

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE TİMOKİNON VE
5-FLUOROURACİLİN TERAPÖTİK ETKİSİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO*
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Eray Metin GÜLER

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıbbi Biyokimya Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

HAZİRAN 2019

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE TİMOKİNON VE
5-FLUOROURACİLİN TERAPÖTİK ETKİSİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO*
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Eray Metin GÜLER
(150606222)

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıbbi Biyokimya Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

HAZİRAN 2019

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 150606222 numaralı Doktora Öğrencisi Eray Metin GÜLER, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE TİMOKİNON VE 5-FLUOROURACİLİN TERAPÖTİK ETKİSİNİN *İN VİTRO* VE *İN VİVO* ARAŞTIRILMASI" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Goncagül HAKLAR**
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Şahabettin SELEK
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Biruni Üniversitesi

Prof. Dr. Engin ULUKAYA
İstinye Üniversitesi

Teslim Tarihi :

Savunma Tarihi : 18 Haziran 2019

Eylül Duru'ma,



ÖNSÖZ

İnsan hayatının en güzel yıllarının büyük bir bölümünü verdiği bu süreci anlatmak zor olmasa gerek..

Akademik hayatımdaki en büyük şansım olan, bir hocadan, bir yol göstericiden çok öte olan ilk deney yaptığımız gün bana dönüp “sen bana ne diyorsun” dediğinde, “hocam” diyoruma karşılık “heh işte bunun hakkını vermem lazım, herşeyi tek tek öğretmem lazım” diyerek beni kendine ve işlerimize dört elle sarılmamamı sağlayan, akademik hayatımın en büyük hocası **Prof. Dr. Abdurrahim Koçyiğit’e**,

Yerli ve milli olarak ülkeye yararın nasıl olacağını gösteren, her gördüğümde keşke onun gibi biyokimya anlatabilsem dediğim, çok çalışmak gerektiğini gösteren, öğreten **Prof. Dr. Şahabettin Selek’e**,

Nasıl anlatsam, nerden başlasam diyebileceğim kendi annemden sonra anne gibi baktığım sevdiğim, tevazu göstermeden bu konuda bu kadar iyi olmamdaki en büyük emeği olan sevgili hocam **Prof. Dr. Güldal Kırkalı’ya**,

Ne zaman aklıma gelse göresim gelen, sesini duymanın bile yettiği, İstanbul’a döndükten sonra elimden tutan, yol gösteren hocalık hatta annelik eden sevgili hocam **Prof. Dr. Goncağül Haklar’a**,

Onun gibi bir insan olabilsem dediğim, tevazuyu, insanlığı, babalığı ve hocalığıyla hayran bırakan, bendeki değeri hep çok olan **Prof. Dr. Ahmet Belce’ye**,

GATA’daki bir kongrede elimden tutup akademik hayatın kollarına atan ve iyi ki de bunu yapan Türkiye’deki Biyokimya’da hocaların hocası **Prof. Dr. Azmi Telefoncu’ya**,

Üniversite yıllarımdaki en büyük desteğim, her daim elini üstümden çekmeyen ve emeklerini hiç unutamayacağım **Prof. Dr. İhsan Yaşa’ya**,

Çocukluğumdan beri yanına ne zaman gitsem, her daim birşeyler öğrendiğim, her kelimesinde kendine hayran bırakan, hayata, insanlara bakışından hep istifade etmem gerektiğine inandığım, çok sevdiğim amcam **Prof. Dr. Yumuşhan Günay’a**,

Tezimin transfeksiyon kısmında bana laboratuvarını açan ve başarılı bir akademisyenin nasıl olmasını gerektiğini gösteren **Prof. Dr. Devrim Gözüaçık’a**,

Kanser çalışmalarına başladığım günden beri her zaman bana destek olan, yol gösteren, kendi öğrencilerinden beni hiç ayırmayan, hangi konu olursa olsun sıkıştığım an yardımlarını unutamayacağım değerli hocam **Prof. Dr. Engin ULUKAYA’ya**

Ne zaman yanına gitsem her daim ilgilenen, ne zaman bir şey istesem hep yardımcı olan tezimin 5-Fluorourasil’in temini ve hayvanların tedavi şeklinde farklı yönler gösteren **Prof. Dr. Hacı Mehmet TÜRK’e**

Bezmialem’in benim için en büyük şanslarından biri olan hem insanlığı ile hem de doktorluğu ile kendine hayran bırakan **Doç. Dr. Mustafa Aziz Hatiboğlu’na**,

Tezimin deney hayvanları kısmındaki benden daha çok işi sahiplenen, yılmadan yorulmadan tüm aşamalarında bana yardımcı olan, haklarını hiç ödeyemeyeceğim sevgili dostlarım **Dr. Mert Çelikten** ve **Tıbbi Biyolog Önder Hüseyinbaş’a** ve tüm Araştırma Merkezi ekibine,

Transgenik hayvanları temin etmemizde yardımlarını benden esirgemeyen, **Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Çakıroğlu’na**,

Sadece tezim için değil, tüm klinik biyokimyasal çalışmalarımı rahatça yapmamı sağlayan, rutin laboratuvar sorumlusu sevgili abim **Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk Özer**'e,

Bezmailem'in bana kattığı en değerli insanlar, ne zaman sıkıntı çıkarsa, ne zaman güzel anılar olsa hep içinde olan, tanımaktan onur duyduğum sevgili dostlarım **Dr. Ecz. Muhammed Yunus Bektay**'a, **Dr. Ecz. Ali Asram Sağıroğlu**'na, **Ecz. Mustafa Gökçe**'ye,

Laboratuvar huzurlu ise işler güzel gider, Koçyiğit Laboratuvarı grup arkadaşlarım **Uzm. Bio. Ezgi Balkan**'a, **Dr. Huri Bulut**'a,

Laboratuvarda bugüne kadar bir şekilde yanımda staj yapan, bilimsellik komitesine gelen, benimle pipet tutan, iki kelam öğrenen ama onların öğrendiği kadar benimde onlardan çok şey öğrendiğim ve tanımaktan hep mutlu olduğum **Hümeysra Nur Kaleli**'ye, **Kübra Bozali**'ye ve hayatın tüm zamanlarında göreceğim küçük kardeş sevgili **Dr. B. Hande Şişman**'a,

Araştırma Merkezi'ndeki ve Yaşam Bilimleri Merkezi'ndeki çalışan ve her zaman her konuda destek olan, aynı yolu paylaştıklarım, değerli arkadaşlarım, dostlarım **Dr. Beyza Göncü**'ye, **Uzm. Mol. Bio. Sevde Hasanoğlu**'na, **Uzm. Bio. Bahar Sarıkamış**'a, **Uzm. Bio. Burcu Özdemir**'e ve **Dr. Sezen Atasoy**'a

Transfeksiyonu o olmazsa öğrenemezdim sevgili **Dr. Yunus Akkoç**'a,

Kanser Araştırmaları konusunda her zaman birbirimize destek çıktığımız, aynı yolun yolcusu olduklarımız; **Koç Üniversitesi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Ege Üniversitesi, Uludağ Üniversitesi, İstinye Üniversitesi, Sabancı Üniversitesi, İstanbul Üniversitesi ve Marmara Üniversitesi**'ndeki ekip arkadaşlarıma ve onların sayın hocalarına,

Hatiboğlu Laboratuvar ekibine başta **Uzm. Fzk. Kerime Akdur, Hem. Ayten Şakarcan** ve **Mol. Bio. Arife Nallı**'ya,

Benim az kahrımı çekmeyen, haklarımı zor ödeyeceğim başta **Cemre Nur Oğul** olmak üzere tüm **Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına ve hocalarına,**

Bitmek bilmeyen bilim aşkların her daim mutluluk duyduğum, ileride iyi yerlere geleceklerine tüm kalbimle inandığım **A. Sadık Gülgeç**'e, **Ahsen Çakır**'a ve **Tunahan Dünder**'a,

Tezimi **9.2017/7** nolu proje ile destekleyen **Bezmailem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi**'ne, çalışanlarına ve hocalarına,

Laboratuvarımızın herşeyi, her işimize koşturan sevgili **Mustafa Karaboncuk**'a,

Olmasaydın olmazdı diyebildiğim, kelimeleri her açıdan kifayetsiz bırakan canım abim **Dr. Mustafa Kesmen**'e,

Ne kadar yazsam, ne kadar teşekkür etsem az olduğunu bildiğim ama hayatımdaki en büyük gücüm, en değerlilerim, o ailenin bir ferdi olmaktan onur ve gurur duyduğum her daim yolundan gideceğim sevgili babam **Erol Güler**'e, sevginin herşeye yeteceğini öğreten canım annem **Tülay Güler**'e ve varlığıyla güçlü olduğum, en değerlim, güzelim **Av. Dilara Gülay Güler**'e,

Şu dünyadaki en büyük şansım, huzurum, deli gibi çalışmaktan hep yalnız bıraktığım, hakkını hiçbir zaman ödememeyeceğim sevgili eşim **Duygu Güler**'e ve ben tezi yazarken o da annesinin karnında ralli yapan güzel kızım **Eylül Duru**'ma,

Teşekkür bir borç bilirim.

Söz uçar, yazı kalır.

Kalması dileğiyle..

Haziran 2019

Eray Metin GÜLER
(Uzman Biyokimyacı)

BEYAN

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

Eray Metin GÜLER
İmza

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	iv
BEYAN	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	x
SEMBOLLER	xiii
TABLO LİSTESİ	xiv
ŞEKİL LİSTESİ	xv
ÖZET	xviii
SUMMARY	xx
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2 Araştırmanın Amacı	1
1.3 Araştırmanın Hipotezleri.....	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Hücre Döngüsü ve Kanser.....	3
2.1.1 Hücre yaşam döngüsü	3
2.1.2 Hücre yaşam döngüsü kontrolü	4
2.1.3 Genetik kararsızlık ve kanser	5
2.2 Kolorektal Kanser	5
2.2.1 Kolorektal kanser epidemiyolojisi.....	7
2.2.2 Kolorektal kanser etiyolojisi.....	7
2.2.3 Kolorektal kanser risk faktörleri.....	8
2.2.3.1 Diyet	9
2.2.3.2 Aile öyküsü	10
2.2.3.3 Ailesel adenomatoz polipozis (AAP).....	10
2.2.3.4 Hereditör non-polipozis kolorektal kanser (HNPCK).....	11
2.2.3.5 Kolonik polipler	12
2.2.3.6 Enflamatuvar bağırsak hastalığı (EBH)	12
2.2.3.7 Davranışsal Risk Faktörleri	13

2.2.4 Kolorektal kanser mekanizması / patofizyolojisi	13
2.2.5 Kolorektal kanser lokalizasyonu	20
2.2.6 Kolorektal kanserin evrelendirilmesi.....	20
2.2.7 Kolorektal kanser progresyonu.....	25
2.2.8 Kolorektal kanser belirtileri.....	25
2.2.9 Kolorektal kanserin yayılım yolları ve metastaz	25
2.2.10 Kolorektal kanserin diferansiyasyonu	26
2.2.11 Kolorektal kanserin biyobelirteçleri	27
2.2.12 Teşhis ve Tedavi	28
2.3 Bitkisel Kökenli İlaçlar	32
2.3.1 Çörek otu	33
2.3.2 Timokinon	34
2.4 5-Fluorourasil	40
2.4.1 5-FU etki mekanizması.....	41
2.4.2 5-FU'nun modülasyonu.....	42
3. MATERYAL ve METOT	44
3.1 Gereç	44
3.1.1 Cihazlar.....	44
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar.....	45
3.1.3 Kullanılan kitler.....	46
3.2 Yöntem.....	47
3.2.1 <i>In vitro</i> deneyler.....	48
3.2.1.1 Hücre kültürü çalışmaları	48
3.2.1.2 Transfeksiyon	49
3.2.1.3 Sitotoksosite Testi	52
3.2.1.4 Hücre ayırma	53
3.2.1.5 Genotoksosite testi	53
3.2.1.6 Apoptoz testleri	55
3.2.1.7 Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) tayini.....	59
3.2.1.8 Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) tayini.....	60
3.2.1.9 Hücre içi glutatyon düzeylerinin ölçümü.....	60
3.2.2 <i>In vivo</i> deneyler	61
3.2.2.1 Zenograft kolon kanseri modeli	61
3.2.2.2 Biyokimyasal analizler	66
3.2.2.3 Doku analizleri	67

3.3 İstatistiksel Analiz	67
4. BULGULAR	69
4.1 Transfeksiyon Kontrol.....	69
4.2 ATP Canlılık Testleri Sonuçları	70
4.3 Hücre içi ROS düzeyleri	72
4.4 Hücre içi glutasyon seviyesi	74
4.5 Mitokondriyal Membran Potansiyeli	76
4.6 DNA Hasarı ölçümü.....	79
4.7 Apoptozun değerlendirilmesi	81
4.7.1 Akridin turuncusu / etidyum bromür çift boyaması	81
4.7.2 Annexin V-FITC boyası ile akış sitometrisinde apoptoz tayini	85
4.8 Hücre Protein Ekspresyonlarının Düzeyleri.....	87
4.9 In Vivo Zenograft Kolon Kanseri Modeli.....	92
4.10 Oksidatif Stres Ölçümleri.....	99
4.11 Serum Enflamasyon ve Büyüme Faktörleri Sonuçları.....	103
4.12 Karaciğer ve Böbrek Fonksiyon Testlerinin Düzeyleri.....	107
4.13 Doku Protein Ekspresyonlarının Düzeyleri.....	108
4.14 Doku TGF β 1 ve VEGF Düzeyleri	109
5. TARTIŞMA	111
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	128
KAYNAKLAR	129
EKLER.....	157
ÖZGEÇMİŞ.....	158

KISALTMALAR

5'DFUR	: 5'-deoksi-5-florouridin
5-FU	: 5-Fluorourasil
AAP	: Ailesel adenomatöz polipozis
AKT	: AKT serin treonin kinaz 1
APC	: Adenomatöz polypozis coli
ARID1A	: AT bakımından zengin etkileşim domaini 1A
Bax	: Bcl-2 ilişkili X
Bcl-2	: B hücre lenfoma 2
BMP3	: Metillenmiş kemik morfogenetik protein 3
BRAF	: B-raf onkogen
BRCA1	: Meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini
BSA	: Sığır serum albümini
BSH	: Blastasidin-S HCl
BTK	: Bilgisayarlı tomografi kolonografi
CA	: Kanser antijen
CO₂	: Karbondioksit
Cdk	: Siklin bağımlı kinaz
CEA	: Karsinoembriyjenik antjen
CHEK1/CHK1	: Kontrol noktası kinaz 1
CIMP	: CpG Ada metilatör fenotipi
CIN	: Kromozom instabilitesi
c-Myc	: Hücresel myc
CTNNB1	:Katenin beta 1
ÇO	: Çörek otu
DHFU	: Dihidrofluorouasil
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DOX	: Doksorubisin
DPD	: Dihidropirimidin dehidrojenaz

EBH	: Enflamatuvar bağırsak hastalığı
EGF	: Epitelyal büyüme faktörü
ERK	: Hücre dışında düzenlenen kinazlar
FAM123B	: Ailesel 123B dizi benzerliği olan gen
FBXW7	: F ve WD7 içeren tekrarlayan domainler
FDUDP	: Forodeoksiridin difosfat
FdUMP	: Florodeoksiridin monofosfat
FdUMP	: Fluorodeoksiüridin monofosfat
FIT	: Fekal immünokimyasal test
FOLFİRİ	: Folik asit, fluorourasil ve irinotekan
FOLFOX	: Oksaplatin, fluorourasil ve irinotekan
FUDP	: Florüridin difosfat
FUMP	: Florüridin monofosfat
FUR	: Feroüridin
FUTP	: Florüridin trifosfat
gFOBT	: Guaiak fekal gizli kan testi
GNAS	: Guanin nükleotit bağlayıcı protein alfa uyarıcı
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GTPaz	: Guanozin trifosfataz
hCG	: İnsan koryonik gonadotropin
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2
hMLH	: İnsan mutL homolog
hMSH	: İnsan mutS homolog
HNPCK	: Herediter non-polipozis kolorektal kanser
IFN	: İnterferon
IGF	: İnsülin benzeri büyüme hormonu
IKKb	: Nükleer faktör kappa-B kinaz
IVIS	: <i>In vivo</i> görüntüleme sistemi
JAK2	: Janus kinaz 2
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
KAT	: Katalaz
KK	: Kolorektal kanser
KNPKK	: Kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser
LDH	: Laktat dehidrogenaz

LRP5	: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör proteini 5
LV	: Lökovrin
MAPK	: Mitojenle aktiveleştirilen bir protein kinaz
MMP	: Mitokondriyal membran potansiyeli
mRNA	: Mesajcı RNA
MSI	: Mikro satelit instabilite
NDRG4	: N-myc downstream regüle edilmiş gen 4 proteini
NFκB	: Nükleer faktör kappa B
NMP	: Nükleer matriks proteini
NP	: Neopterin proteini
NSE	: Nöron spesifik enolaz
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
Plk1	: Polo benzeri kinaz 1
PRPP	: Fosforibosil pirofosfat
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
RNA	: Ribo nükleik asit
RSPO	: R-spodin proteini
SOD	: Süperoksit dismutaz
SRY	: Cinsiyet belirleyici bölge Y
TCF7L2	: Transkripsiyon faktör 2 benzeri 7
TGFβ1	: Dönüştürücü büyüme faktör beta 1
TK	: Timidin kinaz
TP53	: Tümör protein 53
TQ	: Timokinon
TS	: Timidilat sentaz
VEGFA	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü A
VIM	: Vimentin
XIAP	: X'e bağlı apoptoz inhibitör

SEMBOLLER

$\Delta\psi_m$: Mitokondriyal membran potansiyeli



TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 : Kanser moleküler mekanizması.....	14
Tablo 2.2 : Kolorektal kanserde sık görülen genetik ve epigenetik değişiklikler.....	17
Tablo 2.3 : Kolorektal kanser evreleme.....	22
Tablo 2.4 : Kolorektal kanser testlerinin avantaj ve dezavantajları.....	28
Tablo 2.5 : Timokinonun farklı kanser türleri üzerindeki etkisi.....	38
Tablo 2.6 : TQ ile kombine kemoterapi.....	38
Tablo 3.1 : Cihaz listesi.....	44
Tablo 3.2 : Kimyasal listesi.....	45
Tablo 3.3 : Kit listesi.....	46
Tablo 3.4 : Transdüksiyon karışımı.....	49
Tablo 3.5 : Deney grupları.....	62
Tablo 4.1 : IC ₅₀ değerleri.....	72
Tablo 4.2 : Hücre içi maksimum ROS düzeyi.....	74
Tablo 4.3 : Karaciğer ve Böbrek Fonksiyon Testleri.....	107

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: Hücre yaşam döngüsü ve fazları.	3
Şekil 2.2	: Kolorektal kanser.	6
Şekil 2.3	: Kolorektal kanser risk faktörleri.....	9
Şekil 2.4	: Kolorektal kanserde sinyal yolları.....	14
Şekil 2.5	: Kolorektal kanserin lokalizasyonu.	20
Şekil 2.6	: Kolon duvarı.....	21
Şekil 2.7	: Kolorektal kanser oluşumu ve evreleme.	24
Şekil 2.8	: Kolorektal kanser metastazı.	26
Şekil 2.9	: Tıbbi bitki ilaçlarının keşfi ve gelişimi.	33
Şekil 2.10	: Siyah tohumlar ve çörek otu çiçeği.	34
Şekil 2.11	: Timokinonun moleküler yapısı.	34
Şekil 2.12	: Timokinonun etki ettiği farklı hücresel mekanizmalar.	35
Şekil 2.13	: Farklı hedefe yönelik tedavi yolları.....	39
Şekil 2.14	: 5-FU'nun yapısı.	41
Şekil 2.15	: 5-FU metabolizması.	42
Şekil 2.16	: 5-FU modülasyonu.	43
Şekil 3.1	: Deneysel aşamalar 1.....	47
Şekil 3.2	: Deneysel aşamalar 2.....	47
Şekil 3.3	: Transfeksiyon aşamaları ve kontrol.....	51
Şekil 3.4	: ATP sitotoksosite ölçüm prensibi.....	52
Şekil 3.5	: DNA Hasarı (Comet Assay).....	54
Şekil 3.6	: Canlı, apoptotik ve nekrotik hücreler.....	56
Şekil 3.7	: Annexin V-FITC kit çalışma prensibi.....	57
Şekil 3.8	: Hücre içi ROS ölçüm prensibi.....	59
Şekil 3.9	: Mitokondriyal membran potansiyel.....	60
Şekil 3.10	: Hücre içi glutatyon ölçüm prensibi.....	61
Şekil 3.11	: Deneyin <i>in vivo</i> aşamaları.....	63
Şekil 3.12	: Deneysel tüm aşamalar özet.....	64
Şekil 3.13	: IVIS luminometrik hayvan görüntüleme prensibi.....	65
Şekil 3.14	: Tümör ve serum ile yapılan deneysel aşamalar.....	65
Şekil 4.1	: Transfeksiyon kontrol (Floresans mikroskop).....	68
Şekil 4.2	: Hücre transfeksiyon kontrol IVIS.....	69
Şekil 4.3	: Timokinon'un ATP canlılık grafiği.....	70
Şekil 4.4	: 5-Fluorourasil'in ATP canlılık grafiği.....	70
Şekil 4.5	: Kombine tedavinin canlılık grafiği.....	71
Şekil 4.6	: Timokinon'un sağlıklı ve kanser hücreleri üstünde ROS'a etkisi.....	72
Şekil 4.7	: 5-Fluorourasil'in sağlıklı ve kanser hücreleri üstünde ROS'a etkisi.....	72
Şekil 4.8	: Kombine tedavinin sağlıklı ve kanser hücreleri üstünde ROS'a etkisi.....	73

Şekil 4.9 : Timokinon'un hücre içi glutatyon düzeylerine etkisi.....	74
Şekil 4.10 : 5-Fluorourasil'in hücre içi glutatyon düzeylerine etkisi.....	74
Şekil 4.11 : Kombine tedavinin hücre içi glutatyon düzeylerine etkisi.....	75
Şekil 4.12 : Timokinon'un mitokondriyal membran potansiyeli üstüne etkisi.....	76
Şekil 4.13 : 5-Fluorourasil'in mitokondriyal membran potansiyeli üstüne etkisi.....	76
Şekil 4.14 : Kombine tedavinin mitokondriyal membran potansiyeli üstüne etkisi....	77
Şekil 4.15 : Mitokondriyal membran potansiyeli - akış sitometrisi.....	77
Şekil 4.16 : Timokinon'un DNA hasarı üzerine etkisi.....	78
Şekil 4.17 : 5-Fluorourasil'in DNA hasarı üzerine etkisi.....	79
Şekil 4.18 : Kombine tedavinin DNA hasarı üzerine etkisi.....	79
Şekil 4.19 : DNA Hasarı görüntüleri (LoVo – kombine tedavi).....	80
Şekil 4.20 : Timokinon'un apoptoz üzerine etkisi.....	81
Şekil 4.21 : 5-Fluorourasil'in apoptoz üzerine etkisi.....	81
Şekil 4.22 : Kombine tedavinin apoptoz üzerine etkisi.....	82
Şekil 4.23 : Apoptoz görüntüleri.....	82
Şekil 4.24 : Timokinon'un apoptoz üzerine etkisi.....	83
Şekil 4.25 : 5-Fluorourasil'in apoptoz üzerine etkisi.....	84
Şekil 4.26 : Kombine tedavinin apoptoz üzerine etkisi.....	84
Şekil 4.27 : Apoptoz - Akış sitometrisi görüntüsü (LoVo - kombine tedavi).....	85
Şekil 4.28 : β -aktin ekspresyonları.....	86
Şekil 4.29 : <i>In vitro</i> tekli ve kombine tedavide Bax proteininin ekspresyonu.....	86
Şekil 4.30 : <i>In vitro</i> tekli ve kombine tedavide Bcl-2 proteininin ekspresyonu.....	87
Şekil 4.31 : <i>In vitro</i> tekli ve kombine tedavide Kaspaz-3 proteininin ekspresyonu....	87
Şekil 4.32 : <i>In vitro</i> tekli ve kombine tedavide Kaspaz-9 proteininin ekspresyonu....	88
Şekil 4.33 : <i>In vitro</i> tekli ve kombine tedavide p21 proteininin ekspresyonu.....	88
Şekil 4.34 : <i>In vitro</i> tekli ve kombine tedavide p53 proteininin ekspresyonu.....	89
Şekil 4.35 : <i>In vitro</i> deney genel sonuçlar 1.....	89
Şekil 4.36 : <i>In vitro</i> deney genel sonuçlar 2.....	90
Şekil 4.37 : Zenograft ile kolon kanseri oluşumu ve tedavi süreci.....	90
Şekil 4.38 : Hayvanlarda D-Lusiferin ışına zaman optimizasyon grafiği.....	91
Şekil 4.39 : Farklı günlerdeki tümör gelişim süreci (IVIS görüntüleri).....	91
Şekil 4.40 : Farklı gruplardaki tümör gelişimi (Kumpas ile ölçüm).....	92
Şekil 4.41 : Gruplara göre tümör büyüklüklerinin IVIS görüntüleri.....	92
Şekil 4.42 : Günlük tedavi görüntüleri (IVIS).....	93
Şekil 4.43 : Grupların tedavi öncesi ve sonrası tümör yoğunluğu (IVIS).....	94
Şekil 4.44 : Grupların tedavi öncesi ve sonrası tümör büyüklüğü (Kumpas).....	95
Şekil 4.45 : Tümör rezeksiyonları.....	95
Şekil 4.46 : Tümör dokularının makroskopik görüntüsü.....	96
Şekil 4.47 : Gruplara göre tümörlerin ağırlıkları.....	96
Şekil 4.48 : Gruplara ait tümörlerin patolojik skorları.....	97
Şekil 4.49 : Serum total tiyol düzeyi.....	98
Şekil 4.50 : Serum natif tiyol düzeyi.....	98
Şekil 4.51 : Serum disülfid düzeyi.....	99
Şekil 4.52 : Serum total anti-oksidan seviye.....	100
Şekil 4.53 : Serum total oksidan seviye.....	100
Şekil 4.54 : Serum oksidatif stres indeksi.....	101
Şekil 4.55 : Serum IL1 β düzeyi.....	102
Şekil 4.56 : Serum IL6 düzeyi.....	102

Şekil 4.57 : Serum TNF α düzeyi.....	103
Şekil 4.58 : Serum HsCRP düzeyi.....	103
Şekil 4.59 : Serum VEGF düzeyi.....	104
Şekil 4.60 : Serum TGF β 1 düzeyi.....	104
Şekil 4.61 : Tümör dokusu Bax, Bcl-2 ve kaspaz-3 protein ekspresyonları.....	106
Şekil 4.62 : Tümör dokusu Kaspaz-9, p21, p53 protein ekspresyonları	107
Şekil 4.63 : Tümör dokusu TGF β 1 düzeyi.....	107
Şekil 4.64 : Tümör dokusu VEGF düzeyi.....	108
Şekil 4.65 : <i>In vivo</i> genel deneysel sonuçlar.....	108



**KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE TİMOKİNON VE 5-
FLUOROURACİLİN TERAPOTİK ETKİSİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO*
ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Kanser, dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kolon kanseri, gelişmiş ülkelerde kadınlarda ve erkeklerde sırasıyla 2 ve 3. sırada yer alan en yaygın görülen kanser türlerinden biridir. Kolon kanserinde rutin tedavi olan 5-Fluorouracil'in (5-FU) %30 başarısı alternatif tedavi yöntemleri arayışına neden olmuştur. Son yıllarda bitkisel kaynaklı doğal etken maddelerin kanser tedavisi üzerinde etkileri yanında konvansiyonel tedavilerle kombine edilmesi ile ilgili araştırmalar yoğunlaşarak sürmektedir.

Bu çalışmada amacımız, rutin tedavide kullanılan 5-FU ile *Nigella sativa*'nın etken maddesi Timokinon'nun (TQ) kolon kanseri üzerine kombine tedavisinin sitotoksik, genotoksik, apoptotik ve anti-kanser etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle araştırılması ve olası etki mekanizmaların aydınlatılmasıdır.

Kolon kanser hücrelerine (LoVo) ilk olarak transfeksiyon ile Lusiferaz geni transfekte edildikten sonra hücre kültürü ortamında farklı konsantrasyonlarda TQ, 5-FU ve kombinasyonlarına maruz bırakıldı. 24 saat inkübasyondan sonra ATP yöntemiyle luminometrik olarak sitotoksosite, comet assay yöntemi ile DNA hasarı, luminometrik yöntem ile hücre içi glutatyon düzeyi, florometrik yöntem ile mitokondriyal membran potansiyeli, akridin turuncusu/etidyum bromür boyası ile floresans mikroskopta apoptoz, *annexin V-FITC* boyası ile akış sitometrisinde apoptoz, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu *western blot* yöntemiyle çalışıldı. Kontrol, TQ, 5-FU ve kombine olmak üzere beş grup *nude* fareye transfekte LoVo hücreleri zenograft yöntem ile subkutan olarak enjekte edildi. 3 hafta sonra oluşturulan tümörlerin tedavisine geçilip, yalnız TQ, yalnız 5-FU ve kombine gruplarına 3 hafta boyunca tedavi uygulandı. Tedavi sonucunda *in vivo* canlı hayvan görüntüleme sistemi ve kumpasla tümör boyutları ölçüldü. Ayrıca tedavi bitiminde alınan kanlarda oksidatif stres ve enflamasyon belirteçleri incelendi. Alınan doku örneklerinde de büyüme faktörleri ve vaskülerizasyon belirteçleri incelendi.

In vitro ortamda LoVo hücreleri üzerinde TQ ve 5-FU ile yapılan tekli terapiye göre kombine terapilerin, tekli tedaviye göre düşük dozlarının sitotoksisiteyi, DNA hasarını, apoptozu ve hücre içi reaktif oksijen türlerinin düzeylerini arttırırken, mitokondriyal membran potansiyelini ve glutatyon düzeylerini düşürdüğü tespit

edilmiştir. Ayrıca anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonu düşerken apoptotik proteinler Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-9, P-53 ve P-21'in protein ekspresyonu artmıştır. Zenografik yöntemle oluşturulan *in vivo* kolon kanserinde ise kombine tedavinin tekli terapilere göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Tümör boyutu küçülürken, dokuda TGFβ1 düzeyi ve vaskülerizasyon belirteci VEGF düzeyleri azalmıştır. Tedavi sonrası alınan plazmalarda pozitif kontrole göre oksidatif stres düzeyleri düşmüştür.

Elde ettiğimiz veriler, rutin tedavide kullanılan 5-FU yanında bitkisel kökenli TQ'nun kombine kullanımının hem *in vitro* hem de *in vivo* oluşturulan kolon kanserinde anti-tümör etkilerini arttırdığını ve tedaviye bağlı yan etkileri azalttığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Timokinon, 5-Fluorourasil, kolon kanseri, IVIS



INVESTIGATION OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* THERAPOTIC EFFECT OF THYMOQUINONE AND 5-FLUOROURACIL ON COLON CANCER CELLS

SUMMARY

Cancer is a major public health issue worldwide. In developed countries, colon cancer is the 2nd most common observed type of cancer in women and the 3rd most common in men. The 30% success of 5-FU, which is a routine treatment for colon cancer, has led the researchers to seek different treatment modalities. Therefore, plant-derived natural substances have become the target of a significant amount of attention. In recent years, increasing efforts have been made to discover the effects of combined plant-derived substances with conventional therapy methods on cancer.

This study aimed to investigate the cytotoxic, genotoxic, apoptotic, and anti-cancer effects of thymoquinone – the active ingredient of *Nigella sativa* – and 5-Fluorouracil in combination against *in vitro* and *in vivo* colon cancer while illuminating possible action mechanisms.

Initially, Luciferase transfection was performed in LoVo colon cancer cells to which TQ, 5-FU, and combinations of different concentrations were given, and they were incubated for 24 hours. Luminometric cytotoxicity by ATP method, DNA damage by comet assay, luminometric intracellular glutathione level, fluorometric mitochondrial membrane potential, apoptosis by fluorescence microscopy with acridine orange/ethidium bromide dye, apoptosis in flow cytometry by annexin V-FITC dye, expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins with western blot method have been investigated. Transfected LoVo cells have been injected subcutaneously to five groups of nude mice for the following: control, TQ, 5-FU, and combined. 3 weeks of treatment with TQ, 5-FU, and combined therapy have been initiated 3 weeks after the injection. At the end of this period, tumor size was measured with the IVIS device and caliper. Also, oxidative stress and inflammation markers were examined in blood and growth factors, and vascularization markers were examined in tissue samples at the end of the treatment.

Compared to the monotherapy with TQ and 5-FU on colon cancer, combined treatment has been found in low doses to increase cytotoxicity, DNA damage, apoptosis and intracellular reactive oxygen species in the cell culture studies, while decreasing mitochondrial membrane potential and glutathione levels. Also, the expression of apoptotic proteins Bax, Caspase-3, Caspase-9, p53, and p21 increased while the anti-apoptotic protein Bcl-2 expression decreased. Combination therapy was found to be more effective than mono therapies *in vivo* colon cancer, which was formed by the

xenographic method. While tumor size decreased, TGF β 1 levels and VEGF levels – a vascularization indicator – were decreased in the tissue. In the plasma taken after treatment, oxidative stress levels decreased compared to the positive control group.

According to the data obtained through this study, in colon cancer TQ has been found to increase the anti-tumor properties of the routine therapy of 5-FU *in vitro* and *in vivo* while diminishing the side effects profile.

Keywords: Thymoquinone, 5-Fluorouracil, colon cancer, IVIS



1. GİRİŞ ve AMAÇ

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Kolorektal kanser (KK), 2018 yılında dünyada beş yıllık sağkalımı %50- 55'lerde olan; akciğer, karaciğer, meme ve prostat kanserinden sonra en sık rastlanan malignitedir. Metastatik kolorektal kanserin primer metastaz yeri karaciğerdir ve kansere bağlı ölümlerin ilk sebebidir. Metastatik kanserlerin biyolojik özellikleri tümörden tümöre değişmesinin yanında mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Tedavide kullanılan anti-neoplastik ilaçların yan etkisinden dolayı farklı tedavi yollarının aranmasına neden olmuştur ve ilk akla gelen bitkisel kaynaklı etken maddelerin tedavide kullanılabilirliğidir. Bitkisel kaynakların içerdikleri yüksek fenol ve flavanoid içerikli bileşikler anti-oksidan moleküller olmalarına rağmen, ortamda serbest demir ve bakırın varlığında yüksek dozlarının pro-oksidan etki göstermesi, kanser tedavisi için bir seçenek oluşturmaktadır. Son yıllarda kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerin etkinliğini artırmak ve yan etkilerini azaltmak için, kullanılan kemoterapötik ilaç ile birlikte fitoterapötik etken maddelerin kombinasyonlarının birlikte verilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

1.2 Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, Dünya ve Türkiye genelinde sıklığı açısından önemli yeri olan kolorektal kanser üzerine çörek otunun etken maddesi olan timokinon ve rutin tedavide kullanılan anti-neoplastik bir ajan olan 5-fluorourasil'in kombine tedavisinin anti-tümör etkilerini, *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile birlikte, transfekte hücrelerin transgenik *nude* farelere zenograft ile oluşturulan *in vivo* kolorektal kanser modelinde etkinliğini göstermektir.

1.3 Araştırmanın Hipotezleri

Projemizin hipotezini şu şekilde açıklayabiliriz: ‘‘Kolon kanserinde timokinon ve 5-flourourasil’in kombine tedavisi sinerjik etki yaratarak duşuk dozda yüksek anti-tümör etki gösterir.

İleri sürdüğümüz bu hipotezimizi doğrulamak için hedeflerimizi aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz.

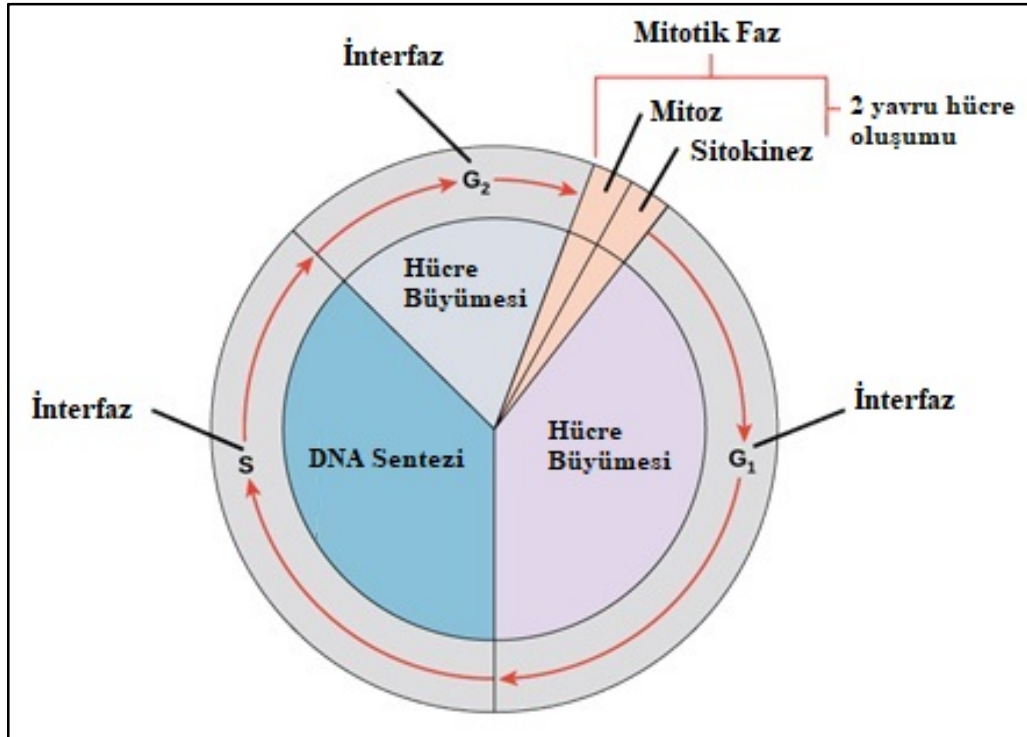
- o İlk olarak insan metastatik kolon kanser hücre hattına (LoVo) Lusiferaz gen (Luc) transfeksiyonu yapılması
- o Transfekte LoVo (LoVo-Luc+) hücre hattına tekli ve kombine bir şekilde uygulanan timokinon ve 5-flourourasil’in sitotoksik, genotoksik ve apoptotik aktivitelerinin incelenmesi
- o Transgenik *nude* farelere LoVo-Luc+ hücrelerin zenografik olarak enjekte edilmesi ve tümör oluştuktan sonra *canlı hayvan görüntüleme sistemi* (IVIS) ile görüntülenmesi. 3 hafta boyunca tekli ve kombine bir şekilde timokinon ve 5-flourourasil tedavisi yapılıp tümör boyutlarının görüntülenmesi
- o Kombine tedavide etkinliğinin *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmesi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hücre Döngüsü ve Kanser

2.1.1 Hücre yaşam döngüsü

Hücrenin interfaz (bölünmeye hazırlık) ve mitoz (bölünme) evrelerinin birbirini takip ettiği süreç hücre yaşam döngüsüdür. Bu fazlar G₁, S, G₂ ve M'dir. Bölünme sürecinin ilk fazı G₁, bölünmenin sonlanması ile DNA sentezinin (S) başlangıcı arasındaki sürece interfaz denir. Bu evrede DNA sentezine gerekli olan protein sentezleri ve aktivatörler için hazırlık yapılır. DNA sentez fazında (S) replikasyon yapılır ve kromozom sentezi tamamlanıp hücre diploid özellik kazanır. Süreç tamamlandıktan sonra hücre mitoz hazırlık evresi olan G₂ fazını başlatır. Bu süreçte mikrotübüller sentezlenir. Bir sonraki faz olan mitoz (M)'da ise karyokinez (nükleus bölünmesi) ve sitokinez (sitozol bölünmesi) gerçekleşir (Şekil 2.1). Kardeş kromatitlerin birbirlerinden ayrılarak mikrotübüller vasıtasıyla farklı kutuplara taşındığı evre bu evredir [1, 2].



Şekil 2.1 : Hücre yaşam döngüsü ve fazları.

2.1.2 Hücre yaşam döngüsü kontrolü

Hücre proliferasyonu, yaşamın en temel faaliyeti olduğundan iyi korunmuş bir mekanizma ile düzenlenmelidir. 2001 yılında, üç farklı türdeki hücre döngüsünün kilit düzenleyicilerinin keşfi için Nobel ödülü verildi: bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae* ve *Schizosaccharomyces pombe* ve bir denizkestanesi olan *Arbacia* ile olan hücre döngüsü çalışmaları Nobel ödülü getirdi [3]. Bu keşifler bir araya geldiğinde, hücre döngüsünün ana düzenleyici proteinleri olan siklin ve siklin bağımlı kinazın (Cdk) önemini ortaya çıkardı. Bugün, birkaç siklin kompleksi hücre döngüsünün farklı aşamalarının düzenleyicileri olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, yıllar boyunca bir düzineden fazla siklin ve siklin bağımlı kinaz tanımlanmıştır [4].

Memeli hücrelerinde en az iki siklin G2 fazında bulunur: Siklin A2, ekspresyonu S fazının başlangıcında indüklenir ve siklin B1 üretimi mitotik giriş öncesi G2'de indüklenir. Aynı zamanda, her iki siklin ile kompleksler oluşturabilen iki Cdk vardır: Cdk2-Siklin A kompleksi olarak S fazının ilerlemesi için gerekli olan Cdk2 ve Cdk1-Siklin B kompleksi olarak mitozun tetiklenmesi için gerekli olan Cdk1'dir. Bazı organizmalarda Cdk-Siklin A, mitozu [5] teşvik etmek için gerekli olmasına rağmen, insan hücrelerinde önemi hala tartışılmaktadır.

Hücre döngüsü düzenlemesinin önemli bir özelliği, periyodik olarak gerçekleşmesinin gerekmesidir. Bir döngü, başkasının başlaması için bitmelidir. Bir aşama diğerinden önce gelmeli ve ilerleme tek yönlü olmalıdır. Bu, Cdk aktivitesinin bir osilatörü olan siklinlerin üretim ve indirgenmesi ile gerçekleştirilir [6]. Bu mekanizma, hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve hücre döngüsünün yeniden başlatılmasında protein bozulmasını önemli bir yere koyar [7].

Günümüzde mitoz ve interfazda çok önemli fonksiyonlar oynayan, siklinler ve siklin bağımlı kinaz komplekslerinin aktivitesini daha da düzenleyen, artıran veya baskılayan daha fazla hücre döngüsü düzenleyicisi ortaya çıkmıştır. Tüm hücre döngüsü düzenleyicileri, belirli bir ekspresyon düzeyine sahip sağlam bir sistem oluşturan ileri besleme ve geri besleme döngüleri ile birbirine çok bağlıdır [8]. Özellikle yakın zamanda tanımlanmış iki kinaz familyası, hücre döngüsü düzenlemesinde rol oynamaktadır: Polo benzeri kinazlar ve Aurora kinazlar. Her ikisi de mitozda mutant fenotiplerden isimler almıştır. İlgili araştırmalar hala devam etmektedir.

2.1.3 Genetik kararsızlık ve kanser

Kanser, hücrede genetik değişikliklerin birikmesinden kaynaklanan bir hastalıktır. Çevresel karsinojen (kimyasallar, virüsler, radyasyonlar) maruz kalmak, tüm insan kanserlerinin en az %80'inin oluşumuna katkıda bulunur [9]. DNA hasarına maruz kalmayı takiben bir hücre için üç olası sonuç vardır: (a) hücre hasarı onarabilir; (b) hücre ölebilir veya (c) hasarlı DNA'nın replikasyonu ile sonuçlanan kalıcı bir mutasyonla hayatta kalabilir.

DNA hasarı, G1/S veya G2/M geçişlerinde hücre çoğalması, DNA replikasyonu veya kromozom ayrılması sırasında meydana gelen hataları gidermeye izin verir [10]. P53 proteini, G1'de hücre döngüsünün durmasıyla hasarlı DNA'nın tamirine izin vermek için bir kontrol noktası görevi görür [11]. Genomik bütünlüğün korunmasında rol oynayan genler - örneğin DNA uyumsuzluğu onarım genleri, p53 ve BRCA1 - aynı zamanda “koruyucu” genler olarak da adlandırılır. DNA hasarlarına karşı koruma sağlayan hücresel mekanizmalardaki kusurlar, genetik dengesizliği artırır, bu nedenle genetik hataların birikmesine neden olur ve sonuçta tümör gelişmesine neden olabilir. Etkisizleştirme mekanizmaları kalıtsal değişiklikler, edinilmiş mutasyonlar ve epigenetik olaylar olabilir.

2.2 Kolorektal Kanser

Kolorektal kanserin (KK) %75'i kolonda meydana gelirken %25'i de rektumda meydana gelmektedir (Şekil 2.2). 2019 yılı verilerine göre dünyada (başta Amerika, Avrupa, Kore, Çin, Avustralya ve Yeni Zelanda olmak üzere) kadınlarda meme kanserinden sonra en çok görülen ikinci büyük kanserken, erkeklerde prostat ve akciğer kanserinden sonra en çok görülen üçüncü büyük kanserdir. Gelişmiş ekonomiye sahip ülkelerde kadınlarda meme, kolorektal ve akciğer kanseri; erkeklerde de prostat, akciğer ve kolorektal kanser en çok görülen kanserlerdir. Gelişmekte olan ülkelerde ise, kadınlarda meme, serviks ve akciğer kanseri ilk sıraları alırken, erkeklerde ise akciğer, karaciğer ve mide kanseri en çok görülen kanserlerdir [12, 13].

Kansere karşı erken bilinçlenme, yaşam tarzının düzeltilmesi, ileri tanı teknikleri kullanarak erken teşhis ve tedavi ile KK insidansı Amerika ve Avrupa'da düşerken, dengesiz beslenme, alkol, sigara kullanımı ve obezite gibi nedenlerden dolayı Asya ve Ortadoğu'da artmaktadır.

Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) 2018 verilerine göre, 2018 yılında kanser kaynaklı ölümlerin %8,3'ü KK nedenli ve 5 yıllık sağ kalım oranı dünya genelinde %64,5 olarak belirtilmiştir [14].

İnsanlarda KK gelişimi genetik ve çevresel faktörlere dayanır. KK tanısı alan hastaların %30'a kadar yakınında ailesel kanser hikayesi vardır ve bu durum da genetik faktörleri işaret etmektedir. Genetik geçişli KK'yı 2 başlığa ayırabiliriz; a) Kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser (KNPKK): %5-10 ve b) Ailesel adenomatöz polipozis (AAP): %2 [15].

KK'nın yapılan çalışmalara göre birçok risk faktörü vardır. Bunlar, 45 yaşın üstünde obezite, inaktif bir fiziksel yaşam, alkol ve sigara kullanımı, düşük kalsiyum ve vitamin alımı, yoğun bir kırmızı et tüketimi, tahıllı ve lifli gıdalarla beslenmeme, meyve ve sebze tüketiminden kaçınma, polip ve KK geçmişi, aile hikayesi, diyabet öyküsü, crohn ve ülseratif kolit gibi enflatuvar bağırsak sorunu yaşamış olanlar yüksek KK riskini taşırlar. Literatürde asetilsalisilik asit (Aspirin) gibi nonsteroid anti-enflamatuvar ilaçların düzenli kullanımında KK riskini azaltan çalışmalar olmasına rağmen bu ilaçlar mide kanamasını tetiklediğinden dolayı KK'nın profilaktif tedavisinde önerilmemektedir. Ayrıca KK'lı kadınlarda östrojen ve progesteron ile hormon tedavisi yapılmasını gösteren çalışmalar mevcut olmasına rağmen meme kanseri, miyokardiyal enfarktüs ve inme gibi riskleri olduğu için tedavide önerilmemektedir [14].



Şekil 2.2 : Kolorektal kanser.

2.2.1 Kolorektal kanser epidemiyolojisi

KK, dünyadaki değişik coğrafi bölgelerde farklı oranlarda rastlanan bir kanser türüdür. Endüstrinin geliştii Amerika ve Avrupa'da hem ortalama yaşam süresinin artması hem de diyet ile çevresel faktörler insanlarda KK riskini arttırmaktadır [16].

İnsanların düşük riskli bölgelerden yüksek riskli bölgelere göç etmesi KK'ya yakalanma risklerini arttırmaktadır. Çünkü çevresel faktörler ve diyet bu değişen coğrafi koşullardan kaynaklanmaktadır.

Sporadik KK gelişiminde yaş en önemli risk faktörüdür. İnsidans 45 yaşından sonra artmaya başlar, olguların neredeyse %95'i 50 yaş ve sonrasıdır [16].

KK prevalansı dünya genelinde 13-14/100.000'tür. Rektum kanserinde beyaz ırk ağırlıklıyken, kolon kanserlerinde ırk ve cinsiyet farkı yoktur [17].

Dünyada 1980'lerin ortalarına kadar KK'ya yakalanma oranı artarken 1990'a yaklaştıkça bu oranda bir yavaşlama ve gerileme eğilimine girilmiştir. Bunun nedeni toplumun bilinçlenmesi, kanser tarama, düzenli beslenme ve yaşam şekli ile varolan poliplerin çıkartılması olarak belirtilmiştir [18].

Kolorektal kanser gelişme riski, ilerleyen yaşla birlikte artar. Hastalık tanısı alan kişilerin %90'ından fazlası 50 yaşından büyüktür ve tanı sırasındaki ortalama yaş 64'tür. ABD'de, 75 yaşından büyük popülasyondaki en yaygın kanserdir. 65 ile 85 yaş arası insanlarda KK gelişme riski genç popülasyona göre 6 kat fazladır [19].

70 yaş ve üstü hastalarda KK'nın tanısı erken evrede olurken, 40 yaş gibi daha genç hastalarda ise geç tanı ve agresif seyir izlenir [20].

2.2.2 Kolorektal kanser etiyolojisi

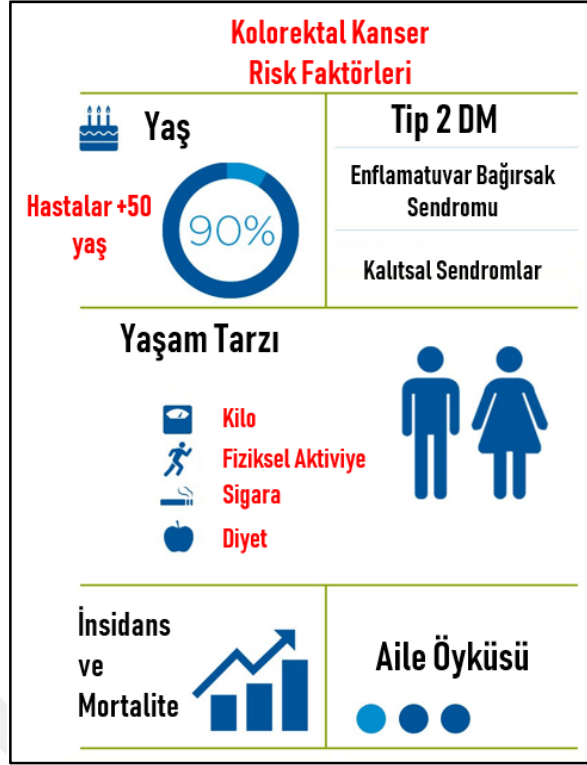
KK vakalarının neredeyse tamamı adenokarsinomlardır. Adenokarsinom kökenlilerin dışındaki tüm tümörler toplamın sadece %3-5'ini oluşturur. Skuamöz karsinomlar %35-40 ve kolonun karsinoid tümörleri ise %30-35 arasında görülür. Anal kökenli transizyonel tümörler, çekum ve rektum kökenli lenfomalar (%15 - primer) ile sarkomalar (%5 - kaposisarkom, leyimiyosarkom ve leyimyom) ve melanomlar (%2) çok az görülür. Granüler mybolastom, nörofibrom, hemanjiyon ve lenfanjiyom ise çok nadir görülmektedir [21].

KK genellikle yavaş ve uzun vadede gelişim gösterir. Kanser meydana gelmeden önce rektum ya da kolonun iç katmanlarında doku kökenli kanser olmayan polipler gelişir. Bu anormal gelişen polipler benign ya da malign olabilir. Bu tamamıyla polibin türüne göre değişim göstermektedir. Adenokarsinom kökenli gelişen KK rektum ve kolonda mukus üreten glandula hücrelerinden gelişim gösterir. Karsinoid kökenli gelişen KK'da bağırsaktaki hormon üreten hücrelerden köken alır. Stromal tümörlerde ise kolon duvarında hücreler farklılaşarak malign ya da benign olarak gelişir. İnsidansı düşük olan sarkomalar ve lenfomalar bağ dokudan ve immün sistemden köken alarak rektum ve kolona ulaşabilirler [22]. Lynch sendromu, ailevi kolon polipozis ve herediter adenom sendromu gibi bazı KK'lar haricinde bu kanser genetik kökenli değildir. KK gelişim riski adenom sayısı ve büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Rezeksiyon sonrası bu oran azalmaktadır. Kolondaki ülseratif kolit, crohn ya da idiyopatik bağırsak hastalıkları gibi enflamatuvar hastalıklar adenom gelişimi için yüksek bir risk oluşturur. Ayrıca kript sayısındaki azalma, düzensizlik, nükleus genişlemesi gibi değişimler kolon mukozasında displazik sonuçlar doğurmaktadır [23]. KK'da rezeksiyon sonrası tekrar gelişim oranı %10-12'dir. Radyasyon KK için bir risk faktörüdür. Radyoterapi sonrası gelişen KK'da karakteristik özellik yüksek miktarda müsin üretmesidir [24].

Yapılan çalışmalarda kalori ve lipit bakımından düşük, fiber ve lif bakımından yüksek diyetle beslenen kişilerde kanser gelişim riskinin az olduğu gösterilmiştir. Diyetteki lipit miktarı kolona gelen safra asidini arttırmakta ve bunun bir tetikleyici faktör olduğu düşünülmektedir [25].

2.2.3 Kolorektal kanser risk faktörleri

KK gelişimindeki risk faktörleri arasında; çevresel faktörler, aile öyküsü, diyet, adenom-karsinom öyküsü, yaş ve enflamatuvar bağırsak hastalığı gibi durumlar sayılabilir (Şekil 2.3) [26].



Şekil 2.3 : Kolorektal kanser risk faktörleri.

2.2.3.1 Diyet

Diyetlerinde yağ tüketimi düşük olan toplumlarda KK görülme oranı azdır. KK görülme sıklığı yüksek olan Avrupa ve Amerika’da günlük kalorinin yarısından fazlası yağdan karşılanırken, görülme oranı düşük olan toplumlarda günlük kalorinin sadece %10-15’i yağdan karşılanmaktadır.

Diyetle alınan yağlar karaciğerde safra asidi ve kolesterol sentezinde artışa neden olur. Kolonda bulunan bakteriler ise bu safra asidini ve kolesterolü sekonder metabolitlere ve toksik metabolitlere dönüştürür. Bu çıkan metabolitler kolon mukozasında hasar yaparken aynı zamanda epitel hücrelerin proliferasyonunu artırır. Son yapılan çalışmalar tavuk ve balık eti yerine kırmızı et tüketen toplumlarda KK insidansının arttığı gözlenmiştir [27-29].

Epidemiyolojik çalışmalar KK riskinin sebze ve meyve gibi lifli gıdaların tüketimi ile azaldığını göstermiştir. Diyetle alınan lif, gaita hacmini ve buna bağlı olarak geçiş hızını arttırarak intraluminal karsinojenlerin mukoza ile temasını azaltır. Ayrıca lifli gıdalar, bağırsakta metabolize olan sekonder safra asitlerini ve kolesterol metabolitlerinin konsantrasyonunu azaltarak zararlı etkilerini minimize eder [30, 31].

2.2.3.2 Aile öyküsü

Kolorektal karsinoma genellikle sporadik, kalıtsal veya ailesel olmak üzere 3 paternden oluşur. KK tanısı almış vakaların %70-75'ini sporatik KK'lar, %20-25'ini de aile öyküsü olan vakalar oluşturur. Bir hasta, 60 yaşından önce kolon kanseri veya kolon polipleri ile teşhis edilmişse ya da akrabalarında kolon kanseri ve öyküsü varsa kolon kanseri öyküsü olduğu kabul edilir. Literatürde bazı çalışmalarda, birinci derece akrabalarda kolon kanseri olmasının sonuçları ya risk içermemekte ya da 6-8 kat daha fazla risk içermekte gibi uyumsuz veriler içermektedir [32-35]. St. John ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, KK tanısı alan 7493 birinci derece yakını olan 523 kişide kanser tanısı yapılmıştır [36].

Yapılan çalışmalar KK risk oranının, ailede bir kişide varsa 1,8 kat, ailede iki kişide varsa 5,7 kat olduğu sonucuna varmıştır. Ayrıca etkilenen aile üyelerinin 55 yaşından küçük olması riski 3 kat, 45'ten küçük olması riski 5 kat arttırmaktadır.

Ayrıca araştırmalar kanser riskinin cinsiyet, hastalık bölgesi ve kanser türünden bağımsız olduğu sonucunu göstermiştir. Ailesel KK için genetik mutasyon olup olmadığını belirleyen birçok çalışma yapılmıştır; özellikle Aşkenazi Yahudileri'nde görülen ailesel kolon kanseri patogenezini anlamaya odaklanılmıştır [37, 38].

Avrupa Yahudi kökenli bireylerin yaşam boyu KK risklerinin %10-15 olduğu bildirilmektedir. Laken ve arkadaşları, KK teşhisi konan Aşkenazi Yahudileri'nin %10-12'sinde I1307K APC *germline* mutasyonu tanımlamışlardır. Bu mutasyona sahip sağlıklı bireylerde KK'ya yakalanma riski %18 ile %30 arasındadır [39-41].

2.2.3.3 Ailesel adenomatoz polipozis (AAP)

Kalıtsal KK'ların %5-10'unun nedeni prevalansı artan kalıtsal polipozis sendromları ya da kalıtsal polipozis olmayan kolon kanseriyle ilişkilidir. Ailesel adenomatoz polipozis, kalıtsal polipozis sendromlarının en çok ve belirgin gözlenen türüdür. KK tanısı alan tüm hastaların %1 ile %2'sinde mevcut olduğu düşünülmektedir. Ailesel adenomatoz polipozis ile ilişkili genetik mutasyon, 5C21 kromozomunun uzun kolunda yer alan bir tümör baskılayıcı gen olan APC geninde bir germ hattı mutasyonudur. APC geni, kolonik neoplastik progresyonun "kapı koruyucusu" olarak adlandırılır ve kolon hücrelerinde apoptozu destekler.

Hücre sinyal transdüksiyonunu ve büyümesini düzenler, β -katenin kaynaklı hücresel proliferasyonu engellediği düşünülen mikrotübül proteinin sentezinde görev alır [42]. Böylece, APC geninde kesilmiş bir proteinle sonuçlanan bir mutasyon apoptozu önler ve β - katenin uyarılmış hücre büyümesine izin verir. APC işlevine sahip olmayan hücrelerin hızlı büyümesi, bir adenomatoz polipin malign hale gelme olasılığını arttırır. Ailesel adenomatoz polipozis otozomal dominant özelliktedir ve gastrointestinal sistemde özellikle kolon boyunca binlerce adenomatoz polip ile karakterize edilir. Kolondaki polipler genellikle yaşamın erken dönemlerinde ortaya çıkar ve hastalar 16 ile 60 yaşları arasında klinik semptomlar gösterebilir. Erken profilaktik kolektomi uygulanmazsa, etkilenen tüm bireylerde 40 yaşına kadar KK geliştirir. Sieber ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, kromozomda bulunan ve KK ile bağlantılı bir temel eksizyon onarım geni olan MYH'ın ailesel adenomatoz polipozis fenotipine sahip olan ve APC germline mutasyonunun saptanamadığı hastalarda %7-8 oranında mutasyon taşıdığı bildirilmiştir [43].

APC geninde bir germ hattı mutasyonu içerdiği bilinen diğer sendromlar, Gardner sendromu ve Turcot sendromudur. Gardner sendromu, mandibula ve kafatasının osteomları, dermoid tümörler ve mezenterik fibromatoz gibi ekstrakolonik bulgular ile karakterizedir. Çalışmalar, kolon adenomatozisi, duodenal polipozis ve Gardner sendromu ile bağlantılı olan kolon ve mide kanseri riskinin Ailesel adenomatoz polipozisle aynı olduğunu göstermiştir [44-46].

2.2.3.4 Herediter non-polipozis kolorektal kanser (HNPCK)

Herediter Non-Polipozis Kolorektal Kanseri hasta, AAS gibi çok sayıda polip içermez. Bu sendroma aynı zamanda Lynch sendromu denir ve kolorektal kanserin %5-10'unu oluşturur. Bu hastalık otozomal dominant olarak kalıtımsaldır ve çeşitli DNA tamir genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Kontrol edilemeyen ve düzeltilen mutasyonlar sonucunda KK gelişimi hızlanır. Tamir genlerinin germline bölgelerindeki mutasyonlar hastaların %90'ından fazlasında bulunmuştur. Bu mutasyonlar hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH3 ve hMSH6. hMSH2 ve hMLH1 gen bölgelerinde bulunmaktadır [47, 48].

Tanı koymada ortalama yaş 40-50 arasındadır ve hastaların sağ taraflı kolonik kanser gelişim olasılığı daha yüksektir. Ayrıca, senkron veya meta-senkron lezyonlar geliştirme riski de vardır. HNPKK'lı aileleri tanımlamak için Amsterdam kriterleri uygulanır. Bu kriterlere göre, kanser 50 yaş öncesinde teşhis edilmeli, AAP dışlanmalı, tümör patoloji ile doğrulanmalı ve ailede en az üç akraba kanserden etkilenmelidir.

2.2.3.5 Kolonik polipler

Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre kolonik adenomatoz polip öyküsü olan hastalarda yüksek oranda KK'ya yakalanma riski olduğu gösterilmiştir [49, 50]. Kolorektal polipler iyi huylu veya kötü huylu olabilir; iyi huylu polipler arasında hamartomalar, hiperplastik, enflamatuvar ve mukozal vardır. KK, tübüler, tübülovillöz ve villöz adenomlar olmak üzere üç histolojik varyantı olan adenomatöz poliplerden kaynaklandığı iyi bilinmektedir. Tübüler adenomlar, adenomatoz poliplerin %75-85'ini temsil eder ve malignite tespitinde <%5 şansı vardır. Tübülovillöz adenomları poliplerin %10-15'ini temsil eder ve genellikle %20-25'inin bir malignite oluşturduğunu gösterir.

Villöz adenomlar kalan poliplerin %5-10'unu oluşturur ve bu poliplerin %35-40'ı maligndir. Villöz poliplerde büyüklük ve sayı malignite riskiyle doğru orantılıdır. 2 cm'den daha büyük poliplerin >%40 malign olma olasılığı vardır ve şiddetli displazili poliplerin %35'inin tam eksizyondan sonra malign olduğu bulunmuştur. Poliplerde adenomdan karsinomaya dönüşümün 10 yıl sürdüğü ileri sürülmüştür [51, 52].

KK'nın çoğunun adenomlardan kaynaklandığına dair doğrudan bir kanıt bulunmamakla birlikte, adenokarsinomların genellikle adenomlardan kaynaklandığı kabul edilir ve adenomlu hastalar 20 yıl boyunca gözlemlendiğinde, adenom bölgesinde kanser riski %25'tir, ayrıca, adenomatöz poliplerin eksizyonu, kolorektal kanser insidansının önemli derecede azalması ile ilişkilidir [53].

2.2.3.6 Enflamatuvar bağırsak hastalığı (EBH)

Enflamatuvar barsak hastalığı (EBH) olan hastalar KK gelişimi için yüksek risk taşır. Crohn ve Ülseratif Kolit hastalarının KK'ya yatkınlığını gösterebilecek genetik bir temel tespit edilememiştir.

KK tanısı konan, EBH'si bilinen hastaların mortalite oranı sporadik KK riskinden daha yüksektir. Bu risk, hastalığın süresi ve anatomik yapısı ile ilişkilidir.

25 yıllık EBH'li hastalarda KK'ya yakalanma riski %7-14 [54, 55], 35 yıllık EBH'li hastalarda ise %30 olduğu bildirilmiştir [56, 57]. Bernstein ve arkadaşları, 5529 EBH'li hastanın, 2829'unda Crohn hastalığı ve 2672'sinde ülseratif kolit olan grubu inceledi. Sağlıklı gruba kıyasla bakıldığında Crohn hastalığı olan vakalarda kolon kanseri insidansı oranında anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur [58].

2.2.3.7 Davranışsal Risk Faktörleri

Diyet ve davranışın birçok bileşeni, KK için risk faktörüdür. Yüksek miktarda kırmızı et tüketiminin KK riskini arttırdığına dair çalışmalar vardır [59, 60]. Meyve, sebze, lifli gıdaların KK ile ilişkisini inceleyen çalışmalarda çelişkili sonuçlar çıkmıştır [61-63].

Kalsiyumun, kolon epitelyal hiperproliferasyonunu inhibe ederek kanserojenezi inhibe edebileceği öne sürülmüştür. Kolorektal adenom öyküsü olan 930 hastayı kapsayan plasebo kontrollü çalışmada, kalsiyum takviyesinin epitelyal hiperproliferasyonu azalttığı ve yeni adenom oluşumunu azalttığı gösterilmiştir [64].

Uzun süreli sigara kullanımının (30 ile 40 yıl) KK ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda tütün ve KK arasında bir ilişki olmadığı bildirilmiş olsa da, çoğu çalışmada 20 yıldan fazla bir süredir sigara kullanan kişilerin çalışmaya dâhil edilmediği görülmüştür. Genç yaşta sigara kullanımına başlayan kişilerin uzun vadede KK'ya yakalanması kaçınılmaz hale gelmiştir [65-67].

Sigara kullanımı kaynaklı KK popülasyonunda erkekler %21, kadınlar da %12'lik kısmı oluşturur. Sigaranın içerdiği heterosiklik aminler, nitrozaminler ve polisiklik hidrokarbonlar gibi karsinojenlerin APC geni ile etkileşime girdiği bilinmektedir [68].

2.2.4 Kolorektal kanser mekanizması / patofizyolojisi

Kolorektal kansere neden olan çevresel ve genetik faktörler bunu, kolon epitel hücrelerine değişiklik yaptırarak neden olurlar (Tablo 2.1) [69, 70]. Bu değişiklikler, onkogenleri aktive eden ve tümör baskılayıcı genleri inaktive eden, genetik ve epigenetik değişikliklerin aşamalı bir birikimidir.

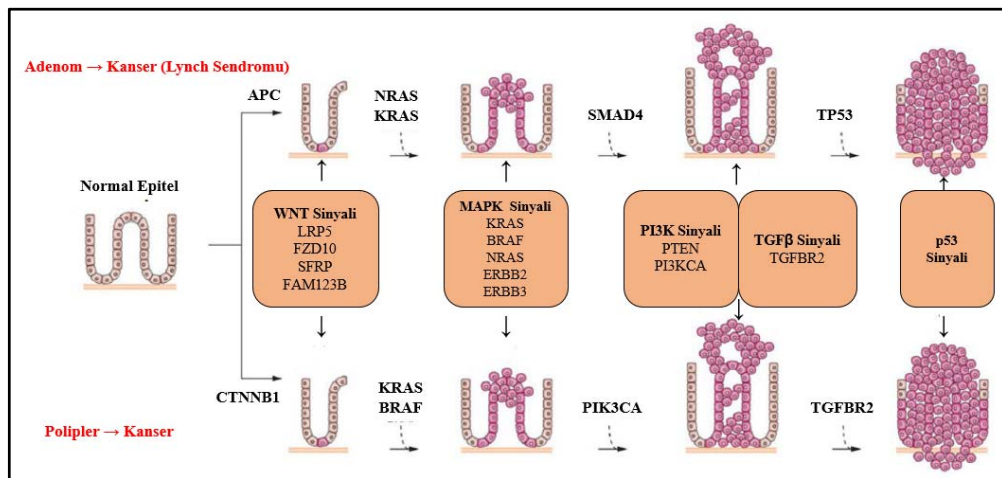
Genomik ve / veya epigenomik stabilite kaybı, kolondaki erken neoplastik lezyonların çoğunda (yani, anormal kript odakları, adenomlar ve tırtıklı polipler) gözlenmiştir ve muhtemelen kolorektal kanserin başlatılması ve oluşumunda merkezi bir moleküler ve patofizyolojik olaydır [71, 72].

Genomik ve epigenomik stabilite kaybı, kolon hücreleri için klonal genişleme boyunca hücrelerin agresif ve malign dönüşümüne yol açar ve tümör baskılayıcı genlerde ve onkogenlerde mutasyonlara sebep olarak epigenetik değişikliklerin birikimini hızlandırır [73-75]. KK'da hakim bir paradigma, orijin hücrenin, kolon kriptlarının tabanında bulunan bir kök hücre veya kök hücre benzeri hücre olmasıdır [76]. Bu paradigmada, onkogenlerdeki ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, bir tümörün başlatılması gerekli olan kanser kök hücrelerinin oluşumuna yol açar [77].

Tablo 2.1 : Kanser moleküler mekanizması.

Kanser Moleküler Mekanizması [70, 71]	
Bağışıklık sisteminden kaçmak:	Lokal sitokinlerin indüksiyonu ile tümör mikroçevresinde immün baskılama
Büyüme süpresörlerinden kaçınmak:	Büyümeyi inhibe eden faktörlerin ve reseptörlerinin mutasyon ve downregülasyonu
Genom kararsızlığı ve mutasyon:	DNA tamir mekanizmalarının etkisizleştirilmesi
Replikatif immortalizasyonu sağlamak:	Yaşlanmayı ve telomeraz aktivitesini indükleyen mekanizmaların inhibisyonu
Serbest bırakan hücresel enerji:	Aerobik glikoliz (Warburg fenomeni) ve glutaminoliz
Tümör teşvik edici enflamasyon:	Yerel enflamatuvar hücreler tarafından üretilen salgılanmış proteinler tarafından büyüme teşvik edici ve anjiyojenetik teşvik edici faktörlerin uyarılması
Anjiyojenetik indüklenmesi:	Yeni kan damarlarının oluşumunun indüksiyonu
Dirençli hücre ölümü:	Apoptoz ve diğer hücre ölümü biçimlerinin otonom ve parakrin medyatörlerinden kaçış (nekroz, nekroptoz)
Aktive invazyon ve metastaz:	Hücre hareketliliğini ve epitelyal-mezenkimal geçişin indüklenmesini teşvik etmek için hücre dışı matrisin yeniden yapılandırılması

Kolonda, normal epitelyal hücrelerin adenokarsinomlara dönüşümü histolojik ve eşzamanlı epigenetik/ genetik değişikliklerin tahmin edilebilir bir ilerlemesini takip eder (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 : Kolorektal kanserde sinyal yolları.

“Klasik” KK oluşumu modelinde, kanserlerin büyük çoğunluğu, daha sonra erken bir adenoma (tübüler veya tübülovillöz histolojisi ile <1 cm büyüklüğünde) dönüşen berrak bir kripte ile başlayan bir polipten kaynaklanmaktadır. Adenom daha sonra KK haline gelmeden önce ileri bir adenoma (> 1 cm büyüklüğünde ve / veya villöz histolojisi ile) dönüşür. Bu süreç mutasyonların ve epigenetik değişikliklerin birikmesiyle gerçekleşir ve bunun gerçekleşmesi 10-15 yıl alır, ancak bazı durumlarda daha hızlı ilerleyebilir (örneğin, Lynch sendromlu hastalarda) [78].

Özellikle tübüler adenomların histolojisi oldukça homojen olmasına rağmen, bu poliplerin moleküler temeli, bazı adenomların kolorektal kansere neden ilerlediğini (poliplerin yaklaşık %10'u) ve bazılarının neden ilerlemediğini açıklayabilir [79, 80].

5-10 yıl öncesine kadar tübüler ve tübülovillöz adenomatöz poliplerin kansere ilerleyebilen tek lezyon olduğu düşünülüyordu. Bununla birlikte, bazı kolorektal kanserlerin, bütün poliplerin kabaca %5-10'unu oluşturduğu sapsız tırtıklı polipler adı verilen bir polip alt grubundan köken aldığı gösterilmiştir. Bu sapsız tırtıklı polipler, tübüler adenomlardan [81-83] farklı moleküler ve histolojik yollardan kaynaklanır ve üç kategoride sınıflandırılır: hiperplastik polipler, sapsız tırtıklı adenomlar ve geleneksel tırtıklı adenomlardır [84]. Sapsız tırtıklı poliplerin KK'ya dönüşme potansiyeli çok yüksektir [81-85]. Sağ kolonda ortaya çıkan poliplerde MSI (Mikro Satelit İnstabilite) ve CIMP (CpG Ada Metilatör Fenotipi) DNA metilasyon bölgelerinde kararsızlıkla seyreden epigenetik değişiklikler vardır. Buna karşılık, sol kolonda ortaya çıkan poliplerde mikrosatellitler stabil olmasına rağmen KRAS mutasyonlarını taşırlar ve bu poliplerin alt kümeleri CIMP bölgelerinin zayıflatılmış formuna sahiptirler [82, 83, 86].

Poliplerdeki ve kanserdeki bu farklılıklar göz önüne alındığında moleküler olarak farklı dört KK sınıflandırması önerilmiştir. Hiper-Kararsız/Mikro-Satelit-Kararsız, Hiper-Kararsız/Mikro-Satelit-Kararlı, Mikro-Satelit-Kararlı veya Kromozomal-Kararsız ve CIMP kanserleri olarak tanımlanmıştır [72]. Spesifik mutasyonların sıklığı, gün geçtikçe sınıflandırmayı değiştirmektedir [87]. Bununla birlikte, bu moleküler gruplamayı spesifik mutasyonların yanında epigenetik değişikliklerde etkilemektedir. APC ve SMAD ailesindeki bazı mutasyonların KK'da önemli rolleri vardır [88].

KK'da epistatik ilişkili gruplardaki (özellikle sinyal yolundaki genlerde) mutasyon heterojenitesi tümörler arasında belirgindir [89-91]. En sık görülen değişiklikler

arasında (Tablo 2.2) FAM123B (AMER1), β -katenin, TP53, PIK3CA, BRAF, ARID1A, KRAS, SRY, SOX9, APC, ERBB2, Wnt- β -katenin, SMAD4, EGF, MAPK, TGFBR2, PI3K ve TGF- α gibi sinyal yollarında görülür [72, 92].

KK çoğunlukla Wnt sinyal yolunu etkileyen değişiklikler ile başlar ve ardından ortaya çıkan neoplastik hücreler, RAS-RAF-MAPK, TGF-P ve PI3K-AKT yolları dahil olmak üzere diğer sinyal yollarının düzenini bozarak ilerler [91, 93].

KK'da gen mutasyonlarına ek olarak, epigenetik değişiklikler genellikle meydana gelir ve bu değişiklikler gen mutasyonları ile iş birliği yapar [94-97].

KK'daki DNA metilasyonu, genellikle genlerin 5' bölgesinde yer alan transkripsiyon faktörünün bağlanmasını etkiler ve CpG bakımından zengin bölgelerde kromatin yapısındaki değişikliklerle transkripsiyonel sessizliğe neden olur [98].

Ayrıca gen promotörlerinde tümör süpresör genlerini susturabilen CpG adalarının hipermetilasyonu ve genomik kararsızlığı veya onkojen aktivasyonuna yol açabilen tekrarlayan genetik elementlerin hipometilasyonu da KK gelişimine yol açar [99]. Genel olarak bu moleküler özelliklerin çoğunun etkisi tümörün bağırsak içindeki konumuna bağlı olarak değişir [100, 101].

Tablo 2.2 : Kolorektal kanserde sık görülen genetik ve epigenetik değişiklikler.

Gen Biyobelirteç	Kromozom	Fonksiyon	Moleküler Lezyon	Sıklık (%)	Prediktif ?	Prognostik ?	Tanı ?
Tümör Baskılayıcılar							
APC	5	Wnt sinyal yolağında düzenleyici	İnaktifleştirici mutasyonlar	40-70	Hayır	Hayır	Familyal Adenomatöz Polipozis
ARID1A	1	SWI/SNF aile üyesi; kromatin yapısı ve gen transkripsiyonunu düzenler.	İnaktifleştirici mutasyonlar	15	Hayır	Hayır	NA
CTNNB1	3	Wnt sinyal yolağında düzenleyici	Aktifleştirici mutasyonlar	1	Hayır	Hayır	Hayır
DCC	18	Netrin reseptörü; apoptozda düzenleyici; kolorektal kanserde silinir ama mutasyona uğramaz; primer kanserde rolü bilinmiyor.	Delesyon/LOH	9 (mut.)/70 (LO)	Hayır	Mümkün	Hayır
FAM123B	X	Wnt sinyal yolağında görev alır.	İnaktifleştirici mutasyonlar	10	Hayır	Hayır	Hayır
FBXW7	4	Proteazom kaynaklı protein degradasyonunu düzenler.	İnaktifleştirici mutasyonlar	20	Hayır	Hayır	Hayır
PTEN	10	PI3K-AKT yolağında düzenleyici	İnaktifleştirici mutasyonlar; immünohistokimya tarafından protein kaybı	10(mut.);30 (eks. kaybı)	Mümkün	Hayır	Cowden Sendromu
RET	10	GDNF sinyal yolağında düzenleyici	İnaktifleştirici mutasyonlar, anormal DNA metilasyonu	7 (mut.); 60 (met.)	Hayır	Hayır	Hayır
SMAD4	18	TGF-β ve BMP yolaklarında düzenleyici	İnaktifleştirici mutasyonlar, delesyon	25	Mümkün	Mümkün	Juvenil Polip
TGFBR2	3	TGF-β yolağında düzenleyici	İnaktifleştirici mutasyonlar	20	Hayır	Hayır	Hayır
TP53	17	Hücre sel döngü, DNA onarımı ve apoptozda görev alan hedef genlerin ekspresyonunu düzenler.	İnaktifleştirici mutasyonlar	50	Mümkün	Mümkün	Li Fraumeni Sendromu

Tablo 2.2 (devam) : Kolorektal kanserde sık görülen genetik ve epigenetik değişiklikler.

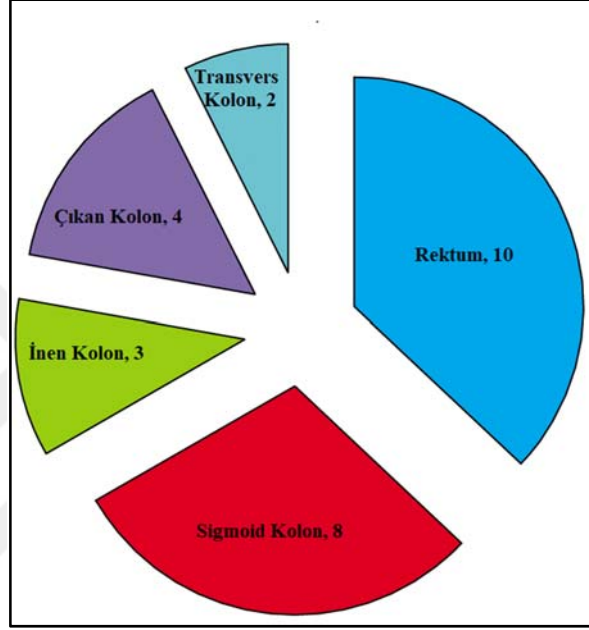
Gen Biyobelirteç	Kromozom	Fonksiyon	Moleküler Lezyon	Sıklık (%)	Prediktif ?	Prognostik ?	Tanı ?
Proto-onkogenler							
BRAF	7	MAPK sinyal yolağında görev alır.	V600E aktifleştirici mutasyonlar	8-28	Muhtemel	Muhtemel	Lynch Sendromu
ERBB2	17	EGF-MAPK sinyal yolağında görev alır.	Amplifikasyon	35	Hayır	Hayır	Hayır
GNAS	20	G-protein sinyal sistemini düzenler.	Mutasyon	20	Hayır	Hayır	Hayır
IGF2	11	IGF sinyal yolağında düzenleyici	Kopya sayısında artım, imprinting kaybı	7 (mut.) / 10 (met.)	Hayır	Hayır	Hayır
KRAS		MAPK yolaklı intraselüler sinyal sisteminde düzenleyici	Kodon 12 veya 13'te ve nadiren kodon 61, 117 ve 146'da mutasyon aktive edici	40	Evet	Mümkün	NA
MYC	8	Proliferasyon ve farklılaşmayı düzenler.	Amplifikasyon	2 (mut.) / 10 CNV	Hayır	Hayır	Hayır
NRAS	1	MAPK yolağında düzenleyici	Kodon 12 veya 13'te mutasyon	2	Evet	Hayır	Hayır
PIK3CA	3	PI3A-AKT yolağında düzenleyici	Kinaz (exon 20) ve helikal (exon 9) domainlerde al ve kina20Mutaz mutasyonları	20	Muhtemel	Mümkün	Hayır
RSPO2 ve RSPO3	1	LGR reseptör ailesi için ligand, Wnt sinyal sistemini aktive eder.	Gen füzyon, translokasyon	10	Hayır	Hayır	Hayır
SOX9	17	Apoptozu düzenler.	Kopya sayısının artımı	9 (mut.) <5 CNV	Hayır	Hayır	Hayır
TCF7L2	10	Wnt sinyal sistemini düzenler.	Gen füzyon ve translokasyonu	10	Hayır	Hayır	Hayır

Tablo 2.2 (devam) : Kolorektal kanserde sık görülen genetik ve epigenetik değişiklikler.

Gen Biyobelirteç	Kromozom	Fonksiyon	Moleküler Lezyon	Sıklık (%)	Prediktif ?	Prognostik ?	Tanı ?
Diğer moleküler etkileşimler							
Kromozom İnstabilitesi (CIN)	N/A	NA	Anöploidi	70	Muhtemel	Muhtemel	Hayır
CpG Ada Metilatör Fenotipi (CIMP)	N/A	N/A	Seçili işaretçiler arasından >%20 lokusun metilasyonu	15	Muhtemel	Muhtemel	Hayır
Mikrosatellit İnstabilitesi (MSI)	N/A	N/A	Konsensüste dengesiz mikrosatellit tekrarları	15	Muhtemel	Evet	Lynch Sendromu
Uyumsuzluk Onarım Genleri	N/A	DNA uyumsuzluk onarımını düzenler.	İmmünohistokimya tarafından protein kaybı; metilasyon; inaktifleştirici mutasyonlar	1-15	Mümkün	Muhtemel	Lynch Sendromu
SEPT9	17	N/A	Metilasyon	>90	Hayır	Hayır	Kanser teşhisi için serum bazlı test
VIM, NDRG4, BMP3	10, 16 ve 4	N/A	Metilasyon	75	Hayır	Hayır	Erken teşhis için dışkı bazlı test
18qLOH	18	N/A	Kromozom 18'in uzun kolunun delesyonu	50	Muhtemel	Mümkün	Hayır

2.2.5 Kolorektal kanser lokalizasyonu

Kolorektal karsinomların çoğu sigmoid kolon ve rektumda bulunur, ancak son yıllarda giderek artan oranda proksimal karsinom oranının arttığına dair kanıtlar vardır [102, 103]. KK'nın moleküler patolojisi bölgesel farklılık gösterir (Şekil 2.5). Bunun nedeni ras proto-onkogen mutasyonlarıdır. Bu mutasyonların olduğu tümörler genelde çekum ve transvers kolonda çok sık görülür [104].



Şekil 2.5 : Kolorektal kanserin lokalizasyonu.

2.2.6 Kolorektal kanserin evrelendirilmesi

KK'da ilk patolojik evrelendirme 1932'de C.E.Dukes tarafından yapılmıştır. Bu sınıflandırma yayılım ve lenfatik tutulumuna göre yapılmaktaydı. 1954'te Aster-Coler sınıflandırma temeline tümör derinliğini katmıştır. 1967'de Turbull uzak metastazı sınıflandırmaya ekleyerek yeni bir sınıflandırma oluşturmuştur. KK için en sık ve güncel kullanılan evreleme sistemi, 3 temel bilgiye dayanan Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC)'nin TNM sistemidir:

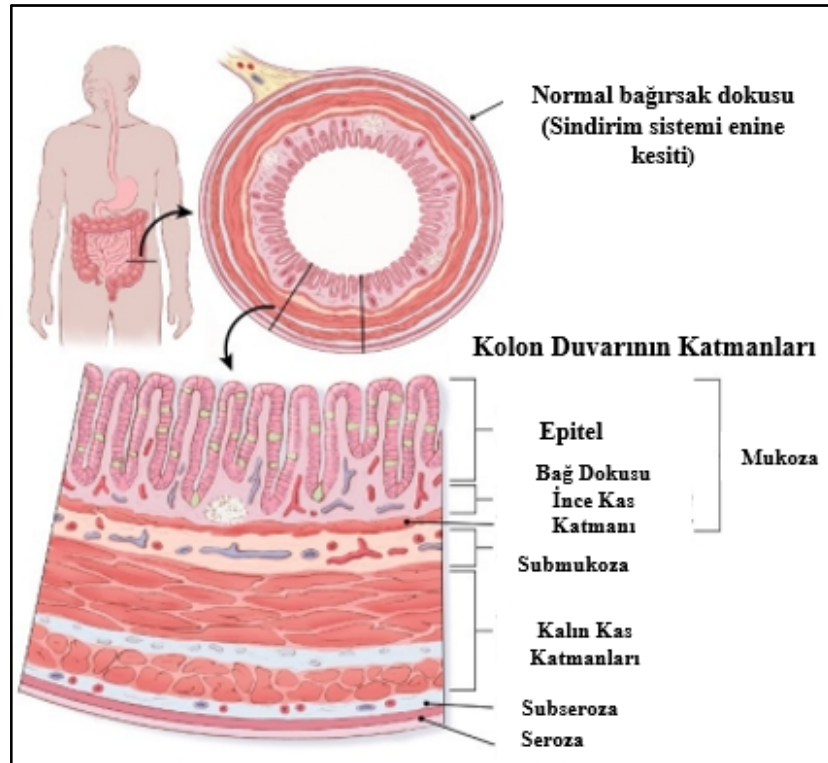
Tümörün büyüklüğü (büyüklüğü) (T): Kanser kolon veya rektumun duvarında ne kadar büyüdü? Bu katmanlar, içten dışa doğru şunları içerir:

- Tüm koleraktal kanserler iç katmandan (*mukoza*) başlar.
- İnce bir kas tabakası (*muscularis mucosa*) içerir.
- Bu kas tabakasının altındaki fibröz doku (submukoza)'dur.
- Kalın bir kas tabakası (*muscularis propria*) - en dıştaki bağ dokusu tabakaları (*subserosa ve serosa*)

Yakındaki lenf düğümlerine yayılma (N): Kanser, yakındaki lenf düğümlerine yayıldı mı?

Uzak bölgelere yayılma (metastaz) (M): Kanser uzak lenf bezlerine veya karaciğer veya akciğer gibi uzak organlara yayıldı mı?

Bu evreleme sistemi Ocak 2018 itibariyle yürürlüğe girmiştir. Bir ameliyat ya da operasyon sırasında çıkarılan doku incelenerek belirlenen patolojik evreleme yapılır (Şekil 2.6). İşlemden önce yapılan fizik muayene, biyopsi ve görüntüleme testlerinin sonuçlarını dikkate alan klinik evrelemeden daha doğru olabilir. T, N ve M'den sonraki rakamlar veya harfler bu faktörlerin her biri hakkında daha fazla ayrıntı sağlar. Daha yüksek sayılar, kanserin daha gelişmiş olduğu anlamına gelir (Tablo 2.3) [105].



Şekil 2.6 : Kolon duvarı.

Tablo 2.3 : Kolorektal kanser evreleme.

Evre	Grup	Evreleme Açıklaması
0	Tis	Kanserin en erken aşamasındadır.
	N0	Bu evre ayrıca in situ karsinom veya intramukozal karsinom (Tis) olarak da bilinir.
	M0	Kolon veya rektumun iç tabakasının (mukozası) ötesinde büyümemiştir.
I	T1 ya da T2	Kanser, muscularis mucosa'dan submucosa'ya doğru büyümüştür (T1), ayrıca muscularis propriya (T2) içinde de büyümüş olabilir. Yakındaki lenf düğümlerine (N0) veya uzak bölgelere (M0) yayılım yoktur.
	N0	
	M0	
IIA	T3	Kanser, kolon veya rektumun en dış katmanlarına doğru büyümüştür, ancak onlardan geçmedi (T3). Yakındaki organlara ulaşmadı. Yakındaki lenf düğümlerine (N0) veya uzak bölgelere (M0) yayılmadı.
	N0	
	M0	
IIB	T4a	Kanser, kolon veya rektumun çeperi boyunca büyümüş, fakat yakınlardaki diğer doku veya organlara büyümemiştir (T4a). Henüz yakındaki lenf düğümlerine (N0) veya uzak bölgelere (M0) yayılmadı.
	N0	
	M0	
IIC	T4b	Kanser, kolon veya rektumun çeperi boyunca büyümüş ve yakınlardaki diğer doku veya organlara (T4b) bağlanmış veya büyümüştür. Henüz yakındaki lenf düğümlerine (N0) veya uzak bölgelere (M0) yayılmadı.
	N0	
	M0	
IIIA	T1 ya da T2	Kanser mukozadan submukoza (T1) dönüşmüştür ve ayrıca muscularis propriya (T2) içinde de büyümüş olabilir. Yakındaki 1 ila 3 lenf noduna (N1) veya lenf nodu yakınındaki yağ alanlarına yayılmış ancak nodların kendisinin değil (N1c) yayılmıştır. Uzak bölgelere yayılmadı (M0).
	N1/N1c	
	M0	
IIIB	T1	YA DA Kanser, mukozadan submukozaya (T1) dönüşmüştür. Yakındaki lenf bezlerine yayılmıştır (N2a). Uzak bölgelere yayılmadı (M0).
	N2a	
	M0	
IIIB	T3 ya da T4a	YA DA Kanser, kolon veya rektumun en dış katmanlarına (T3) veya visseral peritona (T4a) yayıldı, ancak yakındaki organlara ulaşmadı. Yakındaki 1 ila 3 lenf noduna (N1a veya N1b) veya lenf nodlarının yakınındaki yağ alanlarına yayılmış ancak nodların kendisinin değil (N1c) yayılmıştır. Uzak bölgelere yayılmadı (M0).
	N1/N1c	
	M0	
IIIB	T2 ya da T3	YA DA Kanser, muskularis propria (T2) veya kolon veya rektumun en dış katmanlarına (T3) dönüşmüştür. Yakındaki lenf bezlerine yayılmıştır (N2a). Uzak bölgelere yayılmadı (M0).
	N2a	
	M0	

Tablo 2.3 (devam) : Kolorektal kanser evreleme.

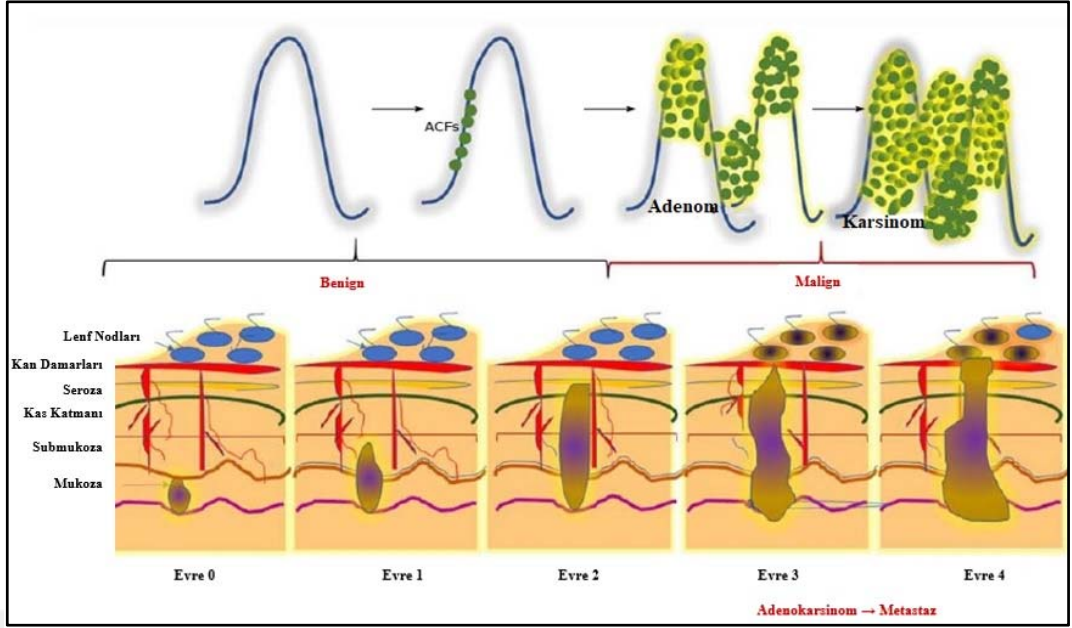
Evre	Grup	Evreleme Açıklaması
IIB (devam)	T1 ya da T2 N2b M0	Kanser mukozadan submukoza (T1) dönüşmüştür ve ayrıca muscularis propria (T2) içinde de büyümüş olabilir. Yakındaki 7 veya daha fazla lenf bezine yayılmıştır (N2b). Uzak bölgelere yayılmadı (M0).
	T4a N2a M0	Kanser kolon veya rektumun çeperinden (visseral periton dahil) büyümüş, ancak yakın organlara ulaşmamıştır (T4a). Yakındaki lenf bezlerine yayılmıştır (N2a). Uzak bölgelere yayılmadı (M0).
		YA DA
IIIC	T3 ya da T4a N2b M0	Kanser, kolon veya rektumun en dış katmanlarına (T3) veya visseral peritona (T4a) yayıldı, ancak yakındaki organlara ulaşmadı. Yakındaki 7 veya daha fazla lenf bezine yayılmıştır (N2b). Uzak bölgelere yayılmadı (M0).
		YA DA
IVA	T4b N1 ya da N2 M0	Kanser, kolon veya rektumun çeperi boyunca büyümüş ve yakınlardaki diğer doku veya organlara (T4b) bağlanmış veya büyümüştür. Yakındaki en az bir lenf düğümüne veya lenf düğümlerinin (N1 veya N2) yakınındaki yağ alanlarına yayılmıştır. Uzak bölgelere yayılmadı (M0).
	T N M1a	Kanser, kolon veya rektum duvarı boyunca büyümüş olabilir veya olmayabilir (T). Yakındaki lenf düğümlerine yayılmış olabilir veya olmayabilir. (N). 1 uzak organa (karaciğer veya akciğer gibi) veya uzak lenf nodları kümesine yayılmış, ancak peritonun uzak kısımlarına (karın boşluğunun astarı) (M1a) yayılmamıştır.
IVB	T N M1b	Kanser kolon veya rektum duvarı boyunca büyümüş olabilir veya olmayabilir (T). Yakındaki lenf düğümlerine yayılmış olabilir veya olmayabilir (Herhangi bir N). 1'den fazla uzak organa (karaciğer veya akciğer gibi) veya uzak lenf nodları kümesine yayılmış, ancak peritonun uzak kısımlarına (karın boşluğunun astarı) (M1b) yayılmamıştır.
	T N M1c	Kanser kolon veya rektum duvarı boyunca büyümüş olabilir veya olmayabilir (T). Yakındaki lenf düğümlerine yayılmış olabilir veya olmayabilir (Herhangi bir N). Peritonun uzak bölgelerine yayılmış (karın boşluğunun astarı) ve uzak organlara veya lenf düğümlerine yayılmış olabilir veya olmayabilir (M1c).

* Aşağıdaki ek kategoriler yukarıdaki tabloda listelenmemiştir (Şekil 2.7):

TX: Ana tümör bilgi eksikliği nedeniyle değerlendirilemez.

T0: Birincil tümör kanıtı yok.

NX: Bölgesel lenf bezleri bilgi eksikliği nedeniyle değerlendirilemiyor.



Şekil 2.7 : Kolorektal kanser oluşumu ve evreleme.

Kolorektal karsinogenezin ilerlemesi sırasında farklı aşamalar vardır.

- Evre 0: Kanser hücreleri mukozanın iç astarında büyür;
- Evre I: Kanser hücreleri mukoza ve submukoza boyunca büyür. Kanserli büyüme, kolonun kas katmanına invaze olur;
- Evre II: Kanserde büyüme, komşu dokulara veya lenf düğümlerine yayılmadan kolonun duvarından nüfuz eder;
- Evre III: Kanser seroza kas katmanlarına nüfuz eder, kanser lenf düğümlerine yayılmaya başlar;
- Evre IV: Dokuda kolonu çevreleyen bir tümör nodülü oluşuyor, lenf nodlarında kanser hücreleri belirir ve kanser metastaz yapmaya başlar.

2.2.7 Kolorektal kanser progresyonu

Yapılan çalışmalarda kolorektal polipler <10 mm çapındadır [106-109]. Gözlem süresinin 22 ile 43 ay arasında olduğu vakalarda bu poliplerden kanser gelişim oranı %2,5 kadardır. Tüm kolorektal adenomlar kanser olma yeteneğine sahip olmasına rağmen, sadece birkaç lezyon kanser geliştirir ve adenomların çoğu büyüklük olarak birkaç yıl içinde artış göstermez. Bu takip çalışmalarının sonuçlarına dayanarak, kısmi kolorektal adenomlar için acil tedavi gerekli olmayabilir ve takip muayenesi birkaç yıl için yeterli olabilir [109].

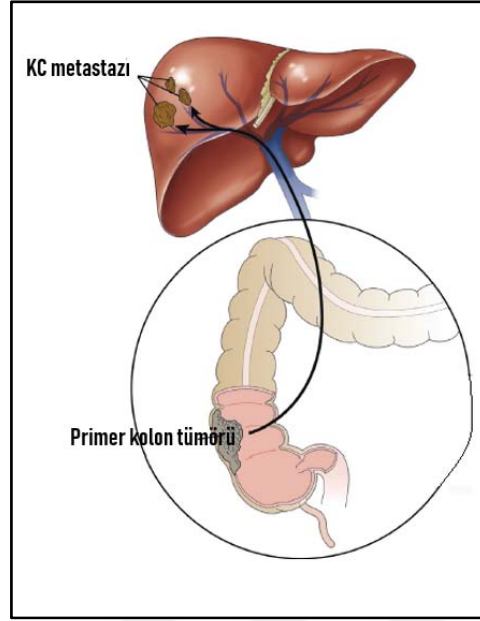
2.2.8 Kolorektal kanser belirtileri

KK'nın prognozu yavaş, semptomları çeşitlidir. Kanama, ağrı, gaitada değişiklikler, uzun süreli ishal ya da kabızlık, karına giren kramplar, kansızlık, halsizlik ve yorgunluk hissi ve ani kilo kayıpları gibi görülen semptomlar KK'nın tanısı için kullanılır [110]. Gösterilen bu semptomlar tümörün lokalizasyonuna göre farklılık göstermektedir [111]. Semptomlar incelenirken kolondaki lokalizasyon sağda mı solda mı önemlidir. Sol kolon dar ve dışkı şekilli olduğundan dolayı sol kolon tümörlerinde ilk göze çarpan değişiklik, gaita şekli, bağırsak alışkanlığıdır. Hasta genelde sol kolon tümörlerinde gaitanın çapının kalınlığının azaldığını söyler. Bunlara ek olarak alt kadranda krampla seyreden ağrılar ve defakasyonla birlikte taze kanama mevcuttur. Sağ kolon, sola göre daha geniş olduğundan dolayı tümör varlığında bile herhangi bir şekilde tıkanma yoktur. Bağırsak alışkanlığı normaldir, hazımsızlık, halsizlik, karın ağrısı ve gaitada gizli kan vardır [112-114].

Bu bulguların haricinde KK tanısı alan hastaların yarısında kilo kaybının olduğu ve nadir olarak septisemi kaynaklı ateşe rastlanmaktadır [115, 116].

2.2.9 Kolorektal kanserin yayılım yolları ve metastaz

Kolonda görülen malignitelerin invazyon özellikleri vardır. Yayılımı kan, lenfatik yol ve transperitoneal olarak yapabilirler. KK'nın en çok rastlanan metastazları karaciğer ve lenf nodlarıdır (Şekil 2.8). Kolonun tüm katlarına yapılan invazyonların neredeyse tamamı lenf nodlarına metastaz yapar.



Şekil 2.8 : Kolorektal kanser metastazı.

Akciğer, over ve periton diğer olası metastaz bölgeleridir. Kemik, uterus, testis, sinir sistemi, oral kavite ve mide daha az metastaz görülen organlardır [117, 118].

KK'lı hastaların yaklaşık %20'sinde teşhis sırasında zaten metastaz vardır ve bu istatistik son 20 yılda değişmemiştir [119]. Gelişen teşhis ve tedaviler sayesinde soliter akciğer ve karaciğer metastazları sağkalımları uzatmaktadır [120-122]. KK'nın erken tanısı metastaz ihtimalini azaltmaktadır [119, 123]. KK metastazları üstünde yapılan son araştırmalar ile mekanizmalar hücresel ve moleküler düzeyde açıklanmasına rağmen epidemiyolojik olarak hala eksiklikler mevcuttur [124-127].

2.2.10 Kolorektal kanserin diferansiyasyonu

Adenokarsinomalar KK'da genelde üç gruba ayrılır. Bunlar iyi, orta ve kötü diferansiye tümörlerdir [128].

- İyi Diferansiye KK (Evre I): Bu tümörlerde yapılanmanın hepsi glandülerdir.
- Orta Diferansiye KK (Evre II): Bu tümörlerde yapılanmanın %50'si glandülerdir.
- Kötü Diferansiye KK (Evre III): Bu tümörlerde yapılanmanın %10-40'ı glandülerdir.
- İndiferansiye KK (Evre IV): Bu tümörlerde yapılanmanın %5'inden azı glandülerdir.

2.2.11 Kolorektal kanserin biyobelirteçleri

KK'nın moleküler tespiti, invazif olmayan bir test olduğu için hasta ve klinisyenler için caziptir. KK için ideal moleküler biyobelirteç, adenom ve kanser arasında farklı, sürekli olarak bağırsak lümeni veya dolaşıma salınmalı ve lezyon çıkartıldıktan sonra veya tedavi edildikten sonra azalmalı ya da tamamiyle tespit edilememelidir. Teşhis için kanda, gaitada ve idrarda bazı proteinler, RNA ve DNA bölgelerinden geliştirilmiş testler mevcuttur (Tablo 2.4). SEPT9 geni bir GTPaz sınıfına aittir ve promoter bölgesinin hipermetilasyonu KK ile ilişkilidir; SEPT9'un doku seviyesinde anormal metilasyonu, kolorektal neoplaziyi normal mukozadan ayırt eder.

Yapılan vaka-kontrol çalışmalarında, SEPT9 metilasyon testinin kolorektal kanser için %85-90 arasında bir özgüllük ile %50-70 arasında orta hassasiyette olduğunu göstermiştir [129]. Bir başka büyük ölçekli bir çalışmada ise SEPT9 metilasyon testini kullanırken KK tespit oranının <%50 olduğunu göstermiştir [130]. SEPT9'un metilasyon durumuna göre ileri kolonik adenomun tespiti yaklaşık %10'dur. Bu haliyle, SEPT9 tahlilleri, mevcut kantitatif fekal immünokimyasal testler (FIT'ler) ile daha iyi performans göstermektedir. Gaita örneklerinden, epitelyal hücreler tarafından dökülen DNA'da APC ve KRAS mutasyonları tespit edildi. İlk jenerasyon fekal DNA testleri KK tespiti için hassastır ancak ileri kolonik adenomların tespiti için düşük hassasiyeti olduğu bulunduğu için tatmin edici sonuçlara ulaşılmıştır [131]. Üzerinde çalışılan bir diğer teşhis belirteçleri mRNA ve mikroRNA'lar ile dolaşımdaki sitokeratinlerdir [132].

KK'da biyobelirteç olarak Sialik asit, Karsinoembriyonik antijen (CEA), Kanser Antijen 50 (CA-50), Kanser Antijen 19-9 (CA 19-9), Kanser Antijen 15-3 (CA 15-3), Kanser Antijen 125 (CA 125), Neopterin proteini (NP), Nükleer Matriks Proteinleri (NMP), Nöron Spesifik Enolaz (NSE), İnsan koryonik gonadotropin (hCG), p53, p21, β 2-Mikroglogulin ve Laktat Dehidrogenaz (LDH) spesifik ve non-spesifik olarak kullanılmaktadır [133].

Tablo 2.4 : Kolorektal kanser testlerinin avantaj ve dezavantajları.

Test	Avantaj	Dezavantaj
gFOBT	Düşük maliyetli, Tarama yükü düşük, Kayda değer sonuç alımı,	İleri neoplazi için sınırlı hassasiyet, Kısa görüntüleme interval gereksinimi, Kolorektal kanser insidansında etkisiz, Kalitatif, otomatikleştirilmemiş, Çoklu örnekleme, Orta seviyeli pozitif prediktif değer,
FIT	Düşük maliyetli Tarama yükü düşük, Kantitatif, otomatikleştirilmiş, Tekli örnek, Kolorektal kansere hassas, En yüksek sonuç alımı, İnsidans ve mortalitede etkili,	İleri adenom için sınırlı hassasiyet, Orta seviyeli pozitif prediktif değer, Tekrarlı görüntüleme gereksinimi (interval gFOBT'takinden çoğunlukla daha uzun), Performans sıcaklık bağımlı,
Sigmoidoskopi	Distal ileri neoplaziye hassas, Görüntüleme intervali uzun, İnsidans ve mortalitede etkili,	Düşük sonuç alımı, Proksimal ileri neoplaziye orta seviye hassasiyet, Yüksek maliyetli,
Kolonoskopi	Hassas ve spesifik, Görüntüleme intervali uzun, İnsidans ve mortalitede etkili,	Düşük sonuç alımı, Yüksek maliyetli, Sorumluluk yükü fazla, Komplikasyon riski,
CT kolonografi	Hassas ve spesifik, Görüntüleme intervali uzun, İnsidans ve mortalitede olası etki,	Düşük sonuç alımı, Yüksek maliyetli, İleri neoplazide tekrarlı lavaj gereksinimi, Radyasyona maruziyet, Sorumluluk yükü fazla,
Çok hedefli fokal DNA testi	Hassas ve spesifik,	Sonuç alımı belirsiz, Yüksek maliyetli, Prospektif veri yetersiz,

2.2.12 Teşhis ve Tedavi

Teşhis

KK tanısı ya semptomları olan bir hastanın değerlendirmesinden ya da tarama sonucunda ortaya çıkar. Hastalık dışkıda kan, bağırsak alışkanlıklarında değişiklik ve karın ağrısı gibi belirtilerle ilişkili olabilir. Diğer belirtiler arasında yorgunluk, soluk görünüm ve nefes darlığı gibi kansızlığa bağlı semptomlar ve kilo kaybı sayılabilir.

Yaşlı bir hastada kolorektal kanser varlığı için bu semptomların öngörücü değeri sınırlıdır, ancak daha ileri klinik değerlendirmeyi gerektirir. KK için yaygın olarak yapılan popülasyon taraması ile birçok kişiye klinik öncesi bir aşamada tanı konmaktadır. Semptomatik hastalarda, kolonoskopi tercih edilen araştırma yöntemidir, ancak diğer endoskopik yöntemler de mevcuttur veya geliştirilmektedir. Popülasyon taraması için, birincil değerlendirme için bir dizi başka yöntem kullanılabilir, ardından pozitif bir test durumunda kolonoskopi yapılabilir [134].

• **Kolonoskopi:** Kolonoskopi, kolorektal kanser tanısı için altın standarttır. Tanısal doğruluğu yüksektir ve tümörün konumunu değerlendirebilir. Eş zamanlı biyopsi alınabilmesi ve moleküler profil için alınan materyalin histolojik onayı tanıyı kolaylaştırır. Kolonoskopi ayrıca hem tanısal hem de terapötik etki sağlayan tek tarama tekniğidir. Ayrıca endoskopik polipektomi kullanılarak adenomların çıkarılması kanser insidansını ve mortaliteyi azaltabilir [135-138]. Aslında, kolonoskopinin KK insidansı ve mortalitesinin azaltılmasındaki etkinliği ABD Ulusal Polip Çalışması tarafından iyi bir şekilde gösterilmiştir [53, 138]. Bu çalışmanın son 20 yıllık takip verileri, KK'ya bağlı ölüm oranlarında %53 oranında bir azalma olduğunu gösterdi; bu, daha yakın tarihli bir çalışma tarafından yinelenen cesaret verici bir sonuçtur [139]. Kolonoskopi kalitesi, kanser ve adenomun tanısal başarısında belirleyici bir faktördür [135, 140-142].

• **Kapsül endoskopisi:** Elek tarafından yutulan kablosuz bir kapsül cihazı kullanır ve geleneksel endoskopi kullanılmadan hemen hemen tüm gastrointestinal sistemin incelenmesini sağlar [143-145]. Kapsül endoskopisi, adenom ve KK teşhisinde faydalıdır. Birinci nesil kapsül endoskopisinin ≥ 6 mm boyutlarında polipleri yaklaşık %60 hassasiyet ve $>80-89$ özgüllük ile tespit edebildiği tespit edildi. KK'lı hastaların %74'ünde teşhis uyumlu çıktı [143]. 884 hastanın dahil olduğu bir çalışmada yeni nesil kapsülün kolorektal neoplaziyi teşhiste ve 6 mm'den büyük adenomların tespitinde duyarlılığın %88, özgüllüğün %82 olduğu gösterilmiştir [146]. Avrupa Gastrointestinal Endoskopi Kılavuzu'na göre, kolon mukozasının görüntülenmesinde kapsül endoskopisi güvenilir bir araç olarak kabul edilmiştir [145]. Daha sonra Asya-Pasifik kılavuzlarına da KK taraması için kapsül endoskopisi önerilmiştir [147]. Kapsül endoskopisinin endikasyonları şunlardır; konvansiyonel kolonoskopiyi reddeden ya da anatomik nedenlerden dolayı tam bir kolonoskopinin mümkün olmadığı hastalardır. Herhangi bir stenoz varlığı ise kapsül tutulmasına yol açabileceğinden dolayı kontraendikasyon nedenidir.

• **Bilgisayarlı Tomografi Kolonografi (BTK):** Bilgisayarlı Tomografi Kolonografi (BTK)'de, kolonun iç görüntüsünü elde etmek için düşük dozlu kullanılan tanısal bir yöntemdir [148]. 49 merkezli 11.000 kişiyi içeren, sistematik yapılan bir meta analizde BTK'nın KK tespitinde %96 duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir [149]. Bu performansla BTK'nın, geleneksel kolonoskopi ve kapsül endoskopiyle benzer olduğu bildirilmiştir [150]. BTK, bağırsak temizliği, insüflasyon ve stabil pozisyon gibi bazı gereklilikler içerir ve sedasyona ihtiyaç duyulmaz.

Lakin 6-9 mm gibi düz lezyonlarda duyarlılığı düşüktür. BTK maliyetinden dolayı kullanımını sınırlıdır [151, 152]. BTK, ABD ve Avrupa'daki rehberlerde KK taraması seçeneklerinden biri olarak önerilmiştir [153, 154]. Birçok ülkede BTK, çift kontrastlı baryum lavman (kolon için konvansiyonel X-ışını tabanlı görüntüleme yöntemi) incelemesinin yerini almıştır ve giderek artan bir şekilde geleneksel kolonoskopiye alternatif olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, radyasyona maruz kalma, maliyetler, hastalara yük ve yüksek kolonoskopi sevk oranlarından dolayı, BTK Avrupa'da pek kabul görmemiştir. Asya-Pasifik bölgesinde, total kolonoskopinin mümkün olmadığı durumlar dışında, KK taraması için BTK önerilmemektedir [147].

Tedavi

Evre 3 ve 4 kolon kanseri ile evre 2 ve 4 rektum kanserinde adjuvan tedavi tercih edilir [155, 156]. Taramadaki istenilen verime ulaşamama, tedavide de kendini göstermektedir. Ayanian ve arkadaşları tarafından yapılan popülasyon ve yaşa bağlı bir çalışmada kemoterapi ve radyoterapi kullanım oranının yaşlılarda gençlere göre daha yüksek, bekar ve yüksek komorbiditeleri olan hastalarında kemoterapi alma olasılığının daha düşük olduğu bulunmuştur. Çalışmaya göre, uygun tedaviyi sağlamama nedenleri hastanın reddi, komorbiditesi veya klinik endikasyon eksikliği idi [157].

Ayrıca, Baxter ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada cinsiyet, ırk ve yaşla ilişkili radyasyon tedavisinin önemli belirleyicileri bulunmuştur. Radyasyon tedavisinin zamanla arttığını bulsalar da, cinsiyetler ve farklı ırk ve yaş grupları arasında eşitsizlik varlığını sürdürdü [158]. KK tedavisindeki yetersiz ve eksikliklere yönelik devam eden çalışmaların çoğu, ele alınabilecek faktörleri (değiştirilebilir ve değiştirilemez) değerlendirmeye çalışmaktadır. Bazı araştırmalar, tedavi tercihlerinin farklı kullanımların nedeni olduğunu öne sürmüş olsa da, bazıları belirli ırklardan ve etnik kökenlerden insanların önerilenleri reddetme ihtimalinin daha yüksek olduğunu bildirmiştir [159]. KK insidansı ve mortaliteyi azaltmak için dünya genelinde tarama oranlarını arttırmaya ihtiyaç olduğu açıkça görülmektedir.

Ayrıca, KK için uygun tedaviye erişimdeki eşitsizlikler mevcuttur ve KK için bakımın kalitesini ve sunumunu iyileştirmek için ele alınması gerekir.

KK'da hastalar için tedavi seçenekleri değişkenlik gösterir ve aşağıdaki değişkenler göz önüne alınarak değerlendirilir:

- Tümör büyüklüğü
- Tanı evresi
- Tümörün kolondaki veya rektumdaki yeri
- Kanseri geri dönüş riski
- Hastanın fiziksel sağlığı

Genel olarak KK için mevcut tedavi seçenekleri cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve biyolojik tedavilerdir [160].

• **Cerrahi Tedavi:** Erken evre KK'lı hastaların çoğu, "rezeksiyon" olarak bilinen bir prosedürde, tümörün mümkün olduğunca çoğunu çıkarmak için ameliyat olur. Kanseri yayılma riskini azaltmak rezeksiyonla edilecektir. Rezeksiyon ayrıca, özellikle karaciğer metastazında ve ileri evre hastalığı olan bazı hastalar için bir tedavi seçeneğidir. Kolonun etkilenen alanı laparoskopik rezeksiyonla alınarak erken dönemde etkili sonuçlar alınır [161]. Ayrıca tümörün bölgesi ve yayılımına göre radyofrekans ablasyon (kryoablasyon) ya da kolostomide yapılır.

• **Radyoterapi:** KK'da en büyük sorun lokal tümör tedavisidir. Cerrahi teknikteki gelişmelere paralel olarak gen ve adjuvan tedavi rejimleri, lokal nüks oranını azaltmaktadır. Bu tedavilerle birlikte radyoterapi tedavi başarısını çok arttırmıştır. Literatürdeki son raporlara göre, preoperatif kemoradyoterapi artık II. ve III. evre rektum kanserli hastalarda tedavi standardı olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, kısa süreli radyoterapinin etkili lokal kontrol sağladığı ve daha uzun süreli kemoradyoterapi programları ile aynı genel sağkalım sağladığı ve bu nedenle bazı durumlarda uygun bir seçenek olabileceği görülmektedir [162]. Eksternal ışın tedavisi, internal ışın tedavisi (brakiterapi), endokaviter radyasyon tedavisi, interstisyel brakiterapi ve radyoembolizasyon gibi seçenekleri vardır [163].

• **Kemoterapi:** İleri evre hastalarda genellikle cerrahi sonrası kemoterapi verilir. Kolorektal kanserlerde sıklıkla 5-fluorourasil (5-FU), Lökovorin (folinik asit veya LV) ve oksaliptatin içeren FOLFOX19 protokolü veya 5-fluorourasil (5-FU), Lökovorin (folinik asit veya LV) ve irinotekan içeren FOLFİRİ protokolü tercih edilmektedir. İnvaziv tümörler nedeniyle başlangıçta ameliyat edilemeyen ileri KK'lı bazı hastalar

ameliyat düşünülmeden önce kemoterapi ile tedavi edilebilir ve buna neo-adjuvan tedavi denilmektedir [161]. KK'lı birçok vaka başlangıçta kemoterapiye yanıt verir, ancak, çoğunda hastalık ilk basamak tedaviden sonra ilerler. Bu gerçekleştiğinde, hasta "ikinci basamak" tedavisi olarak bilinen başka bir kemoterapiye maruz kalabilir. Hastalık rekürrensini erken saptamak, sağkalımı arttırmada önemlidir, çünkü geç teşhis mortalite oranını %50'ye çıkarmaktadır. Bu nedenle hastalar rutin olarak kemoterapiyi tamamladıktan sonra düzenli kontrol edilir [164, 165].

• **Hedefli Terapi:** Hedefli terapi, kanserin spesifik genlerini, proteinlerini veya kanserin proliferasyon yaptığı dokuyu hedefleyen bir tedavidir. Bu tip tedavilerin sağlıklı hücrelere etkisi sınırlıyken, kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını engeller. Tüm tümörler için aynı hedef bölge yoktur. Bu yüzden en etkili tedaviyi bulmak için hastanın genlerini, proteinlerini ve tümöründeki diğer faktörleri tanımlamak için testler yapılır. Bunun sonucunda spesifik bölgelere, özel moleküler hedefler belirlenir. Genelde anti-anjiyogenez tedaviler, büyüme faktörü reseptör inhibitörleri kullanılır. Ayrıca bu hastalarda BRAF, HER2 ve RAS genlerinin ekspresyonlarına bakılır [166].

2.3 Bitkisel Kökenli İlaçlar

Doğal olarak elde edilen ilaçlar, hastalıklara karşı nihai ilaç gelişimi için yeni adayların keşfedilmesinde önemli bir rol oynamaktadır [167]. Doğal ilaçların üç ana kaynağı şunlardır: bitkiler, mikroorganizmalar (bakteri ve mantarlar) ve deniz organizmalarıdır [168]. 2008 yılında Harvey, doğal ürün ya da doğal ürün kaynaklı bileşiklerin ilaç pazarının %80'inden fazlasını oluşturduğunu belirtmiştir [169]. Organik olarak sentezlenmiş moleküllere kıyasla, doğal bileşikler birkaç kimyasal avantaja sahiptir: daha az hetero ve ağır atom içerirler ve daha fazla kiral merkeze ve daha çok halka yapılarına sahiptirler [168].

Doğal kaynaklı ilaçların farmakolojik birçok faydası vardır. Bunlar anti-neoplastik, anti-oksidan ve anti-mutajenik etkileriyle, bu ilaçların normal hücrelere düşük dozlarda hiçbir yan etkisi yoktur. Yüksek dozlarda tek başlarına veya diğer doğal türev ilaçlarla kombine halde uygulanırsa tümör hücresi gelişimini engelleyebilirler [170]. Bitki kökenli ilaçlar eski uygarlıklardan bu yana yüzyıllar boyunca uygulanmaktadır [171]. Son yıllarda, doğal olarak oluşan bileşikler yüksek dozda anti-kanser etkilerinden dolayı artan ilgi görmüştür [172]. Günümüzde, etnofarmakoloji

fitokimyada özellikle kemopreventif veya kemoterapötik amaçlı yeni aday ilaçların keşfedilmesinde önemli bir yaklaşımdır. Halen klinik olarak kullanılan bitki kaynaklı anti-kanser ilaçları dört ana grupta sınıflandırılabilir: taksanlar (örn., Paclitaxel), alkaloidler (örn., Vinblastin), epipodofilotoksinler (örn., Etoposide) ve kamptotesinler (örn., Irinotecan) [173].

Bu bitki kaynaklı ilaçların keşfi zaman gerektiren pahalı bir süreçtir: bu tür çalışmalar için yaklaşık en az 10 yıl ve 800 milyon dolar gerekir [174, 175]. Süreç şifalı bitkinin tanımlanması, biyolojik etkisinin değerlendirilmesi, bileşiğin klinik değerlendirmelerinde toksikolojik ve farmakokinetik analizleri ile devam eder (Şekil 2.9).

Dünyada artan kanser insidansı ve çoğu ilaca karşı gelişen direnç ile birlikte, yeni etkili ilaçlara olan ihtiyaç sürekli artmaktadır. Uzun ve maliyetli keşif prosedürleriyle bile, bitki kaynaklı ilaçlar, yeni çözüm yollarının ana kaynağı olmaya devam edecektir [173].



Şekil 2.9 : Tıbbi bitki ilaçlarının keşfi ve gelişimi.

2.3.1 Çörek otu

Ranunculaceae familyasından, *Nigella sativa* (NS; Çörek Otu: ÇO), iyileştirici özelliklere sahip mucizevi bir bitki olarak tanımlanmıştır. Bu şifalı bitki halk ve geleneksel tıpta yüzyıllardır kullanılmaktadır. NS, Avrupa, Afrika ve Asya'da bulunur, ancak özellikle Hindistan, Pakistan ve Türkiye'de, baharat veya ilaç olarak kullanılır [176].

Bu yıllık çiçekli bitki, bol miktarda tohum barındıran bir meyve üretir (Şekil 2.10) [177]. İngilizce'de siyah tohum veya kara kimyon adı verilen tohum, eski Latince'de "Panacea" olarak adlandırılır ve tüm hastalıkların tedavisi anlamına gelir. Arapça kayıtlarda, bu tohuma nimet anlamına gelen "Habbat el Baraka" terimi ile atıfta bulunulmuştur [178].

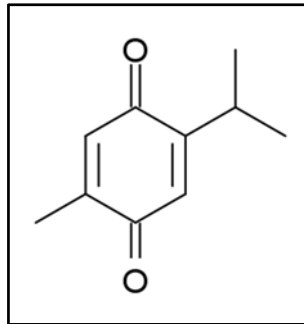


Şekil 2.10 : Siyah tohumlar ve çörek otu çiçeği.

Bugüne kadar, NS geniş bir hastalık yelpazesinde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve geniş bir farmakolojik özellik çeşidine sahip olduğunu kanıtlamıştır: anti-enflamatuvar, anti-mikrobiyal, anti-diyabetik, anti-hipertansif, anti-kanser, anti-oksidan, analjezik, spazmolitik, gastro koruyucu, hepato koruyucu, idrar söktürücü etki vb. Tüm bu aktivitelerle birlikte, astım, ishal, bronşit, romatizma ve cilt rahatsızlıkları gibi sayısız hastalığın tedavisinde kullanılmıştır [177].

2.3.2 Timokinon

Timokinon, NS'nin içeriğinde en çok bulunan etken maddedir. NS'nin yararı ve terapötik avantajları, temel olarak, ekstrakte edilmiş yağın en bol aktif bileşiminden kaynaklanmaktadır: timokinon (TQ) (Şekil 2.11).

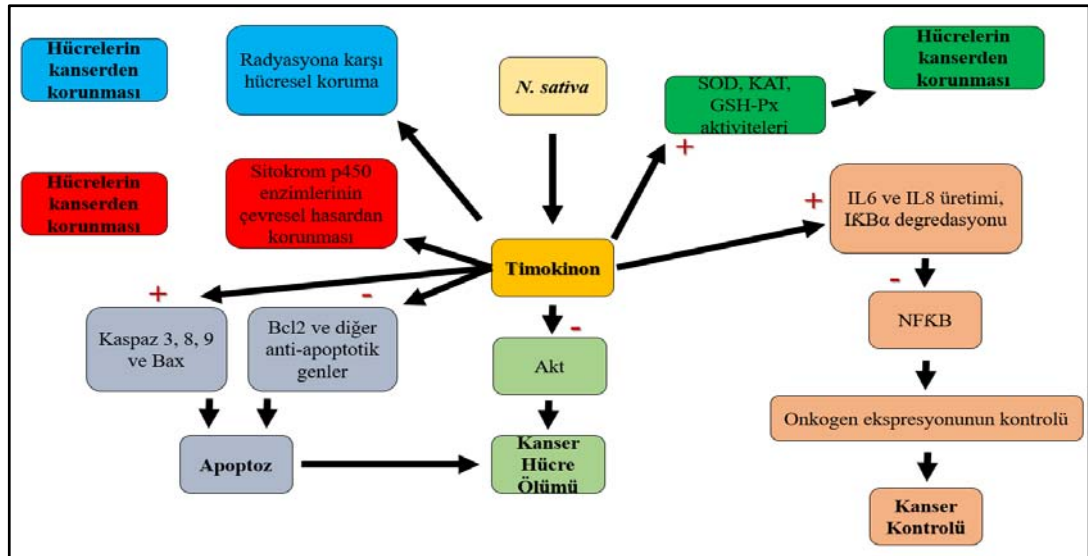


Şekil 2.11 : Timokinonun moleküler yapısı.

TQ'nun yanı sıra, çörek otu çeşitli aktif bileşikler içerir: timohidrokinon, ditimokinon, p-simen, karvakrol, 4-terpineol, t-anetol, seskiterpen longifolen, alfa-pinen, timol, vs. TQ veya 2-izopropil-5 metilbenzokinon (C₁₀H₁₂O₂, MA: 164.20g), çörek otunda %30-50'lik bir konsantrasyonda bulunur [179]. İlginç bir şekilde, tüm NS bitkisi üzerinde yapılan bir çalışma, yaprakta tohum ekstraktından 12 kat daha fazla TQ olduğunu göstermiştir [180]. *In vivo* olarak, ilaç formülasyonu, biyoyararlanım ve TQ'nun hücrel olarak alımı ile ilgili araştırmalar, lipofilik yapısından dolayı zorluklarla karşılaşmaktadır. Çeşitli hayvan modellerinde TQ oral uygulamasının, 10-100 mg/kg arasında tutulduğunda güvenli olduğu ortaya çıkmıştır [181]. Öte yandan, serum proteinlerine bağlanma TQ yeteneğini anti-kanser aktivitesini negatif yönde etkiler. Gerçekten de, TQ'nun hücre kültürü ortamında bulunan BSA'ya kovalent olarak bağlandığı gösterilmiştir [182].

• Timokinon etki mekanizmaları

Bu fitokimyosalın farmakolojik potansiyeli kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır: anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-oksidan, anti-diyabetik, anti-enflamatuvar, analjezik etkileri ile gastro, hepatik, nefro, pulmoner ve testiküler koruyucu etkinlikleri vardır [177]. En önemlisi, farklı mekanizmaları etkileyen önemli kanser önleyici özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 : Timokinonun etki ettiği farklı hücrel mekanizmalar.

• p53 bağımlı ve bağımsız mekanizmalar

Çalışılan sisteme göre, TQ'nun p53'e bağımlı veya bağımsız olarak etki ettiği gösterilmiştir. Osteosarkom hücrelerinde TQ'nun, p53'ten bağımsız olarak apoptozu indüklediği, kolon kanserinde ise hücre ölümünün indüklenmesi için p53 mevcudiyetinin önemli olduğu gösterilmiştir [183, 184]. KK'da TQ, çok çeşitli hücre hatları üzerinde *in vitro* olarak test edilmiştir. Fonksiyonel p53'e sahip hücre hatları (LoVo, HCEC-1CT, RKO, Caco-2, HCT116), TQ'ya mutasyona uğramış bir p53 içeren HT-29 hücre hücresinden daha hassas olduğu gösterilmiştir [182, 185]. Yapılan çalışmada, HCT116 p53 - / - hücrelerinin, HCT116wt hücrelerine kıyasla daha az TQ kaynaklı apoptoz ve hücre döngüsünün etkilenmesi gösterildi [183]. Mekanik olarak, işlevsel bir p53 olmadığında, DNA hasarı için bir sensör olan CHK1'in baskılanması gerçekleşmez; bu nedenle CHK1, apoptozda bir azalmaya yol açacak şekilde düzenlenmektedir [183]. Ayrıca, HCT116 hücrelerinde, TQ, bir G1 tutuklaması, p53 ve p21 protein seviyelerinin artması ve Bcl-2'nin azalması yoluyla zamana ve doza bağımlı apoptozu neden olmaktadır.

• NFκB sinyal yolağı üzerine etkileri

İmmün yanıtın anahtarı, NFκB'nin bozulması kanserin oluşmasıyla korelasyon gösterir [183]. Miyeloid lösemi hücreleri (KBM-5) üzerinde yapılan bir araştırma, TQ'nun, IκBa fosforilasyonunu bloke ederek NFκB aktivasyonunu inhibe ettiği, böylece çekirdeğe p65 translokasyonunun baskılanmasına yol açtığını gösterdi [184]. Aslında, TQ'nun NFκB tarafından düzenlendiği ve proliferasyonda rol oynadığı bilinen XIAP, Bcl-2, Bcl-xL, c-Myc, siklin, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGFR) gibi birkaç genin ekspresyonunu bastırdığı bulunmuştur. Bu nedenle TQ, nihayetinde apoptozu yol açan anti-enflamatuvar ve anti-kanser aktivite arasında köprü oluşturmaktadır

• Reaktif oksijen türlerinin üretimi (ROS)

Diğer taraftan, DLD-1 hücrelerinde, TQ kaynaklı apoptozun ROS üretimi yoluyla oluştuğu gösterilmiştir. Pro-oksidan TQ, TQ tarafından üretilen stresi yenmek için JNK ve ERK'nın fosforilasyonunu arttırmış ve böylece hücrelerin apoptotik mekanizmanın başlatmasına yol açan pro-survival rollerini uygulamamıştır [182].

Diğer çalışmalar, farklı kanser türlerinde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesini yükselterek TQ'nun anti-oksidan aktivitesini bildirmiştir [185-187]. TQ'nun bu özelliği, diğer anti-kanser tedavilerden doğan toksisitenin azaltılmasına yardımcı olabilir ve bu da TQ'nun klinik uygulamadaki olası rolünü gösterir.

• *In vivo* TQ mekanizması

In vivo zenograft fare modelinde TQ'nun tümör büyümesini inhibe ederek apoptozu indüklediği gösterilmiştir [188]. Benzer şekilde, APCMin (adenomatöz polipozis coli multipl bağırsak neoplazi) fare modeli, TQ tedavisi sırasında, tümör polipozisine özgü apoptozun indüklenmesi nedeniyle büyük poliplerin sayısında bir azalmanın gözlemlendiğini, dolayısıyla TQ'nun kemopreventif rolüne ışık tuttuğu ortaya konulmuştur [189]. Hatiboğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada B16F10 fare modelinde TQ'nun tümör boyutunu düşürdüğü gösterilmiştir [190].

• Kombinasyon tedavisinde TQ

Yıllar boyunca, TQ farklı kanser türlerinde etkinliğini kanıtlamıştır. Anti-proliferatif etkiden apoptoz indüksiyonuna, TQ'nun kanser hücrelerini geleneksel kemoterapötik ajanlara karşı kemosensitize ettiği gösterilmiştir. Kolorektal kanser 5-fluorourasil (5-FU) ile TQ SW-626 hücrelerine (insan adenokarsinom hücreleri) etkisi araştırılmış ve benzer anti-kanser etkileri bulunmuştur [191]. Son onbeş yılda, kanser hücrelerini, farmakolojik etkilerinde iyileşmelere yol açan kemoterapötik ve bitki kaynaklı ilaçların (TQ gibi) bir kombinasyonu ile tedavi etme eğilimi belirlenmiştir (Tablo 2.5). Effenberger ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 1:1 doksorubisin (DOX) ve TQ karışımının, hem HT29 hem de DOX-dirençli HT29 hücrelerinde tek başına DOX tedavisinden daha yüksek hücre ölümüne yol açtığını göstermiştir [192]. Bu çalışma TQ'nun kanser hastalarında sıklıkla gözlenen çoklu ilaç direnciyle yüzleşmedeki önemini güçlendirmiştir.

Tablo 2.5 : Timokinonun farklı kanser türleri üzerindeki etkisi.

Kanser Tip		TQ Etkisi	Referans
Kan Kanseri	Lösemi HL-60 hücre hattı	Anti-proliferatif	[193]
Meme Kanseri	MCF7 / Topo meme karsinoma	Apoptoz indüksiyonu	[194]
Pankreas kanseri	Pankreatik tümör	Kemosensitizasyon ve konvansiyonel kemoterapi	[195]
Karaciğer Kanseri	HepG2 hücresi	Anti-proliferatif	[196]
	Hepatik tümör	Karsinogeneze karşı profilaktik ve toksik	[197]
Fibrosarkoma	Fibrosarkoma hücreleri	Anti-proliferatif	[198]
Prostat	LNCap, C4-B, DU145, PC3	DNA Sentezi inhibisyonu, anti-proliferatif	[199]
	HCT116	Anti-neoplastik, proapoptotik	[188]
Kolon kanseri	SW626	TQ kemoterapötik ajan olarak önerilmiş	[191]

Aynı şekilde, 5-FU ile tedavi edilmeden önce mide kanseri hücrelerinin TQ ile 24 saat ön tedavisinin, tek başına 5-FU ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranda apoptoza neden olduğu gösterilmiştir [200]. İlginç bir şekilde, bu çalışma kolorektal kanserde araştırılmamıştır. Kemoterapötiklerin TQ ile birleştirilmesinin tedavisi, çeşitli kanser sistemlerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak kayda değer sonuçlar göstermesine rağmen, bu kombinasyonların hala faz I klinik çalışmaları yoktur (Tablo 2.6).

Tablo 2.6 : TQ ile kombine kemoterapi.

Timokinon +	Kanser Tip / Hücre Hattı	Etki	Referans
Tamoksifen	Meme Kanseri (MCF7, MDA-MB231, MDA-MB468, T47D)	Apoptoz artmış, <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> büyüme azalmış, Akt ve <i>cleaved</i> kaspaz-9 inaktive olmuş, Bax, sitokrom C ve p27 aktive olmuş	[201]
5-FU	Gastrik Kanseri, BGC823, SGC-7901, MGC-803 ve HGC-27	<i>In vitro</i> , kanserde kemoduyarlılık artmış, Bcl-2 ekspresyonu azalmış, Bax, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonu artmış	[200]
		<i>In vivo</i> 'da ise sadece 5-FU'ya göre kombine tedavinin anti-tümör etkisi daha yüksektir.	
Cisplatin	Ehrlich Asit Karsinom farelerde (Zenograft)	Suya konan 50mg/L TQ, cisplatinin anti-tümör etki gösterirken neden olduğu nefrotoksisite azalmış	[202]
Ifosfamid	Ehrlich Asit Karsinom farelerde (Zenograft)	10mg/kg TQ tedavisi 50mg/kg ifosfamidin etkisini güçlendiriyor	[203]

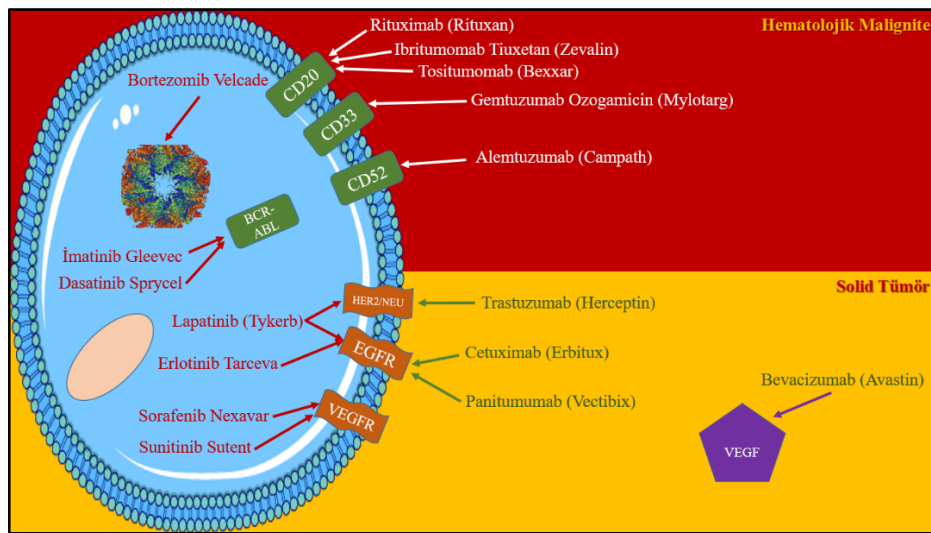
Tablo 2.6 (devam) : TQ ile kombine kemoterapi.

Timokinon +	Kanser Tip / Hücre Hattı	Etki	Referans
	Kolon: HL-60, 518A2, HT-29	HL-60 hücresinde TQ, DOX'un anti-kanser etkisini artırıyor.	
Doksorubisin	Serviks: KB-V1	Çoklu hücre direnci olan hücrelerde kaspaz-3 ve ROS üretimine bağlı apoptozu indükler.	[194, 203, 204]
	Meme: MCF-7	TQ DOX kaynaklı nefropatiyi azaltır.	
	Sıçan	Oral TQ alımı DOX kaynaklı süperoksitleri inaktive eder ve kardiyotoksisiteyi azaltır.	

• Hedefli terapi

Son 10 yılda, kanser tedavisinde yeni bir strateji ortaya atılmıştır: Bunlardan en önemlisi hedefe yönelik tedavidir. İntravenöz sitotoksik kemoterapiden farklı olarak, hedefli tedaviler hastalar tarafından daha kolay uygulanır ve tolere edilir, ancak bunlar daha sonra ishal gibi ikincil etkiler yaratabilir [205]. Bu bireysel olarak uyarlanmış kanser tedavisi iki türde olabilir: monoklonal antikolar veya küçük molekül inhibitörleri ile. Bu nispeten yeni bakış açısıyla, daha önce geleneksel kemoterapötik tedavilerden dışlanan hastalar daha fazla tedavi seçeneklerine sahip olabilirler.

2013 yılında Rajput ve arkadaşları TQ'yu AKT inhibitörü olarak önerdi, böylece bu diyet fitokimyasal küçük molekülün meme kanseri tedavisinde öneminin altını çizdi (Şekil 13) [206].



Şekil 2.13 : Farklı hedefe yönelik tedavi yollarında uygulanan monoklonal antikolar ya da inhibe edici ajanlar solid tümörlerde büyüme faktörlerinin reseptörleri üstünden, hematolojik tümörlerde CD reseptörleri üstünden etki ederler.

• TQ ve kinazlar

Fosforilasyonun denince akla ilk gelen protein kinazlar, genellikle karmaşık yollarla çalışır ve hedefe yönelik tedavi için yeni adaylar haline gelmiştir. TQ'nun kinaz düzenlemesine katılmasını açıklayan birkaç çalışma vardır; AKT1 [207], JAK2 [208], JNK [182], IKKb [184], ERK2 [182], CHEK1 [209] ve Plk1 [210]. Bu kinazların çoğu kolon kanserinde sıklıkla serbesttir. Son 10 yılda, birkaç kinaz inhibitörü klinik olarak test edilmiştir veya şu anda hedefli tedavide klinik denemeler geçirmektedir [211]. Bu terapi, tümör hücresi çoğalmasını ve ilerlemesini etkileyen moleküllere müdahale ederek kanserin büyümesini ve yayılmasını engeller. KK'da, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve prosurvival hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz (ERK) gibi kinazların, apoptozisin başlangıcından önce TQ tedavisi altında aktive edildiği gösterildi [182]. HCT116 p53 - / - hücrelerinde gözlenen TQ direnci, p53 olmadığında TQ kaynaklı DNA hasarına karşı verimsiz bir savunma mekanizması olduğunu ve serin / treonin kinaz hücre döngüsü kontrol noktası olan CHEK1'in bir upregülasyonu ile ilişkilendirilmiştir [209].

2.4 5-Fluorourasil

Anti-metabolit ilaçlar, temel biyokimyasal işlemleri inhibe ederek veya DNA ve RNA gibi makromoleküllere dâhil edilerek, normal fonksiyonları inhibe ederek çalışır. Fluoropirimidin olan 5-fluorourasil (5-FU) her ikisini de yapar.

Fluoropirimidinler, 1950'lerde sıçan hepatomlarının RNA'daki urasili normal dokulara göre daha çok ve hızlı bir şekilde kullandıkları anlaşıncaya, urasil metabolizmasına yönelik potansiyel bir anti-metabolit kemoterapisi geliştirilmiştir [212].

5-FU'nun sitotoksikite mekanizması, fluoronükleotitlerin RNA ve DNA'ya yanlış eşleşmesine ve nükleotit sentetik enzim timidilat sentazın (TS) inhibisyonuna bağlanmıştır.

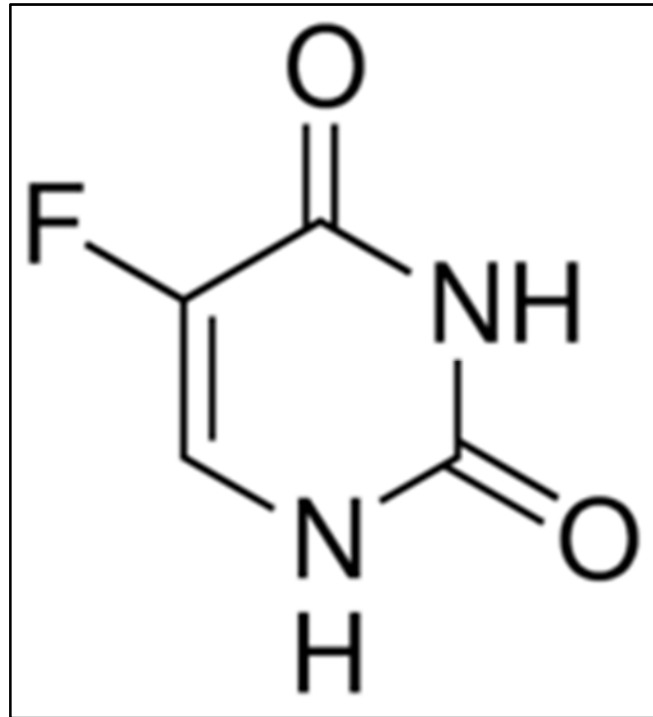
5-FU, kolorektal ve meme kanserleri dâhil olmak üzere bir dizi kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Her ne kadar diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde 5-FU, göğüs ve baş boyun kanserlerinde yanıt oranlarını ve sağkalımı iyileştirse de, kolorektal kanserde 5-FU'nun en büyük etkiye sahip olduğu görülmektedir. 5-FU bazlı kemoterapi, rezeke evre III KK'lı hastaların sağkalımını

iyileştirir [213]. Bununla birlikte, ileri KK için birinci basamak tedavi olarak 5-FU bazlı kemoterapinin cevap oranları sadece %10-15'tir [214]. 5-FU'nun Irinotecan ve Oksaliptatin gibi daha yeni kemoterapilerle kombinasyonu, ileri kolorektal kanser için cevap oranlarını %40-50'ye yükseltti [215, 216]. Bununla birlikte, bu gelişmelere rağmen, acilen yeni terapötik stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. 5-FU'nun hücre ölümüne neden olduğu ve tümörlerin 5-FU'ya dirençli hale geldiği mekanizmaları anlamak, bu direnci tahmin etmek veya aşmak için atılmış önemli bir problemdir.

2.4.1 5-FU etki mekanizması

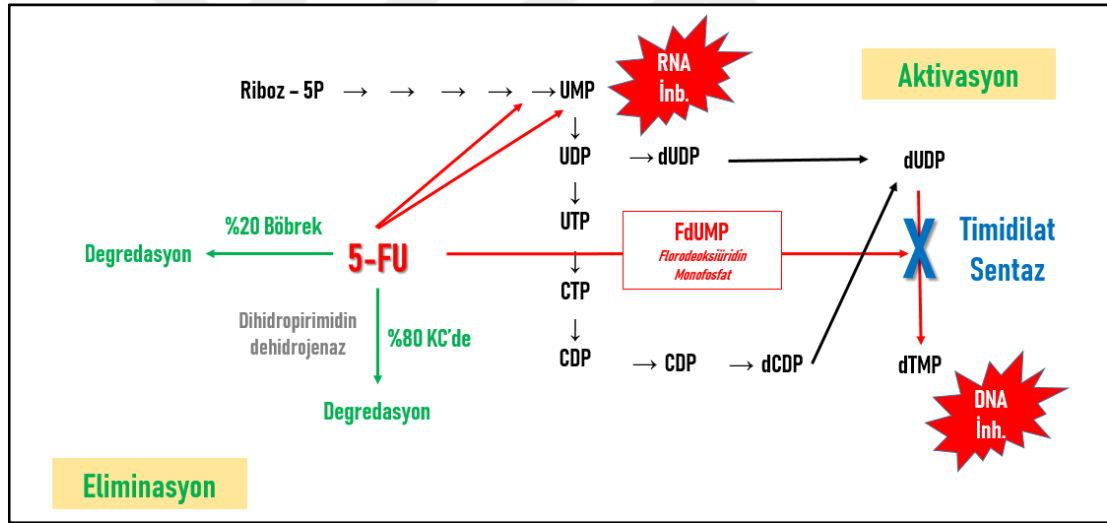
5-FU, urasilin 5. karbonunda konumundaki karbon yerine flor bulunan bir urasil analogudur (Şekil 2.14) [217]. Urasil ile aynı kolaylaştırılmış taşıma mekanizmasını kullanarak hücreye hızla girer. 5-FU hücre içi olarak çeşitli aktif metabolitlere dönüştürülür: florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), florodeoksiridin trifosfat (FdUTP) ve floroüridin trifosfat (FUTP) (Şekil 2.15) - bu aktif metabolitler, RNA sentezini ve TS'nin etkisini bozar.

5-FU katabolizmasındaki hız sınırlayıcı enzim, 5-FU'yu dihidrofluorourasile (DHFU) dönüştüren dihidropirimidin dehidrojenazdır (DPD) [218]. Uygulanan 5-FU'nun %80'inden fazlası normal olarak birincil olarak DPD'nin bolca eksprese edildiği karaciğerde katabolize edilir [218].



Şekil 2.14 : 5-FU'nun yapısı.

Sonuç olarak, 5-FU hem ileri hem de erken evre KK tedavisinde ana ajandır. 5-FU anti-kanser aktivitesini modüle etmek için araştırılan stratejiler arasında 5-FU bozulmasının azaltılması, 5-FU aktivasyonunun artırılması ve FdUMP'nin TS bağlama aktivitesinin artırılması bulunur. Lökovorin (LV), hücre içi 5,10-metilen tetrahidrofolat (CH₂THF) havuzunu artırır, böylece florodeoksiridin monofosfat (FdUMP) tarafından timidilat sentaz (TS) inhibisyonunu artırır. Enilurasil ve urasil, 5-FU'nun DPD aracılı bozulmasını önler. Metotreksat (MTX) 'in fosforibosil pirofosfat (PRPP) seviyelerini artırarak 5-FU aktivasyonunu arttırdığı düşünülmektedir. İnterferonların (IFN'ler), timidin fosforilaz (TP) aktivitesini arttırdığı, 5-FU tedavisinin neden olduğu akut TS indüksiyonunu iptal ettiği ve 5-FU aracılı DNA hasarını arttırdığı rapor edilmiştir (Şekil 2.16). Kapesitabin, karboksilesteraz ve sitidin deaminazın sıralı etkisiyle karaciğerde 5'-deoksi-5 floroüridin'e (5'DFUR) dönüştürülen bir 5-FU ön ilacıdır. 5'DFUR, TP ile 5-FU'ya dönüştürülür.



Şekil 2.16 : 5-FU modülasyonu.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Gereç

3.1.1 Cihazlar

Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar Tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1 : Cihaz listesi.

Cihaz Adı	Marka	Kullanım Amacı
<i>In Vivo</i> Imaging System (IVIS)	Perkin Elmer	Hayvanda tümör görüntüleme için kullanılmıştır.
Hücre Kültürü Kabini (Class II)	Safe Fast Classic Faster Air	Hücre kültürü ve transfeksiyon işlemleri için kullanılmıştır.
Karbondioksit İnkübatörü	ESCO - Panasonic	Hücre kültürü deneylerinde kullanılmıştır.
Ters Işık Mikroskobu	Novel	Hücre kültürü deneylerinde kullanılmıştır.
Floresans Mikroskop	Leica DM 1000	Apoptoz, DNA Hasarı ve Transfeksiyon kontrolünde kullanılmıştır.
Akış Sitometri	BD Facs Canto II	MMP, Apoptoz ölçümünde kullanılmıştır.
Multiplaka Okuyucu	Thermo Varioskan	Fotometrik, Luminometrik ve Florometrik okumalar bu cihazda yapılmıştır.
Soğutmalı Santrifüj	Hermle	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Western blot sistemi	Biorad	Western blot çalışmaları için kullanılmıştır.
Jel Görüntüleme Cihazı	Vilbert Laurmart Fusion Fx5	Western Blot sonrası membranlardaki protein ekspresyonlarını ölçmek için kullanılmıştır.
Derin Dondurucu (-20°C / -80°C)	Uğur / Haier	FBS, Blastasidin, Pen/Strep, L-Glutamin gibi sıvıların saklanması için kullanılmıştır.
Buzdolabı (+4)	Uğur	Örnek, kit, medyum, tampon vb'nin saklanması için kullanılmıştır.
pH metre	Milwaukee Instruments Inc	Hazırlanan tamponlarda pH ayarlaması için kullanılmıştır.
Hassas Terazi	Mettler Toledo	Numunelerin tartılmasında kullanılmıştır.
Deiyoze su cihazı	Sartorius Stedim	Tüm deneylerde kullanılmıştır.
Vortex	Stuart	Stok solüsyonu hazırlarken kullanılmıştır.

Tablo 3.1 (devam) : Cihaz listesi.

Cihaz Adı	Marka	Kullanım Amacı
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo	DNA Hasarı'nda jel yürütürken kullanılmıştır.
Otomotik Pipetler	Eppendorf	Tüm deneylerde kullanılmıştır.
Manyetik Karıştırıcı	Biocote, Stuart CB162	Tüm deneylerde kullanılmıştır.
Orbital karıştırıcı	Biosan, OS20	Tüm deneylerde kullanılmıştır.
Sonikatör	Memmert, ENB29, Almanya	Tüm deneylerde kullanılmıştır.
Sıcak su banyosu	Hellma Analytics	Tüm deneylerde kullanılmıştır.
Isıtıcı blok	Daihan	Western blot ön aşamasında protein denatürasyonu için kullanılmıştır.
Buz makinası	Maestrogen Inc	Tüm deneylerde kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Tablo 3.2'de yer almaktadır.

Tablo 3.2 : Kimyasal listesi.

Kimyasal Adı	Marka	Kullanım Amacı
Sodyum Klorür (NaCl)		
Potasyum Klorür (KCl)		
Sodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)		
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich	Genel laboratuvar solüsyon ve tamponları için kullanılmıştır.
Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)		
Tris HCl		
Tris Baz		
Fetal Sığır Serumu		
Penisilin/Streptomisin F12K Medyumu	Gibco	
Eagle's Minimum Essential Medium (E'MEM)	Sigma-Aldrich	Genel hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.
Tripsin-EDTA	Sigma-Aldrich	
L-Glutamin	Sigma-Aldrich	
Cryopreservation Medyum	ABM	

Tablo 3.2 (devam) : Kimyasal listesi.

Kimyasal Adı	Marka	Kullanım Amacı
Blastacidin-S HCl Kalsiyum Klorür (CaCl ₂) Polybrene Hepes D-Glukoz Monohidrat D-Lusiferin	Sigma-Aldrich	Hücrelerin transfeksiyonu için kullanılmıştır.
GFP vector – plenti CMV GFP Blast (659-1) Plasmid # 17445 Luc vector – plenti CMV V5 Luc Blast (w567-1) Plasmid # 21474 psPAX2 Plasmid # 12260 pMD2.G Plasmid # 12559	Addgene	
Timokinon 5-Fluorouracil	Sigma-Aldrich Deva	<i>In vitro</i> ve <i>in vivo</i> çalışmalarda kullanılmıştır.
Diklorofloroscein Diasetat Akridin turuncusu Etidyum Bromür		Hücre içi reaktif oksijen türlerinin ölçümü için kullanılmıştır. Apoptoz testleri için kullanılmıştır. Apoptoz ve DNA Hasarı görüntülemesi için kullanılmıştır.
Normal Melting Agar Low Melting Agar Dimetil Sülfoksit (DMSO) Triton X Sodyum Hidroksit (NaOH) HCl	Sigma-Aldrich	DNA Hasarı için hazırlanan solüsyonlarda kullanılmıştır.
RIPA Tamponu Coomasie Brilliant Blue G250 Fura-2AM	Santa Cruz BioRad Sigma-Aldrich	Hücre lizisi için kullanılır. Protein ölçümü için kullanılır. Hücre içi kalsiyum ölçümü için kullanılır.
3,3'-dihexyloxycarbocyanine Iodide (DiOC6(3))	Santa Cruz	Mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü için kullanılmıştır.
Laemlli Sample Buffer Protein Ladder	Biorad Thermo	Western Blotta örnek yüklerken kullanılmıştır. Western blotta standart olarak kullanılmıştır.
Bax primer antikor Bcl-2 primer antikor Kaspaz-3 primer antikor Kaspaz-9 primer antikor p53 primer antikor p21 primer antikor Anti-mouse sekonder antikor Anti-rabbit sekonder antikor	Cell Signaling Technology	Protein ekspresyonlarını belirlemek için western blotta kullanılmıştır.

3.1.3 Kullanılan kitler

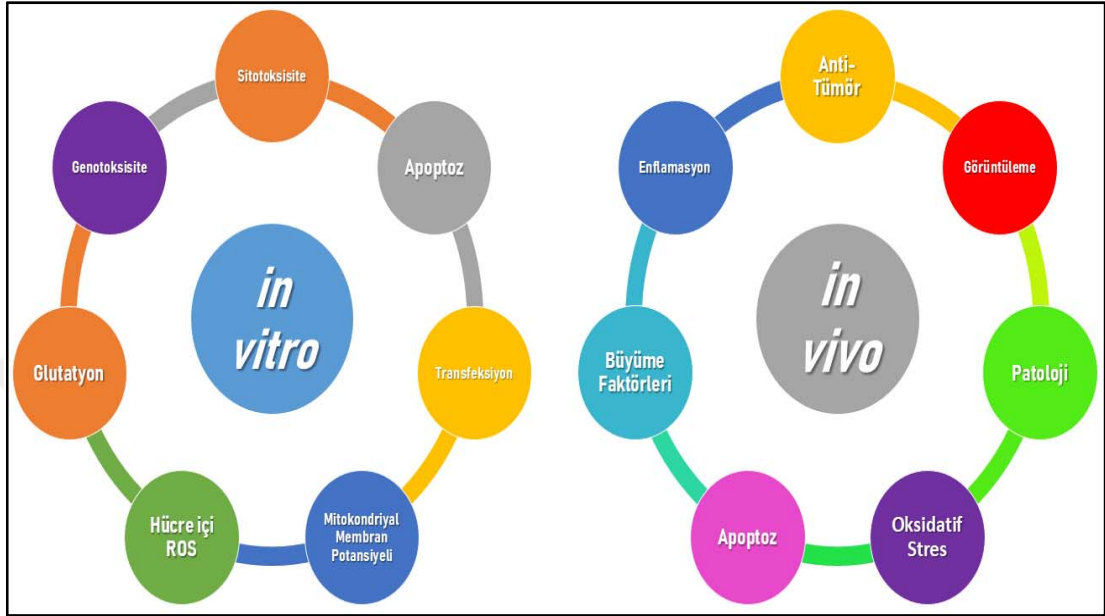
Tez çalışmasında kullanılan kitler Tablo 3.3'de yer almaktadır.

Tablo 3.3: Kit listesi.

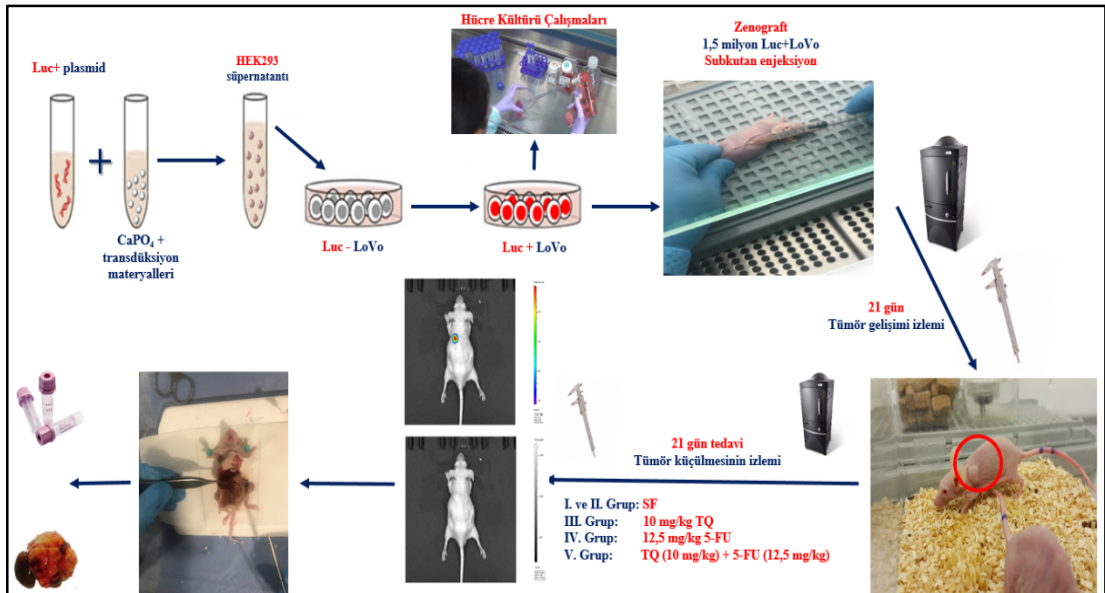
Kit Adı	Marka	Kullanım Amacı
<i>Plasmid Isolation Midi Kit</i>	M&N	Transfeksiyon için kullanılmıştır.
<i>CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Kit</i>	Promega	Sitotoksosite deneyleri için kullanılmıştır.
<i>GSH-Glo™ Glutathione Assay Kit</i>	Promega	Hücre kültüründe glutatyon düzeylerini ölçmek için kullanılmıştır.
<i>Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit</i>	ThermoFisher	Akış sitometrisinde apoptoz ölçümleri için kullanılmıştır.
ELISA Kitleri	Elabscience	Oksidatif stres, enflamasyon ve büyüme faktörlerinin ölçümü için kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

Çalışmamızın deneysel aşaması 2 bölümden oluşmaktadır. *In vitro* hücre kültüründe yapılan çalışmalar ve *in vivo* hayvan modelinde yapılan çalışmalardır (Şekil 3.1 ve 3.2).



Şekil 3.1 : Deneysel aşamalar 1.



Şekil 3.2 : Deneysel aşamalar 2.

3.2.1 *In vitro* deneyler

3.2.1.1 Hücre kültürü çalışmaları

Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den ticari olarak alınan LoVo (ATCC® CCL-229) kolon kanser ve CCD18Co (ATCC® CRL 1459™) kolon sağlıklı hücre hatları çalışmada kullanıldı. LoVo kolon kanser hücre hattı F12K besiyeri içine %10 FBS ve %1 P/S eklenerek kültüre edildi. CCD18Co kolon sağlıklı hücre hattı E'MEM besiyeri içine %10 FBS, %1 L-Glutamin ve %1 P/S eklenerek 37°C'de %5 Karbondioksit (CO₂) ve %95 hava bulunan inkübatörde kültüre edilip, çoğaltıldı. Cryo tüplerinde donmuş gelen hücreler 37°C'de 1 dakika içinde çözüldükten sonra falkona aktarılmış complete besiyerlerine eklenerek 800 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı. Pellet pipetaj yapılarak içinde complete besiyeri olan 25cm²'lik kültür flasklarına ekildi ve CO₂ inkübatörüne kaldırıldı. Hücreler her gün kontrol edildi ve konflue olduktan sonra besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve 1x PBS ile yıkandı. Hücrelerin üstüne 0,5 ml Tripsin-EDTA (%0,25) eklendi ve inkübatöre kaldırıldı. 3-4 dakikalık İnkübasyon sonrası hücreler hafifçe çalkalanarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Tripsin-EDTA'yı nötralize etmek için flaskın için 5 ml *complete* besi yeri eklendi ve oluşan hücre süspansiyonu 15 ml steril falkona aktarılıp 800 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı aspire edildikten sonra hücre pelleti 2 ml taze *complete* besi yeri eklenip, süspanse edildi. Önceden inkübatörde bulunan içinde *complete* besiyeri olan 75cm²'lik flasklara ekildi. Hücre pasajlama döngüsü bu şekilde devam etti. Pasaj sonrası hücreler 1:1 oranında tripan mavisi ile karıştırılıp *thoma* lamında mikroskopta sayıldı. Sitotoksisite ve ROS için 96'lı plate'lere kuyu başı 15000 hücre, genotoksisite ve apoptoz için 6'lık *well*'lere kuyu başına 100000 hücre ekildi. Fazla hücreler ise saklama medyumunu ile 1:1 oranında karıştırılıp ml'de 1-2 milyon hücre olacak şekilde *cryo* viallere aktarılıp azot tankına kaldırıldı [219]. Çalışmadaki tüm ekimler hücrelerin yapışması için 24 saatlik inkübasyon, verilen maddelerin sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerini incelemek için 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakıldı.

3.2.1.2 Transfeksiyon

2 farklı (Luc ve GFP) plasmidi (psPAX2 Plasmid # 12260 ve pMD2.G Plasmid # 12559) agarda bakteri içinde geldi. Gelen bakteriler ayrı ayrı ekilip tek (*single*) koloni seçilip plasmid izolasyonu kiti ile izolasyon yapıldı. İzole edilen plasmidler nanodrop'ta 1 µg/µl olacak şekilde ölçülüp -80°C'e alikotlanarak stoğa kaldırıldı.

Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den ticari olarak alınan insan böbrek epitel hücresi HEK293 (293 [HEK-293] ATCC® CRL-1573™) transfeksiyon için konak hücre olarak kullanıldı. HEK293 böbrek epitel hücre hattı E'MEM besiyeri içine %10 FBS ve %1 P/S eklenerek kültüre edilip, çoğaltıldı. 25 cm²'lik kültür flaskına ekilen hücreler 24 saat sonra aşağıdaki karışım (A+B) medyuma karıştırılarak eklendi (Tablo 3.4).

Transdüksiyon

Tablo 3.4 : Transdüksiyon karışımı.

A			
	Ekleme Sırası	GFP	LUC
CaCl ₂	6	30 µl	30 µl
psPAX2 Plasmid #12260	5	2 µg (Stoktan 2 µl)	2 µg (Stoktan 2 µl)
pMD2.G Plasmid #12259	4	0,5 µg (Stoktan 0,5 µl)	0,5 µg (Stoktan 0,5 µl)
GFP Vector – Plenti CMV GFP Blast (659-1) Plasmid #17445	3	2,5 µg (Stoktan 2 µl)	-
Luc Vector – Plenti CMV V5 Luc Blast (w567-1) Plasmid #21474	2	-	2,5 µg (Stoktan 2 µl)
HiClone Su	1	265 µl	265 µl
TOPLAM		300 µl	300 µl
B			
2xHBS		300 µl	

Karışım HEK293 hücrelerinin üstüne eklendikten 8 saat sonra medyum aspire edildi ve 1x dPBS ile yıkandı. Taze medyum hücrelerin üstüne eklendikten sonra her 24 saatte 1 kez 3 tekrarlarla hücre medyumunu yenilendi ve aspire edilen medyum santrifüj edilip (500 g x 10 dakika) +4°C'ye kaldırılıp 72. saatin sonunda tüm aspire edilen medyumlar birleştirildi. Virüs içeren aspire edilen medyumlar alikotlanarak -80°C'ye kaldırıldı [220].

Blastacidin-S HCl toksik dozunun belirlenmesi

GFP ve Luc transfeksiyonu yapılacak LoVo hücreleri 6'lık *well*'lere ekilerek 24 saatli inkübasyonun ardından transfeksiyonda selektiviteye neden olan blastacidin-S HCl (BSH) antibiyotigine karşı doz belirlendi. Bu yüzden de her kuyuya farklı konsantrasyonda (0,5-8 µg/ml) BSH eklenip inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda sadece tek hücre kalan kuyu bulunarak kaydedildi. LoVo hücresi için bu değer 6 µg/ml'dir. Transfekte hücreler için bundan sonra complete besiyerinin içinde BSH bulunacaktır.

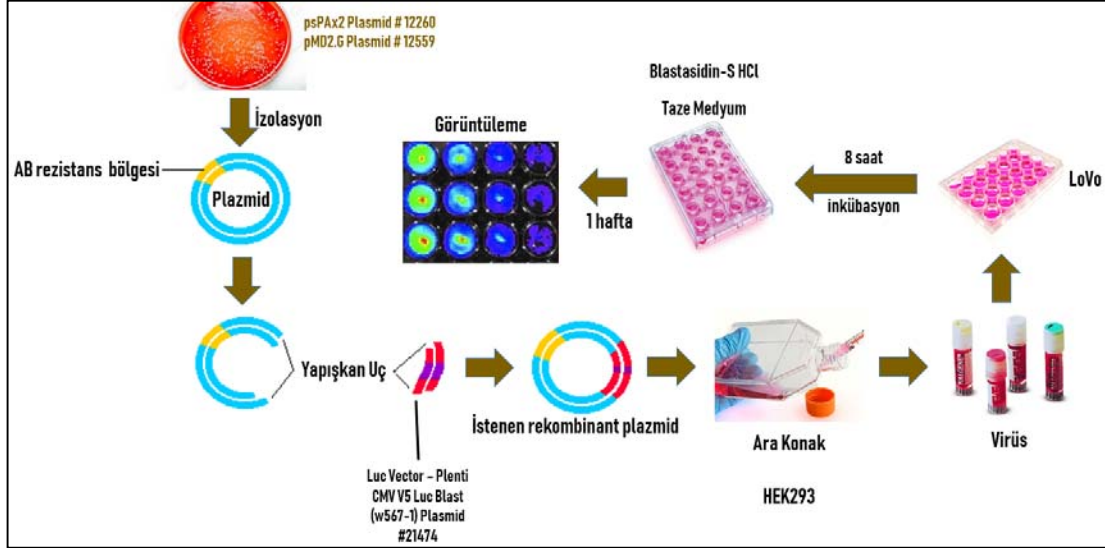
Transfeksiyon

LoVo hücreleri 24'lük *well*'lere 3×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra içinde transdüksiyon sonrası alikotlanıp -80°C'ye kaldırılan virüs içeren medyumdan 50µl alınıp 6µg/ml BSH ile 5 µg/ml polybrene bulunan 950µl *complete* besiyerine eklendi. Bu karışım kuyu başına 1 ml olacak şekilde eklendikten sonra hücreler 8 saat inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda medyumlar aspire edilip, hücreler 1x dPBS ile yıkandıktan sonra içinde 6 µg/ml BSH olan taze *complete* besiyeri eklenip hücreler çoğaltılarak çalışmalara başlandı. Böylelikle transfeksiyonun tutmadığı hücreler elimine olup, sadece transfekte olan hücreler çoğalacaktır. Transfeksiyonun kontrolünü, luminometrede, floresans mikroskopta ve *in vivo* görüntüleme cihazında yapıldı [221].

Biyoluminesans Görüntüleme

Biyoluminesans görüntüleme hayvanlarda tümörü gerçek zamanlı ve invazif olmayan bir şekilde görüntülenmesini sağlar. Lusiferaz tarafından katalize edilen ATP ve O₂ varlığında lusiferinin oksilüsiferine dönüşmesiyle salınan fotonun tespitine dayanır. Yani lusiferaz sentezleyen hücreye/tümöre lusiferin verildiğinde luminesans fotonlar ölçülebilecektir. Sonuç olarak, biyoluminesans yoğunluk, tümörlerin aerobik koşullardaki büyüklüklerine ve aktivitelerine bağlıdır.

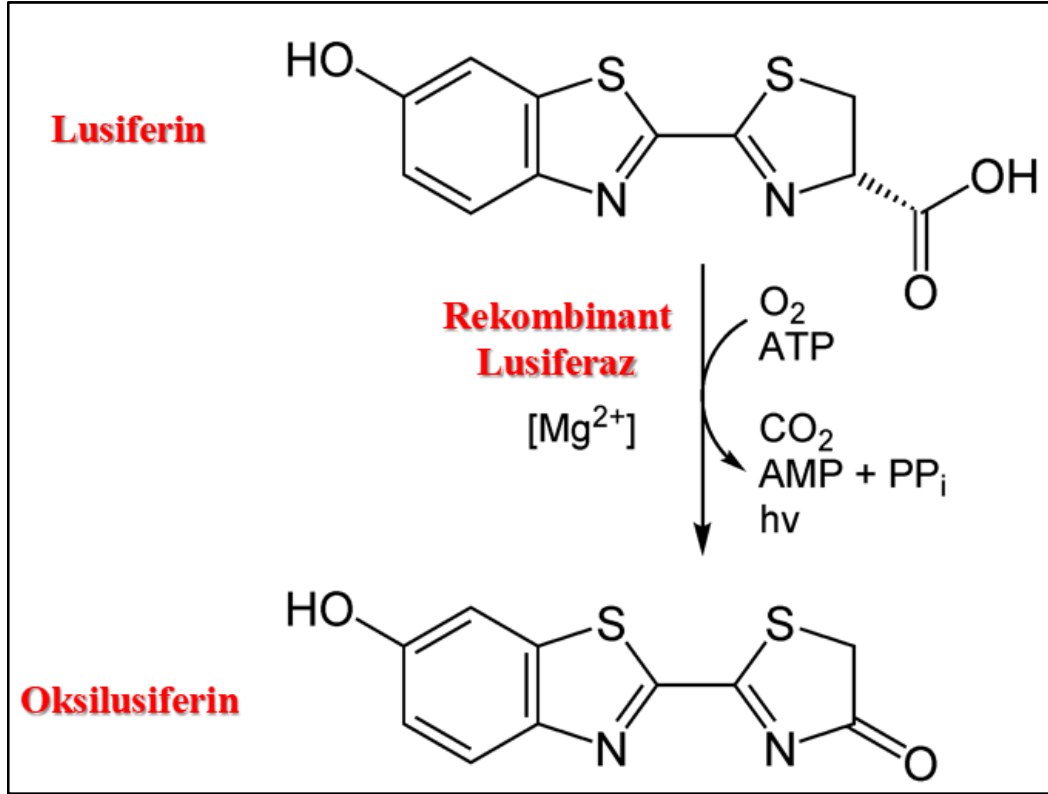
İlk olarak transfeksiyonun başarı sağlayıp sağlamadığını belirlemek için 6'lık *well*'lere 5x10⁴ transfekte LoVo hücresi ekildi ve 24 saatlik inkübasyonun ardından medyumlar aspire edildi ve 1xDPBS ile kuyular yıkandı. Kuyu başına 1 µM D-lusiferin eklenip *in vivo* hayvan görüntüleme cihazında luminometrik olarak görüntü alınıp, kontrol edildi. Aynı işlem zenografik olarak LoVo hücresi ekilen Balb/c atimik *nude* farelere de tümör oluşuktan sonra anestezi (Rompun + Ketazol) altında intraperitonel olarak 10 µM D-lusiferin enjekte edilerek 5 dakika içinde IVIS'te (Perkin Elmer, Waltham-ABD) görüntü alındı. Tümör bölgesi (ROI: ilgilenilen bölge), çizilip, yayılan luminesans (foton/sn) olarak IVIS görüntüleme yazılımı ile ölçüldü (Şekil 3.3) [222].



Şekil 3.3 : Transfeksiyon aşamaları ve kontrol.

3.2.1.3 Sitotoksosite Testi

Çalışmada sitotoksositeyi kantifiye edebilmek için luminometrik ATP testi kullanıldı. Ticari olarak satın alınan *CellTiter-Glo*® luminesans hücre canlılık kiti canlı hücrelerin varlığını işaret eden ATP miktarına dayalı homojen bir yöntemdir. Hücre çoğalması (proliferasyon) ve sitotoksosite analizleri için idealdir. Yöntemin prensibi, ATP miktarı hücre sayısı ile orantılı olduğundan dolayı [223] ortamdaki lusiferin hücrelerdeki ATP varlığında rekombinant lusiferaz enzimi ile oksilusiferine dönüşerek luminesans yayar (Şekil 3.4) [224]. Opak beyaz 96'lık plate'lere ekilen 10^4 hücreye 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda hazırlanan TQ (2,5-100 μM), 5-FU (0,039-25 μM) ve kombine dozları eklendi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından ATP solüsyonu eklenip 5 dakika içinde *Thermo Varioskan multiplate* okuyucuda luminesans ölçüm alındı.



Şekil 3.4 : ATP sitotoksosite ölçüm prensibi.

3.2.1.4 Hücre ayırma

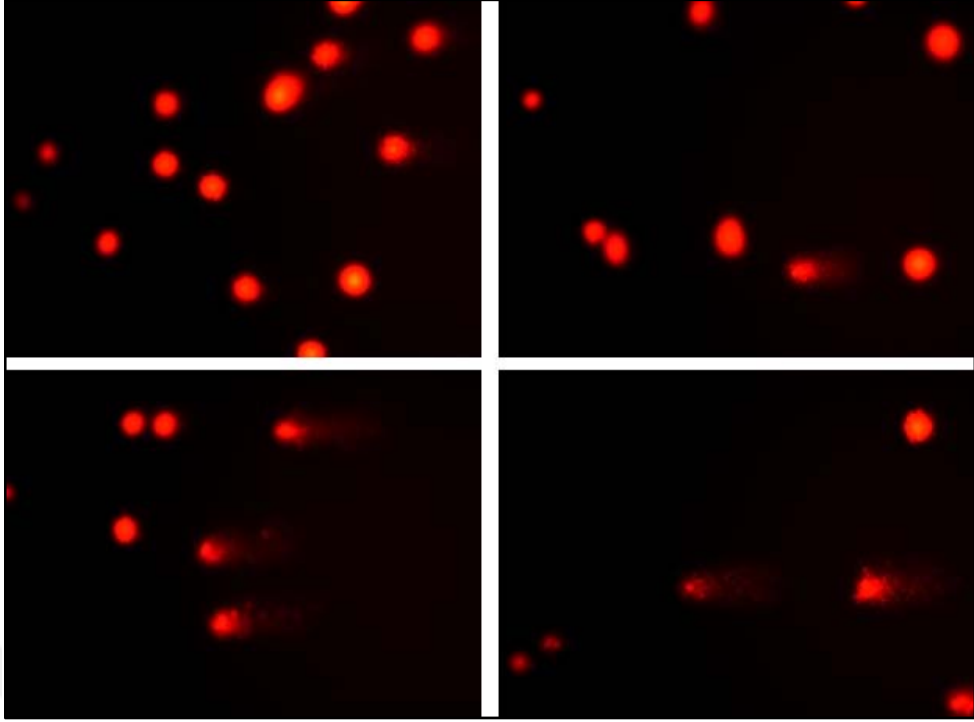
Genotoksisite, apoptoz, mitokondriyal membran potansiyeli, glutasyon ve protein ekspresyonlarının ölçümü için 6'lık *well*'lere 10^5 hücre ekilip 24 saat inkübasyonun ardından TQ, 5-FU ve kombine tedavi verilip tekrar inkübatörde 24 saatlik inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun ardından besiyerleri aspire edildi. Hücreler 1xPBS ile yıkandıktan sonra kuyu başına 100 µl tripsin-EDTA eklenip, 3 dakika inkübatöre kaldırıldı. Tripsin-EDTA'nın etkisi önceden aspire edilen homolog besiyerleri eklenerek kaldırıldı. Hafif pipetaj yapılarak steril ependorfa alınan hücreler +4°C'de 800 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar enflamasyon belirteçleri için kaldırıldı ve pellet tekrar 1,5 ml 1xPBS ile pipetaj yapıp tekrar santrifüj edildi. Yıkama işlemi bir kez daha gerçekleştirildikten sonra diğer aşamalara geçildi. Tüm konsantrasyonlar 3 kere tekrarlanarak çalışıldı.

3.2.1.5 Genotoksisite testi

Genotoksik hasar yani DNA Hasarı Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilen alkali tekli hücre elektroforezi yöntemi (comet assay) ile ölçüldü [225, 226].

Yöntemin Prensibi

Comet Assay metodu DNA'nın farklı elektriksel yük ve ağırlığına göre elektrik alanında farklı göç etmesine dayalı bir yöntemdir. Hücreler agarozaya yerleştirilip lizise uğratılır. Eğer DNA'da herhangi bir hasar (genotoksisite) yoksa DNA görünümü kompakttır yani herhangi bir kuyruk (comet) oluşturmaz. Oysa DNA hasara uğrayıp fragmente olmuşsa, oluşan bu fragmentler farklı elektriksel yük ve molekül ağırlığına sahip oldukları için elektroforetik ortamda farklı hareket edeceklerinden, DNA lar floresan boya olan etidyum bromür ile boyandıklarında kuyruklu bir görüntü oluşturacaklardır (Şekil 3.5) [225, 226].



Şekil 3.5 : DNA Hasarı (Comet Assay).

Yönteminin Uygulanışı

Slaytların Hazırlanması

50°C’de NMA %1’lik ddH₂O beher içinde hazırlanır ve lamalar behere batırılıp bir tarafı silinerek kurutmaya bırakıldı. Agarlı lamalar hazırlandıktan sonra tripsin-EDTA ile kaldırılan hücre ve 40°C’de ddH₂O ile hazırlanan %0,65’lik LMA (85:15) ependorf içinde karıştırıldı. 85 µl karışımdan çekilir ve önceden hazırlanmış olan agarlı lama damlatılıp, lamel kapatılır. Agarozun donması için buzdolabında 5 dakika bekletildikten lamel lamdan çıkartılır ve sonra lizis aşamasına geçildi [219, 225].

Lizis aşaması

Lizis aşamasına hazırlanan lamalar maksimum bir gece lizis solüsyonunda (pH:10 - 100 mM EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM Tris Baz ve %1 triton X-100) buzdolabında inkübe edildi. Lizis solüsyonu hücre içeriğinin dışarı çıkmasını sağlar ve DNA’da kırık varsa ve parçalanmışsa fragmente bölgeyi tutan bağları kopmasını sağlandı [219, 225].

Elektroforez aşaması

Lizis aşamasından sonra lamalar 1xPBS ile yavaşça 5 kez yıkanır. Elektroforez tankına yerleştirilen lamalar elektroforezden önce +4°C'de 30 dakika elektroforez tamponun (pH:10 - 1mM EDTA, 300 mM NaOH) inkübe edilir. İnkübasyon sonrası 300 mA, 14 volt'ta 25 dakika elektroforez gerçekleştirildi [219, 225].

Nötralizasyon aşaması

Elektroforezden sonra lamalar 5 dk süre ile 5 kez nötralizasyon tamponu (pH:7,5 - 0.4 M Tris-HCl,) ile oda sıcaklığında muamele edildi [219, 225].

Boyama aşaması

Boyama aşamasında kullanılan boya nükleik asitlere özgü olan etidyum bromürdür. Nötralizasyon aşamasından sonra lamaların üstündeki jellere 2 µg/ml etidyum bromür damlatılıp lamelle kapatılır. Örnekler leica floresans mikroskop ile (20X, Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 20 nm) DNA'ların görüntüsü değerlendirilip, kaydedildi.

Analiz

Floresans mikroskoptan kaydedilen görüntüler bilgisayardaki analiz programı (Comet Assay IV, Perpective Ins.) ile değerlendirildi. Hartmann'a göre DNA hasarı ölçümündeki ilk kriter kuyruk yoğunluğunun ölçülmesidir [227]. Programdan DNA'lardaki kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity) ölçülerek hesaplandı.

3.2.1.6 Apoptoz testleri

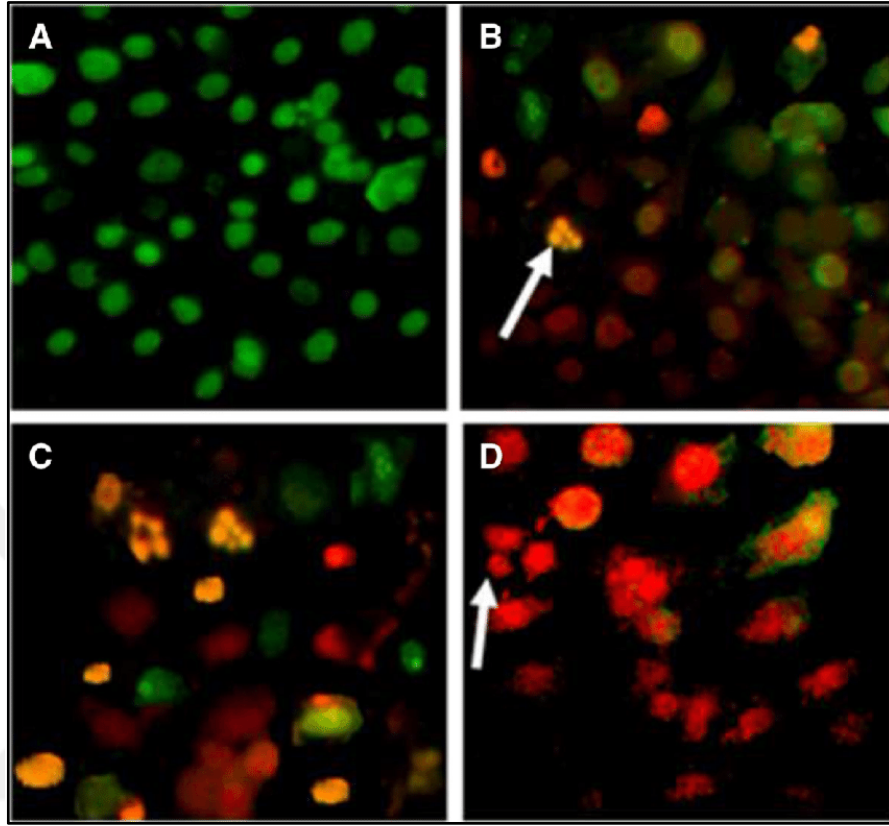
Akridin turuncusu (AT) / etidyum bromür (EB) çift boyaması

Akridin turuncusu/etidyum bromür boyası (AT/EB), hücrelerde morfolojik değişikliklerin değerlendirilmesi için kullanılan çift boyamadır [228]. Akridin turuncusu boyası vital bir boyadır ve hem canlı hem de ölü hücreleri boyar. Etidyum bromür boyası ise sadece membran bütünlüğünü kaybetmiş hücreleri boyar.

Canlı hücreler homojen bir yeşil, erken apoptotik hücreler ise kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma dolayısıyla özellikle çekirdeklerinde parlak yeşil noktalar içerecektir.

Geç apoptotik hücreler hem AT hem de EB içerdiğinden dolayı turuncu rengi alacaktır.

Fakat nekrotik hücreler sağlıklı hücrelerin aksine yoğunlaşmış kromatin içerdiğinden farklı bir nükleer morfoloji ve boya yoğunluğuna sahip olduğundan bozuk şekilli kırmızı görünür (Şekil 3.6) [229].



Şekil 3.6 : Canlı, apoptotik ve nekrotik hücreler.

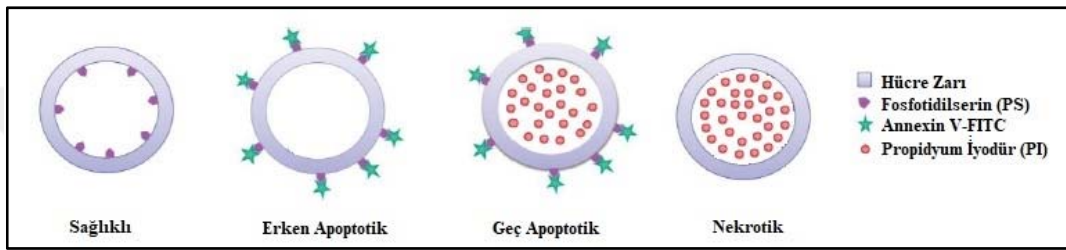
6'lık *well*'lere ekilen hücreler IC₅₀ altındaki dozlarda tedavi uygulandıktan 24 saat sonra tripsin-EDTA ile kaldırıldı. 1xPBS ile yıkanan hücreler +4°C'de 500g'de 5 dakika santrifüj ardından süpernatant atıldı. Boş lamın üzerine 10 µl hücre pelleti ve 10 µl AT/EB solüsyonu (100 µg/ml AT + 100 µg/ml EB) eklenip lamel kapatıldı. Görüntüler floresans mikroskopta (Leica DM 1000) değerlendirilip kaydedildi. Rastgele kaydedilen hücrelerde her konsantrasyonda 3 tekrar ve minimum 100 hücre sayıldı [219].

Annexin V-FITC ile akış sitometri analizi

Erken apoptozda hücre membranında farklı değişiklikler meydana gelir. Apoptoz kaskatındaki ilk değişiklik normalde hücre zarının iç yüzünde bulunan fosfotidilserinin

(FS) apoptozla birlikte hücre zarının dışında konumlanır. *Annexin V-FITC* konjugatı ortamda kalsiyum varlığında FS'ye bağlanır.

Erken evredeki apoptoz *annexin V-FITC* ile saptanır. Geç apoptoz ve nekroz durumunda hücre zar bütünlüğü bozulmaya başlar. Bu evreleri saptayabilmek için DNA'ya spesifik bir boya olan propidyum iyodür (PI) boyası kullanıldı. Hücrelerin erken ve geç apoptoz, nekroz yada sağlıklı olduğunu belirlemek için *annexin V-FITC* boyası ile PI boyası aynı anda verildi. Hücreler (FITC:-/PI:-) ise sağlıklı, (FITC:+/PI:-) ise erken apoptotik, (FITC:+/PI:+) ise geç apoptotik, (FITC:-/PI:+) ise nekrotiktir (Şekil 3.7) [230].



Şekil 3.7 : *Annexin V-FITC* kit çalışma prensibi.

Akış sitometrisinde apoptoz analizi *Annexin V-FITC* apoptoz tayin kitinin (EBioscience BMS500F1) prospektüsüne göre yapılmıştır. Kısaca 6'lık *well*'lere ekilen hücreler IC_{50} altındaki dozlarda tedavi uygulandıktan 24 saatin ardından tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Hücreler 1xPBS ile yıkanıp 195 μ l 1x bağlanma tamponu ve 5 μ l *annexin V-FITC* boyası ile oda sıcaklığında 10 dakika karıştırıldıktan sonra inkübe edildi. 200 μ l 1x bağlanma tamponu ekleyip +4°C'de 1500xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı. Pellete 190 μ l 1x bağlanma tamponu ve 10 μ l propidyum iyodür boyası eklenip vortekslendikten sonra akış sitometrisinde (Becton Dickinson, FACS Canto II) ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$:488/525 nm) analiz edildi.

Apoptotik protein ekspresyonlarının *western blot* ile ölçümü

Western blot tekniği, jel elektroforezi ile ayrılmış olan proteinleri bir nitroselüloz yada PVDF (Polivinilidin Florür) membrana aktarıp daha sonra aktarılan proteinleri birincil antikor (hedef proteine spesifik) ile inkübe edip, yıkandıktan sonra HRP (horse radish peroxydase) gibi enzim işaretli ikincil antikorla reaksiyona sokup kemilüminesans yada kromojenik yöntemle protein ekspresyonunu dansitometrik olarak inceleme

işlemdir. TQ, 5-FU ve kombine tedavinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler üstünde etkisini görmek için western blot yöntemiyle protein ekspresyonları incelendi. 6'lık *well*'lere ekilen hücreler 24 saat inkübasyonun ardından TQ, 5-FU ve kombine tedavinin IC₅₀ dozlarının altındaki dozlarla 24 saat inkübe edilip, 1xPBS ile yıkayıp tripsin-EDTA ile kaldırıldı. +4°C'de 500g'de 5 dakika santrifüj'den sonra süpernatant atıldı. Pelletlere, PMSF (fenilmetilsülfonil florür), ortovanadat ve proteaz inhibitör kokteyl içeren RIPA (Radioimmunoprecipitation) lizis tamponu eklendi ve +4°C'de 14.000 g'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım hücrenin proteinlerinin geçtiği kısımdır ve çalışma süpernatant üstünden devam etti. Her bir konsantrasyona ait süpernatantların protein miktarı Bradford yöntemiyle [231] ölçüldü. Proteinler jeldeki kuyulara yüklenmeden önce kuyu başına 20 µl'de 50 µg protein ve 4x Laemlli tamponu 1x olacak şekilde karıştırılıp, dH₂O ile seyreltilip ısıtma bloğunda 100°C'de 15 dakika ısıtıldı. Örnekler %12'lik ayırma (separating) jeli ve %8'lik yığıma (stacking) jeli olacak şekilde SDS-PAGE'e yüklendi ve 120 mA, 100 V'de 1,5 saat yürütüldü. Proteinlerin kontrolü için ponceau S boyası kullanıldı. Jellerdeki proteinleri PVDF membrana aktarmadan önce membran 30 saniye metanol, 3 dakika ddH₂O ve 5 dakika transfer tamponuyla aktive edildi. Sırasıyla transfer süngeri, membran, jel ve transfer süngeri konarak sandviç şeklinde transblot sistemine yerleştirildi. 10 dakika 85mV transfer işleminden sonra proteinlerin jelden membrana geçip geçmediğini kontrol etmek için jeller ddH₂O'da hazırlanan %0,1'lik coomasie brilliant blue g250 boyası ile muamele edildi. Jelde protein olmadığı saptanınca, işlemler membran üstünden devam etti. Membran TBST (*Tris-Buffered Saline-Tween*)'de hazırlanan %5'lik bloklama solüsyonu ile orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında 100 'de 1 saat muamele edildi.

Bloklanan membran TBST ile 3 kere yıkandıktan sonra %2,5'luk yağsız süt tozunda hazırlanan 1:1000'lik primer antikolar (Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-9, β-aktin) (Cell Signaling, ABD) orbital çalkalayıcıda +4°C'de 100 g'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası non-spesifik bağlanmaları ortadan kaldırmak için membran TBST ile 5 dakika boyunca 3 kere yıkandı. Membran yine %2,5'luk yağsız süt tozunda hazırlanan 1:5000'lik HRP (horse radish peroxidase) bağlı sekonder antikor (anti-mouse IgG ve anti-rabbit IgG, Cell Signaling, ABD) ile oda sıcaklığında 1 saat 100g'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında membran TBST ile 5 dakika boyunca 5 kez yıkandı.

Membrandaki proteinleri görüntümeden önce Luminol solüsyonu (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo, ABD) eklendi.

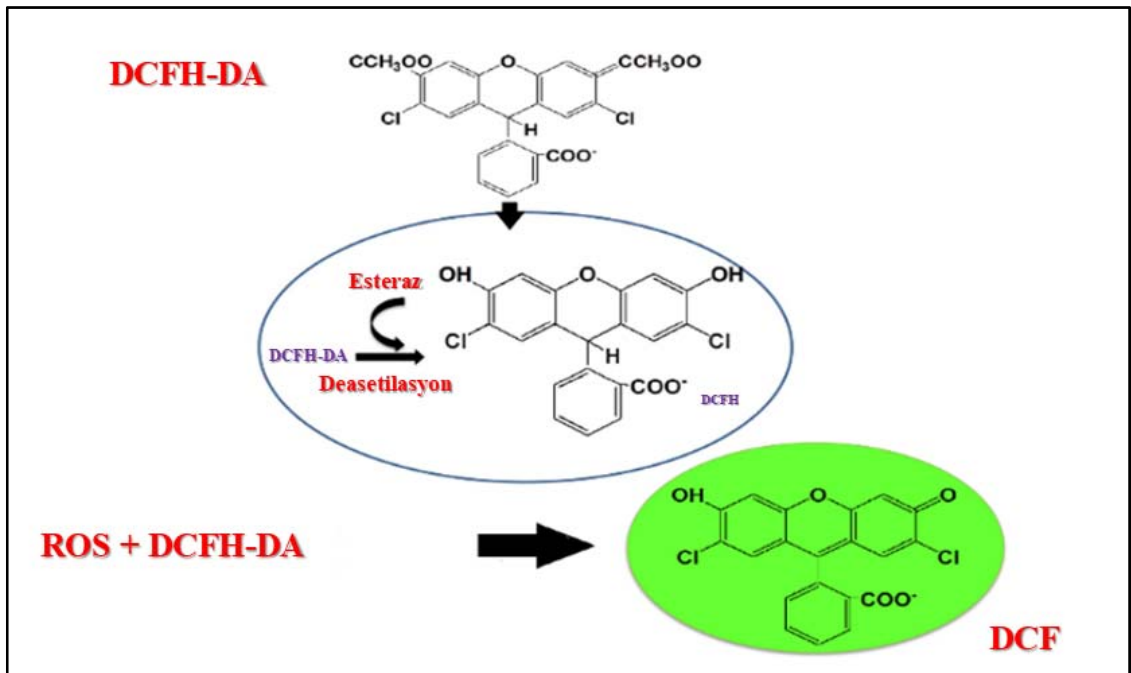
Görüntüler Vilbert Laumart Fusion Fx5 cihazında 1 saat içinde alındı. Bantların dansitesi cihazın programı ile hesaplandı [224].

3.2.1.7 Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) tayini

Hücre içi ROS üretimi, floresan sinyal göstergesi 2,7 diklorodihidrofloreseindiasetat (H₂DCF-DA) kullanılarak değerlendirildi. Renksiz olan H₂DCF-DA ortamdaki ROS ile oksitlenir ve yeşil floresans özellikteki diklorofloreseine (DCF) dönüşür (Şekil 3.8). Artan ROS miktarı ile yayılan floresans arasında floresans korelasyon vardır [232].

96'lık siyah opak plate'lere ekilen 10⁴ hücreye 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda hazırlanan TQ (2,5-100 µM), 5-FU (0,039-25 µM) ve kombine dozları eklendi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyerleri aspire 1xPBS ile 3 kere yıkandı. ddH₂O'da hazırlanan 100 µl 10 µM H₂DCF-DA eklenip 37°C'de inkübatörde inkübe edildi.

İnkübasyon sonra oluşan DCF'nin floresans yoğunluğu Ex:488nm/Em:525nm floresans plate okuyucusu (Varioskan Flash Çok Modlu Okuyucu, Thermo, Waltham, ABD) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar %0,1 DMSO eklenen kontrol grubuna göre relatif olarak ATP ile kıyaslanarak (ROS/ATP) hesaplandı [224].

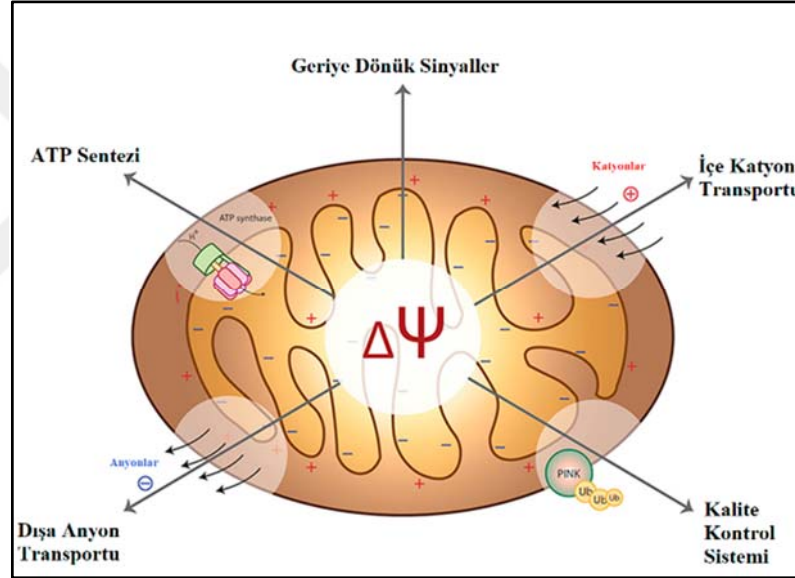


Şekil 3.8 : Hücre içi ROS ölçüm prensibi.

3.2.1.8 Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) tayini

Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP- $\Delta\psi_m$), mitokondriyal fonksiyonun önemli bir parametresi ve hücre sağlığının bir göstergesidir. MMP'nin düşmesi proapoptotik sinyalin başlatılmasını yansıtan mitokondriyal zar bütünlüğünün kaybına işaret eder (Şekil 3.9). Son zamanlarda, lipofilik katyonların Nernst dengesi dağılımına ulaşıncaya kadar mitokondriyal matriks içinde birikerek potansiyeli saptamak için lipofilik katyonik floresan boyalar geliştirilmiştir.

Bu protokolda, mitokondride biriken bir hücre geçirgen, yeşil floresans, lipofilik boya 3,3'-diheksiloksikarbosiyanin iyodür (DiOC6(3)) kullandık.



Şekil 3.9 : Mitokondriyal membran potansiyeli.

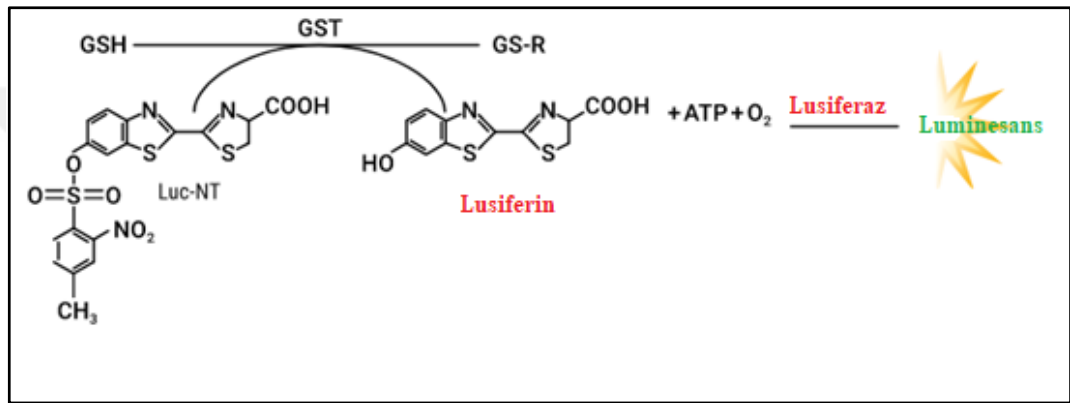
TQ, 5-FU ve kombinasyon grubunun 24 saatlik inkübasyonu sonrası kaldırılıp yıkandıktan sonra 40 nM DiOC6(3) ile 37°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra 1xPBS ile yıkandı. Yıkama işlemi 2 kere daha tekrarlandıktan sonra hücreler akış sitometrisinde (Becton Dickinson, FACS Canto II) ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}:484/501$ nm) analiz edildi [224, 233].

3.2.1.9 Hücre içi glutatyon düzeylerinin ölçümü

Çalışmada hücre içi glutatyon düzeylerini ölçmek için luminometrik glutatyon kiti kullanıldı. Ticari olarak satın alınan GSH-Glo™ Glutathione Assay luminesans

glutasyon kiti glutasyonu glutasyon s transferaz enzimiyle indirgerken kitte bulunan luciferin-NT substratını lusiferine dönüştürür (Şekil 3.10).

Bu dönüşüm sırasında ortamda ATP çıkar. Ortamda meydana gelen lusiferin rekombinant lusiferaz enzimi ile oksilusiferine dönüşerek luminesans yayar [234]. Opak beyaz 96'lık plate'lere ekilen 10^4 hücreye 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda hazırlanan TQ (2,5-100 μ M), 5-FU (0,039-25 μ M) ve kombine dozları eklendi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından glutasyon solüsyonu eklenip 5 dakika içinde Thermo Varioskan multiplate okuyucuda luminesans ölçüm alındı.



Şekil 3.10 : Hücre içi glutasyon ölçüm prensibi.

3.2.2 *In vivo* deneyler

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Hayvan Etik Kurulu'ndan 2017-13 no'lu etik kurul kararı alındı.

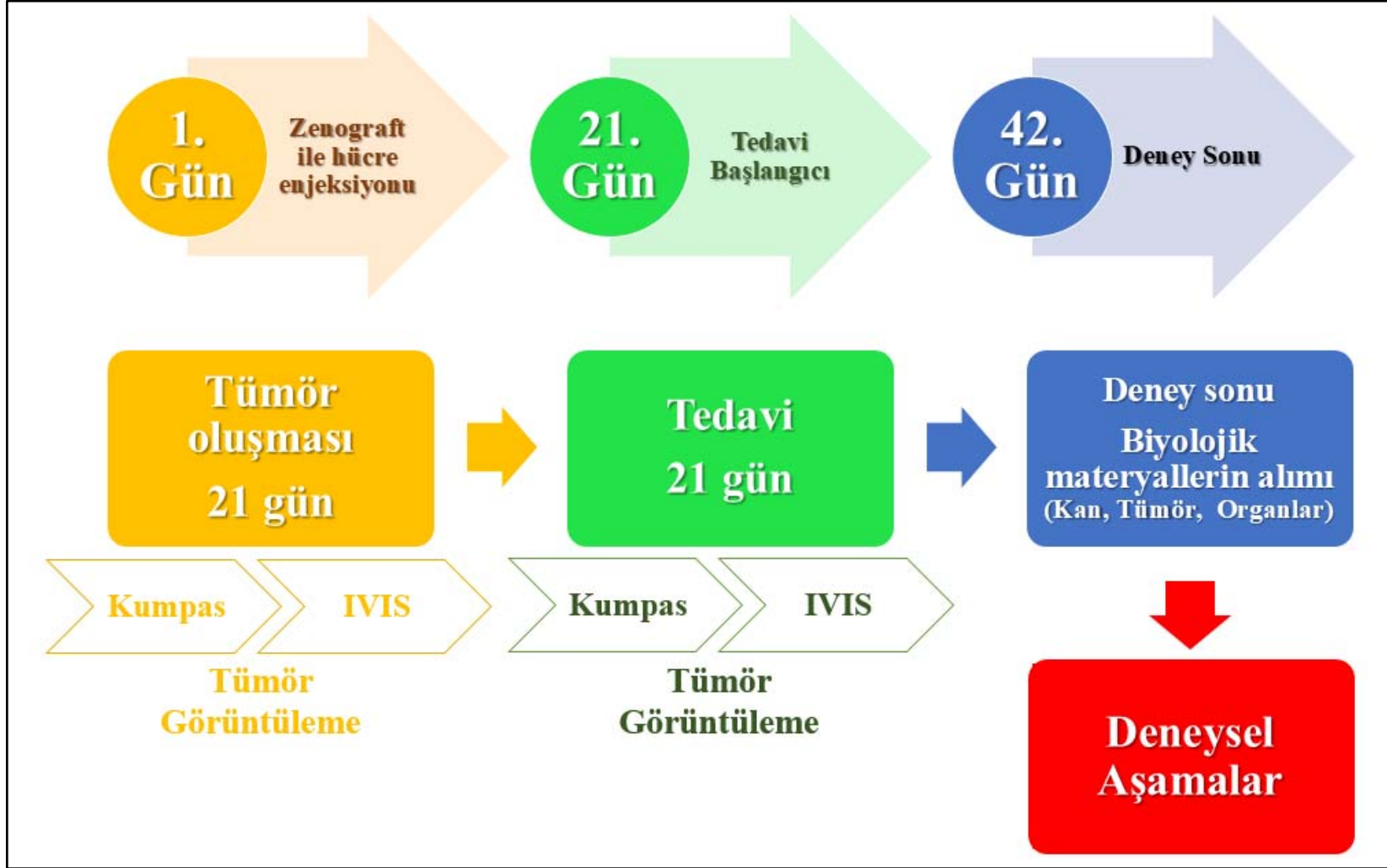
3.2.2.1 Zenograft kolon kanseri modeli

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Transgenik Laboratuvarı'ndan temin edilen 20-25 gram 8-10 haftalık BALB/c atimik erkek *nude* fareler temin edildi. Güç analizi ile $\alpha=0,05$ anlamlılık düzeyinde %80 güç elde edecek şekilde 5 grup ve her bir grup için en az 6 hayvan kullanılması hesaplandı. Toplamda çalışmada kullanılacak hayvan sayısı 30 adet olarak belirlendi. Tüm prosedürler Bezmialem Vakıf Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bakım ve Kullanım Kılavuzuna uygun olarak yapıldı. Fareler ısı ve sıcaklık kontrolü olan standart pleksiglas kafeslerde, kafes başına 6 fare olacak şekilde rastgele ayrıldı. Su ve yemler standart transgenik farelere uygun olarak verildi (Tablo 3.5).

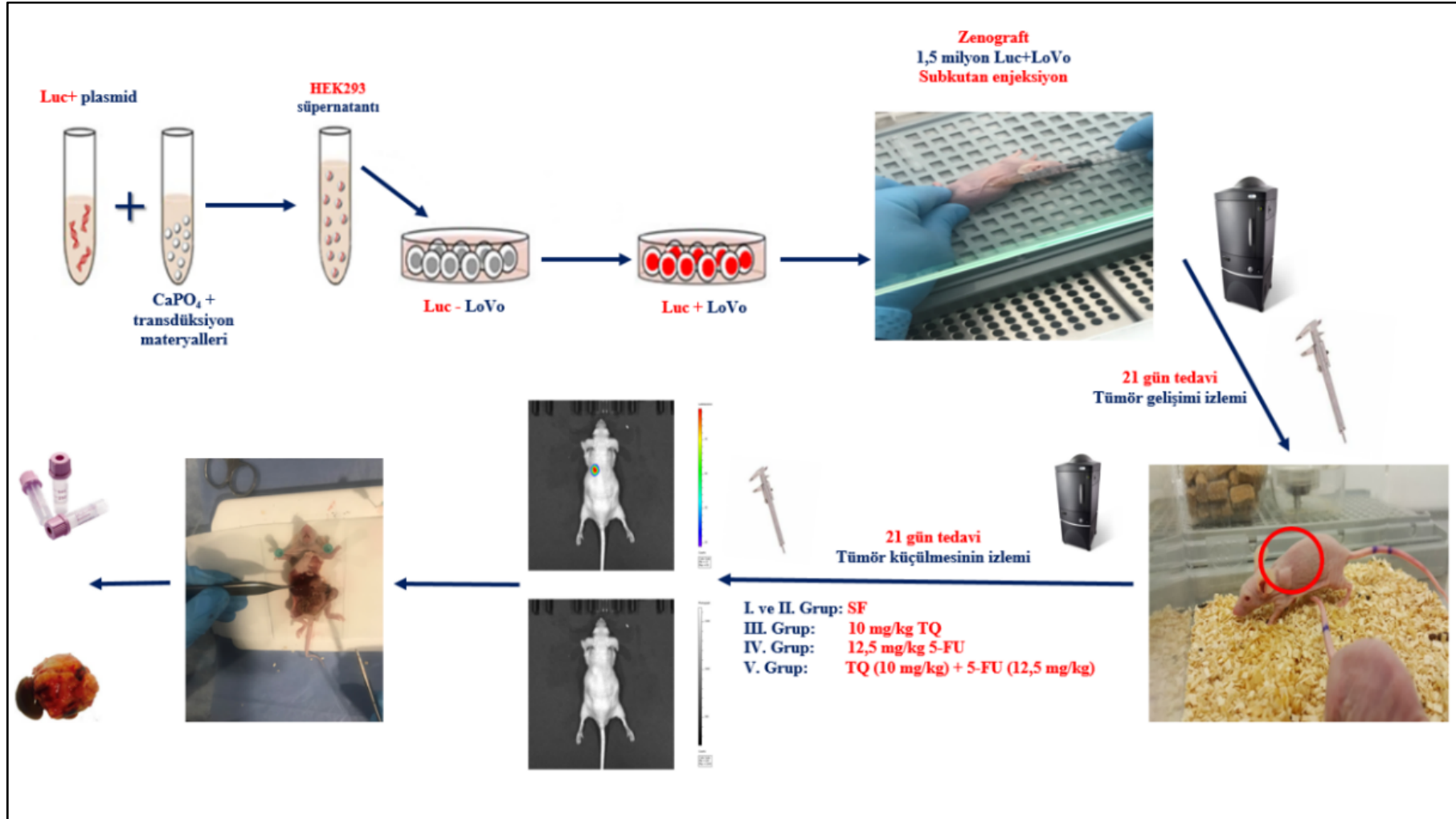
Tablo 3.5 : Deney grupları.

Gruplar		Detay
Grup I	Negatif Kontrol (n=6)	Zenograft ile kanser hücresi ekimi yapılmayan sağlıklı hayvanlara, gruplara ayrıldıktan 22. gün itibariyle gün aşırı intraperitoneal SF verildi. Sağlıklı grup
Grup II	Pozitif Kontrol (n=6)	Zenograft ile kanser hücresi enjekte edildikten 22. gün itibariyle gün aşırı intraperitoneal SF verildi. Kanser grubu
Grup III	TQ (n=6)	Zenograft ile kanser hücresi enjekte edildikten 22. gün itibariyle gün aşırı intraperitoneal 10mg/kg TQ verildi. TQ grubu
Grup IV	5-FU (n=6)	Zenograft ile kanser hücresi enjekte edildikten 22. gün itibariyle gün aşırı intraperitoneal 12,5mg/kg 5-FU verildi. 5-FU grubu
Grup V	TQ+5-FU (n=6)	Zenograft ile kanser hücresi enjekte edildikten 22. gün itibariyle gün aşırı intraperitoneal 10mg/kg TQ ve 12,5mg/kg 5-FU verildi. Kombine grubu

Gruplara rastgele seçilerek alınan farelerden 2 gün sonra heparinli tüpe kan alınarak plazmalarına ayrıldı. Kanser hücresi enjeksiyonundan önce ve deney bitiminde hayvanların ağırlıkları not edildi. Negatif kontrol grubu hariç tüm gruplara 1 hafta arayla transfekte LoVo hücreleri 1x dPBS içinde $1,5 \times 10^6$ subkutan olarak verildi. Tümörler yaklaşık 21 gün sonra kumpasla ölçülüp ortalama 0,9-1,5 cm boyutuna ulaştı. Belirli gün aralıklarla tümör gelişimleri hayvanlara anestezi altındayken hem kumpas ile hem de 10 µM D-Lusiferin intraperitoneal olarak enjekte edilip, 15 dakika içinde IVIS cihazında görüntülendi. 22. gün tedavi protokolü başlandı ve gruplara gün aşırı 3 hafta boyunca intraperitoneal olarak TQ (10mg/kg), 5-FU (12,5mg/kg) ve aynı dozları kombine şekli enjeksiyonlarla verildi. Görüntüleme işlemleri yine belirli gün aralıklarla hayvanlar anestezi altındayken hem kumpasla hemde IVIS ile ölçüldü (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12).

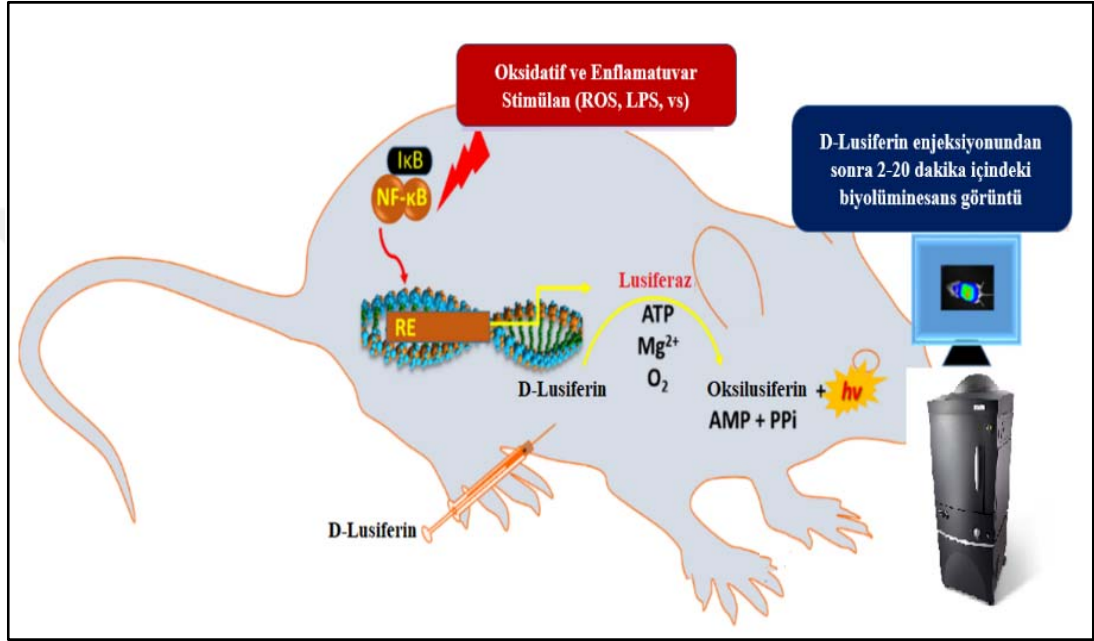


Şekil 3.1 : Deneyin *in vivo* aşamaları.

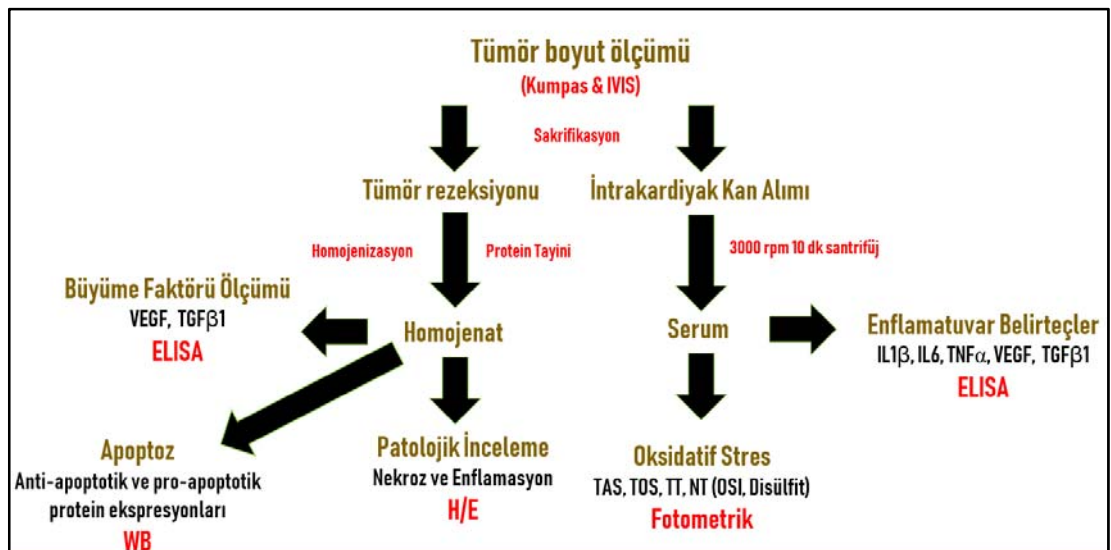


Şekil 3.2 : Deneysel tüm aşamalar özet.

Tedavi süreci bitiminde (deneyin 42. günü) tekrar hayvanlar anestezi altındayken 10 μM D-Lusiferin intraperitoneal olarak enjekte edildi. Hayvanlar uyutulup IVIS'te görüntü alındıktan sonra kumpasla tümör boyutu ölçüldü [235] ve intrakardiyak olarak kanları heparinli tüpe alınıp, plazmaları ayrıldı. Tümör dokusu hayvanlardan çıkartılarak tartıldı ve biyokimyasal analizler için boş kuru endorf ve immünohistokimyasal analizler için %10 tamponlanmış formaline kaldırıldı (Şekil 3.13, 3.14).



Şekil 3.3 : IVIS luminometrik hayvan görüntüleme prensibi.



Şekil 3.4 : Tümör ve serum ile yapılan deneysel aşamalar.

3.2.2.2 Biyokimyasal analizler

Hayvanlardan zenograft işlemi yapılmadan önce ve deney sonlandırılmasıyla lityum heparinli tüpe alınan kan örnekleri 3000 g'de 10 dakika santrifüjden sonra plazmalarına ayrıldı. Plazma örneklerinden karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri, total anti-oksidan kapasite, total oksidan kapasite, total ile natif tiyol homeostazı ve enflamasyon belirteçleri ile büyüme faktörleri ölçüldü.

Oksidatif stres belirteçleri

Total anti-oksidan kapasite ölçümü Erel ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle yapıldı [236]. Yöntemin prensibi, örnekteki anti-oksidanların koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini, renksiz ABTS formuna indirgenmesine dayanır. Standart olarak mM troloks kullanılıp serum/plazma için sonuçlar mM troloks ekivalent, doku içinse mM troloks ekivalent/mg protein olarak verildi.

Total oksidan kapasite ölçümünde Erel ve arkadaşlarının geliştirdiği bir başka yöntemle yapıldı [237]. Yöntemin prensibinde örnekteki oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside edip bu ferrik iyonların asidik ortamda kromojen madde ile renk oluşturma esasına dayanır. Standart olarak mM H₂O₂ kullanılıp serum/plazma için sonuçlar mM H₂O₂ ekivalent, doku için mM H₂O₂ ekivalent / mg protein olarak verildi.

Tiyol disülfid homeostazı ölçümünde Erel ve arkadaşlarının geliştirdiği otomatize yöntem kullanıldı [238]. Numunelerdeki toplam tiyol (-SH + -S - S-) ve natif tiyol (-SH) konsantrasyonları Ellmann ve modifiye Ellmann reaktifi kullanılarak ölçüldü. -SH içeriği -SH + -S - S- içeriğinden çıkarılıp bu farkın yarısı hesaplanarak dinamik disülfid bağlarının miktarı (-S-S-) belirlendi.

Karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri

Alınan serum örnekleri biyokimya otoanalizörlerinde çalışıldı. Karaciğer fonksiyon testlerinden alanin aminotransferaz (ALT), aspartataminotransferaz (AST), alkalin fosfataz (ALP), gama glutamil transpeptidaz (GGT), laktat dehidrogenaz (LDH), albümin (ALB), total bilirubin (TB) ve total protein (TP); böbrek fonksiyon testlerinde ise sodyum, potasyum, klor, üre, kreatinin ve kan üre azotu (BUN) değerleri ölçüldü [239].

3.2.2.3 Doku analizleri

Tümör dokuları biyokimyasal analiz için seramik bilyeler ile homojenize edilip 1 dakika 1xPBS tamponu için hemojenize edildikten sonra 30 dakika +4°C'de 12.000 g'de santrifüj edildi [190]. Süpernatant kısmı alınıp diğer işlemlere devam edildi.

Doku protein ekspresyon analizleri

Süpernatant kısmı aspire edilerek bradford yöntemiyle protein tayini yapıldı [231]. Hücreler için bakılan pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonları yukarıda detaylıca anlatılan western blot ile analiz edildi [219]. İmmünohistokimyasal analiz için ayrılan dokular ise ileriki çalışmalar için saklandı.

Doku ELISA testleri

Doku homojenatlarında protein tayini yapıldıktan sonra TGFβ1 ve VEGFA ticari olarak satın alınan fare ELISA kitleriyle fotometrik olarak ölçülerek hesaplandı [240].

Patolojik değerlendirme

Hayvanlardan rezeke olan tümör dokuları patolojik incelemeler için 2 gün boyunca %10'luk tamponlanmış formalin çözeltisinde sabitlendikten sonra SF ile yıkanıp, kademili olarak 30'ar dakika %50, %70 ve %95 etanol ile dehidrate edildi. Daha sonra parafin içine gömülmüş 5 mikronluk kesitler halinde hematoksilin eozin ile boyanıp, kör histolojik değerlendirmeye tabi tutuldu [241]. Işık mikroskopuyla yapılan histopatolojik değerlendirmede dokudaki enflamasyon ve nekrotik alanlar semi kantitatif olarak 0-4 arasında değerler vererek kaydedildi. Ayrıca hayvanlardan çıkarılan tümörün boyutu ve dereceside sayısal verilerle değerlendirildi [242].

3.3 İstatistiksel Analiz

In vivo ve *in vitro* tüm veriler üç tekrarın ortalama \pm standart sapması (Ortalama \pm SS) olarak sunulmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığını belirlemek için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) kullanılmıştır. Değişkenler arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Pearson korelasyon analizi kullanıldı. Farklı grupların parametrelerini karşılaştırmak için post hoc analizleri yapıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

TQ, 5-FU ve kombinasyonun hücre hatları üzerindeki IC₅₀ değerleri, doğrusal olmayan regresyon analizi ile hesaplandı. *p* değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. SPSS for Windows paket programı (Sürüm 22, Chicago, IL) kullanıldı.

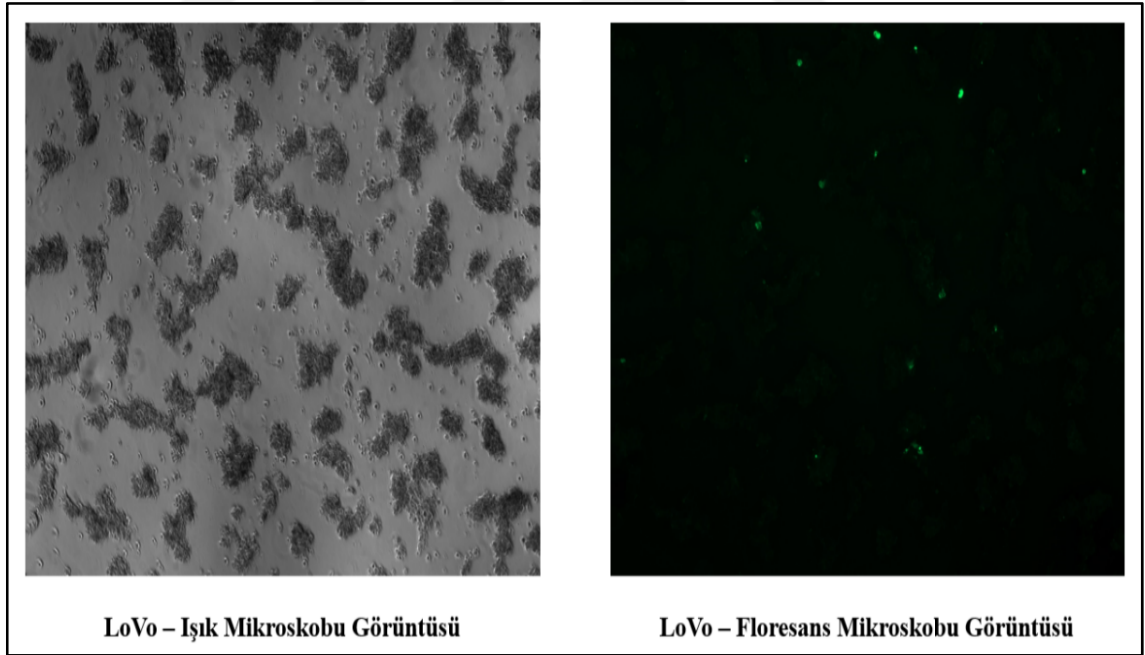


4. BULGULAR

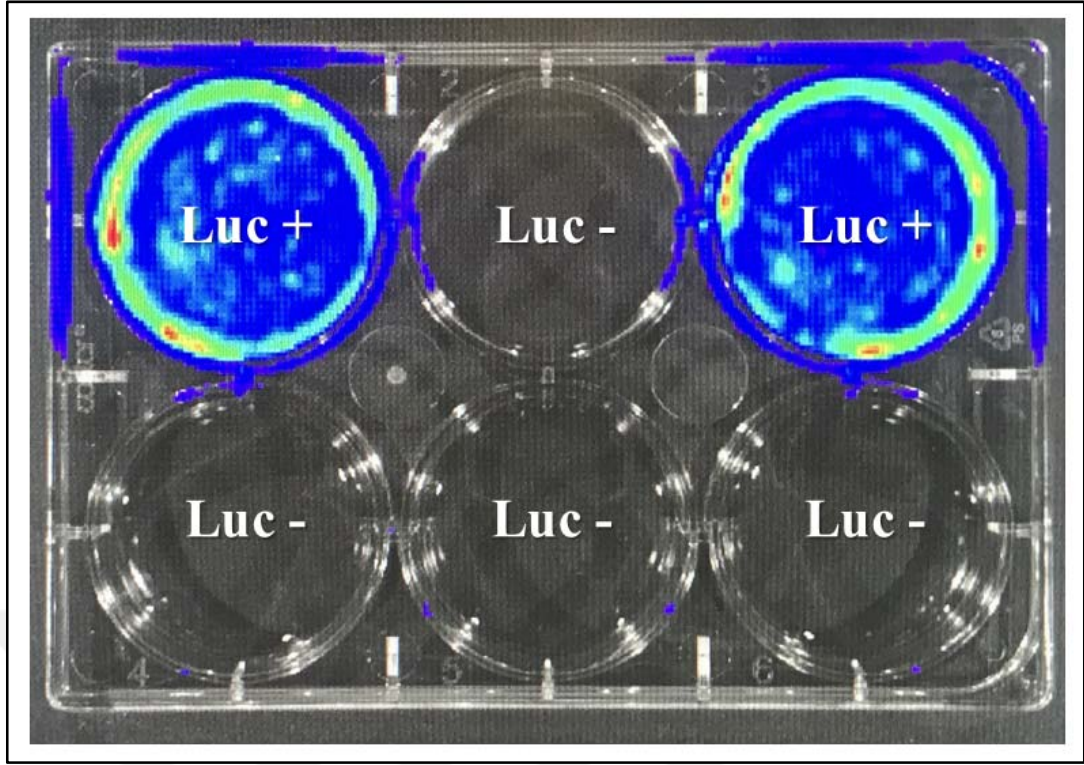
4.1 Transfeksiyon Kontrol

LoVo hücrelerine lusiferaz (LUC) ve yeşil floresans protein (GFP) transfeksiyonu yapıldıktan 2 pasaj sonra transfeksiyonunun tutup tutmadığı kontrol edildi. İlk olarak ters floresans mikroskopunda hücreler normal ışık kontrol edildikten sonra floresans mikroskobu ile ışık mikroskopunda bakılan aynı alana incelendi. Yeşil renkte hücrelerin görülmesiyle GFP transfeksiyonunun başarılı olduğu gösterildi (Şekil 4.1).

Lusiferaz transfeksiyonunun kontrolü içinde transfeksiyon işlemi ardından 2 pasaj sonra hücreler 6'lık *well*'lere ekildi. 24 saat yapışma inkübasyonundan sonra hücreler IVIS cihazında görüntülendi. 1. ve 3. kuyular Luc +, diğer kuyular ise Luc-ti (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 : Transfeksiyon kontrol (Floresans mikroskop); sol taraftaki görüntü ışık mikroskobuna ait görüntü, sağ taraftaki görüntü ise aynı alana ait floresans mikroskop görüntüsü.

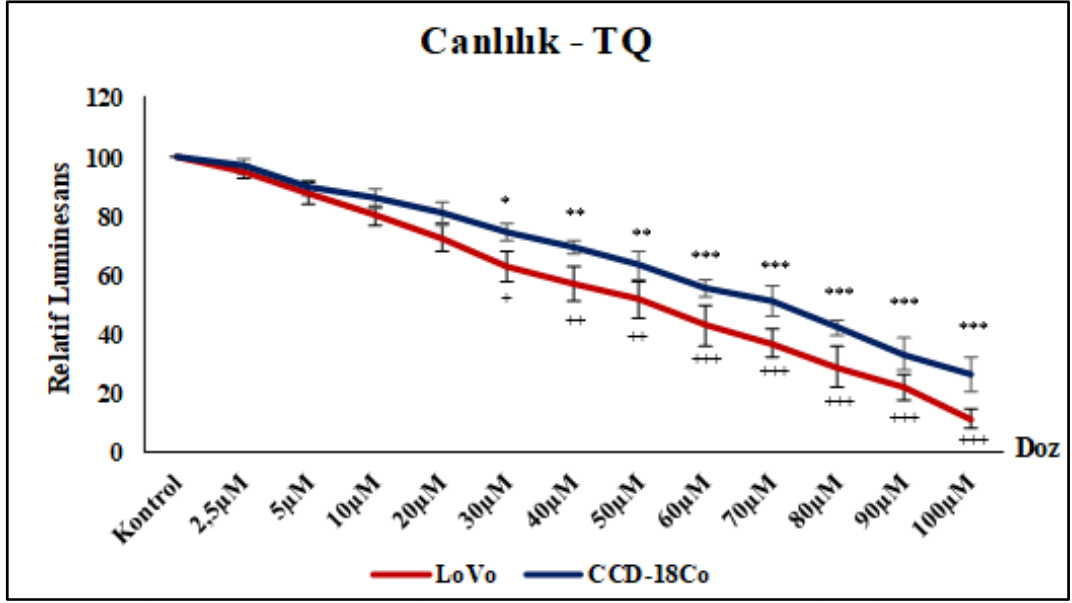


Şekil 4.2 : Hücre transfeksiyon kontrol (IVIS); transfekte olan hücreleri kontrol etmek için $1\mu\text{M}$ D-lusiferini dPBS'te hazırlayıp hücrelerin üstüne eklendi. 1. ve 3. kuyulardaki luminesans 5 dk içinde IVIS cihazında görüntülendi. Diğer kuyularda ışımaya olmadığından dolayı Luc – yani transfeksiyon gerçekleşmemiştir.

4.2 ATP Canlılık Testleri Sonuçları

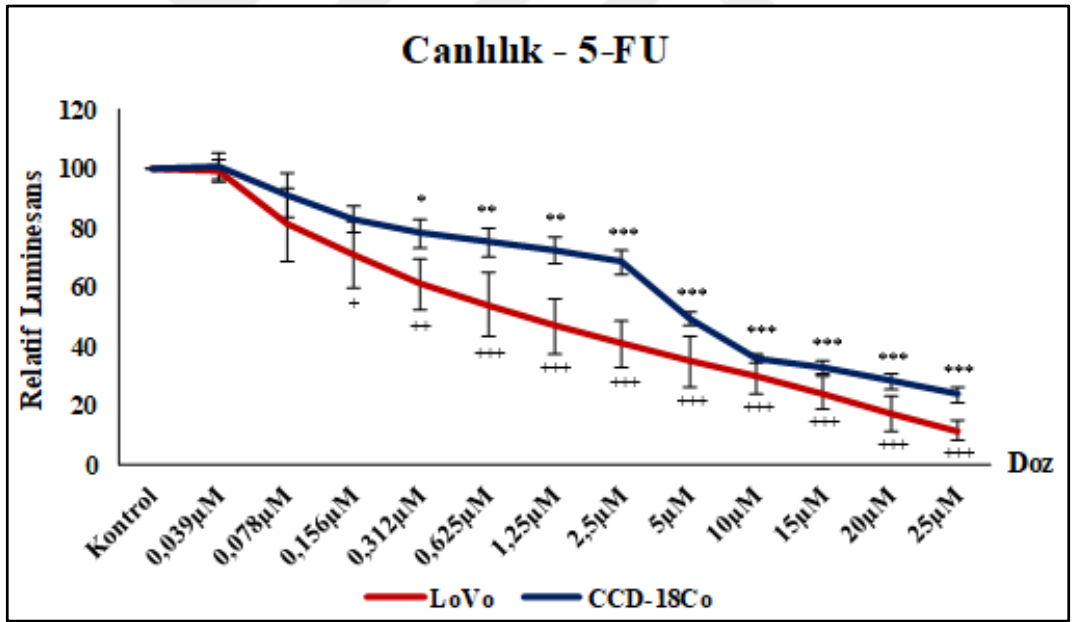
TQ ($2,5\ \mu\text{M} - 100\ \mu\text{M}$), 5-FU ($0,039\ \mu\text{M} - 25\ \mu\text{M}$) ve kombinasyon grubunun (TQ+5-FU) ($2,5\ \mu\text{M} + 0,0039\ \mu\text{M} - 100\ \mu\text{M} + 25\ \mu\text{M}$) farklı konsantrasyonları 24 saat inkübasyonun ardından CCD18Co ve LoVo hücre hatlarındaki sitotoksik etkisini inceleyebilmek için hücre içi ATP seviyesini ölçen luminometrik yöntemle analiz yapıldı. Hücre hatları maddelerle 24 saat inkübasyon edildikten sonra sonuçlar kontrol grubuna % relatif luminesans olarak şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'de gösterilip, maddelerin IC_{50} dozları tablo 4.1'de verildi. Sonuç olarak tüm maddelerin artan dozlarıyla sitotoksitenin arttığı, canlılığın azaldığı gözlemlendi. Ayrıca tekli terapi ve kombine terapi de sağlıklı CCD18Co hücre hattı ile LoVo hücre hattında arasında fark TQ'da %9,99, 5-FU'da %13,31 ve kombine terapide %14,88 olarak bulunmuştur.

TQ ve 5-FU'nun sinerjik etkisi hücrelere karşı gösterdiği aynı sitotoksik değer göz önüne alındığında her birinin tek tek uygulanmasına göre TQ: CCD18Co'da %49,05, LoVo'da %70,51; 5-FU: CCD18Co'da %68,12, LoVo'da %69,84 oranında dozu düşürmüştür.



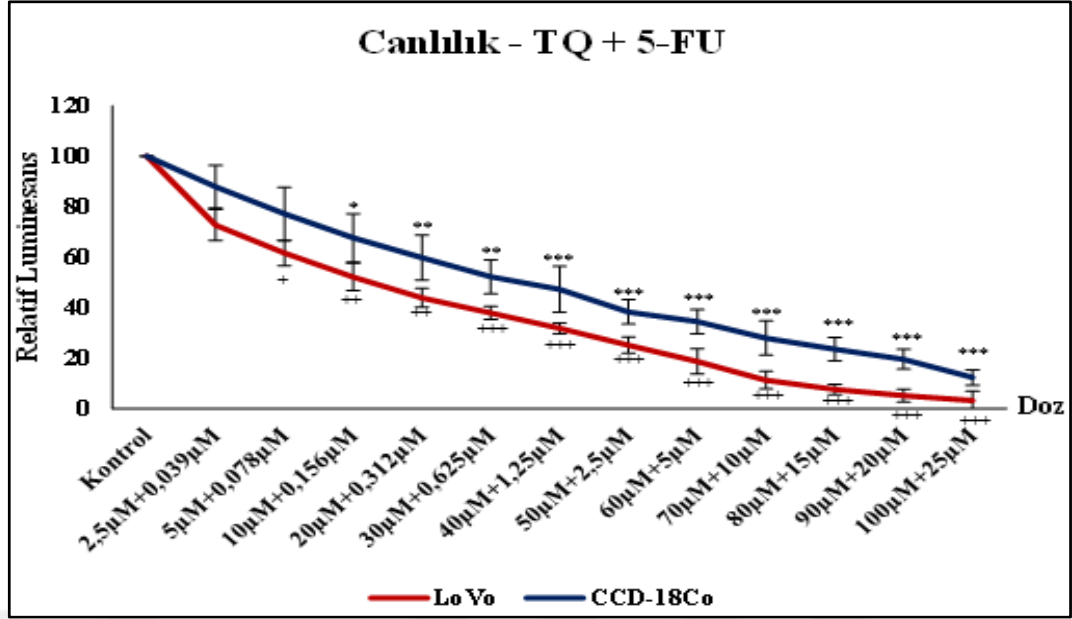
Şekil 4.3 : Timokinon'un ATP canlılık grafiği: artan dozlarda canlılık düşmektedir. Kontrol grubuna göre hem sağlıklı hücrede hem de kanser hücresinde istatistiksel olarak anlamlı düşmüştür.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$



Şekil 4.4 : 5-Fluorourasil'in ATP canlılık grafiği: artan dozlarda canlılık düşmektedir. Kontrol grubuna göre hem sağlıklı hücrede hem de kanser hücresinde istatistiksel olarak anlamlı düşmüştür.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$



Şekil 4.5 : Kombine tedavinin canlılık grafiği: artan dozlarda kombine tedavideki sitotoksosite tekli tedavilere göre daha etkilidir. Kontrol grubuna göre hem sağlıklı hücrede hem de kanser hücresinde istatistiksel olarak anlamlı düşmüştür.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001

Tablo 4.1 : IC₅₀ değerleri.

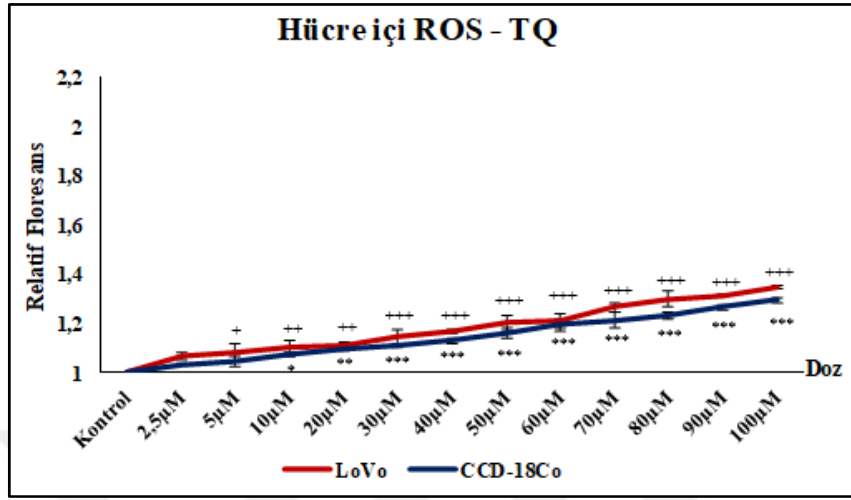
Verilen Maddeler	IC ₅₀ (µM)	
	CCD18Co	LoVo
TQ	67,86	51,75
5-FU	3,80	0,63
TQ + 5-FU	34,57+1,20	15,26+0,19

4.3 Hücre içi ROS düzeyleri

TQ (2,5 µM – 100 µM), 5-FU (0,039 µM – 25 µM) ve kombinasyon grubunun (TQ+5-FU) (2,5 µM + 0,0039 µM – 100 µM +25 µM) farklı konsantrasyonları 24 saat inkübasyonun ardından CCD18Co ve LoVo hücre hatlarındaki hücre içi reaktif oksijen türlerinin düzeylerini inceleyebilmek için indirgenmiş floresans özellik gösteren H₂DCFH-DA (dikloro fluoreskein diasetat) kimyasalı kullanıldı. Çıkan sonuçlar ATP sonuçlarıyla oranlanıp relatif floresans olacak şekilde verildi (Şekil 4.6 – 4.8).

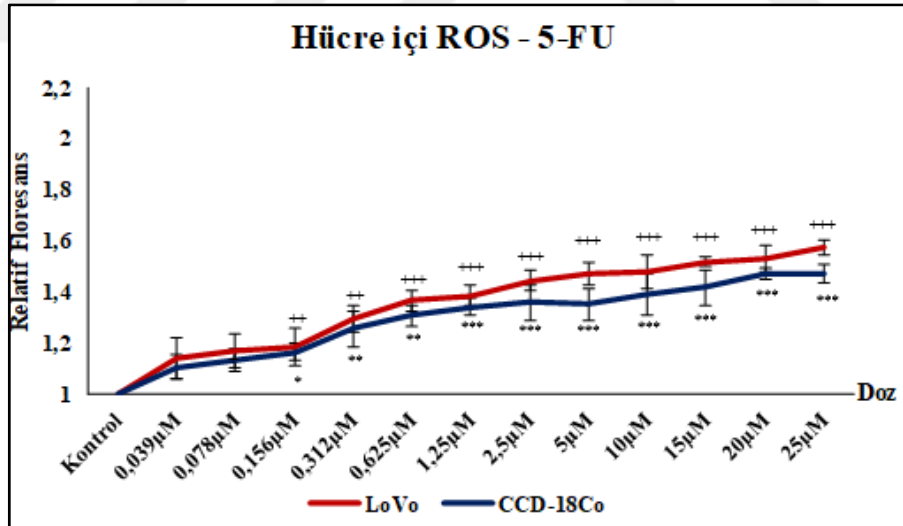
Hücrelere TQ verildiğinde kontrol gruplarına göre ROS düzeyini CCD18Co’da 1,29 kat, LoVo’da 1,33 kat; 5-FU verildiğinde CCD18Co’da 1,44 kat, LoVo’da 1,57 kat arttırırken kombine tedavide CCD18Co’da 1,63 kat, LoVo’da da 1,94 kat arttırmıştır.

Kanser hücrelerinde sağlıklı hücreye göre yüksek metabolik aktivite ve beklenen yüksek ROS miktarı olmasına rağmen TQ, 5-FU ve kombine tedavi ROS seviyelerinin artışıını indüklemiştir.



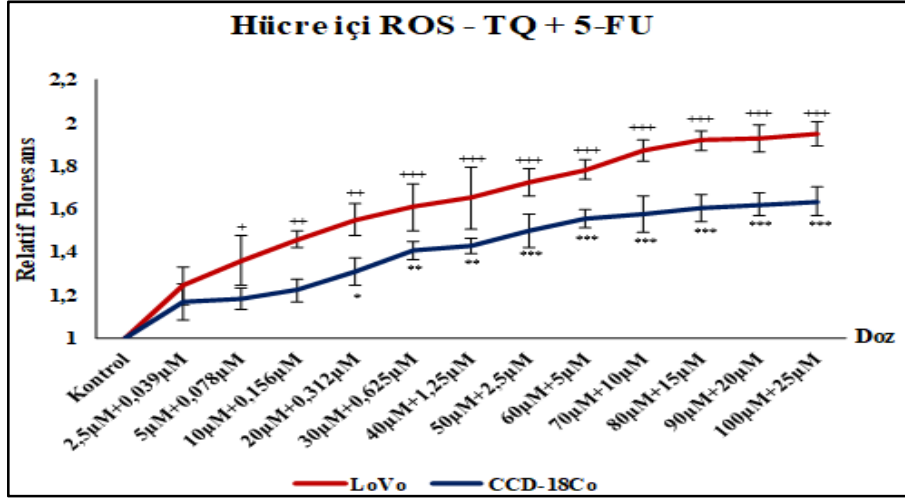
Şekil 4.6 : Timokinon'un sağlıklı ve kanser hücreleri üstünde ROS'a etkisi: artan 5-FU konsantrasyonu hücre içi ROS düzeylerinin arttırmıştır. ROS düzeyi kontrol grubuna göre hem sağlıklı hücrede hem de kanser hücresindeki istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$



Şekil 4.7 : 5-Fluorourasil'in sağlıklı ve kanser hücreleri üstünde ROS'a etkisi: artan 5-FU konsantrasyonu hücre içi ROS düzeylerinin arttırmıştır. ROS düzeyi kontrol grubuna göre hem sağlıklı hücrede hem de kanser hücresindeki istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$



Şekil 4.8 : Kombine tedavinin sağlıklı ve kanser hücreleri üstünde ROS'a etkisi: artan 5-FU konsantrasyonu hücre içi ROS düzeylerinin arttırmıştır. ROS düzeyi kontrol grubuna göre hem sağlıklı hücrede hem de kanser hücresindeki istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$

Tablo 4.2’de gösterildiği üzere TQ, 5-FU ve kombine grubunu en yüksek dozlarının kontrole göre hücre içi ROS’u kaç kat arttırdığı verilmiştir.

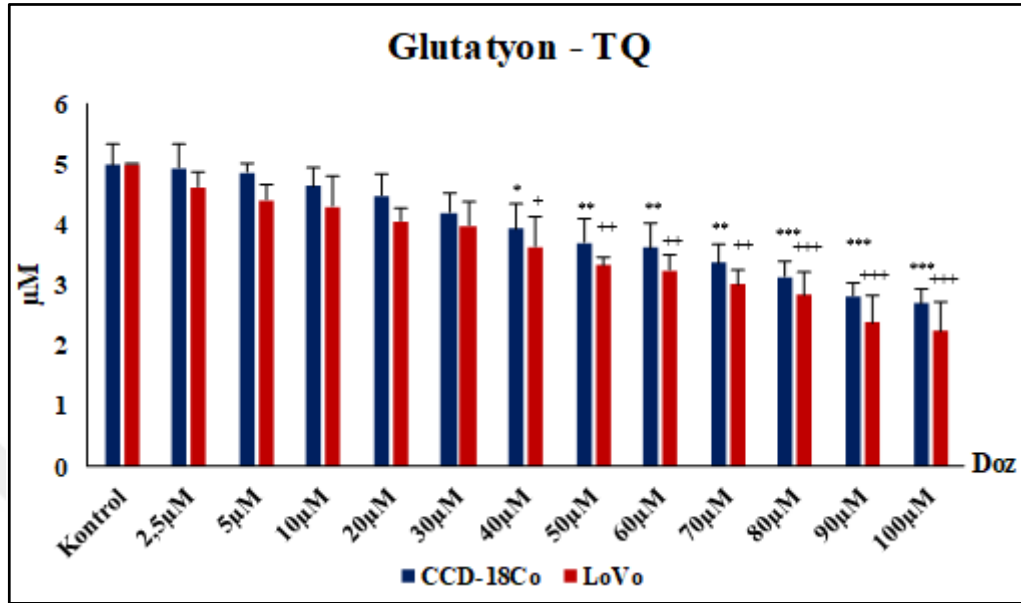
Tablo 4.2 : Hücre içi maksimum ROS düzeyi.

Verilen Maddeler	Max. ROS	
	CCD18Co	LoVo
TQ	1,29	1,34
5-FU	1,47	1,57
TQ + 5-FU	1,63	1,94

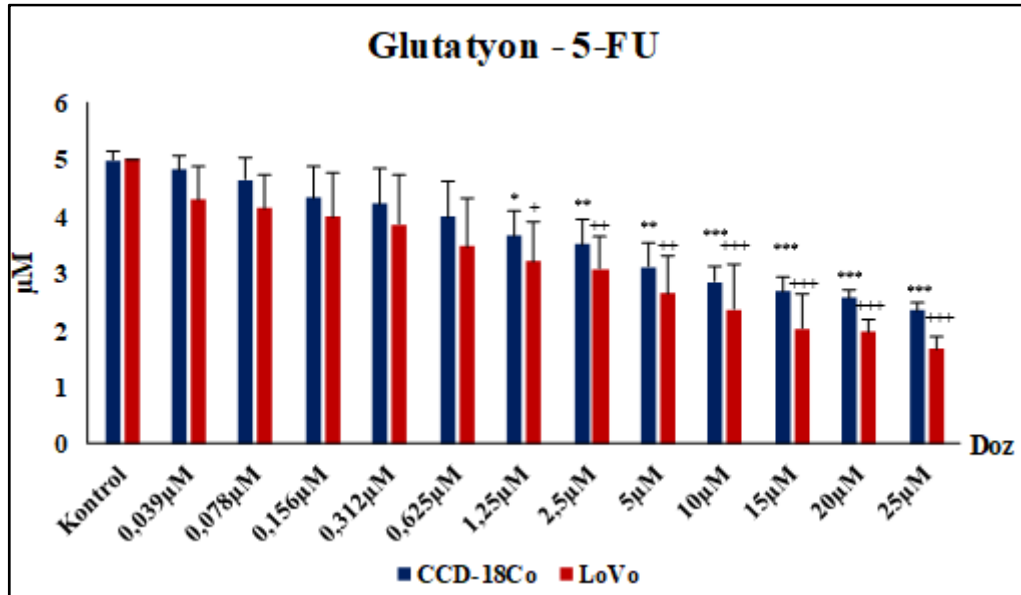
4.4 Hücre içi glutatyon seviyesi

CCD18Co ve LoVo hücre hatlarındaki TQ (2,5 μM – 100 μM), 5-FU (0,039 μM – 25 μM) ve kombinasyon grubunun (TQ+5-FU) (2,5 μM + 0,0039 μM – 100 μM + 25 μM) farklı konsantrasyonları 24 saat inkübasyonun ardından hücre içi glutatyon düzeyleri luminometrik olarak ölçüldü (Şekil 4.9 – 4.11). TQ inkübasyonu en yüksek dozda kontrol grubuna göre CCD18Co’da %45; LoVo’da %53; 5-FU inkübasyonu en yüksek dozda kontrol grubuna göre CCD18Co’da %52; LoVo’da %66, kombine tedavide ise en yüksek dozda kontrol grubuna göre CCD18Co’da %55; LoVo’da %74 oranında hücre içi glutatyon düzeyini düşürdü.

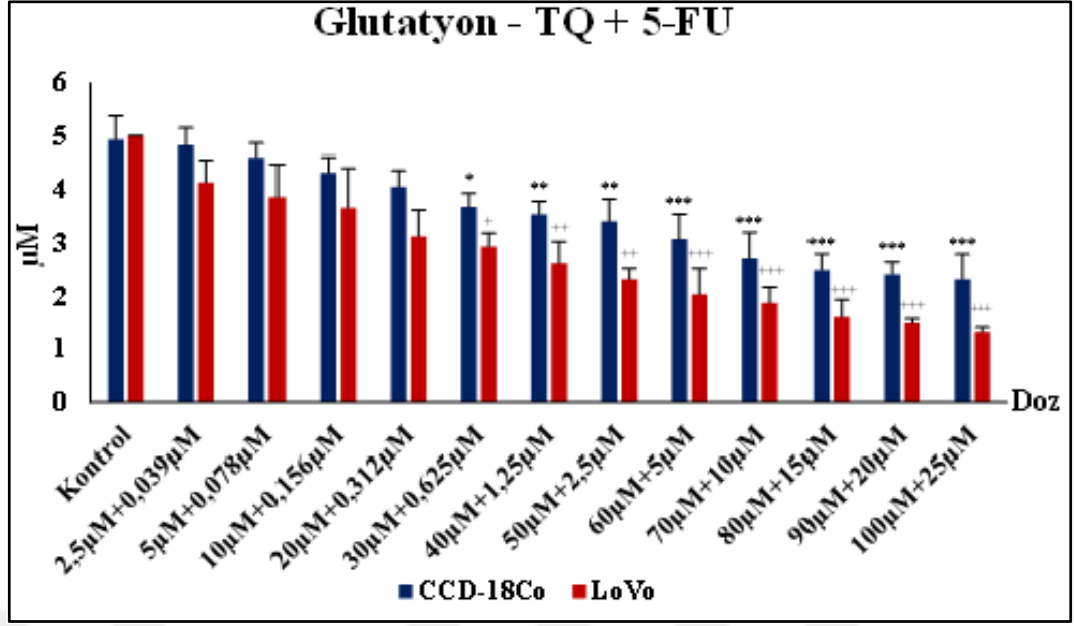
GSH düzeyi düştükçe serbest radikallere karşı hücrel savunmadaki zafiyetin ortaya çıkması hücre içi ROS'un yükselmesiyle sitotoksisiteye, genotoksisiteye ve apoptoza neden olmaktadır.



Şekil 4.9 : Timokinon'un hücre içi glutasyon düzeylerine etkisi: artan TQ konsantrasyonu hücre içi GSH düzeylerini düşürmüştür. GSH düzeyi kontrol grubuna göre hem sağlıklı hücrede hem de kanser hücreindeki istatistiksel olarak anlamlı düşmüştür.
* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$



Şekil 4.10 : 5-Fluorourasil'in hücre içi glutasyon düzeylerine etkisi: artan 5-FU konsantrasyonu hücre içi GSH düzeylerini düşürmüştür. GSH düzeyi kontrol grubuna göre hem sağlıklı hücrede hem de kanser hücreindeki istatistiksel olarak anlamlı düşmüştür.
* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$

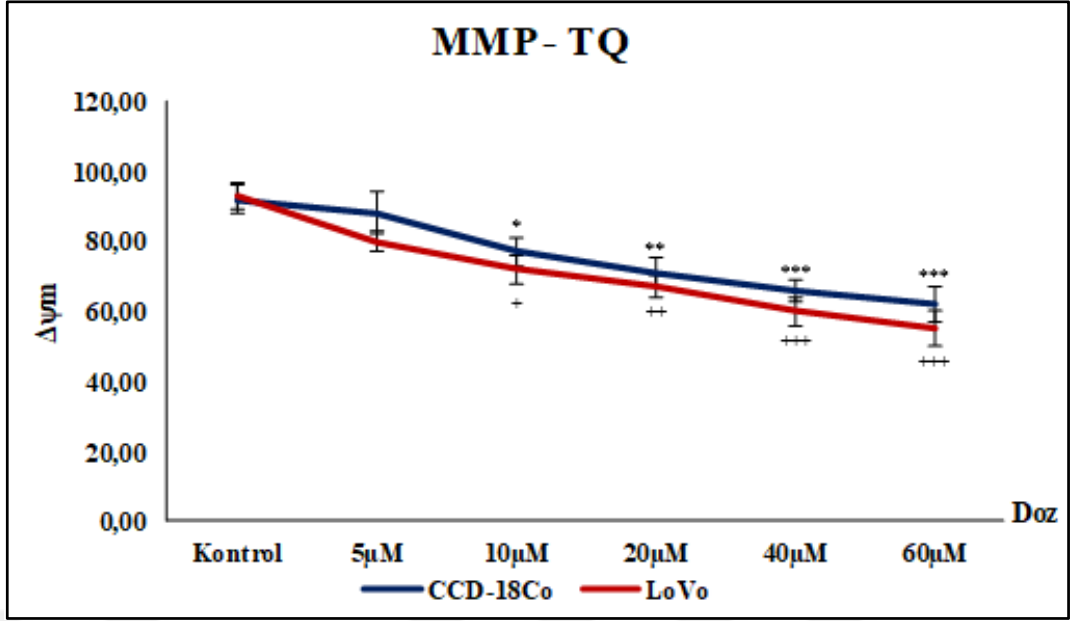


Şekil 4.11 : Kombine tedavinin hücre içi glutasyon düzeylerine etkisi: artan kombine tedavi konsantrasyonu hücre içi GSH düzeylerini düşürmüştür. GSH düzeyi kontrol grubuna göre hem sağlıklı hücrede hem de kanser hücreesindeki istatistiksel olarak anlamlı düşmüştür.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$

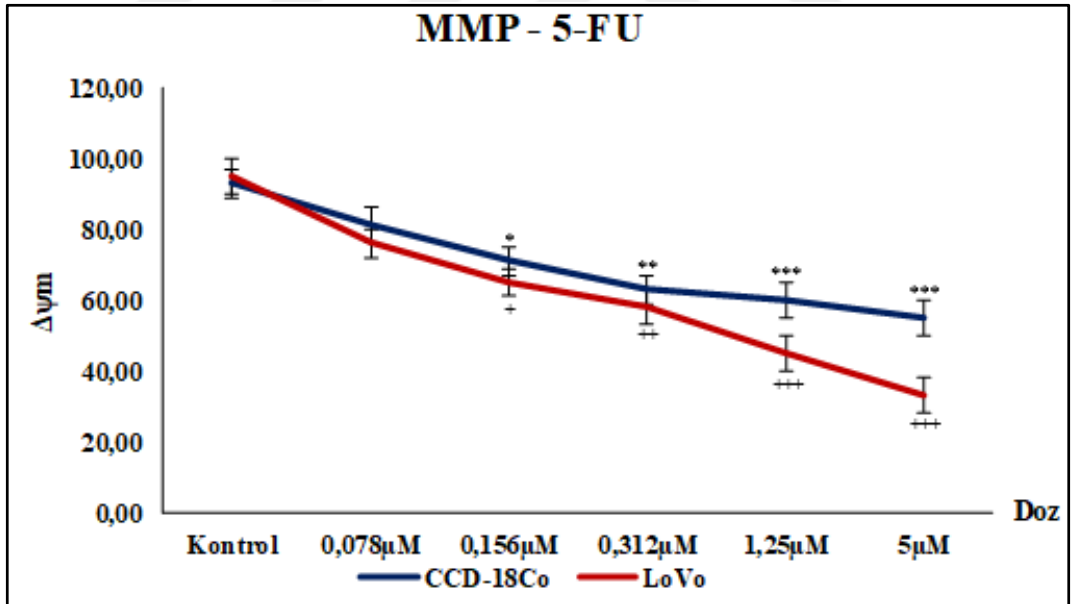
4.5 Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Mitokondri membran potansiyelindeki azalma sitokrom C'nin mitokondriden ayrılarak kaspazları aktive etmesiyle karakterizedir. Kaspazların aktivitesinin artması hücreyi apoptoza götürdüğünden MMP'deki azalma önemlidir. TQ, 5-FU ve kombine tedavinin IC_{50} altındaki dozları her iki hücrede 24 saatlik inkübasyondan sonra 40 nM (DiOC₆(3)) ile 15 dakika muamele edilip yıkandıktan sonra akış sitometrisinde ölçüm yapıldı (Şekil 4.12 – 4.14). Bu sonuçlara göre TQ, CCD18Co hücreesindeki kontrole göre MMP oranı %33, LoVo hücreesindeki %41; 5-FU, CCD18Co hücreesindeki kontrole göre MMP oranı %41, LoVo hücreesindeki %65; kombine tedavide ise CCD18Co'da %66 ve LoVo'da %83 kayıp yaşanmıştır. Sitotoksositeyle beraber artan bu kayıpların hücreleri apoptoza götürdüğü bulunmuştur.



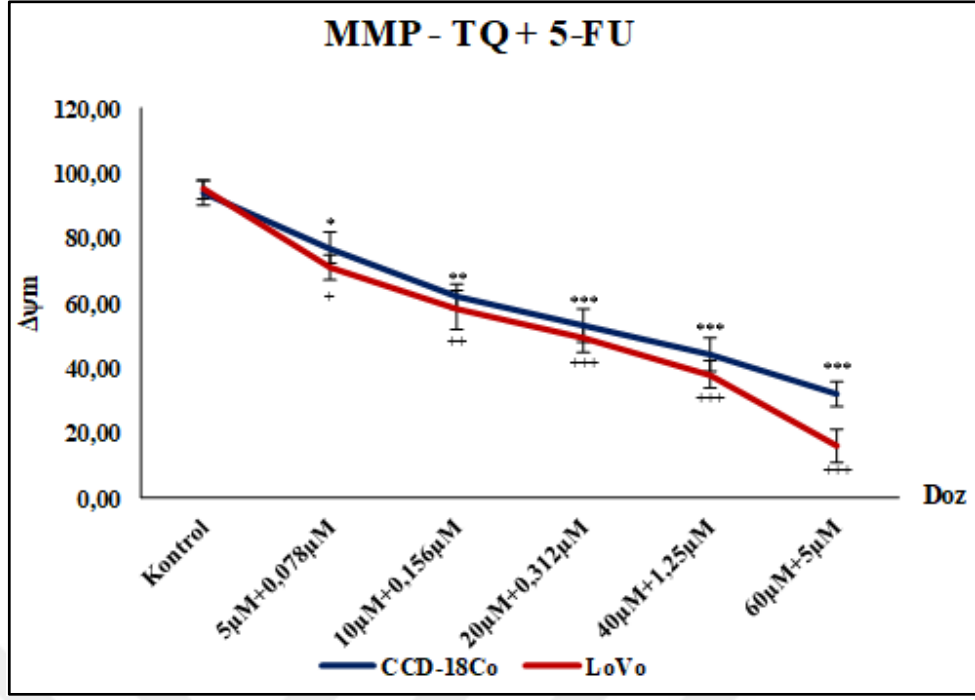
Şekil 4.12 : Timokinon'un mitokondriyal membran potansiyeli üstüne etkisi: IC₅₀ altındaki artan konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem de kanser hücrelerinde MMP düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düşmüştür.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001



Şekil 4.13 : 5-Fluorourasil'in mitokondriyal membran potansiyeli üstüne etkisi: IC₅₀ altındaki artan konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem de kanser hücrelerinde MMP düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düşmüştür.

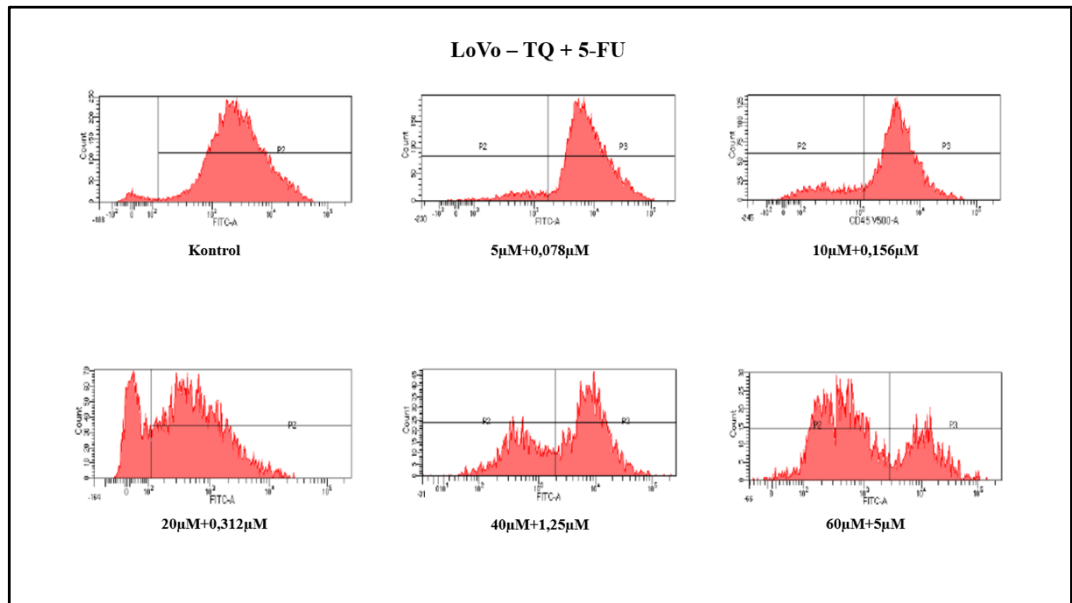
* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001



Şekil 4.14 : Kombine tedavinin mitokondriyal membran potansiyeli üstüne etkisi: IC₅₀ altındaki artan konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem de kanser hücresinde MMP düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düşmüştür.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001

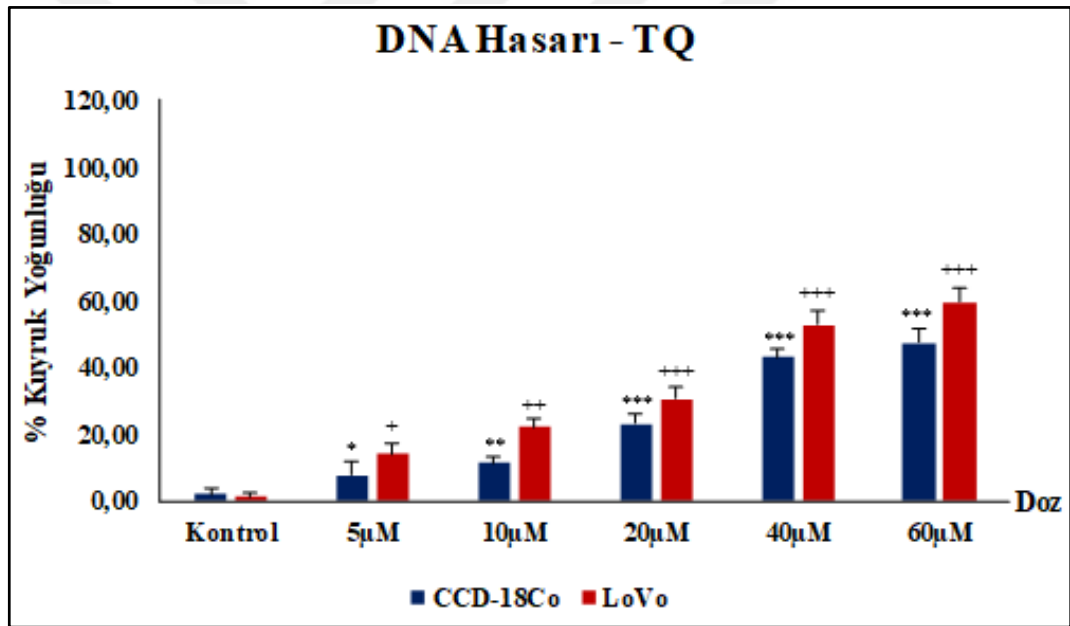
Tüm gruplarda ve doz arttıkça düşen MMP değerleri ile doz arttıkça artan ROS ve apoptoz arasında negatif bir korelasyon vardır (Lovo:TQ+5-FU; p=0,003, r=-0,983). Aşağıda (Şekil 4.15) LoVo hücresine kombine tedavinin akış sitometrisi diyagramı verilmiştir.



Şekil 4.15 : Mitokondriyal membran potansiyeli - akış sitometrisi (LoVo).

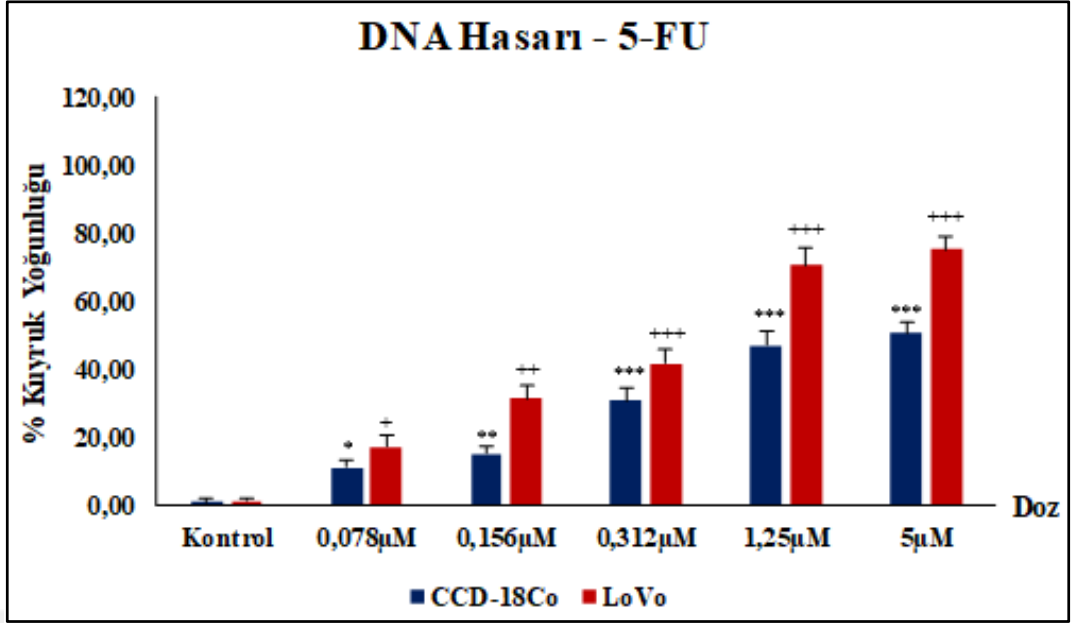
4.6 DNA Hasarı ölçümü

Hücrelerdeki IC₅₀ dozlarının altında farklı konsantrasyonlardaki 24 saatlik TQ, 5-FU ve kombine tedavinin uygulanması sonucu oluşan DNA hasar düzeyine alkali tek hücre elektroforezi olan comet assay metodu ile analiz edildi. Artan dozlarda DNA'daki kuyruk yoğunluğundaki artış arasında pozitif korelasyon olduğu gösterildi (LoVo: TQ-5-FU, p=0,006, r=0,937) . Kanser hücrelerindeki genetik kararsızlık, yüksek ROS düzeyinden ve azalan GSH düzeyinden dolayı DNA kuyruk yoğunluğu sağlıklı hücreye göre yüksek çıktı. Ayrıca TQ, 5-FU ve kombine tedavideki artan konsantrasyonlar kuyruk yoğunluklarını arttırdı (Şekil 4.16 – 4.18). TQ/5-FU'nun kanser hücrelerindeki DNA hasar oranı yalnız TQ'ya göre 4 kat; yalnız 5-FU'ya göre 1,5 kat artmıştır.



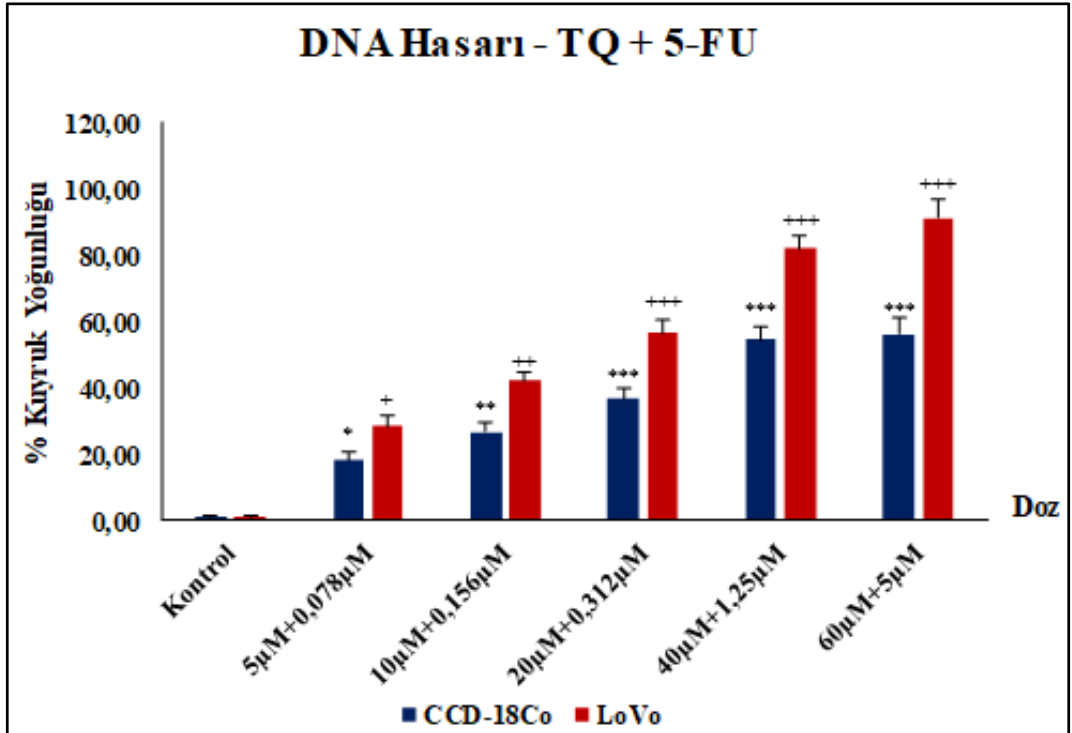
Şekil 4.16 : Timokinon'un DNA hasarı üzerine etkisi: Comet assay ile yapılan deneyde IC₅₀ altındaki artan konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem de kanser hücresinde DNA hasarı istatistiksel olarak anlamlı artmıştır.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001



Şekil 4.17 : 5-Fluorourasil'in DNA hasarı üzerine etkisi: Comet assay ile yapılan deneyde IC₅₀ altındaki artan konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem de kanser hücresinde DNA hasarı istatistiksel olarak anlamlı artmıştır.

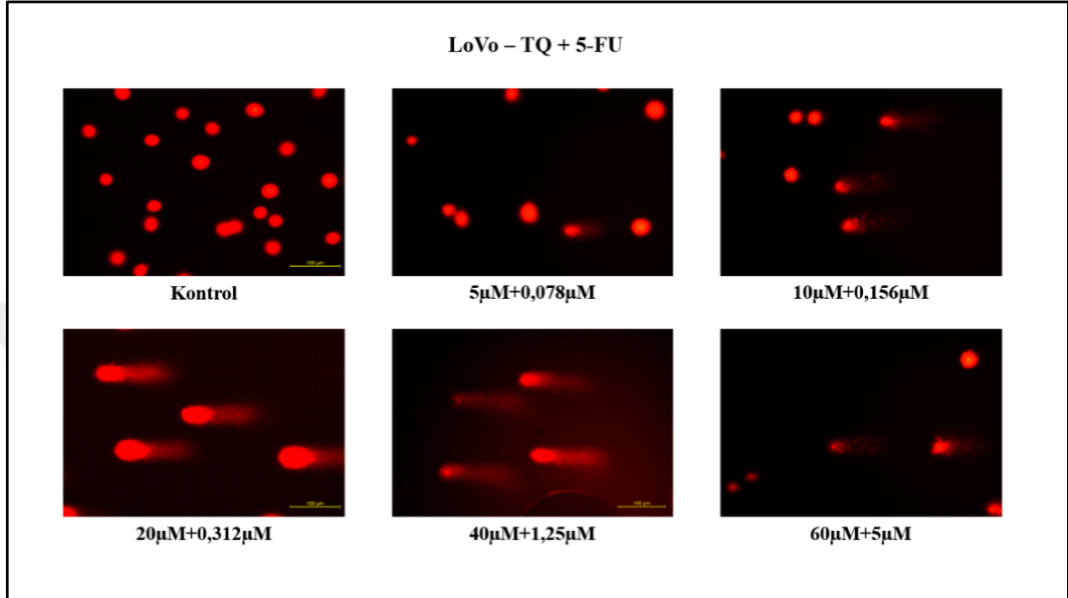
* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001



Şekil 4.18 : Kombine tedavinin DNA hasarı üzerine etkisi: Comet assay ile yapılan deneyde IC₅₀ altındaki artan konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem de kanser hücresinde DNA hasarı istatistiksel olarak anlamlı artmıştır.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001

Tüm gruplarda ve doz arttıkça DNA hasarı artmıştır. Dozla birlikte artan DNA hasarı, artan sitotoksinite, ROS ve apoptoz ile pozitif artış sergilemektedir. Aşağıda (Şekil 4.19) LoVo hücrelerine ait kombine tedavide ki artan konsantrasyonla birlikte artan DNA hasarına ait floresans mikroskop görüntüsü vardır.



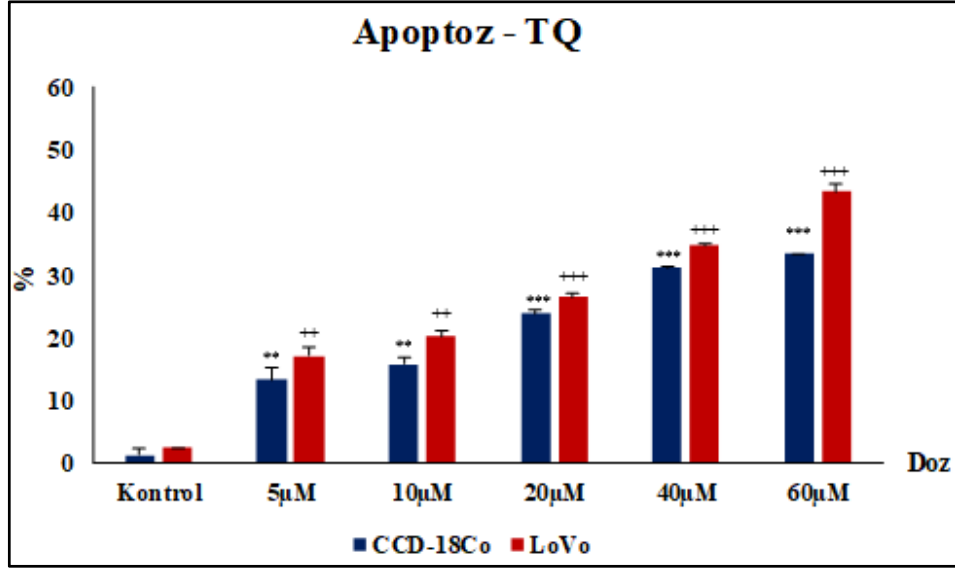
Şekil 4.19 : DNA Hasarı görüntüleri (LoVo – kombine tedavi).

4.7 Apoptozun değerlendirilmesi

4.7.1 Akridin turuncusu / etidyum bromür çift boyaması

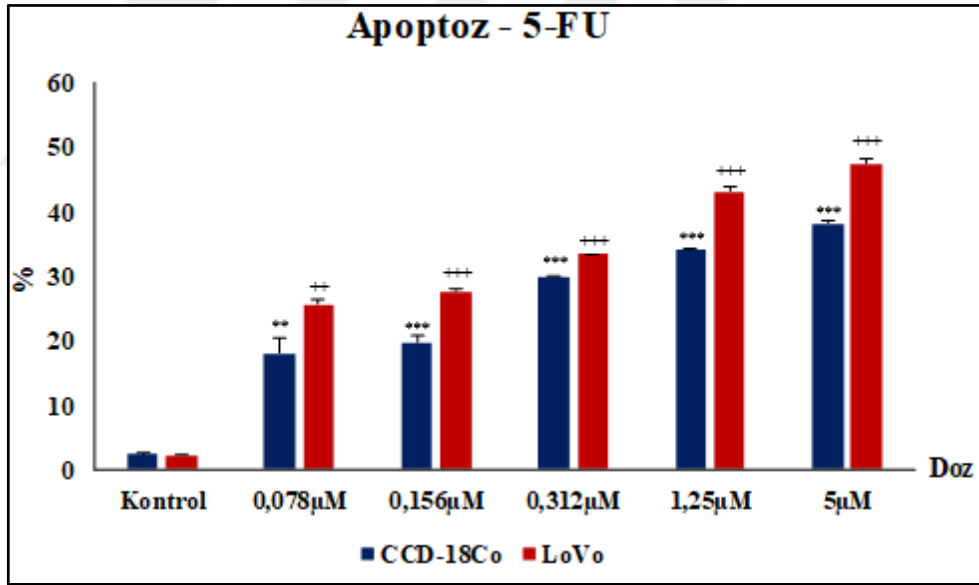
IC₅₀ dozlarının altındaki farklı konsantrasyonlarda verilen maddelerin 24 saatlik inkübasyonunun ardından hücrelerdeki morfolojik ve apoptotik değişimini izlemek için akridin turuncusu / etidyum bromür çift boyası kullanıldı. Maddelerle inkübasyonun ardından tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler 2 kere +4°C’de 1xPBS ile 500g’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra pelletten alınan hücreler 1:1 oranında AT/EB boyası ile karıştırılıp lam üstüne damlatılıp lamelle kapatıldı. Görüntüler floresans mikroskopunda bakılıp yarı kantitatif olarak hücreler sayılarak not edildi. Doza bağlı olarak apoptoz oranı artmıştır. Sağlıklı hücreye göre kanser hücreesindeki apoptotik hücreler TQ ve 5-FU’da %19, kombine tedavide ise %22 artmıştır.

Ayrıca kombine tedavide apoptoz oranı diğer maddelerin tek tek verildiğindeki apoptoz oranından %30 daha yüksektir (Şekil 4.20 – 4.22).



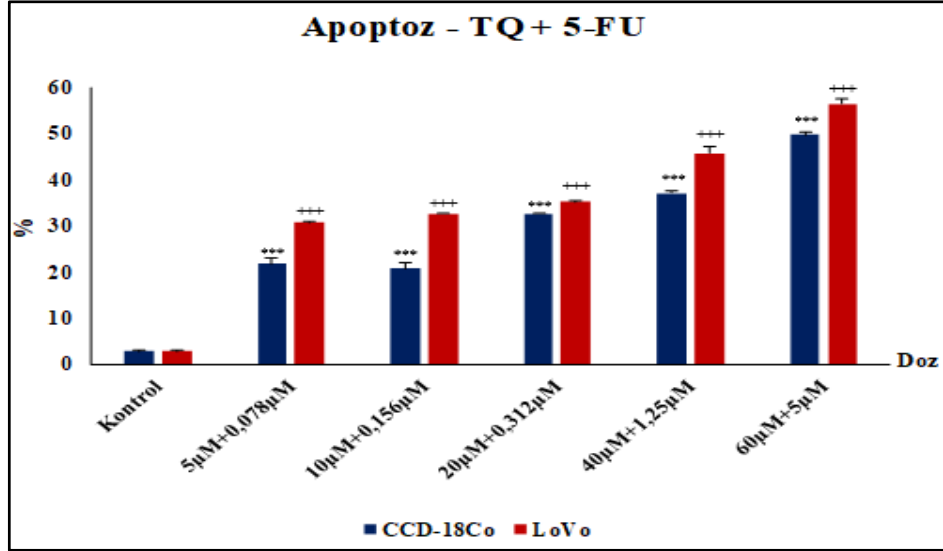
Şekil 4.20 : Timokinon'un apoptoz üzerine etkisi: Akridin turuncusu/etidyum bromür çift boyası ile floresans mikroskopta görüntülenen deneyde IC₅₀ altındaki artan konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem de kanser hücresinde apoptoz istatistiksel olarak anlamlı artmıştır.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001



Şekil 4.21 : 5-Fluorourasil'in apoptoz üzerine etkisi: Akridin turuncusu/etidyum bromür boyası ile floresans mikroskopta görüntülenen deneyde IC₅₀ altındaki artan konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem de kanser hücresinde apoptoz istatistiksel olarak anlamlı artmıştır.

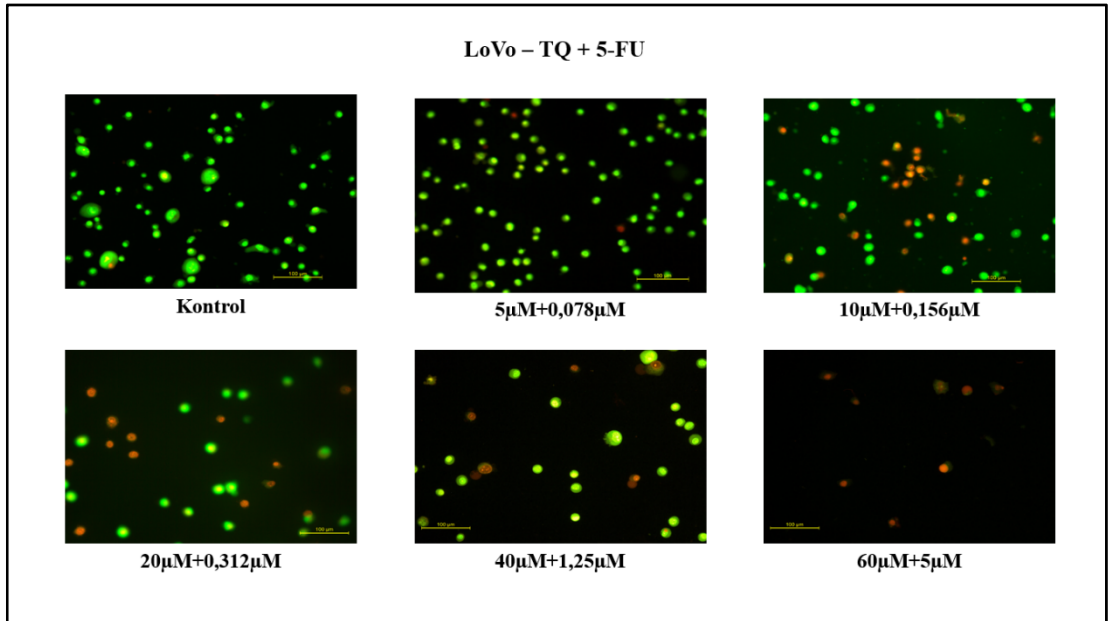
* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001



Şekil 4.22 : Kombine tedavinin apoptoz üzerine etkisi: Akridin turuncusu/etidyum bromür boyası ile floresans mikroskopta görüntülenen deneyde IC₅₀ altındaki artan konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem de kanser hücresinde apoptoz istatistiksel olarak anlamlı artmıştır.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001

Artan dozlar tüm hücrelerde apoptozu tetiklemiştir. Buna doğrudan ya da dolaylı olarak mitokondriyal membran potansiyelinin düşmesiyle sitokrom C'nin salınması, artan hücre içi ROS miktarı apoptozun hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarını uyarmıştır. Aşağıdaki şekilde LoVo hücresine kombine tedavinin apoptotik etkisinin floresans mikroskoptaki görüntüleri verilmiştir (Şekil 4.23).

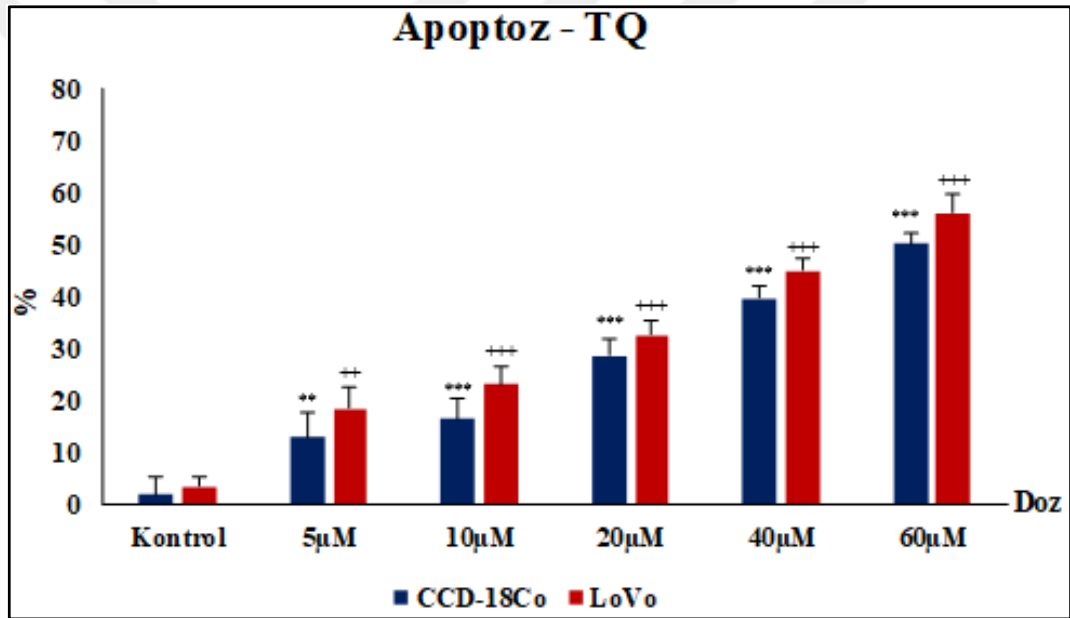


Şekil 4.23 : Apoptoz görüntüleri (Floresans mikroskop - LoVo hücresi; kombine tedavi).



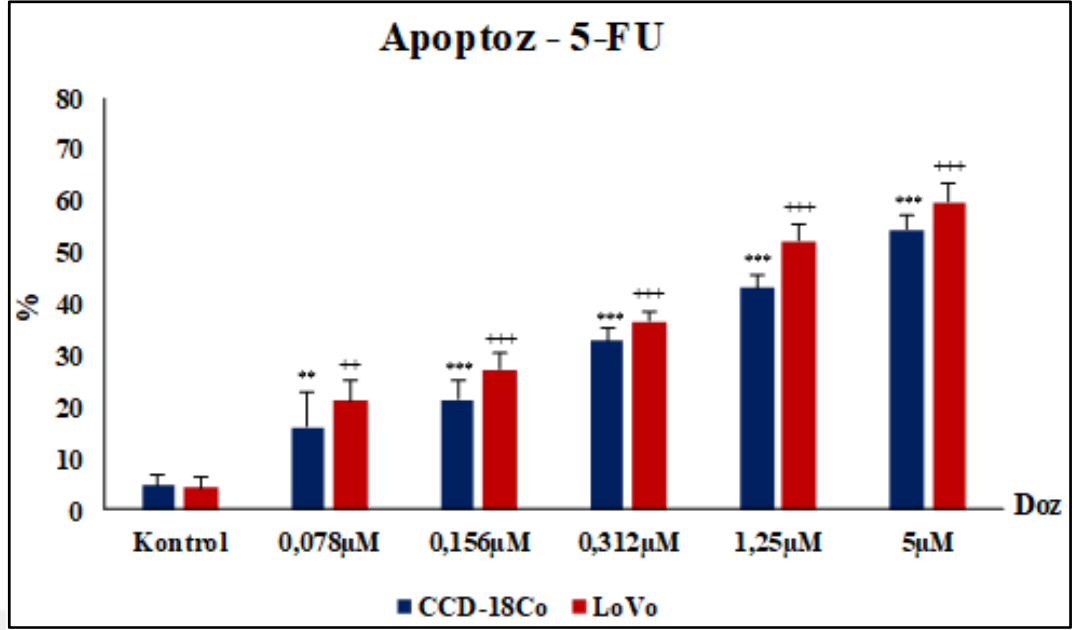
4.7.2 Annexin V-FITC boyası ile akış sitometrisinde apoptoz tayini

Hücrenin apoptoz sürecinde hücre membranının sitozol yüzünde bulunan fosfolipidlerin dış yüze çıkmasıyla FITC konjugatının bağlanması ve propidyum iyodür boyasının membran bütünlüğü bozulduğunda hücre içine girmesindeki kombinasyonlara dayanan ve akış sitometrisinde ölçülen yöntemle göre, maddelerin hücrelere tek tek ve kombinasyon şeklinde IC₅₀ dozlarının altındaki farklı konsantrasyonları 24 saatlik verilmesinin ardından doza bağlı olarak erken, geç apoptoz ve nekroz artmıştır. Kombinasyon tedavisindeki apoptotik ve nekrotik hücrelerin oranı diğer maddelere göre sağlıklı hücrede %10, kanser hücresinde %20 artmıştır (Şekil 4.24 - 4.26). Grafikler erken ve geç apoptoz toplamını göstermektedir.



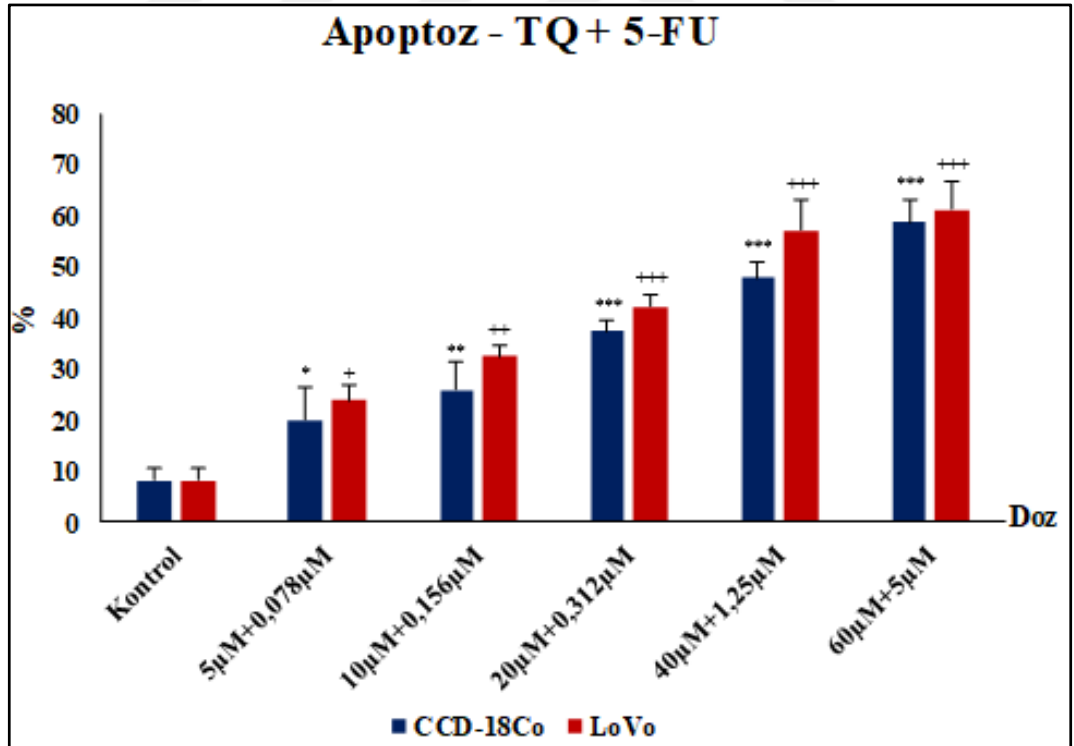
Şekil 4.24 : Timokinin'un apoptoz üzerine etkisi: annexin V-FITC boyası ile akış sitometrisinde yapılan deneyde IC₅₀ altındaki artan konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem de kanser hücresinde apoptoz istatistiksel olarak anlamlı artmıştır.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001



Şekil 4.25 : 5-Fluorourasil'in apoptoz üzerine etkisi: *Annexin V-FITC* boyası ile akış sitometrisinde yapılan deneyde IC_{50} altındaki artan konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem de kanser hücresinde apoptoz istatistiksel olarak anlamlı artmıştır.

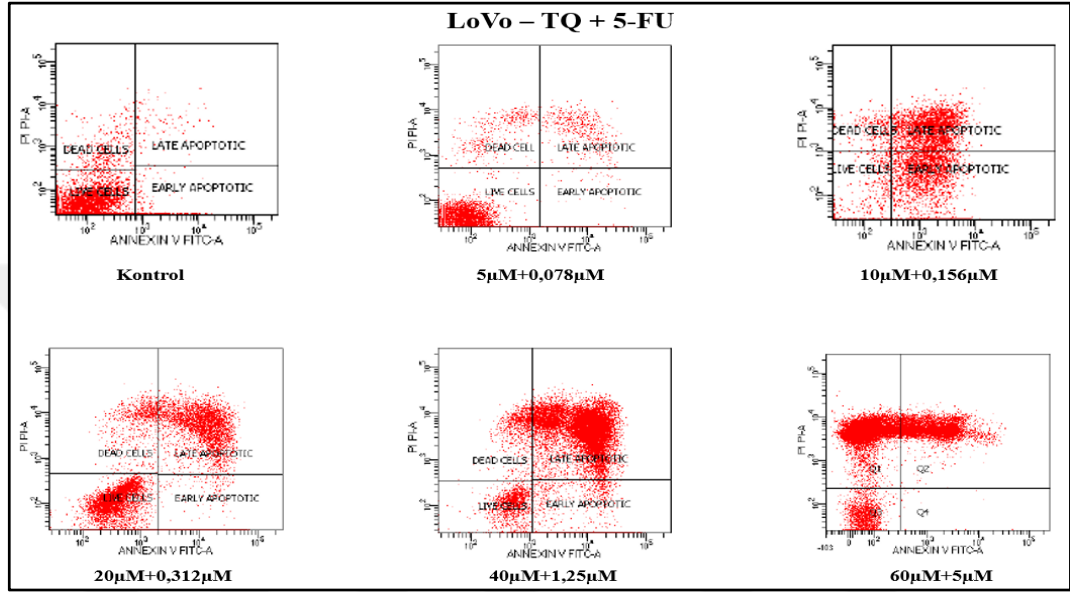
* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$



Şekil 4.26 : Kombine tedavinin apoptoz üzerine etkisi: *annexin V-FITC* boyası ile akış sitometrisinde yapılan deneyde IC_{50} altındaki artan konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem de kanser hücresinde apoptoz istatistiksel olarak anlamlı artmıştır.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$

IC₅₀ dozlarının altında hücelere verilen tüm dozlar, 24 saatlik inkübasyonun ardından tripsin-EDTA ile kaldırılıp, yıkandıktan sonra annexin V-FITC boyası ile kitte belirtilen prospektüse göre muamele edilip BD Canto II akış sitometrisine verildi. Aşağıdaki diyagram kombine tedavinin LoVo hücrelerindeki 24 saatlik inkübasyonundan sonraki canlı, nekrotik, erken ve geç apoptozdaki hücre yoğunluğunu göstermektedir (Şekil 4.27).



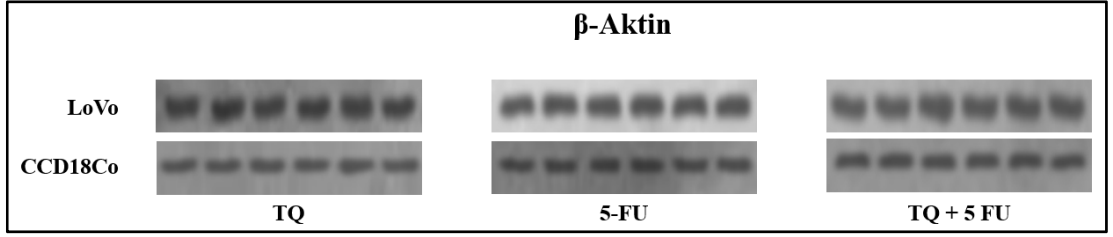
Şekil 4.27 : Apoptoz - Akış sitometrisi görüntüsü (LoVo - kombine tedavi).

4.8 Hücre Protein Ekspresyonlarının Düzeyleri

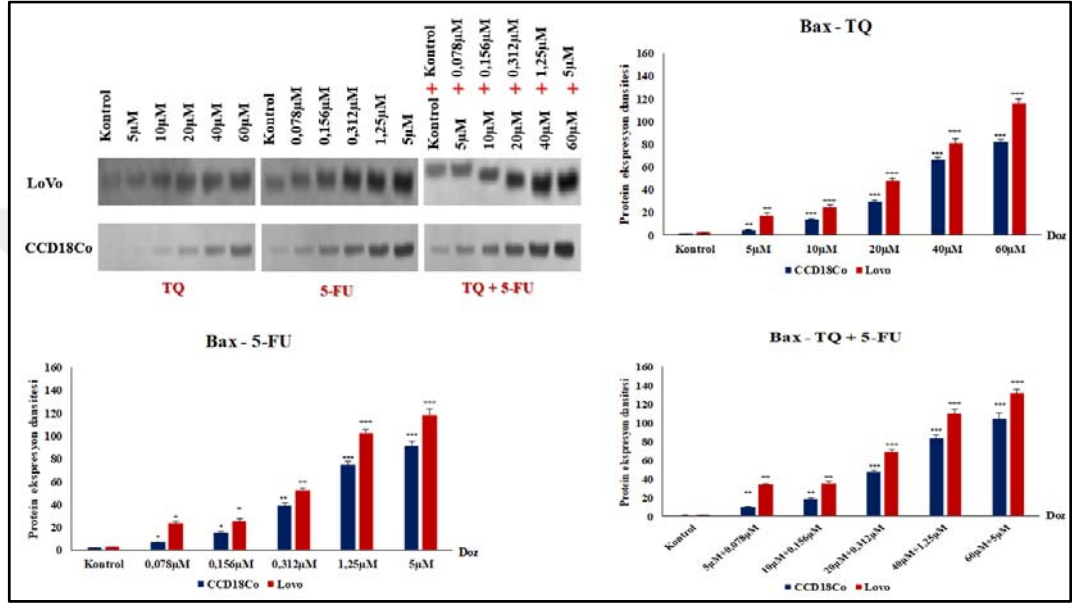
TQ (5 µM – 60 µM), 5-FU (0,078 µM – 5 µM) ve kombinasyon grubunun (TQ+5-FU) (5 µM + 0,0078 µM – 60 µM + 5 µM) IC₅₀ dozlarının altındaki farklı konsantrasyonları 24 saat inkübasyonun ardından CCD18Co ve LoVo hücre hatlarındaki proapoptotik (Bax), anti-apoptotik(Bcl-2), apoptotik regülatör (p53, p21, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9) proteinlerinin ekspresyonları western blot yöntemiyle çalışılıp, hesaplandı. Çıkan sonuçlar *housekeeping* protein olan β-aktinle normalize edildi (Şekil 4.28 – 4.34).

Anti-apoptotik protein olan Bcl-2 hariç tüm proteinlerin (Bax, p53, p21, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9) ekspresyonları doza bağımlı olarak artmıştır. Bcl-2 ekspresyonu artan dozla birlikte düşmüştür. Kolon kanser hücrelerindeki ekspresyon artışı ya da azalışı sağlıklı kolon hücresine göre ortalama 1,2 ile 1,6 kat daha yüksektir.

Ayrıca kombine tedavideki tüm proteinlerin ekspresyon değerleri TQ ve 5-FU'nun tek tek uygulanmasına göre 1,5 ile 1,8 katıdır.

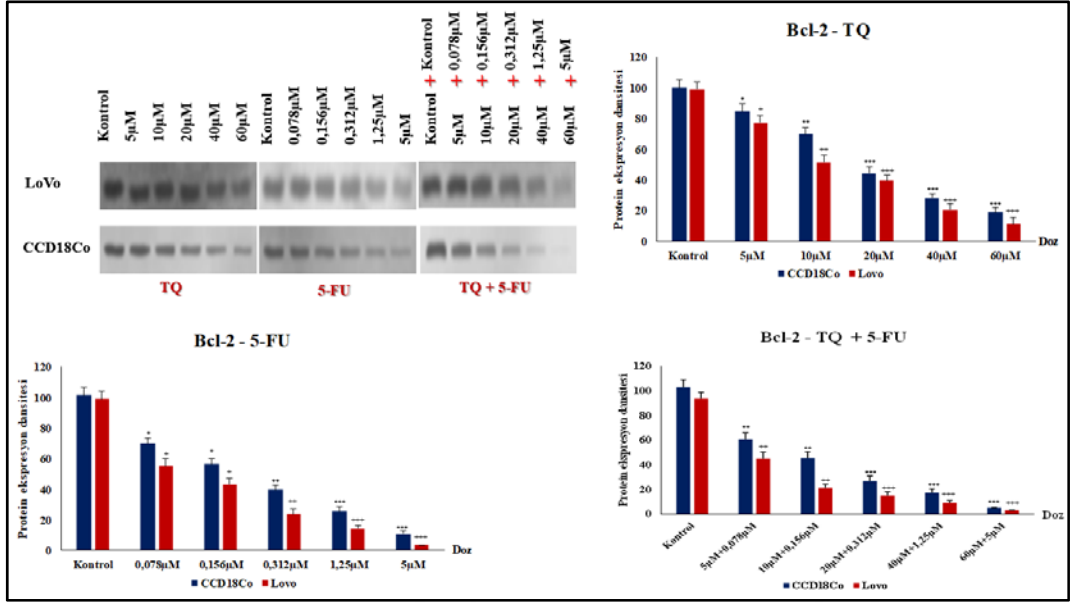


Şekil 4.28 : β -aktin ekspresyonları.

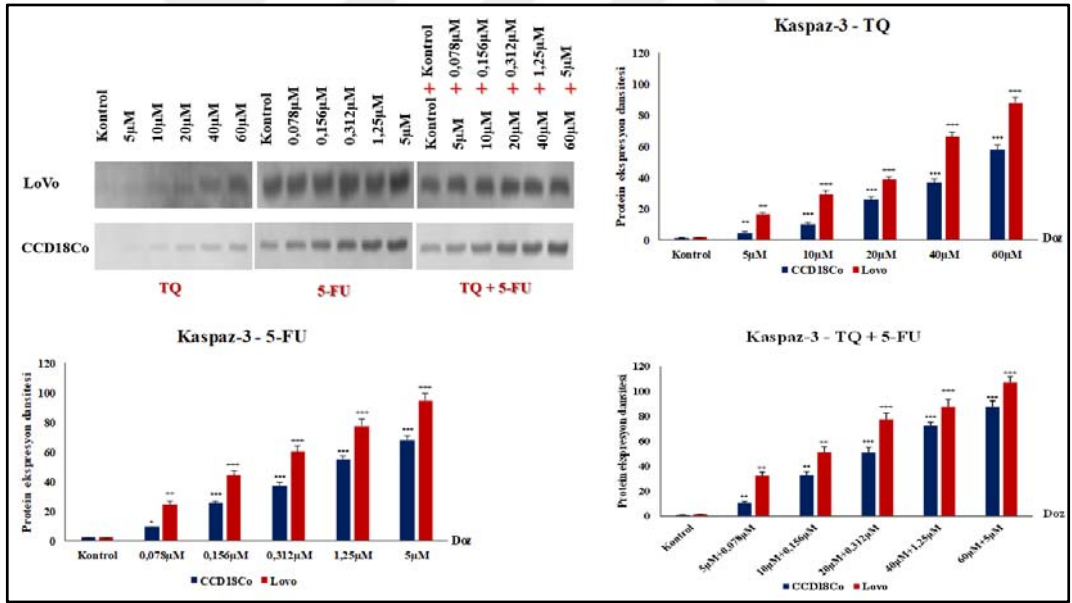


Şekil 4.29 : *In vitro* tekli ve kombine tedavide Bax proteininin ekspresyonu: IC₅₀ altındaki artan dozlarda doza bağımlı olarak Bax ekspresyonu kontrole göre artmıştır.
* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001

Kombine tedavi tekli tedavilere göre pro-apoptotik (Bax) ve anti-apoptotik (Bcl-2) proteinlerin ekspresyonunu daha çok etkilemiştir. Sağlıklı hücreler ile kanser hücrelerdeki ekspresyonlara bakıldığında Bax'ta ortalama %30 kanser hücrelerinin ekspresyonu daha fazlayken, Bcl-2'de kanser hücrelerinin ekspresyonu ortalama %24 daha azdır.

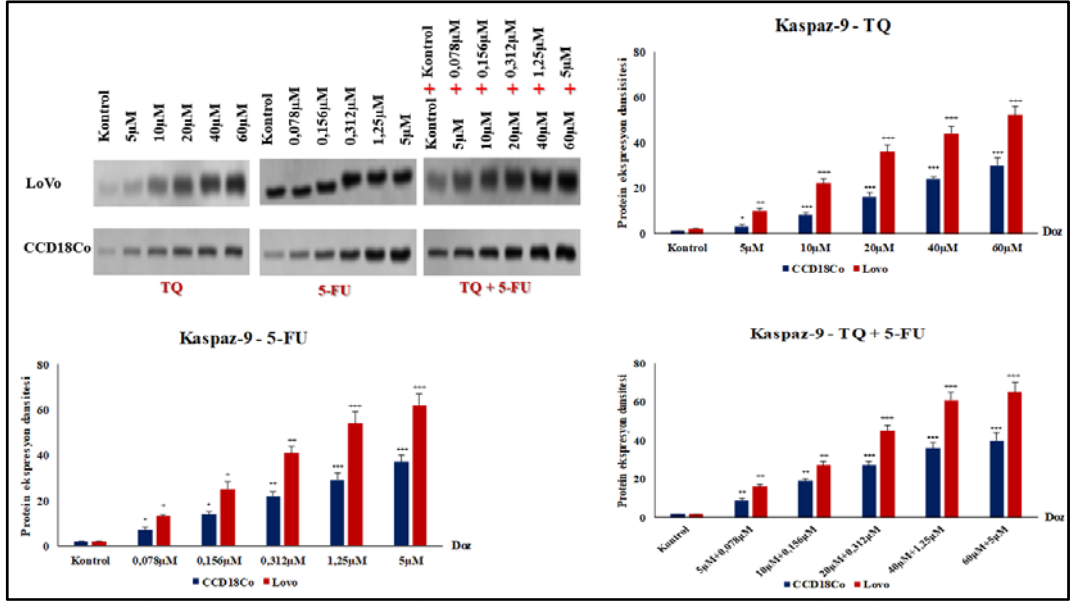


Şekil 4.30 : *In vitro* tekli ve kombine tedavide Bcl-2 proteininin ekspresyonu: IC₅₀ altındaki artan dozlarda doza bağımlı olarak Bcl-2 ekspresyonu kontrole göre azalmıştır.
 * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001

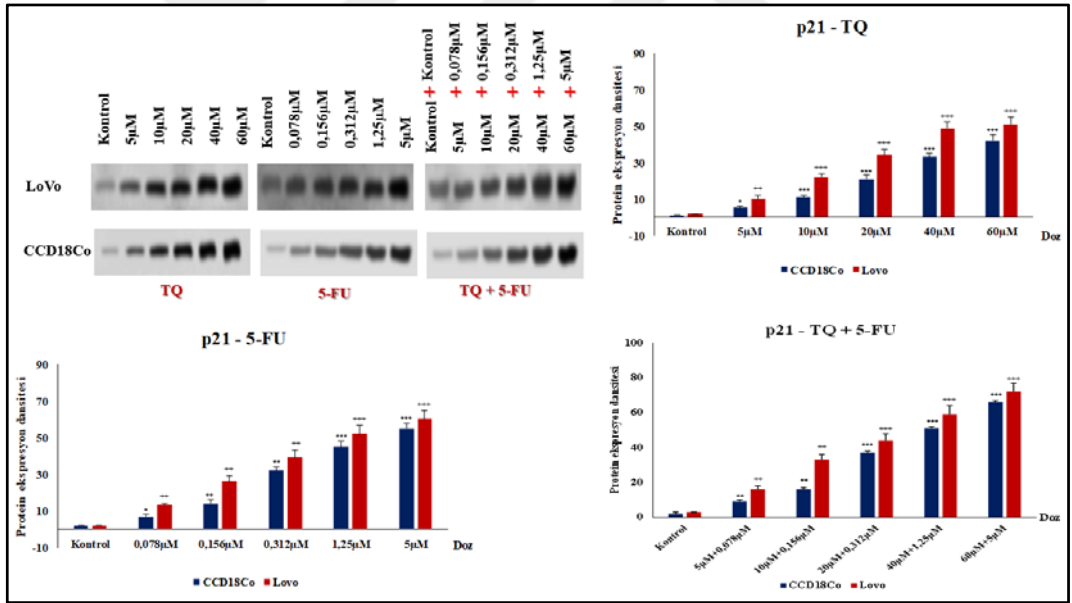


Şekil 4.31 : *In vitro* tekli ve kombine tedavide Kaspaz-3 proteininin ekspresyonu: IC₅₀ altındaki artan dozlarda doza bağımlı olarak Kaspaz-3 ekspresyonu kontrole göre artmıştır.
 * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001

Apoptotik proteinler olan kaspaz-3 ve kaspaz-9'un ekspresyonları kombine tedavide tekli tedavilere göre daha çok artmıştır. Kanser hücrelerindeki kaspaz-3 artışı sağlıklı hücreye göre ortalama %35 daha fazlayken, kaspaz-9 artışı sağlıklı hücreye göre %43 daha fazladır.

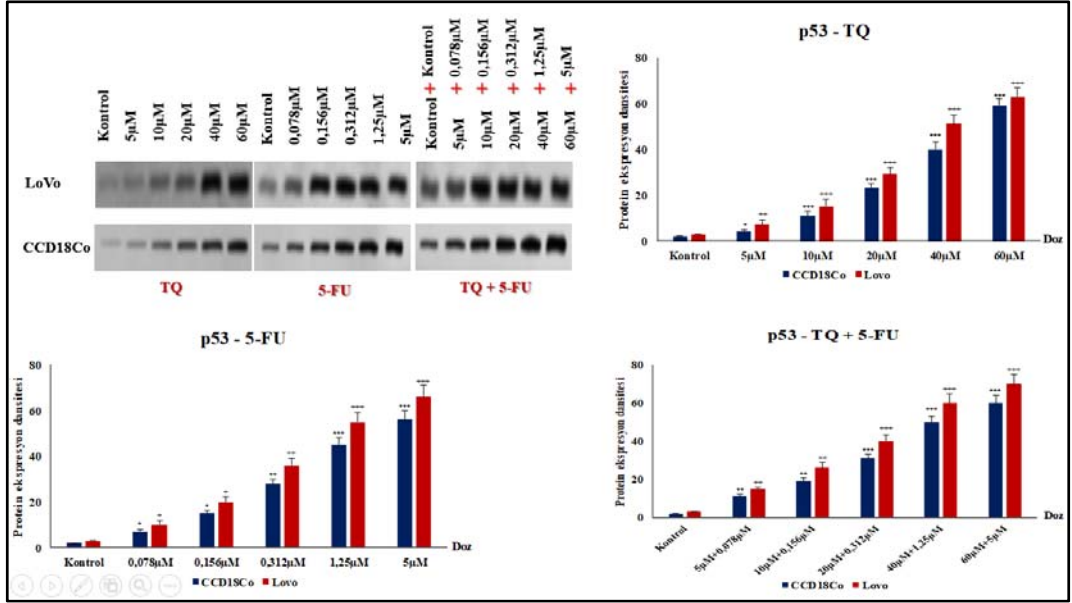


Şekil 4.32 : *In vitro* tekli ve kombine tedavide Kaspaz-9 proteininin ekspresyonu: IC₅₀ altındaki artan dozlarda doza bağımlı olarak Kaspaz-9 ekspresyonu kontrole göre artmıştır. * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001



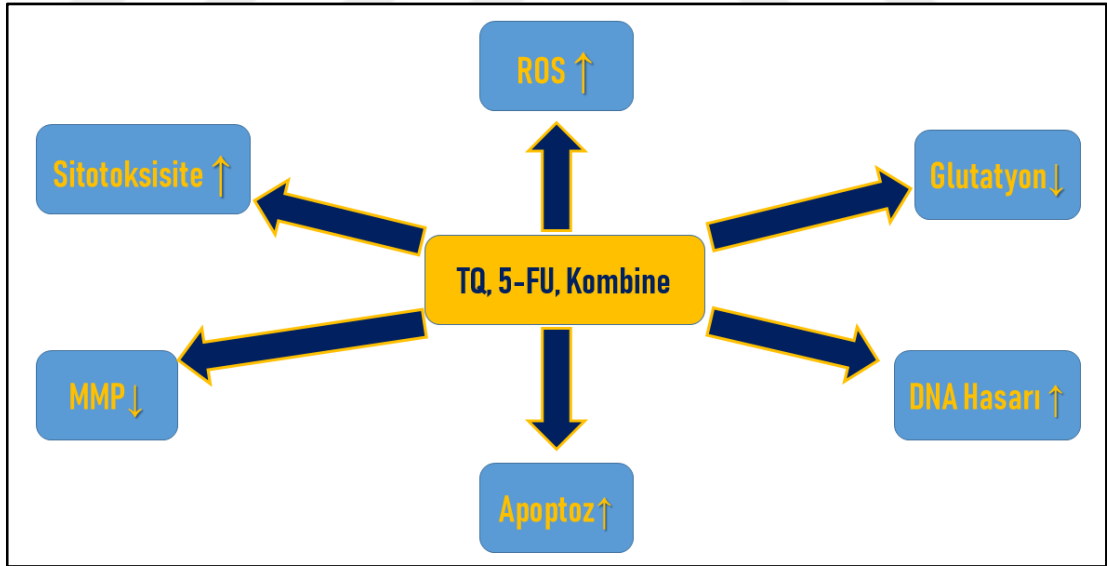
Şekil 4.33 : *In vitro* tekli ve kombine tedavide p21 proteininin ekspresyonu: IC₅₀ altındaki artan dozlarda doza bağımlı olarak p21 ekspresyonu kontrole göre artmıştır. * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001

Kanser mekanizmasında önemli olan p21 ve p53 proteinlerinin ekspresyonları tekli tedavilere göre kombine tedavide daha çok artmıştır. Ayrıca kanser hücresinde bu proteinlerin sağlıklı hücreye göre ekspresyon artışı p21’de %24, p53’te %19’dur.

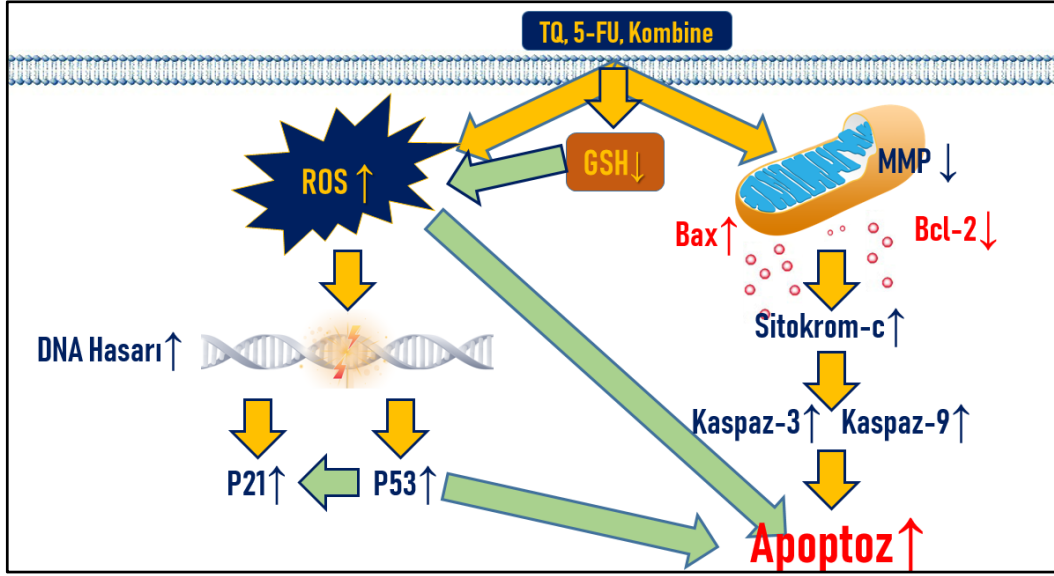


Şekil 4.34 : *In vitro* tekli ve kombine tedavide p53 proteininin ekspresyonu: IC₅₀ altındaki artan dozlarda doza bağımlı olarak p53 ekspresyonu kontrole göre artmıştır.
 * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001

TQ, 5-FU ve kombine tedavinin *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında ROS, sitotoksosite, genotoksosite ve apoptozu artırırken, glutatyon ve MMP düzeylerini düşürdüğü bulunmuştur (Şekil 4.35, 4.36).



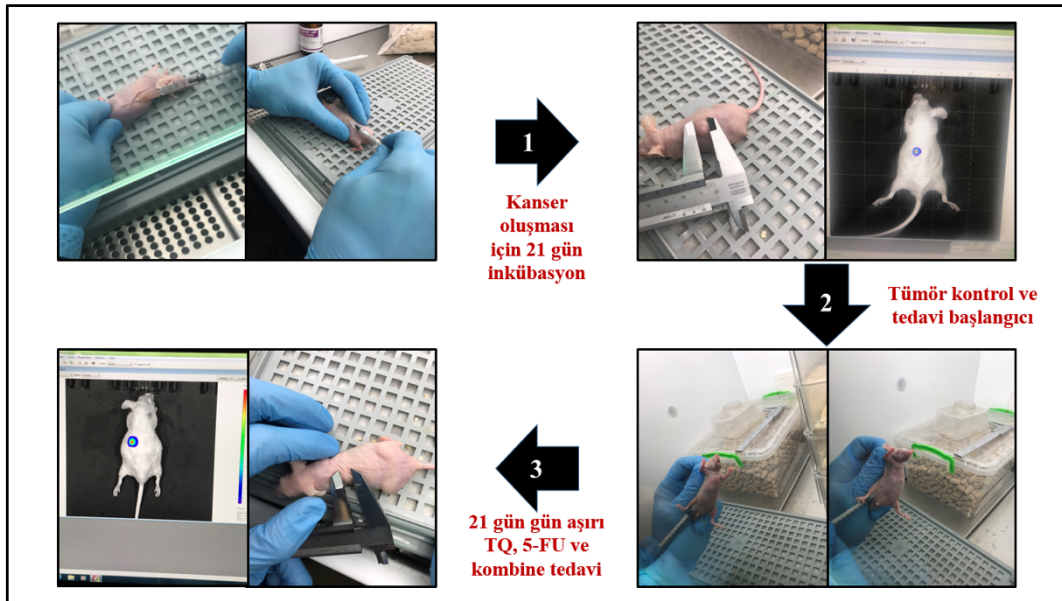
Şekil 4.35 : *In vitro* deney genel sonuçlar 1.



Şekil 4.36 : *In vitro* deney genel sonuçlar 2.

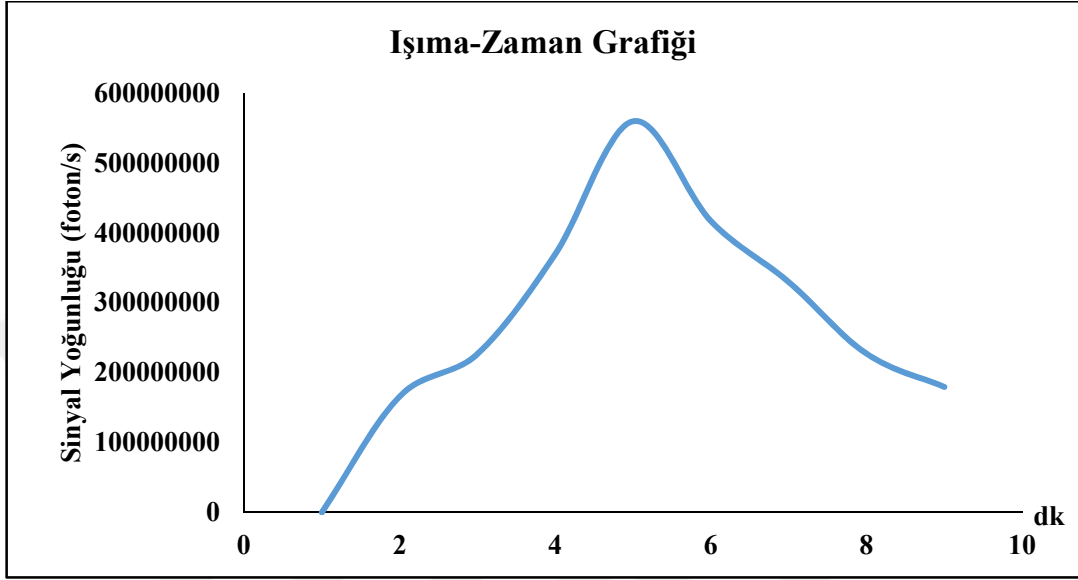
4.9 *In Vivo* Zenograft Kolon Kanseri Modeli

8-10 haftalık atimik *nude* erkek fareler rastgele gruplara ayrıldıktan 1 hafta sonra hayvanlara $1,5 \times 10^6$ transfekte LoVo hücrelerinden dPBS içinde subkutan olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan birer hafta ara ile hayvanlara 1 mg/ml D-lusiferin verilip *in vivo* canlı hayvan görüntüleme sisemi (IVIS) ile kontrol edilip, ROI değerleri kaydedildi. Enjeksiyondan sonra 3. hafta tedaviye geçildi. TQ tedavisi için gün aşırı 10 mg/kg; 5-FU tedavisi için gün aşırı 12,5 mg/kg ve aynı dozlar kombine şekilde yine gün aşırı hayvanlara verildi (Şekil 4.37).

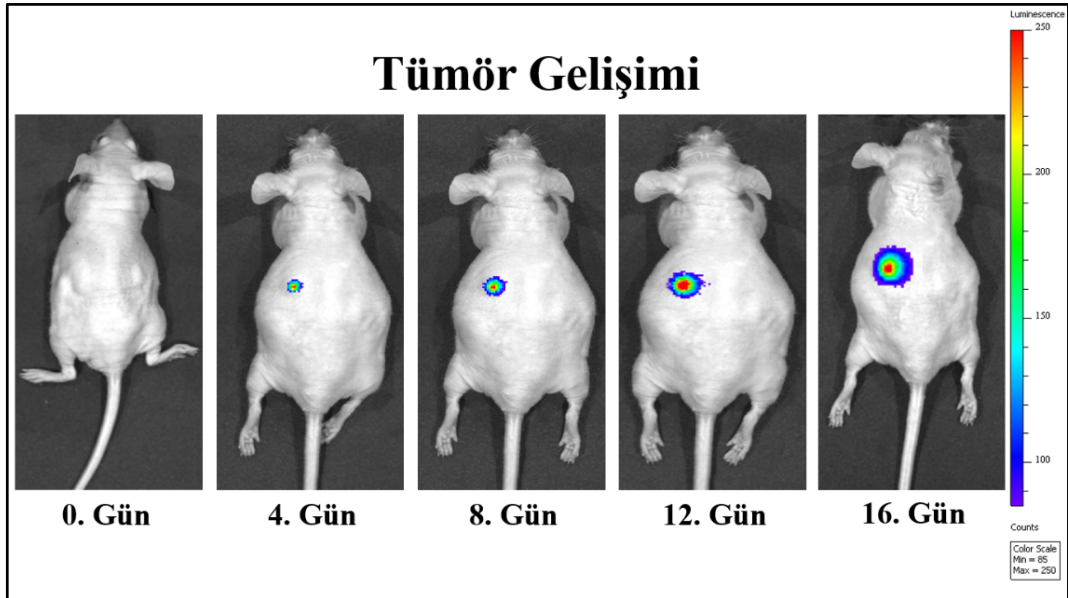


Şekil 4.37 : Zenograft ile kolon kanseri oluşumu ve tedavi süreci.

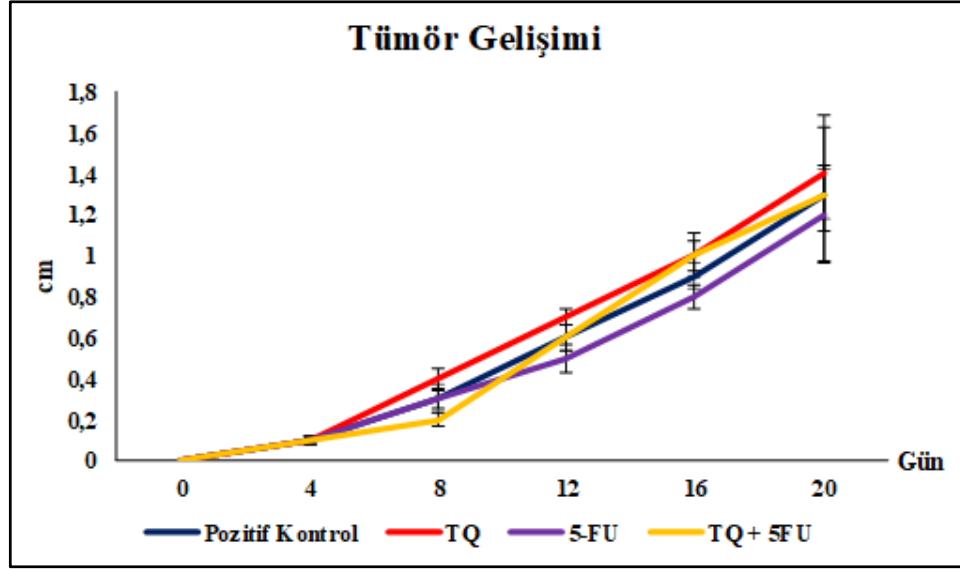
Tümör gelişimini incelemek için enjeksiyondan sonra 4 gün arayla hayvanlar uyutulup 1 mg/ml D-Lusiferin intraperitoneal olarak verildi. Işıma zaman grafiğinde optimizasyon yapıp en yüksek ışıma dakikası kaydedildi (Şekil 4.38). 5 dakika içinde görüntüler alınıp, ROI değerleri kaydedildi (Şekil 4.39). Hayvanlar kafeslere kaldırılmadan önce kumpasla tümör boyutları çift yönlü ölçüldü (Şekil 4.40).



Şekil 4.38 : Hayvanlarda D-Lusiferin enjeksiyonundan sonra ışıma zaman optimizasyon grafiği.



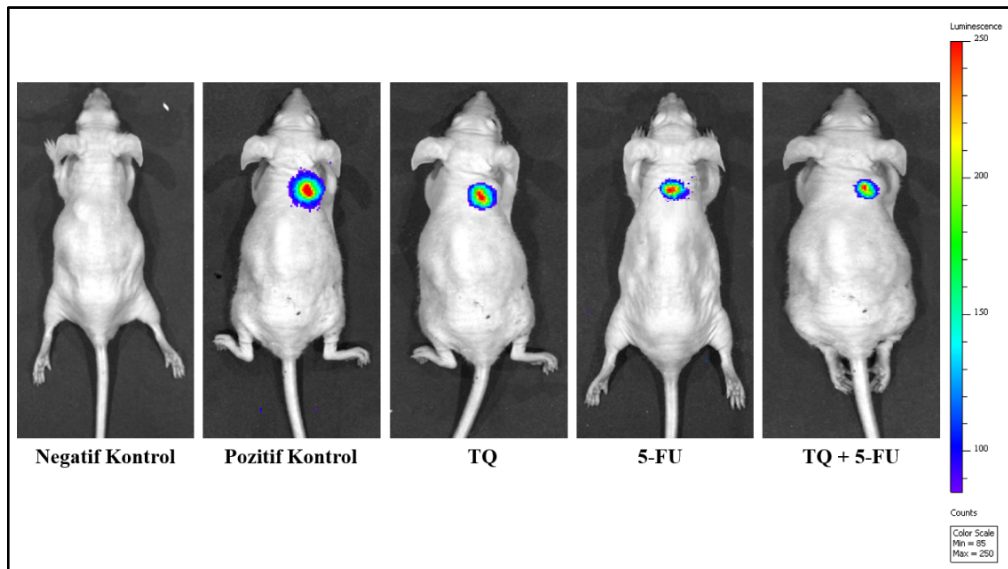
Şekil 4.39 : Farklı günlerdeki tümör gelişim süreci (IVIS görüntüleri).



Şekil 4.40 : Farklı gruplardaki tümör gelişimi (Kumpas ile ölçüm).

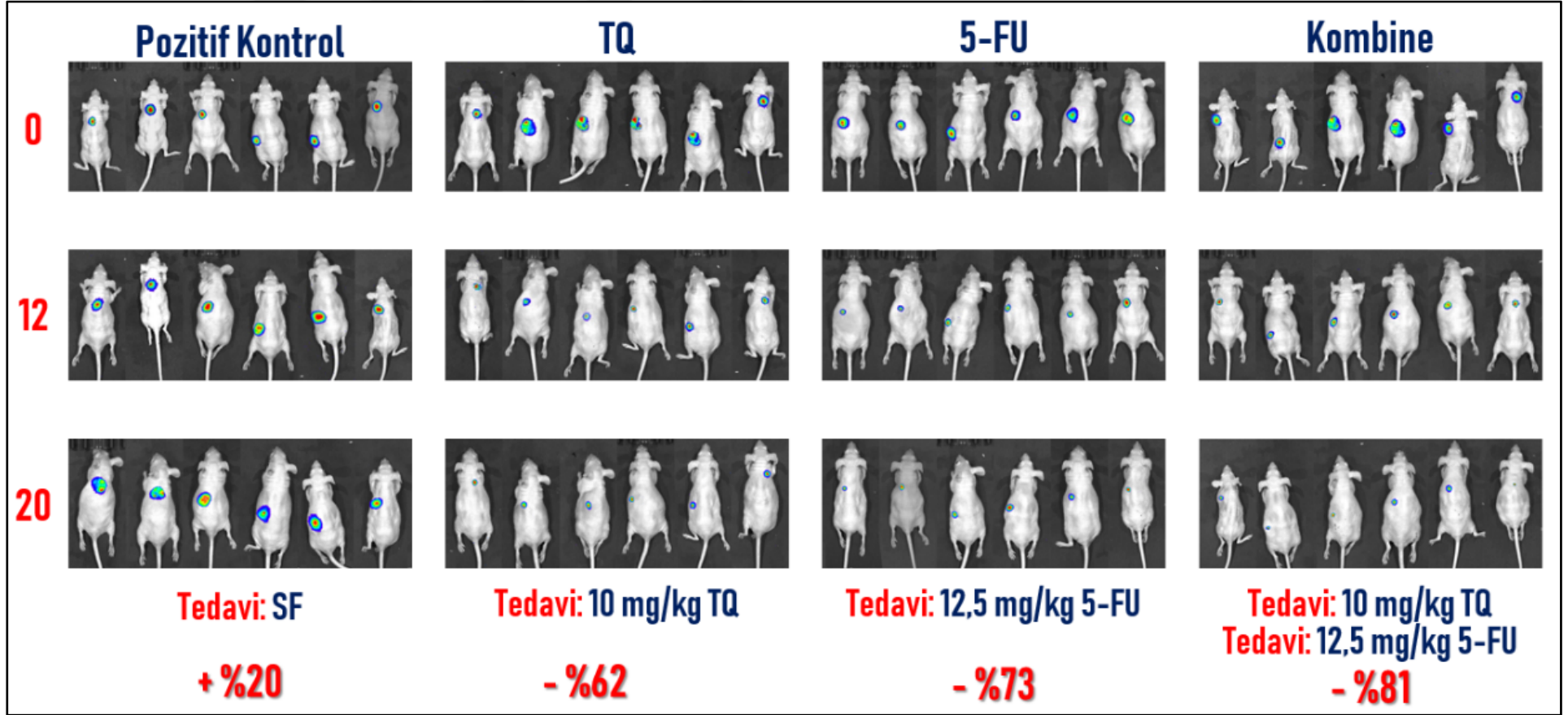
Zenograftla hücre enjeksiyonununun 21. gününde tümör oluşumu tamamlandıktan sonra gruplara 21 günlük tedavi sürecine başlandı. Gün aşırı verilen tedavilerin ardından yine 4 günde bir hayvanlar uyutulup kumpasla ve 1 mg/ml D-Lusiferin intraperitoneal verilip IVIS cihazıyla görüntüleri alınıp, kaydedildi. Deney başında ve deney sonunda hayvanların ağırlıkları ölçüldü ve %15-22 arasında ağırlık kaybı olduğu görüldü.

Tedavinin 3. haftasında hayvanlar son kez uyutulup 1 mg/ml D-Lusiferin verilip IVIS cihazında hayvanların görüntüleri alındı ve ROI değerleri kaydedildi (Şekil 4.41 – 4.42). Sakrifikasyon öncesi kumpasla hayvanların tümör boyutları ölçüldü.

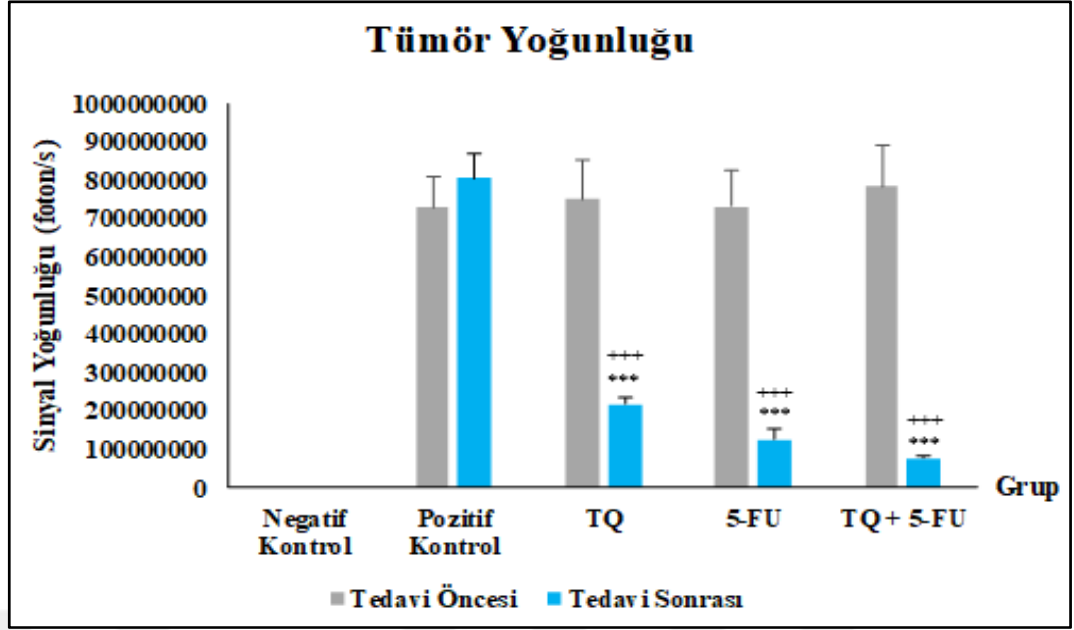


Şekil 4.41 : Gruplara göre tümör büyüklüklerinin IVIS görüntüleri: Kombine tedavi tekli tedaviye göre tümör boyutunu daha çok düşürmüştür.

Grupların farklı günlerdeki tedavi sonrası görüntüleri aşağıdaki gibidir (Şekil 4.42).



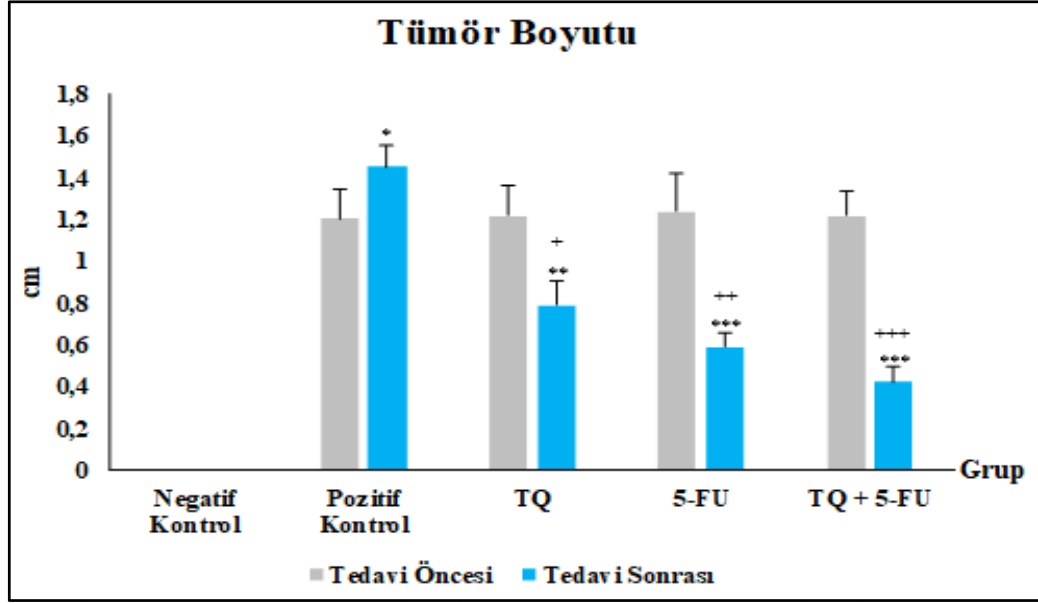
Şekil 4.42 : Günlük tedavi görüntüleri (IVIS).



Şekil 4.43 : Grupların tedavi öncesi ve sonrası tümör yoğunluğu (IVIS): Tedavi öncesi ve sonrası hayvanların tümörlerinden ölçülen ROI değerlerine bakıldığında tüm tedavi gruplarında tümör boyutu küçültmesine rağmen kombine tedavi daha etkili olduğu gösterilmiştir. Tüm tedavilerde ve pozitif kontrol grubuna göre tümör boyutu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşmüştür.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$

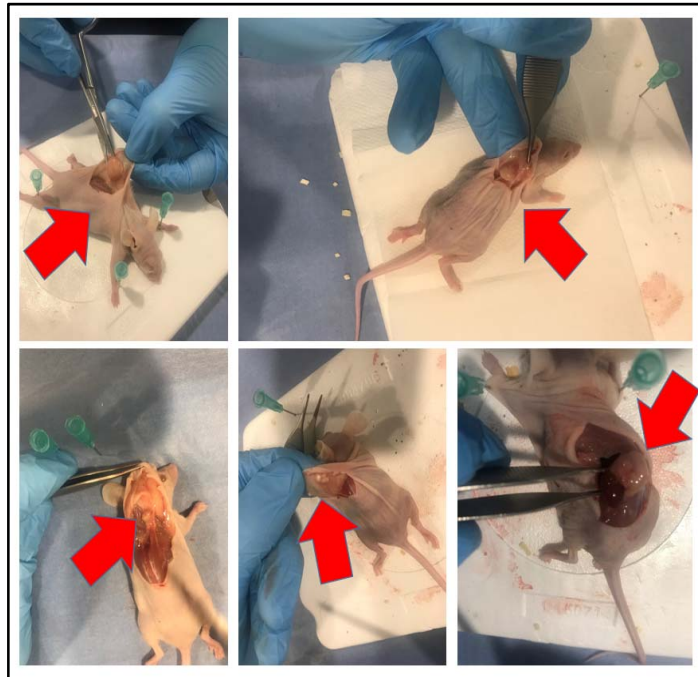
In vivo kolon kanser modeli değerlendirildiğinde $1,5 \times 10^6$ hücre subkutan ekilip 3 hafta tümörün oluşması için beklendiğinde tümör boyutu ortalama 6 kat arttı. Tedavi sürecine geçildiğinde pozitif kontrol grubuna 3 hafta boyunca sadece serum fizyolojik verildi ve tedavi sonunda tümör boyutu %17 arttı. TQ grubunda 3 haftalık tedavi sonunda %35'lik bir küçülme, 5-FU grubunda %53'lük bir küçülme ve kombine tedavi grubunda %66'luk bir küçülme bulundu (Şekil 4.43 – 4.44).



Şekil 4.44 : Grupların tedavi öncesi ve sonrası tümör büyüklüğü (Kumpas): Tedavi öncesi ve sonrası hayvanların tümör boyutları kumpasla ölçüldüğünde tüm tedavi gruplarında tümör boyutu küçültmesine rağmen kombine tedavi daha etkili olduğu gösterilmiştir. Tüm tedavilerde ve pozitif kontrol grubuna göre tümör boyutu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşmüştür.

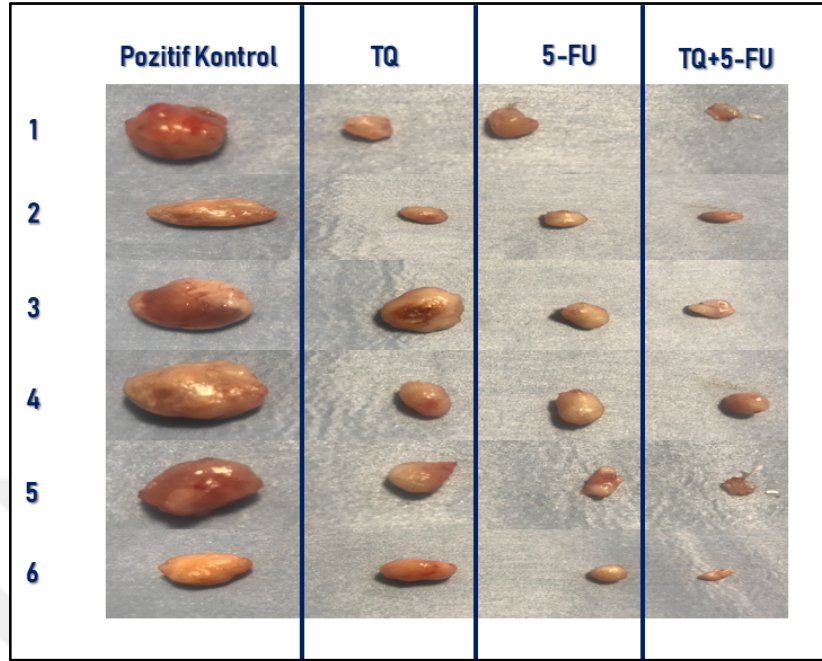
* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$

Görüntüler alınıp, tümör boyutları ölçüldükten sonra hayvanlardan intrakardiyak olarak jelli biyokimya tüpüne kan alınıp, sakrifiye edildi. Hayvanlardan önce tümör dokuları sonra karaciğer ve böbrek dokuları alınıp, biyokimyasal ve patolojik incelemeler yapıldı (Şekil 4.45).



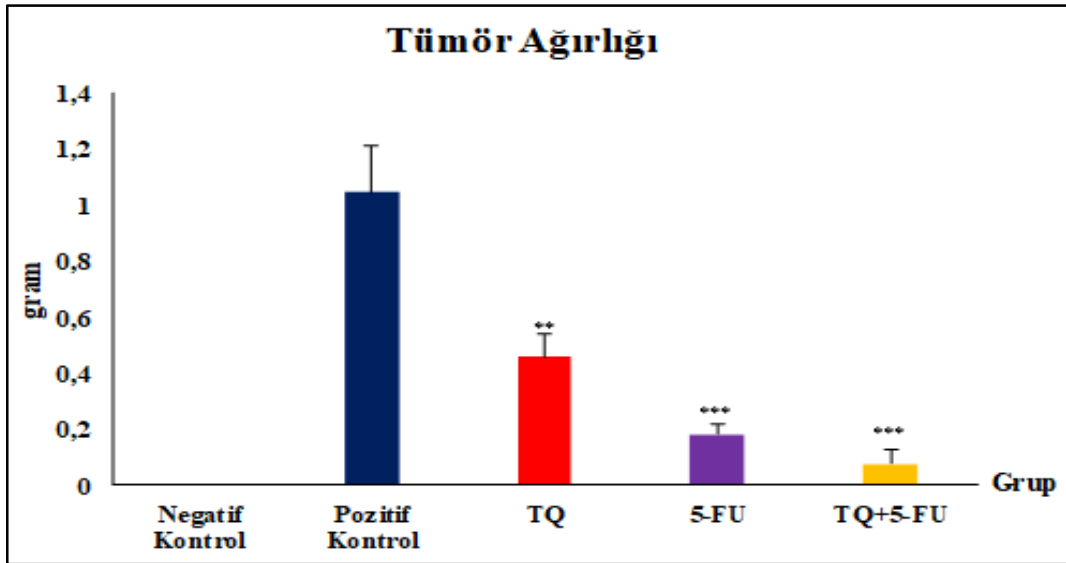
Şekil 4.45 : Tümör rezeksiyonları.

Çıkarılan tümör dokularının (Şekil 4.46) ağırlıkları ölçülerek kaydedildi (Şekil 4.47).



Şekil 4.46 : Rezeke edilen farklı gruplara ait tümör dokularının makroskobik görüntüsü.

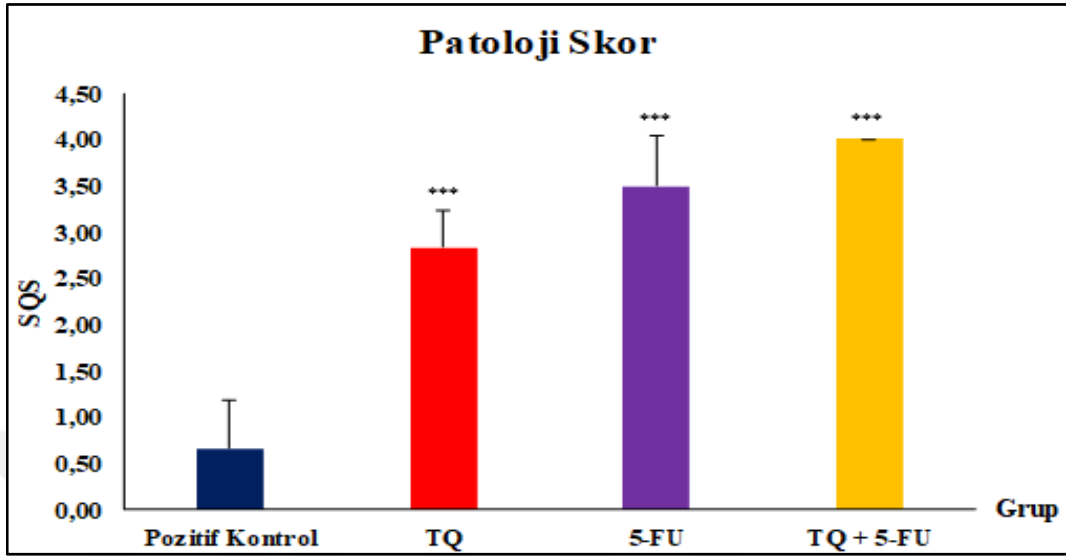
Tedavi sonrası çıkarılan tümör dokularının boyutlarına bakıldığında tüm tedavi gruplarında tümörler küçülmüştür. Kombine tedavinin tekli tedaviye göre hem makroskobik hem de tümör ağırlığı açısından tedavi veriminin yüksek olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.47 : Gruplara göre tümörlerin ağırlıkları: Pozitif kontrol grubuna göre kombine ve tekli tedavinin tümör ağırlığını istatistiksel olarak anlamlı derece düşürdüğü bulunmuştur.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Hayvandan alınan tümör dokularında patolojik olarak yarı kantitatif enflamasyon ve nekrotik alanlar değerlendirildi. Tüm tedavilerde enflamasyon ve nekroz artmıştır. Kombine tedavinin tekli tedaviye göre daha etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.48).



Şekil 4.48 : Gruplara ait tümörlerin patolojik skorları: Sadece SF verilen pozitif kontrol grubuna göre diğer gruplarda enflamasyon ve nekroz istatistiksel anlamlı bir şekilde artmıştır.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

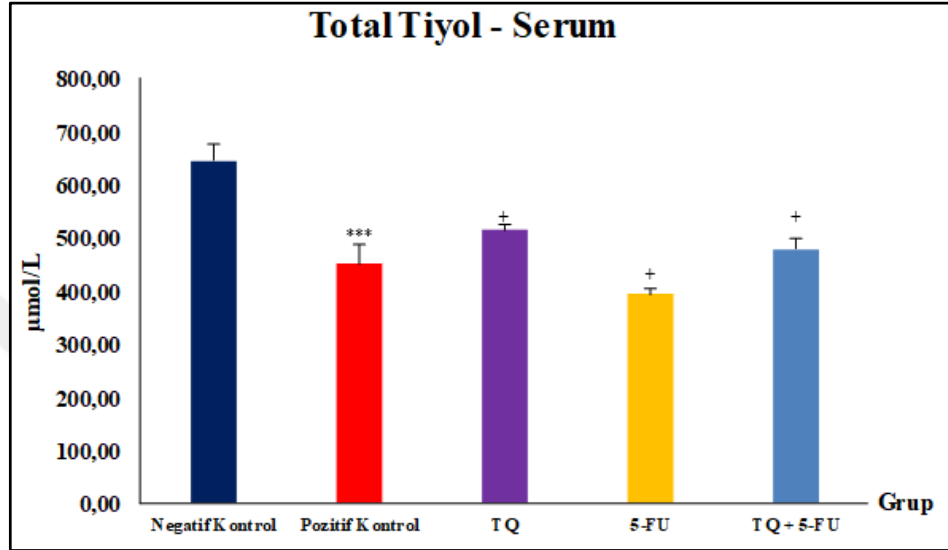
4.10 Oksidatif Stres Ölçümleri

Sakrifikasyonda jelli biyokimya tüpüne alınan kanlar 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan serum örneklerinde oksidatif stres göstergelerinden olan total tiyol (TT), natif tiyol (NT), total anti-oksidan seviye (TAS) ve total oksidan seviye (TOS) yöntemde belirtilen fotometrik metotlarla ölçüldü. Disülfid düzeyi: $(TT-NT)/2$ ve oksidatif stres indeksi: TOS/TAS matematiksel hesaplarla bulundu (Şekil 4.49 – 4.54).

TT ve NT düzeylerine bakıldığında negatif kontrol grubuna (sağlıklı grup) göre pozitif kontrol grubunda ortalama %30 istatistiksel olarak anlamlı düşmüştür. Tedavi gruplarının TT ve NT düzeyleri pozitif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişmiştir. TQ tedavisi TT ve NT'yi ortalama %21 arttırarak anti-oksidan özelliğini ön plana çıkarırken, 5-FU tedavisi, TT ve NT değerlerini %20-30 arası düşürürken, kombine tedavide TQ etkisinden dolayı pozitif kontrol grubu değerlerine göre TT ve NT %10 artmıştır.

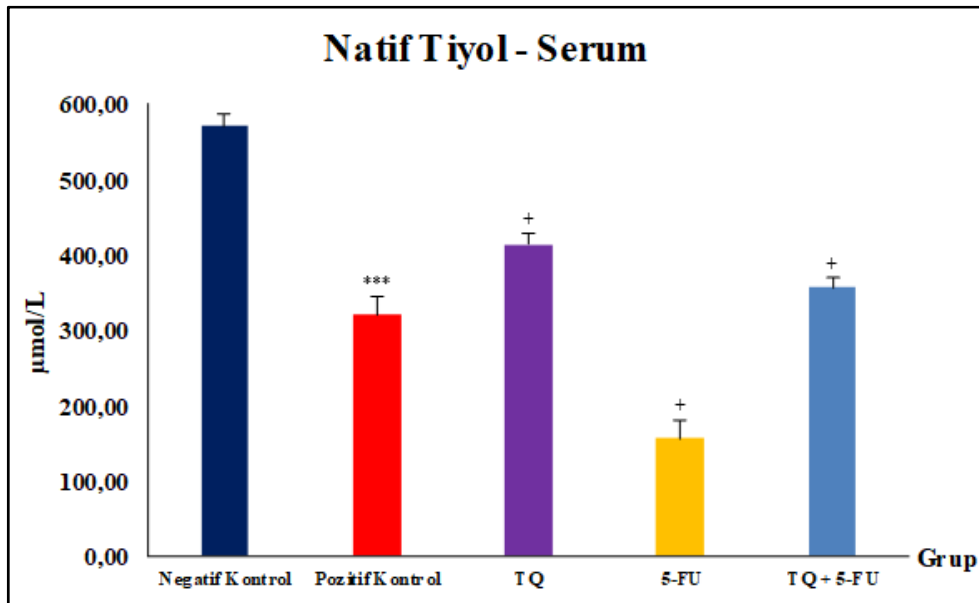
Disülfit düzeylerine bakıldığında negatif kontrole göre pozitif kontrolde ortalama %60'lık istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardır.

Tedavi gruplarında ise TQ ve kombine tedavi pozitif kontrole göre disülfit düzeylerini düşürmüştür. Bu düşüşün asıl sebebi TQ'nun sistemik etkide anti-oksidan gibi davranmasıdır. 5-FU ise disülfit oluşumunu indüklemiştir ve pozitif kontrol grubuna göre %45'lik bir artışa neden olmuştur.



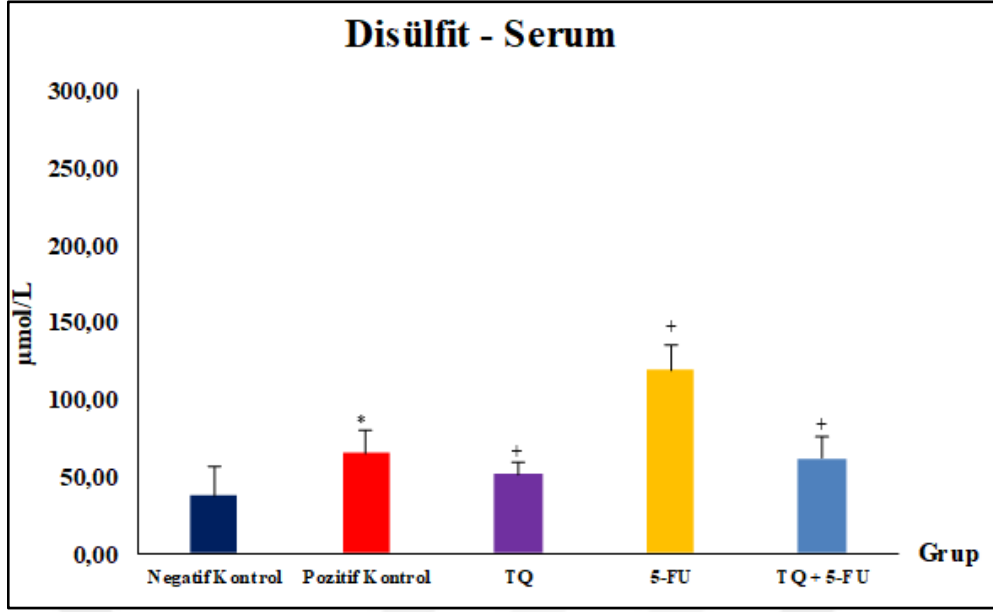
Şekil 4.49 : Serum total tiyoL düzeyi: negatif kontrol grubuna (sağlıklı) göre pozitif kontrol grubu TT istatistiksel anlamlı düşmüştür. Ayrıca pozitif kontrol grubuna göre tüm tedavi gruplarındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$



Şekil 4.50 : Serum natif tiyoL düzeyi: negatif kontrol grubuna (sağlıklı) göre pozitif kontrol grubu NT düzeyleri istatistiksel anlamlı düşmüştür. Ayrıca pozitif kontrol grubuna göre tüm tedavi gruplarındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$

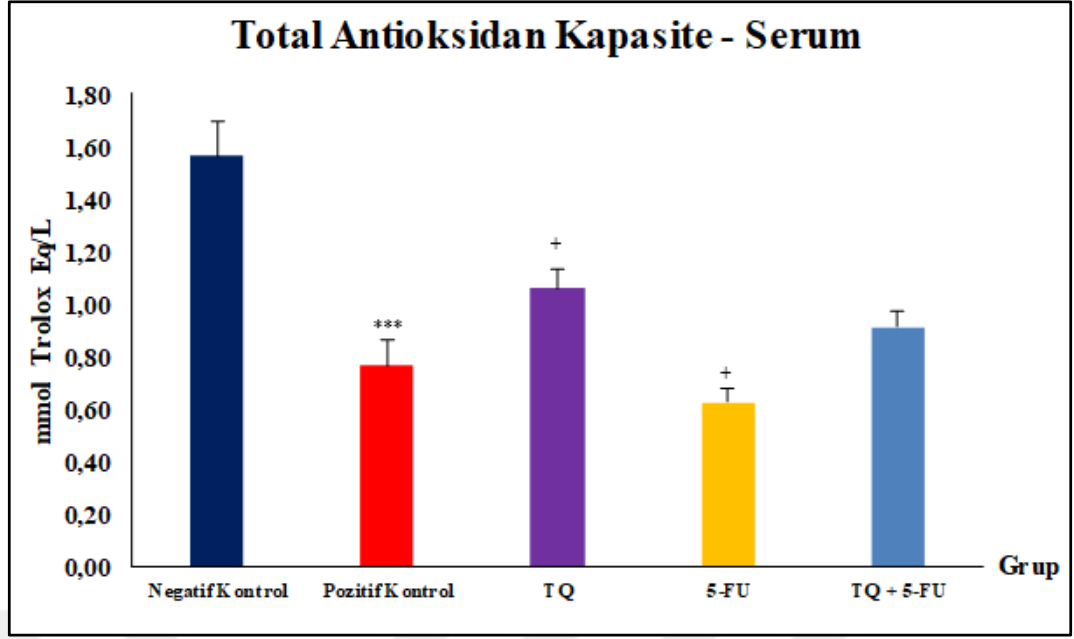


Şekil 4.51 : Serum disülfit düzeyi: negatif kontrol grubuna (sağlıklı) göre pozitif kontrol grubu DS düzeyleri istatistiksel anlamlı artmıştır. Ayrıca pozitif kontrol grubuna göre tüm tedavi gruplarındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır.

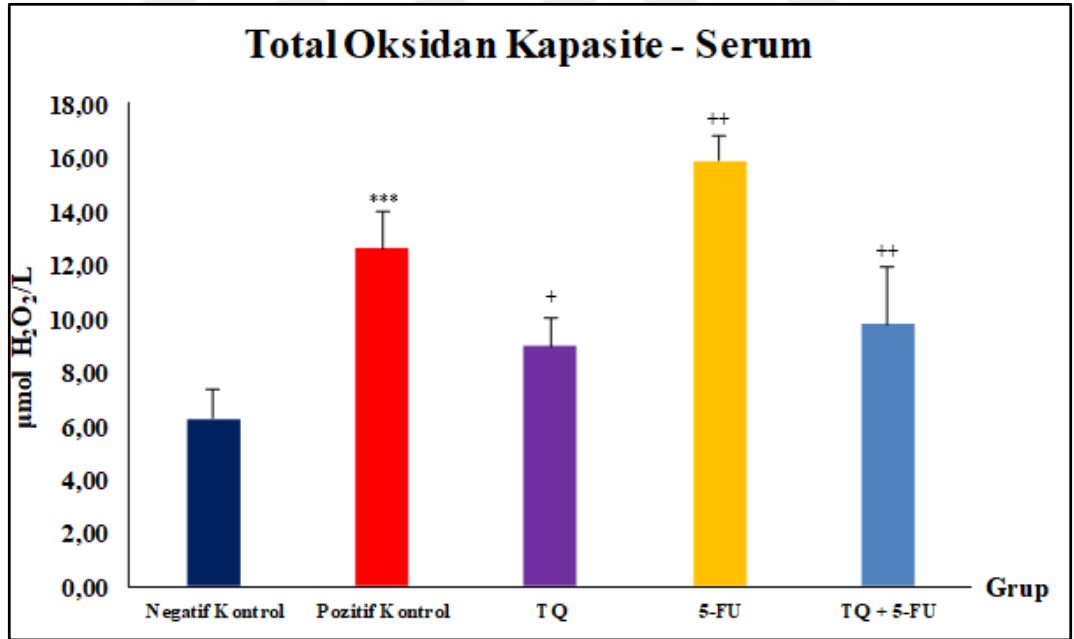
* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & † = $p < 0,05$; †† = $p < 0,01$; ††† = $p < 0,001$

Negatif kontrol grubunda TOS ve OSI düzeylerine bakıldığında pozitif kontrol grubuna göre sırasıyla 2 ile 4 kat istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Tedavi gruplarının pozitif kontrol grubuna göre değişimine bakıldığında TQ'nun sistemik etkide anti-oksidan özellik gösterdiğinden dolayı bu değerleri ortalama %25 düşürmüştür. 5-FU ise oksidatif stresi indükleyerek pozitif kontrol grubuna göre TOS'da %25, OSI'de %50 arttırmıştır.

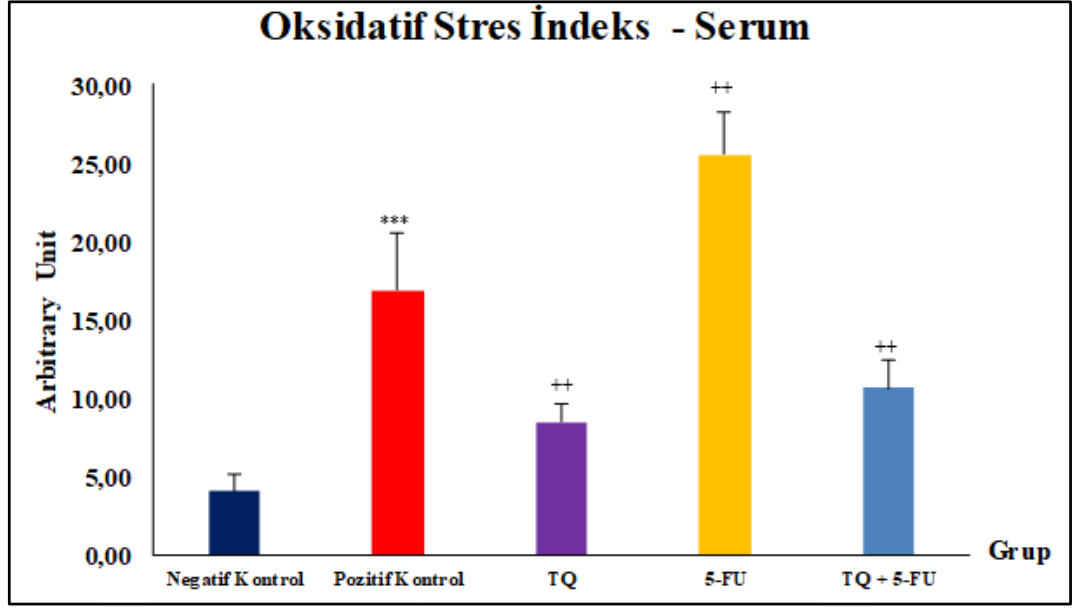
TAS düzeylerinde ise negatif kontrol grubuna göre pozitif kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı %50'lik bir düşüş vardır. Tedavi gruplarına bakıldığında da pozitif kontrol grubuna göre TQ'nun olduğu tüm gruplarda artış varken 5-FU, TAS düzeyini %15 düşürmüştür.



Şekil 4.52 : Serum total anti-oksidan seviye: negatif kontrol grubuna (sağlıklı) göre pozitif kontrol grubunda TAS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır. Ayrıca pozitif kontrol grubuna göre tüm tedavi gruplarındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır.
 * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$



Şekil 4.53 : Serum total oksidan seviye: negatif kontrol grubuna (sağlıklı) göre pozitif kontrol grubunda TOS istatistiksel anlamlı yükselmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubuna göre tüm tedavi gruplarındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır.
 * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$



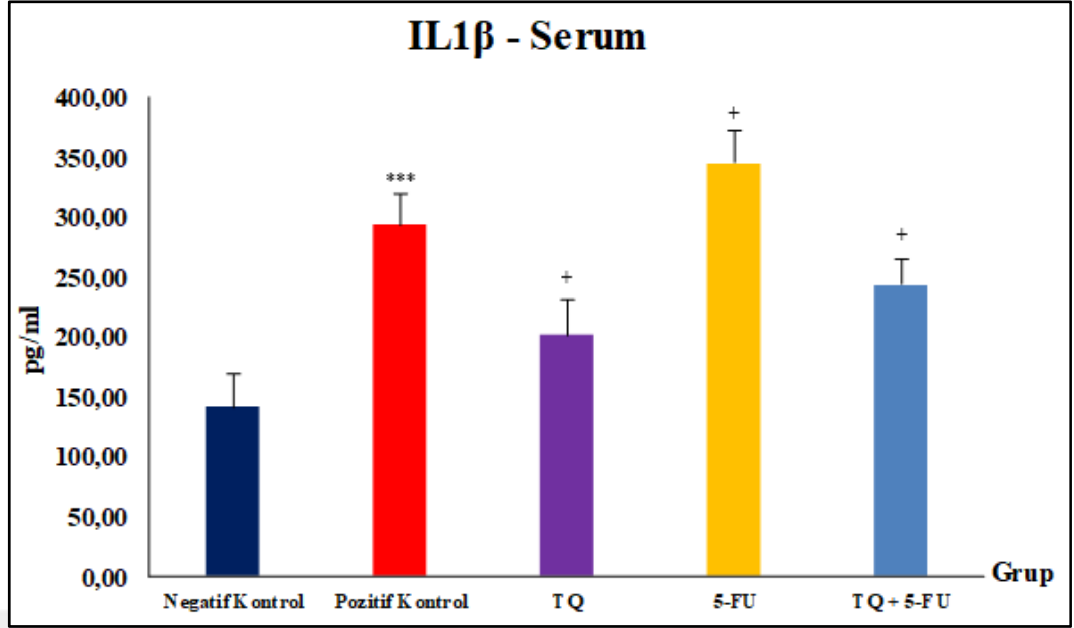
Şekil 4.54 : Serum oksidatif stres indeksi: negatif kontrol grubuna (sağlıklı) göre pozitif kontrol grubu OSI istatistiksel anlamlı yükselmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubuna göre tüm tedavi gruplarındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$

4.11 Serum Enflamasyon ve Büyüme Faktörleri Sonuçları

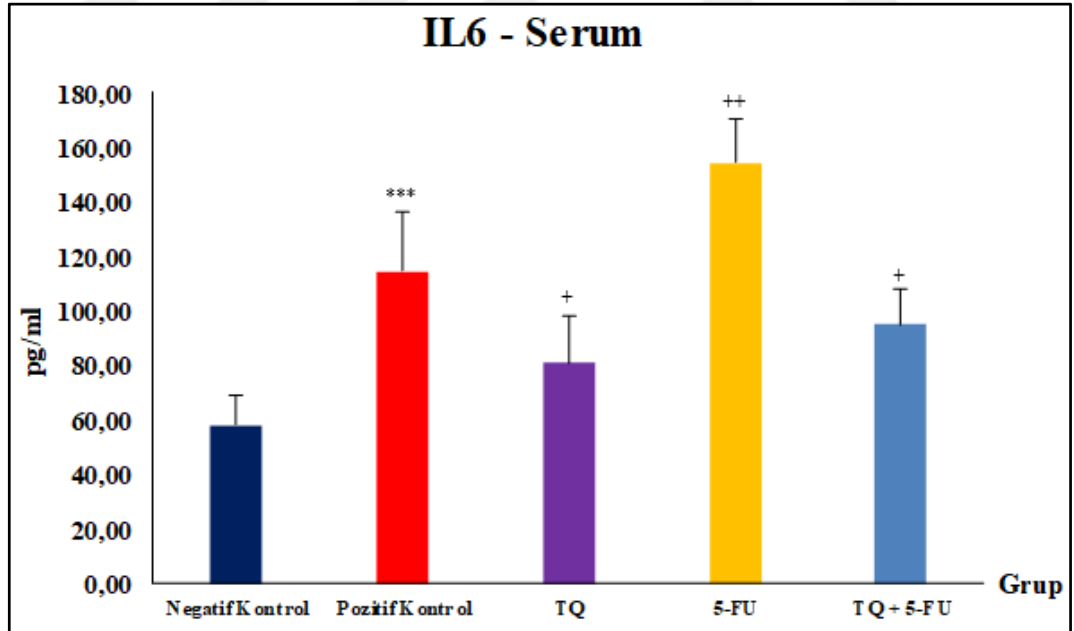
Sitokin belirteçleri ve büyüme faktörleri hayvanlardan alınan serumlarda ticari olarak alınan fare ELISA kitleri alınıp fotometrik olarak ölçüldü. Alınan verilere göre sadece negatif kontrol grubuna göre enflamasyon belirteçleri (IL1 β , IL6, TNF α ve HsCRP) ve büyüme faktörleri (VEGF ve TGF β 1) istatistiksel olarak anlamlı yüksek çıkarken, pozitif kontrol grubuna göre 5-FU ile tedavi tüm enflamatuvar sitokinleri arttırırken, TQ'nun olduğu tüm tedavi gruplarında enflamasyon TQ'nun sistemik anti-oksidan etkisinden dolayı pozitif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşmüştür (Şekil 4.55 – 4.58).

Pozitif kontrol grubundaki VEGF ve TGF β 1 gibi büyüme faktörleri negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır. Tedavide ise sırasıyla TQ, 5-FU ve kombine tedavide pozitif gruba göre istatistiksel anlamlı bir şekilde düşmüştür (Şekil 4.59 – 4.60).



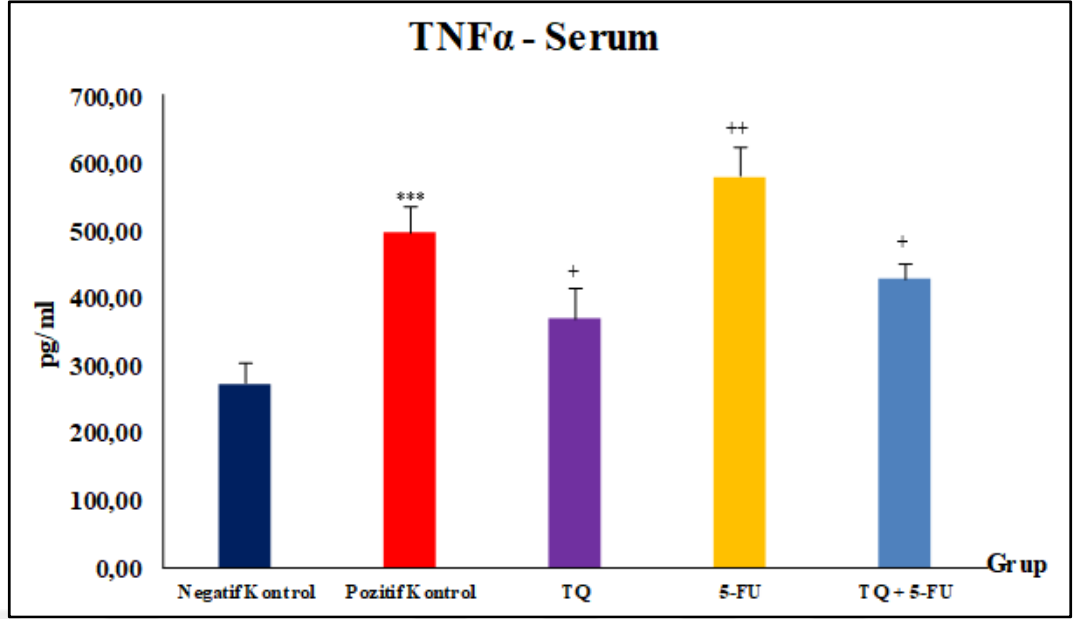
Şekil 4.55 : Serum IL1 β düzeyi: negatif kontrol grubuna göre pozitif kontrol grubunda IL1 β düzeyi istatistiksel olarak anlamlı artmıştır. Tedavi gruplarında TQ'nun bulunduğu tekli ve kombine tedavide TQ sistemik etkide anti-enflamatuvar etki gösterdiğinden enflamasyon pozitif kontrol grubuna göre anlamlı düşmüştür. 5-FU ise IL1 β salınımını istatistiksel olarak arttırmıştır.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001



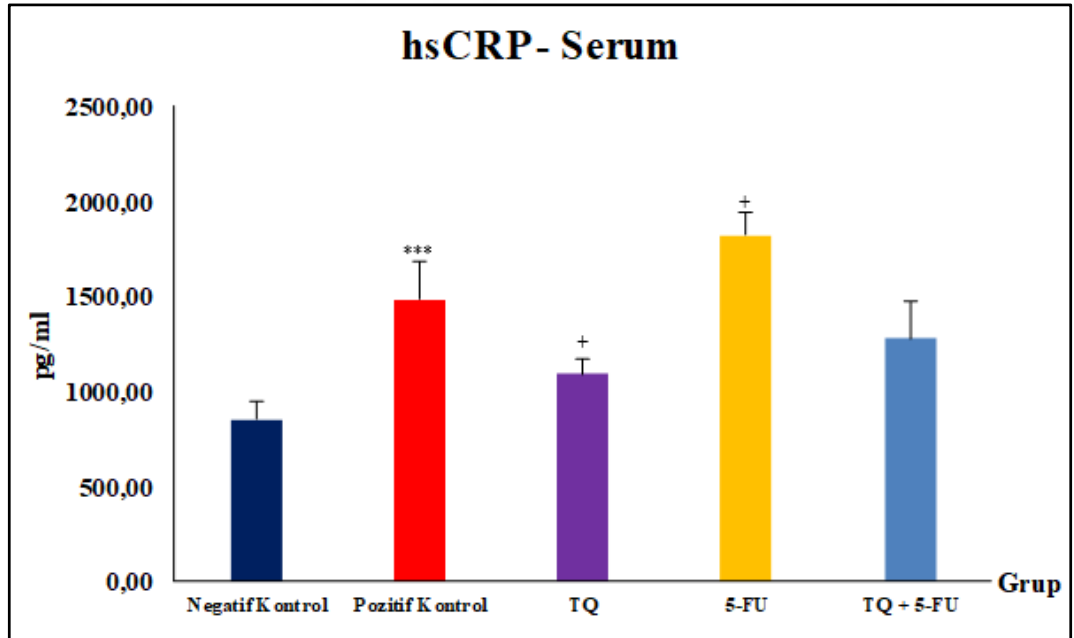
Şekil 4.56 : Serum IL6 düzeyi: negatif kontrol grubuna göre pozitif kontrol grubunda IL6 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı artmıştır. Tedavi gruplarında TQ'nun bulunduğu tekli ve kombine tedavide TQ sistemik etkide anti-enflamatuvar etki gösterdiğinden enflamasyon pozitif kontrol grubuna göre anlamlı düşmüştür. 5-FU ise IL6 salınımını istatistiksel olarak arttırmıştır.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001



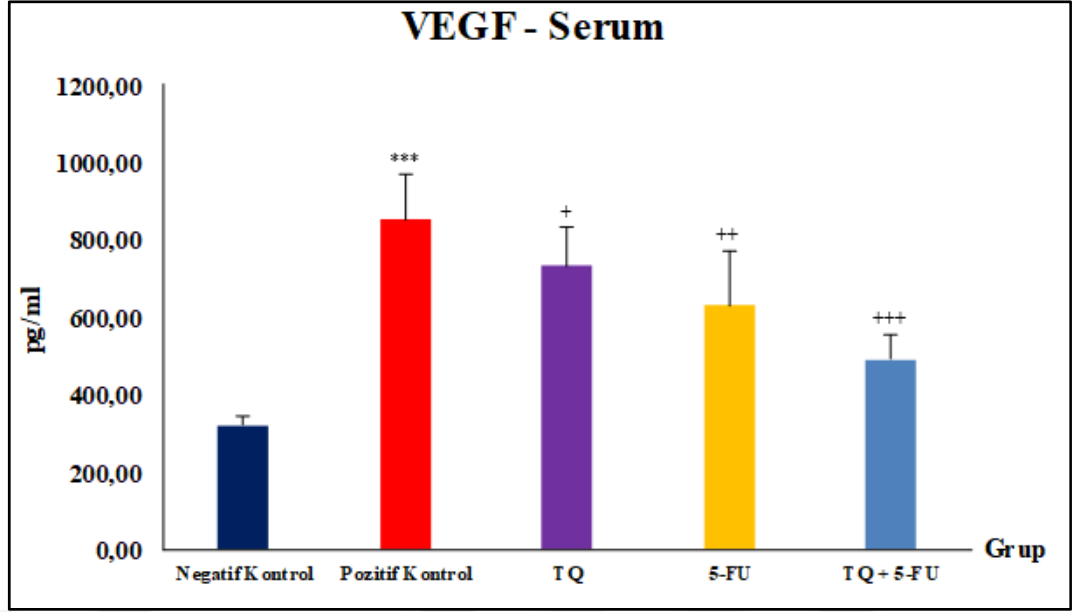
Şekil 4.57: Serum TNF α düzeyi: negatif kontrol grubuna göre pozitif kontrol grubunda TNF α düzeyi istatistiksel olarak anlamlı artmıştır. Tedavi gruplarında TQ'nun bulunduğu tekli ve kombine tedavide TQ sistemik etkide anti-enflamatuvar etki gösterdiğinden enflamasyon pozitif kontrol grubuna göre anlamlı düşmüştür. 5-FU ise TNF α salınımını istatistiksel olarak arttırmıştır.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001



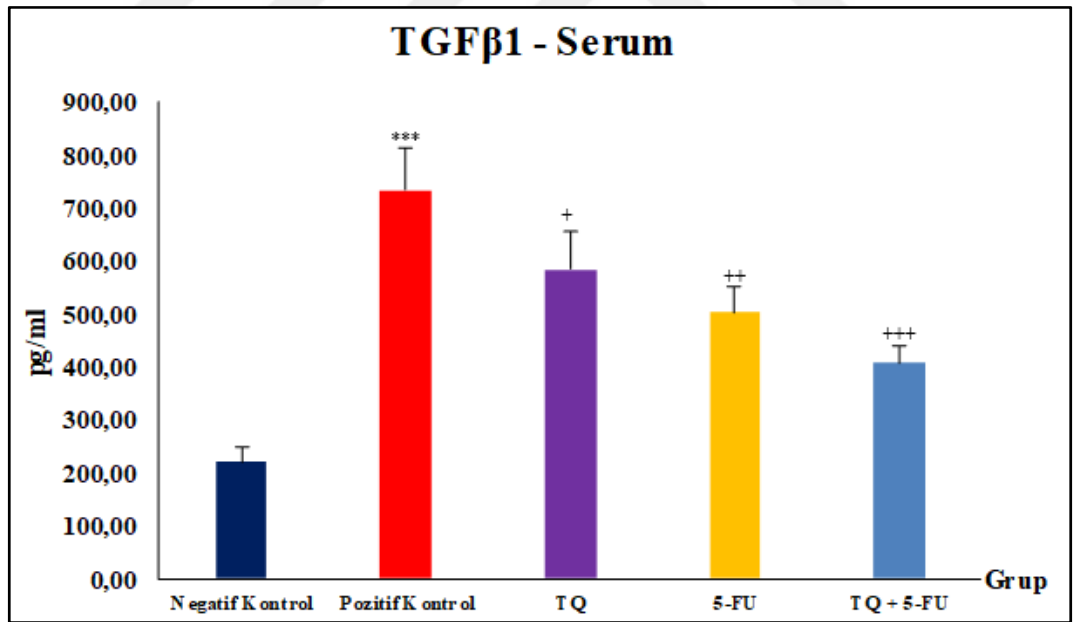
Şekil 4.58 : Serum HsCRP düzeyi: negatif kontrol grubuna göre pozitif kontrol grubunda HsCRP düzeyi istatistiksel olarak anlamlı artmıştır. Tedavi gruplarında TQ'nun bulunduğu tekli ve kombine tedavide TQ sistemik etkide anti-enflamatuvar etki gösterdiğinden enflamasyon pozitif kontrol grubuna göre anlamlı düşmüştür. 5-FU ise HsCRP salınımını istatistiksel olarak arttırmıştır.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001



Şekil 4.59 : Serum VEGF düzeyi: negatif kontrol grubuna göre pozitif kontrol grubunda VEGF düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı artmıştır. Tedavi gruplarını pozitif kontrole göre karşılaştırıldığında sırasıyla TQ, 5-FU ve kombine tedavinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde VEGF düzeyini düşürdüğü bulunmuştur.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$



Şekil 4.60 : Serum TGFβ1 düzeyi: negatif kontrol grubuna göre pozitif kontrol grubunda TGFβ1 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı artmıştır. Tedavi gruplarını pozitif kontrole göre karşılaştırıldığında sırasıyla TQ, 5-FU ve kombine tedavinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde TGFβ1 düzeyini düşürdüğü bulunmuştur.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ & + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$

4.12 Karaciğer ve Böbrek Fonksiyon Testlerinin Düzeyleri

Hayvanlardan sakrifikasyon sırasında alınan intrakardiyak kanlar jelli biyokimya tüpüne alınıp 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra böbrek fonksiyon testleri-BFT (Üre, Kreatinin, Ürik Asit, Sodyum, Potasyum, Kalsiyum, Fosfor) ile karaciğer fonksiyon testleri-KFT (AST, ALT, LDH, GGT, LDH) rutin biyokimya otoanalizörlerinde çalışıldı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 : Karaciğer ve Böbrek Fonksiyon Testleri.

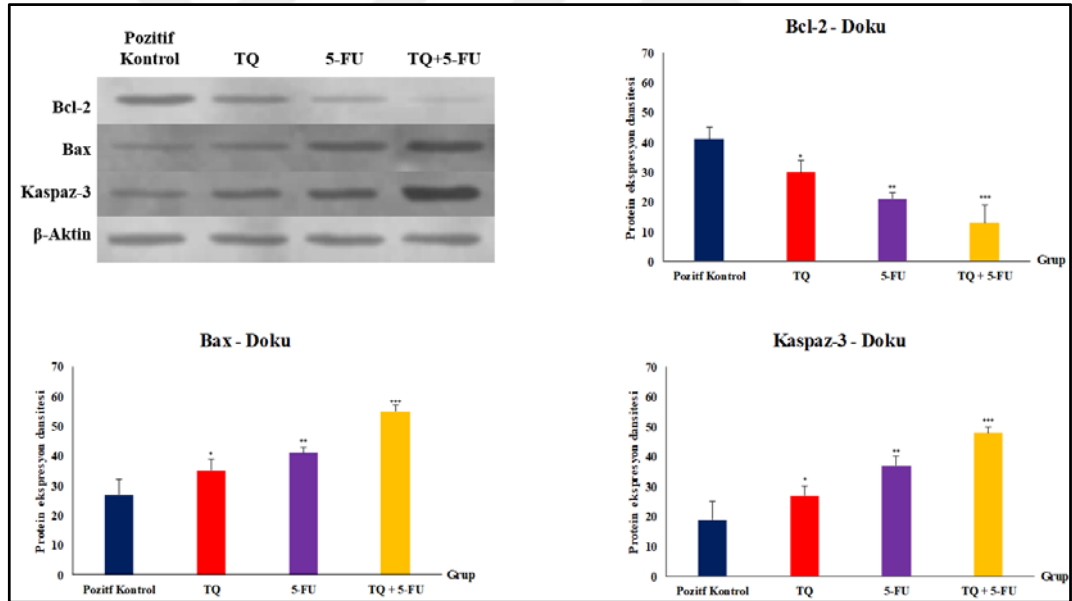
	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	TQ	5-FU	TQ + 5-FU
Üre <i>mg/dL</i>	22,33±4,71	56,83±2,85***	44,16±5,49 ⁺	83,00±7,40**	76,50±3,93 ⁺
Kreatinin <i>mg/dL</i>	0,27±0,03	0,34±0,03**	0,31±0,02 ⁺	0,49±0,07+++	0,44±0,03 ⁺
Ürik Asit <i>mg/dL</i>	1,75±0,14	3,55±0,19***	2,71±0,34 ⁺	4,25±0,19 ⁺⁺	3,49±0,31
Sodyum <i>mmol/L</i>	158,50±6,09	151,83±3,13	153,33±2,34 ⁺	135,83±3,49 ⁺	142,17±4,12 ⁺
Potasyum <i>mmol/L</i>	3,54±0,29	4,36±0,35*	4,00±0,08	4,92±0,08	4,67±0,14
Kalsiyum <i>mg/dL</i>	8,00±0,35	8,68±0,25*	8,63±0,28	8,65±0,37	8,62±0,42
Fosfor <i>mg/dL</i>	5,48±0,50	8,02±0,64***	7,12±0,36	8,95±0,31 ⁺	8,38±0,35
AST <i>U/L</i>	44,50±4,85	111,33±24,34***	84,98±9,98 ⁺	135,33±7,94 ⁺	100,50±3,15
ALT <i>U/L</i>	23,67±4,84	50,67±9,49***	33,17±7,28 ⁺	55,50±6,32	52,67±10,45
GGT <i>U/L</i>	<4	<4	<4	<4	<4
LDH <i>U/L</i>	525,50±72,77	1444,50±254,91***	1194,00±62,44 ⁺⁺	1828,33±234,30 ⁺	1591,33±95,90 ⁺

Çıkan sonuçlara göre sodyum hariç tüm fonksiyon testlerinde negatif kontrole göre pozitif kontrol düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı artmıştır. TQ ve kombine tedavi pozitif kontrole göre artan değerleri düşürürken, 5-FU pozitif kontrole göre tüm test düzeylerini istatistiksel olarak arttırmıştır (* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 & + = p<0,05; ++ = p<0,01; +++ = p<0,001).

Sodyum değerleri ise negatif gruba göre pozitif grupta düşmüş, TQ ve kombine tedavide istatistiksel anlamlı olmayan bir artış varken, 5-FU tedavisini alan grupta sodyum seviyeleri anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur. Kanserle beraber oluşan hepatotoksisite ve nefrotoksisite artar. 5-FU'nun da bu organlara karşı bilinen toksisiteleri mevcuttur. TQ'nun ise oluşan toksisitelere karşı bir koruyucu etkisi bulunduğundan TQ'nun olduğu gruplarda değerler normale daha yaklaşmıştır. KFT testlerinden GGT düzeyleri tespit limiti altında olduğundan dolayı ölçülemediği.

4.13 Doku Protein Ekspresyonlarının Düzeyleri

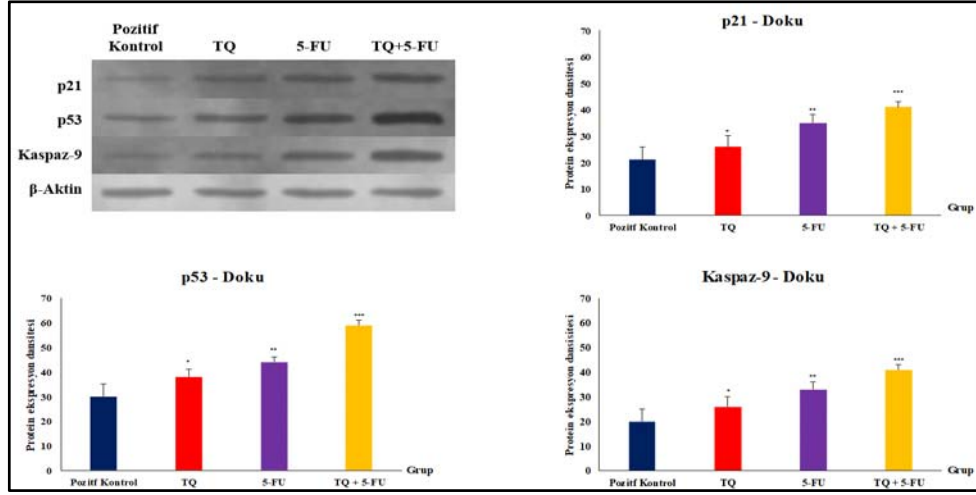
Sakrifikasyondan sonra alınan dokular homojenize edilip protein tayini yapıldıktan sonra proapoptotik (Bax), anti-apoptotik (Bcl-2), apoptotik regülatör (p53, p21, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9) proteinlerinin ekspresyonları western blot yöntemiyle çalışılıp, hesaplandı. Çıkan sonuçlar *housekeeping* protein olan β -aktinle normalize edildi (Şekil 4.61 – 4.62).



Şekil 4.61 : Tümör dokusu Bax, Bcl-2 ve kaspaz-3 protein ekspresyonları: Bcl-2 hariç tüm proteinler pozitif kontrol grubuna göre sırasıyla TQ, 5-FU ve kombine tedavide istatistiksel olarak anlamlı artmıştır.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Anti-apoptotik protein olan Bcl-2 hariç tüm proteinlerin (Bax, p53, p21, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9) ekspresyonları kontrol grubuna göre sırasıyla TQ, 5-FU ve kombine tedavide istatistiksel olarak artmıştır. Bcl-2 ekspresyonu ise sırasıyla TQ, 5-FU ve kombine tedavide istatistiksel olarak azalmıştır.

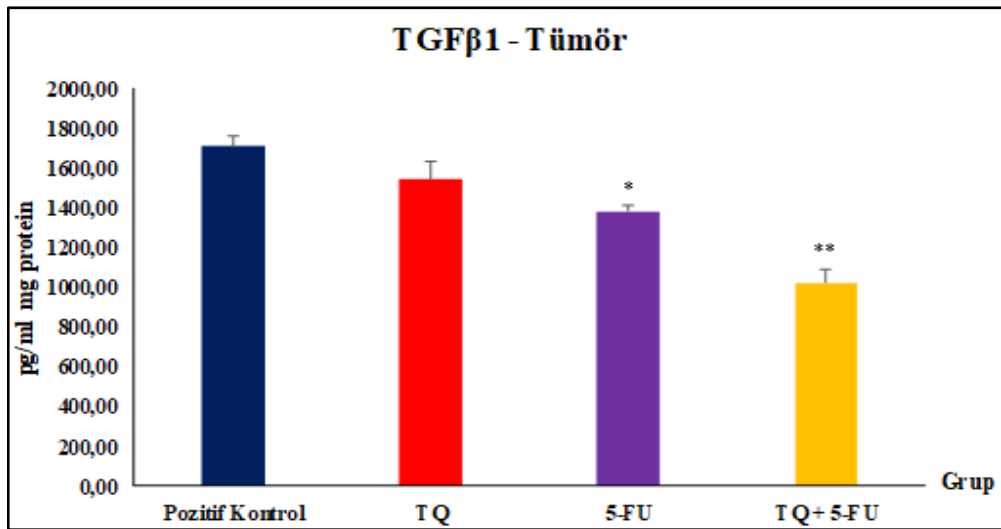


Şekil 4.62 : Tümör dokusu Kaspaz-9, p21, p53 protein ekspresyonları: Bcl-2 hariç tüm proteinler pozitif kontrol grubuna göre sırasıyla TQ, 5-FU ve kombine tedavide istatistiksel olarak anlamlı artmıştır.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

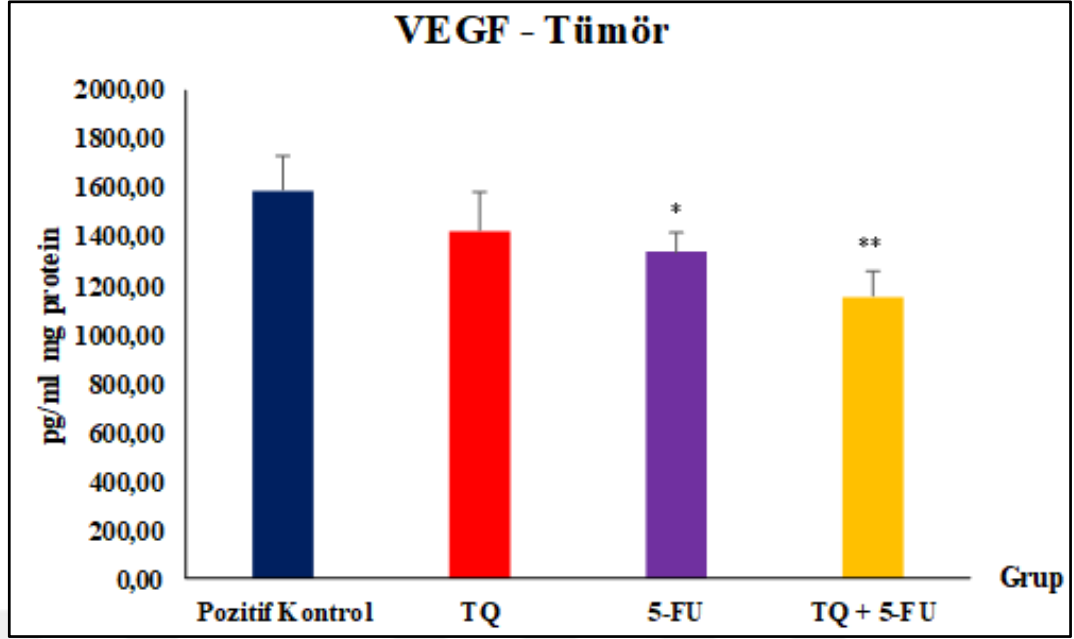
4.14 Doku TGFβ1 ve VEGF Düzeyleri

Alınan tümör dokuları homojenize edilip protein tayini yapıldıktan sonra doku büyüme faktörleri olan VEGF ve TGFβ1 düzeyleri ticari olarak satın alınan ELISA kitleri ile fotometrik olarak ölçülmüştür ve sonuçlar mg protein başına verilmiştir. Pozitif kontrol grubundaki VEGF ve TGFβ1 gibi büyüme faktörleri negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır. Tedavide ise sırasıyla TQ, 5-FU ve kombine tedavide pozitif gruba göre istatistiksel anlamlı bir şekilde düşmüştür (Şekil 4.63 – 4.64)



Şekil 4.63 : Tümör dokusu TGFβ1 düzeyi: pozitif kontrol grubuna göre tekli ve kombine tedavi TGFβ1 düzeyini istatistiksel anlamlı bir şekilde düşürmüştür.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$



Şekil 4.64 : Tümör dokusu VEGF düzeyi: pozitif kontrol grubuna göre tekli ve kombine tedavi VEGF düzeyini istatistiksel anlamlı bir şekilde düşürmüştür.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001

TQ, 5-FU ve kombine tedavinin *in vivo* kolon kanseri hayvan çalışmasında dokuda anti-tümör ve anti-apoptotik etki gösterirken, büyüme faktörlerini düşürmüştür. Serumda ise oksidatif stres, enflamasyon, büyüme faktörleri ve karaciğer ile böbrek üzerine etkileri vardır (Şekil 4.65).



Şekil 4.65 : *In vivo* genel deneysel sonuçlar.

5. TARTIŞMA

Her yıl dünya çapında 1 milyondan fazla kolorektal kanser teşhisi yapılmaktadır [241, 242] ve kolorektal kanser, özellikle yüksek insidans ve mortalite oranları ile dünyadaki yaşamı tehdit eden en yaygın malignitelerden biridir [243, 244]. Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'na göre, KK erkeklerde en sık görülen üçüncü kanser, kadınlarda ise en sık görülen ikinci ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedeni olarak kabul edilmektedir. Teşhis ve tarama araçlarını geliştirmek için harcanan yoğun çabalara rağmen, mevcut tedavi yöntemlerinin sınırlı terapötik etkinliği, KK tedavisinde en önemli zorluktur. Günümüzde klinik uygulamaları ciddi yan etkilerinden dolayı sınırlı olsa da kemoterapi rejimleri hastalar için birincil tedavi seçeneğidir [245]. Bu nedenle, tek başına veya diğer sitotoksik ajanlarla (örneğin, irinotekan, lökovorin veya oksaliptatin) kombinasyon halinde 5-fluorourasil (5-FU) bazlı terapi, standart kemoterapötik yaklaşım olarak kabul edilmektedir [246, 247]. Genel olarak bakıldığında 5-FU tekli olarak kullanıldığında %7-17 arasında, diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte kombine kullanıldığında %35-39 oranında sınırlı etkinlik göstermektedir [247, 248]. Bunun nedeni tümör hücrelerinin kazandığı terapötik dirençtir [249, 250]. Bununla birlikte, sınırlı tedavi cevabı, doz sınırlayıcı toksisite ve nüks tedavinin handikaplarıdır [246, 247, 251]. Daha da önemlisi son zamanlarda standart kombine tedaviye eklenen bevacizumab ve setuksimab gibi yeni hedeflenmiş ajanlar KK için yine beklenen etkiyi göstermemiştir [247]. Bu nedenle potansiyel doğal ürünler/maddeler ile alternatif kombine terapötik stratejilerin geliştirilmesi KK prognozunu ve iyileştirme oranını arttırmak için büyük önem taşır. 5-FU'ya karşı gelişen terapötik direncin üstesinden gelmek ve yan etkilerini azaltmak için bitki kaynaklı ilaçlarla birkaç kombinasyon stratejisi önerilmiştir [252-254]. Bu nedenle, 5 FU'nun KK tedavisindeki etkinliğini arttırmak için gelecek vaad eden bir kombinasyon stratejisinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Timokinon (TQ), iyi bilinen, sağlam ve pluripotent anti-tümör aktivitesi olan *N. sativa*'nın etken maddesi olan doğal bir biyolojik bileşiktir [255-259] ve kanser tedavisinde çekiciliğini korumaktadır [195, 255, 256, 260-264].

Çeşitli doğal ürünler ve nutrasötiklerin, geleneksel ilaçlarla adjuvan veya alternatif ilaç olarak kullanıldığında yararlı olduğu gösterilmiştir. Örneğin, *N. sativa* ve etken maddesi olan TQ'nun anti-tümör, anti-enflamatuvar, anti-romatizmal, immünomodülatör, anti-fibrotik, analjezik, anti-diyabetik, anti-oksidan, anti-mikrobiyal, anti-hipertansif ve çeşitli tıbbi bozukluklarda koruyucu özellikleri vardır. *N. sativa* birçok hastalığın tedavisinde yüzyıllardır geleneksel olarak kullanılmaktadır [265, 266].

Bir anti-kanser ajanı olarak, TQ'nun güçlü anti-tümörjenik hücrel ve moleküler etkileri, tümör hücresi proliferasyonunu, farklılaşmasını, anjiyojenezini, baskılaması, apoptozu ve nekrozu arttırması gibi etkileri vardır. TQ'nun kemopreventif ve anti-kanser özellikleri çeşitli *in vivo* ve *in vitro* insan kanser modellerinde gözlenmiştir [199, 267-272]. TQ'nun geleneksel kemoterapötik ilaçların kanser hücreleri üzerindeki kemoduyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir [267-269, 273]. Ayrıca farklı hastalıklar üzerinde yapılan bazı klinik araştırmalar, TQ'nun ümit verici güvenlik profilini göstererek, klinik açıdan yeni bir ilaç olarak geliştirilme potansiyelini ortaya koymaktadır [258, 259, 274]. TQ geleneksel kemoterapötiklerle birlikte kullanıldığında kemoterapötiklere karşı direncin potansiyel etkisini düşürdüğü gösterilmiştir [260, 266, 275].

Çalışmamızda kolon kanseri hücre hattında ve zenografik yöntem ile oluşturduğumuz kolon kanseri modelinde 5-FU'nun *in vivo* etkinliğini çörek otunun etken maddesi olan TQ ile arttırılabileceğini gösterdik. Kombine tedavi tekli tedaviye kıyasla daha yüksek anti-kanser etki gösterdi. Bu artış *in vitro* da sadece sitotoksitede değil kombine tedavide artan apoptoz, genototoksitede olduğunu, *in vivo* çalışmada ise tümör boyutunu küçülttüğünü, enflamasyonu ve vaskülerizasyonu azalttığını göstererek umut verici etkilerin var olduğunu gösterdik. Bu çalışma TQ ve 5-FU'nun tekli ve kombine etkinliğini transfekte kolon kanser hücrelerinde ve bu hücrelerin zenografikla *nude* farelere enjeksiyonu sonrası oluşturulan kolon kanseri modelinde gösterdiğinden dolayı literatürdeki ilk çalışma olması sebebiyle önem teşkil etmektedir.

Bu kombine tedavinin sitotoksitede üzerindeki etkileri araştırıldığında, çörek otunun etken maddesi olan TQ'un farklı kanser türleri üzerinde çalışılıp, sitotoksik ve pro-apoptotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [182, 209]. TQ'nun 60 μ M'ye kadar normal bağırsak hücrelerinde toksik olmadığı açıklanmıştır [182, 262]. Literatürdeki birçok çalışma TQ'yu klinikte kullanılan farklı kemoterapötik ajanlarla kombine edip

tedavi başarısını araştırmıştır [264, 276, 277]. TQ ve 5-FU ile ilk defa 2007 yılında Norwood ve arkadaşları tarafından SW-262 kolon kanseri hücresinde karşılaştırılmal olarak incelendiğinde her ikisinin de kolon kanserine karşı aynı sitotoksik potansiyele sahip olduğu ve TQ'nun konvansiyonel tedavinin etkinliğini artırdığı bildirilmiştir [191]. Bu iki maddenin kombinasyonunun kolon kanserine verildiği birkaç çalışma vardır [278, 279]. Lei ve arkadaşları yüksek doz TQ (50 μ M) ve 5-FU (75 μ g/ml)'nun kombinasyonunun apoptoza yol açtığını kanıtlamışlardır [200]. Bu çalışmada ilk kez TQ ve 5-FU'nun kombinasyonu HT29 kolorektal kanser hücresine uygunlanmış ve tekli tedavideki dozlarına göre dozları düşmüştür. Ndreškjana ve arkadaşlarının 2019'da HCT116 ve HT29 kolon kanseri hcresleri üzerinde yaptığı çalışmada TQ ve 5-FU'nun kombine tedavisinin tekli tedaviye göre daha etkili olduğu ve dozu düşürdüğü gösterilmiştir [280]. TQ'nun *in vitro* kolon kanseri ve lenfoma hcreslerinin üzerindeki etkileri araştırıldığında, hücre proliferasyonuna negatif etki gösterdiği tespit edilmiştir [281, 282]. Acar ve arkadaşlarının 2015'de bař boyun kanser hcresleri üzerine yaptığı bir başka çalışmada TQ ve 5-FU'nun kombine tedavisinin tekli tedaviye göre daha sitotoksik olduğunu ve dozların düştüğünü göstermişlerdir [283]. Bizim çalışmamız sonucunda TQ ve 5-FU'nun tekli tedavisine göre kombine tedavi daha düşük dozda daha yüksek etkili olduğu bulunmuştur. Bulgularımıza destek olarak, son zamanlarda yapılan *in vitro* alışmalar TQ'nun 5-FU'ya göre hücresel hasar konusunda daha etkili olduğu gösterilmiştir [191]. Ayrıca TQ'nun 5-FU'nun kemoterapötik etkinliğini arttırdığı bulunmuştur. TQ'nun 5-FU ile birlikte insan nazofarengeal ve gastrik adenokarsinomada potansiyel bir adjuvan olabileceği düşünülmektedir [284, 285]. Bu durumda geleneksel KK tedavisinde kullanılan 5-FU'nun yan etkileri de düşünülünce TQ ile kombine tedavisinin normale göre düşük dozda daha verimli ve sağlıklı hcreslere karşı daha az hasarlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Reaktif oksijen türleri, hücrenin normal oksijen metabolizması tarafından sürekli üretilir ve biyomolekülleri oksidatif hasara uğratarak hücreyi apoptoz ya da otofaji sürecine sokabilir [286]. ROS'un aşırı üretilmesinin kardiyovasküler hastalık, hipertansiyon, ateroskleroz, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kansere yol açabilecek patofizyolojik bir süreç olan oksidatif stres ile sonuçlandığı bildirilmiştir [287]. 5-FU'nun anti-kanser mekanizması DNA sentezini ve replikasyonunu bloke etmesine rağmen, oksidatif streste de önemli bir rol oynadığı ne sürülmüştür [247].

Hücre kültüründe yapılan önceki çalışmalar 5-FU'nun kanser hücrelerinde hücre içi ROS seviyelerini arttırdığını ortaya koymuştur [288]. Ayrıca oluşan bu oksidatif stres, 5-FU'nun toksik etkilerinin çoğunu oluşturduğu düşünülmektedir. 5-FU oksidatif stresi indüklerken süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi sitoplazmik enzimleri inhibe ettiği bildirilmiştir [289].

TQ, ROS'u indükleyerek anti-tümör rolünü yerine getirir, bunu farklı onkojenik yolları aktive ederek pro-oksidan özelliğinden dolayı gerçekleştirir. TQ'nun multipl myelom hücreleri üzerine etkisi bakıldığında ROS miktarını artırarak hücreleri apoptoza götürdüğü bulunmuştur [290, 291]. TQ'nun kanser tedavisinde rolüne baktığımızda hücre içi ROS'u artırarak mitokondriyal yoldan apoptozu indüklemeye potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir [292]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda dirençli tümörlere karşı TQ'nun pro-oksidan özelliğinden dolayı ROS'u indüklemesi kullanılmıştır [293, 294]. El Naijar ve arkadaşlarının 2010'da yaptığı çalışmada TQ'nun indüklediği ROS insan kolon kanseri hücrelerinde sitotoksiteyi ve apoptozu arttırdığı gösterilmiştir [293]. TQ'nun ROS'u artırması farklı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir [295]. TQ ve 5-FU'nun hücre içi ROS'u indüklediği ayrı ayrı birçok çalışma ve ikisinin aynı hücrede kullanıldığı çalışmaların da olmasına rağmen ROS düzeyleri ölçülmemiştir. Artan TQ ve 5-FU'nun tekli ve kombine tedavisinde hücre içi ROS miktarı artmıştır. Kombine tedavide düşük dozda daha yüksek ROS miktarına ulaşılmış ve artan ROS seviyesi ile sitotoksite arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Çalışmamız, hem bu yönüyle hem de tekli ve kombine tedavi sonrası oluşan sitotoksite, genotoksite ve apoptozun kaynağının ROS olduğunu göstermesi bakımından bir ilktir.

Kanser hücrelerinin öldürülmesinde en etkili yöntemlerden biri hücre DNA larını ileri derecede hasara uğratmaktır. Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılan anti-neoplastiklerin çoğu direk DNA'yı etkiler. DNA'da oluşan hasar tamir edilemeyecek derecede fazla ise, apoptotik sinyal yolları aktive edilerek hücrenin apoptozise gitmesi sağlanır. 5-FU bir hücrenin RNA'sına etki eder ve DNA sentezi için gerekli olan timidin trifosfatları yerine DNA'ya UTP ya da FdUTP ekleyerek timidilat sentazı (TS) inhibe ederek etkisini gösterir [296]. Ayrıca yüksek afinite ile DNA'ya bağlanarak DNA'nın yapısını ciddi ölçüde etkiler [297, 298]. TQ ise etkisini ya direk DNA üstünden ya da hücre içi ROS seviyesini artırarak sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etki göstererek yapar [299]. TQ farklı anti-neoplastiklerle kombine olarak

farklı hücrelerde etki göstermesine rağmen 5-FU ile sadece iki çalışma vardır. Bu çalışmalarda WNT, β -katenin, NF- κ B, COX-2, iNOS ve VEGF'i etkiler. DNA hasarını kemoduyarlılık yaratarak meydana getirir [200, 279]. Çalışmamızda da tekli ve kombine tedavide DNA hasarının arttığı bulunmuştur. Kombine tedavide dozlar azalırken hasarlı DNA'daki kuyruk yoğunluğu artmıştır. DNA hasarındaki birincil etkinin nedeninin artan hücre içi ROS olduğu gösterildi. Artan ROS miktarı sitotoksisteyi artırırken, DNA hasarı ve apoptozu da tetiklemektedir.

Hücre içi glutatyon (GSH) düzeyi hücreki anti-oksidan savunmada serbest radikallere karşı merkezi bir rol oynar ve mitokondri içinde aşırı hücre içi ROS üretimine karşı önemli bir savunmadır [300]. Yüksek GSH miktarı hücrel redoks potansiyeli ile mitokondriyal membran potansiyelinin hücre sağ kalımındaki rolünü de ortaya çıkarmaktadır. Bu durumdan dolayı da hem kullanılan geleneksel kemoterapide hem de alternatif bileşik/bitkisel ürünler kanser hücrelerinde mevcut GSH miktarını düşürerek duyarlılığı artırdığını gösteren birçok çalışma mevcuttur [301-303]. Azalan glutatyon miktarı ve artan ROS'un göstermiş olduğu ters sinerjik etki hücrenin sitotoksisteyini, genotoksisteyini ve apoptozunu artırır. Sonuç olarak çalışmamızda artan dozlarda GSH miktarı düşmektedir. Tekli tedaviye göre kombine tedavide düşük dozlarda yüksek GSH inhibisyonu gözükmemektedir. Literatüre bakıldığında TQ ve 5-FU kullanarak hücre içi GSH düzeyini kolon kanserinde ölçen herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Mitokondriyal metabolizma hatalı şekilde hızlı çoğalan hücrelerin metabolik talepleri için hep önemsiz görülmesine rağmen [304, 305] mitokondri, DNA hasarını ve genetik kararsızlığa neden olan ROS üretimini üstlenmiştir. Bunun nedeni 1920'lerde ortaya konan Warburg etkisi denen, kanser hücrelerinin glukoz aldıklarında oksijen varlığında yüksek miktarda laktik asit üretmesi [306] ve kanser hücrelerinin proliferasyon için öncelikli olarak glikolizi kullanmasıdır [305]. Kanser hücrelerindeki mitokondri ile ilgili bir diğer bakış açısı, ürettikleri ROS kaynaklı genetik kararsızlık mutasyonu ve tümör oluşumlarını tetiklemektedir. Sonuç olarak mitokondriyal disfonksiyon kanser hücrelerinin metabolik bir işareti olarak kabul edilmektedir. Günümüzde kanser metabolizmasındaki fikir birliği, tümör hücrelerinin makromolekül sentezi gerekli yapı taşlarının yanı sıra ATP ve NADPH'ı sağlamak için hem glikoliz hemde mitokondriyal metabolizmaya sahip olması gerekmektedir [307]. MMP, Krebs döngüsünün aktivitesiyle ilişkili redoks dönüşümlerinden

kaynaklanır ve ATP sentazın ATP'yi üretmek için kullandığı bir ara enerji depolama biçimi olarak çalışır. Bu dönüşümler yalnızca elektriksel bir potansiyel değil aynı zamanda bir proton gradienti oluşturur ve birlikte hidrojen iyonlarının transmembran potansiyelini oluştururlar [308]. Mevcut veriler ATP ve MMP tarafından yürütülen sinyal mekanizmalarının farklı olduğunu göstermektedir [309]. Sağlıklı hücrelerde hücre içi ATP ve MMP seviyeleri hücrenin metabolizma faaliyeti için belirli bir seviyede tutulur [310-312]. MMP'deki değişikliklerin uzun süreli olmasının, canlılığı tehlikeye sokup patolojik sonuçlara yol açabileceği öne sürülmektedir [313]. MMP sadece ATP üretiminde değil, MMP kaybı, membran geçirgenliğine yol açar ve pro-apoptotik proteinlerin mitokondri iç membranına geçip apoptozu indüklemesiyle sonuçlanır. TQ'nun *in vitro* çalışmalarda MMP üzerine etkisini inceleyen birçok çalışmaya rastlanılmıştır. Farklı meme kanser hücreleri üzerinde TQ, MMP düzeylerini düşürmüştür [314, 315]. Bir başka çalışmada da melanoma ve lösemi hücre hatları üzerine TQ ve Doksorubisin kombinasyonları verilip MMP düzeylerinin düştüğü bulunmuştur [316]. 5-FU'nun irinotekan ile kolon kanseri üzerine kombine tedavisinde ise MMP miktarı düşmüştür [317]. Hu ve arkadaşlarının 2015'te hepatoselüler karsinoma hücreleri üzerine 5-FU ve apigenin kombinasyonları ile yaptıkları çalışmada MMP miktarı düşmüştür [318]. Çalışmamız gibi literatürde daha önce TQ ve 5-FU kombinasyonu herhangi bir hücre hattında daha önce çalışılmamıştır. Bu tekli ve kombine tedavi hem LoVo hem de CCD18Co hücrelerinde MMP düzeylerini istatistiksel anlamlı bir şekilde düşürmüştür. Bu düşüşün ilk sonucu olarak hücrel apoptotik mekanizmaların aktive olmasıdır.

Apoptoz normal dokularda gelişimde ve homeostazda kritik rol oynayan farklı biyokimyasal ve genetik yolları olan çok sıkı programlanmış bir hücre ölümüdür [319] [1]. Apoptoz kanser tedavisinde en önemli yollardan biridir [319]. Hücrel homeostazı sağlamak için hücre ölümü ve sağ kalımı arasında gereksiz, istenmeyen ve hatalı hücreleri ortadan kaldırarak bir denge kuran apoptoz en önemli mekanizmadır [320, 321]. Günümüzde cerrahi ve immünoterapi hariç rutin kanser tedavisi için kullanılan anti-neoplastiklerin kanser hücresinde apoptozu uyarmasını hedeflenmiştir. Bu nedenle, tüm kanser ilacı tasarımcıları, kanser hücrelerindeki etkisizleştirilmiş apoptotik mekanizmayı aktive etmeye ya da kusurlu olanı düzeltmeye çalışır. Şu anda klinik kullanımda olan tüm sitotoksik anti-kanser tedavileri, malign hücrelerin apoptozunu indüklemektedir. TQ kanser ilişkisi ile ilgili ilk çalışmalar anti-oksidan

özelliğinden dolayı kemopreventif aktivitesi ağırlıktayken, son zamanlarda kanser hücreleri üzerine oksidatif hasar vererek apoptozu indüklediği bildirilmiştir [295, 322-327]. TQ ile ilgili ilginç bir çalışma da kanser hücrelerinde pro-apoptotik proteinleri, sağlıklı hücrelerde de anti-apoptotik proteinleri indüklediği bildirilmiştir [328]. En önemli hipotez ise TQ'nun düşük dozlarda anti-oksidan, yüksek dozlarda pro-oksidan etki göstererek kanser tedavisinde önemli sonuçlar çıkarmıştır [329]. 5-FU'nun diğer kemoterapötik ajanlar gibi çeşitli tümör hücreleri üzerinde apoptozu tetiklediğini gösteren birçok çalışma vardır [330-335]. Çalışmamızdaki sonuçlarımıza baktığımızda literatürdeki diğer çalışmalar gibi hem akridin turuncusu/etidyum bromür boyasıyla floresans mikroskopta bakılan, hem de *annexin V-FITC* boyasıyla akış sitometrisinde yapılan ölçüm doğrultusunda apoptoz oranları artmaktadır. Kombine tedavi grubu tekli tedavilere göre hücreleri daha çok apoptoza götürmektedir.

Apoptozdan kaçma kanserin işaretlerinden biridir [336]. Tümör hücreleri iki biyokimyasal apoptotik sinyal mekanizmasını atlar [337]. İntrinsik ya da mitokondri aracılı apoptoz yolu, mitokondriyal zarın depolarizasyonu, sitokrom c salınımı ve sırasıyla kaspaz-9, kaspaz-7 ve kaspaz-3'ün aktivasyonu ile poli-(ADP-riboz) polimerazın (PARP) ayrılmasını içerir. Ekstrinsik yol ise hücre zarına bağlı ölüm reseptörlerinin aktivasyonuna aracılık eder. Ardından pro-kaspaz 8 aktivasyonu ve ardından kaspaz-3 aktivitesini tetikleyerek hücre ölümünü gerçekleştirir [337, 338]. İntrinsik apoptoz indüksiyon mekanizmasına göre, MMP büyük ölçüde farklı B hücre lenfoma (Bcl) ailesi proteinleri tarafından regüle edilir. Bcl-2 anti-apoptotik proteininin lokalizasyonu, MMP homeostazını sağlarken, Bcl-2 downregülasyonu, pro-apoptotik Bax proteinin mitokondriye lokalizasyonu MMP'nin depolarizasyonunu sağlayarak sitokrom C salınmasına neden olur. Bu da kaspaz kaskadının aktivasyonuna neden olarak hücre ölümünü tetikler [181, 337, 338]. DNA hasarına bağlı gelişen apoptozda p21 proteini ve p53 proteini kritik bir rol oynamaktadır. Hücresel ya da DNA'da bir hasar meydana geldiğinde p53 proteini transkripsiyon faktörü gibi davranarak DNA'ya bağlanarak p21 proteinin sentezlenmesi için geni uyarır [339]. p21 proteini doğrudan p53 tarafından stimüle edilmektedir [340, 341]. Eğer DNA'da hasar var ve hücre döngüsü kontrol noktalarında bu durum tespit edilirse p21 proteini döngünün G0/G1 fazındaki siklin bağımlı kinazları inhibe ederek döngüyü G1 fazında durdurur [342]. Bu süreçte tamir mekanizması aktifleşir. Eğer

hücre tamir edilemezse mitoz durmasına rağmen anormal DNA sentezlenir. Bu oluşan anormal DNA hücre ölümüne yol açar [343-346]. Ayrıca düzeltilemeyen hasar p53 proteininin hücreyi apoptoza yönlendirmesine neden olur [347]. TQ'nun çok çeşitli insan kanser hücreleri üzerinde sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerinin olduğunu gösteren birçok çalışma vardır [261]. Kanser hücrelerinde aktif bir hücre içi ROS üretimine neden olan TQ, bu ROS kaynaklı DNA'ya hasar vererek, hücre büyümesini inhibe eder, aynı zamanda hücre döngüsünü durdurup, hücrelerin apoptoza gitmesine neden olur [193, 262, 263, 295, 348-350]. El Najjar ve arkadaşlarının 2010'da intestinal hücreler üzerine TQ'nun etkisine baktıklarında TQ'un kanser hücrelerini inhibe edip, hücrelerin apoptoza gitmesini indüklediğini göstermişlerdir [182]. TQ'nun p53 bağımlı [262] ve p53 bağımsız [193, 348] yolların etkileri literatürde kanıtlanmıştır. Gali-Muhtasib ve arkadaşlarının 2004'te yaptıkları çalışmada HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde TQ inkübasyonu sonucunda anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonu düşerken p53 proteinlerinin ekspresyonu artmıştır [348]. Roepke'nin 2007'de yaptığı MG-63 osteosarkom hücrelerinde TQ'nun anti-kanser etkisi Bax/Bcl-2 oranını değiştirmiş ve kaspaz aktivasyonu yapmıştır [295]. El-Mahdy ve arkadaşlarının 2005'te yaptığı çalışmada HL-60 lösemi hücrelerinde de TQ'nun kaspaz-3 ile kaspaz-9 ve Bax ekspresyonlarını arttırırken, Bcl-2 ekspresyonlarını düşürmüştür. TQ'nun meme kanseri üzerine doksorubisin ile kombine etkisine bakıldığında p53 ve p21 protein ekspresyonlarını arttırdığı gözlemlenmiştir [315]. Meme kanseri hücre hatları üzerinde yapılan bir başka çalışmada TQ sitotoksitesiyi, apoptozu indüklerken, Bax regülasyonunu arttırıp Bcl-2 proteinlerinin regülasyonunu azalttığı bildirilmiştir [351, 352]. TQ'nun anti-apoptotik protein olan Bcl-2'nin ekspresyonuna negatif etki gösterdiği bilinmektedir [294]. 5-FU'nun apoptoza etkisi bakıldığında p53 ve kaspazların aktivasyonu ile hem intrinsik hem de ekstrinsik yoldan tetiklenir [353]. İntrinsik yolda Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriyal membran geçirgenliğini modüle eder ve sitokrom c salınımına yol açar. Böylelikle sırasıyla kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktive olup apoptoz başlar. 5-FU'nun ekstrinsik yola etkisinde kaspaz-8 ve kaspaz-3'ü aktive eden hücre zarı üzerinden ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile sağlanır [353].

Yaptığımız çalışmamızda *in vitro*'da artan TQ, 5-FU ve artan kombine tedavi dozlarında literatürle uyumlu bir şekilde anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonları düşmüştür. Apoptotik proteinlerden olan p21, p53, kaspaz-3, kaspaz-9

ve Bax'ın tüm gruplarda artan dozla ekspresyonlarının arttığı bulunmuştur. *In vivo*'da ise rezeke tümörlerin homojenize edilip aynı apoptotik biyobelirteçlere baktığımızda tekli ve kombine tedavilerin anti-apoptotik mekanizmayı bastırırken, pro-apoptotik mekanizmayı aktive ettiği görülmüştür. Her bir gruptaki hayvandan rezeke edilen tümörler, homojenize edilip, grup havuzuna alınarak tüm gruplar aynı anda değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak kombine tedavi anti-apoptotik protein olan Bcl-2'yi en iyi inhibe ederken, en az etkiyi TQ göstermiştir. Pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonlarını da yine kombine tedavi en iyi yükseltirken TQ' en az etkileyen gruptur. *In vivo* çalışmada ise rezeke edilen tümörler homojenize edilip, doku havuzuna alındıktan sonra anti-apoptotik protein olan Bcl-2 harici diğer tüm proteinler tedavilerle birlikte anlamlı artış göstermektedir. Kombine tedavinin tekli tedavilere göre apoptoz mekanizması üstündeki etkisi daha yüksektir.

Tümör büyümesi, tümör hücreleri tarafından üretilen çeşitli sinyallerle tetiklenen mekanizmalara bağlıdır [354]. Tümör anjiyojenezi, tümör gelişiminde ve yayılımında önemli bir rol oynar [355]. Anjiyojenez, çeşitli kanser türlerinde rol oynayan karmaşık bir süreçtir [356-361]. Tümör hücreleri anjiyojenez sürecinde kimyasal stimülasyonu başlatan vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), nörofilin ve integrinler gibi çeşitli anjiyojenik proteinleri ve büyüme faktörlerini içerir [362]. Bir sinyal proteini olan VEGF, vasküler geçirgenlik faktörü olarak bilinir. Normal ve anormal anjiyojenezin ana düzenleyicisi olarak görev yapar. TGF- β 1, hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve hücre dışı matris restorasyonu dâhil olmak üzere çeşitli hücre fonksiyonlarından sorumludur [363]. TGF- β 1, TGF- β süper ailesinin bir polipeptididir [363]. Kanser hücrelerinde majör doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf II ekspresyonunu bloke ederek ve tümör infiltre eden lenfositleri (TIL) ve doğal öldürücü (NK) hücreleri devre dışı bırakarak bağışıklık sistemi üzerinde önemli bir önleyici etkiye sahiptir [364]. VEGF ve TGF- β 1'in endotel hücreleri üzerinde etkileri vardır. TGF- β 1 ve VEGF apoptozu inhibe eder [365]. TQ, EGF, FGF, VEGF, TGF- β 1 ve çeşitli metastatik, anjiyojenik ve pro-mitojenik faktörler tarafından kontrol edilen tüm tümörjenik sinyallemeği zayıflatır [366]. TQ, tümör anjiyojenezini inhibe eder [291] ve anjiyojenezin önemli yollarını inhibe ederek aktivasyonu baskılar. Yapılan bir çalışmada anjiyojenezde önemli bir yeri olan endotel hücre göçünü HUVEC hücrelerinde TQ'un inhibe ettiği gösterilmiştir [207]. TQ'nun osteosarkom üzerindeki

NF- κ B yolu ile anti-tümör ve anti-anjiyojenez etkilerini gösterilmiştir [367]. 5-FU kanser tedavisinde anjiyojenezi inhibe etmektedir. Düşük ve sürekli dozda 5-FU tedavisi anjiyojenez baskılayıcı ve anti-tümör etki göstermektedir [368-370]. Kemoterapide anti-anjiyojenik endotel hücrelerindeki stabil mikrodamarları hedef alır [371]. Çalışmamızda TQ, 5-FU ve kombine tedaviden sonra hayvanlardan alınan kandan ve rezeke edilen tümör homojenatından VEGF ve TGF- β 1 düzeylerine baktık. Sağlıklı negatif kontrol grubuna göre tümör gelişen pozitif kontrol grubunda bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı arttığını gösterdik. Tedavilerle birlikte VEGF ve TGF- β 1 düzeyleri anlamlı bir şekilde düştüğü, kombine tedavinin tekli tedavilere göre daha etkili olduğu gösterildi.

Genel olarak çalışmamızın *in vitro* kısmını incelediğimizde literatürler ve sonuçlarımız ışığında TQ ve 5-FU'nun kombine tedavisi kolon kanseri üzerinde canlılığı azaltırken hücre içi ROS düzeyleri arttırıp mitokondriyal hasar sonucunda glutasyon düzeyini ve mitokondriyal membran potansiyelini bozarak anti-apoptotik mekanizmaları down-regüle edip, pro-apoptotik mekanizmaları indükleyerek hücrelerin apoptoza gitmesine neden oldu. Ayrıca artan ROS düzeyleri DNA'ya hasar verdi. Tekli ve kombine tedavi kanser hücrelerinin anjiyojenezi ve proliferasyonunda önemli rol oynayan VEGF ve TGF- β 1 ekspresyonlarını istatistiksel anlamlı bir şekilde düşürdü.

In vitro ve *in vivo* hayvan modelleri, kanser araştırmalarında, gelişen kanserojenlerin tanımlanmasında, kanser terapilerinin gelişmesinde, ilaç taramasında ve tümör büyümesinin ve metastazın moleküler mekanizmaları hakkında fikir verilmesine olanak sağlayan önemli araçlardır. Metastatik süreçte kanser hücreleri stroma, kan damar endoteli, vasküler sistem ve dokular gibi mikro çevrelerden geçerek yayılım gösterirler [372-374]. Metastaz ve hücre proliferasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için kanser hücresinin mikroçevre ile etkileşim içinde olması gerekmektedir [375]. Deneysel kanser modellerinde *in vitro* kanser modelleri üzerinde birçok sinyal mekanizması olmasına rağmen tümör mikroçevresi bakımından sınırlı olduğundan dolayı tüm sonuçlar hep eksik kalmıştır. *In vivo* kanser modelleri tümörlerin mikro çevresini sağladığından dolayı *in vitro* modellere göre daha avantajlı ve daha gerçekçidirler. Bir kimyasalla indüklenerek *in vivo* model yerine ticari satın alınan hücre hatlarının zenograftı ile oluşturulan *in vivo* modellerde anti-kanser çalışmaları literatürde en sık karşılaşılan çalışmalardır. Zenograft yapılan insan kanser

hücrelerinin reddini önlemek için genelde atimik *nude* fareler (Balb/c, CD-1, Nu/Nu) timustan yoksun, immün sistemi baskılanmış hayvanlar kullanılmaktadır [376, 377]. Zenograft modellerin bir avantajı da hayvana enjekte edilen hücrelerin gelişmiş kanser ve metastazdan indüklendiğidir. Dezavatanji ise tümör içi heterojeniteyi tam anlamıyla göstermemekle birlikte oluşturulan modelde tümörün progresyonu ve büyümesi immün defektli hayvanda meydana gelmektedir [378, 379]. *In vivo* kanser çalışmalarına bakıldığında kimyasal ya da zenograft ile oluşturulan tümörlerde yapılan tedaviler eğer subkutan değilse tedavi süresi bitiminde ya da hayvanlarda meydana gelen değişikliklerden dolayı hayvan sakrifiye edilip, gerekli olan kan ve doku örnekleri alınarak çalışmalar tamamlanır. *In vivo* görüntüleme sisteminde ise luminesans ya da floresans ışına yapabilen hücrelerin zenograft ile *nude* farelere enjeksiyonundan sonra oluşturulan kanser modelinde tedavi başarısı ya da başarısızlığı hayvanları sakrifiye etmeden belirli aralıklarla görüntülenebileceğinden dolayı hem çalışma için gereksiz malzeme ve zaman kaybını önlemekte, hem de tümörün seyri sık aralıklarla incelenebildiğinden, bu yöntem her yönüyle çok daha değerlidir.

Moleküler görüntüleme, nispeten yeni ancak hızlı gelişen bir araştırma alanıdır. Pratik moleküler görüntüleme, araştırmacıların moleküler düzeyde canlı deneklerde hastalıkları invazif olmayan şekilde incelemelerine olanak sağlar [380-383]. Yapılan birçok araştırma moleküler görüntüleme tekniklerinin kişiselleştirilmiş tıp çağında merkezi bir rol oynayacağını göstermiştir. Deney hayvanlarında ve hastalardaki hastalıkların fonksiyonel ve anatomik bilgisini sağlayan çeşitli görüntüleme yöntemleri geliştirilmiştir. Bu tür yöntemler arasında pozitron emisyon tomografisi (PET), tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (SPECT), *in vivo* optik görüntüleme (IV-OI, bioluminesans ve floresans), manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ultrason (US) ve bilgisayarlı tomografi (CT)'dir [380, 381]. Özellikle kanser çalışmalarında moleküler optik görüntüleme hızla popülerlik kazanmaktadır. Görüntüleme cihazı pahalı olmasına rağmen yöntem ucuz ve cihazın kullanımı ve sonuçların yorumlanması kolaydır. Optik görüntüleme cihazında artmış doku penetrasyonunu bioluminesans ve biyofloresans problemlerden yayılan düşük enerjili yayılımı ölçen kameralarla tespit eder [380, 384].

Çalışmamızda subkutan bölgede oluşturulan kolon kanser modelinde 21 günlük tedavi sonrası tümör boyutları kumpas ve IVIS ile ölçülmüştür. TQ'nun bilinen anti-tümör aktivitesi ile ilgili birçok çalışma vardır [259, 264, 271]. TQ'nun meme [385], akciğer

[386], multipl miyelom [387], glioblastoma [388, 389], pankreas [390], servikal [391], kolon [392], skuamöz [393], hepatoselüler karsinoma [394], akut lenfoblastik lösemi [294], osteosarkom [367], nöroblastom [395], mesane [396], gastrik [285], yumurtalık [276] ve prostat [397] kanseri olmak üzere çeşitli kanser türleri üzerinde anti-tümör etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. Woo ve arkadaşları 2012’de yaptıkları zenograft fare meme kanseri modelinde TQ’nun tümörü küçülttüğünü gösteren birçok çalışma yapılmıştır [398-400]. Hsu ve arkadaşları 2017’de kolon kanseri modelinde TQ’nun etkisini incelemiş ve tümör boyutlarını düşürdüğü bulunmuştur. Gali-Muhtasib’in 2008’de yaptığı çalışmada farede oluşturulan kolon kanseri modelinde TQ tümör boyutlarını düşürmüştür [188]. Jafri ve arkadaşlarının 2010’da *in vitro* ve *in vivo* akciğer kanseri üzerine yaptıkları TQ ve cisplatin’le yaptıkları çalışmada tedavi ile tümör boyutları küçülmüştür ve tümör görüntüleme IVIS ile yapılmıştır [277]. Banarjee ve arkadaşları tarafından 2009’da gentamisin, oksaplatin ve TQ ile pankreas kanser modelinde tümör boyutlarının tedavi ile düştüğü bulunmuştur [260]. 2008’de hem *in vitro* hem de *in vivo* prostat kanser modelinde TQ’un anjiyojenezi inhibe ettiği bulunmuş ve zenograft fare modelinde hiç kemotoksik etki göstermeden tümör büyümesini önleyip, tümörü küçültmüştür [401]. Shim ve arkadaşlarının 2017’de *nude* farelerde *in vivo* pankreas kanseri modelinde 5-FU’nun etkisine IVIS ile baktığı çalışmada 5-FU ile tedavinin tümör büyüklüğünü düşürdüğü bulunmuştur [402]. Lei ve arkadaşlarının 2012’de TQ ve 5-FU ile gastrik kansere karşı yaptığı hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmada kombine tedavinin tekli tedaviye göre daha etkili olduğu ve tümör boyutunu düşürdüğü gösterilmiştir [285]. İvankoviç ve arkadaşlarının 2006’da TQ’nun skuamöz hücre karsinomuna karşı *in vivo* çalışmada anti-tümör etkiyi göstermişlerdir [403]. Xu ve arkadaşları 2014’te kolonajiyokarsinoma *in vivo* modelde TQ tümör boyutlarını düşürdüğünü bulmuştur [404]. Gastrik kansere TQ etkisini gösteren bir başka *in vivo* çalışmada TQ tümör boyutunu düşürmüştür [405]. Attoub ve arkadaşları 2012 akciğer kanseri modelinde TQ’nun etkisinin %39 tümör boyutunu düşürdüğünü bulmuşlardır [268]. Kolon kanseri tedavisinde literatürde TQ ve 5-FU ile tekli birçok *in vivo* çalışma olmasına rağmen ikisinin kombinesinin etkisini zenograft *in vivo* modelde deneyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Kombine tedavi sadece gastrik kanserde [285] ve kimyasalla indüklenmiş kolorektal kanserde [279] çalışılmıştır. Literatür verilerini göz önüne alıp çalışmamızı değerlendirdiğimizde hem tekli tedavi hem de kombine tedavinin tümör boyutunu düşürdüğü gösterdik.

Rutin tedavide kullanılan 5-FU ve bitkisel etken madde olan TQ ile sinerjik etki ile tekli tedavilere göre daha yüksek anti-kanser etki göstermiştir. Çalışmamızda hem tümör boyutunu IVIS ve kumpasla ölçerek çift kontrol hemde *in vivo* kolon kanserini zenograft ile oluşturduğumuzdan dolayı literatüre yeni bir bakış açısı ve daha anlamlı sonuçlar kazandırdık.

Kanser tedavisinde rutin olarak kullanılan 5-FU'nun dokular üstünde bilinen nekrozu, apoptozu ve enflamasyonu gibi birçok toksisitesi vardır [406, 407]. TQ'nun anti-oksidan, anti-enflamatuvar, anti-toksik etkisi bilinsede hayvanlara verildiği ajanlarla beraber hücre ve dokulara toksisitede yaratabilmektedir [408]. Aynı zamanda TQ'nun etkisine baktığında kanser dokusunda enflamasyonu tetiklemektedir [409, 410]. TQ'nun enflamatuvar kaskada etkisi, kanser tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmektedir [260]. Çalışmamızda tedavi sonunda rezeke edilen tümör dokularından semi kantitatif olarak nekroz ve enflamasyon değerlendirildi. Tekli tedaviye göre kombine tedavi tümör boyutunu küçültürken, tümör dokusunda nekroz ve enflamasyonu arttırmıştır.

Diğer kanserlerde de olduğu gibi, VEGF ve diğer merkezi anjiyojenik ve tümör vaskülerizasyonunu kolaylaştırıcıların aracılık ettiği anjiyojenez KK'nın ilerlemesi ve metastazında önemli bir role sahiptir [411]. VEGF'in KK tedavisinde baskılanması potansiyel bir strateji olabilir. Verilerimizde de TQ ve 5-FU'nun hem tekli hemde kombine tedavisinde VEGF miktarları düşmektedir. Önceki çalışmalarda göstermektedir ki TQ'daki anti-kanser ve anti-enflamatuvar aktiviteler VEGF gibi tümör anjiyojenezinde etkin rol oynayan yolları baskılamıştır [258, 259, 412]. TQ'nun tümör dokusu üzerine anti-anjiyojenik etkisi vardır [401]. 5-FU tümör dokularında damar yoğunluğunu düşürdüğü de bildirilmiştir [413-415]. *In vivo* bir deneysel çalışmada TQ ile tedavi edilen grupta serum VEGF seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, bu sonuç TQ'nun VEGF üretimlerini baskılama potansiyeline veya yeteneğine sahip olduğunu ve anti-tümör anjiyojenezle tümör büyümesini önlediğini göstermektedir [416].

TGF- β 1 çeşitli hücre fonksiyonlarda rol alan pleiotropik sitokindir. TGF- β 1 sinyal yolunun disfonksiyonu, kanser dâhil birçok hastalıkta yer almaktadır. Farklı kanserlerde mekanizması bilinmesine rağmen hala aydınlatılamamış bir paradoks saklıdır [417-420]. Ayrıca TGF- β 1 sinyal yolağının down-regülasyonunda rol alan bileşenler, onkogenin erken aşamalarındaki aktivasyonunu ve genellikle

onkosüpresyon ile epitel hücre transformasyonu ve hiperproliferasyonunun inhibisyonu ile ilişkilidir [418, 419]. Kolon kanserinde TGF- β 1'in aktivite kaybı gastrointestinal karsinogeneze ve özellikle de kolon kanserine karşı duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir [419]. Öte yandan insan pankreas ve meme kanserlerinde anti-tümör mekanizmalarının bir parçası olarak TGF- β 1 yolu araştırılmış ve TQ ile [314, 327] 5-FU [421] TGF- β 1 yolağını hem KK modelinde *in vitro* hem de *in vivo* aktive etmiştir. Bizim çalışmamızda da TGF- β 1 ekspresyonu hem tekli hemde kombine tedavide azalmıştır. Bu sonuçla birlikte TGF- β 1 down-regülasyonu da anti-tümör aktiviteyi açıklayan parametrelerden biridir.

Kanser gelişimi ile enflamasyon arasındaki ilişki uzun zamandır bilinmektedir [422-424]. Kanserlerin %20'sinin enflamasyon kaynaklı olduğu bildirilmiştir [425]. Enflamasyon her zaman mutajenez için gerekli değildir. Enflamasyonun olmadığı dokuda da kanser gelişebilir. Bununla birlikte, enflamasyon olmayan yerde gelişen tümörün kendisi enflamasyon yaratır [426]. Bu enflamasyonun kapsamı ve niteliği değişken ve tümörün ilerlemesi ve gelişmesi yönündedir [427]. Tümörler çeşitli mekanizmalar yoluyla enflamatuvar reaksiyonlara neden olurlar. İlk olarak da kanser hücreleri nötrofilleri ve makrofajları toplayan sitokinleri eksprese ederler [428]. Bu ekspresyona yanıtla ek enflamatuvar sitokinler serbest bırakılır. İkincisi, büyüyen tümör, normal dokuya fiziksel olarak zarar verebilir ve enflamasyon tamir mekanizmalarını başlatan yerleşik granülositler üzerindeki reseptörleri aktive eden hasarla ilişkili moleküller serbest bırakır. Benzer şekilde, büyüyen tümörler kan ve lenfatik damarları sıkıştırabilir, oksijen ve besin teminini durdurabilir [429, 430]. Ortaya çıkan hipoksi, yeni kan damarlarını ve makrofajları alan sitokinlerin ve anjiyojenik büyüme faktörlerinin üretimine yol açar. Enflamatuvar sitokinler ve hücreler kolorektal kanser gelişiminde önemli bir rol oynar [431]. TQ'nun hem *in vitro* hem de *in vivo* anti-oksidan, anti-enflamatuvar ve anti-kanser aktivitelerini gösteren birçok çalışma mevcuttur [432]. TQ'un çeşitli hastalıklarda semptomların hafifletilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir [264]. TQ'nun anti-enflamatuvar özelliğinin farklı hastalıklarda da etkisi gösterilmiştir [264]. Son zamanlarda TQ ile ilgili yapılan çalışmalar, güçlü bir enflamasyon önleyici, anjiyojeniz, karsinogeneze ve tümör ilerlemesinin inhibitörü olduğunu göstermiştir [433, 434]. TQ'nun anti-kanser etkileri, hücre büyümesinin durması, pro-apoptoz mekanizmayı indüklemesi, ROS üretimi, anti-metastatik ve anti-anjiyojenik özellikler gibi birçok mekanizma ile

içindedir [401, 409]. Aynı zamanda TQ'nun bilinen hem anti-oksidatif hem de anti-enflamatuvar etkileri vardır [264]. Çalışmamızın sonuçlarına göre tekli ve kombine tedavi serumdaki enflamasyonu ve pro-enflamatuvar sitokin düzeylerini tedavi almayan gruba göre düşürmüştür.

Oksidatif stres, normal koşullarda serbest radikallerin anti-oksidanlarla kurduğu dengenin serbest radikaller tarafına bozulmasıyla meydana gelen metabolik bir süreçtir. Bozulan bu denge organizmanın hepsini ciddi bir şekilde etkileyebilecek bir potansiyele sahiptir [435]. Hücre içinde üretilen reaktif oksijen türleri metabolizma için önemli bir etkisi olan sinyal kaskatlarında, hücresel savunmada ve çevre koşullarına adaptasyonda önemli bir rol oynar [436]. Vücutta üretilen ROS'un çoğu mitokondriyal solunum zincirinde üretilir [437]. Endojen metabolik reaksiyonlar sırasında aerobik hücreler ROS üretir. Bunlar süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^-) ve moleküler oksijenin biyolojik indirgenmesinin normal ürünleri olarak organik peroksitlerdir [438]. Hücrede açığa çıkan moleküler oksijenin neredeyse tamamı elektron transport zincirinde üretilir [439, 440]. Hipoksik koşullarda hücre reaktif azot türlerini (RNS) üretir [437]. Hücre içinde artan ROS ve RNS biyomoleküllere zarar verir. Lipitler peroksidasyona uğrayarak malondialdehit ve türevlerini, proteinler oksidasyona uğrayarak protein karbonillerini oluştururken DNA oksidatif hasara uğrayarak bazlarına ya da şekerlerinde hasarlar meydana gelir [441]. Özellikle DNA'da meydana gelen bu hasarlar mutajenez riskini artırır [442]. Kronikleşen ROS artışı ya da çevresel faktörlerden kaynaklı hasarların oluşması mutasyonlara ve neoplastik dönüşümlere neden olabilir [443, 444]. Yüksek seyreden ROS miktarı kanserin başlamasına, ilerlemesine ve DNA'da mutasyonların meydana gelmesiyle genomik kararsızlığa neden olur [445]. Kanser, başlama, progresyon ve ilerleme olmak üzere üç aşamada tanımlanan bir süreçtir [446-448]. Başlangıçta ROS gen mutasyonlarına ve DNA hasarına neden olur. Progresyon sürecinde anormal gen ekspresyonuna, hücre-hücre etkileşiminin bozulmasına, ikincil habercilerin modifikasyonuna, son olarak oksidatif stres hücre proliferasyonuna ve DNA instabilitesine neden olur [449]. Kemoterapi, tedavi sırasında hastalarda oksidatif stresi artırır [450], 5-FU da yapısı itibari ile oksidatif stresi tetikler [451]. İnsan tümör hücreleri yüksek miktarda hidrojen peroksit üretir ve artan süperoksit ve hidrojen peroksit kolorektal kanseri tanılı hastaların serumunda bulunur [452]. 5-FU kemoterapisinin, GSH-Px ve GSH seviyelerinin azalmasına rağmen, kanser

hastalarının nötrofillerinde süperoksit radikal ve hidrojen peroksit üretimini arttırdığı gösterilmiştir [453]. GSH-Px ve GSH seviyelerinde gözlenen bu azalma ve kanser hastalarında lipit peroksidasyonundaki artış, kanser hücrelerinin neden olduğu aşırı oksidatif strese bağlanabilir[454]. 2013'te Koçer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kolorektal kanser hastalarına tedavide verilen 5-FU'nun oksidatif stresi arttırıp, anti-oksidan savunmayı azalttığı belirtilmiştir [451]. Bir başka çalışmada 5-FU hücre içi ROS'u arttırarak tümör hücrelerini öldürmede kullanılmaktadır [454]. TQ güçlü bir anti-oksidadır. Farklı doku hasarlarına karşı koruyucu etkisi vardır [455]. Çalışmamızda oksidatif stres belirteçlerinden total oksidan seviye ve tiyol-disülfit düzeyi TQ tedavisi ile düşmüştür. 5-FU oksidatif stresi arttırdığından dolayı, 5-FU tedavi grubu, pozitif ve negatif kontrol gruplarına göre oksidatif stres artmıştır. Ayrıca kombine tedavi grubundaki oksidatif stres negatif kontrol grubuna göre daha yüksektir. TQ'nun tedavi de olduğu gruplar kanser grubuna göre total anti-oksidan seviye, total tiyol ve natif tiyol düzeyi bakımında yükselirken, 5-FU anti-oksidan savunmayı inhibe ettiğinden bu grupta değerler düşmüştür. Sonuç olarak değerlerimiz *in vivo* kolon kanseri modelinde bugüne dek hiç çalışılmamıştır. Normalde TQ kanser tedavisinde pro-oksidan özellik göstererek tedavi etmekteyken, sistemik etkide bu durumu göstermediğini, aksine anti-oksidan yönünün daha ağır olduğu ortaya çıkmaktadır. Tümör doku büyüklüğü, invazyon, enflamasyon, nekroz gibi durumlara bakıldığında da TQ'nun pro-oksidan etkisinin tümör dokusundaki yüksek demir ve bakır konsantrasyonlarından dolayı daha ağır olduğu gözükmektedir. 5-FU tümörde de sistemik etkide de oksidatif stresi arttırıp, anti-oksidan mekanizmayı azaltmaktadır. Kanser tedavisindeki önemli noktalardan biride hepatotoksisite ve nefrotoksisitedir. Bu yüzden deneysel oluşturulan kolon kanser modelinde tedavilerin karaciğer fonksiyon testlerini (KFT) ve böbrek fonksiyon testlerini (BFT) nasıl etkilediğini göstermek istedik. Literatüre baktığımızda TQ'nun hepato ve nefro koruyucu özellik gösterdiğine dair çalışmalar mevcuttur [456, 457]. Çalışmamızda negatif kontrol grubuna göre pozitif kontrol grubunda tüm testler (sodyum hariç, sodyum tümör oluşumuyla düşmüştür) istatistiksel olarak anlamlı yükselmiştir. Tedavi gruplarına geçildiğinde 5-FU yapısı ve metabolizması gereği böbrek ve karaciğerde toksisiteye neden olduğundan tüm testlerde pozitif kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir şekilde yükseltmiştir. Bununla birlikte, TQ'nun olduğu tüm gruplar (tekli ve kombine) TQ'nun koruyucu özelliklerinden dolayı artan değerleri azaltmıştır.

Sonuç olarak, TQ, sayısız moleküler mekanizmayı düzenleyen güçlü bir anti-kanser molekülü olarak kanserin önlenmesi ve tedavisinde iyi bir terapötik molekül olma potansiyeline sahiptir. TQ'un kolon kanseri üstündeki *in vitro* ve *in vivo* tedavi etkinliğini çalışmamızda gösterdik. Tedavide şu an oral ya da *iv* formu olmayan TQ verilmesi için, yeni uygulanabilir formülasyonlar geliştirildikten sonra geleneksel tedavide kullanılan 5-FU ile kombine tedavisi uygulanabilir. Yine de bu süreç zarfında TQ'un kanser üstündeki etkisini moleküler olarak daha detaylı araştırmak gerekmektedir. Bu çalışma ile elde ettiğimiz bulgularımız TQ veya 5-FU ile tekli tedavinin, bu model üzerinde belirgin bir anti-kanser etki yaratmasına rağmen, kombinasyonlarının, *in vitro* ve *in vivo* modelde gözlenen moleküler değişiklikleri baskılamak için daha önemli bir etkinlik sergilediğini göstermektedir. KK'ya yakalanan insanlarda bu kombinasyon etkinin potansiyel klinik faydalarını göstermek için daha detaylı araştırmalar gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız neticesinde TQ ve 5-FU'nun kombine tedavisi *in vitro* ve *in vivo* KK modelinde sinerjik etkileri neticesinde anti-tümör etkisi gösterilmiştir. *İn vitro* tedavi sonuçları ile *in vivo* tedavi sonuçları arasında pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda çıkan *in vitro* ve *in vivo* sonuçlar doğrultusunda;

- Timokinonun kolon kanser kombine tedavisinde bir seçenek olabileceği;
- Kolon kanseri rutin tedavisinde verilen 5-Fluorourasil'in zararlı etkilerinin timokinon'un anti-oksidan özelliğiyle kapatılırken, pro-oksidan özelliğiyle sinerjik etki yaratarak düşük dozlarda yüksek toksisite yaratabileceği;
- Kemoterapötik kanser tedavisinde ilacın sadece intravenöz yolla verildiği göz önüne alındığında timokinon'un oral ya da intravenöz formülasyonlarının geliştirilmesinin tedavi için yararlı olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] Morgan, D. O. (2007). *The cell cycle: principles of control*. New Science Press.
- [2] Tang, Z. I. (2010). The domino and clock models of cell cycle regulation. *Nat Educ*, 3, 56.
- [3] Malumbres, M. ve Barbacid, M. (2001). Milestones in cell division: to cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(3), 222.
- [4] Malumbres, M. ve Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*, 30(11), 630-641.
- [5] Knoblich, J. A. ve Lehner, C. F. (1993). Synergistic action of Drosophila cyclins A and B during the G2-M transition. *The EMBO journal*, 12(1), 65-74.
- [6] Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D. ve Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33(2), 389-396.
- [7] Morgan, D. O. ve Roberts, J. M. (2002). Cell cycle: Oscillation sensation. *Nature*, 418(6897), 495.
- [8] Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V. ve Medema, R. H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *The Journal of cell biology*, 185(2), 193-202.
- [9] Doll, R. ve Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute*, 66(6), 1191-1308.
- [10] Hartwell, L. H. ve Kastan, M. B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science (New York, NY)*, 266(5192), 1821-1828.
- [11] Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. ve Craig, R. W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research*, 51(23 Pt 1), 6304-6311.
- [12] Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. ve Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
- [13] Pham, T. T., Talukder, A. M., Walsh, N. J., Lawson, A. G., Jones, A. J., Bishop, J. L., ve ark. (2019). Clinical and epidemiological factors associated with suicide in colorectal cancer. *Supportive Care in Cancer*, 27(2), 617-621.
- [14] Noone, A. M., Cronin, K. A., Altekruse, S. F., Howlader, N., Lewis, D. R., Petkov, V. I., ve ark. (2017). Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992-2013. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 26(4), 632-641.
- [15] de la Chapelle, A. (2004). Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature reviews Cancer*, 4(10), 769-780.
- [16] Edwards, B. K., Howe, H. L., Ries, L. A., Thun, M. J., Rosenberg, H. M., Yancik, R., ve ark. (2002). Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1999, featuring implications of age and aging on U.S. cancer burden. *Cancer*, 94(10), 2766-2792.
- [17] Levin, K. E. ve Dozois, R. R. (1991). Epidemiology of large bowel cancer. *World journal of surgery*, 15(5), 562-567.

- [18] Winawer, S. J., Zauber, A. G., Ho, M. N., O'Brien, M. J., Gottlieb, L. S., Sternberg, S. S., ve ark. (1993). Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *The New England journal of medicine*, 329(27), 1977-1981.
- [19] Kemppainen, M., Raiha, I., Rajala, T. ve Sourander, L. (1993). Characteristics of colorectal cancer in elderly patients. *Gerontology*, 39(4), 222-227.
- [20] MacGillivray, D. C., Swartz, S. E., Robinson, A. M., Cruess, D. F. ve Smith, L. E. (1991). Adenocarcinoma of the colon and rectum in patients less than 40 years of age. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 172(1), 1-7.
- [21] Locker, G. Y. ve Lynch, H. T. (2004). Genetic factors and colorectal cancer in Ashkenazi Jews. *Familial cancer*, 3(3-4), 215-221.
- [22] Rosenberg, S. A., De_Vita, V. T. ve Lawrence, T. S. (2015). *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology*. Lippincott, Williams & Wilkins.
- [23] Janakiram, N. B. ve Rao, C. V. (2014). The role of inflammation in colon cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 816, 25-52.
- [24] Hafner, M. F. ve Debus, J. (2016). Radiotherapy for Colorectal Cancer: Current Standards and Future Perspectives. *Visceral medicine*, 32(3), 172-177.
- [25] Nguyen, T. T., Ung, T. T., Kim, N. H. ve Jung, Y. D. (2018). Role of bile acids in colon carcinogenesis. *World journal of clinical cases*, 6(13), 577-588.
- [26] Brenner, H., Kloor, M. ve Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *Lancet (London, England)*, 383(9927), 1490-1502.
- [27] Kapiteijn, E., Liefers, G. J., Los, L. C., Kranenburg, E. K., Hermans, J., Tollenaar, R. A., ve ark. (2001). Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *The Journal of pathology*, 195(2), 171-178.
- [28] Norat, T., Bingham, S., Ferrari, P., Slimani, N., Jenab, M., Mazuir, M., ve ark. (2005). Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(12), 906-916.
- [29] Bird, R. P., Yao, K., Lasko, C. M. ve Good, C. K. (1996). Inability of low- or high-fat diet to modulate late stages of colon carcinogenesis in Sprague-Dawley rats. *Cancer research*, 56(13), 2896-2899.
- [30] Song, M., Garrett, W. S. ve Chan, A. T. (2015). Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*, 148(6), 1244-1260.e1216.
- [31] Baena, R. ve Salinas, P. (2015). Diet and colorectal cancer. *Maturitas*, 80(3), 258-264.
- [32] Rozen, P., Fireman, Z., Figer, A., Legum, C., Ron, E. ve Lynch, H. T. (1987). Family history of colorectal cancer as a marker of potential malignancy within a screening program. *Cancer*, 60(2), 248-254.
- [33] Sondergaard, J. O., Bulow, S. ve Lynge, E. (1991). Cancer incidence among parents of patients with colorectal cancer. *International journal of cancer*, 47(2), 202-206.
- [34] Pickhardt, P. J., Mbah, I., Pooler, B. D., Chen, O. T., Hinshaw, J. L., Weiss, J. M., ve ark. (2017). CT Colonographic Screening of Patients With a Family History of Colorectal Cancer: Comparison With Adults at Average Risk and Implications for Guidelines. *AJR American journal of roentgenology*, 208(4), 794-800.
- [35] Kessels, K., Eisinger, J. D., Letteboer, T. G., Offerhaus, G. J. A., Siersema, P. D. ve Moons, L. M. G. (2017). Sending family history questionnaires to patients before a colonoscopy improves genetic counseling for hereditary colorectal cancer. *Journal of digestive diseases*, 18(6), 343-348.
- [36] St John, D. J., McDermott, F. T., Hopper, J. L., Debney, E. A., Johnson, W. R. ve Hughes, E. S. (1993). Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer. *Annals of internal medicine*, 118(10), 785-790.
- [37] Lynch, H. T. ve de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 348(10), 919-932.

- [38] Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B. (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science (New York, NY)*, 280(5366), 1036-1037.
- [39] Rozen, P., Shomrat, R., Strul, H., Naiman, T., Karminsky, N., Legum, C., ve ark. (1999). Prevalence of the I1307K APC gene variant in Israeli Jews of differing ethnic origin and risk for colorectal cancer. *Gastroenterology*, 116(1), 54-57.
- [40] Gryfe, R., Di Nicola, N., Lal, G., Gallinger, S. ve Redston, M. (1999). Inherited colorectal polyposis and cancer risk of the APC I1307K polymorphism. *American journal of human genetics*, 64(2), 378-384.
- [41] Woodage, T., King, S. M., Wacholder, S., Hartge, P., Struewing, J. P., McAdams, M., ve ark. (1998). The APC I1307K allele and cancer risk in a community-based study of Ashkenazi Jews. *Nature genetics*, 20(1), 62-65.
- [42] Grady, W. M. ve Markowitz, S. D. (2003). Hereditary colon cancer genes. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 222, 59-83.
- [43] Sieber, O. M., Lipton, L., Crabtree, M., Heinimann, K., Fidalgo, P., Phillips, R. K., ve ark. (2003). Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *The New England journal of medicine*, 348(9), 791-799.
- [44] Lynch, H. T. ve Fitzgibbons, R., Jr. (1996). Surgery, desmoid tumors, and familial adenomatous polyposis: case report and literature review. *The American journal of gastroenterology*, 91(12), 2598-2601.
- [45] Offerhaus, G. J., Giardiello, F. M., Krush, A. J., Booker, S. V., Tersmette, A. C., Kelley, N. C., ve ark. (1992). The risk of upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 102(6), 1980-1982.
- [46] Ishikawa, H. (2016). Colorectal cancer prevention of familial adenomatous polyposis. *Nihon Shokakibyō Gakkai zasshi = The Japanese journal of gastroenterology*, 113(7), 1191-1195.
- [47] Lynch, H. T. ve Smyrk, T. (1996). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer*, 78(6), 1149-1167.
- [48] Carethers, J. M. ve Stoffel, E. M. (2015). Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer. *World journal of gastroenterology*, 21(31), 9253-9261.
- [49] Muller, A. D. ve Sonnenberg, A. (1995). Prevention of colorectal cancer by flexible endoscopy and polypectomy. A case-control study of 32,702 veterans. *Annals of internal medicine*, 123(12), 904-910.
- [50] Stryker, S. J., Wolff, B. G., Culp, C. E., Libbe, S. D., Ilstrup, D. M. ve MacCarty, R. L. (1987). Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology*, 93(5), 1009-1013.
- [51] Shinya, H. ve Wolff, W. I. (1979). Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps. *Annals of surgery*, 190(6), 679-683.
- [52] Loughrey, M. B. ve Shepherd, N. A. (2017). Problematic Colorectal Polyps: Is It Cancer and What Do I Need to Do About It? *Surgical pathology clinics*, 10(4), 947-960.
- [53] Winawer, S. J., Stewart, E. T., Zauber, A. G., Bond, J. H., Ansel, H., Wayne, J. D., ve ark. (2000). A comparison of colonoscopy and double-contrast barium enema for surveillance after polypectomy. National Polyp Study Work Group. *The New England journal of medicine*, 342(24), 1766-1772.
- [54] Gillen, C. D., Andrews, H. A., Prior, P. ve Allan, R. N. (1994). Crohn's disease and colorectal cancer. *Gut*, 35(5), 651-655.
- [55] Gyde, S. N., Prior, P., Allan, R. N., Stevens, A., Jewell, D. P., Truelove, S. C., ve ark. (1988). Colorectal cancer in ulcerative colitis: a cohort study of primary referrals from three centres. *Gut*, 29(2), 206-217.
- [56] Ekblom, A., Helmick, C., Zack, M. ve Adami, H. O. (1990). Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *The New England journal of medicine*, 323(18), 1228-1233.

- [57] Desai, D. ve Desai, N. (2014). Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: A critical analysis. *World journal of gastrointestinal endoscopy*, 6(11), 541-548.
- [58] Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Kliewer, E. ve Wajda, A. (2001). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, 91(4), 854-862.
- [59] Butler, L. M., Sinha, R., Millikan, R. C., Martin, C. F., Newman, B., Gammon, M. D., ve ark. (2003). Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study. *American journal of epidemiology*, 157(5), 434-445.
- [60] Kampman, E., Slattery, M. L., Bigler, J., Leppert, M., Samowitz, W., Caan, B. J., ve ark. (1999). Meat consumption, genetic susceptibility, and colon cancer risk: a United States multicenter case-control study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 8(1), 15-24.
- [61] Fuchs, C. S., Giovannucci, E. L., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Stampfer, M. J., Rosner, B., ve ark. (1999). Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *The New England journal of medicine*, 340(3), 169-176.
- [62] Pietinen, P., Malila, N., Virtanen, M., Hartman, T. J., Tangrea, J. A., Albanes, D., ve ark. (1999). Diet and risk of colorectal cancer in a cohort of Finnish men. *Cancer causes & control : CCC*, 10(5), 387-396.
- [63] Terry, P., Giovannucci, E., Michels, K. B., Bergkvist, L., Hansen, H., Holmberg, L., ve ark. (2001). Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(7), 525-533.
- [64] Baron, J. A., Beach, M., Mandel, J. S., van Stolk, R. U., Haile, R. W., Sandler, R. S., ve ark. (1999). Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. Calcium Polyp Prevention Study Group. *The New England journal of medicine*, 340(2), 101-107.
- [65] Giovannucci, E., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Hunter, D., Rosner, B. A., Willett, W. C., ve ark. (1994). A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in U.S. women. *Journal of the National Cancer Institute*, 86(3), 192-199.
- [66] Slattery, M. L., Potter, J. D., Friedman, G. D., Ma, K. N. ve Edwards, S. (1997). Tobacco use and colon cancer. *International journal of cancer*, 70(3), 259-264.
- [67] Knekt, P., Hakama, M., Jarvinen, R., Pukkala, E. ve Heliovaara, M. (1998). Smoking and risk of colorectal cancer. *British journal of cancer*, 78(1), 136-139.
- [68] Hama, H., Tabuchi, T., Ito, Y., Fukushima, W., Matsunaga, I., Miyashiro, I., ve ark. (2016). [Smoking behavior and participation in screening for lung, gastric, and colorectal cancers]. [*Nihon koshu eisei zasshi*] *Japanese journal of public health*, 63(3), 126-134.
- [69] Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- [70] Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- [71] Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F. ve Ricciardiello, L. (2013). Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 16365-16385.
- [72] Grady, W. M. ve Carethers, J. M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), 1079-1099.
- [73] Fearon, E. R. ve Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767.
- [74] Lengauer, C., Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643-649.

- [75] Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2), 159-170.
- [76] Zeki, S. S., Graham, T. A. ve Wright, N. A. (2011). Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 8(2), 90-100.
- [77] Armaghany, T., Wilson, J. D., Chu, Q. ve Mills, G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research : GCR*, 5(1), 19-27.
- [78] Jones, S., Chen, W. D., Parmigiani, G., Diehl, F., Beerenwinkel, N., Antal, T., ve ark. (2008). Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(11), 4283-4288.
- [79] Luo, Y., Wong, C. J., Kaz, A. M., Dzieciatkowski, S., Carter, K. T., Morris, S. M., ve ark. (2014). Differences in DNA methylation signatures reveal multiple pathways of progression from adenoma to colorectal cancer. *Gastroenterology*, 147(2), 418-429.e418.
- [80] van Engeland, M., Derks, S., Smits, K. M., Meijer, G. A. ve Herman, J. G. (2011). Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(10), 1382-1391.
- [81] Goldstein, N. S. (2006). Serrated pathway and APC (conventional)-type colorectal polyps: molecular-morphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification. *American journal of clinical pathology*, 125(1), 146-153.
- [82] Jass, J. R. (2004). Hyperplastic polyps and colorectal cancer: is there a link? *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 2(1), 1-8.
- [83] Bettington, M., Walker, N., Clouston, A., Brown, I., Leggett, B. ve Whitehall, V. (2013). The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology*, 62(3), 367-386.
- [84] Rex, D. K., Ahnen, D. J., Baron, J. A., Batts, K. P., Burke, C. A., Burt, R. W., ve ark. (2012). Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *The American journal of gastroenterology*, 107(9), 1315-1329; quiz 1314, 1330.
- [85] Kambara, T., Simms, L. A., Whitehall, V. L., Spring, K. J., Wynter, C. V., Walsh, M. D., ve ark. (2004). BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*, 53(8), 1137-1144.
- [86] Noffsinger, A. E. (2009). Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annual review of pathology*, 4, 343-364.
- [87] Network, C. G. A. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407), 330-337.
- [88] Chittenden, T. W., Howe, E. A., Culhane, A. C., Sultana, R., Taylor, J. M., Holmes, C., ve ark. (2008). Functional classification analysis of somatically mutated genes in human breast and colorectal cancers. *Genomics*, 91(6), 508-511.
- [89] Li, F. Y. ve Lai, M. D. (2009). Colorectal cancer, one entity or three. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10(3), 219-229.
- [90] Starr, T. K., Allaei, R., Silverstein, K. A., Staggs, R. A., Sarver, A. L., Bergemann, T. L., ve ark. (2009). A transposon-based genetic screen in mice identifies genes altered in colorectal cancer. *Science (New York, NY)*, 323(5922), 1747-1750.
- [91] Parsons, D. W., Wang, T. L., Samuels, Y., Bardelli, A., Cummins, J. M., DeLong, L., ve ark. (2005). Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature*, 436(7052), 792.
- [92] Brennan, C. W., Verhaak, R. G., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S. R., ve ark. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, 155(2), 462-477.

- [93] Bardelli, A., Parsons, D. W., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Saha, S., ve ark. (2003). Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science (New York, NY)*, 300(5621), 949.
- [94] Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., ve ark. (2015). Colorectal cancer. *Nature reviews Disease primers*, 1, 15065.
- [95] Wang, Y., He, T., Herman, J. G., Linghu, E., Yang, Y., Fuks, F., ve ark. (2017). Methylation of ZNF331 is an independent prognostic marker of colorectal cancer and promotes colorectal cancer growth. *Clinical epigenetics*, 9, 115.
- [96] Lao, V. V. ve Grady, W. M. (2011). Epigenetics and colorectal cancer. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 8(12), 686-700.
- [97] Kim, Y. H., Petko, Z., Dzieciatkowski, S., Lin, L., Ghiassi, M., Stain, S., ve ark. (2006). CpG island methylation of genes accumulates during the adenoma progression step of the multistep pathogenesis of colorectal cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 45(8), 781-789.
- [98] Bird, A. (1992). The essentials of DNA methylation. *Cell*, 70(1), 5-8.
- [99] Worthley, D. L., Whitehall, V. L., Buttenshaw, R. L., Irahara, N., Greco, S. A., Ramsnes, I., ve ark. (2010). DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer. *Oncogene*, 29(11), 1653-1662.
- [100] Yamauchi, M., Morikawa, T., Kuchiba, A., Imamura, Y., Qian, Z. R., Nishihara, R., ve ark. (2012). Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. *Gut*, 61(6), 847-854.
- [101] Rosty, C., Young, J. P., Walsh, M. D., Clendenning, M., Sanderson, K., Walters, R. J., ve ark. (2013). PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PloS one*, 8(6), e65479.
- [102] Klein, J. L., Okcu, M., Preisegger, K. H. ve Hammer, H. F. (2016). Distribution, size and shape of colorectal adenomas as determined by a colonoscopist with a high lesion detection rate: Influence of age, sex and colonoscopy indication. *United European gastroenterology journal*, 4(3), 438-448.
- [103] Ansa, B. E., Coughlin, S. S., Alema-Mensah, E. ve Smith, S. A. (2018). Evaluation of Colorectal Cancer Incidence Trends in the United States (2000-2014). *Journal of clinical medicine*, 7(2).
- [104] Missiaglia, E., Jacobs, B., D'ario, G., Di Narzo, A., Sonesson, C., Budinska, E., ve ark. (2014). Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Annals of oncology*, 25(10), 1995-2001.
- [105] Dawson, H., Kirsch, R., Messenger, D. ve Driman, D. (2019). A Review of Current Challenges in Colorectal Cancer Reporting. *Archives of pathology & laboratory medicine*.
- [106] Watari, J., Saitoh, Y., Obara, T., Fujiya, M., Maemoto, A., Ayabe, T., ve ark. (2002). Natural history of colorectal nonpolypoid adenomas: a prospective colonoscopic study and relation with cell kinetics and K-ras mutations. *The American journal of gastroenterology*, 97(8), 2109-2115.
- [107] Hoff, G., Foerster, A., Vatn, M. H., Sauar, J. ve Larsen, S. (1986). Epidemiology of polyps in the rectum and colon. Recovery and evaluation of unresected polyps 2 years after detection. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 21(7), 853-862.
- [108] Ueyama, T., Kawamoto, K., Iwashita, I., Kitagawa, S., Haraguchi, Y., Muranaka, T., ve ark. (1995). Natural history of minute sessile colonic adenomas based on radiographic findings. Is endoscopic removal of every colonic adenoma necessary? *Diseases of the colon and rectum*, 38(3), 268-272.
- [109] Hisabe, T., Tsuda, S., Matsui, T. ve Iwashita, A. (2010). Natural history of small colorectal protuberant adenomas. *Digestive endoscopy : official journal of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society*, 22 Suppl 1, S43-46.

- [110] Alexiusdottir, K. K., Möller, P. H., Snaebjornsson, P., Jonasson, L., Olafsdottir, E. J., Björnsson, E. S., ve ark. (2012). Association of symptoms of colon cancer patients with tumor location and TNM tumor stage. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 47(7), 795-801.
- [111] Alsayed, M. A., Surrati, A. M., Altaifi, J. A., Alharbi, A. H., Alfouti, R. O. ve Alremaithi, S. M. (2019). Public Awareness of Colon Cancer Symptoms, Risk Factor, and Screening at Madinah-KSA. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 8(1).
- [112] Baran, B., Mert Ozupek, N., Yerli Tetik, N., Acar, E., Bekcioglu, O. ve Baskin, Y. (2018). Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology research*, 11(4), 264-273.
- [113] Baek, S. K. (2017). Laterality: Right-Sided and Left-Sided Colon Cancer. *Annals of coloproctology*, 33(6), 205-206.
- [114] Meguid, R. A., Slidell, M. B., Wolfgang, C. L., Chang, D. C. ve Ahuja, N. (2008). Is there a difference in survival between right-versus left-sided colon cancers? *Annals of surgical oncology*, 15(9), 2388.
- [115] Alatise, O. I., Ayandipo, O. O., Adeyeye, A., Seier, K., Komolafe, A. O., Bojuwoye, M. O., ve ark. (2018). A symptom-based model to predict colorectal cancer in low-resource countries: Results from a prospective study of patients at high risk for colorectal cancer. *Cancer*, 124(13), 2766-2773.
- [116] Fakih, M. G. (2015). Metastatic colorectal cancer: current state and future directions. *Journal of clinical oncology*, 33(16), 1809-1824.
- [117] Riihimaki, M., Hemminki, A., Sundquist, J. ve Hemminki, K. (2016). Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Scientific reports*, 6, 29765.
- [118] Vatandoust, S., Price, T. J. ve Karapetis, C. S. (2015). Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World journal of gastroenterology*, 21(41), 11767-11776.
- [119] van der Geest, L. G., Lam-Boer, J., Koopman, M., Verhoef, C., Elferink, M. A. ve de Wilt, J. H. (2015). Nationwide trends in incidence, treatment and survival of colorectal cancer patients with synchronous metastases. *Clinical & experimental metastasis*, 32(5), 457-465.
- [120] Morris, E. J., Forman, D., Thomas, J. D., Quirke, P., Taylor, E. F., Fairley, L., ve ark. (2010). Surgical management and outcomes of colorectal cancer liver metastases. *The British journal of surgery*, 97(7), 1110-1118.
- [121] Andres, A., Mentha, G., Adam, R., Gerstel, E., Skipenko, O. G., Barroso, E., ve ark. (2015). Surgical management of patients with colorectal cancer and simultaneous liver and lung metastases. *The British journal of surgery*, 102(6), 691-699.
- [122] de Baere, T., Auperin, A., Deschamps, F., Chevallier, P., Gaubert, Y., Boige, V., ve ark. (2015). Radiofrequency ablation is a valid treatment option for lung metastases: experience in 566 patients with 1037 metastases. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(5), 987-991.
- [123] Klint, A., Tryggvadottir, L., Bray, F., Gislum, M., Hakulinen, T., Storm, H. H., ve ark. (2010). Trends in the survival of patients diagnosed with cancer in female genital organs in the Nordic countries 1964-2003 followed up to the end of 2006. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 49(5), 632-643.
- [124] Langley, R. R. ve Fidler, I. J. (2011). The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *International journal of cancer*, 128(11), 2527-2535.
- [125] Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews Cancer*, 3(6), 453-458.
- [126] Sleeman, J. P., Nazarenko, I. ve Thiele, W. (2011). Do all roads lead to Rome? Routes to metastasis development. *International journal of cancer*, 128(11), 2511-2526.

- [127] Wood, S. L., Pernemalm, M., Crosbie, P. A. ve Whetton, A. D. (2014). The role of the tumor-microenvironment in lung cancer-metastasis and its relationship to potential therapeutic targets. *Cancer treatment reviews*, 40(4), 558-566.
- [128] Kim, J. W., Shin, M. K. ve Kim, B. C. (2015). Clinicopathologic impacts of poorly differentiated cluster-based grading system in colorectal carcinoma. *Journal of Korean medical science*, 30(1), 16-23.
- [129] Grutzmann, R., Molnar, B., Pilarsky, C., Habermann, J. K., Schlag, P. M., Saeger, H. D., ve ark. (2008). Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PloS one*, 3(11), e3759.
- [130] Church, T. R., Wandell, M., Lofton-Day, C., Mongin, S. J., Burger, M., Payne, S. R., ve ark. (2014). Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut*, 63(2), 317-325.
- [131] Ahlquist, D. A., Sargent, D. J., Loprinzi, C. L., Levin, T. R., Rex, D. K., Ahnen, D. J., ve ark. (2008). Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia. *Annals of internal medicine*, 149(7), 441-450, w481.
- [132] Bosch, L. J., Carvalho, B., Fijneman, R. J., Jimenez, C. R., Pinedo, H. M., van Engeland, M., ve ark. (2011). Molecular tests for colorectal cancer screening. *Clinical colorectal cancer*, 10(1), 8-23.
- [133] Zarkavelis, G., Boussios, S., Papadaki, A., Katsanos, K. H., Christodoulou, D. K. ve Pentheroudakis, G. (2017). Current and future biomarkers in colorectal cancer. *Annals of gastroenterology*, 30(6), 613-621.
- [134] Kolligs, F. T. (2016). Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Visceral medicine*, 32(3), 158-164.
- [135] Valori, R., Rey, J. F., Atkin, W. S., Bretthauer, M., Senore, C., Hoff, G., ve ark. (2012). European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition--Quality assurance in endoscopy in colorectal cancer screening and diagnosis. *Endoscopy*, 44 Suppl 3, Se88-105.
- [136] Morris, E. J., Rutter, M. D., Finan, P. J., Thomas, J. D. ve Valori, R. (2015). Post-colonoscopy colorectal cancer (PCCRC) rates vary considerably depending on the method used to calculate them: a retrospective observational population-based study of PCCRC in the English National Health Service. *Gut*, 64(8), 1248-1256.
- [137] Lanspa, S. J. ve Lynch, H. T. (2010). Quality indicators for colonoscopy and the risk of interval cancer. *The New England journal of medicine*, 363(14), 1371; author reply 1373.
- [138] Zauber, A. G., Winawer, S. J., O'Brien, M. J., Lansdorp-Vogelaar, I., van Ballegooijen, M., Hankey, B. F., ve ark. (2012). Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *The New England journal of medicine*, 366(8), 687-696.
- [139] Nishihara, R., Wu, K., Lochhead, P., Morikawa, T., Liao, X., Qian, Z. R., ve ark. (2013). Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy. *The New England journal of medicine*, 369(12), 1095-1105.
- [140] Kaminski, M. F., Regula, J., Kraszewska, E., Polkowski, M., Wojciechowska, U., Didkowska, J., ve ark. (2010). Quality indicators for colonoscopy and the risk of interval cancer. *The New England journal of medicine*, 362(19), 1795-1803.
- [141] Corley, D. A., Jensen, C. D., Marks, A. R., Zhao, W. K., Lee, J. K., Doubeni, C. A., ve ark. (2014). Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer and death. *The New England journal of medicine*, 370(14), 1298-1306.
- [142] Sanduleanu, S., le Clercq, C. M., Dekker, E., Meijer, G. A., Rabeneck, L., Rutter, M. D., ve ark. (2015). Definition and taxonomy of interval colorectal cancers: a proposal for standardising nomenclature. *Gut*, 64(8), 1257-1267.

- [143] Van Gossum, A., Munoz-Navas, M., Fernandez-Urien, I., Carretero, C., Gay, G., Delvaux, M., ve ark. (2009). Capsule endoscopy versus colonoscopy for the detection of polyps and cancer. *The New England journal of medicine*, 361(3), 264-270.
- [144] Spada, C., Hassan, C., Munoz-Navas, M., Neuhaus, H., Deviere, J., Fockens, P., ve ark. (2011). Second-generation colon capsule endoscopy compared with colonoscopy. *Gastrointestinal endoscopy*, 74(3), 581-589.e581.
- [145] Spada, C., Hassan, C., Galmiche, J. P., Neuhaus, H., Dumonceau, J. M., Adler, S., ve ark. (2012). Colon capsule endoscopy: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy*, 44(5), 527-536.
- [146] Rex, D. K., Adler, S. N., Aisenberg, J., Burch, W. C., Jr., Carretero, C., Chowers, Y., ve ark. (2015). Accuracy of capsule colonoscopy in detecting colorectal polyps in a screening population. *Gastroenterology*, 148(5), 948-957.e942.
- [147] Sung, J. J., Ng, S. C., Chan, F. K., Chiu, H. M., Kim, H. S., Matsuda, T., ve ark. (2015). An updated Asia Pacific Consensus Recommendations on colorectal cancer screening. *Gut*, 64(1), 121-132.
- [148] Kim, D. H., Pickhardt, P. J., Taylor, A. J., Leung, W. K., Winter, T. C., Hinshaw, J. L., ve ark. (2007). CT colonography versus colonoscopy for the detection of advanced neoplasia. *The New England journal of medicine*, 357(14), 1403-1412.
- [149] Pickhardt, P. J., Hassan, C., Halligan, S. ve Marmo, R. (2011). Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection--systematic review and meta-analysis. *Radiology*, 259(2), 393-405.
- [150] Spada, C., Hassan, C., Barbaro, B., Iafrate, F., Cesaro, P., Petruzzello, L., ve ark. (2015). Colon capsule versus CT colonography in patients with incomplete colonoscopy: a prospective, comparative trial. *Gut*, 64(2), 272-281.
- [151] de Wijkerslooth, T. R., de Haan, M. C., Stoop, E. M., Bossuyt, P. M., Thomeer, M., Essink-Bot, M. L., ve ark. (2012). Burden of colonoscopy compared to non-cathartic CT-colonography in a colorectal cancer screening programme: randomised controlled trial. *Gut*, 61(11), 1552-1559.
- [152] de Haan, M. C., van Gelder, R. E., Graser, A., Bipat, S. ve Stoker, J. (2011). Diagnostic value of CT-colonography as compared to colonoscopy in an asymptomatic screening population: a meta-analysis. *European radiology*, 21(8), 1747-1763.
- [153] Yee, J., Kim, D. H., Rosen, M. P., Lalani, T., Carucci, L. R., Cash, B. D., ve ark. (2014). ACR Appropriateness Criteria colorectal cancer screening. *Journal of the American College of Radiology : JACR*, 11(6), 543-551.
- [154] Spada, C., Stoker, J., Alarcon, O., Barbaro, F., Bellini, D., Bretthauer, M., ve ark. (2014). Clinical indications for computed tomographic colonography: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) and European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology (ESGAR) Guideline. *Endoscopy*, 46(10), 897-915.
- [155] Kountourakis, P., Souglakos, J., Gouvas, N., Androulakis, N., Athanasiadis, A., Boukovinas, I., ve ark. (2016). Adjuvant chemotherapy for colon cancer: a consensus statement of the Hellenic and Cypriot Colorectal Cancer Study Group by the HeSMO. *Annals of gastroenterology*, 29(1), 18-23.
- [156] Milinis, K., Thornton, M., Montazeri, A. ve Rooney, P. S. (2015). Adjuvant chemotherapy for rectal cancer: Is it needed? *World journal of clinical oncology*, 6(6), 225-236.
- [157] Ayanian, J. Z., Zaslavsky, A. M., Fuchs, C. S., Guadagnoli, E., Creech, C. M., Cress, R. D., ve ark. (2003). Use of adjuvant chemotherapy and radiation therapy for colorectal cancer in a population-based cohort. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(7), 1293-1300.

- [158] Baxter, N. N., Rothenberger, D. A., Morris, A. M. ve Bullard, K. M. (2005). Adjuvant radiation for rectal cancer: do we measure up to the standard of care? An epidemiologic analysis of trends over 25 years in the United States. *Diseases of the colon and rectum*, 48(1), 9-15.
- [159] Demissie, K., Oluwole, O. O., Balasubramanian, B. A., Osinubi, O. O., August, D. ve Rhoads, G. G. (2004). Racial differences in the treatment of colorectal cancer: a comparison of surgical and radiation therapy between Whites and Blacks. *Annals of epidemiology*, 14(3), 215-221.
- [160] Raj, K. P., Taylor, T. H., Wray, C., Stamos, M. J. ve Zell, J. A. (2011). Risk of second primary colorectal cancer among colorectal cancer cases: a population-based analysis. *Journal of carcinogenesis*, 10, 6.
- [161] Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G. D., Brouquet, A. ve Cervantes, A. (2010). Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 21 Suppl 5, v70-77.
- [162] Kye, B. H. ve Cho, H. M. (2014). Overview of radiation therapy for treating rectal cancer. *Annals of coloproctology*, 30(4), 165-174.
- [163] Vacchelli, E., Vitale, I., Tartour, E., Eggermont, A., Sautès-Fridman, C., Galon, J., ve ark. (2013). Trial watch: anticancer radioimmunotherapy. *Oncoimmunology*, 2(9), e25595.
- [164] Mitchell, G., Porter, S. ve Manias, E. (2019). From telling to sharing to silence: A longitudinal ethnography of professional-patient communication about oral chemotherapy for colorectal cancer. *Psycho-Oncology*, 28(2), 336-342.
- [165] Van Cutsem, E., Kohne, C. H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C. R., Makhson, A., ve ark. (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 360(14), 1408-1417.
- [166] Richman, S. D. ve Jasani, B. (2019). Predictive Biomarkers and Targeted Therapies in Colorectal Cancer. *Predictive Biomarkers in Oncology* ss. 423-430: Springer.
- [167] Newman, D. J. ve Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.
- [168] Pan, L., Chai, H. B. ve Kinghorn, A. D. (2012). Discovery of new anticancer agents from higher plants. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 4, 142-156.
- [169] Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug discovery today*, 13(19-20), 894-901.
- [170] Zhou, Y., Zhang, A.-h., Sun, H., Yan, G.-l. ve Wang, X.-j. (2014). Plant-derived natural products as leads to antitumor drugs. *Plant Science Today*, 1(2), 46-61.
- [171] Samuelsson, G. (2004). Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy, 5th Swedish Pharmaceutical press. *Stockholm, Sweden*.
- [172] Schneider-Stock, R., Fakhoury, I. H., Zaki, A. M., El-Baba, C. O. ve Gali-Muhtasib, H. U. (2014). Thymoquinone: fifty years of success in the battle against cancer models. *Drug discovery today*, 19(1), 18-30.
- [173] Balunas, M. J. ve Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences*, 78(5), 431-441.
- [174] Reichert, J. M. (2003). Trends in development and approval times for new therapeutics in the United States. *Nature reviews Drug discovery*, 2(9), 695-702.
- [175] Dickson, M. ve Gagnon, J. P. (2004). Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nature reviews Drug discovery*, 3(5), 417-429.
- [176] Khare, C. P. (2004). *Indian herbal remedies: rational Western therapy, ayurvedic, and other traditional usage*, Botany. Springer science & business media.
- [177] Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S. A., Najmi, A. K., Siddique, N. A., ve ark. (2013). A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(5), 337-352.

- [178] Aggarwal, B. B., Kunnumakkara, A. B., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Sung, B. ve Anand, P. (2008). Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta medica*, 74(13), 1560-1569.
- [179] Al-Jassir, M. S. (1992). Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry*, 45(4), 239-242.
- [180] Alemi, M., Sabouni, F., Sanjarian, F., Haghbeen, K. ve Ansari, S. (2013). Anti-inflammatory effect of seeds and callus of *Nigella sativa* L. extracts on mix glial cells with regard to their thymoquinone content. *AAPS PharmSciTech*, 14(1), 160-167.
- [181] Abukhader, M. M. (2012). The effect of route of administration in thymoquinone toxicity in male and female rats. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 74(3), 195-200.
- [182] El-Najjar, N., Ketola, R. A., Nissila, T., Mauriala, T., Antopolsky, M., Janis, J., ve ark. (2011). Impact of protein binding on the analytical detectability and anticancer activity of thymoquinone. *Journal of chemical biology*, 4(3), 97-107.
- [183] Rayet, B. ve Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18(49), 6938-6947.
- [184] Sethi, G., Ahn, K. S. ve Aggarwal, B. B. (2008). Targeting nuclear factor-kappa B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis. *Molecular cancer research : MCR*, 6(6), 1059-1070.
- [185] Dergarabetian, E. M., Ghattass, K. I., El-Sitt, S. B., Al-Mismar, R. M., El-Baba, C. O., Itani, W. S., ve ark. (2013). Thymoquinone induces apoptosis in malignant T-cells via generation of ROS. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 5, 706-719.
- [186] Barron, J., Benghuzzi, H. ve Tucci, M. (2008). Effects of thymoquinone and selenium on the proliferation of mg 63 cells in tissue culture. *Biomedical sciences instrumentation*, 44, 434-440.
- [187] Ismail, M., Al-Naqeep, G. ve Chan, K. W. (2010). *Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(5), 664-672.
- [188] Gali-Muhtasib, H., Ocker, M., Kuester, D., Krueger, S., El-Hajj, Z., Diestel, A., ve ark. (2008). Thymoquinone reduces mouse colon tumor cell invasion and inhibits tumor growth in murine colon cancer models. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(1), 330-342.
- [189] Lang, M., Borgmann, M., Oberhuber, G., Evstatiev, R., Jimenez, K., Dammann, K. W., ve ark. (2013). Thymoquinone attenuates tumor growth in ApcMin mice by interference with Wnt-signaling. *Molecular cancer*, 12(1), 41.
- [190] Hatiboglu, M. A., Kocyigit, A., Guler, E. M., Akdur, K., Nalli, A., Karatas, E., ve ark. (2018). Thymoquinone Induces Apoptosis in B16-F10 Melanoma Cell Through Inhibition of p-STAT3 and Inhibits Tumor Growth in a Murine Intracerebral Melanoma Model. *World neurosurgery*, 114, e182-e190.
- [191] Norwood, A., Tan, M., May, M., Tucci, M. ve Benghuzzi, H. (2006). Comparison of potential chemotherapeutic agents, 5-fluoruracil, green tea, and thymoquinone on colon cancer cells. *Biomedical sciences instrumentation*, 42, 350-356.
- [192] Effenberger, K., Breyer, S. ve Schobert, R. (2010). Terpene conjugates of the *Nigella sativa* seed-oil constituent thymoquinone with enhanced efficacy in cancer cells. *Chemistry & biodiversity*, 7(1), 129-139.
- [193] El-Mahdy, M. A., Zhu, Q., Wang, Q. E., Wani, G. ve Wani, A. A. (2005). Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *International journal of cancer*, 117(3), 409-417.

- [194] Effenberger, K., Breyer, S. ve Schobert, R. (2010). Terpene conjugates of the *Nigella sativa* seed-oil constituent thymoquinone with enhanced efficacy in cancer cells. *Chemistry & biodiversity*, 7(1), 129-139.
- [195] Chehl, N., Chipitsyna, G., Gong, Q., Yeo, C. J. ve Arafat, H. A. (2009). Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB*, 11(5), 373-381.
- [196] AL-NAQEEB, G. ve Ismail, M. (2009). Regulation of apolipoprotein A-1 and apolipoprotein B100 genes by thymoquinone rich fraction and thymoquinone in HepG2 cells. *Journal of Food Lipids*, 16(2), 245-258.
- [197] Ashour, A. E., Abd-Allah, A. R., Korashy, H. M., Attia, S. M., Alzahrani, A. Z., Saquib, Q., ve ark. (2014). Thymoquinone suppression of the human hepatocellular carcinoma cell growth involves inhibition of IL-8 expression, elevated levels of TRAIL receptors, oxidative stress and apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry*, 389(1-2), 85-98.
- [198] Badary, O. A. ve Gamal, A. E.-D. (2001). Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer detection and prevention*, 25(4), 362-368.
- [199] Kaseb, A. O., Chinnakannu, K., Chen, D., Sivanandam, A., Tejwani, S., Menon, M., ve ark. (2007). Androgen receptor–and E2F-1–targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research*, 67(16), 7782-7788.
- [200] Lei, X., Lv, X., Liu, M., Yang, Z., Ji, M., Guo, X., ve ark. (2012). Thymoquinone inhibits growth and augments 5-fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells both in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 417(2), 864-868.
- [201] Rajput, S., Kumar, B. P., Sarkar, S., Das, S., Azab, B., Santhekadur, P. K., ve ark. (2013). Targeted apoptotic effects of thymoquinone and tamoxifen on XIAP mediated Akt regulation in breast cancer. *PloS one*, 8(4), e61342.
- [202] Badary, O. A., Nagi, M. N., al-Shabanah, O. A., al-Sawaf, H. A., al-Sohaibani, M. O. ve al-Bekairi, A. M. (1997). Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 75(12), 1356-1361.
- [203] Badary, O. A. (1999). Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 67(2), 135-142.
- [204] Nagi, M. N. ve Mansour, M. A. (2000). Protective effect of thymoquinone against doxorubicin–induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacological research*, 41(3), 283-289.
- [205] Gerber, D. E. (2008). Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American family physician*, 77(3), 311-319.
- [206] Rajput, S., Kumar, B. N., Dey, K. K., Pal, I., Parekh, A. ve Mandal, M. (2013). Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G(1) arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells. *Life sciences*, 93(21), 783-790.
- [207] Yi, T., Cho, S. G., Yi, Z., Pang, X., Rodriguez, M., Wang, Y., ve ark. (2008). Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular cancer therapeutics*, 7(7), 1789-1796.
- [208] Li, F., Rajendran, P. ve Sethi, G. (2010). Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. *British journal of pharmacology*, 161(3), 541-554.

- [209] Gali-Muhtasib, H., Kuester, D., Mawrin, C., Bajbouj, K., Diestel, A., Ocker, M., ve ark. (2008). Thymoquinone triggers inactivation of the stress response pathway sensor CHEK1 and contributes to apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer research*, 68(14), 5609-5618.
- [210] Yin, Z., Song, Y. ve Rehse, P. H. (2013). Thymoquinone blocks pSer/pThr recognition by Plk1 Polo-box domain as a phosphate mimic. *ACS chemical biology*, 8(2), 303-308.
- [211] Fabbro, D., Cowan-Jacob, S. W., Mobitz, H. ve Martiny-Baron, G. (2012). Targeting cancer with small-molecular-weight kinase inhibitors. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 795, 1-34.
- [212] Rutman, R. J., Cantarow, A. ve Paschkis, K. E. (1954). Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. *Cancer research*, 14(2), 119-123.
- [213] Impact. (1995). Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet (London, England)*, 345(8955), 939-944.
- [214] Johnston, P. G. ve Kaye, S. (2001). Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. *Anti-cancer drugs*, 12(8), 639-646.
- [215] Douillard, J. Y., Cunningham, D., Roth, A. D., Navarro, M., James, R. D., Karasek, P., ve ark. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet (London, England)*, 355(9209), 1041-1047.
- [216] Giacchetti, S., Perpoint, B., Zidani, R., Le Bail, N., Faggiuolo, R., Focan, C., ve ark. (2000). Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(1), 136-147.
- [217] Wohlhueter, R. M., McIvor, R. S. ve Plegemann, P. G. (1980). Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *Journal of cellular physiology*, 104(3), 309-319.
- [218] Diasio, R. B. ve Harris, B. E. (1989). Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clinical pharmacokinetics*, 16(4), 215-237.
- [219] Kocyigit, A. ve Guler, E. M. (2017). Curcumin induce DNA damage and apoptosis through generation of reactive oxygen species and reducing mitochondrial membrane potential in melanoma cancer cells. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 63(11), 97-105.
- [220] Ranieri, D., Avitabile, D., Shiota, M., Yokomizo, A., Naito, S., Bizzarri, M., ve ark. (2015). Nuclear redox imbalance affects circadian oscillation in HaCaT keratinocytes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 65, 113-124.
- [221] Ramanathan, C. ve Liu, A. C. (2018). Developing Mammalian Cellular Clock Models Using Firefly Luciferase Reporter. *Reporter Gene Assays* ss. 49-64): Springer.
- [222] Brullé, L., Vandamme, M., Riès, D., Martel, E., Robert, E., Lerondel, S., ve ark. (2012). Effects of a non thermal plasma treatment alone or in combination with gemcitabine in a MIA PaCa2-luc orthotopic pancreatic carcinoma model. *PloS one*, 7(12), e52653.
- [223] Crouch, S., Kozlowski, R., Slater, K. ve Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of immunological methods*, 160(1), 81-88.
- [224] Kocyigit, A., Guler, E. M., Karatas, E., Caglar, H. ve Bulut, H. (2018). Dose-dependent proliferative and cytotoxic effects of melatonin on human epidermoid carcinoma and normal skin fibroblast cells. *Mutation research*, 829-830, 50-60.

- [225] Singh, N. P., Danner, D. B., Tice, R. R., Brant, L. ve Schneider, E. L. (1990). DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutation Research/DNAging*, 237(3-4), 123-130.
- [226] Demirbag, R., Yilmaz, R., Gur, M., Kocyigit, A., Celik, H., Guzel, S., ve ark. (2005). Lymphocyte DNA damage in patients with acute coronary syndrome and its relationship with severity of acute coronary syndrome. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 578(1-2), 298-307.
- [227] Hartmann, A., Plappert, U., Raddata, K., Grünert-Fuchs, M. ve Speit, G. (1994). Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis*, 9(3), 269-272.
- [228] McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R. J., ve ark. (1995). The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods in cell biology* Cilt 46, ss. 153-185): Elsevier.
- [229] Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzel, E. ve Green, D. R. (2006). Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. *CSH protocols*, 2006(3).
- [230] Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. ve Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of immunological methods*, 184(1), 39-51.
- [231] Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. *The protein protocols handbook* ss. 17-24): Springer.
- [232] Wu, T., Qiang, L., Chen, F.-H., Zhao, Q., Yang, Z., Zou, M.-J., ve ark. (2011). LFG-500, a newly synthesized flavonoid, induced a reactive oxygen species-mitochondria-mediated apoptosis in hepatocarcinoma cells. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 1(2), 132-138.
- [233] Rottenberg, H. ve Wu, S. (1998). Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1404(3), 393-404.
- [234] Günes-Bayir, A., Kiziltan, H. S., Kocyigit, A., Güler, E. M., Karataş, E. ve Toprak, A. (2017). Effects of natural phenolic compound carvacrol on the human gastric adenocarcinoma (AGS) cells in vitro. *Anti-cancer drugs*, 28(5), 522-530.
- [235] Tian, X., Liu, K., Zu, X., Ma, F., Li, Z., Lee, M., ve ark. (2019). 3, 3'-Diindolylmethane inhibits patient-derived xenograft colon tumor growth by targeting COX1/2 and ERK1/2. *Cancer letters*, 448, 20-30.
- [236] Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, 37(4), 277-285.
- [237] Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103-1111.
- [238] Erel, O. ve Neselioglu, S. (2014). A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem*, 47(18), 326-332.
- [239] Debele, T. A., Lee, K.-Y., Hsu, N.-Y., Chiang, Y.-T., Yu, L.-Y., Shen, Y.-A., ve ark. (2017). A pH sensitive polymeric micelle for co-delivery of doxorubicin and α -TOS for colon cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(29), 5870-5880.
- [240] Hatiboglu, M. A., Kocyigit, A., Guler, E. M., Akdur, K., Khan, I., Nalli, A., ve ark. (2019). Thymoquinone enhances the effect of Gamma Knife in B16-F10 melanoma through inhibition of p-STAT3. *World neurosurgery*.
- [241] Leitão, R., Ribeiro, R., Bellaguarda, E., Macedo, F., Silva, L., Oriá, R., ve ark. (2007). Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 59(5), 603-612.

- [242] Lee, A. H., Happerfield, L. C., Bobrow, L. G. ve Millis, R. R. (1997). Angiogenesis and inflammation in ductal carcinoma in situ of the breast. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 181(2), 200-206.
- [243] Rouhollahi, E., Moghadamtousi, S. Z., Al-Henhena, N., Kunasegaran, T., Hasanpourghadi, M., Looi, C. Y., ve ark. (2015). The chemopreventive potential of *Curcuma purpurascens* rhizome in reducing azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats. *Drug design, development and therapy*, 9, 3911.
- [244] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ve ark. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
- [245] Longley, D. B., Harkin, D. P. ve Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews Cancer*, 3(5), 330-338.
- [246] Ahn, J.-Y., Lee, J.-S., Min, H.-Y. ve Lee, H.-Y. (2015). Acquired resistance to 5-fluorouracil via HSP90/Src-mediated increase in thymidylate synthase expression in colon cancer. *Oncotarget*, 6(32), 32622.
- [247] Hammond, W. A., Swaika, A. ve Mody, K. (2016). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Therapeutic advances in medical oncology*, 8(1), 57-84.
- [248] Stringer, A. M., Gibson, R. J., Bowen, J. M. ve Keefe, D. M. (2009). Chemotherapy-induced modifications to gastrointestinal microflora: evidence and implications of change. *Current drug metabolism*, 10(1), 79-83.
- [249] Phua, L. C., Mal, M., Koh, P. K., Cheah, P. Y., Chan, E. C. ve Ho, H. K. (2013). Investigating the role of nucleoside transporters in the resistance of colorectal cancer to 5-fluorouracil therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 71(3), 817-823.
- [250] Subbarayan, P. R., Sarkar, M., Nelson, G., Benitez, E., Singhal, S. ve Ardalan, B. (2010). Chronic exposure of colorectal cancer cells in culture to fluoropyrimidine analogs induces thymidylate synthase and suppresses p53. A molecular explanation for the mechanism of 5-FU resistance. *Anticancer research*, 30(4), 1149-1156.
- [251] Obrand, D. I. ve Gordon, P. H. (1997). Incidence and patterns of recurrence following curative resection for colorectal carcinoma. *Diseases of the colon & rectum*, 40(1), 15-24.
- [252] Vinod, B., Antony, J., Nair, H., Puliappadamba, V., Saikia, M., Narayanan, S. S., ve ark. (2013). Mechanistic evaluation of the signaling events regulating curcumin-mediated chemosensitization of breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Cell death & disease*, 4(2), e505.
- [253] James, M. I., Iwuji, C., Irving, G., Karmokar, A., Higgins, J. A., Griffin-Teal, N., ve ark. (2015). Curcumin inhibits cancer stem cell phenotypes in ex vivo models of colorectal liver metastases, and is clinically safe and tolerable in combination with FOLFOX chemotherapy. *Cancer letters*, 364(2), 135-141.
- [254] Toden, S., Tran, H.-M., Tovar-Camargo, O. A., Okugawa, Y. ve Goel, A. (2016). Epigallocatechin-3-gallate targets cancer stem-like cells and enhances 5-fluorouracil chemosensitivity in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(13), 16158.
- [255] Agbaria, R., Gabarin, A., Dahan, A. ve Ben-Shabat, S. (2015). Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed) and its relationship with the thermal processing and quinone composition of the seed. *Drug design, development and therapy*, 9, 3119.
- [256] Darakhshan, S., Pour, A. B., Colagar, A. H. ve Sisakhtnezhad, S. (2015). Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological research*, 95, 138-158.

- [257] Barakat, E. M. F., El Wakeel, L. M. ve Hagag, R. S. (2013). Effects of *Nigella sativa* on outcome of hepatitis C in Egypt. *World journal of gastroenterology: WJG*, 19(16), 2529.
- [258] Rahmani, A. H., Alzohairy, M. A., Khan, M. A. ve Aly, S. M. (2014). Therapeutic implications of black seed and its constituent thymoquinone in the prevention of cancer through inactivation and activation of molecular pathways. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- [259] AbuKhader, M. M. (2013). Thymoquinone in the clinical treatment of cancer: Fact or fiction? *Pharmacognosy reviews*, 7(14), 117.
- [260] Banerjee, S., Kaseb, A. O., Wang, Z., Kong, D., Mohammad, M., Padhye, S., ve ark. (2009). Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer research*, 69(13), 5575-5583.
- [261] Gali-Muhtasib, H., Roessner, A. ve Schneider-Stock, R. (2006). Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(8), 1249-1253.
- [262] Gali-Muhtasib, H., Diab-Assaf, M., Boltze, C., Al-Hmaira, J., Hartig, R., Roessner, A., ve ark. (2004). Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *International journal of oncology*, 25(4), 857-866.
- [263] Shoieb, A. M., Elgayyar, M., Dudrick, P. S., Bell, J. L. ve Tithof, P. K. (2003). In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *International journal of oncology*, 22(1), 107-113.
- [264] Woo, C. C., Kumar, A. P., Sethi, G. ve Tan, K. H. B. (2012). Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical pharmacology*, 83(4), 443-451.
- [265] Salem, M. L. (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International immunopharmacology*, 5(13-14), 1749-1770.
- [266] Randhawa, M. A. ve Alghamdi, M. S. (2011). Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed)—a review. *The American journal of Chinese medicine*, 39(06), 1075-1091.
- [267] Li, F., Rajendran, P. ve Sethi, G. (2010). Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. *British journal of pharmacology*, 161(3), 541-554.
- [268] Attoub, S., Sperandio, O., Raza, H., Arafat, K., Al-Salam, S., Al Sultan, M. A., ve ark. (2013). Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(5), 557-569.
- [269] Kundu, J., Chun, K.-S., Aruoma, O. I. ve Kundu, J. K. (2014). Mechanistic perspectives on cancer chemoprevention/chemotherapeutic effects of thymoquinone. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 768, 22-34.
- [270] Rooney, S. ve Ryan, M. (2005). Effects of alpha-hederin and thymoquinone, constituents of *Nigella sativa*, on human cancer cell lines. *Anticancer research*, 25(3B), 2199-2204.
- [271] Schneider-Stock, R., Fakhoury, I. H., Zaki, A. M., El-Baba, C. O. ve Gali-Muhtasib, H. U. (2014). Thymoquinone: fifty years of success in the battle against cancer models. *Drug discovery today*, 19(1), 18-30.
- [272] Woo, C. C., Loo, S. Y., Gee, V., Yap, C. W., Sethi, G., Kumar, A. P., ve ark. (2011). Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR- γ pathway. *Biochemical pharmacology*, 82(5), 464-475.

- [273] Khalife, R., Hodroj, M. H., Fakhoury, R. ve Rizk, S. (2016). Thymoquinone from *Nigella sativa* seeds promotes the antitumor activity of noncytotoxic doses of topotecan in human colorectal cancer cells in vitro. *Planta medica*, 82(04), 312-321.
- [274] Akhondian, J., Kianifar, H., Raofziae, M., Moayedpour, A., Toosi, M. B. ve Khajedaluee, M. (2011). The effect of thymoquinone on intractable pediatric seizures (pilot study). *Epilepsy research*, 93(1), 39-43.
- [275] Chen, M.-C., Lee, N.-H., Hsu, H.-H., Ho, T.-J., Tu, C.-C., Hsieh, D. J.-Y., ve ark. (2015). Thymoquinone induces caspase-independent, autophagic cell death in CPT-11-resistant lovo colon cancer via mitochondrial dysfunction and activation of JNK and p38. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(5), 1540-1546.
- [276] Nessa, M. U., Beale, P., Chan, C., Yu, J. Q. ve Huq, F. (2011). Synergism from combinations of cisplatin and oxaliplatin with quercetin and thymoquinone in human ovarian tumour models. *Anticancer research*, 31(11), 3789-3797.
- [277] Jafri, S. H., Glass, J., Shi, R., Zhang, S., Prince, M. ve Kleiner-Hancock, H. (2010). Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: In vitro and in vivo. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29(1), 87.
- [278] Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M.-C., Eck, M. J., Mayer, B. J., ve ark. (2000). Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell*, 102(3), 387-397.
- [279] Kensara, O. A., El-Shemi, A. G., Mohamed, A. M., Refaat, B., Idris, S. ve Ahmad, J. (2016). Thymoquinone subdues tumor growth and potentiates the chemopreventive effect of 5-fluorouracil on the early stages of colorectal carcinogenesis in rats. *Drug design, development and therapy*, 10, 2239.
- [280] Ndrashkjana, B., Çapci, A., Klein, V., Chanvorachote, P., Muenzner, J. K., Huebner, K., ve ark. (2019). Combination of 5-fluorouracil and thymoquinone targets stem cell gene signature in colorectal cancer cells. *Cell death & disease*, 10(6), 379.
- [281] Bronner, C., Achour, M., Arima, Y., Chataigneau, T., Saya, H. ve Schini-Kerth, V. B. (2007). The UHRF family: oncogenes that are drugable targets for cancer therapy in the near future? *Pharmacology & therapeutics*, 115(3), 419-434.
- [282] Unoki, M., Kelly, J., Neal, D., Ponder, B., Nakamura, Y. ve Hamamoto, R. (2009). UHRF1 is a novel molecular marker for diagnosis and the prognosis of bladder cancer. *British journal of cancer*, 101(1), 98.
- [283] Acar, M., Gunduz, M., Ocak, T., Gurses, H. E., Cetin, E. N., Ceylan, F. S., ve ark. (2015). Investigation of the effects of 5-fluorouracil and thymoquinone on head and neck cancer stem cells. *Clinical and Investigative Medicine (Online)*, 38(4), E209.
- [284] Williams, S., Tucci, M. ve Benghuzzi, H. (2014). The effect of combination treatments of epigallocatechin-3-gallate, thymoquinone, and 5-Fluorouracil on fadu nasopharyngeal carcinoma cells. *Biomedical sciences instrumentation*, 50, 361-366.
- [285] Lei, X., Lv, X., Liu, M., Yang, Z., Ji, M., Guo, X., ve ark. (2012). Thymoquinone inhibits growth and augments 5-fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells both in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 417(2), 864-868.
- [286] Gopalakrishnan, B., Nash, K. M., Velayutham, M. ve Villamena, F. A. (2012). Detection of nitric oxide and superoxide radical anion by electron paramagnetic resonance spectroscopy from cells using spin traps. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (66), e2810.
- [287] Shyu, K.-G., Chang, C.-C., Yeh, Y.-C., Sheu, J.-R. ve Chou, D.-S. (2014). Mechanisms of ascorbyl radical formation in human platelet-rich plasma. *BioMed research international*, 2014.

- [288] Wilhelm, M., Mueller, L., Miller, M. C., Link, K., Holdenrieder, S., Bertsch, T., ve ark. (2016). Prospective, multicenter study of 5-fluorouracil therapeutic drug monitoring in metastatic colorectal cancer treated in routine clinical practice. *Clinical colorectal cancer*, 15(4), 381-388.
- [289] Durak, L., Karaayvaz, M., Kavutcu, M., Cimen, M. B., Kacmaz, M., Buyukkocak, S., ve ark. (2000). Reduced antioxidant defense capacity in myocardial tissue from guinea pigs treated with 5-fluorouracil. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 59(7), 585-589.
- [290] Jeanblanc, M., Mousli, M., Hopfner, R., Bathami, K., Martinet, N., Abbady, A.-Q., ve ark. (2005). The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle. *Oncogene*, 24(49), 7337.
- [291] Achour, M., Jacq, X., Ronde, P., Alhosin, M., Charlot, C., Chataigneau, T., ve ark. (2008). The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of VEGF gene expression. *Oncogene*, 27(15), 2187.
- [292] Khan, M. A., Tania, M., Fu, S. ve Fu, J. (2017). Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation. *Oncotarget*, 8(31), 51907.
- [293] El-Najjar, N., Chatila, M., Moukadem, H., Vuorela, H., Ocker, M., Gandesiri, M., ve ark. (2010). Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling. *Apoptosis*, 15(2), 183-195.
- [294] Salim, L., Mohan, S., Othman, R., Abdelwahab, S., Kamalidehghan, B., Sheikh, B., ve ark. (2013). Thymoquinone induces mitochondria-mediated apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia in vitro. *Molecules*, 18(9), 11219-11240.
- [295] Roepke, M., Diestel, A., Bajbouj, K., Walluscheck, D., Schonfeld, P., Roessner, A., ve ark. (2007). Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer biology & therapy*, 6(2), 160-169.
- [296] Carethers, J. M., Chauhan, D. P., Fink, D., Nebel, S., Bresalier, R. S., Howell, S. B., ve ark. (1999). Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology*, 117(1), 123-131.
- [297] Tajima, A., Hess, M. T., Cabrera, B. L., Kolodner, R. D. ve Carethers, J. M. (2004). The mismatch repair complex hMutS α recognizes 5-fluorouracil-modified DNA: Implications for chemosensitivity and resistance. *Gastroenterology*, 127(6), 1678-1684.
- [298] Meyers, M., Wagner, M. W., Mazurek, A., Schmutte, C., Fishel, R. ve Boothman, D. A. (2005). DNA mismatch repair-dependent response to fluoropyrimidine-generated damage. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5516-5526.
- [299] Gurung, R. L., Lim, S. N., Khaw, A. K., Soon, J. F. F., Shenoy, K., Ali, S. M., ve ark. (2010). Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells. *PloS one*, 5(8), e12124.
- [300] Fernandez-Checa, J., García-Ruiz, C., Colell, A., Morales, A., Mari, M., Miranda, M., ve ark. (1998). Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors*, 8(1-2), 7-11.
- [301] Anderson, C., Tsai, J., Chan, W., Park, C., Tian, L., Lui, R., ve ark. (1997). Buthionine sulphoximine alone and in combination with melphalan (L-PAM) is highly cytotoxic for human neuroblastoma cell lines. *European journal of cancer*, 33(12), 2016-2019.
- [302] Gartenhaus, R. B., Prachand, S. N., Paniaqua, M., Li, Y. ve Gordon, L. I. (2002). Arsenic trioxide cytotoxicity in steroid and chemotherapy-resistant myeloma cell lines: enhancement of apoptosis by manipulation of cellular redox state. *Clinical Cancer Research*, 8(2), 566-572.

- [303] **Mårtensson, J., Jain, A., Frayer, W. ve Meister, A.** (1989). Glutathione metabolism in the lung: inhibition of its synthesis leads to lamellar body and mitochondrial defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(14), 5296-5300.
- [304] **Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., ve ark.** (2007). A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer cell*, 11(1), 37-51.
- [305] **Warburg, O.** (1956). On the origin of cancer cells. *Science (New York, NY)*, 123(3191), 309-314.
- [306] **Koppenol, W. H., Bounds, P. L. ve Dang, C. V.** (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(5), 325.
- [307] **Ward, P. S. ve Thompson, C. B.** (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer cell*, 21(3), 297-308.
- [308] **Mitchell, P.** (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews*, 41(3), 445-501.
- [309] **Glagolev, A. ve Skulachev, V.** (1978). The proton pump is a molecular engine of motile bacteria. *Nature*, 272(5650), 280.
- [310] **Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., ve ark.** (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *Journal of Experimental Medicine*, 182(2), 367-377.
- [311] **Yaniv, Y., Juhaszova, M., Nuss, H. B., Wang, S., Zorov, D. B., Lakatta, E. G., ve ark.** (2010). Matching ATP supply and demand in mammalian heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1188(1), 133-142.
- [312] **Zorov, D. B., Juhaszova, M. ve Sollott, S. J.** (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*, 94(3), 909-950.
- [313] **Izyumov, D. S., Avetisyan, A. V., Pletjushkina, O. Y., Sakharov, D. V., Wirtz, K. W., Chernyak, B. V., ve ark.** (2004). "Wages of fear": transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1658(1-2), 141-147.
- [314] **Rajput, S., Kumar, B. P., Dey, K. K., Pal, I., Parekh, A. ve Mandal, M.** (2013). Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G1 arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells. *Life sciences*, 93(21), 783-790.
- [315] **Arafa, E.-S. A., Zhu, Q., Shah, Z. I., Wani, G., Barakat, B. M., Racoma, I., ve ark.** (2011). Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 706(1-2), 28-35.
- [316] **Effenberger-Neidnicht, K. ve Schobert, R.** (2011). Combinatorial effects of thymoquinone on the anti-cancer activity of doxorubicin. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 67(4), 867-874.
- [317] **Grivicich, I., Regner, A., da Rocha, A. B., Grass, L. B., Alves, P. A., Kayser, G. B., ve ark.** (2005). Irinotecan/5-fluorouracil combination induces alterations in mitochondrial membrane potential and caspases on colon cancer cell lines. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 15(7-8), 385-392.
- [318] **Hu, X. Y., Liang, J. Y., Guo, X. J., Liu, L. ve Guo, Y. B.** (2015). 5-Fluorouracil combined with apigenin enhances anticancer activity through mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(2), 146-153.
- [319] **Lockshin, R. A. ve Williams, C. M.** (1965). Programmed cell death—I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkmoth. *Journal of insect physiology*, 11(2), 123-133.

- [320] Cotter, T. G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, 9(7), 501.
- [321] Kerr, A. H. W. " Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics"(1972), by John FR Kerr, Andrew H. Wyllie and Alastair R. Currie.
- [322] Richards, L., Jones, P., Hughes, J., Benghuzzi, H. ve Tucci, M. (2006). The physiological effect of conventional treatment with epigallocatechin-3-gallate, thymoquinone, and tannic acid on the LNCaP cell line. *Biomedical sciences instrumentation*, 42, 357-362.
- [323] Richards, L. R., Jones, P., Benghuzzi, H. ve Tucci, M. (2008). A comparison of the morphological changes associated with conventional and sustained treatment with pigallocatechin3gallate, thymoquinone, and tannic acid on lncap cells. *Biomed Sci Instrum*, 44, 465-470.
- [324] Hussain, A. R., Ahmed, M., Ahmed, S., Manogaran, P., Plataniias, L. C., Alvi, S. N., ve ark. (2011). Thymoquinone suppresses growth and induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in primary effusion lymphoma. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(8), 978-987.
- [325] Dergarabetian, E., Ghattass, K., El-Sitt, S., Al-Mismar, R., El-Baba, C., Itani, W., ve ark. (2013). Thymoquinone induces apoptosis in malignant T-cells via generation of ROS. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 5, 706-719.
- [326] Cecarini, V., Quassinti, L., Di Blasio, A., Bonfilii, L., Bramucci, M., Lupidi, G., ve ark. (2010). Effects of thymoquinone on isolated and cellular proteasomes. *The FEBS journal*, 277(9), 2128-2141.
- [327] Torres, M. P., Ponnusamy, M. P., Chakraborty, S., Smith, L. M., Das, S., Arafat, H. A., ve ark. (2010). Effects of thymoquinone in the expression of mucin 4 in pancreatic cancer cells: implications for the development of novel cancer therapies. *Molecular cancer therapeutics*, 9(5), 1419-1431.
- [328] El-Ghany, R., Sharaf, N., Kassem, L., Mahran, L. ve Heikal, O. (2009). Thymoquinone triggers anti-apoptotic signaling targeting death ligand and apoptotic regulators in a model of hepatic ischemia reperfusion injury. *Drug Discov Ther*, 3(6), 296-306.
- [329] Zubair, H., Khan, H., Sohail, A., Azim, S., Ullah, M., Ahmad, A., ve ark. (2013). Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants. *Cell death & disease*, 4(6), e660.
- [330] Li, J., Hou, N., Faried, A., Tsutsumi, S., Takeuchi, T. ve Kuwano, H. (2009). Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. *Annals of surgical oncology*, 16(3), 761-771.
- [331] Nita, M. E., Nagawa, H., Tominaga, O., Tsuno, N., Fujii, S., Sasaki, S., ve ark. (1998). 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *British journal of cancer*, 78(8), 986.
- [332] Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Molecular cell*, 7(3), 673-682.
- [333] Zhang, H., Tang, J., Li, C., Kong, J., Wang, J., Wu, Y., ve ark. (2015). MiR-22 regulates 5-FU sensitivity by inhibiting autophagy and promoting apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer letters*, 356(2), 781-790.
- [334] Buhrmann, C., Yazdi, M., Popper, B., Shayan, P., Goel, A., Aggarwal, B., ve ark. (2018). Resveratrol Chemosensitizes TNF- β -induced survival of 5-FU-treated colorectal Cancer cells. *Nutrients*, 10(7), 888.
- [335] Chen, S., Wang, P., Pan, Y. ve Liu, Y. 2018. Inhibition of cystathionine- β -synthase (CBS) sensitizes colon cancer cells to 5-FU via increasing apoptosis and inhibiting cellular bioenergetics. *AACR*; s.
- [336] Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.

- [337] Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O. ve Irimie, A. (2009). Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta oncologica*, 48(6), 811-821.
- [338] Martin, S. J. ve Green, D. R. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, 82(3), 349-352.
- [339] Caffo, O., Doglioni, C., Veronese, S., Bonzanini, M., Marchetti, A., Buttitta, F., ve ark. (1996). Prognostic value of p21 (WAF1) and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up. *Clinical cancer research*, 2(9), 1591-1599.
- [340] Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B. (1996). Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature*, 381(6584), 713.
- [341] Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Yu, J., Kinzler, K., Vogelstein, B., ve ark. (1997). Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nature medicine*, 3(9), 1034.
- [342] Polyak, K., Waldman, T., He, T.-C., Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B. (1996). Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes & development*, 10(15), 1945-1952.
- [343] Tian, H., Wittmack, E. K. ve Jorgensen, T. J. (2000). p21WAF1/CIP1 antisense therapy radiosensitizes human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis. *Cancer research*, 60(3), 679-684.
- [344] Ruan, S., Okcu, M. F., Pong, R.-C., Andreeff, M., Levin, V., Hsieh, J.-T., ve ark. (1999). Attenuation of WAF1/Cip1 expression by an antisense adenovirus expression vector sensitizes glioblastoma cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cisplatin. *Clinical cancer research*, 5(1), 197-202.
- [345] Mahyar-Roemer, M. ve Roemer, K. (2001). p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene*, 20(26), 3387.
- [346] Xu, G. W., Nutt, C. L., Zlatescu, M. C., Keeney, M., Chin-Yee, I. ve Cairncross, J. G. (2001). Inactivation of p53 sensitizes U87MG glioma cells to 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer research*, 61(10), 4155-4159.
- [347] Matés, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J. ve Márquez, J. (2008). Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Archives of toxicology*, 82(5), 273-299.
- [348] Worthen, D. R., Ghosheh, O. A. ve Crooks, P. (1998). The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer research*, 18(3A), 1527-1532.
- [349] Gali-Muhtasib, H. U., Kheir, W. G. A., Kheir, L. A., Darwiche, N. ve Crooks, P. A. (2004). Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anti-cancer drugs*, 15(4), 389-399.
- [350] Gali-Muhtasib, H., Kuester, D., Mawrin, C., Bajbouj, K., Diestel, A., Ocker, M., ve ark. (2008). Thymoquinone triggers inactivation of the stress response pathway sensor CHEK1 and contributes to apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer research*, 68(14), 5609-5618.
- [351] Citterio, E., Papait, R., Nicassio, F., Vecchi, M., Gomiero, P., Mantovani, R., ve ark. (2004). Np95 is a histone-binding protein endowed with ubiquitin ligase activity. *Molecular and cellular biology*, 24(6), 2526-2535.
- [352] Bostick, M., Kim, J. K., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S. ve Jacobsen, S. E. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science (New York, NY)*, 317(5845), 1760-1764.
- [353] Hector, S. ve Prehn, J. H. (2009). Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1795(2), 117-129.

- [354] Trachana, S.-P., Pilalis, E., Gavalas, N. G., Tzannis, K., Papadodima, O., Lontos, M., ve ark. (2016). The Development of an Angiogenic Protein “Signature” in Ovarian Cancer Ascites as a Tool for Biologic and Prognostic Profiling. *PloS one*, 11(6), e0156403.
- [355] Folkman, J. (1972). Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Annals of surgery*, 175(3), 409.
- [356] Huang, Y.-J., Qi, W.-X., He, A.-N., Sun, Y.-J., Shen, Z. ve Yao, Y. (2013). Prognostic value of tissue vascular endothelial growth factor expression in bladder cancer: a meta-analysis. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 14(2), 645-649.
- [357] Adams, J., Carder, P. J., Downey, S., Forbes, M. A., MacLennan, K., Allgar, V., ve ark. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer research*, 60(11), 2898-2905.
- [358] Shih, C.-H., Ozawa, S., Ando, N., Ueda, M. ve Kitajima, M. (2000). Vascular endothelial growth factor expression predicts outcome and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clinical Cancer Research*, 6(3), 1161-1168.
- [359] Mineta, H., Miura, K., Ogino, T., Takebayashi, S., Misawa, K., Ueda, Y., ve ark. (2000). Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas. *British journal of cancer*, 83(6), 775.
- [360] Carmeliet, P. ve Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *nature*, 407(6801), 249.
- [361] Hashemi Goradel, N., Ghiyami-Hour, F., Jahangiri, S., Negahdari, B., Sahebkar, A., Masoudifar, A., ve ark. (2018). Nanoparticles as new tools for inhibition of cancer angiogenesis. *Journal of cellular physiology*, 233(4), 2902-2910.
- [362] Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. ve Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, 2(3), 213.
- [363] Massagué, J. (2008). TGF β in cancer. *Cell*, 134(2), 215-230.
- [364] Geiser, A. G., Letterio, J. J., Kulkarni, A. B., Karlsson, S., Roberts, A. B. ve Sporn, M. B. (1993). Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) controls expression of major histocompatibility genes in the postnatal mouse: aberrant histocompatibility antigen expression in the pathogenesis of the TGF-beta 1 null mouse phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(21), 9944-9948.
- [365] Parveen, A., Subedi, L., Kim, H. W., Khan, Z., Zahra, Z., Farooqi, M. Q., ve ark. (2019). Phytochemicals Targeting VEGF and VEGF-Related Multifactors as Anticancer Therapy. *Journal of clinical medicine*, 8(3), 350.
- [366] Rashid, M., Sanjarin, F. ve Sabouni, F. (2019). Thymoquinone Effects on Cell Viability, Apoptosis and VEGF-A Gene Expression Level in AGS (CRL-1739) Cell Line. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*.
- [367] Peng, L., Liu, A., Shen, Y., Xu, H.-Z., Yang, S.-Z., Ying, X.-Z., ve ark. (2013). Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF- κ B pathway. *Oncology reports*, 29(2), 571-578.
- [368] Hanahan, D., Bergers, G. ve Bergsland, E. (2000). Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation*, 105(8), 1045-1047.
- [369] Browder, T., Butterfield, C. E., Kräling, B. M., Shi, B., Marshall, B., O'Reilly, M. S., ve ark. (2000). Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer research*, 60(7), 1878-1886.
- [370] Albertsson, P., Lennernäs, B. ve Norrby, K. (2006). On metronomic chemotherapy: modulation of angiogenesis mediated by VEGF-A. *Acta Oncologica*, 45(2), 144-155.

- [371] Dreves, J., Fakler, J., Eisele, S., Medinger, M., Bing, G., Esser, N., ve ark. (2004). Antiangiogenic potency of various chemotherapeutic drugs for metronomic chemotherapy. *Anticancer Research*, 24(3A), 1759-1764.
- [372] Chambers, A. F., Groom, A. C. ve MacDonald, I. C. (2002). Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 563.
- [373] Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 453.
- [374] Steeg, P. S. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*, 12(8), 895-904.
- [375] Wirtz, D., Konstantopoulos, K. ve Searson, P. C. (2011). The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nature reviews Cancer*, 11(7), 512-522.
- [376] Rosa, R., Monteleone, F., Zambrano, N. ve Bianco, R. (2014). In vitro and in vivo models for analysis of resistance to anticancer molecular therapies. *Current medicinal chemistry*, 21(14), 1595-1606.
- [377] Cekanova, M. ve Rathore, K. (2014). Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Des Devel Ther*, 8, 1911-1921.
- [378] Politi, K. ve Pao, W. (2011). How genetically engineered mouse tumor models provide insights into human cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 29(16), 2273.
- [379] Denayer, T., Stöhr, T. ve Van Roy, M. (2014). Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine*, 2(1), 5-11.
- [380] Massoud, T. F. ve Gambhir, S. S. (2003). Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & development*, 17(5), 545-580.
- [381] Gambhir, S. S. (2002). Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 683.
- [382] Weissleder, R. (2006). Molecular imaging in cancer. *Science (New York, NY)*, 312(5777), 1168-1171.
- [383] Weissleder, R. (2002). Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 11.
- [384] Weissleder, R. ve Ntziachristos, V. (2003). Shedding light onto live molecular targets. *Nature medicine*, 9(1), 123.
- [385] Sutton, K. M., Greenshields, A. L. ve Hoskin, D. W. (2014). Thymoquinone, a bioactive component of black caraway seeds, causes G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in triple-negative breast cancer cells with mutant p53. *Nutrition and cancer*, 66(3), 408-418.
- [386] Yang, J., Kuang, X.-r., Lv, P.-t. ve Yan, X.-x. (2015). Thymoquinone inhibits proliferation and invasion of human nonsmall-cell lung cancer cells via ERK pathway. *Tumor Biology*, 36(1), 259-269.
- [387] Kodappully Sivaraman Siveen, N. M., Li, F., Kannaiyan, R., Ahn, K. S., Kumar, A. P., Chng, W.-J., ve ark. (2014). Thymoquinone overcomes chemoresistance and enhances the anticancer effects of bortezomib through abrogation of NF- κ B regulated gene products in multiple myeloma xenograft mouse model. *Oncotarget*, 5(3), 634.
- [388] Seyithanoğlu, M. H., Abdallah, A., Kitiş, S., Güler, E. M., Koçyiğit, A., Dündar, T. T., ve ark. (2019). Investigation of cytotoxic, genotoxic, and apoptotic effects of curcumin on glioma cells. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 65(3), 101-108.
- [389] Racoma, I. O., Meisen, W. H., Wang, Q.-E., Kaur, B. ve Wani, A. A. (2013). Thymoquinone inhibits autophagy and induces cathepsin-mediated, caspase-independent cell death in glioblastoma cells. *PloS one*, 8(9), e72882.

- [390] Mu, G.-g., Zhang, L.-l., Li, H.-y., Liao, Y. ve Yu, H.-g. (2015). Thymoquinone pretreatment overcomes the insensitivity and potentiates the antitumor effect of gemcitabine through abrogation of Notch1, PI3K/Akt/mTOR regulated signaling pathways in pancreatic cancer. *Digestive diseases and sciences*, 60(4), 1067-1080.
- [391] Ichwan, S., Al-Ani, I. M., Bilal, H. G., Suriyah, W. H., Taher, M. ve Ikeda, M. A. (2014). Apoptotic activities of thymoquinone, an active ingredient of black seed (*Nigella sativa*), in cervical cancer cell lines. *Chin J Physiol*, 57(5), 249-255.
- [392] El-Baba, C., Mahadevan, V., Fahlbusch, F. B., Rau, T. T., Gali-Muhtasib, H. ve Schneider-Stock, R. (2014). Thymoquinone-induced conformational changes of PAK1 interrupt prosurvival MEK-ERK signaling in colorectal cancer. *Molecular cancer*, 13(1), 201.
- [393] Chu, S.-C., Hsieh, Y.-S., Yu, C.-C., Lai, Y.-Y. ve Chen, P.-N. (2014). Thymoquinone induces cell death in human squamous carcinoma cells via caspase activation-dependent apoptosis and LC3-II activation-dependent autophagy. *PLoS one*, 9(7), e101579.
- [394] Ashour, A. E., Abd-Allah, A. R., Korashy, H. M., Attia, S. M., Alzahrani, A. Z., Saquib, Q., ve ark. (2014). Thymoquinone suppression of the human hepatocellular carcinoma cell growth involves inhibition of IL-8 expression, elevated levels of TRAIL receptors, oxidative stress and apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry*, 389(1-2), 85-98.
- [395] Paramasivam, A., Sambantham, S., Shabnam, J., Raghunandhakumar, S., Anandan, B., Rajiv, R., ve ark. (2012). Anti-cancer effects of thymoquinone in mouse neuroblastoma (Neuro-2a) cells through caspase-3 activation with down-regulation of XIAP. *Toxicology letters*, 213(2), 151-159.
- [396] Mu, H., Yang, S., Wang, Y. ve Chen, Y. (2012). Role of NF- κ B in the anti-tumor effect of thymoquinone on bladder cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 92(6), 392-396.
- [397] Dirican, A., Atmaca, H., Bozkurt, E., Erten, C., Karaca, B. ve Uslu, R. (2015). Novel combination of docetaxel and thymoquinone induces synergistic cytotoxicity and apoptosis in DU-145 human prostate cancer cells by modulating PI3K-AKT pathway. *Clinical and Translational Oncology*, 17(2), 145-151.
- [398] Woo, C. C., Hsu, A., Kumar, A. P., Sethi, G. ve Tan, K. H. B. (2013). Thymoquinone inhibits tumor growth and induces apoptosis in a breast cancer xenograft mouse model: the role of p38 MAPK and ROS. *PLoS one*, 8(10), e75356.
- [399] Khan, M. A., Tania, M., Wei, C., Mei, Z., Fu, S., Cheng, J., ve ark. (2015). Thymoquinone inhibits cancer metastasis by downregulating TWIST1 expression to reduce epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget*, 6(23), 19580.
- [400] Connelly, L., Barham, W., Onishko, H. M., Sherrill, T., Chodosh, L. A., Blackwell, T. S., ve ark. (2011). Inhibition of NF-kappa B activity in mammary epithelium increases tumor latency and decreases tumor burden. *Oncogene*, 30(12), 1402.
- [401] Yi, T., Cho, S.-G., Yi, Z., Pang, X., Rodriguez, M., Wang, Y., ve ark. (2008). Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular cancer therapeutics*, 7(7), 1789-1796.
- [402] Shim, I. K., Yi, H.-J., Yi, H.-G., Lee, C. M., Lee, Y. N., Choi, Y.-J., ve ark. (2017). Locally-applied 5-fluorouracil-loaded slow-release patch prevents pancreatic cancer growth in an orthotopic mouse model. *Oncotarget*, 8(25), 40140.
- [403] Ivankovic, S., Stojkovic, R., Jukic, M. ve Milos, M. (2006). The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone in vitro and in vivo. *Experimental oncology*.

- [404] Xu, D., Ma, Y., Zhao, B., Li, S., Zhang, Y., Pan, S., ve ark. (2014). Thymoquinone induces G2/M arrest, inactivates PI3K/Akt and nuclear factor- κ B pathways in human cholangiocarcinomas both in vitro and in vivo. *Oncology reports*, 31(5), 2063-2070.
- [405] Zhu, W.-Q., Wang, J., Guo, X.-F., Liu, Z. ve Dong, W.-G. (2016). Thymoquinone inhibits proliferation in gastric cancer via the STAT3 pathway in vivo and in vitro. *World journal of gastroenterology*, 22(16), 4149.
- [406] Han, S. ve Youker, S. (2011). Metallic taste as a side effect of topical fluorouracil use. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 10(10), 1201-1203.
- [407] Sommer, J., Mahli, A., Freese, K., Schiergens, T. S., Kuecukoktay, F. S., Teufel, A., ve ark. (2017). Analysis of molecular mechanisms of 5-fluorouracil-induced steatosis and inflammation in vitro and in mice. *Oncotarget*, 8(8), 13059.
- [408] Nili-Ahmadabadi, A., Alibolandi, P., Ranjbar, A., Mousavi, L., Nili-Ahmadabadi, H., Larki-Harchegani, A., ve ark. (2018). Thymoquinone attenuates hepatotoxicity and oxidative damage caused by diazinon: an in vivo study. *Research in pharmaceutical sciences*, 13(6), 500.
- [409] Mansour, M. A., Nagi, M. N., El-Khatib, A. S. ve Al-Bekairi, A. M. (2002). Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell biochemistry and function*, 20(2), 143-151.
- [410] El-Dakhakhny, M., Madi, N., Lember, N. ve Ammon, H. (2002). Nigella sativa oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of ethnopharmacology*, 81(2), 161-164.
- [411] Zhou, L.-H., Hu, Q., Sui, H., Ci, S.-J., Wang, Y., Liu, X., ve ark. (2012). Tanshinone II-a inhibits angiogenesis through down regulation of COX-2 in human colorectal cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(9), 4453-4458.
- [412] Jrah Harzallah, H., Grayaa, R., Kharoubi, W., Maaloul, A., Hammami, M. ve Mahjoub, T. (2012). Thymoquinone, the Nigella sativa bioactive compound, prevents circulatory oxidative stress caused by 1, 2-dimethylhydrazine in erythrocyte during colon postinitiation carcinogenesis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012.
- [413] Irie, T., Tsujii, M., Tsuji, S., Yoshio, T., Ishii, S., Shinzaki, S., ve ark. (2007). Synergistic antitumor effects of celecoxib with 5-fluorouracil depend on IFN- γ . *International journal of cancer*, 121(4), 878-883.
- [414] Voboril, R., Hochwald, S. N., Li, J., Brank, A., Weberova, J., Wessels, F., ve ark. (2004). Inhibition of NF-Kappa B augments sensitivity to 5-Fluorouracil/Folinic acid in colon cancer1. *Journal of Surgical Research*, 120(2), 178-188.
- [415] Ranger, G. S. (2014). Current concepts in colorectal cancer prevention with cyclooxygenase inhibitors. *Anticancer research*, 34(11), 6277-6282.
- [416] Asfour, W., Almadi, S. ve Haffar, L. (2013). Thymoquinone suppresses cellular proliferation, inhibits VEGF production and obstructs tumor progression and invasion in the rat model of DMH-induced colon carcinogenesis. *Pharmacology & Pharmacy*, 4(01), 7.
- [417] Smith, A. L., Robin, T. P. ve Ford, H. L. (2012). Molecular pathways: targeting the TGF- β pathway for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 18(17), 4514-4521.
- [418] Principe, D. R., Doll, J. A., Bauer, J., Jung, B., Munshi, H. G., Bartholin, L., ve ark. (2014). TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 106(2).

- [419] Hahm, K. B., Lee, K., Kim, Y., Hong, W., Lee, W., Han, S., ve ark. (2002). Conditional loss of TGF- β signalling leads to increased susceptibility to gastrointestinal carcinogenesis in mice. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 16, 115-127.
- [420] Zhang, Q., Yu, N. ve Lee, C. (2014). Mysteries of TGF- β paradox in benign and malignant cells. *Frontiers in oncology*, 4, 94.
- [421] Romano, G., Santi, L., Bianco, M. R., Giuffrè, M. R., Pettinato, M., Bugarin, C., ve ark. (2016). The TGF- β pathway is activated by 5-fluorouracil treatment in drug resistant colorectal carcinoma cells. *Oncotarget*, 7(16), 22077.
- [422] Lin, W.-W. ve Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1175-1183.
- [423] Folkman, J., Year editör^editörler. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Seminars in oncology; 2002: Elsevier; Published.
- [424] Balkwill, F. ve Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *The lancet*, 357(9255), 539-545.
- [425] Wang, K. ve Karin, M. (2015). Tumor-elicited inflammation and colorectal cancer. *Advances in cancer research* Cilt 128, ss. 173-196): Elsevier.
- [426] Diakos, C. I., Charles, K. A., McMillan, D. C. ve Clarke, S. J. (2014). Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *The Lancet Oncology*, 15(11), e493-e503.
- [427] Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. ve Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436.
- [428] Bonavita, E., Galdiero, M. R., Jaillon, S. ve Mantovani, A. (2015). Phagocytes as corrupted policemen in cancer-related inflammation. *Advances in cancer research* Cilt 128, ss. 141-171): Elsevier.
- [429] Chauhan, V. P., Martin, J. D., Liu, H., Lacorre, D. A., Jain, S. R., Kozin, S. V., ve ark. (2013). Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. *Nature communications*, 4, 2516.
- [430] Stylianopoulos, T., Martin, J. D., Chauhan, V. P., Jain, S. R., Diop-Frimpong, B., Bardeesy, N., ve ark. (2012). Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38), 15101-15108.
- [431] Bromberg, J. ve Wang, T. C. (2009). Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer cell*, 15(2), 79-80.
- [432] Shanmugam, M. K., Manu, K. A., Ong, T. H., Ramachandran, L., Surana, R., Bist, P., ve ark. (2011). Inhibition of CXCR4/CXCL12 signaling axis by ursolic acid leads to suppression of metastasis in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *International journal of cancer*, 129(7), 1552-1563.
- [433] Mousli, M., Hopfner, R., Abbady, A., Monte, D., Jeanblanc, M., Oudet, P., ve ark. (2003). ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells. *British journal of cancer*, 89(1), 120.
- [434] Jenkins, Y., Markovtsov, V., Lang, W., Sharma, P., Pearsall, D., Warner, J., ve ark. (2005). Critical role of the ubiquitin ligase activity of UHRF1, a nuclear RING finger protein, in tumor cell growth. *Molecular biology of the cell*, 16(12), 5621-5629.
- [435] Ďuračková, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological research*, 59(4).
- [436] Jabs, T. (1999). Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical pharmacology*, 57(3), 231-245.
- [437] Poyton, R. O., Ball, K. A. ve Castello, P. R. (2009). Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(7), 332-340.

- [438] Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science (New York, NY)*, 201(4359), 875-880.
- [439] Goossens, V., Vos, K. D., Vercammen, D., Steemans, M., Vancompernelle, K., Fiers, W., ve ark. (1999). Redox regulation of TNF signaling. *Biofactors*, 10(2-3), 145-156.
- [440] Goossens, V., Grooten, J., De Vos, K. ve Fiers, W. (1995). Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8115-8119.
- [441] Hussain, S. P., Hofseth, L. J. ve Harris, C. C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(4), 276.
- [442] Schraufstatter, I., Hyslop, P. A., Jackson, J. H. ve Cochrane, C. G. (1988). Oxidant-induced DNA damage of target cells. *The Journal of clinical investigation*, 82(3), 1040-1050.
- [443] Fang, J., Seki, T. ve Maeda, H. (2009). Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Advanced drug delivery reviews*, 61(4), 290-302.
- [444] Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P. ve Koul, H. K. (2009). Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer letters*, 282(2), 125-136.
- [445] Visconti, R. ve Grieco, D. (2009). New insights on oxidative stress in cancer. *Current opinion in drug discovery & development*, 12(2), 240-245.
- [446] Ames, B. ve Gold, L. (1992). Animal cancer tests and cancer prevention. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, (12), 125-132.
- [447] Guyton, K. ve Kensler, T. W. (1993). Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *British medical bulletin*, 49(3), 523-544.
- [448] Schulte-Hermann, R., Timmermann-Trosiener, I., Barthel, G. ve Bursch, W. (1990). DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer research*, 50(16), 5127-5135.
- [449] Klaunig, J. E., Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., ve ark. (1998). The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environmental health perspectives*, 106(suppl 1), 289-295.
- [450] Kasapovic, J., Pejic, S., Todorovic, A., Stojiljkovic, V. ve Pajovic, S. B. (2008). Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 26(6), 723-730.
- [451] Ozer, U., Barbour, K. W., Clinton, S. A. ve Berger, F. G. (2015). Oxidative stress and response to thymidylate synthase-targeted antimetabolites. *Molecular pharmacology*, 88(6), 970-981.
- [452] Laurent, A., Nicco, C., Chereau, C., Goulvestre, C., Alexandre, J., Alves, A., ve ark. (2005). Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer research*, 65(3), 948-956.
- [453] Balendiran, G. K., Dabur, R. ve Fraser, D. (2004). The role of glutathione in cancer. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 22(6), 343-352.
- [454] Suhail, N., Bilal, N., Khan, H., Hasan, S., Sharma, S., Khan, F., ve ark. (2012). Effect of vitamins C and E on antioxidant status of breast-cancer patients undergoing chemotherapy. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 37(1), 22-26.
- [455] Badary, O. A., Nagi, M. N., Al-Shabanah, O. A., Al-Sawaf, H. A., Al-Sohaibani, M. O. ve Al-Bekairi, A. M. (1997). Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 75(12), 1356-1361.

- [456] Nili-Ahmadabadi, A., Tavakoli, F., Hasanzadeh, G., Rahimi, H. ve Sabzevari, O. (2011). Protective effect of pretreatment with thymoquinone against Aflatoxin B1 induced liver toxicity in mice. *Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 19(4), 282.
- [457] Fouda, A. M. M., Daba, M. H. Y., Dahab, G. M. ve Sharaf el-Din, O. A. (2008). Thymoquinone ameliorates renal oxidative damage and proliferative response induced by mercuric chloride in rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 103(2), 109-118.



EKLER

EK A: Etik Kurul Onayı



T.C.
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2017/213
KONU: Sn. Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

21.08.2017

Sayın, Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

"Kolon kanseri hücreleri üzerine timokinon ve 5-fluorouracilin terapötik etkisinin in vitro ve in vivo araştırılması" başlıklı projenize ait başvurunuz 21.08.2017 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve power analizin detaylandırılması ve yeni oluşan denek sayılarına göre grupların tekrar yapılandırılması şartıyla onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet BELCE

Üye

KATILMADI

Yrd. Doç. Dr. Fatemeh BAHADORI
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN

Üye

KATILMADI

Prof. Dr. İsmail MERAL

Üye

KATILMADI

Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL

Üye

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEK

Üye

Harun SARIKAMIŞ

Üye

Serife BÖNCO

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deneysel Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyadı : Eray Metin GÜLER
Doğum Tarihi ve Yeri : 1987, Kadıköy
E-posta : eraymetinguler@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2010, Ege Üniversitesi, Fakültesi, Biyokimya Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2013, Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2010'da Ege Üniversitesi Biyokimya bölümünde mezun oldu.
- 2005-2011'de Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda araştırmalarda bulundu.
- 2013 yılında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan mezun oldu.
- 2019 yılında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan mezun oldu. 2019 - Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi Sözlü Sunum 1.'lik ödülü
- 2019 - Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi Sözlü Sunum 3.'lik ödülü
- 2018 - 40. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi – Sözel Bildiri 1.'lik Ödülü
- 2018 - 13. Uluslararası Katılımlı Çocuk Alerji ve Astım Kongresi – Sözel Bildiri 1.'lik Ödülü
- 2018 - VI. Dünya Nadir Hastalıklar Günü Sempozyumu - Poster 1.'lik Ödülü
- 2017 - Bayer Retina Araştırma Ödülleri - 1.'lik ödülü

- 2017 - Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi Sözlü Sunum 1.'lik ödülü
- 2017 - Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi Poster Sunumu 1.'lik ödülü
- 2016 - 6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi – Genç Araştırmacı Bursu
- 2016 - 38. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi – Sözlü Sunum 1.'lik ödülü
- 2016 - Eastern Mediterranean International Medical Students' Congress – Sözlü Sunum 1.'lik ödülü
- 2016 - İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 4. Bilim Günleri - Sözlü Sunum 3.'lük ödülü
- 2013 - XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi Poster Ödülü
- 2013 - FEBS Young Scientists Forum Fellow (3 - 11 Temmuz 2013)
- 2011 - XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi Poster Ödülü
- 2002 - 2005 - 50. Yıl Tahran Lisesi – Onur Belgesi
- 2004 - Özel İstanbul Çevre Okulları 3.Bilim Şenliği Jüri Onur Ödülü

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

- Eray Metin Guler, Abdurrahim Kocyigit - Investigation Of Effect Of Thymoquinone & 5-Fluorouracil On Colon Cancer Both *in vitro* and *in vivo* (Poster Sunumu)
Uluslararası Biyokimya Kongresi 2018 / 29. Ulusal Biyokimya Kongresi, 25-30 Ekim 2018, Muğla
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 44 Ek Sayı 1, 25-30 Ekim 2018, Sayfa 73, P. 098 /
“Investigation Of Effect Of Thymoquinone & 5-Fluorouracil On Colon Cancer Both *in vitro* and *in vivo*”

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR, PATENTLER

- Ayşe Güneş-Bayır, Abdurrahim Kocayigit, **Eray Metin Güler**, Huriye Senay Kiziltan. Effects of Thymol, a Natural Phenolic Compound, on Human Gastric Adenocarcinoma Cells *In Vitro*. *Alternative Therapies*, Mar/Apr 2019 Vol. 25 No. 2 PMID: 29477139
- Mustafa Aziz Hatiboglu, Abdurrahim Kocayigit, **Eray Metin Guler**, Kerime Akdur, Imran Khan, Arife Nalli, Ersin Karatas, Saffet Tuzgen. Thymoquinone enhances the effect of Gamma Knife in B16-F10 melanoma through inhibition of p-STAT3. *World Neurosurgery* May 2019. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.04.205>
- Omer Faruk Ozer, Habib Akbulut, **Eray Metin Guler**, Hifa Gulru Caglar, Fatih Gevher, Fatmanur Koktasoglu, Sahabettin Selek. Oxidative stress and phenotype frequencies of paraoxonase-1 in teratozoospermia. *Andrologia* 2019 Apr 22:e13299. 2019. <http://dx.doi.org/10.1111/and.13299>.
- Mehmet Hakan Seyithanoğlu, Anas Abdallah, Serkan Kitiş, **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit, Tolga Turan Dünder, Meliha Gündoğ Papaker. Investigation of cytotoxic, genotoxic, and apoptotic effects of curcumin on glioma cells. *Cell Mol Biol (Noisy le Grand)* 2019 | Volume 65 | Issue 3,101-108. <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2019.65.3.15>
- Abdurrahim Kocayigit, **Eray Metin Guler**, Suleyman Kaleli. Anti-inflammatory and antioxidative properties of honey bee venom on Freund's Complete Adjuvant-induced arthritis model in rats. *Toxicon* 161 (2019) 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.02.016>
- Deniz Ozceker, Esra Yucel, Sevgi Sipahi, Fatih Dilek, Emin Ozkaya, **Eray Metin Guler**, Abdurrahim Kocayigit, Nermin Guler, Zeynep Tamay. Evaluation of periostin level for predicting severity and chronicity of childhood atopic dermatitis. *Adv Dermatol Allergol* doi: <https://doi.org/10.5114/ada.2018.79728>
- TF Gur, AV Erdemir, MS Gurel, A Kocayigit, **EM Guler**, D Erdil. The investigation of the relationships of demodex density with inflammatory response

and oxidative stress in rosacea. Archives of dermatological research 310 (9), 759-767. doi: [10.1007/s00403-018-1857-1](https://doi.org/10.1007/s00403-018-1857-1)

- Taha Sezer, Muhammed Altinisik, **Eray Metin Guler**, Abdurrahim Kocyigit, Hakan Ozdemir, Arif Koytak. Evaluation of xenon, light-emitting diode (LED) and halogen light toxicity on cultured retinal pigment epithelial cells. Cutaneous and Ocular Toxicology. <https://doi.org/10.1080/15569527.2018.1539008>
- Omer Faruk Ozer, Mehmet Yigit, Eray Metin Guler, Abdurrahim Kocyigit, Ismail Meral, Bilge Sumbul Gultepe, Sahabettin Selek, Yeliz Emine Ersoy. Raftlin, presepsin levels and thiol-disulphide homeostasis in acute appendicitis: A pilot study. JPMA Research Article Nov 2018 August 15.FH11. PMID: [30410146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30410146/)
- Abdurrahim Kocyigit, **Eray Metin Guler**, Murat Dikilitas. Role of Antioxidant Phytochemicals in Prevention, Formation and Treatment of Cancer. Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells Books. Open access peer-reviewed chapter. Chapter 3, <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72217>.
- Gunes-Bayir A., Kocyigit A., **Guler EM.**, *In vitro* effects of two major phenolic compounds from the family Lamiaceae plants on the human gastric carcinoma cells. Toxicology and Industrial Health 1–15. <https://doi.org/10.1177/0748233718761698>.
- Kocyigit A., **Guler EM.**, Karatas E., Caglar H, Bulut H. Dose-dependent proliferative and cytotoxic effects of melatonin on human epidermoid carcinoma and normal skin fibroblast cells. Mutat Res Gen Tox En 829–830 (2018) 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.04.002>
- Kumas M, Esrefoglu M, **Guler EM.** Protective effects of silymarin against isotretinoin induced liver and kidney injury in mice. Indian Journal of Experimental Biology Vol. 56, March 2018, pp. 158-163.
- Hatiboglu MA, Kocyigit A, **Guler EM**, Akdur K, Nalli A, Karatas E, Tuzgen S. Thymoquinone induces apoptosis in B16-F10 melanoma cell through inhibition

of p-STAT3 and inhibits tumor growth in a murine intracerebral melanoma model. World Neurosurg. 2018 Mar 3. pii: S1878-8750(18)30409-1. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.02.136>.

- Günes-Bayir A, Kocyigit A, **Güler EM**, Kiziltan HS. Effects of Thymol, a Natural Phenolic Compound, on Human Gastric Adenocarcinoma Cells *In Vitro*. Altern Ther Health Med. 2018 Feb 24. pii: AT5782. PMID: 29477139
- Tuncay S, Senol H, **Guler EM**, Ocal N, Secen H, Kocyigit A, Topcu G. Synthesis of Oleanolic Acid Analogues and Their Cytotoxic Effects on 3T3 Cell Line. Med Chem. 2018 Feb 21. <https://doi.org/10.2174/1573406414666180222094544>.
- Günes-Bayir A, Kocyigit A, **Güler EM**, Bilgin MG, Ergün İS, Dadak A. Effects of carvacrol on human fibroblast (WS-1) and gastric adenocarcinoma (AGS) cells *in vitro* and on Wistar rats *in vivo*. Mol Cell Biochem. 2018 Feb 13. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3329-5>.
- Yigit M, Sogut O, Tataroglu Ö, Yamanoglu A, Yigit E, **Güler EM**, Ozer OF, Kocyigit A. Oxidative/antioxidative status, lymphocyte DNA damage, and urotensin-2 receptor level in patients with migraine attacks. Neuropsychiatr Dis Treat. 2018 Jan 24;14:367-374. <https://doi.org/10.2147/NDT.S156710>. eCollection 2018.
- Fatih Dilek, Deniz Özçeker, **Eray Metin Güler**, Emin Özkaya, Mebrure Yazıcı, Zeynep Tamay, Abdurrahim Koçyiğit, Nermin Güler. Plasma lipoxin A4 levels in childhood chronic spontaneous urticaria. The Turkish Journal of Pediatrics 2018; 60: 527-534. <https://doi.org/10.24953/turkjpmed.2018.05.009>.
- Kurt A, Altintas SH, Kiziltas MV, Tekkeli SE, **Guler EM**, Kocyigit A, Usumez A. Evaluation of residual monomer release and toxicity of self-adhesive resin

cements. Dent Mater J. 2018 Jan 30;37(1):40-48.
<https://doi.org/10.4012/dmj.2016-380>. Epub 2017 Dec 8.

- Kocyigit A, **Guler EM**. Curcumin induce DNA damage and apoptosis through generation of reactive oxygen species and reducing mitochondrial membrane potential in melanoma cancer cells. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2017 Nov 30;63(11):97-105. . <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.11.17>.
- Senturk E, Yildirim YS, Dogan R, Ozturan O, **Guler EM**, Aydin MS, Kocyigit A, Esrefoglu M, Kocak I. Assessment of the effectiveness of cyclosporine nasal spray in an animal model of allergic rhinitis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2018 Jan;275(1):117-124. <https://doi.org/10.1007/s00405-017-4786-2>. Epub 2017 Oct 25.
- Fatih Dilek, Deniz Ozceker, Emin Ozkaya, **Eray Metin Guler**, Mebrure Yazici, Zeynep Tamay, Abdurrahim Kocyigit, Nermin Guler. Elevated Nitrosative Stress in Children with Chronic Spontaneous Urticaria. Int Arch Allergy Immunol. 2017;172(1):33-39. <https://doi.org/10.1159/000453334>.
- Abdurrahim Kocyigit, **Eray Metin Guler**, Ibrahim Celalettin Haznedaroglu, Umit Yavuz Malkan. Ankaferd hemostat induces DNA damage, apoptosis and cytotoxic activity by generating reactive oxygen species in melanoma and normal cell lines. Int J Clin Exp Med 2017;10(2):2116-2126.
- Ayse Günes-Bayir, Huriye S Kiziltan, Abdurrahim Kocyigit, **Eray M Güler**, Ersin Karatas, Ali Toprak. Effects of natural phenolic compound carvacrol on the human gastric adenocarcinoma (AGS) cells *in vitro*. Anti-Cancer Drugs: June 2017 - Volume 28 - Issue 5 - p 522–530.
<https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000491>.

- M. Zorlu, M. Kiskac, M. Cakirca, C. Karatoprak, **E. M. Güler**, K. Çelik, İ. Gültepe, M. A. Cikrikcioglu, A. Kocyigit. Evaluation of the Relation between Vitamin D and Serum Omentin and Vaspin Levels in Women. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2016; 124: 440–443. <https://doi.org/10.1055/s-0042-108853>
- M Zorlu, M Kiskac, **EM Güler**, İ Gültepe, E Yavuz, K Çelik, A Kocyigit. Serum obestatin and omentin levels in patients with diabetic nephropathy. *Nigerian Journal of Clinical Practice*. January 2016. <https://doi.org/10.4103/1119-3077.181350>
- Fatih Dilek, Emin Ozkaya, Abdurrahim Kocyigit, Mebrure Yazici, **Eray Metin GULER**, Mehmet Rusen Dundaroz. Plasma total thiol pool in children with asthma: Modulation during montelukast monotherapy. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 1–6. <https://doi.org/10.1177/0394632015621563>
- Şahabettin Selek, Ömer Faruk Özer, Ömer Göktekin, Abdürrahim Koçyiğit, Ceren Kalınbaçoğlu, İrem İşlek, Tuğba İşlek, Beyza Arpacı, Neval Erol, Sedat Meydan, **Eray Metin GÜLER**. Paraoxonase-1 Phenotype and Its Relationship with Mean Platelet Volume and Oxidative Stress in Coronary Artery Disease. *Bezmialem Science* 2015; 3: 24-8. <https://doi.org/10.14235/bs.2015.492>.
- Ayşenur Erdoğan, **Eray Metin Guler**, Abdurrahim Koçyiğit, Habib Akbulut – Opuntia ficus indica’s anti-cancer and anti-inflammatory effect on prostate cancer cell line (**Poster Sunum**)
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi 14 Mart 2019, İstanbul.
Bezmialem Science Volume 7, Supplement 1, March 2019,ss: 96
- Aslınur Erenay, **Eray Metin Guler**, Abdurrahim Koçyiğit – The Effect of Onion on Expiration of the proteins that lead to carriage of cholesteroles from macrophages to HDL (**Poster Sunum**) Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi 14 Mart 2019, İstanbul.
Bezmialem Science Volume 7, Supplement 1, March 2019,ss: 92

- Hatice Kübra Sarı, **Eray Metin Guler**, Abdurrahim Koçyiğit – Cytotoxic, Genotoxic, Autophagic and Apoptotic Effects of Anastatica Hierochuntica on Malign Melanoma Cells (**Sözlü Sunum**)
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi 14 Mart 2019, İstanbul.
Bezmialem Science Volume 7, Supplement 1, March 2019,ss: 26
- Zümra Akyol, Ali Çay, Ganime Çoban, **Eray Metin Guler**, Abdurrahim Koçyiğit – Effect of Amniomax on Experimental Ischemia/Reperfusion Induced Kidney Injury in Rats (**Sözlü Sunum**)
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi 14 Mart 2019, İstanbul.
Bezmialem Science Volume 7, Supplement 1, March 2019,ss: 18
- Şule Öztürk, Ali Çay, **Eray Metin Guler**, Abdurrahim Koçyiğit – Protective Effect of Amniomax on Experimental Ischemia/Reperfusion Injury in rat Ovary (**Sözlü Sunum**)
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi 14 Mart 2019, İstanbul.
Bezmialem Science Volume 7, Supplement 1, March 2019,ss: 9
- Mehmet Akif Kaymakçı, **Eray Metin Guler**, Ezgi Balkan, Abdurrahim Koçyiğit - Investigation of Ganoderma Resinaceum's Cytotoxic, Genotoxic, Apoptotic and Autophagic Effects on Gastric Adenocarcinoma Cells (**Sözlü Sunum**)
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi 14 Mart 2019, İstanbul.
Bezmialem Science Volume 7, Supplement 1, March 2019,ss: 5

- Fatma Zehra Yaşar, Erkan Yardımcı, Erhan Ayşan, Fahri Akbaş, **Eray Metin Güler** - Fecal Microbiota Transplantation Effect on Obesity Treatment: An Experimental Study (**Sözlü Sunum**)
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi 14 Mart 2019, İstanbul.
Bezmialem Science Volume 7, Supplement 1, March 2019,ss: 3
- Ataman Gönel, İsmail Koyuncu, **Eray Metin Güler** - İntravenöz İmmünoglobulin Tedavisinin Hemogram Parametrelerine Etkisinin Deneysel İncelenmesi (**Sözlü Sunum**)
Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği Hematoloji Testlerinde Preanalitik Evre Sempozyumu, 15 Mart 2019, İstanbul
Abstract Book: s3 – SS07
- Mehmed Kursad Türkdoğan, Abdurrahim Koçyigit, **Eray Metin Güler**, Ömer Faruk Özer – Oleuropein Against Gastric Cancer: a New Hope Therapy (**Sözlü Sunum**)
8th International Gastrointestinal Cancers Conference, 7-9 Aralık 2018, İstanbul
Abstract Book: s15 (OP-012)
- Mehmed Kursad Türkdoğan, Abdurrahim Koçyigit, **Eray Metin Güler**, Ömer Faruk Özer – Mide Kanserine Karşı Oleuropein: Yeni bir Tedavi Umudu (**Sözlü Sunum**)
35. Ulusal Gastroenteroloji Haftası, 21-25 Kasım 2018, Antalya
Abstract Book: s85 (SS-27)
- **Eray Metin Güler**, Mustafa Kesmen, Abdurrahim Kocyigit - Investigation Of The Cytotoxic, Genotoxic & Apoptotic Effects Of Capsaicin On Gastric Cancer (**Sözlü Sunum**)
Uluslararası Biyokimya Kongresi 2018 / 29. Ulusal Biyokimya Kongresi, 25-30 Ekim 2018, Muğla
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 44 Ek Sayı 1, 25-30 Ekim 2018, Sayfa 35, S. 039 / “Investigation Of The Cytotoxic, Genotoxic & Apoptotic Effects Of Capsaicin On Gastric Cancer”

- **Eray Metin Guler**, Abdurrahim Kocyigit - Investigation Of Effect Of Thymoquinone & 5-Fluorouracil On Colon Cancer Both *in vitro* and *in vivo* (**Poster Sunumu**)
Uluslararası Biyokimya Kongresi 2018 / 29. Ulusal Biyokimya Kongresi, 25-30 Ekim 2018, Muğla
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 44 Ek Sayı 1, 25-30 Ekim 2018, Sayfa 73, P. 098 / "Investigation Of Effect Of Thymoquinone & 5-Fluorouracil On Colon Cancer Both in vitro and in vivo"
- **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit - Meme kanseri hücreleri üzerine timokinon ve paclitaxel 'in terapötik etkisinin araştırılması (**Sözlü Sunum**)
Multidisipliner Kanser Araştırma ve 1. Temel Onkoloji Kongresi – 11-14 Ekim 2018, İzmir – Türkiye
Abstract Book: ss70
- Adnan Kirit, Abdurrahim Koçyiğit, Kasım Takım, Vildan Betül Yenigün, Huri Bulut, **Eray Metin Güler**, Ezgi Balkan - Işkın Kökü Özütünün Antikanser Etkinliğinin Malign Melanom B16F10 Hücre Hattı Üzerinde Araştırılması (**Sözlü Sunum**)
Uluslararası Hakemli GAP Zirvesi – 4-7 Ekim 2018, İzmir – Türkiye
Abstract Book: ss34
- A. Deveci Ozkan, S. Kaleli, H. I. Onen, O. Aksoy, H. N. Kaleli, **E. M. Guler**, A. Kalayci Yigin, M. Akdogan - Investigation of the effect of flavonoid nobiletin on TLR4 signaling pathway in prostate cancer cell lines. (**Poster Sunumu**)
43rd FEBS Congress – 7-12 July 2018, Prague – Czech Republic
FEBS Open Bio 8 (Suppl. S1) (2018) 329 DOI: 10.1002/2211-5463.12453

- Kocyigit Abdurrahim, Aydogdu Gokhan, Balkan Ezgi, Yenigun Vildan Betul, Dedeakay Huri, **Guler Eray Metin**, Koktasoglu Fatmanur - Quercus Pyrenaica Honeydew Honey Induces DNA Damage, Apoptosis and Cell Death Through Generation of Reactive Oxygen Species in Gastric Cancer Cells (Poster Sunumu) 20th ISANH International Conference on Oxidative Stress, Redox Homeostasis & Antioxidants - Paris Redox 2018, June 25-26, 2018, Paris - France
Abstract Book: page: 113
- Elif Ece Dogan, Mehmet Serif Aydın, **Eray Metin Guler**, Abdurrahim Kocyigit, Meltem Gursu, Mesut Seker, Rumezka Kazancioglu - Effects Of Proxceed Plus In The Prevention And Treatment Of Cisplatin Nephrotoxicity: An Experimental Rat Study (**Poster Sunumu**)
55th ERA-EDTA Congress, 24-27 Mayıs 2018, Copenhagen
Abstract Book: SP057 – page: 364
- Omer Faruk Ozer, **Eray Metin Guler**, Abdurrahim Kocyigit - Investigation of the relationship among oxidative status, inflammation and lipid levels in hypertension (**Sözlü Sunum**)
7th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels. 20 – 23 April 2018 Alanya- Antalya, TURKEY
Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress Volume 10, Number 2, 2018 E-ISSN Number: 2149-7222 (Online) Page: 699, T. Oral Presentation 14
- Oğuzhan Yıldız, Remzi Doğan, Abdurrahim Kocyigit, **Eray Metin Guler**, Ozge Gedik, Meliha Başoz - Effect of N-Acetylcysteine and Organic Selenium Yeast on Noise Induced Hearing Loss in Rats (**Sözlü Sunum**)
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi 14 Mart 2018, İstanbul.
Bezmialem Science 2018; 6 (Suppl.-1): S1-S66 – Special Issue 1, 2018 ss: 10
- Ahsen Çakır, Tunahan Dünder, Ahmet Sadık Gülgeç, **Eray Metin Güler**, Duygu Harmancı Karagülle, Nilay Kadakal, Abdurrahim Koçyigit – Kistik Fibrozis Hastalarında Oksidatif Stres ve Enflamasyon (**Poster Sunumu**)
VI. Dünya Nadir Hastalık Günü Sempozyumu 28-29 Şubat 2018, İstanbul
VI. Dünya Nadir Hastalık Günü Sempozyumu Özet Kitapçığı SS-55-56

- Mustafa Aziz Hatiboglu, **Eray Metin Guler**, Kerime Akdur, Arife Nalli, Hande Sisman, Abdurrahim Kocyigit - Thymoquinone Enhances the Effectiveness of Gamma Knife in Glioma Cell Lines *in vitro* Through Inducing Apoptosis and Genotoxicity (**Sözlü Sunum**)
CNS 2017 Annual Meeting, 7-11 October 2017, Boston, Massachusetts.
- Omer Faruk OZER, **Eray Metin GULER**, Abdurrahim KOCYIGIT, Sahabettin SELEK, Bilge Sumbul GULTEPE, Mehmet YIGIT, Yeliz Emine ERSOY - Raftlin, Presepsin Levels and Thiol-Disulfide Homeostasis in Acute Appendicitis (**Sözlü Sunum**)
Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi (IONCC2017), 21-23 Eylül 2017, Şanlıurfa
IONCC 2017 Abstract Book: SS 44
- Omer Faruk Ozer, **Eray Metin Guler**, Abdurrahim Kocyigit, Sahabettin Selek, Ganime Coban, Hacı Mehmet Turk - Investigation of Oxidative Stress Markers in the Pathogenesis of the Lung, Breast and Colon Cancer (**Poster Sunumu**)
Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi (IONCC2017), 21-23 Eylül 2017, Şanlıurfa
IONCC 2017 Abstract Book: SS 101
- **Eray Metin Güler**, Taha Sezer, İbrahim Arif Koytak, Abdurrahim Koçyiğit - Vitreoretinal Cerrahide Kullanılan Farklı Işık Kaynaklarının Retina Pigment Epiteli Üzerindeki Fototoksik Etkilerinin Araştırılması (**Sözlü Sunum**)
Uluslararası Biyokimya Kongresi 2017 / 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül 2017, Erzurum
- Behice Hande Şişman, **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit, Mustafa Aziz Hatiboğlu – C6 Glioma Hücre Kültüründe Timokinonun Etkileri (**Poster Sunumu**)
Uluslararası Biyokimya Kongresi 2017 / 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül 2017, Erzurum

- **Eray Metin Güler**, Ezgi Yalçın, Abdurrahim Koçyiğit – Süt Çocuklarında Demir Profilaksisinin Oksidan Aktivite ve DNA Üzerine Etkisi (**Poster Sunumu**)
Uluslararası Biyokimya Kongresi 2017 / 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül 2017, Erzurum
- Merve Topaca, **Eray Metin Güler**, Hümeysra Nur Kaleli, Abdurrahim Koçyiğit, Fatma Betül Çakır, Sare Betül Kaygusuz – B12 Vitamin Eksikliği Tanısı Konulan Çocuk Hastalarda Tedavi Öncesi ve Sonrası B12 Vitamini, Folat, Homosistein, Total –Natif Tiyo ve Oksidatif Stres Durumunun ve Mononükleer Lökosit DNA Hasarı Düzeyinin Araştırılması (**Poster Sunumu**)
Uluslararası Biyokimya Kongresi 2017 / 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül 2017, Erzurum
- Sibel Zaralı, **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit – Kurkumin’in Lökositlerde Bakterisidal Permeabilite Arttırıcı Protein (BPI) Ekspresyonuna Etkisinin *in vitro* Ortamda Araştırılması (**Poster Sunumu**)
Uluslararası Biyokimya Kongresi 2017 / 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül 2017, Erzurum
- Murat Dikilitaş, Abdurrahim Koçyiğit, **Eray Metin Güler**, Sema Karakaş – Low Doses of Posticide Exposure Cause Oxidative Stress and DNA Damage in Fibroblast Cells (**Poster Sunumu**)
ICAW 2017, 29-31 August, Pamplona, Spain
ICAW 2017 Abstract Book SS:74
- Abdurrahim Koçyiğit, **Eray Metin Güler**, Ersin Karatas, Hifa G Caglar, Huri Bulut – Concentration Dependent Genotoxic and Apoptotic Effects of Melatonin in Human Epidermoid Carcinoma Cells (A431) and Normal Skin Fibroblastic Cells (CCD1079SK) by Activating the Reactive Oxygen Species-Mediated Mitochondrial Pathway (**Poster Sunumu**)
ICAW 2017, 29-31 August, Pamplona, Spain
ICAW 2017 Abstract Book SS:74

- Hande Sisman, **Eray Metin Guler**, Arife Nalli, Abdurrahim Kocyigit, Mustafa Aziz Hatiboglu. Thymoquinone is an effective treatment through induction of apoptosis in U87 human glioma cells. **(Sözlü Sunum)**
WFNS XVI. World Congress of Neurosurgery, 20-25 Ağustos 2017, İstanbul
- Salih Tuncay, Halil Şenol, **Eray Metin Güler**, Nuket Öcal, Hasan Seçen, Abdurrahim Koçyiğit, Gülaçtı Topçu – Oleanolik Asit Türevlerinin Sentezi ve Sitotoksik Aktivitelerinin Araştırılması **(Sözlü Sunum)**
Uluslararası katılımlı 5. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi – 30 Mart – 2 Nisan 2017, Antalya
- Hande Şişman, **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit, Hakan Seyithanoğlu, Mustafa Aziz Hatiboğlu – C6 Glioma Hücre Kültüründe Timokinon'un Etkinliğinin Araştırılması **(Sözlü Sunum)**
Türk Nöroşirürji Derneği 31. Bilimsel Kongresi, 29 Mart – 02 Nisan 2017, Antalya
Türk Nöroşirürji Dergisi Cilt 27 Ek Sayı 1, 2017 ss:73
- Mustafa Aziz Hatiboğlu, Abdurrahim Koçyiğit, **Eray Metin Güler**, Erdinç Özbek, Saffet Tüzgen – Fare Melanoma Beyin Metastazı Modelinde Timokinon'un p-Stat3 İnhibisyonu Aracılığıyla Apoptozu Arttırarak Etki Göstermesi **(Sözlü Sunum)**
Türk Nöroşirürji Derneği 31. Bilimsel Kongresi, 29 Mart – 02 Nisan 2017, Antalya
Türk Nöroşirürji Dergisi Cilt 27 Ek Sayı 1, 2017 ss:75
- Mehmet Hakan Seyithanoğlu, **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit, Tolga DüNDAR, Serkan Kitiş, Meliha Gündoğ Papaker, Erdinç Özek – Kurkumin'in Glioma Hücreleri Üzerine Sitotoksik, Genotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması **(Sözlü Sunum)**
Türk Nöroşirürji Derneği 31. Bilimsel Kongresi, 29 Mart – 02 Nisan 2017, Antalya
Türk Nöroşirürji Dergisi Cilt 27 Ek Sayı 1, 2017 ss:127

- Hatice Rabia Delikenli, **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit – “Genotoxic, Cytotoxic and Apoptotic Effects of Diallyl Disulphids (DADs) and Diallyl Trisulphids (DATs) on Human Prostate Cell Line (WPMY-1) and Human Prostate Epitelial Cell Line (PWPE-1)” (**Sözlü Sunum**)
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi 14 Mart 2017, İstanbul.
Bezmialem Science – Special Issue 1, 2017 ss: XX
- Behice Hande Şişman, **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit, M. Aziz Hatiboğlu – “Thymoquinone’s effect pn C6 glioma cell culture” (**Sözlü Sunum**)
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi 14 Mart 2017, İstanbul.
Bezmialem Science – Special Issue 1, 2017 ss: 22
- Sibel Zaralı, **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit – “The effects of curcumin on bactericidal permeability increasing protein (BPI) in neutrophil culture *in vitro*” (**Sözlü Sunum**)
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi 14 Mart 2017, İstanbul.
Bezmialem Science – Special Issue 1, 2017 ss: 24
- Merve Topaca, **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit – “Investigation of vitamin B12, folate and homocysteine levels in serum, total-native thiol and oxidative stress status and DNA damage in peripheral mononuclear leukocyte before and after treatment in children with the diagnosis of vitamin B12 deficiency” (**Poster Sunumu**)
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi 14 Mart 2017, İstanbul.
Bezmialem Science – Special Issue 1, 2017 ss: 31

- Feyza Funda Duman, **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit – “Cytotoxic, Genotoxic and Apoptotic Effects of Rhus Seed Extract on Mouse Malignant Melanoma Cells (B16F10)” **(Poster Sunumu)**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi 14 Mart 2017, İstanbul.
Bezmialem Science – Special Issue 1, 2017 ss: 31-32
- M. Hakan Seyithanoğlu, **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit, Tolga Dündar, Serkan Kitiş, Meliha Gündoğ Papaker – “Kurkumin’in Glioma Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik, Genotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması” **(Sözlü Sunum)**
Türk Nöroşirürji Derneği 31. Bilimsel Kongresi – 29 Mart - 02 Nisan 2017, Antalya
Türk Nöroşirürji Dergisi Cilt 27 Ek Sayı 1 Yıl 2017 Sayfa 127, No: SS-197
- Hande Şişman, **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit, Hakan Seyithanoğlu, Mustafa Aziz Hatiboğlu – “C6 Glioma Hücre Kültüründe Timokinon’un Etkinliğinin Araştırılması”
Türk Nöroşirürji Derneği 31. Bilimsel Kongresi – 29 Mart - 02 Nisan 2017, Antalya
Türk Nöroşirürji Dergisi Cilt 27 Ek Sayı 1 Yıl 2017 Sayfa 73, No: SS-054
- Mustafa Aziz Hatiboğlu, Abdurrahim Koçyiğit, **Eray Metin Güler**, Kerime Akdur, Erdinç Özek, Saffet Tüzgen – “Fare Melanoma Beyin Metaztazi Modelinde Timokinon’un p-Stat3 İnhibisyonu Aracılığıyla Apoptozu Arttırarak Etki Göstermesi” **(Sözlü Sunum)**
Türk Nöroşirürji Derneği 31. Bilimsel Kongresi – 29 Mart - 02 Nisan 2017, Antalya
Türk Nöroşirürji Dergisi Cilt 27 Ek Sayı 1 Yıl 2017 Sayfa 75, No: SS-059

- **Güler Eray Metin,** Kocyigit Abdurrahim - “Cytotoxic, Genotoxic And Apoptotic Effects Of Curcumin In Different Cell Lines” **(Sözlü Sunum)**
6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi – 27-30 Ekim 2016, Konya
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 41 Ek Sayı 4, 27-30 Ekim 2016, Sayfa 67, S. 049 / “Cytotoxic, Genotoxic And Apoptotic Effects Of Curcumin In Different Cell Lines”
- Kocyigit Abdurrahim, **Güler Eray Metin** - “Ankaferd Blood Stopper Induces DNA Damage, Apoptosis And Cytotoxic Activity By Generating Reactive Oxygen Species In Melanoma Cells *In Vitro*” **(Sözlü Sunum)**
6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi – 27-30 Ekim 2016, Konya
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 41 Ek Sayı 4, 27-30 Ekim 2016, Sayfa 47, S. 019 / “Ankaferd Blood Stopper Induces DNA Damage, Apoptosis And Cytotoxic Activity By Generating Reactive Oxygen Species In Melanoma Cells In Vitro”
- Kaleli Hümeyra Nur, **Güler Eray Metin,** Kocyigit Abdurrahim - “Cytotoxic, Genotoxic And Apoptotic Activities of Olive Leaf And Sumac Extracts On Cancer And Healthy Cells” **(Sözlü Sunum)**
6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi – 27-30 Ekim 2016, Konya
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 41 Ek Sayı 4, 27-30 Ekim 2016, Sayfa 68, S. 050 / “Cytotoxic, Genotoxic And Apoptotic Activities of Olive Leaf And Sumac Extracts On Cancer And Healthy Cells”
- Bektay M. Yunus, **Güler Eray Metin,** Uçkaya Fatih, Topçu Gülaçtı, Koçyiğit Abdurrahim - “Investigation Of Effects Of Olive (*Olea Europaea L.*) Leaves On Liver Cell Lines” **(Poster Sunumu)**
6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi – 27-30 Ekim 2016, Konya
*Türk Biyokimya Dergisi Cilt 41 Ek Sayı 4, 27-30 Ekim 2016, Sayfa 122, P. 063 / “Investigation Of Effects Of Olive (*Olea Europaea L.*) Leaves On Liver Cell Lines”*

- Güneş Bayır Ayşe, Kocyigit Abdurrahim, **Güler Eray Metin** - “Cytotoxic, Genotoxic, Apoptotic And Reactive Oxygen Generating Effects Of Carvacrol On Human Fibroblast (Ws-1) And Gastric Adenocarcinoma (AGS) Cells” (**Sözlü Sunum**)
6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi – 27-30 Ekim 2016, Konya
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 41 Ek Sayı 4, 27-30 Ekim 2016, Sayfa 64, S. 045 / “Cytotoxic, Genotoxic, Apoptotic And Reactive Oxygen Generating Effects Of Carvacrol On Human Fibroblast (Ws-1) And Gastric Adenocarcinoma (AGS) Cells”
- Koyuncu İsmail, Koçyiğit Abdurrahim, Yüksekdağ Özgür, **Güler Eray Metin**, Gönel Ataman, Kirit Adnan - “Anti-Cancer Effect Of Urfa Pistachio (Pistacia Vera) Green Hull Extract On Colon Adenocarcinoma Cells” (**Sözlü Sunum**)
6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi – 27-30 Ekim 2016, Konya
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 41 Ek Sayı 4, 27-30 Ekim 2016, Sayfa 60, S. 038 / “Anti-Cancer Effect Of Urfa Pistachio (Pistacia Vera) Green Hull Extract On Colon Adenocarcinoma Cells”
- Koyuncu İsmail, Yüksekdağ Özgür, Koçyiğit Abdurrahim, **Güler Eray Metin**, Durgun Mustafa, Kirit Adnan, Gönel Ataman - “Investigation Of Anti Cancer Properties Of New Sulphonamide Derivative Showed Carbonic Anhydrase-IX Enzyme Inhibitor Feature” (**Sözlü Sunum**)
6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi – 27-30 Ekim 2016, Konya
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 41 Ek Sayı 4, 27-30 Ekim 2016, Sayfa 41, S. 012 / “Investigation Of Anti Cancer Properties Of New Sulphonamide Derivative Showed Carbonic Anhydrase-IX Enzyme Inhibitor Feature”
- Mustafa Salih Canpolat, Ayşe Aslı Şahin Yılmaz, Çağatay Oysu, **Eray Metin Güler**, Şahbettin Selek, Ali Hikmet Eriş, Alpaslan Mayadağlı, Olgu Enes Tok, Mukaddes Eşrefoğlu – “Çörek Otu Yağının Sıçan Major Tükürük Bezlerinde ve Kan Parametrelerinde Radyoprotektif Etkileri” (**Sözlü Sunum**)
38. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi - 26-30 Ekim 2016, Antalya

- Erol Şentürk, Yavuz Selim Yıldırım, Remzi Doğan, **Eray Metin Güler**, Mehmet Şerif Aydın, Orhan Özturan – “Deneyisel Alerjik Rinit Hayvan Modelinde Siklosporin Nazal Spreyin Etkinliğinin Değerlendirilmesi” (**Sözlü Sunum Ödülü**)
38. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi - 26-30 Ekim 2016, Antalya
- Gunes-Bayır Ayse, Kızıltan Huriye Senay, **Guler Eray Metin**, Karataş Ersin, Kocyiğit Abdurrahim – “*In vitro* toxic effect of thymol carvacrol mixture on the human gastric adenocarcinoma cells” (**Poster Sunumu**)
7-10 September 2016, Granada, Spain. The 17th International Congress of Dietetics. *Özet Kitabı: 641/p400*
- Mustafa Aziz Hatiboglu, Abdurrahim Kocyiğit, **Eray M Guler**, Kerime Akdur, Ersin Karatas, Saffet Tuzgen – “Thymoquinone enhances the effectiveness of Gamma Knife in melanoma cell line *in vitro* through inducing apoptosis” (**Sözlü Sunum**)
18th International Leksell Gamma Knife® Society Meeting Amsterdam, May 15-19, 2016
- **Eray Metin Güler**, Sinem Uçak, Fatih Uçkaya, Halit Enes Güneş, Makbule Deniz Borucu, Şahabettin Selek, Abdurrahim Koçyiğit – “Parkinson Hastalığında Oksidan ve Anti-oksidan Döngünün Değerlendirilmesi” (**Sözlü Sunum**)
Eastern Mediterranean International Medical Students’ Congress, 19-21 May 2016. Famagusta, Cyprus *Özet Kitabı: Sayfa 10*
- Abdurrahim, KOCYIGIT, **Eray, Metin GULER**, Süleyman, KALELİ - “Anti-Inflammatory, Antioxidant and Anti-genotoxic Effects of Different Doses of Bee Venom on Adjuvant Induce Arthritis in Rats” (**Sözlü Sunum**)
ISANH Middle East Antioxidants World Congress which was held in Dubai, UAE, from April 12 to April 14, 2016.
Journal of International Society of Antioxidants in Nutrition & Health - Journal of ISANH Volume 3: Special Issue for Antioxidants Middle East (2016)

- Cemal Terzioğlu, **Eray Metin Güler**, Sinem Uçak, Orhan Çakmak, Mehmet Zorlu, Muharrem Kıskaç, Abdurrahim Koçyiğit – “Diyabetik Nefropatili Hastalarda Oksidatif Stresin Rolü” (**Sözlü Sunum**)
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 4. Bilim Günleri, 20-21 Mart 2016, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye
Özet Kitabı: Sayfa 19
- Özgür Taşpınar, Teoman Aydın, Hakan Seyithanoğlu, Yaşar Keskin, Müge Kepekçi, **Eray Metin Güler**, Serkan Kitiş, Tolga Turan Dündar – “Disk Materyallerindeki Oksidatif Stres Disk Herniasyonunda Önemli Bir Faktör Müdür?” (**Sözlü Sunum**)
Uluslararası Katılımlı Türk Romatoloji Kongresi, 23-27 Mart 2016, Antalya
Özet Kitabı: 207
- M. Yunus Bektay, **Eray Metin Güler**, Mustafa Volkan Kızıлтаş, Fatih Uçkaya, Abdurrahim Koçyiğit, Gülaçtı Topçu – “Anti-Oxidant, Cytotoxic And Genotoxic Investigations Of *Olea Europaea* Leaves” (**Poster Sunumu**)
2. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, 27-29 Kasım 2015, Haliç Kongre Merkezi, İstanbul - Türkiye
Özet Kitabı: P-095, Sayfa 106
- Ayşegül Kurt, **Eray Metin Güler**, Abdurrahim Koçyiğit, Aslıhan Üşümez – “Self Adeziv Rezin Simanlarda Artık Monomer Salınımı ve Sitotoksisitenin İncelenmesi” (**Sözlü Sunum**)
Türk Prostodonti ve İmplantoloji Derneği 22. Uluslararası Bilimsel Kongresi, 12–15 Kasım 2015, Gloria Kongre Merkezi, Antalya – Türkiye
Özet Kitabı: SS-044, Sayfa 81

- **Eray Metin GÜLER**, Abdurrahim KOÇYİĞİT – “Timokinon İle İndüklenmiş Gastrik Adenokarsinom Hücrelerinde Sitotoksisite, Genotoksisite ve Apoptoz”
(Sözlü Sunum)
XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 03- 06 Kasım 2015, Antalya
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 40 Özel Sayı 1, 03- 06 Kasım 2015, Sayfa 122, S050
/ Timokinon İle İndüklenmiş Gastrik Adenokarsinom Hücrelerinde Sitotoksisite, Genotoksisite ve Apoptoz
- Güneş Bayır Ayşe, Kızıltan Huriye Şenay, **Güler Eray Metin**, Karakaş Ersin, Koçyiğit Abdurrahim – “Thymus vulgaris komponenti timol’ün sitotoksik ve apoptotik aktivitelerinin gastrik adenokarsinoma hücrelerinde araştırılması”
(Sözlü Sunum)
XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi, 27 - 30 Ekim 2015 Ölüdeniz - Fethiye / Türkiye
Özet Kitabı: SS-02 01, Sayfa 126
- Gunes Bayir Ayse, Kiziltan Huriye Senay, **Guler Eray Metin**, Ersin Karakas, Koçyiğit Abdurrahim – “Cytotoxic, genotoxic and apoptotic activities of thymol from Thymus vulgaris on the human adenocarcinoma gastric cells.” **(Sözlü Sunum)**
EFAD CONFERENCE 2015, 23-24 October 2015, Amsterdam, Netherland.
- Fatih Uckaya, Meryem Uckaya, **Eray Metin Guler**, Gulacti Topcu – “Three phase partitioning of peroxidase from opuntia-ficus indica and its utility for decolorization of synthetic dyes” **(Poster Sunumu)**
International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development 2015 Ekim 15-17, 2015, Eskişehir-TÜRKİYE

- Ayşe Gunes-Bayır, Huriye Senay Kiziltan, **Eray Metin Guler**, Ersin Karakas, and Abdurrahim Kocyigit – “Cytotoxic, genotoxic and apoptotic activities of carvacrol from *Thymus vulgaris* on the human adenocarcinoma gastric cells”
(Sözlü Sunum)
1st International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy 31 Ağustos–2 Eylül 2015 İstanbul, Türkiye
Anti-Cancer Drugs 2015, 26:e9 OP3 / Cytotoxic, genotoxic and apoptotic activities of carvacrol from Thymus vulgaris on the human adenocarcinoma gastric cells
- Abdurrahim Kocyigit, **Eray M. Guler** and Ersin Karatas - Curcumin induced cytotoxicity by oxidative stress mediated DNA damage and apoptosis in mouse B16F10 melanoma cells **(Poster Sunumu)**
1st International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy
31 Ağustos–2 Eylül 2015 İstanbul, Türkiye
Anti-Cancer Drugs 2015, 26:e18 PP1 / Cytotoxic, genotoxic and apoptotic activities of carvacrol from Thymus vulgaris on the human adenocarcinoma gastric cells
- Teoman Aydın, Özgür Taşpınar, Müge Kepekçi, Ömer Faruk Özer, **Eray Metin Güler**, Şahabettin Selek, Adil Çamlı – “Romatoid Artritli Hastalarda DMARD Kullanımının Hastalık Aktivitesi ve Oksidatif Markerları Üzerine Etkisi” **(Poster Sunumu) P639**
25. Ulusal Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Kongresi, 22-26 Nisan 2015, Antalya
- Hakan Seyithanoğlu, Özgür Taşpınar, Teoman Aydın, Hikmet Eriş, Yaşar Keskin, Müge Kepekçi, **Eray Metin Güler**, Ahmet Serdar Mutluer, Adil Çamlı – “Ratlarda Uygulanan Radyoterapinin Motor Fonksiyonuna Etkisi” **(Poster Sunumu) P186**
25. Ulusal Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Kongresi, 22-26 Nisan 2015, Antalya

- Mustafa Aziz Hatiboğlu, Abdurrahim Koçyiğit, **Eray Metin Güler**, Kerime Akdur, Fatih Çalış, Saffet Tüzgen - “Melanoma kanser hücrelerinde *in vitro* Thymoquinone’un apoptozu indükleyerek Gamma knife tedavisinin etkinliğini arttırdığının gösterilmesi” (**Sözlü Sunum**)
Türk Nöroşirürji Derneği 29. Bilimsel Kongresi, 17 - 21 Nisan 2015, Antalya
Türk Nöroşirürji Dergisi 2015 Cilt 25 Sayı – Ek Syf: 70 SS-046[Stereotaktik, Fonksiyonel Ağrı ve Epilepsi Cerrahisi] / Melanoma kanser hücrelerinde in vitro Thymoquinone’un apoptozu indükleyerek Gamma knife tedavisinin etkinliğini arttırdığının gösterilmesi
- **E. M. Güler**, A. Yalcin - Migren Hastalığının Patogenezinde Oksidatif Stres, Damar Fizyopatolojisini Etkileyen Faktörler ve İnflamasyonun Rolünün Araştırılması (**Poster Sunumu**)
Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mezuniyeti, 03.11.2014, İstanbul
- **E. M. Güler**, D. Borucu, A. D. Yalcin, A. S. Yalcin – “Oxidative stress and antioxidants in diabetic neuropathy” (**Poster Sunumu**)
FEBS EMBO Kongresi, 30 Ağustos – 4 Eylül 2014, Paris
FEBS Journal 281 (Suppl. 1) (2014) 65–783 / Oxidative stress and antioxidants in diabetic neuropathy
- **E. M. Güler**, M. Kesmen, S. Polat, R. Ayas, B. Aksu, A. S. Yalcin – “Isolation of immunoglobulin Y from hen egg and determination of its efficiency against Salmonella species” (**Poster Sunumu**)
FEBS EMBO Kongresi, 30 Ağustos – 4 Eylül 2014, Paris
FEBS Journal 281 (Suppl. 1) (2014) 65–783 / Isolation of immunoglobulin Y from hen egg and determination of its efficiency against Salmonella species

- **E.M. Güler**, U.A. Kelleci, H.G. Polat, A.D. Yalcin, A.S. Yalcin – “Investigation Of The Role Of Oxidative Stress, Factors Affecting Vascular Pathophysiology And Inflammation In Migraine Pathogenesis” **(Poster Sunumu)**
IFCC World Lab Istanbul, 22 - 26 Haziran 2014, İstanbul
Clin Chem Lab Med 2014; 52, Special Suppl, pp S1 – S1760, June 2014 / Investigation Of The Role Of Oxidative Stress, Factors Affecting Vascular Pathophysiology And Inflammation In Migraine Pathogenesis
- **Eray Metin Güler** – “Tavuk yumurtasından Salmonella’ya karşı poliklonal antikor (IgY) eldesi” **(Poster ve Sözlü Sunum)**
T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, Bilim ve Teknoloji Müdürlüğü – 2012 Teknogirişim Başarı Öyküleri, Hilton Kongre Merkezi, 04 Aralık 2013, İstanbul
- T. Seyrekel, **E.M. Güler**, Ö. Baykan, M. Arpa, A.S. Yalçın, G. Haklar – “Gebelerde prenatal üçlü tarama testi ile oksidatif stresin ilişkisi: ön çalışma” **(Poster Sunumu)**
Uluslararası Katılımlı Klinik Biyokimya Kongresi ve LabExpo 2013, 24 – 28 Eylül 2013, Antalya
- **Eray Metin Güler**, Ahmet Kılınç, A. Suha Yalçın – “Oksidatif stres skorlamasının migren ve diyabetik nöropati hastalarında kullanılması” **(Sözlü Sunum)**
XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, 03 – 06 Eylül 2013, İzmir
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 38 Özel Sayı 1, 03 – 06 Eylül 2013, Sayfa 103, S. 024 / “Oksidatif stres skorlamasının migren ve diyabetik nöropati hastalarında kullanılması”
- Huri Dedeakayoğulları, **Eray Metin Güler**, Makbule Deniz Borucu, A. Destina Yalçın, A. Süha Yalçın – “Alfa lipoik asidin diyabetik nöropatili hastalarda oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi” **(Poster Sunumu)**
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 38 Özel Sayı 1, 03 – 06 Eylül 2013, Sayfa 147, P. 028 / “Alfa lipoik asidin diyabetik nöropatili hastalarda oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi”

- Ziba Mokhberi Oskouei, Huri Dedeakayoğulları, **Eray Metin Güler**, A. Suha Yalçın – “Vicia faba’dan l-dopa ve anti-oksidan içeriği yüksek ekstrakt eldesi”
(Poster Sunumu)
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 38 Özel Sayı 1, 03 – 06 Eylül 2013, Sayfa 310, P. 188 / “Vicia faba’dan l-dopa ve anti-oksidan içeriği yüksek ekstrakt eldesi”
(Poster Ödülü)
- **Eray Metin Güler**, Mustafa Kesmen, Huri Dedeakayoğulları, Ziba Mokhberi Oskouei, Ahmet Kılınç, A. Suha Yalçın - “Production of Hen Egg IgY Liposomes Against Different Salmonella Species” **(Poster Sunumu)**
Federation of European Biochemical Societies CONGRESS 2013 “Mechanisms in Biology”, 06 – 11 Tem 2013, St. Petersburg
Special Issue: 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013 - July 2013 Volume 280, Issue Supplement s1 Page 481 - SW06.S25–18
- **Eray Metin Güler**, Ulker Anadol Kelleci, Hayriye Gul Polat, Huri Dedeakayogullari, Gokhan Bicim , Ahmet Kilinc, A. Destina Yalcin, A.Suha Yalcin - “The Role of Oxidative /Antioxidative Balance, Vascular Pathophysiology and Inflammation in Migraine” **(Poster Sunumu)**
Federation of European Biochemical Societies CONGRESS 2013 “Mechanisms in Biology”, 06 – 11 Tem 2013, St. Petersburg
Special Issue: 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013 - July 2013 Volume 280, Issue Supplement s1 Page 421 - SW04.S19–27
- Huri Dedeakayoğulları, Ahmet Kılınç, Gökhan Biçim, **Eray Metin Güler**, Ziba Mokhberi Oskouei, A. Suha Yalçın - “Comparative Analysis of Different Parts of Vicia faba for Production of a Protein Isolate with High Antioxidant Activity, L-DOPA and Phenolics Content” **(Poster Sunumu)**
Federation of European Biochemical Societies CONGRESS 2013 “Mechanisms in Biology”, 06 – 11 Tem 2013, St. Petersburg
Special Issue: 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013 - July 2013 Volume 280, Issue Supplement s1 Page 510 - SW06.S27–7

- **Eray Metin Güler**, Mustafa Kesmen, Huri Dedeakayoğulları, Ziba Mokhberi Oskouei, Ahmet Kılınç, A. Suha Yalçın - “Production of Hen Egg IgY Liposomes Against Different Salmonella Species” (**Sözlü Sunum ve Poster Sunumu**)
Federation of European Biochemical Societies CONGRESS 2013 “Mechanisms in Biology” – *Young Scientists Forum 2013*, 03 – 05 Tem 2013, St. Petersburg
- G. Biçim, **E.M. Güler**, A. Kılınç, C. Eker, H. Kumuşoğlu, A.S. Yalçın - “Oxidative Stress Biomarkers And Antioxidant Gene Polymorphisms” (**Poster Sunumu**)
COST Action: BM1203Management Committee Meeting, Working Group Meeting May 23 - 25 2013, Art’otel Budapest, Hungary
- **Eray Metin Güler**, Ülker Anadol Kelleci, Hayriye Gül Polat, Ahmet Kılınç, A. Destina Yalçın, A. Suha Yalçın - “Migren Hastalığının Tanısında Oksidatif Stres Risk Skorlamasının Yararlılığı” (**Poster Sunumu**)
XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi Tıbbi Laboratuvarlarda İzlenebilirlik – Standardizasyon – Harmonizasyon, 25 - 28 Eylül 2012, Konya
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 37 Özel Sayı 1, 25-28 Eylül 2012, Sayfa 306, P.166 / Migren Hastalığının Tanısında Oksidatif Stres Risk Skorlamasının Yararlılığı
- **E. M. Güler**, A. Kılınç, A. S. Yalçın - “A Novel Approach To Assess Oxidative Stress Status” (**Sözlü Sunum**)
III European Congress of Preventive Medicine, Antiaging and Regenerative, 29 - 31 May 2012, İstanbul
- **E. M. Güler**, H. Dedeakayoğulları, A. Kılınç, A. S. Yalçın - “Oksidatif Stresin Belirlenmesinde Yeni Bir Yaklaşım” (**Poster Sunumu**)
XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi “Biyomolekülleri Yaşamdaki Önemi ve Klinik Kararda Laboratuvar“ 29 Kasım – 02 Aralık 2011, Adana (**Poster Ödülü**)
Türk Biyokimya Dergisi Cilt 36 Özel Sayı 1, 28 Kasım – 2 Aralık 2011, Sayfa 306, P. 180 / Oksidatif Stresin Belirlenmesinde Yeni Bir Yaklaşım

- G. Gedik, G. Biçim, A. M. Yılmaz, **E. M. Güler**, A. Kılınç, A. S. Yalçın -
“Determination Of Antioxidant Capacity Of Different World Teas” (**Poster
Sunumu**)

SFRR-Europe 2011 Meeting “Redox Biology and Micronutrients: from signaling
to translation and back“ September 7 - 10, 2011, İstanbul

