

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;  
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(DOKTORA TEZİ )**

**ACACETİN'İN İN VİTRO ORTAMDA KOLON KANSERİ  
HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ANTİKANSEROJENİK  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**BESTE TACAL ASLAN**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. BEDİA ÇAKMAKOĞLU**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

**İSTANBUL-2018**

## DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Programında Doktora öğrencisi **Beste TACAL ASLAN** tarafından Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU'nun danışmanlığında hazırlanan "**Acacetin'in İn Vitro Ortamda Kolon Kanseri Hücre Hatları Üzerine Antikanserojenik Etkisinin İncelenmesi**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 19 / 06 /2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı**

Prof. Dr. Turgay İSBİR  
Yeditepe Ün. Tıp Fak.  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Jüri (Danışman)**

Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU  
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE  
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof. Dr. Arzu ERGEN  
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE  
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

**Jüri**

Doç. Dr. Özlem KÜÇÜKHÜSEYİN  
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE  
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

**Jüri**

Dr. Öğr. Yardımcı YILDIZ  
İstinye Univ. Tıp Fak. Tıbbi A.D

**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.

Beste TACAL ASLAN



## İTHAF

Biricik kızlarım Öykü ve İlke'ye ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince akademik açıdan yetişmemi sağlayan, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her konuda destek olan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (ASDETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi saygıdeğer hocam Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU' na teşekkür ederim.

Tezimin deney ve yazım süreçlerindeki her türlü desteği veren ikinci tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Elif Sinem Bireller' e, tez çalışmalarımda yardımını esirgemeyen MSc. Barış Ertuğrul'a, yardım ve destekleri için Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarımın destek vererek gerçekleştirmemi sağlayan Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Tanju KADİR'e teşekkür ederim.

Ayrıca, her adımda yanımda olan, hayallerimi devam ettirmem için manevi desteklerini usanmadan gösteren hayattaki en büyük şansım olan sevgili eşim Türker ASLAN ve aileme sonsuz teşekkürler...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 53038

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİ
ÖZET .....	XİV
ABSTRACT.....	XV
ZUSAMMENFASSUNG / RESUME.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kanser .....	3
2.1.1. Kanser Oluşumuna Etki Eden Faktörler ve Kanser Tedavi Yöntemleri .....	8
2.2. Kolon Kanseri .....	9
2.3. Kolorektal karsinogenezde moleküler genetik değişiklikler.....	11
2.4. Kolorektal Karsinogenezisin Moleküler Mekanizması .....	12
2.4.1. Hücre içi moleküller ve gelişen olaylar .....	12
2.4.1.1. APC Geni Mutasyonu .....	12
2.4.1.2. p53 Geni Mutasyonu (17p13.1) .....	13
2.4.1.3. Kolorektal Kanserde Silinen Bölge (DCC) (18q21.3) .....	13
2.4.1.4. DNA Onarım Genlerindeki Değişiklikler .....	14
2.4.1.5. Wnt Wnt/ $\beta$ -katenin yolağı.....	14
2.4.1.6. E-cadherin and $\alpha$ -catenin .....	16
2.4.1.7. BRAF, NRAS, VEGF genleri .....	17
2.4.2. Genomik ve Epigenomik Kararsızlık ve Kromozomal Değişiklikler .....	20
2.4.2.1. Kromozomal Kararsızlık (CIN) .....	20
2.4.2.2. Mikrosatellit Kararsızlığı (MSI) .....	21
2.4.2.3. CpG Adacık Hipermetilasyonu (CIMP).....	21

2.5. Kolon Kanseri Tedavi Yöntemleri.....	22
2.6. Flavonoidler .....	22
2.6.1. Flavonoidlerin yapısı.....	24
2.6.2. Flavonoidlerin metabolizması ve biyoyararlanımı .....	26
2.6.3. Flavonoidlerin etkileri.....	26
2.6.3.1. Acacetin.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Kullanılan Materyaller .....	29
3.1.1. Kimyasal Malzemeler .....	29
3.1.2. Cihazlar .....	29
3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. HT-29 Hücre Hattı .....	30
3.2.2. HCT 116 Hücre Hattı.....	30
3.2.3. MRC-5 Hücre Hattı.....	31
3.2.4. Hücre Ekim İşlemleri .....	31
3.2.5. Alt Kültür İşlemleri.....	31
3.2.6. Hücre Dondurma İşlemleri.....	32
3.2.7. Acacetin Solüsyonu Hazırlama İşlemi .....	32
3.2.8. WST-1 Hücre Canlılık Tayini.....	32
3.2.9. Kaspaz-3 Enzimatik Aktivite Ölçümü .....	33
3.2.10. Annexin V-FITC Hücre Ölüm Tipi Apoptoz/Nekroz Aktivitesi .....	33
3.2.11. Deney Verilerinin İstatiksel Tayini .....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Hücre Canlılığı Üzerinde Acacetinin Doz ve Zaman Bağımlı Etkisi .....	36
4.2. Hücre Ölüm Tiplerinin İncelenmesi .....	38
4.2.1. Annexin V-FITC Apoptoz/Nekroz İncelenmesi .....	38
4.2.2. Kaspaz 3/BCA Etkinliğinin Değerlendirilmesi.....	40
5. TARTIŞMA .....	43
KAYNAKLAR .....	49
HAM VERİLER .....	59
FORMLAR .....	60
ETİK KURUL KARARI .....	61
PATENT HAKKI İZİNİ .....	62



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	63
ÖZGEÇMİŞ .....	64



**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 2-1: Kolon Kanserinde Görülen Mutasyon Türleri (Akyol, 2014).....	19
Tablo 3-1: Deneyde kullanılan cihazlar .....	30



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Dünyada Kadınlarda Kanser Mortalite Oranları (GLOBOCAN, 2012) .....	5
Şekil 2-2: Dünyada Erkeklerde Kanser Mortalite Oranları (GLOBOCAN, 2012) .....	6
Şekil 2-3: Kolon Kanseri Çeşitleri (Burt, 2000) .....	10
Şekil 2-4: Kolon kanseri gelişiminin moleküler modeli (Dobrucalı, 2007) .....	12
Şekil 2-5: <i>WNT/beta-katenin</i> yolağı (Suzuki ve ark. 2015).....	16
Şekil 2-6: Kolorektal Kanserde Görülen Somatik Mutasyonlar (Lo ve ark. 2016) .....	17
Şekil 2-7: RAS ve PIK3CA sinyal yolakları (Lo ve ark. 2016) .....	18
Şekil 2-8: Fenilalaninden fenilpropanoidler, flavonoidler, tanninler ve diğer fenoliklerin üretimi (Ötleş, S, 2005).....	23
Şekil 2-9: Fenil propanoidler (coumaryl CoA) ve malonil CoA'dan flavonoidlerin ve stilbenlerin üretimi (Shahidi ve Nacz, 2005) .....	25
Şekil 2-10: Flavon, flavonol ve flavanonun yapısı (Stefova ve ark. 2003) .....	26
Şekil 2-11: Acacetin yapı formülü.....	27
Şekil 4-1: Acacetinin HT-29 Hattı Üzerinde Doz Zaman Bağımlı Canlılığa Etkisi.....	36
Şekil 4-2: Acacetinin HCT 116 Hattı Üzerinde Doz Zaman Bağımlı Canlılığa Etkisi ..	37
Şekil 4-3: Acacetinin MRC-5 Hattı Üzerinde Doz Zaman Bağımlı Canlılığa Etkisi .....	37
Şekil 4-4: Acacetinin HT-29 Hattı Üzerinde Annexin V-FITC Apoptoz/Nekroz Tayini .....	38
Şekil 4-5: Acacetinin HCT 116 Hattı Üzerinde Annexin V-FITC Apoptoz/Nekroz Tayini .....	39
Şekil 4-6: Acacetinin MRC-5 Hattı Üzerinde Annexin V-FITC Apoptoz/Nekroz Tayini .....	40
Şekil 4-7: Acacetinin HT-29 Kolon Kanseri Hattı Üzerinde % Kaspaz-3/BCA Enzim Aktiviteleri.....	41
Şekil 4-8: Acacetinin HCT 116 Hücre Hattı Üzerinde % Kaspaz-3/BCA Enzim Aktiviteleri .....	41
Şekil 4-9: Acacetinin MRC-5 Kolon Kanseri Hattı Üzerinde % Kaspaz-3/BCA Enzim Aktiviteleri .....	42

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

**ATCC:** American Type Culture Collection, LGC Standart

**ACS:** American Cancer Society

**WHO:** Dünya Sağlık Örgütü

**KETEM:** Kanser Erken Teşhis Tarama Eğitim Merkezi

**TBMM:** Türkiye Büyük Millet Meclisi

**DNA:** Deoksiribonükleik asit

**KRK:** Kolorektal kanser

**FAP:** Ailesel Adenomatöz Polipozis Koli

**HNPCC:** Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser

**FDA:** Food and Drug Administration

**GGK:** Gaitadan gizli kan testi

**ÇKBE:** Çift kontrastlı baryumlu enema

**BTK:** Bilgisayarlı tomografi ile kolonografi

**THSK:** Türkiye Halk Sağlığı Kurumu

**APC:** Adenomatöz Polipozis Koli

**DCC:** Deleted in colorectal cancer

**MSI:** Microsatellite instability

**MMR:** Mismatch repair

**TGF $\beta$ RII:** Transforming growth factor beta receptor II

**BAX:** Bcl-2-associated X protein

**WISP-3:** WNT1 inducible signaling pathway protein 3

**IGFII:** Insulin- like growth factor II receptor

**MSH3:** MutS Homolog 3

**MSH6:** MutS Homolog 6

**CTNNB1:** Catenin beta 1

**mTOR:** mechanistic target of rapamycin

**FGF:** Fibroblast growth factor

**TGF- $\beta$ :** Transforming growth factor beta

**CDH1:** Cadherin 1

**EMT:** Epitelyal-mezenkimal transizyon

**TNF alfa:** Tumor necrosis factor alpha

**ILK:** Integrin-linked kinase  
**HIF:** Hypoxia-inducible factor  
**NF-kappa B:** Nuclear factor kappa B  
**EGFR:** Epidermal growth factor receptor  
**ACF:** Adenomatous Aberrant Crypt Foci  
**GTP:** Guanosine triphosphate  
**VEGF:** Vascular endothelial growth factor  
**IL4:** İnterlökin 4  
**PIK3CA:** phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha  
**CDK8:** cyclin-dependent kinase 8  
**PTEN:** Phosphatase and tensin homolog  
**TCF7L2:** Transcription factor 7-Like 2 protein  
**ACVR2:** The activin type 2 receptors  
**CIN:** Chromosomal Instability  
**CIMP:** The CpG island methylator phenotype  
**Caspase:** cysteine-aspartic acid protease  
**CASP5:** Caspase 5  
**MLH1:** mutL homolog 1  
**KVH:** Kardiyovasküler hastalık  
**CoA:** Koenzim A  
**KAFE:** Kafeik asit fenetil ester  
**LPS:** Lipopolisakkarit  
**MAPK:** Mitogen activated protein  
**TPA:** 12-O-Tetradecanoylphorbol 13- acetat  
**COX2:** Cyclooxygenase-2  
**INOS:** Inducible NO synthesis  
**NO:** Nitric oxide  
**AİF:** Apoptoz İndükleyici Faktör  
**ROT:** Reaktif Oksijen Türleri  
**MMP-2:** Matrix metallo-proteinase-2  
**MMP-9:** Matrix metallo-proteinase-9  
**u-PA:** urokinase-type plasminogen activator  
**AP:** Aktivatör protein

**KHDAK:** Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

**FITC:** Fluorescein isothiocyanate

**pNA:** para nitroaniline

**BCA:** Bicinchoninic Acid



## ÖZET

Aslan, B.T. (2018). Acacetin'in İn Vitro Ortamda Kolon Kanseri Hücre Hatları Üzerine Antikanserojenik Etkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD, Doktora Tezi. İstanbul.

Kolon kanseri dünya üzerinde en çok görülen kanser türlerindedir. Kolon kanserinin tedavisinde çok sayıda terapötik ilaç kullanılmaktadır. İlaç ve ameliyat tedavileri birçok kanser tipinin oluşumunu ve sonuçlarının tamamen kontrol altında olmasını sağlayamamıştır. Bu nedenle minimum olumsuz yan etkiye sahip bitkisel kökenli yeni terapötik ilaçların geliştirilmesine acilen ihtiyaç vardır.

Bir flavonon olan acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone) de özellikle Robinia pseudoacacia türünde, ayrıca çeşitli bitki, tohum ve çiçeklerde bulunmaktadır. Çeşitli flavonoidlerin in vitro olarak böbrek, akciğer, prostat, mesane, melanom, osteosarkom, meme ve lenfoid kanser türevli hücre hatlarında antikanserojenik aktiviteleri saptanmıştır. Yapılan literatür taramaları çalışmalarında acacetin flavonoidinin kolon kanserine olan etkisinin henüz araştırılmadığı saptanmıştır.

Çalışmamızda acacetinin kolon kanseri üzerindeki olası sitotoksik etkisini araştırmak için HT-29 ve HCT 116 kolon kanseri hücre hatları ve MRC-5 sağlıklı kontrol hücre hatları kullanılmıştır. Acacetinin doz bağımlı canlılık etkisi araştırılırken WST-1, kaspaz enzim aktivitesi değerlendirilirken Kaspaz 3 / BCA ve apoptotik tayin yöntemi olarak ise Annexin V testleri kullanılmıştır.

Çalışmamız sonucunda kolon kanseri hücre hatları HT-29 ve HCT 116 hücre hatları üzerinde doz ve zamana dayalı olarak inkübasyon süresince uyguladığımız acacetinin apoptotik etkisi görülmüştür. Sağlıklı kontrol olarak çalıştığımız MRC-5 hücre hattı üzerinde ise doğal bir flavonoid olan acacetinin, toksik etki göstermemesi tedavide kullanılabilme potansiyeli için önemli bir veri niteliği taşımakta olup, yapılacak ileri kanser araştırmaları için umut vaatmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kolon Kanseri, acacetin, apoptoz, HT-29, HCT 116.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:53038

## ABSTRACT

Aslan, B.T. (2018). The In Vitro Investigation of Anticancerogenic Effect of Acacetin on Colon Cancer Cell Lines İstanbul University, Institute of Health Science, Aziz Sancar Institute for Experimental Medicine Research, Department of Molecular Medicine, Doctorate Thesis. İstanbul.

Colon cancer is one of the most common cancers in worldwide. There are currently many therapeutic drugs using in colon cancer treatment. Since conventional therapeutic and surgical approaches have not been able to fully control the incidence and outcome of most cancer types, there is an urgent need to develop new plant-derived therapeutic drugs with minimum adverse effect.

Acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone) is one of the flavonones, especially present in *Robinia pseudoacacia* and also found in seeds and flowers of various kinds of plants. Anticarcinogenic activity of many flavonoids indicated in cancer cell lines such as renal, lung, prostate, bladder, melanoma, osteosarcoma, breast and lenfoid in vitro. In the literature, there is no study of the effect of acacetin on colon cancer.

In our study, possible cytotoxic effect of acacetin on colon cancer cells was investigated by using HT-29 and HCT 116 cell lines and as healthy control, we used MRC-5. We applied WST-1 test for detecting acacetin's dosage effect on cytotoxicity and vitality, Caspase 3 / BCA for caspase enzyme activity and Annexin V for apoptotic effects.

As a result of our study, the apoptotic effect of acacetin was observed on colon cancer cell lines HT-29 and HCT 116 has been observed during the incubation time depended on dosage and time. On the MRC-5 cell line, where we work as healthy control, acacetin, a natural flavonoid, is an important data feature for potential use in treatment, and it promises for further cancer research.

**Key Words:** Colon Cancer, acacetin, apoptosis, HT-29, HCT 116.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: 53038



**ZUSAMMENFASSUNG / RESUME**

**Dikkat bu satırı ve aşağıdaki paragrafı daha sonra siliniz!**

Bu sayfayı koyarsanız "ÖZET" ve "ABSTRACT" sayfalarındaki ilkeler uygun olarak hazırlayın. Bu sayfayı koymazsanız başlığı tamamen bloklayarak siliniz.





## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sağlıklı hücrelerde çeşitli genetik ve epigenetik mekanizmaların etkilenmesiyle hücrelerin kontrol dışı çoğalması sonucu kanser oluşmaktadır. Tüm dünyada kanser en sık mortalite ve morbidite sebeplerinden biridir. Kolorektal kanserler de tüm kanser türleri arasında kadınlarda görülme sıklığı %10 oranı ile ikinci sırada, erkeklerde ise %9.2'lik bir oranla üçüncü sırada yer almaktadır. Yüksek oranda ölüme sebebiyet veren kanser türlerinden olması nedeniyle tedavisinde yeni yöntemlerin ve stratejilerin hızla geliştirilmesi gerekmektedir. Kanseri önlemeden, erken tanıya, kanserli hastaların tedavi ve yaşam kalitelerini düzenlemeye yönelik yapılan kanser araştırmaları büyük çapta katkı sağlamakla birlikte hastalığın tam olarak aydınlatılabilmesi açısından hala yetersiz kalmaktadır.

Kolorektal kanser, normal glandüler epitelin invaziv kansere değişim gösterdiği genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimidir (Vogelstein ve ark. 1988). Tüm dönüşen tümör hücreleri; sürekli aktif halde proliferasyon sinyali yayma, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, replikatif ölümsüzlük, anjiogenez oluşumunu sağlama, invazyon ve metastazı aktive etme gibi belli başlı genel özellikler gösterirler (Hanahan ve Weinberg , 2011)

İleri düzeyde ideal bir kolorektal kanser sınıflandırması yapabilmek için hastaya özgü genetik ve genomik özellikler gibi endojen ve çevresel etkenlere maruz kalma, yaşam tarzı ve beslenme alışkanlığı gibi ekzojen faktörlerdeki farklılıkların incelenmesi gerekmektedir (Blanco ve ark. 2015).

Son yirmi yıl boyunca kolon kanseri tedavilerinde değişik yöntemler uygulanmaktadır. Ameliyat ve modern radyoterapinin sitotoksik kemoterapi ile birleşmesi sonucunda sağ kalım oranlarında artış görülmektedir (Nicholls ve Tekkis, 2008).

İlaç tedavileri ve ameliyatlarda birçok kanser tipinin oluşumunu engelleyememiş ve hastalığın etkilerinin kontrol altına alınmasını sağlayamamıştır. Bu nedenle bitkisel kökenli yeni terapötik ilaçların geliştirilmesi ile olumsuz yan etkinin minimuma indirilmesine acilen ihtiyaç vardır. Son zamanlarda farklı yapılarda flavonoidlerin kanserli hücrelere olan sitotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar yaygınlık kazanmaktadır. Flavonoidler, normal hücrelere gösterdikleri minimal etki ve kanser

hücrelerine gösterdikleri sitotoksik etkileri sebebiyle kanser tedavisi için büyük bir potansiyel barındırmaktadırlar (Plochmann ve ark. 2007). Flavonoidler meyve, sebze ve diğer bitkisel gıdalarda bulunun, önemli kronik hastalıkların riskini azaltan antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşiklerin bir grubudur (Erlund, 2004).

Bir O-metillenmiş flavon olan acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone), özellikle *Robinia pseudoacacia* ve *Turnera diffusa* olmak üzere, ayrıca çeşitli bitki, tohum ve çiçeklerde bulunmaktadır (Bhat ve ark. 2013). Acacetin'in karaciğer ve küçük hücreli dışı akciğer kanserinde (KHDAK) apoptozisi indükleyerek ve hücre siklusunu bloke ederek antiperoksidatif ve antiinflamatuvar, antiplazmodial ve antiproliferatif etkileri olduğu da tespit edilmiştir (Hsu ve ark. 2004a).

Tez çalışmamızla beraber literatürde ilk kez kolon kanseri hücre hatları üzerinde acacetinin antiproliferatif, antiapoptotik etkileri ayrıntılı olarak incelenecek olup, elde edeceğimiz sonuçlarla kolon kanseri gibi ölüm oranı yüksek bir kanser türünde etkin bir tedavi yönteminin oluşturulmasına katkı sağlamayı amaçlamaktayız.

## 2. GENEL BİLGİLER

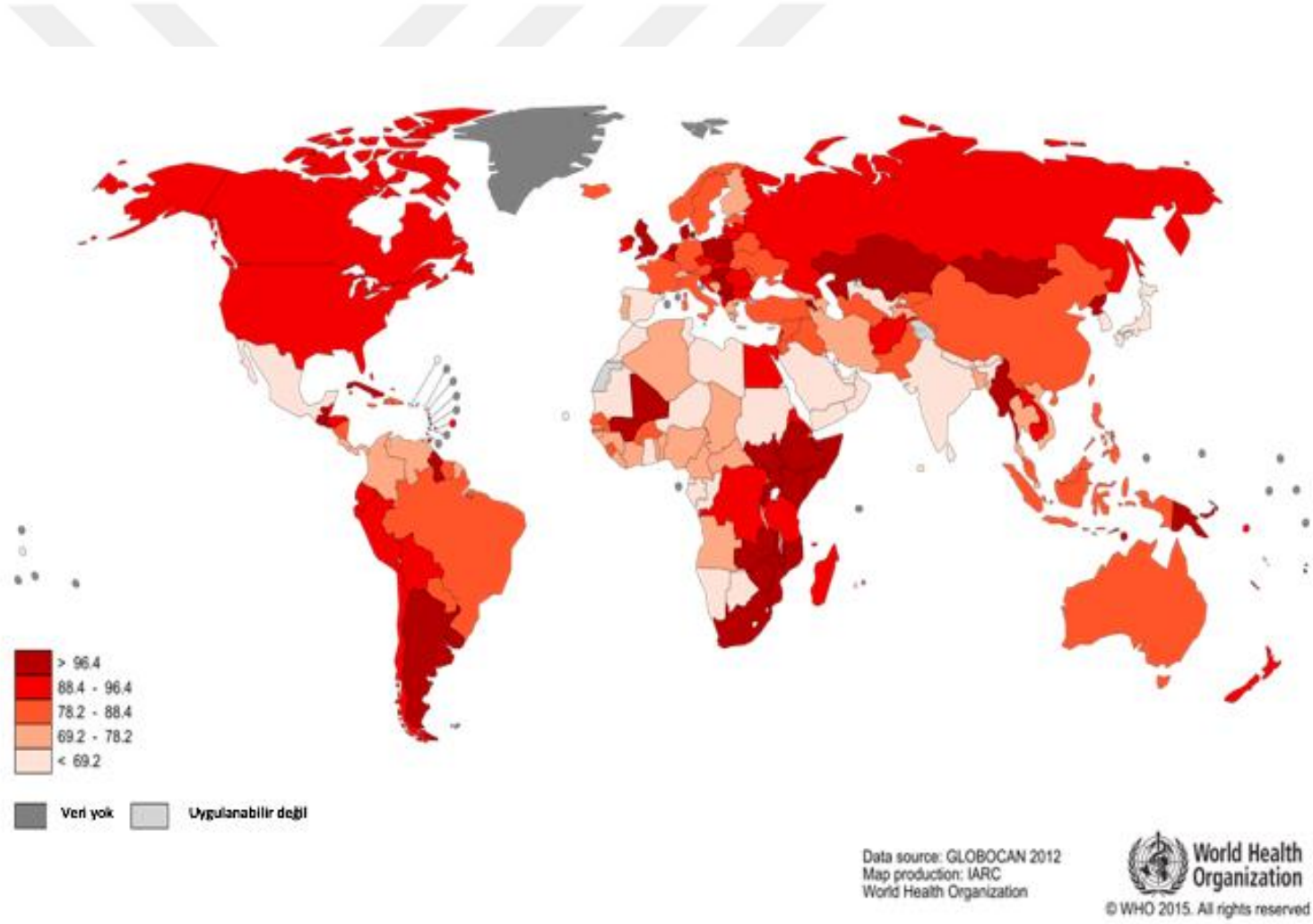
### 2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri, çok basamaklı bir süreçtir. Tüm dünyada kanser en sık mortalite ve morbidite sebeplerinden biridir (Merlo ve ark. 2006).

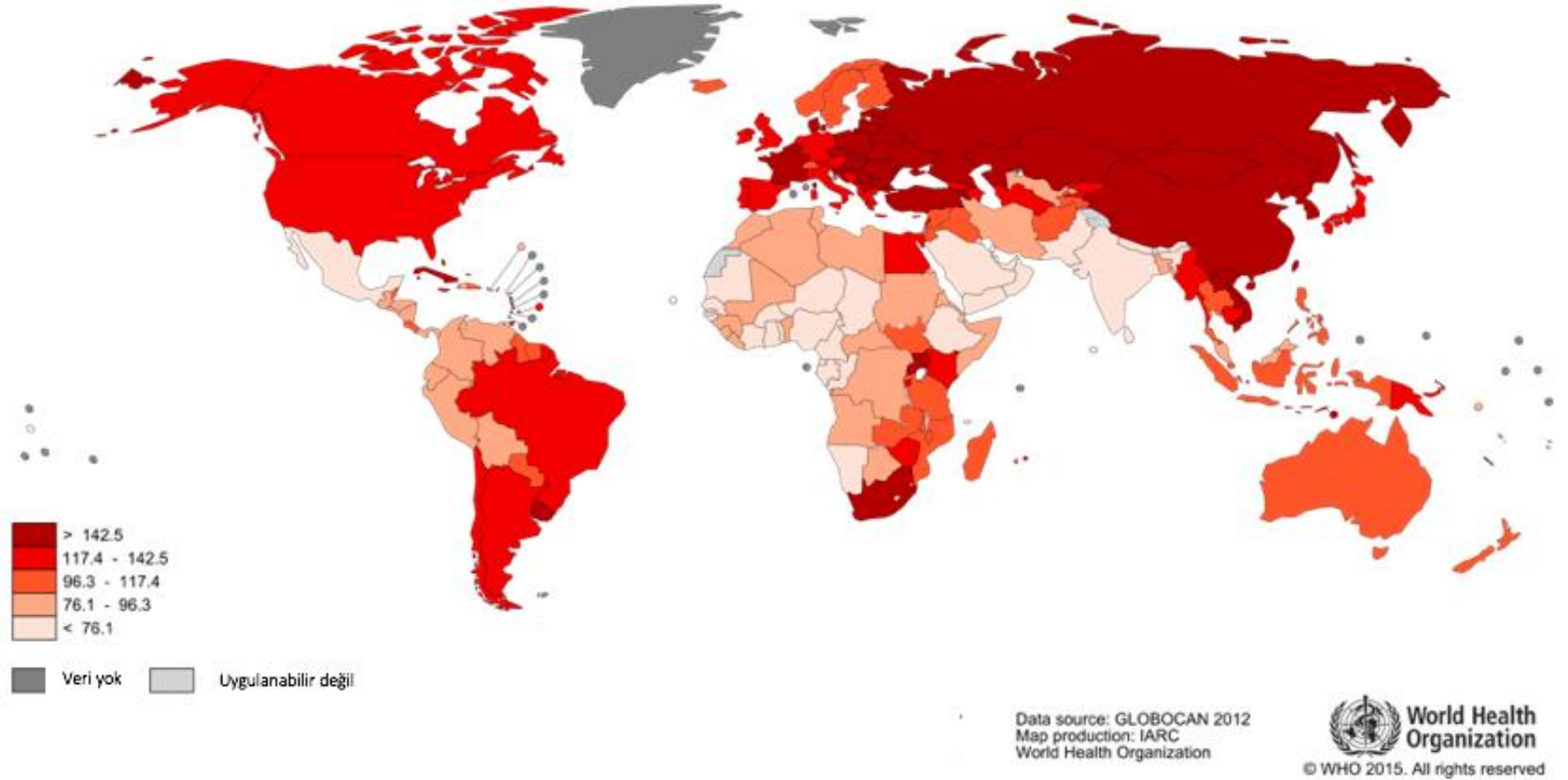
Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayınlanan kanser raporunda 2011 verilerine göre günümüzde, koroner kalp hastalıkları ve inme sebepli ölümlerin toplam sayısını kanserden kaynaklanan ölümlerin sayısı aşmıştır. 2012 yılında dünya üzerinde 14.1 milyon yeni kanser vakası olduğu ve 8.2 milyon kanser nedeni ölüm gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Akciğer kanseri en yaygın görülen kanser olmakla birlikte bu kanser türünü sırasıyla göğüs, kolorektal, prostat, mide, karaciğer kanserleri takip etmektedir. Bu 6 kanser türü 2012 itibariyle tüm kanser türlerinin %55'ini teşkil etmektedir. Kolorektal kanser ise kadınlarda 614.000 vaka ile %9.2'lik bir kısmı içerir ve ikinci sırada yer alır. Erkeklerde ise 746.000 vaka ile tüm kanserlerin %10'unu teşkil ederek üçüncü kanser tipidir. Dünyada kadınlardaki kanser mortalite oranları da Şekil 2-1'de; erkeklerdeki kanser mortalite oranları ise Şekil 2-2'de gösterilmiştir. Kolorektal kanser hastalığını en yüksek oranlarda barındıran bölge Avustralya / Yeni Zelanda; en düşük oranlarda bu hastalığı taşıyan birey sayısı ise Batı Afrika'ya aittir (Ferlay ve ark. 2015). Bu coğrafi farklılığın sebebi diyet, çevresel maruziyet ve genetik yatkınlık gibi faktörlere dayandırılmaktadır (Ashktorab ve ark. 2009).

Kanser, Türkiye'de 1982 yılında 1593 sayılı Umumi Hıfzıssıhha Kanunu'nun 57. Maddesi gereğince "bildirimi zorunlu hastalıklar listesine" alınmıştır ([www.turkkanser.org](http://www.turkkanser.org)). Günümüzde ülkemizde kanser insidansı hakkında veriler edinebilmek için Kanseri Erken Teşhis, Tarama Eğitim Merkezi (KETEM) kurulmuştur. Mevcut verilere göre, ülkemizde her yıl 150.000 yeni kanser vakası teşhis edilmektedir. Kanseri yaşayan hasta sayısı ise yaklaşık 400.000'dir. Ülkemiz açısından en önemli sorun, kanser insidansının her geçen gün yükselmesidir ki hiçbir önlem alınmazsa 2030'lu yıllarda yıllık teşhis edilen kanser sayısının 400.000'lere kadar çıkacağı tahmin edilmektedir (TBMM, 2010).





Şekil 2-1: Dünyada Kadınlarda Kanser Mortalite Oranları (GLOBOCAN, 2012)



Şekil 2-2: Dünyada Erkeklerde Kanser Mortalite Oranları (GLOBOCAN, 2012)





### **2.1.1. Kanser Oluşumuna Etki Eden Faktörler ve Kanser Tedavi Yöntemleri**

Çevresel karsinojenler; maruziyetin dozu, süresi ve genetik ya da sonradan edinilen konak özellikleri ile etkileşimine bağlı olarak kanser oluşumunda kritik etmenlerdendir (Maru ve ark. 2016).

Karsinojenlere maruz kalma sonucunda; konak özelliklerine (fiziksel aktivite, obezite) ve yaşam tarzına (beslenme, tütün kullanımı ve alkol) bağlı olarak hastalıkla sonuçlanabilir. Çevresel karsinojenlerin (fiziksel, kimyasal, biyolojik) çeşitli süreçlerin ve yolların indüklenmesini ya da durdurulmasını sağlayarak kansere yol açmasına karsinogenez denmektedir. Kompleks, multifaktöriyel, çok aşamalı, birden fazla yolağın devreye girdiği, uzun yıllar sürebilen ve inisiasyon, promosyon ve progresyon gibi en az üç aşamadan oluşan bir süreçtir (Weinstein, 1988).

Karsinojenlerin normal hücrelere etkisi sonucu genomik DNA'da hasar (kritik genlerde) meydana gelebilir ve oluşan bu hasarların geri dönüşümü olmayan bir şekilde DNA replikasyonu sırasında tamiri başlar (inisiasyon). Promosyon basamağında inisiasyona uğramış hücreler aktif bir şekilde çoğalmaya devam eder. Bu premalign tümör hücre popülasyonlarını oluşturur. Progresyon sürecinde ise daha başka genetik değişikliklerin eklenmesiyle birlikte tümör hücrelerinin yeni klonları artan bir hızla çoğalır, invazif ve metastaz yapma özelliği edinirler. Ayrıca genetik mutasyonlar sonucunda proto-onkogenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile tümör oluşumuna sebep olacak değişiklikler meydana gelir. Genetik mutasyonlar, genomik kararsızlık ve kronik inflamasyon gibi bir seri epigenetik olaylar normal hücrelerin malign tümör hücrelerine dönüşmesine neden olmaktadır. Tüm dönüşen tümör hücreleri; sürekli aktif halde proliferasyon sinyali yayma, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, replikatif ölümsüzlük, anjiogenez oluşumunu sağlama, invazyon ve metastazı aktive etme gibi belli başlı genel özellikler gösterirler (Hanahan ve Weinberg , 2011).

Kanserle mücadelede birincil, ikincil ve üçüncül önleme etkinlikleri yapılır. Bunlar arasında en önemlisi birincil önlemedir, yani kanser yapıcı etkenin ortadan kaldırılmasıdır. Bu kapsamda tütünle mücadele, aşırı kilo ve obezite ile mücadele, fiziksel aktivitenin artırılması (Khan ve ark. 2010), günlük sebze ve meyve tüketilmesi, dengeli ve doğru beslenme alışkanlıklarının topluma kazandırılması, başta Hepatit B olmak üzere kanser etkisi olan enfeksiyonlarla mücadele edilmesi (Plummer ve ark.

2016), alkol kullanımından sakınılması, aşırı güneş maruziyetinden kaçınılması tüm ülkeler için en önemli mücadele stratejileridir.

İkincil önlemede kanser taramaları vardır. Tüm dünyada taraması kabul edilen 3 kanser vardır: Meme, rahim ağzı ve kolorektal kanserler.

Üçüncül önleme ise, en pahalı olanıdır. Burada da kanser teşhisi alan hastaların tedavisinin en etkin şekilde yapılması ve yeterli palyatif bakım hizmetlerinin sunulmasıdır (TBMM, 2010).

Tedavide kullanılan sistemik toksisite yaratabilen ilaçların normal dokulara zarar vermeden kanserli dokuya etki edecek dozda uygulanamadığı belirtilmiştir. Bu nedenle normal dokulara zarar vermeden ilacın etkili olmasını sağlayacak kombinasyon terapileri kullanılması uygun görülmüştür (Rastegar 2013).

Kemoterapinin sıklıkla kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncinin gelişmesine neden olduğu da yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Ding ve ark. 2001)

Doğal ürünler kemoterapide önemli bir yere sahiptir (Chen ve ark. 2003). Doğal ürünlerden köken alan yaklaşık 60 tane kanser kemoterapi ilacı mevcuttur (Suzuki ve ark. 2002). Günümüzde hücre proliferasyonunu inhibe edebilen, apoptosisi indükleyebilen veya sinyal iletimini düzenleyebilen ajanlar kanser tedavisinde kullanılmaktadır (De flora ve Ferguson , 2005).

Beslenme üzerine yapılan çalışmalar sonucunda meyve ve sebze tüketiminin insan metabolizması üzerine koruyucu bir etkisi olduğu bulunmuştur (Temple ve Gladwin , 2003). Az miktarda meyve ve sebze tüketen kişiler yüksek miktarda meyve sebze tüketen kişilerle kıyaslandığında kanser oluşum oranı iki kat daha yükselmektedir (Liu, 2003) (Adom ve Liu, 2002).

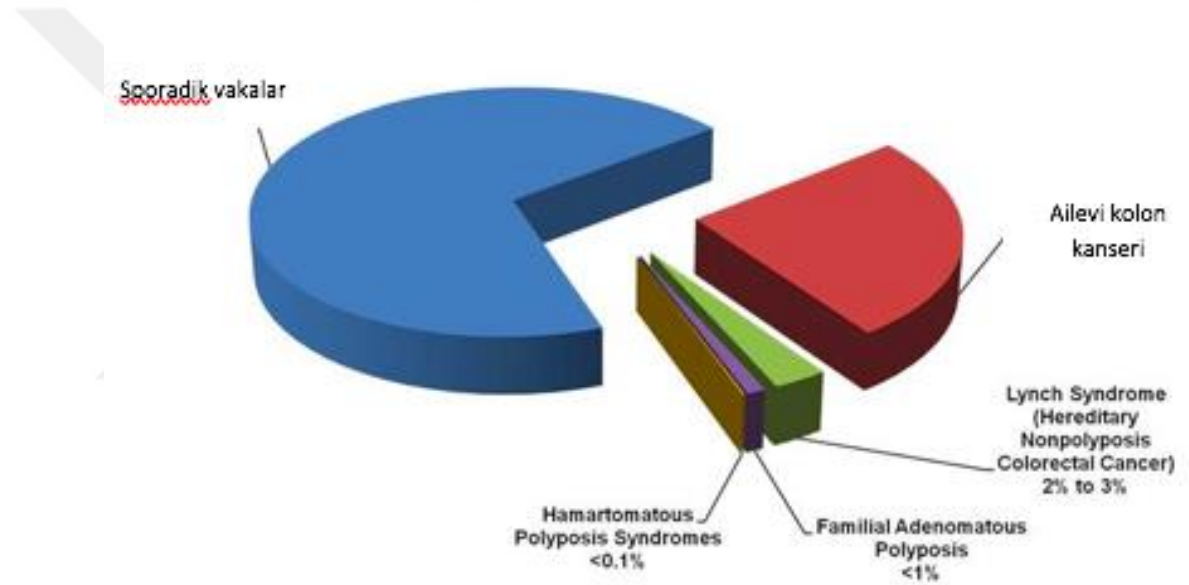
## **2.2. Kolon Kanseri**

Kolon kanseri dünya üzerinde en çok görülen kanser türlerindedir. Her yıl 1 milyondan fazla hastaya kolorektal kanser teşhisi konmaktadır. Her yıl yaklaşık yarım milyon insan bu hastalık sebebiyle ölmektedir. Son yıllarda konuyla ilgili kapsamlı bir bilgi birikimine ulaşılmış ve bu bilgiler günlük pratik tedavide kullanılmaktadır.

Amerikan kanser derneğinin verilerine göre 2013 yılında 102480 kolon kanseri teşhisi konulmuştur. Yine Amerikan kanser derneğinin verilerine göre 2013 yılında 50830 kişi kolon kanseri sebebiyle hayatını kaybetmiştir. Bu rakam kanser sebebiyle gerçekleşen

ölümlerin %9'unu oluşturmaktadır. Kolorektal kanser riski yaşla birlikte artmaktadır. Kansere yakalanan vakaların %90'ının 50 yaş ve üstü olduğu bilinmektedir (American Cancer Society (ACS), 2013).

En yüksek risk artışı genetik temelli olsa da, KRK'lerin çoğunluğunu ailesel kanserden çok sporadik vakalar oluşturur (Wei ve ark. 2004). Ailesel Adenomatöz Polipozis Koli (FAP) ve Hereditör Non-polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC) ailesel kolon kanserleri içinde en yaygın görülenler olmalarına karşılık bunlar KRK vakalarının %5'ten azını oluşturur (Burt ve ark. 1995). Kolon kanser çeşitlerinin yüzdesel dağılımı aşağıdaki dairesel grafikte verilmiştir.



**Şekil 2-3: Kolon Kanseri Çeşitleri (Burt, 2000)**

Kolon kanseri gelişmekte olan ülkelerde kısmen daha nadir görülmekte olup, gelişmiş ülkelerde ise kötü huylu tümörler arasında ikinci sırada yerini almaktadır. Bu çelişki büyük çapta varlıklı yaşam tarzı ile ilişkilidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar bu durumun lifli besin tüketimi (Murphy ve ark. 2012), D vitamini miktarı (Jenab ve ark. 2010), kandaki yağ oranı (van Duijnhoven ve ark. 2011), vücut kitle indeksi (Aleksandrova ve ark. 2013) ve hareketsiz yaşam tarzı (Cao ve ark. 2015) gibi faktörler ile ilgili olduğunu göstermektedir. Bunların yanı sıra diyetle yüksek oranda kırmızı et bulunması ve özellikle etlerin yüksek ısıda pişirilmesi ile kolon kanseri gelişimi ile ilişkili olduğu da varsayılmaktadır (Cross ve ark. 2010).

Kolon kanserinin tedavisinde çok sayıda terapötik ilaç kullanılmaktadır. Kemo ve radyoterapi sistemik olarak kullanıldığında veya kanserli hücreleri öldürmek için direkt dokuya yönelik uygulandığında, sağlıklı hücrelere istenmeyen yan etkilere sebep olarak zarar verir ve tedavinin etkinliğini kısıtlar. Bu yan etkiler sonucunda hastaların kanserden daha kısa bir zamanda öldüğü durumlarla karşılaşmıştır.

Her bir tümör klinik seyrine, moleküler profiline, mikroçevresine ve konak-tümör etkileşimine bakıldığında kendine özgü benzersiz özellikler barındırır. Bu nedenle kolorektal ve diğer başka kanser türlerinde de sınıflandırma yapmaktan kaçınarak ve her bir tümörün moleküler karakterizasyonunu ortaya çıkarmaya yönelik çalışmalara devam edilmelidir (Ogino ve ark. 2012). Bugüne kadar FDA tarafından klinik kullanımı onaylanan Kolorektal kanserin evre II/III aşamasında tanı konabilmesinde kullanılan yalnızca 2 moleküler belirteç bulunmaktadır: 18 genin anlatımına dayanan ColoPrint™ (Salazar ve ark. 2011) ve 12 genin anlatımına dayanan Oncotype Dx Colon Cancer Test™ (Venook ve ark. 2013). Diğer tanı testleri henüz uygulamaya geçirilmemiş olup daha ileri boyutta klinik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bunun yanı sıra onaylanması beklenen birçok tanı testi patoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanımlarının gerçekleştirilmesi için hala çok kompleks olup sadeleştirmeleri gerekmektedir. (Blanco ve ark. 2015).

Kolorektal kanser erken evrede teşhis edildiğinde büyük ölçüde tedavi edilebilir bir hastalıktır. Bunun içinde semptomsuz bir hastada erken evrede kanser tanınabilmelidir. Hastalığın erken teşhisi için toplumu bilgilendirmek ve tarama programları uygulamak gereklidir. Yapılan çalışmalar tarama ve izlenimin kolorektal kanser mortalitesini azalttığını göstermiştir. KRK taramalarını gerçekleştirebilmek için gaitadan gizli kan testi (GGK), fekal DNA testi, çift kontrast baryumlu enema (ÇKBE), sigmoidoskopi, kolonoskopi, bilgisayarlı tomografi ile kolonografi (BTK), kapsül endoskopi gibi çeşitli yöntemler mevcuttur. Bunlar içinde erken tanıyı arttırmak için primer olan test gaitada gizli kan testidir (THSK).

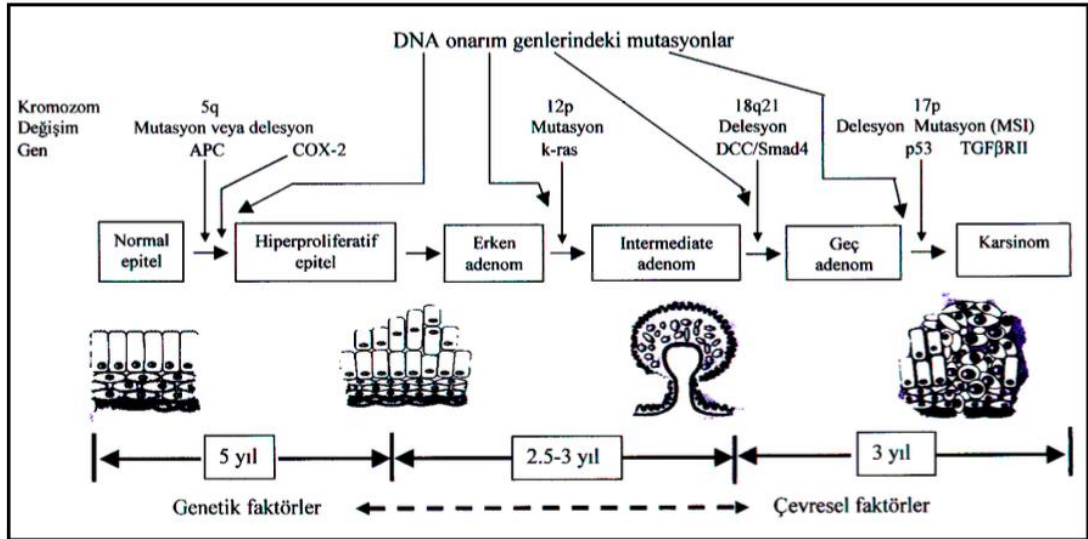
### **2.3. Kolorektal karsinogenezde moleküler genetik değişiklikler**

1990'da Fearon ve Vogelstein'in kolorektal kanser tümorogenezinde rol oynayan moleküler düzeydeki olayları açıklamak amacıyla oluşturdukları model daha sonraki araştırmalara ışık tutmuştur. Fearon ve Vogelstein'in oluşturdukları modele göre;

1- Kolorektal tümörler onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ve tümör supresor

genlerin mutasyonel inaktivasyonu sonucunda oluşurlar. 2- Malign tümör oluşumu için en az 4 veya 5 genin mutasyonu gerekmektedir. Daha az miktardaki değişiklikler ancak benign tümör oluşumu için yeterli olmaktadır. 3- Genetik değişikliklerin birbirini takip eden bir sıra içinde oluştuğu kabul edilmekteyse de tümörün biyolojik özelliklerinin belirlenmesinde bu genetik değişikliklerin birikimi onların oluş sırasından daha önemlidir. 4- Mutant tümör supresör gen heterozigot bir ortamda bulunduğu bile fenotipik etkisini gösterme gayreti içindedir (Fearon & Vogelstein , 1990).

Kolorektal kanser gelişimine sebep olan genetik değişiklikler üç temel grupta incelenebilir; tümör supresör gen aktivitesinin azalması veya kaybolması, protoonkogenlerde oluşan değişiklikler, DNA onarımı (mismatch repair) ile ilgili genlerdeki değişiklikler. Şekil 2-4'de de kolon kanseri gelişiminin moleküler basamakları görülmektedir.



Şekil 2-4: Kolon kanseri gelişiminin moleküler modeli (Dobrucalı, 2007)

## 2.4. Kolorektal Karsinogenezisin Moleküler Mekanizması

### 2.4.1. Hücre içi moleküller ve gelişen olaylar

#### 2.4.1.1. APC Geni Mutasyonu

Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP), kolorektal kanserlerin %1'inden sorumlu olan dominant otozomal karakterde olan kalıtsal bir hastalıktır. FAP hastaları aileleri ile yapılan genetik çalışmalarda bu hastalığa kromozom 5q21'de konumlanan APC geninde oluşan delesyon ve anlamsız (nonsense), çerçeve kayması (frameshift), yanlış mutasyon gibi erken meydana gelen çeşitli mutasyonların sebep olduğu bulunmuştur. FAP eşey

hücrelerinde ve organizmanın tüm dokularında iki allelden birinde oluşan mutasyonla ilgilidir. Kolorektal kanser hücrelerinde bu iki allelden biri kaybolmuş olabilir ya da somatik mutasyona uğramıştır. Bu gen sporadik kanserlerin %60'ından fazlasında mutasyon taşımaktadır. FAP ile ayırt edilebilmesi için düşünülen diğer bir mekanizmada APC genini promote eden bölgenin hipermetilasyona uğramasıdır. Bu durumda genin transkribe olmasını azaltmaktadır.

APC geni;  $\beta$ -katenin seviyesi ve bundan etkilenen sinyallerin düzenlenmesi,  $\beta$ -katenin ve E-kadherin ile hücre adezyonunun düzenlenmesi, mikrotübül etkileşimi ile kromozomal stabilitenin ve hücresel göçün düzenlenmesi, hücre hareketin düzenlenmesi, aktin hücre iskeletinin kontrolü ile hücre polariteyi ve göçü düzenler, apoptozis ve hücre döngüsü komponentlerini inhibe ederek hücre döngüsünü bloke etme gibi fonksiyonlara sahiptir (Bonneton ve ark. 1996).

#### **2.4.1.2. p53 Geni Mutasyonu (17p13.1)**

Hücre döngüsü kontrolü, replikasyon ve genomik stabiliteyi sağlayan DNA tamirinde, ayrıca apoptozis aktivasyonunda ve zehirli ajanlara verilen hücre tepkilerin düzenlenmesinde görev alır. Tetramerik bir protein olmakla birlikte her biri 393 aminoasitten oluşan dört alt üiteden meydana gelmektedir. 17. Kromozomda yer almaktadır. 20 kb uzunluğunda olup 11 ekzon barındırmaktadır. G1/S kontrol noktasında bir fren görevi gören transkripsiyonel bir regülatördür. Hücre döngüsü durdurma, senesens, farklılaşma gibi çeşitli olaylarda da yer almaktadır (Naccarati ve ark. 2012).

#### **2.4.1.3. Kolorektal Kanserde Silinen Bölge (DCC) (18q21.3)**

DCC geni kromozom 18q21 konumunda yer alır. Hücre membranının her iki tarafından geçen 1147 aminoasitlik bir proteini kodlayan 29 ekzondan oluşur. Ekstraselüler kısmı, immunoglobulinlere benzer ekstraselüler bölgeleri olan hücre adezyon proteinleri ile homologtur.

DCC proteini, çoğalma ve farklılaşma süreçlerini düzenleyerek epitelyal/ mezenşimal etkileşimlere müdahale etmektedir (Nagothu ve ark. 2003).

Bu proteinin ekspresyonu kolorektal kanserlerin %50'sinden fazlasında azalmıştır ya da hiç gerçekleşmemektedir. DCC geninin bir tümör baskılayıcı olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Klingelutz ve ark. 1995).

#### 2.4.1.4. DNA Onarım Genlerindeki Değişiklikler

Bir diğer moleküler mekanizma ise Lynch sendromu ve sporadik tümörlerin %15'inin sebebi olarak görülen mikrosatelit kararsızlığıdır (MSI). Mismatch hata tamir sisteminin (MMR-mismatch repair- baz eşleşememesi), yokluğunda KRK oluşumunu açıklar. MMR genlerinde meydana gelen mutasyonlar genomik kararsızlığa sebep olmaktadır. Mikrosatelite kararsızlığı olarak da bilinen mutator fenotipine dönüşmektedir. MMR genlerindeki değişim; özellikle tekrarlayan dizinlerde, AA [S]NAA veya CA[CA]NCA mikrosatelite bölgesinde, yeni mutasyonların ortaya çıkmasına; tekrar bölgelerinin genişlemesi ya da insersiyon ve delesyonlarla küçülmesi ile mikrosatelite kararsızlığına sebep olup bu fenotipi oluşturmaktadır. Bu durum birçok genin inaktivasyonuna BAX veya Kaspaz-5-genleri gibi apoptozisi düzenleyen ya da TGFβRII, WISP-3, IGFIIR veya MMR ailesine ait MSH3 ve MSH6 gibi hücrel büyümenin kontrol ve düzenlenmesinde görev alan birçok genin inaktivasyonuna sebep olmaktadır (Li, 2008).

#### 2.4.1.5. Wnt Wnt/β-katenin yolağı

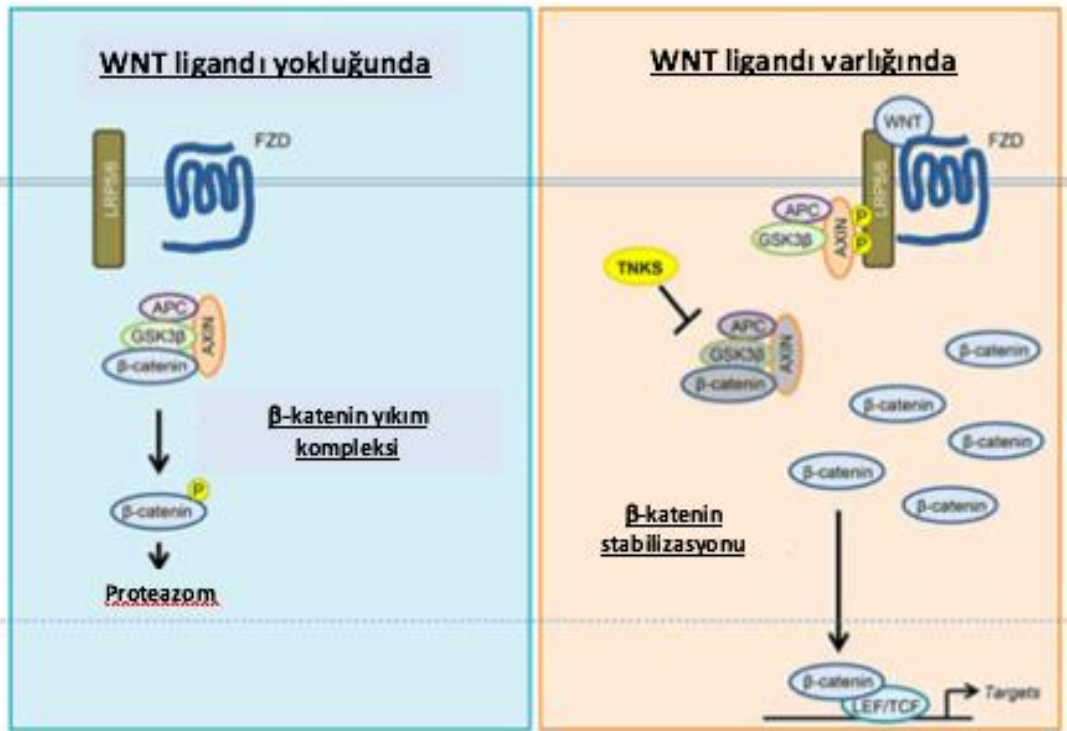
KRK'ların %90'ında görülen mutasyonların birçoğu bu yolağın komponentleridir. APC ve CTNNB1 genlerinde meydana gelen mutasyonlar, bu yolak için çok önemlidir ve ubiquitin-protazom sistemi aracılığıyla β-katenin yıkımına direnç oluşturur. Bu durum da β-kateninin sitoplazmada birikmesine ve nukleusa transferine yol açar. Bunun sonucunda onkoproteinlerin anlatımı aşırı miktarda gerçekleşir. Diğer genlerin de mutasyonlarına yol açarak adenomanın erken oluşumuna sebep olan hiperproliferatif fenotipi oluşur. Wnt/β-katenin yolağınca oluşturulan aktivasyon sadece kolorektal karsinogenezin başlaması için değil aynı zamanda daha ileri seviyelerde malign hücrelerin kontrolünü de sağlar. Bu özelliği, KRK terapilerinin geliştirebilmesi için araştırılan yolakların başında yer almasını sağlamaktadır (Scholer ve ark. 2011).

Bu yolak aynı zamanda regülasyon, farklılaşma, proliferasyon ve hücre ölümü gibi dolayısıyla embriyonik gelişim, büyüme ve homeostaside meydana gelen anormalliklerle de ilgili olan süreçlerde de rol oynamaktadır. Wnt proteinleri reseptörlerle yönlendirilen sinyal transdüksiyon yolaklarını stimüle eden ligandlar olarak hareket ederler. Bilinen dört Wnt sinyal yolağı bulunmaktadır: 1) kanonik veya Wnt-β-katenin yolağı; 2) Kinaz A proteini ile ilişkili Wnt/Ca<sup>+2</sup> yolağı; 3) Planar hücre polaritesi yolağı; 4) Miyogenez ve kinaz C proteini ilişkili yolak.



En önemli yolak  $\beta$ -katenin ile ilişkili olan sitoplazmik kontrol ve regülasyonu sağlayan Wnt yolağıdır. Sitoplazmik  $\beta$ -kateninin artması ile nükleusa giriş başlar ve bu durum hücre bölünmesi, embriyonik gelişme ve morfogenez ile ilgili olan genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Wnt- $\beta$ -katenin yolağı organ gelişimini ayarlayan ve bazı dokuların homeostasisini sürdüren Notch, Hedgehog, Rac/K-RAS ve mTOR gibi birçok sayıda hücre sinyal yolağı ile ilişkilidir. Ayrıca Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve transformatif büyüme faktörü beta TGF- $\beta$  da aktivitelerini düzenlemek ve bazı spesifik hücresel süreçleri kontrol etmek için Wnt- $\beta$ -katenin ile etkileşime geçer. Bu yollar nadiren tek başına çalışır, yollardan birinde meydana gelen aksaklık, kanser gelişimi ile sonuçlanabilir (Takebe ve ark. 2011).

Bu dört Wnt sinyal yolağından, Wnt/ $\beta$ -katenin yolağı kansere sebebiyet veren hücresel değişikliklerden sorumlu olarak belirtilmiştir.  $\beta$ -kateninin malign süreçlerde devreye girmesi yapılan çalışmalarla ilk KRK'larda tespit edilmiştir. APC proteini ile kompleks oluşturarak FAP'ın karsinogenezinde rol almıştır. Aynı zamanda adenomaların adenokarsinomalara dönüşümü *KRAS*, *p53* ve *Smad4* gibi onkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların birikimiyle gerçekleşmektedir. APC geninin yokluğu  $\beta$ -kateninlerin kararsızlığına sebep olur bu durum da epitelyal hücrelerin transformasyonları ile sonuçlanır (Raskov ve ark. 2014). Şekil 2-5'de *WNT/beta-katenin* yolağı şematize edilmiştir.



Şekil 2-5: WNT/beta-katenin yolağı (Suzuki ve ark. 2015)

#### 2.4.1.6. E-kadherin and $\alpha$ -katenin

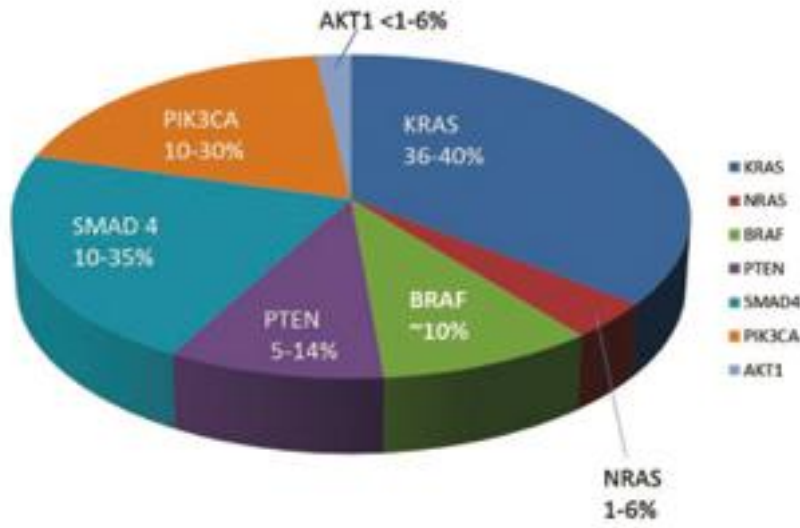
Kadherinler tümör baskılayıcı hücre adhezyon molekülleridir. E-kadherin grubu hücre adhezyon moleküllerinin ekspresyonlarının baskılanması tümör gelişimini tetikler (Moran ve ark. 2010).

E-kadherin/ beta-katenin kompleksi uzak metastazın olup olmadığına dair önemli bir öngörücüdür. Epitelyal kadherin (*CDH1* geniyle kodlanan E-kadherin) ekspresyonunda oluşan bir aksaklık, epitelyal-mezenkimal transizyon (EMT) ile birlikte meydana gelir, ki bu durum tümör gelişimi ve metastazda önemli bir kilit noktadır. EMT çok kompleks ve çok değişkenli bir süreçtir. *WNT/beta-katenin*, *TGF-beta*, *TNF-alfa*, *RAS*, *ILK* (integrin bağlı kinaz), *NF-kappa beta*, *HIF*, *AKT* veya *EGFR* gibi birçok sinyal yolağı ile ilişkilidir (Bezdekova ve ark. 2012).

E-kadherin ekspresyonunun azalmasının etkisi mide, meme, tiroid, hepatoselüler karsinoma ve bunun yanısıra gibi birçok kanserde olduğu gibi kolon kanserinde de tanımlanmıştır (Chen, ve ark 2012).

Birçok durumda KRK, ras proto-onkogen mutasyonu ile ilgili olan hiperplastik polip oluşturan ve APC geninde oluşan mutasyon ile ilgili olan (sporadik vakaların %80'inde bulunmaktadır) olmak üzere iki tipi olan ACF hücreleri gibi progenitör hücrelerinde

meydana gelen değişiklikler sonucu oluşur (Tsanou ve ark. 2008). Bu değişiklikler, APC/ beta-katenin yolağı inaktivasyonu gözleendiği yerde E-kadherin grubu ekspresyonu değişiklikleri ile erken aşamalarda meydana gelirler. E-kadherin grubunu kodlayan genlerin ekspresyonundaki değişiklikler ile, primer neoplasm hücrelerinin adhezyon özelliklerini kaybettiği bölgede metastaz potansiyellerinin artmasıyla olgun tümörün oluşumu sürecinde de devreye girerler (Lorenc ve ark. 2015). Genel itibariyle kolon kanserinde görülen somatik mutasyonlar Şekil 2-6 'da verilmiştir.

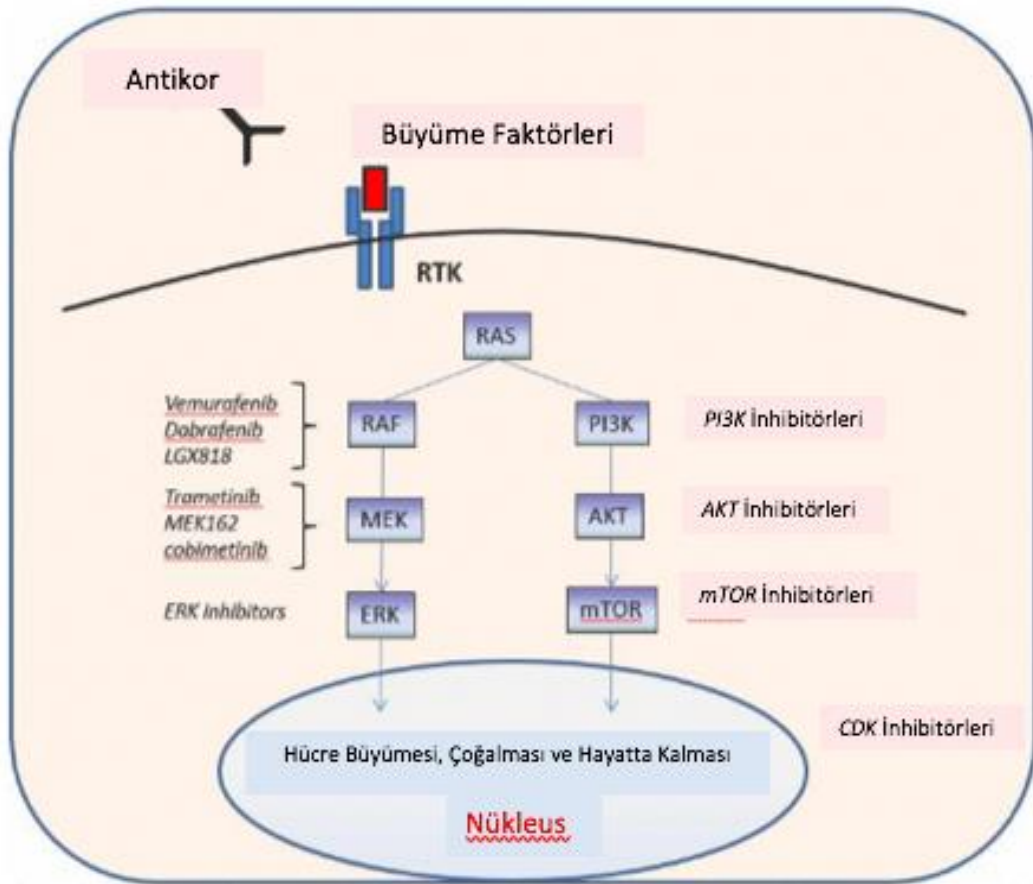


**Şekil 2-6: Kolorektal Kanserde Görülen Somatik Mutasyonlar (Lo ve ark. 2016)**

#### 2.4.1.7. BRAF, NRAS, VEGF genleri

BRAF geni 7. kromozomun uzun kolunda yer alır (7q34). MEK/ERK sinyal yolu transdüksiyonunu yönlendiren RAS ailesine ait sitoplazmik serin/treonin kinazı kodlar. Bu yol hücre büyümesi, farklılaşma ve apoptozis oluşumu gibi olayların düzenlenmesinde çok önemlidir. RAS ailesi genleri: *HRAS*, *NRAS* ve *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma*) neoplazilerde en sık değişime uğrayan onkogenlerdendir. KRAS onkogeni PI3K/ PTEN/ AKT ve RAF/ MEK/ ERK sinyal yolaklarında yer alır. İnsan tümörlerinde RAS mutasyonlarının %85'i KRAS mutasyonudur (Arrington ve ark. 2012). Bunun yanında NRAS mutasyonları %15 ve HRAS mutasyonları ise yalnızca %0.12-1 arası bir oranı oluşturmaktadır. Sıklıkla KRAS mutasyonları olmak üzere RAS geni kolon, pankreas, akciğer tümörleri için spesifiktir. Bu genlerce kodlanan proteinler 21Kd (p21) protein yapısında olup GTPaz aktivitesine sahip olup hücre büyümesi ve farklılaşması sinyal yolaklarında rol alırlar. Bu gende meydana gelen mutasyon akciğer kanserlerinin %30'unda, kolon kanserlerinin %40'ında, pankreas kanserlerinin

%80'inde ve tiroid kanseri vakalarının %55'inde olmak üzere malign tümörlerin gelişiminde en yaygın görülen genetik olaydır. Bu gende meydana gelen mutasyonların yaklaşık %90'ı ilk ekzonun spesifik bölgesinde, %80 oranında 12. kodonda %20 oranında ise 13. kodonda yer almaktadır (Makrodouli ve ark. 2011). RAS ve PIK3CA sinyal yolları Şekil 2-7'de görülmektedir.



Şekil 2-7: RAS ve PIK3CA sinyal yolları (Lo ve ark. 2016)

Vasküler Endotelial büyüme faktörü (*VEGF*) geni insan kromozomu 6p21.3 bölgesinde yer alır. Sekiz ekzon ve yedi intron barındırır ve yaklaşık 14kb uzunluğunda kodlama bölgesi içermektedir. Tümörler ile ilgili hücreler neovaskülarizasyonu oluşturan endotel hücreleri ve perisitlerdir. Tümör hücreleri tarafından üretilen sitokinler ve büyüme faktörleri tümör mikroçevresi içerisinde büyümesi için optimal şartları oluşturur. Stroma hücreleri tarafından salgılanan sitokinler hücrelerin malign davranışlarını etkiler. Proenflamatuarlar interlökin 4 (IL4) ve interlökin-1 (IL1), VEGF ve tümör büyüme faktörleri (TGF- $\beta$ -1,-2,-3) ve reseptörleri ölümsüzlük, tümör büyümesi ve

metastaz ile bağlantılı çeşitli sinyal yollarını aktive eden genlerin transkripsiyonunu teşvik etmektedir (Martin ve ark. 2014).

Hipoksia, VEGF geni ekspresyonunun başlıca regülatörüdür. Oksijen basıncının azalması, hipoksiyle indüklenen faktör (HIF1) transkripsiyon faktörü aracılığıyla VEGF geni transkripsiyonunun artmasına sebep olur. Hipoksi tümör gelişiminde belirleyici bir kademedir. Tümör gelişiminde HIF1 transkripsiyon faktörü, IL-6, TGF- $\beta$  ve VEGF faktörleri ile bir araya gelir. Kolon kanserinde IL-6 seviyesi ve HIF1 $\alpha$  artışı etkileşimi proanjiojenik VEGF izoform ekspresyonunu indükler. Bu durum da tümör proliferasyonunu, apoptozisten kaçışı ve tümör hücrelerinin göçünü teşvik eder (Arvelo ve ark. 2015).

Tüm bunlara ek olarak kolon kanserinde görülen onkogen ve tümör baskılayıcı gen mutasyonları ve tipleri, değişim oranları tablo 2-1’de detaylı bir şekilde verilmiştir.

**Tablo 2-1: Kolon Kanserinde Görülen Mutasyon Türleri (Akyol, 2014)**

Gen	Mutasyon Tipi	Tahmini değişiklik sıklığı
Onkogenler		
<i>KRAS</i>	Nokta mutasyonu (12,13,61 kodonları)	40% (mutasyonların %75’inden fazlası 12. kodonda)
<i>NRAS</i>	Nokta mutasyonu (12,13,61 kodonları)	<5%
<i>PIK3CA</i>	Kinaz aktivitesini artıran nokta mutasyonları	15-25%
<i>BRAF</i>	Kinaz aktivitesini artıran nokta mutasyonları (V600E gibi)	5-10% (CIMP pozitif KRK ile ilişkili mutasyonlar)
<i>EGFR</i>	Gen amplifikasyonu	5-15 %
<i>CDK8</i>	Gen amplifikasyonu	10-15 %
<i>CMYC</i>	Gen amplifikasyonu	5-10%
<i>CCNE1</i>	Gen amplifikasyonu	5%
<i>CTNNB1</i>	N ucundaki çerçeve içi delesyonları ve nokta mutasyonları sabitleyici	<5%
<i>NEU(HER2)</i>	Gen amplifikasyonu	<5%

<i>MYB</i>	Gen amplifikasyonu	<5%
Tümör Baskılayıcı Genler		
<i>p53</i>	Nokta mutasyonu, allel kaybı	60-70% (nokta mutasyonların %95'inden çoğu missense)
<i>APC</i>	Çerçeve kayması, nokta mutasyonu, delesyon ve allel kaybı	70-80% (neredeyse tümü kesilmiş protein sebep olur)
<i>FBXW7</i>	Nonsense, missense, delesyon	20%
<i>PTEN</i>	Nonsense, delesyon	10%
<i>SMAD4</i>	Nonsense, missense ve allel kaybı	10-15%
<i>SMAD2</i>	Nonsense, missense ve allel kaybı	5-10%
<i>SMAD3</i>	Nonsense, delesyon	5%
<i>TGFβ1R</i>	Çerçeve kayması, nonsense	10-15% (%90'I MSI-H KRK'larda)
<i>TCF7L2</i>	Çerçeve kayması, nonsense	5%(MSI-H ve MSS olmak üzere her iki KRK türünde)
<i>ACVR2</i>	Çerçeve kayması	10% (mutasyonların %80'inden fazlası MSI-H KRK'larda)
<i>BAX</i>	Çerçeve kayması	5% (sıklıkla bir allel yaklaşık %50 oranında MSI-H KRK'larda)

MSI-H KRK: Yüksek oranda mikrosatelite kararsızlığı gösteren kolorektal kanser  
MSS KRK: Mikrosatelit stabilitesi olan kolorektal kanser

## 2.4.2. Genomik ve Epigenomik Kararsızlık ve Kromozomal Değişiklikler

### 2.4.2.1. Kromozomal Kararsızlık (CIN)

KRK'ların %70-85'i CIN aracılığıyla gelişir. CIN yolağı moleküler sapmalar yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerinin birikimiyle oluşmaktadır. CIN yolağı APC mutasyonu, KRAS onkogeni mutasyonu, bir tümör baskılayıcı olan *TP53* genini içeren 18q kromozom kaybı ve 17p kromozomu delesyonu ile ilişkilidir. *APC*'de meydana gelen patojenik mutasyon APC proteini ile β-katenin bağlanmasını engeller.

APC-  $\beta$ -katenin bağlanması Wnt yolağını baskılar. *APC* mutasyonu kolonik kanser vakalarının %60'ından rektal kanserlerin ise yaklaşık %82'sinde saptanmıştır (Jass ve diğerleri, 2002).

KRAS (12p12) CIN yolağındaki bir diğer önemli genidir. KRAS mutasyonları KRK vakalarının yaklaşık %35-42'sinde bulunmaktadır. KRAS, sadece CIN yolağına özgü bir gen değildir aynı zamanda CIMP yolağında da önemli bir yere sahiptir.

*DCC*, *SMAD2* ve *SMAD4* 18q21.1 kromozomunda konumlanmıştır ve bu bölgedeki allelik kayıp, KRK vakalarının neredeyse %60'ında bulunmaktadır. *SMAD2* ve *SMAD4*, apoptosis gibi büyümenin düzenlenmesinde görev alan süreçlerde önemli olan TGF- $\beta$  sinyal yolağında görev alır.

TP53 geni de CIN yolağı için önemli olup KRK'ların %50-75'inde fonksiyon bozukluklarına rastlanmıştır.

#### **2.4.2.2. Mikrosatellit Kararsızlığı (MSI)**

Bir diğer önemli genomik kararsızlık MSI'dır. Mikrosatellitler, tutarsızlıklarla bağlantılı olan genom içerisine yayılmış nükleotit tekrar dizileridirler. DNA polimeraz özellikle bu kısa tekrar dizilerini kopyalarken hata yapmaya çok meyillidir. Bu sebepten hata tamir (MMR) disfonksiyonu MSI ile sonuçlanır. Hata tamir sistemi; spesifik partner proteinleriyle fonksiyonel heterodimerler oluşturan MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 ve PMS2 gibi en az yedi proteinden meydana gelir (Hoeijmakers, 2001).

MLH1 ve MSH2 hata tamir mekanizması için çok önemlidir ve beş fonksiyonel heterodimerik protein oluştururlar (MSH2-MSH3; MSH2-MSH6; MLH1-PMS1; MLH1-PMS2; MLH1-MLH3). *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ve *PMS2* mutasyonları HNPCC'lerin hepsinde mevcuttur. MSI genetik hatalarda büyük bir artışa sebep olmaktadır. Ayrıca kolorektal kanser ile bağlantılı *MSH3*, *TGFBR2*, *BAX*, *CASP5*, *MSH6*, *CTNBN1*, *APC*, *IGF2* ve *E2F4* gibi genlerde mikrosatellitler mevcuttur (Worthley ve Leggett, 2010).

#### **2.4.2.3. CpG Adacık Hipermetilasyonu (CIMP)**

CIMP yolağı sporadik KRK vakalarında en önemli ikinci yolaktır. Sporadik vakaların yaklaşık %15'inde görülmektedir. CIMP yolağı, *MLH1* gibi tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu epigenetik olarak inaktive olmasıyla sonuçlanan, promotor bölgelerinin metilasyonunu gerçekleştirerek, sporadik kanserler için gerekli olan epigenetik kararsızlığı sağlar.

CIMP pozitif KRK'lar öncü lezyonlar açısından diğer yolaklardan ayrılırlar. CIN yolağı aracılığıyla oluşan KRK'lar ve ayrıca HNPCC adenomatöz poliplerden köken alırken, CIMP yolağı ile oluşan KRK'lar sesil serrated adenom patolojik öncülerden köken alırlar (Lino ve ark. 1999).

## 2.5. Kolon Kanseri Tedavi Yöntemleri

Kolorektal kanser için en yaygın tedavi şekli ameliyattır. Yayılmamış kanserler için ameliyat tedavi edici olabilmektedir. Kanserin bağırsağın derin iç kısımlarına nüfuz ettiği ya da lenf nodlarına yayıldığı birçok hastaya ameliyat öncesi ya da sonrası kemoterapi, yalnız başına ya da radyasyon ile birleştirilerek uygulanır. Kolon kanserinin erken teşhisinde ve yerinin belirlenmesi durumunda vakaların %90'ı beş yıl hayatta kalabilmektedir. Bununla birlikte kolorektal kanserlerin %39'u bu aşamada tespit edilebilmektedir. Eğer kanser yakın organlara ve lenf nodlarına sıçradığında tanı konmuş ise vakaların beş yıllık sağ kalımı %70'e, uzak organlara sıçradığında tanı konmuş ise %12'e düşmektedir (ACS, 2013).

Tedavide farmasötik bitkilerin kullanılması büyük bir öneme sahiptir (Hamedeyazdan ve ark. 2012). Kanser tedavisinde bitkilerin kullanılması modern tıbbın temelini oluşturmakta ve yeni ilaçlara büyük bir kaynak sağlamaktadır (Suttana ve ark. 2010).

Kolşisin, vinka alkaloidleri ve taksol gibi bileşimlerin doğal kanser önleyici bileşimleri olarak tanımlanması ve izole edilmesi, bilim insanlarını kanser hücre hatları üzerinde bitki türlerinin farklı kısımlarını incelemeye teşvik etmiştir (Saravi ve ark. 2013)

Kemoterapi ilaçlarının tek başına yüksek dozda ya da uzun sürelerle kullanılması sistemik birikime yol açarak olumsuz yan etkiler oluşturur. Bu olumsuz yan etkilerini engellemek amacıyla çeşitli kombinasyon kemoterapi arayışları ortaya çıkmıştır. Kombinasyon terapilerinde kullanılmak amacıyla bitkisel kaynaklı kimyasal bileşikler araştırmaların konusu olmuştur (Riddick ve ark. 2005) (Jin ve ark. 2010)

## 2.6. Flavonoidler

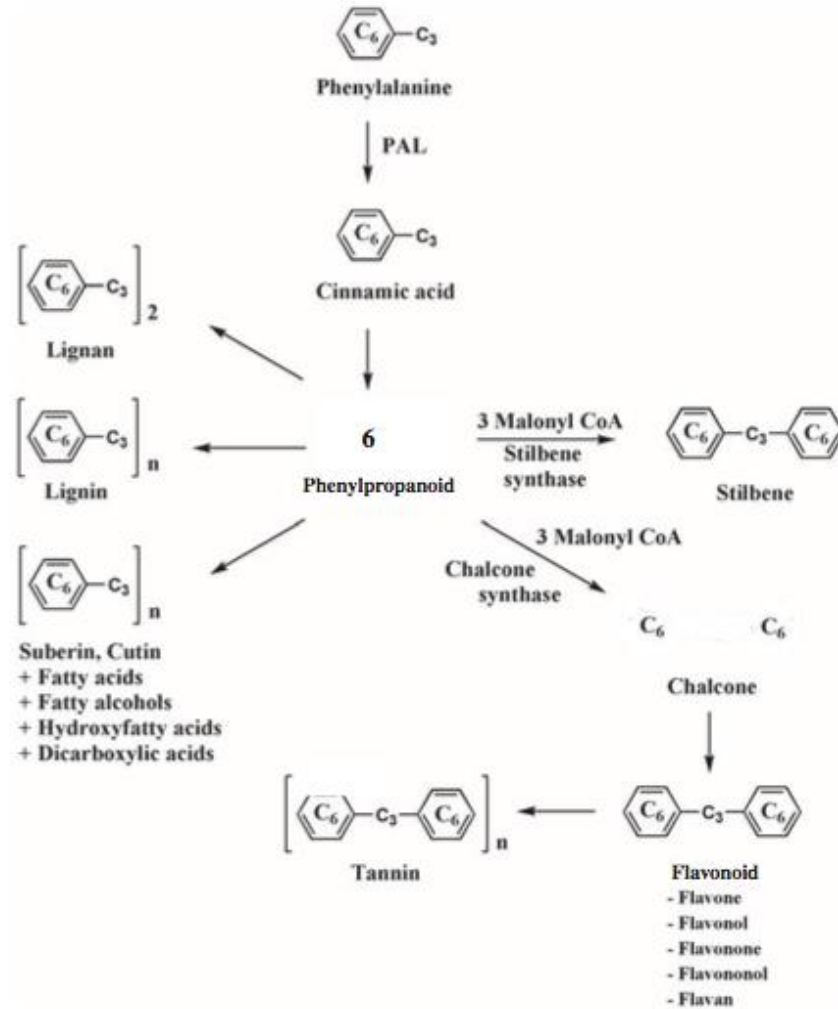
Kardiyovasküler hastalık (KVH), diyabet ve kanser gibi kronik hastalıklar birçok insanın ölümüne ve sakatlığına sebep olan dünya çapında sağlık sorunlarıdır. Sebze, meyve ve tahıllar bu hastalıklara karşı koruyucu etkiye sahiptirler. Bu koruyucu etkiyi sağlayan bileşikler; meyve, sebze ve tahılların içlerinde bulunan bioaktif, besin değeri içermeyen fitokimyasallardır. Bu zamana kadar yaklaşık 10,000 fitokimyasal saptanmış olup büyük bir kısmı da keşfedilmeyi beklemektedir (Zhang ve ark. 2015). Gıdalarda



bulunan bu fitokimyasalların sağlık üzerindeki olumlu etkilerini anlayabilmemiz için ise bilinmeyen kısmın açığa kavuşturulmasına ihtiyaç vardır.

Fitokimyasallar; karotenoidler, fenolikler, alkaloidler, nitrojen içeren bileşikler ve organosülfür bileşikleri olarak sınıflandırılabilir. En çok araştırılan fitokimyasallar; fenolikler ve karotenoidlerdir (Hollman ve Arts, 2000).

Fenolikler bir ya da birden fazla hidroksil grubu içeren bir ya da birden fazla aromatik halkadan oluşmaktadır. Fenolik asitler; basit fenoller, fenilpropanoidler, flavonoidler, benzoik asit türevleri, lignanlar, ligninler, stilbenler, kumarinler ve taninler olarak kategorize edilir (Sak, 2014). Fenilpropanoidler Şekil 2-8’de gösterildiği gibi lignin ve diğer fenolik bileşiklerin öncü maddesi olarak görev alır.



**Şekil 2-8: Fenilalaninden fenilpropanoidler, flavonoidler, taninler ve diğer fenoliklerin üretimi (Ötleş, S, 2005)**

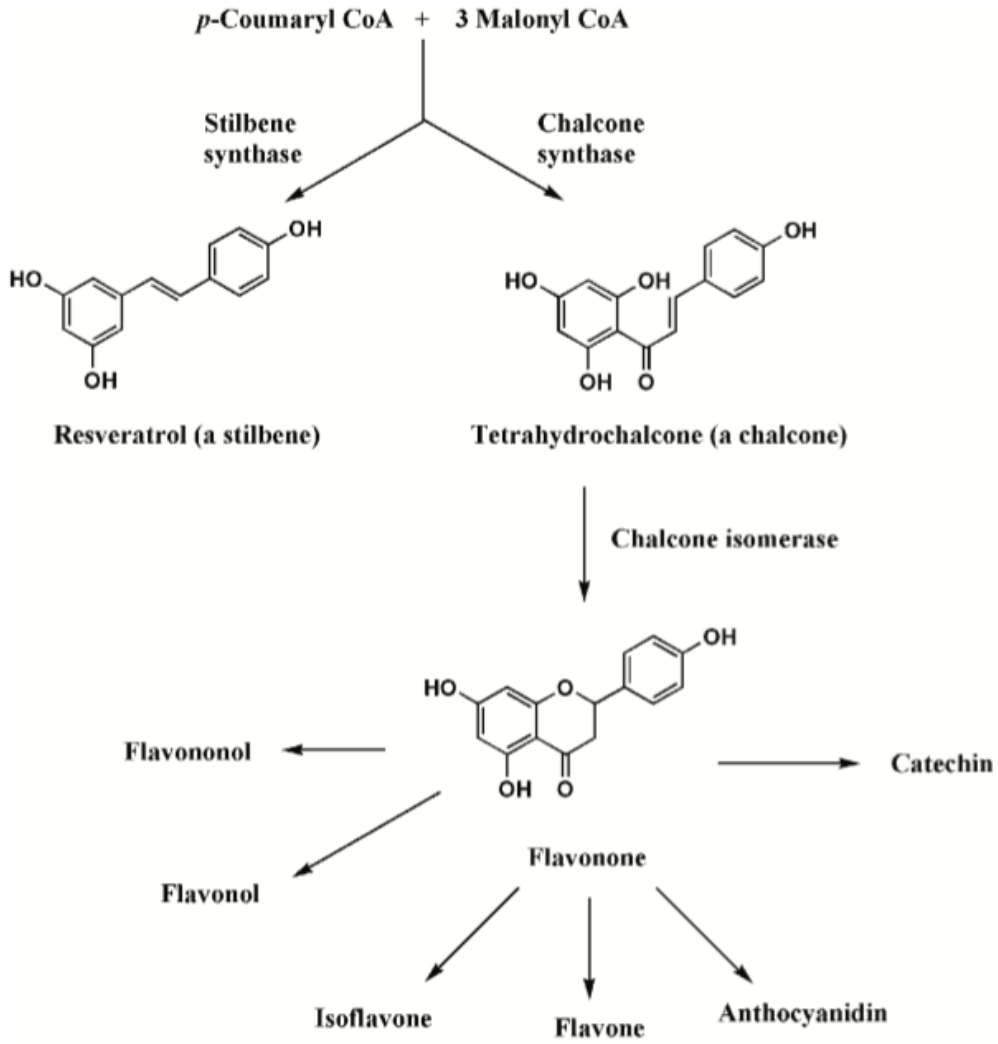
Flavonoidler, meyvelerde, bitkilerde ve diğer bitkisel ürünlerde bulunan antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerdir. Özellikle bitkilerin yaprak ve çiçeklerinde olmak üzere

tüm kısımlarında bulunmaktadır. Bugüne kadar 4000'den fazla flavonoid tanımlanmıştır (Liu, 2004).

Flavonoidlerin güvenilir ve kolay elde edilebilir olmaları kemoterapi veya ilgili ajanlar için klinik kullanım için ideal olmalarını sağlamaktadır (Szliszka ve ark. 2011) (Ninomiya ve ark. 2013). Kanser terapisinde kullanılan yapay olarak üretilen ajanların hemen hemen hepsinin normal hücelere toksik etkileri çok yüksektir. Ciddi hasarlara sebep olmaktadır (Gupta ve ark. 2001). İdeal antikanser ajanının normal kanser hücelere ters etkisi minimal düzeyde, tümör hücelerine olan öldürücü etkisi ise maksimum düzeyde olmalıdır.

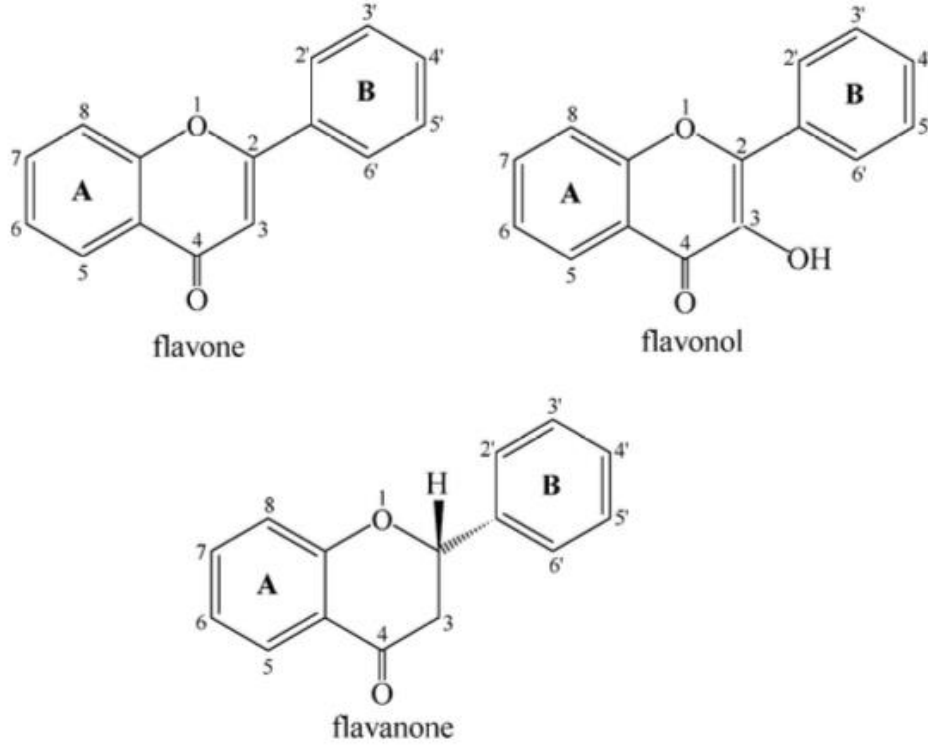
### **2.6.1. Flavonoidlerin yapısı**

Flavonoidler bitki sekonder metabolitleridir. En az bir hidroksil substituenti taşıyan fenilkromanon yapılarına (C6-C3-C6) göre kimyasal olarak sınıflandırılırlar. Doyma seviyeleri ve merkez piran halkalarındaki farklılıklarla flavonoller, flavonlar, flavanoller (kateşin), flavononlar, antosiyanidinler ve izoflavonoidler olarak sınıflandırılırlar (Şekil 2). Flavonoidler doğada sıklıkla glikozillenmiş veya esterleşmiş formlarda bulunmaktadır. Gıda işlenmesinin bir sonucu olarak aglikonlar halinde de bulunabilmektedir (Hollman ve Arts, 2000). Ayrıca flavonoidlerin ve stilbenlerin kimyasal dönüşümleri Şekil 2-9'da yer almaktadır.



**Şekil 2-9: Fenil propanoidler (coumaryl CoA) ve malonil CoA'dan flavonoidlerin ve stilbenlerin üretimi (Shahidi ve Naczki, 2005)**

Belli başlı fitokimyasallar arasında apigenin, luteolin, kafeik asit, kafeik asit fenetil ester (KAFE), chrysin, galangin, pinocembrin, pinobanksin, ginestein, hesperidin ve quercetin, kaempferol, myricetin, isorhamnetin gibi polifenolik bileşikler olan flavonoidler yer almaktadır. Flavonoidlerin kimyasal yapıları Şekil 2-10'da verilmiştir.



**Şekil 2-10: Flavon, flavonol ve flavanonun yapısı (Stefova ve ark. 2003)**

### 2.6.2. Flavonoidlerin metabolizması ve biyoyararlanımı

Flavonoidler genel olarak iki benzen halkasının (A ve B) oksijen içeren bir piren halkası (C) ile bağlanması ile oluşmaktadır (Ötleş, 2005). Oksidatif hücre hasar oluşumunu engelleyen kanser önleyici etkiye sahip serbest radikal çöpçülerdir (Howells ve Manson, 2005).

Bu fenolik bileşikler ksenobiyotik metabolizması enzimleri ile etkileşime geçebilir (Ben Sghaier ve ark. 2011), sinyal iletimindeki kinazları inhibe edebilir, östrojen tip 2 bağlanma noktaları ile etkileşebilir (Benavente Garcia ve Castillo, 2008) ve gen ekspresyon kalıplarını değiştirebilirler (Cai ve ark. 2011).

Bu bileşiklerin moleküler büyüklükleri, polariteleri, çözünürlükleri farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar flavonoidlerin, biyoyararlanımlarını ve farklı makromoleküller, hücre içi organeller, hücreler, organlar ve dokular içinde dağılımını etkiler.

### 2.6.3. Flavonoidlerin etkileri

Flavonoidler, serbest radikal elektronlarının transferini gerçekleştirerek, metal şelatlama aktiviteleri ile, antioksidan enzimlerini aktive ederek, alfa tokoferol radikallerini

azaltarak ve oksidazı inhibe ederek organizmadaki koruyucu etkilerini göstermektedirler (Heim ve ark. 2002).

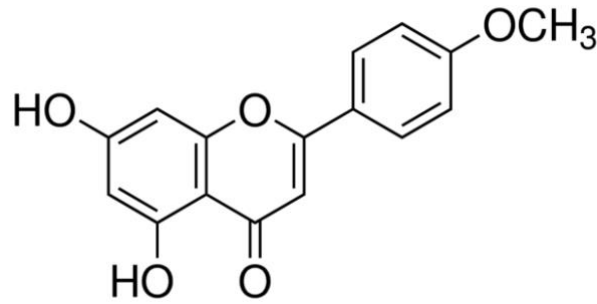
Tömür nekrozis faktörü alfa stimülasyonu, hücre proliferasyonunun inhibisyonu, apoptoz indüklenmesi gibi birçok sinyal yolağını değiştirebilme özelliklerinden dolayı antikanserojen özelliklere sahiptirler.

Oksidatif hasarın azalması, karsinojenlerin inaktivasyonu, hücre farklılaşmasının oluşumu, tümör anjiogenezinin bozulması, metastazın baskılanması flavonoidlerin antikanserojenik aktiviteleridir (Kanno ve ark. 2005).

Flavonoidlerin hücre gelişimini hücre döngüsünün birden çok evresinde durdurabilme özelliğinde olduklarını Neves ve arkadaşları yaptığı çalışmalarla ortaya çıkarmıştır (Neves ve ark. 2011).

### 2.6.3.1. Acacetin

Bir O-metillenmiş flavon olan acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone), özellikle *Robinia pseudoacacia* ve *Turnera diffusa* bitki türlerinde, ayrıca çeşitli bitki, tohum ve çiçeklerde bulunmaktadır. Çeşitli flavonoidlerin in vitro olarak T hücreli lösemi, böbrek, akciğer, mide prostat, mesane, melanom, osteosarkom, meme ve lenfoid kanser türevli hücre hatları gibi birçok kanser türüne antianjiogenik ve antikanserojenik etkisi olduğu bilinmektedir. Şekil 2-11'de acacetinin yapı formülüne yer verilmiştir.



**Şekil 2-11: Acacetin yapı formülü**

Acacetin tarafından indüklenen hücre ölümü nükleer morfolojideki değişimler ile, DNA fragmantasyonu ile ve hücre morfolojisi ile karakterizedir. Acacetin'in apoptozisi indükleyerek ve hücre siklusünü bloke ederek antiperoksidatif ve antiinflamatuvar, antiplazmodial ve antiproliferatif etkileri olduğu da tespit edilmiştir (Hsu ve ark. 2004a) (Hsu ve ark. 2004b). Acacetinin, NFκB, p44/42 MAPK ve PI3K/Akt aktivasyonunu bloke ederek bunun sonucunda iNOS ve COX2 ekspresyonlarının inhibisyonuna sebep

olarak LPS ile tetiklenen enflamasyona karşı koruduğu bulunmuştur (Pan ve ark. 2006). Bu sebeplerden acacetinin, tümörögenöz ilişkili enflamasyona karşı potansiyel bir kemoterapi ajanı olabileceği düşünölmektedir. Aynı zamanda MLK3/MKK3/6 ve p38'i içeren mitojen aktivasyonlu protein kinaz sinyal iletimini düzenlediği de yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Chien ve ark. 2011).

Acacetinin B halkasındaki metoksil grubu apigenin yapısına benzer olmakla birlikte ATP bağlanma bölgesinin bir kompetitif inhibitördür ve TPA ile tetiklenen fibroblast hücrelerinde protein kinaz C aktivitesini inhibe eder.

Acacetinin biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri geniş çapta ortaya konulmasına rağmen, antienlamatuvar ve antikanserojenik etkilerinin hangi mekanizmalarla meydana geldiği henüz tam manasıyla aydınlatılamamıştır.

Acacetin'in kolon kanseri HCT 116 ve HT-29 hücreleri üzerine olan etkisine dair bir bilgi bulunmamaktadır. Sitotoksik etki oluşturduğu sonucu elde edildiği takdirde acacetinin HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde hangi moleküler mekanizmalar üzerinden bu etkiyi oluşturduğuna dair çalışmalar sürdürülecektir.

Yapılan literatür taramaları çalışmalarında acacetin flavonoidinin kolon kanserinde olan etkinliğinin henüz araştırılmadığı saptanmıştır. Araştırmamızın özgünlüğü bu temele dayanmaktadır.

Yapılacak çalışma acacetinin HT-29 ve HCT 116 insan kolon tümör hücre hatlarının gelişimini azaltıcı ve apoptozunu arttırıcı etkisinin olup olmadığını anlamak üzerinedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Materyaller

##### 3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Acetinin (00017) Sigma Aldrich firmasından, hücre kültür çalışma şartlarını sağlayacak şekilde temin edilmiştir.

Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC, LGC Standarts) firmasından temin edilen HCT 116 ve HT-29 kolon kanseri hücre hatlarını yetiştirmek için McCoy's 5A Modifiye besiyeri kullanılmıştır. Sağlıklı kontrol grubu MRC-5 hücre hatlarını yetiştirme ortamı olarak da RPMI-1640 (Lonza, BE12-918F, L-Glutamin) ve fenol red içermeyen besiyeri kullanılmıştır. Beslenme ortamları için fetal sığır serumu (FBS, sıcaklık inaktif, Gibco, 10437028) ve penisilin-streptomisin (Gibco, 15140122) eklenerek hazır hale getirilmiştir.

MRC-5 alt kültür işlemleri için %0,25 Tripsin-EDTA (Gibco, 25200072) ve DPBS olarak  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$  içermeyen (Gibco, 14190367) kullanılmıştır.

Hücre canlılık tayinini saptamak amacıyla WST-1 (Roche, 11644807001) kiti kullanılmıştır. Acetinin oluşturacağı apoptotik aktivitenin belirlenebilmesi için kaspaz 3 (kolorimetrik, BioVision, K106-100) ile Annexin V (apoptoz deteksiyon, Merck Millipore, MCH100105) kitleri ile çalışılmıştır.

##### 3.1.2. Cihazlar

Deneyde kullanılan cihazların listesi Tablo 3-1' de verilmiştir.

**Tablo 3-1: Deneyde kullanılan cihazlar**

<b>Cihaz Listesi</b>
<b>CO<sub>2</sub> İnkübatörü (New Brunswick)</b>
<b>Işık Mikroskobu (Leica)</b>
<b>Otomatik Hücre Sayacı (Life Technologies)</b>
<b>Laminar Kabin (Fast Safe Elit)</b>
<b>Vorteks</b>
<b>Santrifüj (Beckman Coulter)</b>
<b>ELISA Okuyucu (Spektrofotometre ölçümleri için) (ThermoScan, Thermo)</b>
<b>Su Banyosu</b>
<b>Buzdolabı</b>
<b>Sıvı Azot Tankı</b>
<b>Otoklav</b>
<b>Flow Cytometry (Annexin için) (Muse Flow)</b>

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. HT-29 Hücre Hattı

HT-29 hücre hattı, 44 yaşında bir kadından izole edilmiş kolorektal adenokarsinoma hücreleridir. HT-29 hücre hattı, daha önce İ. Ü. Bap 39247 numaralı proje ile ATCC firmasından temin edilip yetiştirilerek dondurulan pasajlardan kullanılan hücrelerdir. Büyüme ortamları McCoy's 5A besiyeri içerisine %10 FBS, %1 Penisilin Streptomisin ilave edilerek hazırlandıktan sonra, hücreler için uygun büyüme koşulları olan %5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C sıcaklık sağlanarak büyümüşür.

#### 3.2.2. HCT 116 Hücre Hattı

HCT 116 hücre hattı, yetişkin bir erkekten izole edilmiş kolorektal karsinoma hücreleridir. HCT 116 hücre hattı daha önce İ. Ü. Bap 39247 numaralı proje ile ATCC firmasından temin edilip yetiştirilerek dondurulan pasajlardan kullanılan hücrelerdir. HCT 116 büyüme ortamı da HT-29 ile aynı olup McCoy's 5A medium içerisine aynı şekilde %10 FBS, %1 Penisilin Streptomisin ilavesiyle uygun ortam sağlandıktan sonra,



CO<sub>2</sub> için %5 ve sıcaklık için 37 °C sağlanarak uygun ortamlarında büyümeleri sağlanmıştır.

### 3.2.3. MRC-5 Hücre Hattı

MRC-5 hücre hattı ATCC firmasından sağlanmıştır Karakteristik olarak fibroblast yapıda olan sağlıklı akciğer hücrelerinden derive edilmiştir. Sağlıklı hücreler üzerindeki acacetin etkisinin değerlendirilmesi amacıyla MRC-5 hattı çalışılmıştır. Büyüme ortamı için RPMI-1640 medium içerisine %10 FBS ve %1 Penisilin Streptomisin ilavesiyle hazırlanan besiyeri içinde, %5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C sıcaklık koşullarındaki inkübatörde yetiştirilmiştir.

### 3.2.4. Hücre Ekim İşlemleri

Hücre hatlarının bulunduğu kriotüpler soğuk saklama ortamlarından alınıp, kademeli olarak önce -20 °C dolapta bekletildikten sonra, 37 °C su banyosunda yaklaşık 2 dk. kadar çözülünceye kadar bekletilmiştir. Hücre kültürü için gereken steril şartlar altında çalışma ortamı olan laminar kabin içerisine alınmıştır. 15 ml falkonlar içerisine 5 ml taze besiyeri eklenip, kriotüplerde bulunan 1 ml hacimdeki hücreler bu falkonlarda santrifüj işlemi için 1500 rpm hızda 5 dk. durduktan sonra, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 1 ml taze medium ile homojenize edilip sayım için 10 µl hücre miktarına karşılık 10 µl trypan blue boyama solüsyonu ile etki edilerek, Countless Cell Counter hücre sayım cihazında ölçümleri yapıldıktan sonra 25 cm<sup>2</sup> boyutundaki flasklara hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.5. Alt Kültür İşlemleri

Hücreler büyüme ortamlarında yetersiz besin miktarı veya ph değişimlerine bağlı olarak istenen miktarda büyüyemez, hücre kaybı meydana gelebilir. Bu nedenle belirli aralıklarla mikroskop altında ve renk değişimlerine flask yüzeyinden bakılarak yapılan kontrollerle hücre ortamları 2-3 günde bir değiştirilmiştir. HT-29, HCT 116 ve MRC-5 hücre hatları adherent özellik gösterir ve flask yüzeyine tutunarak gelişme özelliğinde olduğundan medium değişiminde besiyeri, aspirasyon yöntemiyle uzaklaştırılmış, flaska aynı miktardaki taze mediumdan eklenmiştir. Hücreler büyüyüp, istenilen morfolojik özellikleri gösterdiklerinde ve zeminde daha fazla hücre gelişimi için alan kalmadığında alt kültür işlemine alındı. Alt kültür işlemi için önce besiyeri ortamı aspirasyon ile uzaklaştırıldı. Ardından DPBS ile yıkanan flask zemini, Tripsin-

EDTA eklenmesinin ardından 5 dk. boyunca %5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C inkübatör ortamında bekletildi. Laminar kabine alınan flaskalar, taze mediumla yıkanıp kaldırma işleminin ardından falkonlara alınarak, 1500 rpm. 5 dk santrifüj edilmiştir. Sayımları yapılan HT-29, HCT 116 ve MRC-5 hücreleri, uygun sayıdaki flaska bölünerek işlem tamamlanmıştır.

### 3.2.6. Hücre Dondurma İşlemleri

Daha sonra çalışılacak hücrelerin dondurma işlemleri için tıpkı alt kültür aşamaları santrifüj işlemi dahil olmak üzere gerçekleştirildi. Santrifüj aşamasından sonra falkondaki süspansiyon sıvı uzaklaştırılıp, pellet üzerine dondurma mediumu 1 ml eklenerek yeni karyotipler içerisine alınmıştır. Dondurma mediumu içeriği %90 oranında MRC-5 hücre hattı için RPMI-1640 besiyeri; HT-29 ve HCT 116 hücre hatları için de McCoy's 5A besiyeri olmak üzere %10 oranında da Dimetilsülfoksit (DMSO) bileşenleriyle hazırlandı. Karyotipler içine alınan 1 ml hücre, dondurma işleminin hücrelere zarar vermesini önlemek için ilk olarak -20 °C' de 1 saat, -80 °C' de 24 saat bekletildikten sonra -196 °C azot tankında muhafaza edilmiştir.

### 3.2.7. Acacetin Solüsyonu Hazırlama İşlemi

Acacetin ticari olarak alınıp, DMSO içerisinde çözülerek, 10 mM stok konsantrasyon hazırlanarak, deney için seçilen farklı konsantrasyonlara (5, 10, 25, 50, 100 µM ) göre tüm adımlarda tekrarlanarak hazır hale getirilmiştir.

### 3.2.8. WST-1 Hücre Canlılık Tayini

WST-1 testi aktivitelerini sürdüren, ölü olmayan hücreler üzerinde mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enziminin çalışmasıyla WST-1 tuzları oluşturması mantığını benimser. Çalışmamızda HT-29 ve HCT 116 hücre hatları ile MRC-5 sağlıklı kontrol hücre hatları üzerinde acacetinin canlılığa etkisini incelemek üzere WST-1 deneyleri yapılmıştır. Her hücre hattı için 96 kuyucuk içeren platelerdeki her bir kuyuya 0,1 x 10<sup>5</sup> sayıda hücre ekilmiş olup, ilk sıraya acacetin dozu verilmeden kontrol amaçlı olarak sadece hücre bırakılmış, diğer sıralar belirlenen dozlarda (5, 10, 25, 50, 100 µM) acacetin hücrelere eklenerek, 24, 48 ve 72 saat zaman dilimleri boyunca inkübatörde bekletilmişlerdir. Her zaman dilimi dolan plate içerisindeki hücre ekimi yapılan tüm kuyulara bu kez 10 µl WST-1 çözeltisi eklenerek 37 °C'de 4 saat süre için inkübatörde tutulmuştur. Platelerdeki sadece hücre olup acacetin dozu eklenmeyen kuyular kontrol

olarak kabul edilmiştir. Platelere okuyucuda 440 nm değeri altında ölçüm değerleri saptanmıştır. Kontrol kuyu absorbans ölçüm değerleri %100 olarak değerlendirilmiş ve diğer örneklerin absorbans değerlerinden göreceli canlılık sonuçları elde edilmiştir. Tüm örnekler için elde edilen üç değerli asıl absorbans değerleri ortalamaları alınarak ortalama absorbans elde edilmiştir. Ortalama absorbans değeri belirlenen örnekler, kontrol hücrelerinin ortalama absorbans miktarına bölünerek kontrol hücrelerine kıyasla göreceli canlılık oranı hesaplanmış ve 100 ile çarpılıp örnek başına ayrı ayrı yüzde canlılık miktarı belirlenmiştir. Yüzde Canlılık = [ Örnek ABS (Absorbans) ortalama / Kontrol ABS ortalama] x 100 formülü kullanılmıştır.

### 3.2.9. Kaspaz-3 Enzimatik Aktivite Ölçümü

Kaspaz temel prensibi etiketli substrat DEVD- para nitroanilin (pna) parçalandıktan sonra kromofor pNA'yi spektrofotometrik olarak tayin etmektir. HT-29, HCT 116 ve MRC-5 hücre hatları için kaspaz aktivitesi Kaspaz-3 kolorimetrik değerlendirme kiti (BioVision Research Products, California, CA, USA) ile tayin edilmiştir. Kullanılan 6 kuyulu platelerde kuyu başına  $2 \times 10^6$  hücre aktarıldıktan sonra, %5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C standart inkübasyona bırakılmışlardır. 24 saat sürenin ardından her kuyudaki hücre ayrı ependorf tüplerine alınarak, 800 rpm'de 5 dk. santrifüj işlemi görmüş ve hücreler süpernatantlardan arındırıldıktan sonra üzerlerine 100 µl soğutulmuş lizis tampon çözeltisi eklenerek homojenize edilmiş, örnekler buz üzerinde 10 dk. inkübasyona bırakılmıştır. 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj basamağının ardından üst sıvı faz, steril yeni bir ependorf tüpe aktarılıp yine 100 µl lizis tamponu ilavesiyle protein örneklerinin hazırlama işlemi tamamlanmıştır. Kaspaz enzim işlev tayini için 96 kuyu içeren düz tabanlı mikro platelere, ikili şekilde her kuyuya 50 µl protein örneği ve 50 µl 2X reaksiyon tamponu ilavesi gerçekleştirilmiştir. Ardından her kuyu başına 5 µl kaspaz-3 kolorimetrik substratı eklenmiş ve 37 °C, 2 saat inkübatörde tutulmuştur. Değerler 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (Thermo Spectrum) cihazıyla belirlenmiştir. Hücrelerdeki durgun ve ilaç uygulamalarını takiben kaspaz-3 enzim işlevinde oluşan farklılık tayin edilmiştir.

### 3.2.10. Annexin V-FITC Hücre Ölüm Tipi Apoptoz/Nekroz Aktivitesi

Hücrelerde ölümün apoptoz mu yoksa nekroz kaynaklı mı olduğunu tayin amacıyla kullanılan Annexin V-Fluorescein isothiocyanate (FITC) yöntemini, HT-29 ve HCT 116 kolon kanseri hücre hatları ile MRC-5 sağlıklı kontrol hatları üzerinde doz ve

zamana dayalı uyguladığımız acacetin etkisini görmek için çalıştık. Apoptotik hücrelerin dış membran yüzeyinde bulunan fosfotidil serin fosfolipidi, Annexin-V apoptoz analizinde kullanılan FITC ile konjüge Annexin-V lektinine bağlandığında, FITC bölümü de bağlanmış bu hücrelerin floresan (FL1 dedektörü; eksitasyon= 488nm, emisyon=535nm) ışımaya yapmasını sağlar. Bu floresan ışımaya akış sitometri üzerinde F1 dedektörü sayesinde belirlenir. Nekrotik hücre tayini aşamasında ise nükleik asitle bağlanma özelliğindeki PI (FL2 dedektörü, eksitasyon= 488nm, emisyon=562-588nm) boyası rol üstlenir. PI çalışma mantığı yalnızca hasarlı hücrelerin membranlarından geçerek DNA' larını boyamaktır. PI ışımaya dedektörü FL2 (FL2 dedektörü, eksitasyon= 488nm, emisyon=562-588nm) ile nekrotik hücreler için tayin edilmiş olur. Hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölçümlerinde ışımaya yapan hücreler, ışımının miktarına göre her hücre için ayrı olarak sınıflama yapıldıktan sonra diyagram üzerine yansıtılır.

HT-29, HCT 116 ve MRC-5 hücrelerinin tripsinizasyonun ardından cihazda sayımları yapıp,  $1 \times 10^5$  hücre her kuyu için 2 ml olacak şekilde homojenize edilip kuyulara dağıtılmıştır. Hücrelerin ortama yerleşmesi için % 5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C şartlarındaki inkübatörde 24 saat süre boyunca muhafaza edilmişlerdir. Sürecin sonunda acacetinin belirlenen dozlardaki miktarları kuyulara eklenip 48 saat inkübasyon için bırakılmıştır % 5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C koşullarında inkübasyonları, inkübatör cihazında gerçekleşmiştir. Hücrelerin inkübasyon işlemi sona erdikten sonra, yıkama işlemi ve 1x bağlayıcı buffer ile homojenizasyon işleminin ardından 5 ml kültür tüplerine 100' er µl aktarım yapılmıştır. 5 µl FITC Annexin V ve 5 µl PI hücrelere ilave edilip vorteks işlemi ile homojen bir karışım haline getirildikten sonra 15 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Tamamlanan inkübasyon işleminin ardından, ölçümler akış sitometri cihazında gerçekleştirilmiştir. Diyagram üzerine hücreler dağılırken Annexin-V ve PI ışımaya derecelerine bağlı olarak belirlenmiştir. Canlılık tayini belirlenirken Annexin-V ve PI sinyalinin algılanmadığı hücreler canlı, sadece PI sinyalinin algılandığı hücreler nekrotik, sadece Annexin-V sinyalinin algılandığı hücreler apoptotik ve Annexin-V sinyali ile birlikte PI sinyalinin de algılandığı hücreler geç apoptotik sınıfta belirlenmiş ve diyagram üzerinde her bir bölge üzerine denk gelen hücre miktarı (hücre sayısı bölge) sayılan toplam hücre sayısına oranından yüzde değerler saptanmıştır.

### 3.2.11. Deney Verilerinin İstatiksel Tayini

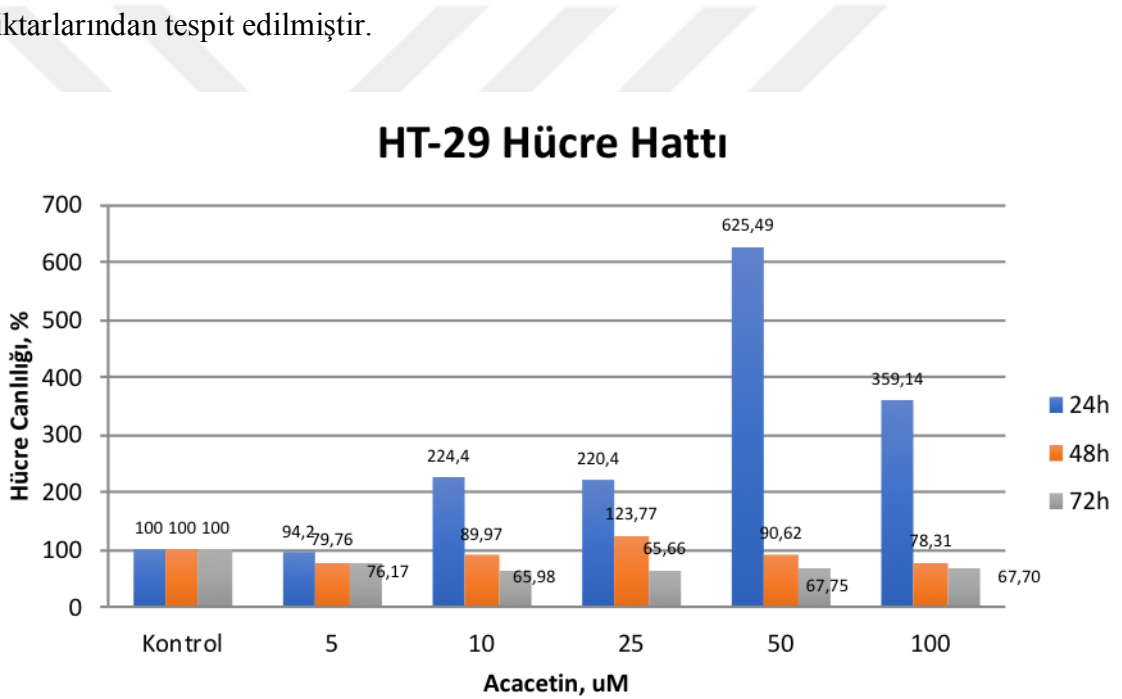
Her deney için hücreler 3'er kez ekilip, deneylerin 3'er kez tekrarlanmasıyla ortalama standart hata (SEM) ile açıklandı. İstatistiksel analizler parametrik tek yönlü varyans analizi ANOVA ile değerlendirildi. İstatistiksel önem  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre Canlılığı Üzerinde Acacetinin Doz ve Zaman Bağımlı Etkisi

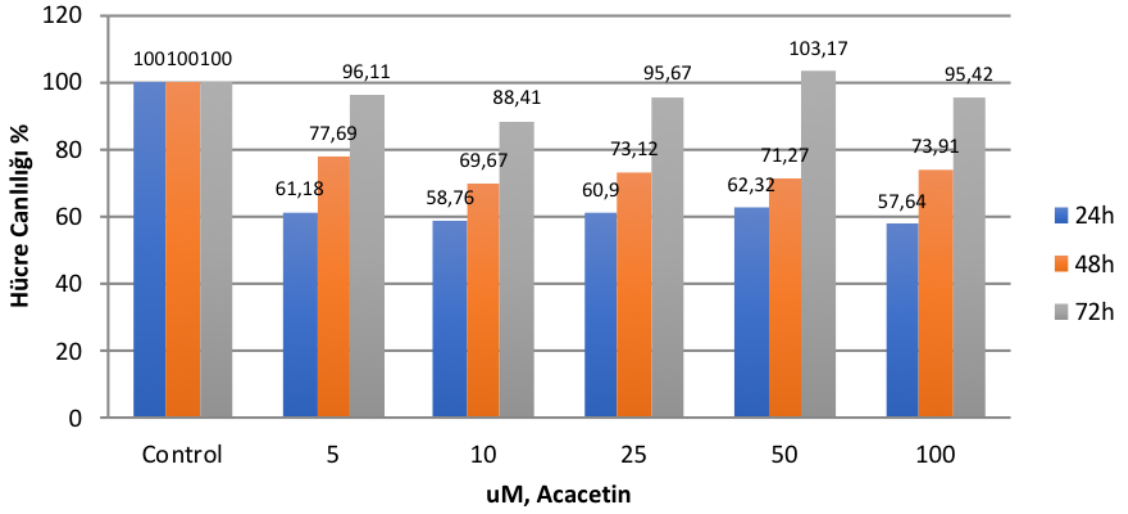
Acacetinin değişen miktardaki dozları 5, 10, 25, 50 ve 100 uM olarak farklı zaman aralıkları olarak 24, 48 ve 72 saat süreyle 96 kuyulu platelerde HT-29, HCT 116 ve MRC-5 hatları için her kuyuya çalışılacak hücre hattından  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ayrı ayrı ekimleri yapıp 3 ayrı zamanda 3'er ekim uygulanıp inkübe edilmiştir. Her plate içerisindeki acacetin eklemeyip sadece hücre ektiğimiz kuyular 24, 48 ve 72 saat sürelerin tümü için %100 olarak değerlendirilmiş olup, acacetin ekiminin de yapıldığı hücre içeren kuyuların canlılık tayinleri oransal biçimde absorbans miktarlarından tespit edilmiştir.



**Şekil 4-1: Acacetinin HT-29 Hattı Üzerinde Doz Zaman Bağımlı Canlılığa Etkisi**

Acacetinin, HT-29 hattı üzerinde 48 saat inkübasyon süresi ve 5 ile 10 uM doz miktarlarında, HCT 116 hücre hattı için ise 10 ve 25 uM doz miktarlarının etki gösterdiği bulunmuştur. HT-29 hücre hattında 48 saat ve acacetin 5 uM doz miktarında hücre canlılığında % 20 azalma görülmüşken ; 48 saat ve 10 uM doz miktarı için % 10 azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4-1).

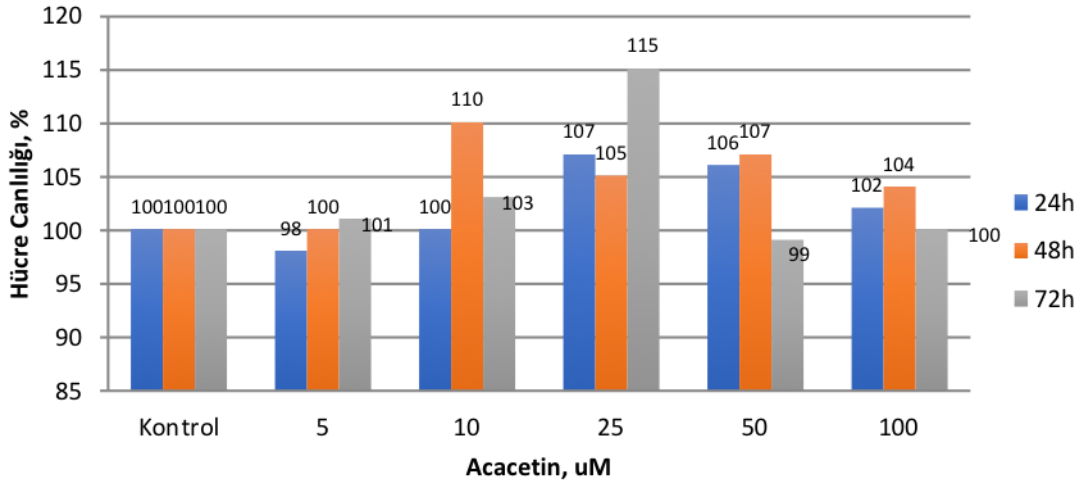
## HCT-116 Hücre Hattı



**Şekil 4-2: Acacetinin HCT 116 Hattı Üzerinde Doz Zaman Bağımlı Canlılığa Etkisi**

HCT 116 hücre hattı üzerinde acacetinin 48 saatlik inkübasyon süresince 10 uM doz uygulamasında %30 azalma saptanırken, bu oran yine 48 saat fakat 25 uM doz uygulamasında %27 azalma olarak bulunmuştur (Şekil 4-2).

## MRC5 Hücre Hattı



**Şekil 4-3: Acacetinin MRC-5 Hattı Üzerinde Doz Zaman Bağımlı Canlılığa Etkisi**

Sağlıklı kontrol grubu olarak kullandığımız MRC-5 hücre hattı üzerinde acacetinin etkisi görülmemiştir. Sağlıklı kontrol grubu olarak kullanıp anlamlı hücre

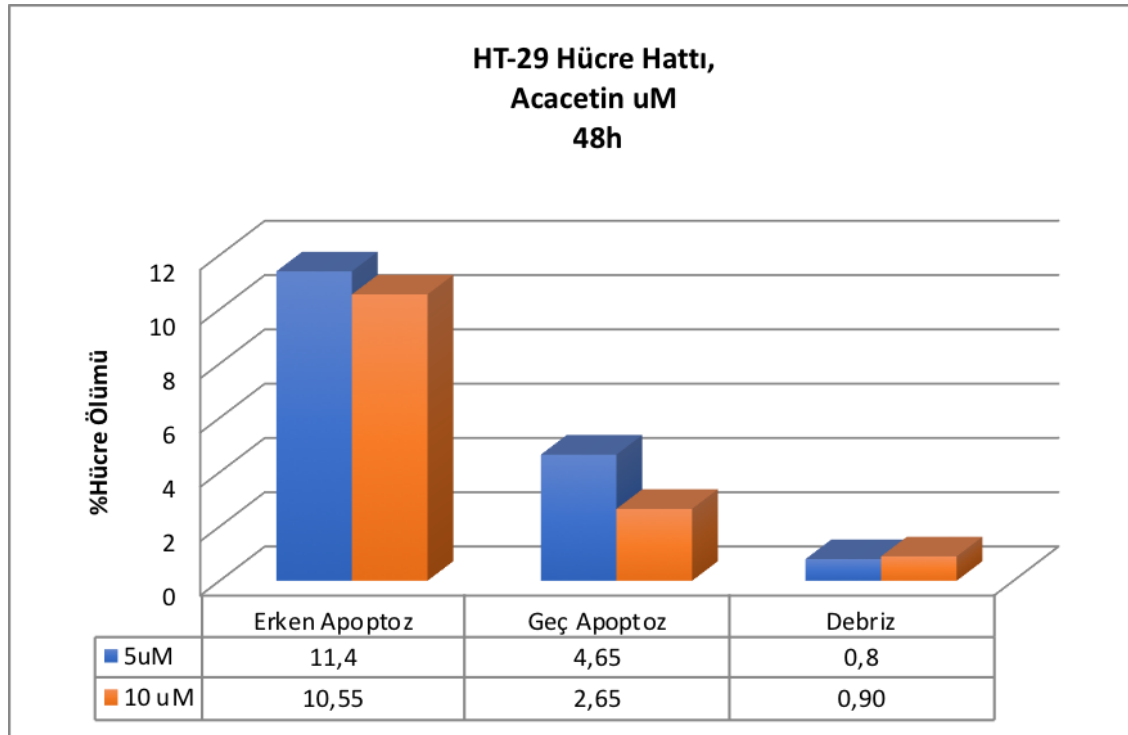
ölümü etkisi beklemediğimiz MRC-5 hücre hattı üzerinde acacetinin anlamlı seviyede aktivitesi saptanmamıştır ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Hücre Ölüm Tiplerinin İncelenmesi

Hücre canlılık WST-1 deneyi ile acacetinin 48 saat süresince HT-29 hücre hattında 5 ve 10  $\mu\text{M}$  ve HCT 116 hücre hattında ise 10  $\mu\text{M}$  ve 25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları, gerçekleşen inkübasyon için uygun doz ve zaman birimleri olarak belirlenmiş olup, kolon kanser hücre hatları üzerinde meydana gelen bu ölümlerin, apoptoza dayalı hücre ölümü miktarını tayin etmek amacıyla akış sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz ve kaspaz-3 analizleri gerçekleştirilmiştir.

##### 4.2.1. Annexin V-FITC Apoptoz/Nekroz İncelenmesi

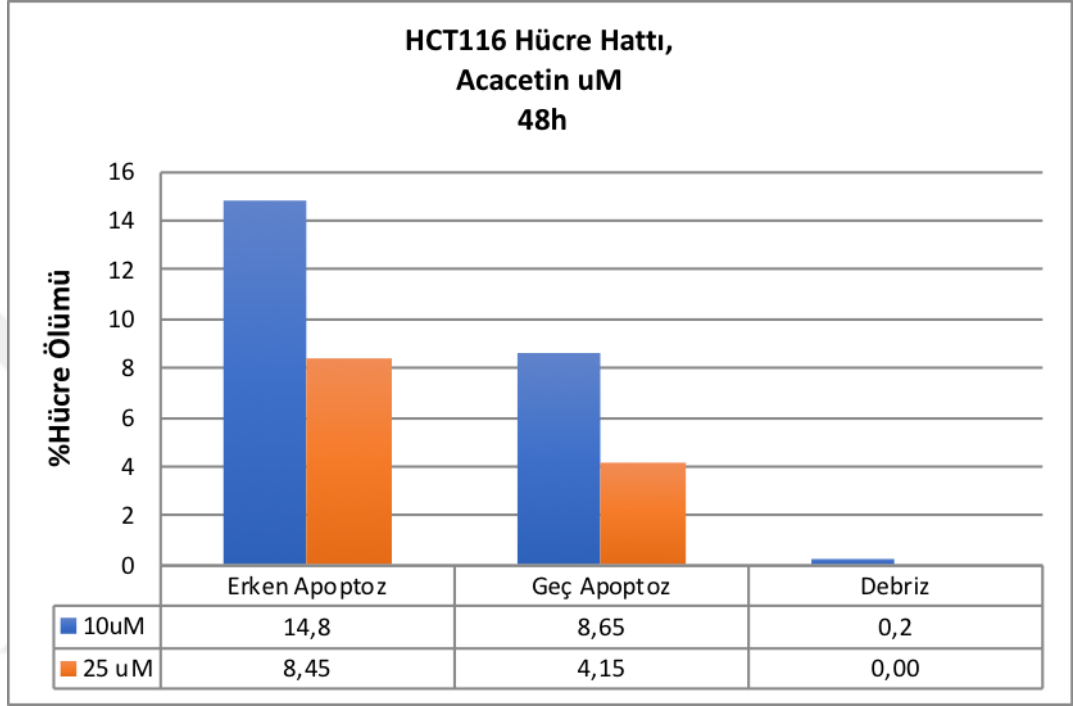
Acacetin etkisiyle tetiklenen hücre ölüm tipi Annexin-V Apoptoz/Nekroz yöntemiyle analiz edilmiştir. Çalışılan örnek başına akış sitometride  $1 \times 10^4$  hücre sayımı yapılmıştır. Annexin-V (-) negatif ve PI (-) negatif hücreler sağlıklı, Annexin-V (+) pozitif ve PI (-) negatif belirlenen hücreler erken apoptotik, Annexin-V (+) pozitif ve PI(+) pozitif hücreler geç apoptotik, son olarak Annexin (-) negatif ve PI (+) pozitif hücreler nekrotik olarak değerlendirilmiştir.



**Şekil 4-4: Acacetinin HT-29 Hattı Üzerinde Annexin V-FITC Apoptoz/Nekroz Tayini**

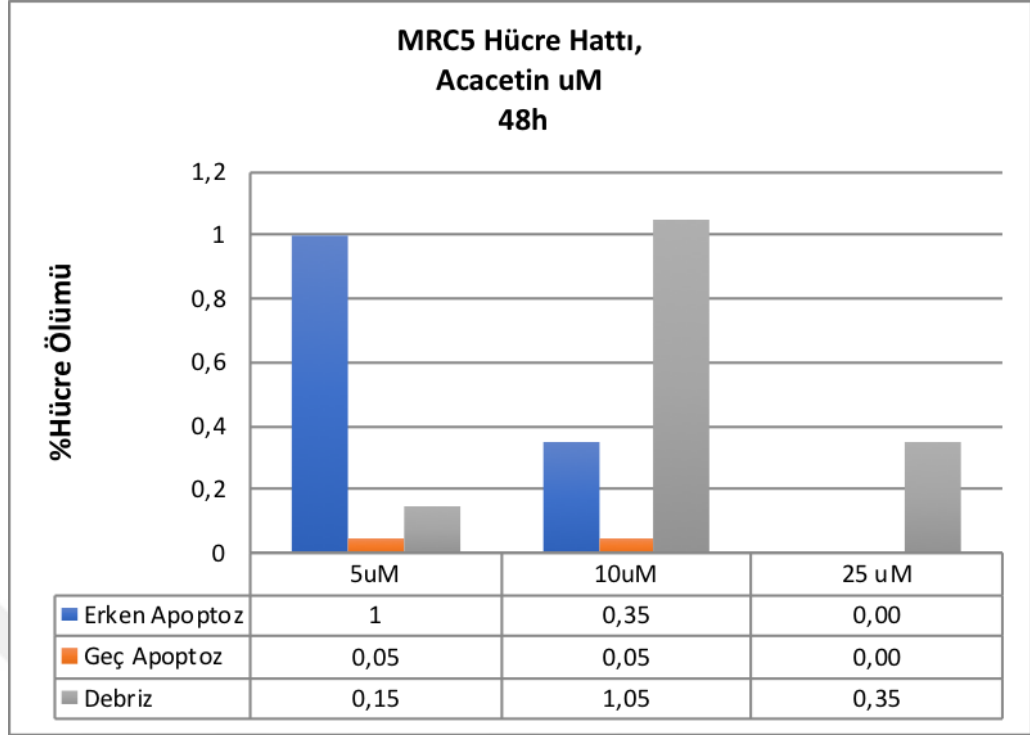


HT-29 hattında akış sitometri yöntemi ile belirlediğimiz apoptotik tayinde 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  doz ve 48 saat süresince acacetin uyguladığımız hücreler, acacetin vermediğimiz HT-29 kontrol hücrelerine göre kıyaslandığında 5  $\mu\text{M}$  ve 48 saat için %16 apoptotik artış tespit edilirken, 10  $\mu\text{M}$  ve 48 saat içinse %13,2 apoptotik artış tespit edilmiş olup nekrotik etki her iki doz için de gözlenmemiştir ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4-3).



**Şekil 4-5: Acacetinin HCT 116 Hattı Üzerinde Annexin V-FITC Apoptoz/Nekroz Tayini**

HCT 116 hücre hattı üzerinde akış sitometri yöntemi ile belirlediğimiz apoptotik aktivite incelendiğinde 10  $\mu\text{M}$  ve 48 saat acacetin uygulamasında %23,5 ve 25  $\mu\text{M}$  doz ile 48 saat süre için bu oran % 12,6 apoptoz artışı olarak tespit edilmiştir (Şekil 4-4).

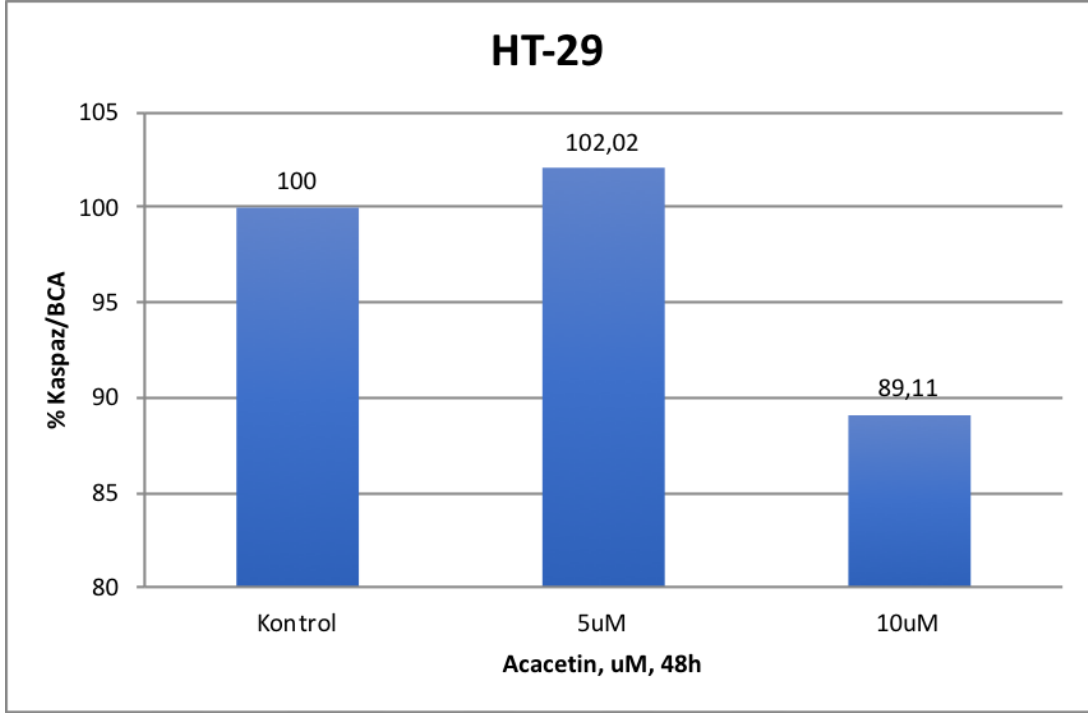


**Şekil 4-6: Acacetinin MRC-5 Hattı Üzerinde Annexin V-FITC Apoptoz/Nekroz Tayini**

Acacetinin sağlıklı kontrol hücreleri olarak kullandığımız MRC-5 hattı üzerinde apoptotik ve nekrotik etkisi tespit edilmemiştir (Şekil 4-5) ( $p < 0,05$ ).

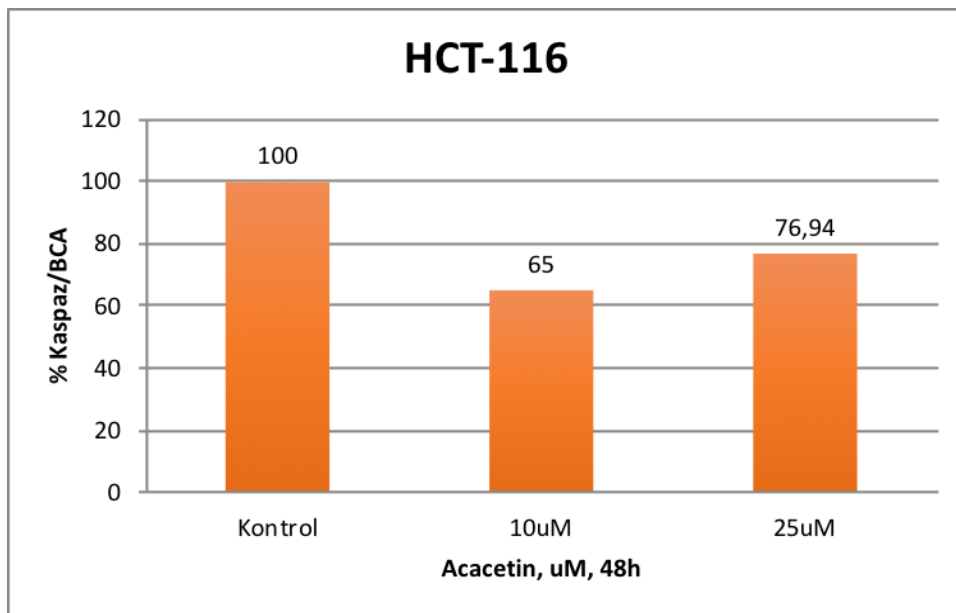
#### **4.2.2. Kaspaz 3/BCA Etkinliğinin Değerlendirilmesi**

HT-29 hattında 48 saat inkübasyon süresi için 5  $\mu$ M doz oranında uyguladığımız acacetin apoptoz oranını %16 tetikleyerek, kaspaz oranında 1,02 kat artış göstermiş olup, kaspaz-3 bağımlı olarak apoptotik aktiviteyi tetiklediği ve hücre ölümü sağladığı görülmüştür. 48 saat ve 10  $\mu$ M doz olarak uyguladığımız acacetin ise, HT-29 üzerinde %13, 2 apoptoz artışı, 1,12 kat kaspaz ifadesinde azalma ile kaspaz bağımsız şekilde hücre ölümünü tetiklemiştir ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4-6).



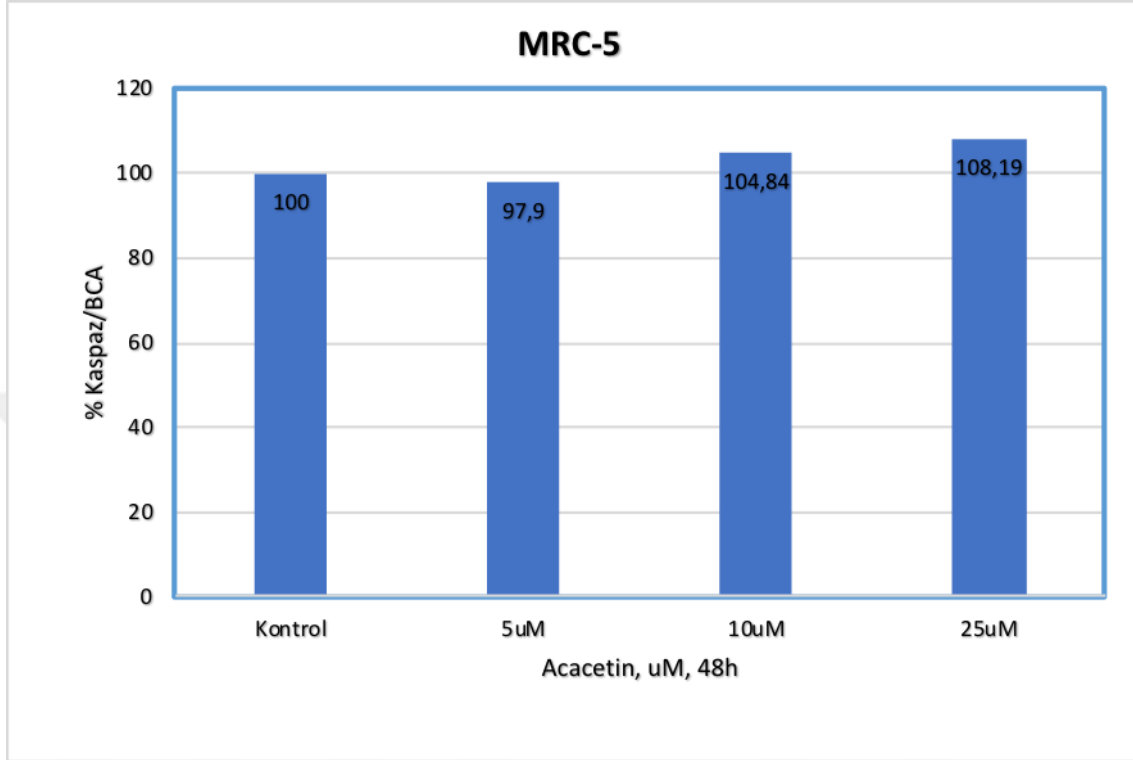
**Şekil 4-7: Acacetinin HT-29 Kolon Kanseri Hattı Üzerinde % Kaspaz-3/BCA Enzim Aktiviteleri**

HCT 116 hücreleri için yorumlandığında ise 48 saat ve 10  $\mu$ M doz ile acacetin etkileşiminin sonucunda, % 23,5 apoptoz artışına karşılık, kaspaz 1,53 kat; 48 saat ve 25  $\mu$ M doz acacetin uygulamamız sonucunda ise, apoptoz oranında % 12,6 artış ve kaspaz için 1,29 kat kaspaz ifadesinde azalma ile kaspaz bağımsız şekilde hücre ölümünü tetiklemiştir. ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4-7).



**Şekil 4-8: Acacetinin HCT 116 Hücre Hattı Üzerinde % Kaspaz-3/BCA Enzim Aktiviteleri**

Sağlıklı kontrol grubu olarak çalıştığımız MRC-5 hücre hattı üzerinde ise 48 saat ile 5 ve 10  $\mu\text{M}$  doz olarak uyguladığımız acacetin etkisi anlamlı düzeyde bulunmamıştır ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 4-9: Acacetinin MRC-5 Kolon Kanseri Hattı Üzerinde % Kaspaz-3/BCA Enzim Aktiviteleri**

## 5. TARTIŞMA

Kanser hastalığının tedavisi için tüm dünyada yapılan araştırmaların sayısı hızla artmakta, alternatif tedavi yolları üreilmeye ve ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bugüne kadar kullanılan kemoterapötiklerin hedef organ ve doku dışında hayati pek çok organı kötü yönde etkilediği de düşünülünce yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar hücrede serbest radikallerin artmasına neden olmakta dolayısıyla bu durumda hücre ölümünü tetiklemekte ve sonuçta hedef hücrelerde daha fazla DNA hasarının ve mutasyonun oluşmasına neden olmaktadır. Bu etkiler göz önüne alındığında, sağlıklı hücrelere olumsuz yan etkisi olmayan antikanserojen özellik taşıyan maddelerin geliştirilmesinin önemi ortaya çıkmaktadır.

Yapılan çalışmalarla flavonoidlerin kanser türleri üzerinde antiproliferatif, apoptotik etkilerinin yüksek olduğu ve bunu gerçekleştirirken sağlıklı hücrelere olumsuz yan etkisinin çok az olduğu tespit edilmiştir (Lu ve ark. 2005), (Iwuchukwu ve ark. 2011). Acacetinin akciğer ve prostat gibi kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiğini ve apoptotik hücre ölümünü artırdığını gösteren çok sayıda çalışma vardır (Watanabe ve ark. 2012) (Bhat ve ark. 2013). Bunun yanında farklı kanser türlerindeki bireylere verilen acacetinin ciddi yan etkileri olduğunu gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Aynı zamanda acacetinin immün sistem üzerinde var olan stimülatör etkisi, güçlü ve çok yönlü bir antioksidan ve serbest radikal süpürücü olduğu meme ve mide kanserinde daha önce yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Pan ve ark. 2005) (Shim ve ark. 2007). Tez çalışmamızda yan etkisi olmayan, ilaç direnci geliştirmeyen, antioksidan ve antikanserojenik etkileri bilinen acacetinin HT-29 ve HCT 116 kolon kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini in vitro ortamda incelemeyi amaçladık.

Hücreler ya fizyolojik yaşam süreleri sonunda apoptozla ya da patolojik faktörlerin etkisiyle nekrozla ölürler. Nekrozla ölüm sonrası hücrede enflamasyon uyarılırken, apoptozla hücre ölümü fizyolojik bir süreç olarak uyarılır ve enflamatuvar yanıt oluşmadan gerçekleşir.

Kanser türleri üzerinde yapılan çok sayıda çalışmada yapıları birbirinden farklı flavonoidlerin antikanserojenik etkilerine bakılmış olup son zamanlarda flavonoidlerin farklı kombinasyonları üzerinde de çalışmalar yaygınlaşmaktadır.

Flavonoidler arasında seçtiğimiz acacetinin kanser hücreleri üzerine olan sitotoksitelerini değerlendirmek için WST1 metodunu kullandık, büyümeye etkilerini inceleyip, yüzde canlılıklarını hesapladık. Meydana gelen hücre ölümlerinin nekrozdan mı yoksa apoptozisten mi kaynaklandığına baktık.

Shim ve arkadaşları (Shim ve ark. 2007), MCF-7 göğüs kanseri hücre hattı üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda acacetin dozları denemekle birlikte 100 uM konsantrasyonunun 24 saat uygulanmasının etkili olduğunu belirlemişlerdir. Acacetinin mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya ve bunun akabinde mitokondriden sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör (AİF) salınımına sebep olduğunu gözlemlemişlerdir. AİF, mitokondri membran arası boşlukta bulunur ve hücre ölümüne cevaben sitoplazmaya salınır. Azalan mitokondriyal membran potansiyeli Reaktif oksijen türleri (ROT) artışı ile ilişkilendirilmiştir. Shim ve arkadaşları da elde ettikleri bulgular sonucunda acacetin tarafından tetiklenen apoptozun, mitokondriyal membran potansiyeli azalması ile sitokrom c ve AİF salınımına sebep olan ROT üretimi ve kaspaz 8 aktivasyonu ile olduğunu öne sürmektedirler. SAPK/JNK1/2-c-Jun sinyal yolağının da hücre farklılaşması ve apoptoz sonucunda aktive olduğu bilinmektedir. Shim ve arkadaşları, acacetinin, SAPK/JNK1/2 ve c-Jun aktivasyonuna sebep olurken; ERK 1/2 ve p38 MAPK aktivasyonunda da keskin bir düşüşe sebep olduğunu belirlemişlerdir.

Gastrik karsinoma AGS hücre hattında Pan ve arkadaşlarının (Pan ve ark. 2005) yaptıkları çalışmalarda çeşitli konsantrasyon ve süre denemelerinden sonra 60 uM acacetin konsantrasyonunun 24 saat uygulanması sonucunda hücrelerde apoptoza özgü belirgin morfolojik değişimler ve kromozom yoğunlaşması gibi değişiklikler gözlemlemişlerdir. ROT üretiminin acacetin indüklü apoptozun kaynaklarından biri olduğunu antioksidan muamelesi sonucunda tam olarak tespit etmişlerdir. Antioksidan uygulaması sonucunda canlılıkta önemli miktarda artış gözlenmiştir. Reseptör ilişkili sinyal transdüksiyonu apoptoz yolağı bir diğer kaspaz aktive edici ana yoldur. Pan ve arkadaşları acacetin uyguladıkları AGS hücre hattında Fas ve FasL ekspresyonunda da artış saptamışlardır. Ayrıca acacetin uygulanan hücrelerde Bcl-2 ekspresyonunun down regülasyonunu ve Bad kopmasını belirlemişlerdir. Aynı zamanda Bax ekspresyonunun up regülasyonunu ve Bcl-XL ayrılmasını gözlemlemişlerdir. Acacetin uygulanması sonucunda bir diğer apoptotik protein olan P53 seviyesindeki artış da bulgular arasındadır.

PI3k/Akt yolağı melanoma gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu sinyal kaskad yolağının aktivasyonu ilaç direnci gelişimine ve kanserli hücre sağkalımının artışına sebep olmaktadır. Jung ve arkadaşları, yüksek seviyede PI3K aktivitesi gösteren SK-MEL-28 deri kanseri hücre hattını kullandıkları xenograft JB6 P<sup>+</sup> fare deri modelinde acacetinin kemoprevantif etkisini araştırmışlardır. Acacetinin ATP kompetitif bir davranış sergileyerek PI3K'a direkt bağlandığını ve belirgin bir şekilde PI3K aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda acacetinin Akt fosforilasyonunu inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (Jung ve ark. 2014).

Shen ve ekibi, DU-145 prostat kanseri hücre hattında acacetinin antimetastatik etkisini araştırmışlardır. MMP-2, MMP-9 ve u-PA ekspresyonlarının protein ve mRNA olmak üzere her iki seviyede de downregülasyonlarında etkili olan p38 MAPK'ın fosforilasyonunu acacetin tarafından inhibe edildiği bulgusuna ulaşmışlardır. Aynı zamanda NF-κB, c-Fos ve c-Jun'un nüklear seviyelerinin azalışına sebep olduğu sonucunu elde etmişlerdir. Belirlenen etkin doz ve zaman 10 uM 48 saat olmuştur. Elde edilen bu sonuçlarla acacetinin NF-κB ve AP-1-DNA bağlanma aktivasyonunu inhibe ederek ve p38 MAPK sinyal yolağını baskılayıp bunu takiben MMP-2, MMP-9 ve u-PA ekspresyonlarını azalmasıyla DU145 hücre hattının invazyon ve migrasyon kabiliyetini azalttığı sonucuna ulaşmışlardır (Shen ve ark. 2010).

Singh ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmalarda acacetinin 25-100 uM dozlarını 24, 48, 72 saatlerinde LNCaP ve DU145 prostat kanseri hücre hatlarına uygulayıp antiproliferatif etkisini araştırmışlardır. Acacetinin, hücre döngüsünün G1 ve G2-M evrelerinde durmasına sebep olduğunu bulmuşlardır. Hücre döngüsü G1 ve G2-M kontrol noktalarında görev alan düzenleyici proteinlerde değişikliklere yol açtığını tespit etmişlerdir. CDKI Cip1/p21 seviyesinde artışı gösteren veriler elde etmişlerdir. Bununla birlikte de CDK2, CDK4 ve CDK6 protein seviyelerinde düşüşü gösteren bulgulara ulaşmışlardır. Cdc25, Cdc2 ve Siklin B1 protein seviyelerinde acacetinin sebep olduğu bir düşüş gözlemlenmiştir. Birçok kanser terapötik ajanın hücre döngüsünün durmasını sağlamasını takiben kanserli hücrelerin apoptotik ölümüne sebep olduğu daha önceden yapılan çalışmalardan bilinmektedir. Singh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da gözlemlenen acacetinin hücre döngüsü düzenleyici faktörlerin seviyelerinde meydana getirdiği düşüş ve artışlar hücrelerin apoptoza gitmesinin temelinde yatan moleküler olayları göstermektedir (Singh ve ark. 2005).

Acacetinin aynı zamanda glutasyon redüktazı (Zhang ve ark. 1997), sitokrom P450 enzimini (Doostdar ve ark. 2000) ve topoizomeraz I'in katalize ettiği DNA replikasyonunu inhibe ettiği de yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Boege ve ark. 1996).

Chien ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da acacetin A549 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatlarının gelişmesini inhibe edici olmasına rağmen normal akciğer fibroblast hücrelerine herhangi bir toksit etkisi olmadığı gözlenmiştir. Bu bulgu acacetinin normal ve kanser hücrelerindeki seçici özelliğinin olduğunu ortaya koymaktadır (Chien ve ark. 2011).

Anjiogenez kanseri kontrol etmede hedef alınan önemli bir olaydır. Bhat ve arkadaşları acacetinin anjiogenez üzerindeki etkisini ve bu etkinin mekanizmasını incelemek adına İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) hücre hattını ve çeşitli kanser hücre hatlarını kullanmışlardır. Acacetinin antianjiogenik aktivitesinin bu zamana kadar kanıtlanmış tüm antitümör etkilerinin kaynağı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Acacetinin büyük ölçüde VEGF indüklü HUVEC hücre hattında proliferasyonu inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Anjiogenez sırasında yeni kapiller damarların oluşumu önemli bir olaydır. HUVEC kapiller tüp oluşumunda da VEGF stimülasyonlu halde dahi acacetinin doz ve zamana bağlı inhibe edici özelliği olduğu verilerini elde etmişlerdir. Matrigel testleri ile acacetinin HUVEC hareketliliği, migrasyonu ve invazyonuna olan inhibitör etkisini de gözler önüne sermeleri süreçteki önemini vurgulamaktadır. Acacetinin, transkripsiyonel aktivitelerinin azalması ile sonuçlanan, Stat-1 (Tyr 701) ve Stat-3 (Tyr 705) fosforilasyonlarını azaltan, Stat-3'ün nükleer lokalizasyonu inhibe eden bir etkisi olduğunu saptamışlardır. Bunun yanısıra bFGF molekülünün down regülasyonuna sebep olan bir etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir. Tüm bunların sonucunda Bhat ve arkadaşlarının in vitro, ex vivo ve in vivo yaptıkları çalışmalar ile acacetinin anjiogenezi baskıladığı sonucuna ulaşılmıştır (Bhat ve ark. 2013).

Tez çalışmamızda HT-29 ve HCT 116 kolon kanseri hücrelerinde acacetinin 5, 10, 25, 50, 100 µM dozları kullanarak 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonrası inhibitör etki ve mekanizmasını inceledik. İnsan kolon kanser hücresi HT-29'da acacetinin 48'inci saat ve 5 ve 10 µM dozlarında; HCT 116'da ise 10 ve 25 µM dozlarında apoptozu uyardığını, bu dozun üzerine çıkıldığında ise acacetinin hücreleri nekroza götürdüğünü ve toksik etki oluşturduğunu belirledik.



Watanabe ve ark. da 20-40  $\mu\text{M}$  dozlarında acacetinin T cell lösemi Jurkat hücrelerine 4, 6, 12, 24, 48, 72 saat uygulanması sonucundaki apoptotik etkisini analiz etmişlerdir. Acacetinin hücre proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiğini, 40  $\mu\text{M}$  acacetinin muamelesi sonrasında bizim bulgularımıza paralel olarak Kaspaz-3 aktivasyonunda artış olduğunu gözlemlemişlerdir (Watanabe ve ark. 2012). Kaspaz-3 aktive olarak çok sayıda proteinin kopmasına öncülük eden apoptoz için çok önemli bir kaspazdır. Çalışmalarımız sonucunda elde ettiğimiz verilerden de HT-29 hücre hattında 48 saat inkübasyon süresi için 5  $\mu\text{M}$  doz oranında uyguladığımızda acacetinin apoptoz oranını %16 tetikleyerek, kaspaz-3 miktarında 1,02 kat artış göstermiş olup, kaspaz-3 bağımlı olarak apoptotik aktiviteyi tetiklediğini tespit ettik. HT-29 hücrelerine 48 saat ve 10  $\mu\text{M}$  doz olarak uyguladığımız acacetin sonrasında ise, HT-29 üzerinde %13, 2 apoptoz artışı gözlemledik. Fakat bu artışın 1,12 kat kaspaz-3 ifadesinde azalma ile kaspaz bağımsız şekilde hücre ölümünü tetikleyerek olduğunu gözlemledik.

Pan ve arkadaşları AGS hücrelerinde 20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu\text{M}$  acacetin dozlarını 0, 3, 6, 9, 12 ve 24 saat uygulayarak antikanserojenik etkisini incelemişlerdir. 60  $\mu\text{M}$  dozunda acacetini 24 saat uyguladıklarında kaspaz-3 aktivasyonunda anlamlı bir artış tespit etmişlerdir. 30  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda da hücre proliferasyonunun azaldığı sonucuna ulaşmışlardır (Pan ve ark. 2005). Tez çalışmamızda ise; HCT 116 hattı üzerinde 48 saat ve 10  $\mu\text{M}$  doz ile acacetin etkileşiminin sonucunda, %23,5 apoptoz artışına karşılık, kaspaz-3 ifadesinde 1,53 kat azalma; 48 saat ve 25  $\mu\text{M}$  doz acacetin uygulamamız sonucunda ise, apoptoz oranında %12,6 artış ile birlikte kaspaz-3 ifadesinde 1,29 kat azalma ile kaspaz bağımsız şekilde hücre ölümünü tetiklemiştir.

Özetle acacetinin HT-29 hattı üzerinde 48 saat için 5  $\mu\text{M}$  dozunda apoptotik etkinliği kaspaz bağımlı olarak; 10  $\mu\text{M}$  dozunda ise apoptotik aktiviteyi kaspaz bağımsız olarak gerçekleştirdiği görülmüştür. HCT 116 hücre hattı üzerinde yapılan deneylerde ise acacetinin 48 saat için 10  $\mu\text{M}$  ve 25  $\mu\text{M}$  dozlarda uyguladığımızda kaspaz-3 ifadesindeki azalma ile birlikte kaspaz bağımsız bir şekilde hücre ölümünü tetiklediği belirlenmiştir.

Çalışma sonuçlarımız HT-29, HCT 116 hatlarında acacetinin, sitotoksitate testinin ardından belirlenen zaman ve doz oranlarının, çalışılan apoptotik tayin ve kaspaz hücre ölüm yöntemi sonuçları baz alınarak, kanser hücreleri üzerinde sağladığı bu ölümün apoptotik aktiviteyle meydana geldiğini destekler niteliktedir. Sağlıklı kontrol hücre

hattı grubu olarak kullandığımız MRC-5 üzerinde, acacetinin değişen doz ve zamanlarda hücre ölümüne neden olmadığı ve sitotoksik etki göstermediği görülmüştür. MRC-5 sağlıklı kontrol hattı üzerinde acacetinin apoptoz, kaspaz aktivitelerinde anlamlı etki göstermemesi, bulgularımızı desteklemekte olup, acacetinin kanser çalışmaları için, araştırılırken, kanser hücrelerini öldürüp, sağlıklı hücrelerde toksik etki yaratmaması önemli bir nitelik kazandırmaktadır.

Acacetin gibi polifenolik bileşikler antikanser stratejilerinde değerli ajanlar olabilirler. Yeni ilaçların geliştirilmesi adına çalışmalara devam edilmelidir. Flavonoidlerin kanser tedavisinde kullanılmasıyla standart kemoterapi ilaçlarının normal hücrelere olan genotoksik hasarları azaltılabilir. Bunun sonucunda ikincil kanserlerin ortaya çıkma olasılığı düşürülebilir. Gıdalarda bulunan fitokimyasalların sağlık üzerindeki olumlu etkilerini anlayabilmemiz için bilinmeyen kısmın açığa kavuşturulmasına ihtiyaç vardır. Yaptığımız çalışma sonucunda aldığımız veriler de literatüre acacetin ve kolon kanseri açısından ışık tutacaktır. Aynı zamanda acacetinin kolon kanseri üzerine olası antikanserojenik etkisinin moleküler mekanizmasının anlaşılması üzerine genetik çalışmalar bulunmamaktadır. Bu konunun irdelenmesi ve araştırma sonrasında elde edilecek sonuçlarla hastalığın patogenezinin daha net anlaşılması söz konusudur.

Kolon kanseri hücre hatları üzerinde sağladığı apoptotik etkinlik, acacetinin, etkin bir tedavi yöntemi olabileceğini göstermektedir. Farklı kanser hücrelerinde yapılacak benzer çalışmalara bağlı olarak bu verileri destekler nitelik kazanmasıyla, yeni bir tedavi ajanı olarak kullanılabileceği ön görülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182-6187.
- Akyol, A. (2014, mart 23). [www.kanser.org. https://kanser.org/saglik/upload/5\\_TTOK/Kolorektal\\_Kanserlerin\\_Molekuler\\_Siniflan\\_dirilmesi%23Aytekin\\_Akyol.pdf](http://www.kanser.org/https://kanser.org/saglik/upload/5_TTOK/Kolorektal_Kanserlerin_Molekuler_Siniflan_dirilmesi%23Aytekin_Akyol.pdf) adresinden alındı
- Aleksandrova, K., Pischon, T., Buijsse, B., May, A. M., Peeters, P. H., & Bueno de Mesquita, H. B. (2013). Adult weight change and risk of colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *European Journal of Cancer*, 49, 3526-3526.
- Al-Mamary, M., Al-Meerri, A., & Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22, 1041-1047.
- Arrington, A. K., Heinrich, E. L., Lee, W., Duldulao, M., Patel, S., & Sanchez, J. (2012). Prognostic and Predictive Roles of KRAS Mutation in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(10), 12153-12168.
- Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2015). *Biology of Cancer. e cancer medical science*, 9, 520.
- Ashktorab, H., Nouraie, M., Hosseinkhah, F., Lee, E., Rotimi, C., & Smoot, D. (2009, September). A 50-year review of colorectal cancer in African Americans: implications for prevention and treatment. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(9), 1985-1990.
- Başkanlığı, T. H. (tarih yok). *Kolorektal Kanser Taramaları*. Ankara: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.
- Benavente Garcia, O., & Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular and antiinflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6185-6205.
- Bezdekova, M., Bryctova, S., Sedlakova, E., Langova, K., Brychta, T., & Belej, K. (2012). Analysis of Snail-1, E-Cadherin and Claudin-1 Expression in Colorectal Adenomas and Carcinomas. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 1632-1643.

- Bhat, T. A., Nambiar, D., Tailor, D., Pal, A., Agarwal, R., & Singh, R. P. (2013). Acacetin inhibits in vitro and in vivo angiogenesis and downregulates stat signalling and VEGF expression. *Cancer Prevention Research*, 6(10), 1128-39.
- Blanco, M. C., Concha, A., Figueroa, A., Garrido, F., & Valladeres, M. A. (2015). Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 13610-13632.
- Boege, F., Straub, T., Kehr, A., Boesenberg, C., Christiansen, K., Andersen, A., . . . Köhrle, J. (1996). Selected Novel Flavones Inhibit the DNA Binding or the DNA Religation Step of Eukaryotic Topoisomerase I. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(4), 2262-2270.
- Bonneton, C., Larue, L., & Thiery, J. P. (1996). The APC gene product and colorectal carcinogenesis. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 319(10), 861-9.
- Burt, R. W. (2000). Colon Cancer Screening. *Gastroenterology*, 119, 837-853. <https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colorectal-genetics-pdq#section/all>
- Burt, R. W., Disario, J. A., & Cannon-Albright, L. (1995). Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annual Review of Medicine*, 46, 371-379.
- Cai, X., Ye, T., & Liu, C. (2011). Luteolin induced G2 phase cell cycle arrest and apoptosis on non-small cell lung cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 25, 1385-1391.
- Cao, Y., Keum, N. N., Chan, A. T., Fuchs, C. S., Wu, K., & Giovannucci, E. L. (2015). Television watching and risk of colorectal adenoma. *British Journal of Cancer*, 112(5), 934-942.
- Chen, C. N., Wu, C. L., Shy, H. S., & Lin, J. K. (2003). Cytotoxic prenylflavonones from Taiwanese propolis. *Journal of Natural Products*, 66(4), 503-506.
- Chen, X., Wang, Y., Xia, H., Wang, Q., Jiang, X., & Lin, Z. (2012). Loss of E-cadherin promotes the growth, invasion and drug resistance of colorectal cancer cells and is associated with liver metastasis. *Molecular Biology Reports*, 39(6), 6707-6714.
- Chien, S. T., Lin, S. S., Wang, C. K., Lee, Y. B., Chen, K. S., & Fong, Y. (2011). Acacetin inhibits the invasion and migration of human non-small cell lung cancer A549 cells by suppressing the p38a MAPK signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 350, 135-148.

- Cross, A. J., Ferrucci, L. M., Risch, A., Graubard, B. I., Ward, M. H., Park, Y., . . . Sinha, R. (2010, March 15). A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Research*, 70(6), 2406-2414.
- De flora, S., & Ferguson, L. R. (2005). Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research*, 591(1&2), 8-15.
- Ding, S., Chamberlain, M., McLaren, A., Goh, L.-b., Duncan, I., & Wolf, C. R. (2001). Cross-talk between signalling pathways and the multidrug resistant protein MDR-1. *British Journal of Cancer*, 85, 1175-1184.
- Dobrucali, A. (2007). <http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/ahmet-dobrucali/Kolon-kanseri.pdf> adresinden alındı
- Doostdar, H., Burke, M. D., & Mayer, R. T. (2000). Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology*, 144, 31-38.
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperidin and naringenin . Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, 851-874.
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., & Rebelo, M. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136, 359-386.
- GLOBOCAN. (2012). [globocan.iarc.fr](http://globocan.iarc.fr). [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) adresinden alındı
- Gupta, S., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2001). Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287, 914-920.
- Hamedeyazdan, S., Fathiazad, F., & Sharifi, S. (2012). Antiproliferative activity of *Marrubium persicum* extract in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13, 5843-5848.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmark of cancer: the next generation. *Cell*, 646-674.

- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 572-584.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, 366-374.
- Hollman, P. C., & Arts, I. C. (2000). Flavonols, flavones and flavanols nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1081-1093.
- Howells, L. M., & Manson, M. M. (2005). Prospects for plant-derived chemopreventive agents exhibiting multiple mechanisms of action. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, 5(3), 201-213.
- Hsu, Y. L., Kuo, P. L., & Lin, C. C. (2004a). Acacetin inhibits the proliferation of Hep G2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 67, 823-829.
- Hsu, Y. L., Kuo, P. L., & Liu, C. F. (2004b). Acacetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Cancer Letters*, 212, 53-60.
- Huang, Y. T., Kuo, M. L., Liu, J. Y., Huang, S. Y., & Lin, J. K. (1996, January). Inhibitions of protein kinase C and proto-oncogene expressions in NIH 3t3 cells by apigenin. *European Journal of Cancer*, 32(1), 146-151.
- Iwuchukwu, O. F., Tallarida, R. J., & Nagar, S. (2011, June 6). Resveratrol in combination with other dietary polyphenols concomitantly enhances antiproliferation and UGT1A1 induction in Caco-2 cells. *Life Science*, 88(23-24), 1047-1054.
- Jass, J. R., Whitehall, V. L., Young, J., & Leggett, B. A. (2002). Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology*, 123(3), 862-876.
- Jenab, M., Bueno-de-Mesquita, H. B., Ferrari, P., van Duijnhoven, F. J., Norat, T., & Pischon, T. (2010). Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations: A nested case-control study. *BMJ*, 340.
- Jin, C., Li, H., & He, Y. (2010). Combination chemotherapy of doxorubicin and paclitaxel for hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 136(2), 267-274.

- Jung, S. K., Kim, J. E., Lee, S. Y., Lee, M. H., Byun, S., Kim, Y. A., . . . Dong, Z. (2014). The P110 subunit of PI3-K is a therapeutic target of acacetin in skin cancer. *Carcinogenesis*, 35(1), 123-130.
- Kanno, S., Tomizawa, A., & Hiura, T. (2005). Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28, 527.
- Khan, N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2010, July 28). Lifestyle as risk factor for cancer: evidence from human studies. *Cancer Letters*, 293(2), 133-143.
- Klingelhutz, A. J., Hedrick, L., Cho, K. R., & Mcdougall, J. K. (1995). The DCC gene suppresses the malignant phenotype of transformed human epithelial cells. *Oncogene*, 10(8), 1581-1586.
- Li, G. M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18, 85-98.
- Lino, H., Jass, J. R., Simms, L. A., Leggett, B., Ajioka, Y., & Watanabe, H. (1999). DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer? *Journal of Clinical Pathology*, 52(1), 5-9.
- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517-520.
- Liu, R. H. (2004, December). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3479-3485.
- Lo, L., Price, T., Young, J., & Townsend, A. (2016). BRAF Mutation in Colorectal Cancer. In L. Rodrigo, *Colorectal Cancer- From Pathogenesis to Treatment*. London, United Kingdom: Intech.
- Lorenc, Z., Opilka, M. N., Rajs, C. K., Rajs, A., Waniczek, D., & Starzewska, M. (2015). Expression Level of Genes Coding for Cell Adhesion Molecules of Cadherin Group in Colorectal Cancer Patients. *Medical Science Monitor*, 21(13), 2031-2040.
- Lu, X., Jung, J. I., Cho, H. J., Lim, D. Y., Lee, H. S., & Chun, H. S. (2005). Fisetin Inhibits the Activities of Cyclin-Dependent Kinases Leading to Cell Cycle Arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *The Journal of Nutrition*, 135, 2884-2890.
- Makrodouli, E., Oikonomou, E., Koc, M., Andera, L., Sasazuki, T., & Shirasawa, S. (2011). BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate

- migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. *Molecular Cancer*, 10, 118.
- Martin, P., Noonan, S., Mullen, M. P., Scaife, C., Tosetto, M., & Nolan, B. (2014). Predicting response to vascular endothelial growth factor inhibitor and chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*, 14, 887.
- Martinez-Vacquez, M., Ramirez Apan, T. O., Lastra, A. L., & Bye, R. (1998). A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of pectolinarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata*. *Planta Med*, 64, 134-137.
- Maru, G. B., Hudlikar, R. R., Kumar, G., Gandhi, K., & Mahimkar, M. B. (2016). Understanding the molecular mechanisms of cancer prevention by dietary phytochemicals: From experimental models to clinical trials. *World Journal of Biological Chemistry*, 88-99.
- Mehlen, P., & Fearon, E. R. (2004). Role of the Dependence Receptor DCC in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Journal of Clinical Oncology*, 22(16), 3420-1428.
- Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *National Review of Cancer*, 924-935.
- Moran, A., Ortega, P., Juan, C., Marcelo, T. F., Frias, C., & Pernaute, A. S. (2010). Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2(3), 151-158.
- Murphy, N., Norat, T., Ferrari, P., Jenab, M., de Mesquita, B. B., & Skeie, G. (2012). Dietary Fibre Intake and Risks of Cancers of the Colon and Rectum in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *PLoS ONE*, 7.
- Naccarati, A., Polakova, V., Pardini, B., Vodickova, L., Hemminki, K., & Kumar, R. (2012). Mutations and polymorphisms in TP53 gene—an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis*, 27(2), 211-218.
- Nagothu, K. K., Jaszewski, R., Moragoda, L., Rishi, A. K., Finkenauer, R., & Tobi, M. (2003). Folic acid mediated attenuation of loss of heterozygosity of DCC tumor suppressor gene in the colonic mucosa of patients with colorectal adenomas. *Cancer Detection and Prevention*, 27(4), 297-304.
- Neves, M. P., Cidade, H., & Pinto, M. (2011). Prenylated derivatives of baicalein and 3,7-dihydroxyflavone: Synthesis and study of their effects on tumor cell lines



- growth, cell cycle and apoptosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 2562-1574.
- Nicholas, R. J., & Tekkis, P. P. (2008). Multidisciplinary treatment of cancer of the rectum: a European approach. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 17, 533-551.
- Ninomiya, M., Nishida, K., & Tanaka, K. (2013). Structure-activity relationship studies of 5,7- dihydroxyflavones as naturally occurring inhibitors of cell proliferation in human leukemia HL-60 cells. *Journal of Natural Medicines*, 67, 460-467.
- Ogino, S., Fuchs, C. S., & Giovannucci, E. (2012). How many molecular subtypes? Implications of the unique tumor principle in personalized medicine. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 12, 621-628.
- Ötles, S. (2005). Chapter 9: Analysis of Polyphenols in Foods. F. Shahidi, M. Naczk, F. Shahidi, & M. Naczk (Dü) içinde, *Methods of analysis of food components and additives* (s. 204). NW, FL: CRC Press.
- Pan, M. H., Lai, C. S., Hsu, P. C., & Wang, Y. J. (2005). Acacetin induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by activation of caspase cascades and production of reactive oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 620-630.
- Pan, M. H., Lai, C. S., Wang, Y. J., & Ho, C. T. (2006). Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice. *Biochemical Pharmacology*, 72, 1293-1303.
- Plochmann, K., Korte, G., & Koutsilieris, E. (2007). Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 460, 1-9.
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016, September). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Global Health*, 4, 609-616.
- Raskov, H., Pommergaard, H. C., Burcharth, J., & Rosenberg, J. (2014). Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, 20(48), 18151-18164.
- Rastegar, H., Ahmadi Ashtiani, H., & Anjarani, S. (2013, September). The role of milk thistle extract in breast carcinoma cell line (MCF7) apoptosis with doksorubisin. *Acta Medica Iranica*, 51(9), 591-598.

- Riddick, D. S., Lee, C., & Ramji, S. (2005). Cancer chemotherapy and drug metabolism. *Drug Metabolism & Disposition*, 33(8), 1083-1096.
- Sabatier, S., Amiot, M. J., Tacchin, M., & Aubert, S. (1992). Identification of flavonoids in sunflower honey. *Journal of Food Science*, 57, 773-774.
- Sak, K. (2014). Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacognosy Review*, 8(16), 122-146.
- Salazar, R., Reopman, P., Capella, G., Moreno, V., Simon, I., & Dreezen, C. (2011, January 1). Gene Expression Signature to Improve Prognosis Prediction of Stage II and III Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(1), 17-24.
- Saravi, S. S., Shokrzadeh, M., & Shirazi, F. H. (2013, May 22). Cytotoxicity of *Sambucus ebulus* on cancer cell lines and protective effects of vitamins C and E against its cytotoxicity on normal cell lines. *African Journal of Biotechnology*, 12(21), 3360-3365.
- Scholer, A. D., Schlabach, M. R., & Loo, A. (2011). Maintenance of adenomatous polyposis coli (APC)-mutant colorectal cancer is dependent on Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(41), 17135-17140.
- Sghaier, M. B., Skandrani, I., & Nasr, N. (2011). Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure activity relationship study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32, 336-348.
- Shahidi, F., & Naczki, M. (2005). Chapter 9: Analysis of Polyphenols in Foods. F. Shahidi, & M. Naczki içinde, *Methods of Analysis of Food Components and Additives* (s. 203). NW, FL: Taylor&Francis Group.
- Shen, K. H., Hung, S. H., Yin, L. T., Huang, C. S., Chao, C. H., Liu, C. L., & Shih, Y. W. (2010). Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 333, 279-291.
- Shim, H. Y., Park, J. H., Paik, H. D., Nah, S. Y., Kim, D. S., & Han, Y. S. (2007). Acacetin induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves caspase cascade, mitochondria-mediated death signaling and SAPK/JNK1/2-c-Jun activation. *Molecules and Cells*, 24, 95-104.

- Singh, R. P., Agrawal, P., & Yim, D. (2005). Acacetin inhibits cell growth and cell cycle progression and induces apoptosis in human prostate cancer cells: structure–activity relationship with linarin and linarin acetate. *Carcinogenesis*, 26(4), 845-854.
- American Cancer Society, (2013). *Cancer facts & figures 2013*. Atlanta: American Cancer Society.
- Stefova, M., Stafilov, T., & Kulevanova, S. (2003). *HPLC Analysis of Flavonoids*. NYC: Marcel Dekker Inc.
- Suttana, W., Mankhetkorn, S., & Poompimon, W. (2010). Differential chemosensitization of P-glycoprotein overexpressing K562/Adr cells by withaferin A and Siamois polyphenols. *Molecular Cancer*, 9, 99.
- Suzuki, A., Scruggs, A., & Iwata, J. (2015). The temporal specific role of WNT/ $\beta$ -catenin signaling during myogenesis. *Journal of Natural Sciences*, 1(8), 143.
- Suzuki, I., Hyashi, I., & Takaki, T. (2002). Antitumor and anticypogenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 17(5), 553-562.
- Szliszka, E., Helewski, K. J., & Mizgala, E. (2011). The dietary flavonol fisetin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 39, 771-779.
- Takebe, N., Harris, P. J., Warren, R. Q., & Ivy, S. P. (2011). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(2), 97-106.
- TBMM. (2010). *Kanser Hastalığı Konusunun Araştırılarak Alınması Gereken Önlemlerin Belirlenmesi Amacıyla Kurulan Meclis Araştırması Komisyonu Raporu*. Ankara: TBMM.
- Temple, N. J., & Gladwin, K. K. (2003). Fruits, vegetables and the prevention of cancer: research challenge. *Nutrition*, 19, 467-470.
- Tsanou, E., Peschos, D., Batistatou, A., Charalabopoulos, A., & Charalabopoulos, K. (2008). The E-Cadherin Adhesion Molecule and Colorectal Cancer. A Global Literature Approach. *Anticancer Research*, 28(6A), 3815-3826.
- Valle, I., Tramalloni, D., & Bragazzi, N. I. (2015). Cancer Prevention: state of the art and future prospects. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 56, 21-27.
- van Duijnhoven, F. J., Bueno de Mesquita, H. B., Calligaro, M., Jenab, M., Pischon, T., & Jansen, E. H. (2011). Blood lipid and lipoprotein concentrations and colorectal

- cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Gut*, 60, 1094-1102.
- Venook, A. P., Niedzwiecki, D., Lopatin, M., Ye, X., Lee, M., & Friedman, P. N. (2013, May 10). Biologic Determinants of Tumor Recurrence in Stage II Colon Cancer: Validation Study of the 12-Gene Recurrence Score in Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 9581. *Journal of Clinical Oncology*, 31(14), 1775-1781.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., & Leppert, M. (1988). Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *The New England Journal of Medicine*, 525-532.
- Watanabe, K., Kanno, S. I., Tomizawa, A., Yomogida, S., & Ishikawa, M. (2012). Acacetin induces apoptosis in human T cell leukemia Jurkat cells via activation of a caspase cascade. *Oncology Reports*, 27, 204-209.
- Wei, E. K., Giovannucci, E., & Wu, K. (2004, January 20). Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *International Journal of Cancer*, 108(3), 433-442.
- Weinstein, I. B. (1988). The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment- twenty seventh G.H.A. *Cancer Research*, 4135-4143.
- Worthley, D. L., & Leggett, B. A. (2010). Colorectal Cancer: Molecular Features and Clinical Opportunities. *The Clinical Biochemist Reviews*, 31(2), 31-39.
- Wu, X., Patterson, S., & Hawk, E. (2011). Chemoprevention history and general principles. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 25(4-5), 445-59.
- Yao, L. H., Datta, N., Tomas-Barberan, F. A., Ferreres, F., Martos, I., & Singanusong, R. (2003). Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, 81, 159-168.
- Zhang, K., Yang, E. B., Tang, W. Y., Wong, K. P., & Mack, P. (1997). Inhibition of Glutathione Reductase by Plant Polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 54, 1047-1053.
- Zhang, Y. J., Gan, R. Y., & Li, S. (2015). Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules*, 20, 21138-21156.

## HAM VERİLER



**FORMLAR**



**ETİK KURUL KARARI**



**PATENT HAKKI İZİNİ**





## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### ACACETİN İN İN VİTRO ORTAMDA KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ANTİKANSEROJENİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

#### ORJNALLIK RAPORU

% <b>12</b>	% <b>9</b>	% <b>2</b>	% <b>4</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>Submitted to Istanbul University</b> Öğrenci Ödevi	% <b>2</b>
<b>2</b>	<b>www.tbmm.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>3</b>	<b>www.drahmetdobrucali.com</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>4</b>	<b>earsiv.atauni.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>5</b>	<b>docplayer.biz.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>6</b>	<b>kanser.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>7</b>	<b>acikerisim.deu.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Beste	<b>Soyadı</b>	Tacal Aslan
<b>Doğ.Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğ.Tar.</b>	23.11.1984
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kim No</b>	19604020574
<b>Email</b>	btacal@gmail.com	<b>Tel</b>	05326201805

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	İstanbul Üniversitesi AZİZ SANCAR DETAE	2018
<b>Yük.Lis.</b>	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2011
<b>Lisans</b>	Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi	2008
<b>Lise</b>	Sakıp Sabancı Anadolu Lisesi	2002

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Marmara Üniversitesi	2012-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	85	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	89.904	90.878	91.386
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

### Özel İlgi Alanları (Hobileri):