

**T.C.  
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ KANSER BİYOLOJİSİ VE  
FARMAKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**20-HİDROKSİ-20-EPİ-TINGENON MOLEKÜLÜNÜN KOLON KANSERİ  
ÜZERİNDE APOPTOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**EREN ŞAHİN**

**YÜKSEK LİSANS**

**PROF. DR. ENGİN ULUKAYA**

**İSTANBUL-2019**

## ÖZET

### 20-HİDROKSİ-20-EPİ-TİNGENON MOLEKÜLÜNÜN KOLON KANSERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Eren Şahin  
Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi  
Danışman: Prof. Dr. Engin Ulukaya

2019

M. chiapensis cinsine ait bitkiler geleneksel tıpta rutin olarak ağrı hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Selastroidler olarak bilinen kinonemethid triterpenoidler, küçük bir biyolojik olarak aktif bileşik grubu oluşturur. Bu belirli metabolit tipleri arasında, pristimerin ve tingenon Latin Amerika'da geleneksel ilaçlar olarak kabul edilir. Bir pentasik triterpen olan tingenon, M. chiapensis'nin köklerinden elde edilir. Önceki yapılan çalışmalara göre, pristimerin meme kanser hücrelerinde büyümeyi durdurucu etkisi bulunmuştur. Ayrıca MCF-7 ve MCF-7s hücre hatlarında apoptozisi tetiklediği görülmüştür. Pristimerinin apoptotik bu etkisinin aynı bitkiden elde edilen tingenon molekülleri için de etkili olabileceği ön görülmüştür. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında farklı konsantrasyonlarda etkisi denenilen tingenon molekülü hücreler üzerinde apoptotik etkisi göstermiştir. Çıkan sonuçlarda kaspaz 3/7 pozitif bulunmuştur. Ayrıca, akışkanlar sitometrisinde hücrelerde Anneksin-V bağlanmasında artış olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, tingenon moleküllerinin kolon kanseri üzerinde apoptotik etkisi olduğu düşünülmektedir. Fakat, bu molekülün umut verici bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilmesi için ölüm metodunu belirlenmesi ve hangi yolağı tam olarak etkilediğinin araştırılması ardından in vivo deneylerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimer: Tingenon, M. Chiapensis, Kolon Kanseri, Apoptoz**

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF APOPTOTIC EFFECT OF 20-HYDROXY-20-EPI-TINGENONE MOLECULE ON COLON CANCER

**Eren Şahin**  
**Cancer Biology and Pharmacology**  
**Danışman: Prof. Dr. Engin Ulukaya**

**2019**

Plants of the genus *M. chiapensis* are routinely used in the treatment of pain diseases in traditional medicine. Kinonemethid triterpenoids, known as celastroloids, form a small group of biologically active compounds. Among these specific metabolite types, pristimer and tingenone are considered traditional drugs in Latin America. Tingenon, a pentacic triterpene, is derived from the roots of *M. chiapensis*. According to previous studies, pristimer has been found to inhibit growth in breast cancer cells. It has also been shown to induce apoptosis in MCF-7 and MCF-7s cell lines. It has been predicted that this apoptotic effect of pristimer may also be effective for tingenon molecules obtained from the same plant. Tingenon molecule showed apoptotic effect on HCT-116 colorectal cancer cell line which were tested for different concentrations. It was found that caspase 3/7 activity on treated cells. In addition, Annexin-V binding was observed increased in these cells by flow cytometry. These results suggest that tingenon molecules have an apoptotic effect on colon cancer. However, in order to predict that this molecule can be used as a promising treatment option, it has been concluded that in vivo experiments should be performed after determining the method of death and investigating which pathway affects it fully.

**Keywords: Tingenon, M. Chiapensis, Colon Cancer, Apoptosis**

## TEŞEKKÜR

Bu alıőmanın gerçekleőtirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaőan, kendisine ne zaman danıősam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaőadıęımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düőündüęüm kıymetli ve danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya teőekkürü bir borç biliyor ve Őükranlarımı sunuyorum. Yine çalıőmamda konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve gelecekteki hayatında çok daha başarılı olacağına inandığım kıymetli arkadaőlarım Melda SARIMAN, Merve ERKISA, iler Gülően DİKEN'e de sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Teőekkürlerin az kalacağı yüksek lisans niversite hocalarımda da bana 2 yıllık niversite hayatım boyunca kazandırdıkları her Őey için ve beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için hepsine teker teker teőekkürlerimi sunuyorum. Ve son olarak beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek Şekilde yetiőtirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük Őansım olan aileme sonsuz teőekkürler.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>SİMGE ve KISALTMASI</b> .....	<b>x</b>
<b>GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
1.1.KARSİNOJENEZ.....	<b>3</b>
1.1.1.Tümör Heterojenitesi ve Kanser Modelleri .....	<b>4</b>
1.1.1.1.Klonal Evrimsel (Stokastik) Model .....	<b>4</b>
1.1.1.2.Kanser Kök Hücreleri (KKH) Modeli.....	<b>5</b>
1.1.2.Kanser Kök Hücrelerinde İlaç Direnci .....	<b>6</b>
1.1.3.Karsinogenezde Etkili Olan Genler .....	<b>6</b>
1.1.3.1.Onkogenler ve Proto-onkogenler.....	<b>6</b>
1.1.3.2.Tümör Baskılayıcı Genler .....	<b>9</b>
1.2.KOLON KANSERİ VE EPİDEMİYOLOJİSİ.....	<b>10</b>
1.2.1.Kolon Kanseriine Sebep Olan Faktörler .....	<b>10</b>
1.2.1.1.Genetik Faktörler .....	<b>11</b>
1.2.1.2.Çevresel Faktörler .....	<b>12</b>
1.2.2.Kolorektal Kanserinin Histopatolojik Teşhisi .....	<b>15</b>
1.3.KOLOREKTAL KANSERDE TEDAVİ YÖNTEMLERİ .....	<b>16</b>
1.3.1.Anjiyogenezin Durdurulması.....	<b>17</b>
1.4.KOLON KANSERİ MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ.....	<b>18</b>
1.4.1.Apoptozis .....	<b>18</b>
1.4.1.1.Apoptozisde Gözlenen Morfolojik Değişiklikler .....	<b>19</b>

1.4.1.2. Apoptozisde Gözlenen Biyokimyasal Değişiklikler.....	19
1.4.1.3. Apoptozis Mekanizmaları .....	20
1.4.1.3.1. Ekstrinsik Yolak .....	20
1.4.1.3.2. İntrinsik Mitokondriyel Yolak .....	21
1.4.1.3.3. Ortak Yolak .....	22
1.4.1.3.4. Endoplazmik Retikulum Yolağı.....	23
1.4.1.3.5. Kaspazlar .....	23
1.4.1.3.6. Apoptozis ve p53 Geni .....	25
1.5. TERPENOİDLER, QUINONE-METHİDE TRİTERPENLER (QMTS) VE TİNGENON.....	26
<b>2. MATERYAL ve METOD .....</b>	<b>30</b>
2.1. MATERYAL .....	30
2.1.1. Kimyasal Maddeler.....	30
2.1.2. Sarf Malzemeleri.....	30
2.1.3. Cihazlar .....	31
2.2. YÖNTEMLER.....	31
2.2.1. Hücre Kültürü .....	31
2.2.1.1. Hücre Kültür Besiyerinin Hazırlanması .....	31
2.2.1.2. HCT116 Hücrelerinin Stoktan Çıkarılması .....	31
2.2.1.3. HCT116 Hücrelerin Pasajlanması .....	32
2.2.1.4. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı .....	32
2.2.2. SRB Metodu ile Sitotoksite Belirleme .....	33
2.2.2.1. Tingenon Doğal Aktif İlaç Çözeltisinin Hazırlanması.....	33
2.2.2.2. Kimyasalların Hazırlanması.....	33
2.2.2.3. SRB Testi.....	34
2.2.3. Akım Sitometrisi Analizleri.....	36
2.2.3.1. Kaspaz 3/7 Testi.....	37
2.2.3.2. Anneksin-V Testi .....	39

2.2.2.3.3.ROS Testi .....	40
<b>3.BULGULAR.....</b>	<b>42</b>
3.1. SRB SİTOTOKSİSİTE TESTİ BULGULARI.....	42
3.2. AKIM SİTOMETRİSİ TESTİ BULGULARI.....	44
3.2.2. Kaspaz 3/7 Testi Bulguları .....	45
3.2.3. ROS Testi Bulguları.....	46
<b>4.TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>47</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>51</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: Karsinogenezis Aşamaları (Siddiqui vd., 2015) .....	3
Şekil 1.2: Kanser Modelleri (Prieto-Vila vd., 2017b) .....	5
Şekil 1.3: MAPK yolağının G12V RAS mutasyonu ile kalıcı aktivasyonu (Rajasekharan & Raman, 2013).....	8
Şekil 1.4: Apoptozisin intrinsik ve ekstrinsik yolları (Wong, 2011).....	21
Şekil 1.5: Bax/Bad Aktivasyonu (J. Li & Yuan, 2008).....	22
Şekil 1.6: Kaspaz Aktivasyonu (Shi, Y., 2004).....	24
Şekil 1.7: p53'ün Apoptozisde Görevi (Amaral, J.D., 2010).....	25
Şekil 1.8: <i>M. ilicifolia</i> ve <i>M. chuchuhuasca</i> bitkilerinden elde edilen organik bileşikler ile yapılan MTT sitotoksikite testi sonuçları (Shirota vd., 1994).....	27
Şekil 1.9: Primisterin ve tingenon moleküler yapısı (Taddeo vd., 2019).....	28
Şekil 1.10: 20-Hidroksi-20-Epi-Tingenon .....	28
Şekil 1.11: 22-Hidroksitingenonun çeşitli kanser hücre hatları üzerinde ED50 değerleri (Bavovada vd., 1990).....	29
Şekil 2.1: Akım Sitometri Çalışma Prensipleri (n.d.).....	37
Şekil 3.1: Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Tingenon çözeltisinin faz-kontrast 10X mikroskop görüntüleri .....	42
Şekil 3.2: Farklı dozlarda uygulanan Tingenon bileşiğinin HCT-116 hücrelerinde kontrole göre % canlılık oranları .....	44
Şekil 3.3: Tingenon (16,91 µM) ile tedavi sonrasında kolon kanseri hücrelerinde Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları .....	45
Şekil 3.4: Tingenon (16,91 µM) ile tedavi sonrasında kolon kanseri hücrelerinde Kaspaz değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları .....	46



**Şekil 3.5:** Tingenon (16,91 µM) ile tedavi sonrasında kolon kanseri hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramı. M1: ROS negatif hücreler; M2: ROS pozitif hücreler ..... 46



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

**Tablo 3.1.** Tingenon molekülü uygulanan HCT-116 hücrelerinde SRB sitotoksiste testi sonuçlarına göre 72 saat tedavi süresindeki IC50 ve IC 90 değerleri..... 43



## SİMGE ve KISALTMASI

Simgeler	Açıklama
<b>5-FU</b>	:5-Fluoracil (5-Floraçil)
<b>ABC</b>	:ATP-Bağlayıcı Kaset (ATP-Binding Casette)
<b>AIF</b>	:Apoptozis İndükleyici Faktör (Apoptozis Inducing Factor)
<b>APAF-1</b>	:Apoptotik Proteaz Aktifleştiren Faktör-1 (Apotozis Protease Activating Factor -1)
<b>APC</b>	:Adenomatöz Polipozis Koli (Adenomatous Polyposis Coli)
<b>ARF</b>	:ADP Ribozilasyon Faktörü (ADP Ribosylation Factor)
<b>ATM</b>	:Ataxia-Telengiectasia Mutated
<b>ATP</b>	:Adenozin Trifosfat
<b>BAD</b>	:BCL2 Associated Agonist of Cell Death
<b>BAK</b>	:BCL2-Antagonist Killer
<b>BAX</b>	:BCL2-Associated X
<b>BCL2</b>	:B-cell Lymphoma 2
<b>BCL-W</b>	:Protein Phosphatase 1, Regulatory Subunit 51
<b>BCL-X<sub>L</sub></b>	:BCL Extra Large
<b>BCL-X<sub>S</sub></b>	:BCL Pro Apoptotik
<b>BID</b>	:BH3 Interacting-domain Death Agonists
<b>BIK</b>	:BCL2 Interacting Killers
<b>BIM</b>	:BCL2 Protein 11
<b>BRAF</b>	:B-Raf geni
<b>BRCA1</b>	:Göğüs Kanseri 1 (Breast Cancer 1)
<b>BRCA2</b>	:Göğüs Kanseri 2 (Breast Cancer 2)
<b>CAD</b>	:Kaspaz Aktifleştirilmiş Deoksiribonükleaz (Caspase Activated Dnaz)
<b>CAPOX</b>	:Capecitabine-Oxaliplatin
<b>CASP3</b>	:Kaspaz-3 (Caspase-3)
<b>CDK</b>	:Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin-Dependent Kinase)
<b>CIMP</b>	:CpG Ada Metilat Fenotipi (CgP Island Methylator Phenotype)
<b>CRC</b>	:Kolonrektal Kanser (Colorectal Cancer)
<b>DD</b>	:Ölüm Domaini (Death Domain)
<b>DHE</b>	:Dihidroetidyum (Dihydroethidium)
<b>DIABLO</b>	:Direkt Apoptozis İnhibitörü Bağlayan Düşük pI Protein (Direct IAP Binding Protein with low pI)
<b>DISC</b>	:Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (Death Inducing Signal Complex)
<b>DMSO</b>	:Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide)
<b>DR</b>	:Ölüm Reseptörü (Death Receptor)
<b>EDTA</b>	:Etilendiamintetraasetik asit (Ethylenediaminetetraacetic acid)
<b>EGFR</b>	:Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor)

<b>ELISA</b>	:Enzim Bağlantılı Immunoabsorbans Tahlili (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)
<b>EMT</b>	:Epitel Mezenkimal Dönüşümü (Epithelial to Mesenchymal Transition)
<b>FADD</b>	:Fas-İlişkili Ölüm Alanı (Fas-Associated Death Domain)
<b>FAP</b>	:Familial Adenomatous Polyposis
<b>FBS</b>	:Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)
<b>FOLFIRI</b>	:Folinik asit Floroaçil İrinotesan (Folinic acid Fluoroacil Irinoteca)
<b>FOLFOX</b>	:Folinik asit Floroaçil Oksaliplatin (Folinic acid Fluoroacil Oxaliplatin)
<b>GEF</b>	:Guanin Değişim Faktörü (Guanine Exchange Factor)
<b>HGF</b>	:Hepatosit Büyüme Faktörü (Hepatocyte Growth Factor)
<b>HIF</b>	:Hispoksi İndüklenebilir Faktör (Hypoxia Inducible Factor)
<b>HRK</b>	:Harakiri
<b>HTRA-2</b>	:HtrA Serin Peptidaz 2
<b>IAP</b>	:Apoptozis İnhibitorü (Inhibitor of Apoptosis)
<b>IARC</b>	:Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (International Agency For Research On Cancer)
<b>ICAD</b>	:Kaspaz Aktive Edilmiş Dnaz İnhibitorü (Inhibitor of CAD)
<b>KIN</b>	:Kromozomal İnstabilite
<b>KK</b>	:Kolon Kanseri
<b>KKH</b>	:Kanser Kök Hücresi
<b>KRAS</b>	:Kirsten Sıçan Sarkoma Viral Onkogen Homoloğu
<b>LV</b>	:Lököverin (Leucovorin)
<b>MAPK</b>	:Mitojen Aktive Edilmiş Protein Kinaz (Mitogen-activated Protein Kinase)
<b>MCF7</b>	:Michigan Kanser Fonu 7 (Michigan Cancer Foundation 7)
<b>MCL-1</b>	:Miyeleoid Hücre Lösemisi 7 (Myeloid Cell Leukemia 1)
<b>MDM2</b>	:Mouse Double Minute 2
<b>MDR</b>	:Çoklu İlaç Direnci (Multiple Drug Resistance)
<b>MOMP</b>	:Mitokondri Dış Membran Geçirgenliği (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization)
<b>MSI</b>	:Mikrosatellit İnstabilitesi (Microsatellit Instability)
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
<b>MYC</b>	: Protoonkogen
<b>NRAS</b>	:Nöroblastoma RAS Viral Onkogen Homoloğu
<b>PBS</b>	:Fostat Tuz Tamponu
<b>PI3K</b>	:Fosfoinositid-3 Kinaz
<b>PS</b>	:Fosfaditileserin
<b>PUMA</b>	:p53 up-regulated modulator of apoptosis
<b>QMT</b>	:Quinone-Methide Triterpenler
<b>RAS</b>	:Protoonkogen ailesi
<b>RB1</b>	:Retinoblastoma
<b>ROS</b>	:Reaktif Oksijen Canlıları

<b>RPMI</b>	:Roswell Park Memorial Institute
<b>RSV</b>	:Rous Sarkoma Virüsü
<b>SMAC</b>	:Mitokondriden Türemiş İkinci Kaspaz Aktivatörü
<b>SRB</b>	:Sülforodamin B
<b>TCA</b>	:Trikloroasetik asit
<b>TMO</b>	:Tümör Mikro Ortamı
<b>TNF</b>	:Tümör Nekrosiz Faktör
<b>TNFR</b>	: Tümör Nekrosiz Faktör Reseptörü
<b>TP53</b>	:Tümör Protein 53
<b>TRADD</b>	: TNFR1-İlgili Ölüm Domain Proteini
<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotelyel Büyüme Faktörü

## GİRİŞ

Dünya çapında kolon kanseri (KK), hem erkek hem de kadınları etkileyen en yaygın kanserler arasında yer almaktadır. GLOBOCAN 2008 datalarına göre 27 kanser türü içerisinde %9'luk bir orana sahip olan kolon kanseri, kanserle ilişkili ölümlerde 3. sıraya ulaşmaktadır (Bhome vd., 2018). Çok gelişen ülkelerde kolorektal kanserin görülme oranı her geçen yıl artmaktadır.

Her yıl yaklaşık 600.000 hasta bu hastalıktan ölmektedir. Hastalığın evresine göre kolorektal kanser hastaları 5 yıllık sağkalım prognozu göstermektedir. Evre I KK hastalarında yüzde 90'dan fazla sağkalım sergilerken, Evre IV KK'li hastalarda yüzde 10'a ulaşır (Van der Jeught, Xu, Li, Lu, & Ji, 2018). Bu nedenle, hastalığın erken teşhisi bir öncelik olmuştur. Erken teşhis edilemeyen hastalar için geç evre KK tedavisi, zor bir süreç olmaktadır. KK tedavisinin temeli; cerrahi, hedefe yönelik terapi, neoadjuvan radyoterapi ve adjuvan kemoterapiden oluşur. Ne yazık ki, KK hastalarının düşük sağkalım oranlarının sebebi ilaç direnci olmaya devam etmektedir. İlaç direnci gösteren hastalar için yeni ilaç molekülleri büyük bir şans olacaktır. Son zamanlarda, tümör mikro-ortamının (TMO) etkisi, KK'de dikkat çekmiştir ve immün hücre infiltrasyonunu prognostik ve prediktif belirteçler olarak değerlendirmek için kapsamlı klinik çalışmaların analizine yol açmıştır. Ek olarak, KK tedavisi için umut verici bir tedavi yöntemi ise immünoterapinin kullanılmasıdır. Günümüzde KK hasta alt gruplarında immün kontrol noktası inhibitörlerinin kullanılmasıyla başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Kalyan, Kircher, Shah, Mulcahy, & Benson, 2018).

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapilerin ilaç direnci göstermeleri yeni ilaç molekülleri keşfetmeye yoğunlaştırmıştır. Geleneksel tıpta kullanılan bitkiler bu alanda öncü molekülleri çıkartmaktadır. Tümörlerin gelişmesini ve yayılmasını engellemek için bitkilerden elde edilen "fitokimyasal" bileşiklerin önemini vurgulayan deneysel çalışmalardan elde edilen çarpıcı kanıtlar vardır. Son 20 yıl boyunca

kullanılan ilaçların %25'inden fazlası doğrudan bitkilerden elde edilirken, diğer %25'i kimyasal olarak değiştirilmiş doğal ürünlerdir. Yine de yaklaşık 250.000 yüksek bitkinin sadece %5-15'i biyoaktif bileşikler için araştırılmıştır. Bu tür bileşiklerin kanser tedavisi için kullanılmasının avantajı, nispeten toksik olmayan yapıları ve bir sindirim formunda bulunmalarındır (Amin, Gali-Muhtasib, Ocker, & Schneider-Stock, 2009).

Bu bilgilerden yola çıkararak, bu çalışmada geleneksel tıpta kullanılan *M. Chiapensis* bitkisinden elde edilen Tingenon molekülleri ile; kolon kanseri hücre hattı olan HCT116 hücreleri üzerine apoptotik/sitotoksik etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

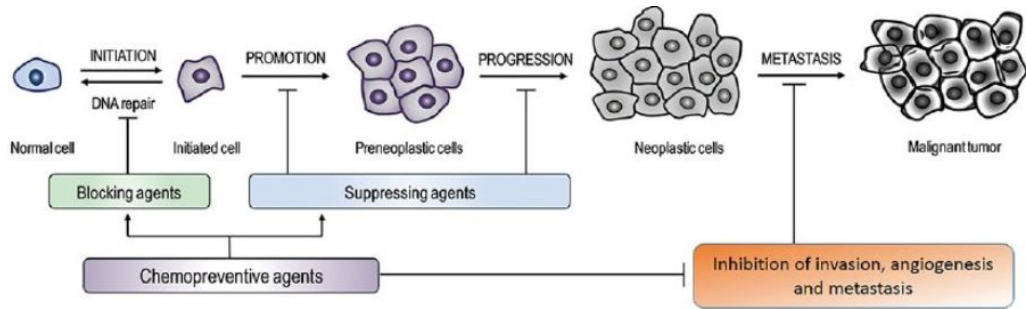
Bu amaçla farklı dozlarda uygulanan Tingenon molekülünün kolon kanseri üzerine etkileşimi sitotoksik ve apoptotik etkisinin olup olmadığı incelenmiştir. 12 farklı dozda uygulanan Tingenon'un İnhibisyon Konsantrasyonu (IC50/IC90) hesaplandıktan sonra %90'nını öldüren konsantrasyon ile yapılan kültür çalışmaları, hücrelerde hangi yolakları etkilediği hangi ölüm yolağını indüklediği gibi konular hücre antijenleri incelenerek yapılmıştır.

## 1.GENEL BİLGİLER

### 1.1.KARSİNOJENEZ

Tanım olarak kanser, vücudun diğer kısımlarına yayılma potansiyeli olan anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesidir. Tüm kanserlerin yüzde 90 ila 95'i çevresel faktörlere bağlı olup, geri kalan kısmı kalıtsaldır. Mutasyon ve epimutasyonların çoğunun kanser yapıcı etkisi olmasa da proliferasyon ve apoptozis arasındaki dengeyi bozanlar kanseri tetiklemektedir. Kansere sebep olan iki önemli gen sınıfı, mutasyona uğramış ya da aktivitesi değiştirilmiş tümör baskılayıcılar ve proto-onkogenlerdir (Cole & Kramer, 2016). Toplam 22.000 insan geni arasından yaklaşık yüzde 1.6'sın somatik kanser mutasyonlarına uğrayabildiği bilinmektedir (Witsch, Sela, & Yarden, 2010).

Karsinogenezis dört ana aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama olan başlangıç, spontane ya da karsinojen ajanlara maruz kalma suretiyle oluşan mutasyonlar ve bunların proliferasyon, farklılaşma ve hücre ömrü gibi süreçlerin yolaklarında oluşturduğu bozukluklar ile tetiklenir. Geçiş aşaması, aktif olarak çoğalan preneoplastik hücrelerin biriktiği, nispeten uzun ve geri dönülmesi mümkün olabilen ikinci aşamadır. İlerleme, neoplastik transformasyonun final aşaması olup, tümör boyutunda hızlı artış, metastatik ve invazif potansiyel taşıyan ileri mutasyonların oluşabileceği evredir. Fenotipik değişiklikler ve hücre proliferasyonu olmaktadır. Son aşama olan metastaz, kanser hücrelerinin ilk oluştukları birincil bölgeden, kan ya da lenf sistemi ile vücudun diğer bölgelerine taşınmasıdır (Şekil 1.1) (Siddiqui, Sanna, Ahmad, Sechi, & Mukhtar, 2015).



Şekil 1.1: Karsinogenezis Aşamaları (Siddiqui vd., 2015)



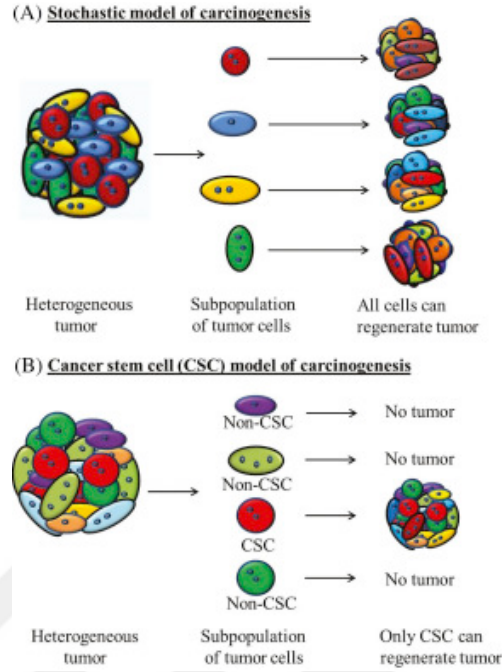
### 1.1.1.Tümör Heterojenitesi ve Kanser Modelleri

Uzun süredir bilindiği üzere tümörler homojen hücre kitlelerinden oluşmamaktadırlar. Tümör hücresi popülasyonları, hücre yüzey belirteçleri, genetik-epigenetik değişiklikler, genetik stabilite, terapiye karşı direnç ve duyarlılık, büyüme hızları gibi faktörlerle birbirlerinden ayrılırlar (Rich, 2016). Bu heterojenite intertümoral ve intratümoral olarak iki ayrı grupta sınıflandırılmaktadır. İntertümoral heterojenite, farklı doku ve hücre tipindeki tümörler arasında gözlenen varyasyonlar olarak tanımlanabilir. Farklı hastalardan aynı doku tipindeki tümörler arasında gözlenen farklılıklar; ve aynı birey içindeki farklı tümörler arasında gözlenen farklılıklar intertümoral heterojenite örnekleridir. İnatümoral heterojenite tek bir tümör içindeki farklılıklara işaret etmektedir; ve kanser prognozunu ve tedavisini komplike bir hale getirmektedir. Bunun ana sebepleri, teşhis için kullanılan tümörden alınan ufak biyopsi örneklerinin bütün lezyonu temsil etmemesi, hastalık ilerledikçe hücrelerin yeni fonksiyonel özellikler ve biyo-belirteç paternleri kazanmasıdır (Islam, Gopalan, & Lam, 2019; Rich, 2016). Kanser heterojenitesi ve ilerlemesi, stokastik model ve kanser kök hücreleri (KKH) olarak adlandırılan iki model ile açıklanmaktadır (Islam vd., 2019). Şu anda iki modelin birbirinden bağımsız olmadığı ve intratümör heterojenitesine beraber katkı yaptıkları genel olarak benimsenmektedir. Bu birleştirilmiş modele göre kanser kök hücreleri hiyerarşinin başında bulunmakta ve tümör başlangıcına yol açmaktadırlar, fakat halen sporadik mutasyonlara müsait ve seçim baskısına açık durumdadırlar (Rich, 2016).

#### 1.1.1.1.Klonal Evrimsel (Stokastik) Model

1976 yılında Peter Nowell tarafından ileri sürülmüştür (Islam vd., 2019). Bu modele göre kanser, somatik hücre mutasyonlarının ve epigenetik değişikliklerin birikmesi ve kademeli doğal seçilime uğramaları ile ilerlemektedir. (Prieto-Vila, Takahashi, Usuba, Kohama, & Ochiya, 2017b) Zamanla hücrelerin saldırganlığı, istilacılığı ve tedaviye karşı oluşturdukları direnç değişebilmektedir. Birikimli olarak ilerleyen bu değişimlere sahip olan hücrelerin bölünmesiyle saldırgan hücre

popülasyonu sayısı saldırgan olmayanların sayısını geçerek tümör heterojenitesine katkıda bulunur (Şekil 1.2) (Islam vd., 2019).



Şekil 1.2: Kanser Modelleri (Prieto-Vila vd., 2017b)

### 1.1.1.2. Kanser Kök Hücreleri (KKH) Modeli

Stokastik modelden farklı olarak KKH modeli, azınlık olarak bulunan bir alt-popülasyon hücre grubunun kendilerini yenileme ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilmesine dayanır. Bu modele göre kanser, kanser başlangıcından, ilerlemesinden, metastazından, ilaç direncinden ve kanser nüksetmesinden sorumlu kanser kök hücreleri popülasyonlarına göre hiyerarşik olarak organize bir durumdadır. KKH modeli, sonradan kazanılan terapi direncini ve hastalık ilerlemesini açıklamak adına tutarlı bir konsept sunar; çünkü kemoradyoterapi dirençli kök hücrelerin geleneksel kemoradyoterapi tedavisinden kaçarak hastalığı tekrar ilerlettikleri düşünülmektedir (Rich, 2016).

Kanser kök hücreleri (KKH'ler), meme, beyin, prostat, kolorektal, baş-boyun, akciğer, yumurtalık, melanom dahil olmak üzere çeşitli solid tümörlerde keşfedilmiştir ve tümör kütleleri içerisinde dikkate değer bir alt popülasyon olarak kabul edilmektedir. KKH'ler kemoterapilere karşı dirençli oldukları da bilinmektedir. Kanseri başlatan ve oluşumunu devam ettiren bir haberleşme sistemleri ile hücreler arasında bir sinyal ağı

oluştururlar. Bu sayede geliştirdikleri tümör mikroçevresi kanserin oluşumu ve devamı için sağlam bir altyapı sağlamaktadır (Prieto-Vila, Takahashi, Usuba, Kohama, & Ochiya, 2017a).

### 1.1.2.Kanser Kök Hücrelerinde İlaç Direnci

Klinik ilaç direnci, sadece bir ilaca karşı olan direnci ifade etmeyebilip, genellikle birden fazla ilaca karşı geliştirilen direnci ifade etmektedir. Bu fenomene çoklu ilaç direnci (MDR) denilmektedir. Kazanılmış ve içsel direnç olmak üzere iki tip ilaç direnci bulunmakta olup, kanser kök hücreleri radyasyon ve kemoterapiye karşı, farklılaşmış hücrelerden daha çok direnç göstermektedirler. Epitel-mezenkimal dönüşüm, kök hücre sinyal yollarını aktive ederek KKH karakteristiklerini indükler ve çoklu ilaç direncine sebep olur. Toksik kimyasalları hücreden atabilme özellikleri sayesinde ABC transporterları da çoklu ilaç direnci gelişiminde rol oynarlar (Jiang, Sun, Wang, & Ruan, 2017; Prieto-Vila vd., 2017b).

Bir diğer önemli faktör ise hipoksidir. Hipoksi-indüklenebilir faktör alfa(HIFalfa), düşük oksijen seviyesine yanıt olarak, hipoksi-indüklenebilir faktör b ile dimerize olduğu çekirdeğe gider. Burada anjiyogenezi başlatan hipoksi cevap elementlerinin transkripsiyonunu başlatır. Ancak HIFalfa aktivasyonu aynı zamanda EMT ve kök hücre yollarını da aktive eder. Düşük oksijen ve besin sebebiyle hücreler pasif evreye geçerler. HIFalfa yolağı sebebiyle üretimi düşen aktif oksijen türlerinin (ROS) normal hücrelerde ve KKH olmayan kanser hücrelerinde birikmesi apoptozisi indükler. Düşük ROS üretimi de kök hücre özelliklerinin sürdürülmesi ve pasifliği tetiklemesi ile çoklu ilaç direncine sebep olur (Prieto-Vila vd., 2017b; Van Der Jeught, Xu, Li, Lu, & Ji, 2018).

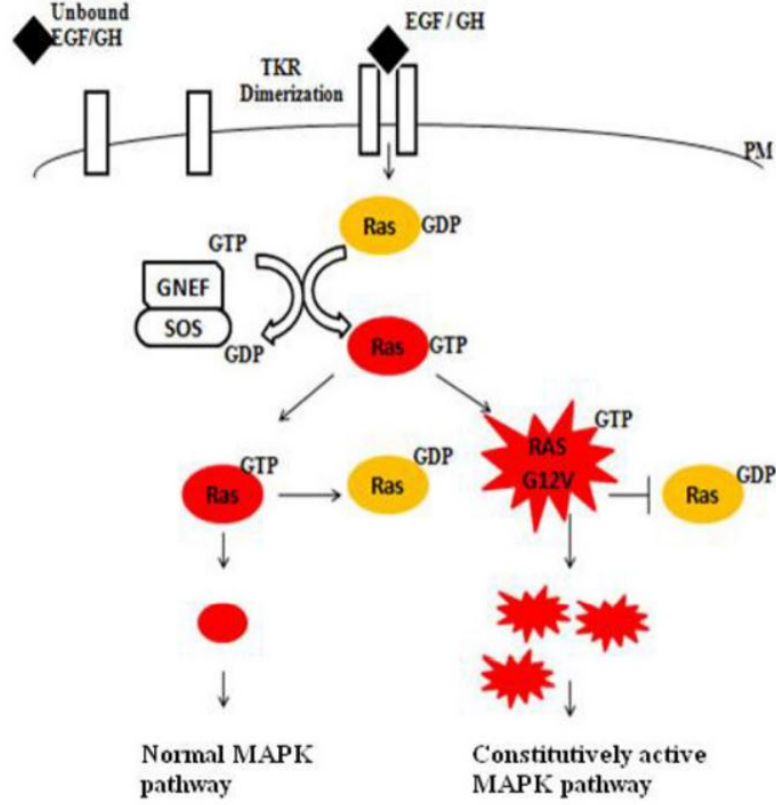
### 1.1.3.Karsinogenezde Etkili Olan Genler

#### 1.1.3.1.Onkogenler ve Proto-onkogenler

Onkogenler kanser ile ilişkisi olduğu keşfedilen ilk gen sınıfıdır (Gryfe vd., 1997a). Kanseri tetikleme yeteneği olan herhangi bir gen onkogen olarak adlandırılmaktadır. Bilinen pek çok onkogen arasından birkaçı hariç neredeyse tümü,

ürünleri hücre büyümesi veya farklılaşmasını kontrol eden yollara katılan genlerden türemiştir. Bu genlere proto-onkogen denilmektedir. Bir proto-onkogenin onkogene dönüşmesi nokta mutasyonları (K-ras), gen amplifikasyonları (c-myc) ve kromozom translokasyonları (bcr/abl) sebebiyle gerçekleşebilir (Shortt & Johnstone, 2012). Onkogenlerin ilk keşfi retrovirüsler üzerinden yapılmış olsa da insan kanserlerinin yüzde sekseni viral kökenli olmayıp, radsayon ve kimyasal karsinojenler gibi sebeplerden kaynaklanmaktadır. Viral onkogenler ilk olarak, tavuk embriyonik fibroblastlarını transforme ederek sarkoma oluşumunu tetikleyen, RSV'de (Rous Sarkoma Virus) tespit edilmiştir (Prakash, Bardot, & Cole, 2007).

İnsanlarda keşfedilen ilk onkogen Ras sinyal iletim proteininin yapısal olarak aktif bir formu (Ras<sup>D</sup>) olup, mesane karsinom hücrelerinden izole edilmiştir. H-ras, N-ras, or K-ras genlerinin onkojenik mutasyonları, hücrelerin normal sinyal iletim yollarının işlevlerini bozarak tümör oluşumuna sebep olmaktadır (Fernández-Medarde & Santos, 2011). Ras onkogenleri insan kanserlerinin yüzde on beşinde, kolorektal kanserlerin ise yaklaşık yüzde ellisinde bulunmaktadır. Ras, küçük G proteinleri ailesinin bir üyesi olup mitojen aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağının regülatörüdür. Ras proteinin iki ayrı konformasyonu olan GTP-bağlı aktif ve GDP-bağlı inaktif formları, sinyal yollarında moleküler şalter olarak rol almaktadırlar. Ras guanin nükleotit değişim faktörleri (Ras guanine nucleotide exchange factors - GEFs) ve Ras GTPaz aktive edici proteinler (GAP), iki form arasındaki dönüşümü düzenlemektedirler. GEF proteinleri, GDP'nin GTP ile değiştirilmesini tetiklerken; GAP proteinleri, içsel Ras GTPaz aktivitesini artırarak Ras inaktivasyonunu sağlarlar (Calvisi vd., 2011). RAS geninin birinci ekzonunda gerçekleşen G12V nokta mutasyonu, Ras proteinin aktif durumda sabitlenmesine sebep olarak MAPK yolağının kalıcı aktivasyonu ile sonuçlanır (Şekil 1.3) (Rajasekharan & Raman, 2013). Üç insan Ras geni olan KRAS, NRAS ve BRAF kolon kanseri vakalarının yüzde 45'inde en sık mutasyona uğrayan onkogenlerdir (Porru, Pompili, Caruso, Biroccio, & Leonetti, 2018).



Şekil 1.3: MAPK yolağının G12V RAS mutasyonu ile kalıcı aktivasyonu (Rajasekharan & Raman, 2013)

Adenomatozis polipozis koli (APC), APC geni tarafından kodlanan bir protein olup, germ mutasyonları nadir bir otozomal dominant hastalık olan FAP'a (Familiyal Adenomatozis Polipozis) yol açar. FAP'a yol açan binden fazla APC mutasyonu tespit edilmiştir. Diğer taraftan sporadik kanser vakalarındaki kromozom 5q kaybı sebebiyle incelemeye alınan APC geninin mutasyonları sporadik kanserlerin büyük bir çoğunluğunda tespit edilmiştir. FAP hastalarında APC geninin germ mutasyonunu takiben, diğer allelin somatik mutasyonu veya delesyonu olmaktadır. Sporadik tümörlerde ise iki allelin de inaktivasyonu gözlenmiştir. Normal bireylerde APC tümör baskılayıcı geni Wnt sinyal yolağında beta-katenini degrade ederek önemli bir regülör rol oynamaktadır. Beta katenin, proliferasyon genleri için transkripsiyon faktörü olarak rol alır. Onkogenik protein beta-kateninin birikmesi APC gen ürünü tarafından engellenir ve bağırsak epitel hücrelerinin proliferasyonu bu sayede kontrol altına alınır. APC geni mutasyonları fonksiyon kaybına yol açarak beta-katenin birikmesine ve kansere yol açar (Bogaert & Prenen, 2014; Gryfe vd., 1997b).

### 1.1.3.2. Tumor Baskılayıcı Genler

Tumor baskılayıcı genler, normal fonksiyonları olarak hücre bölünmesini baskılayan genlerdir. Bu genlerin delesyonu veya inaktivasyonu, hücrenin negatif regülatörlerini ortadan kaldırarak anormal hücre bölünmesine ve tumor oluşumuna sebep olmaktadır. Bu genlerin iki kopyasının da inaktive olması, koruyucu özelliklerinin ortadan kalkmasına ve hücrelerin transformasyona yatkın hale gelmesine sebep olur. Tumor baskılayıcı genlerin germ hücrelerindeki mutasyonları ise kalıtsal kanser yatkınlığına sebep olur ve yatkın olan bireylerin ikinci kopyasının da somatik mutasyonlarla inaktif hale gelmesi kanser riskini artırır (Caldas & Venkitaraman, 2001).

Genel olarak hücre fonksiyonlarına göre ayrılmış iki sınıf tumor baskılayıcı gen ürünü bulunmaktadır. Hücresel proliferasyonu, hücre ölümünü ve ömrünü doğrudan belirleyen genlere “bekçi” tipi denilmektedir. Bunlara örnek olarak Rb ve APC genleri verilebilir (Caldas & Venkitaraman, 2001; Çefle, y.y.). Buna karşın “bakıcı” genlerin mutasyonu karsinogeneze dolaylı olarak sebep olur. Bakıcı genlerin inaktivasyonu, normal işlevleri olan genom bütünlüğünün sağlanmasını engeller ve genomun instabilitesini artırarak mutasyon hızında artışa sebep olur. Artan mutasyon oranı ise bekçi genlerde somatik mutasyonlara sebep olarak karsinogeneze artışa sebep olur. Kanser duyarlılık genlerinden olan BRCA1 ve BRCA2 genleri, DNA tamir mekanizmalarından sorumlu olup, mutasyonları göğüs kanseri riskini artırmaktadır (Caldas & Venkitaraman, 2001; Çefle, y.y.).

Retinoblastoma tumor baskılayıcı geni (Rb1), hücre döngüsünün ana regülatörlerinden olup, insan kanserlerinin çoğunda inaktivedir. Klonlanan ilk tumor baskılayıcı genidir. Mutasyonel inaktivasyonu pediatrik kanser olan retinoblastomaya sebep olurken, görev aldığı yolağın deregulasyonu diğer kanser tiplerinde oldukça yaygındır (Goodrich, 2006). Hücre döngüsü üzerindeki etkisini, E2F transkripsiyon faktörüne bağlanıp, S fazı için gerekli olan genleri baskılayarak gösterir. Mitojenik uyarıya tepki olarak siklin bağımlı kinazlar (CDK4, CDK6, CDK2) aktifleşir ve Rb’yi fosforile ederler. Hiper-fosforile Rb E2F’den ayrılarak transkripsiyonel ko-regülatörlere bağlanmasına izin verir. Böylece transkripsiyonel baskılama ortadan kalkar ve hücre döngüsü devam eder (Vélez-Cruz & Johnson, 2017). Hücre döngüsü

düzenlenmesine ek olarak, Rb ve E2F'nin apoptozis ve farklılaşmada da önemli roller üstlendikleri tespit edilmiştir (Du & Pogoriler, 2006).

Tp53 (Tümör protein 53) hücre döngüsünü düzenleyen ve pro-apoptotik fonksiyona sahip bir transkripsiyon faktörüdür. İnsan kanserlerinin yüzde elliden fazlası p53 geninde fonksiyon kaybı mutasyonlarına sahiptir. Mutant p53 geni, doğal p53'e dominant-negatif etki yapmaktadır. DNA hasarına yanıt olarak indüklenen p53, hücre döngüsünün G1 fazında durdurulmasını, eğer DNA hasarı tamiri mümkün değilse apoptozise girilmesini sağlar. Normal şartlarda p53 geni oldukça az ifade edilmektedir. Bunun sebebi ise onkoprotein olan MDM2 tarafından kontrol edilen proteosomal yıkımdır. p53'ün transaktivasyon domainine bağlanan MDM2 negatif regulasyonu sağlar (Gryfe vd., 1997b).

## 1.2.KOLON KANSERİ VE EPİDEMİYOLOJİSİ

2004-2006 Türkiye Sağlık Bakanlığı kanser istatistiklerine göre, Türkiye'de 100,000 insandan erkeklerde 17.0, kadınlarda 11.7 oranında bir görülme sıklığına sahiptir. Toplamda 7218 (4102 erkek, 3116 kadın) kişinin kolon kanseri olduğu tahmin edilmektedir (Aykan vd., 2015). Kolon kanseri popülasyonlar arasında farklılıklara sahip bir kanser türüdür. Bir popülasyondaki farklı hayat şartları bile, kolon kanserinin prognozunu farklı kılabilir. Etnik ve ırk farklılıkları farklı genetik alt yapıları yüzünden kişilerin hastalığa karşı duruşunda önemli bir rol oynar (Aykan vd., 2015). Bundan dolayı popülasyon spesifik datalar bu kanser tiplerinin korunmasında, tanısında ve tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Türkiye'de ise bu epidemiyolojik data profilleri henüz oluşturulmamıştır. Bu konu hakkında çeşitli çalışmalar günümüzde devam etmektedir.

### 1.2.1.Kolon Kanserine Sebep Olan Faktörler

Dünya çapında birçok bireysel özellikler veya alışkanlıklar, polip veya kolorektal kanser geliştirme şansını arttırdığından risk faktörü olarak kabul edilir (Marley & Nan, 2016).

Kolorektal kanser için ana risk faktörünün yaş olduğunu söyleyebiliriz. 50 yaşın altında kolorektal kanserin başlangıcı (genetik kanserler dışında) nadirdir. Yaşa ek olarak, başka doğal risk faktörleri vardır. Kişisel bir kolorektal kanser veya iltihaplı bağırsak hastalığı öyküsü (İBH) - ülseratif kolitli hastalarda risk % 3.7 artarken, kolorektal kanser gelişimi için de önemli bir risktir (Mármol, Sánchez-de-Diego, Pradilla Dieste, Cerrada, & Rodriguez Yoldi, 2017). İBH'da bulunan kronik inflamasyon; sıklıkla displazi olarak bilinen anormal bir hücre büyümesini oluşturur. Displastik hücreler henüz habis olmasa da anaplastik olma ve bir tümör haline gelme şansı daha yüksektir (Kim vd., 2011). Bu gruba dahil edilebilecek diğer bir risk faktörü, akrabalarda, özellikle tanıdaki elli yaşın altındaki akrabalarda ailesel KK öyküsünün varlığıdır. Ailesel geçmişe bağlı olarak artmış bir risk kalıtsal mutasyonlardan veya çevreden kaynaklanabilir (Johns & Houlston, 2001).

#### *1.2.1.1. Genetik Faktörler*

Genomik instabilite, kolorektal kanserin altında yatan önemli bir özelliktir. Bu duruma yol açan 3 ana mekanizma vardır. Bunlar; kromozomal instabilite (KİN), mikrosatellit instabilitesi (MSI) ve CpG ada metilat fenotipi (CIMP) olarak adlandırılır (Little, Vineis, & Li, 2008).

Tüm KK vakalarının % 80-85'inde görülen kromozom instabilitesi kromozom sayısındaki dengesizliklerle karakterizedir (Grady & Carethers, 2008). Bu genetik sorun heterosigozite kaybı veya aneuploidy tümörlere yol açar. KİN'nin temelini oluşturan mekanizmalar arasında; APC, KRAS, PI3K ve TP53 gibi hücre çoğalma ve büyüme gibi fonksiyonunun korunmasında rol oynayan kritik genler, kromozom ayrımı, telomer disfonksiyonu ve DNA hasar yanıtı değişiklikleri yer alır. APC mutasyonları, β-katenin'in çekirdeğe translokasyonuna neden olur ve tümörojenez ve yayılmada yer alan genlerin transkripsiyonunu başlatırken, KRAS ve PI3K'daki mutasyonlar, MAP kinazının sürekli bir aktivasyonuna yol açar ve böylece hücre proliferasyonunu artırır. Son olarak, ana hücre döngüsü kontrol noktası olan p53'ü şifreleyen TP53'teki fonksiyon kaybı mutasyonları, hücre döngüsünde kontrolsüz bir çoğalmaya neden olur (Al-Shamsi vd., 2016).



Mikrosatellit kararsızlık yolağı, DNA tamir mekanizmalarının kaybına bağılı olarak hipermik bir fenotipten kaynaklanır. Kısa DNA zincirlerini veya tandem tekrarlarını (iki ila beş baz çifti tekrarı) onarma yeteneğı, mikro uydu kararsızlığı olan tümörlerde azalır; bu nedenle, mutasyonlar bu bölgelerde birikme eğilimindedir. Bu mutasyonlar, kodlamayan bölgeleri ve ayrıca mikrosatellitleri kodlayabilir, ve mikrosatellitlerde kodlanmış onkogenler veya tümör baskılayıcı genlerin çerçevelerini okurken tümörler gelişir. Yanlış eşleşme onarım genlerinin (MMR) ekspresyonunun kaybı, spontan olaylar (promotör hipermetilasyonu) veya Lynch sendromunda bulunanlar gibi germinal mutasyonlardan kaynaklanabilir. Bu tümörler çoğunlukla diploiddir ve daha az LOH barındırır. Mikrosatellit kararsızlığı olan tümörlerde mutasyona uğrayan genler arasında MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 ve PMS2 bulunur (Boland & Goel, 2010). Genel olarak MSI tümörleri sporadik tümörlerden daha iyi prognoza sahiptir (Umar vd., 2004).

CpG ada metilat fenotipinden sorumlu olan epigenetik kararsızlık, CRC'de başka bir yaygın özelliktir. CIMP tümörlerinin temel özelliğı, genetik susturma ve protein ekspresyonu kaybına yol açan onkojen promotörlerinin hipermetilasyonudur. Genetik ve epigenetikler kolorektal kanserde münhasır değildir ve her ikisi de gelişiminde işbirliğı yapar ve çoğu zaman nokta mutasyonlarının bulunmasından daha fazla metilasyon olayı ile birlikte çalışır (Lao & Grady, 2011). Kolorektal kanser gelişim sürecinde genetik ve epigenetiğın birleşik etkisinin bir örneğı, birçok CIMP tümöründe BRAF mutasyonlarının yanı sıra mikrosatellit kararsızlığının varlığıdır (Weisenberger vd., 2006)

#### *1.2.1.2.Çevresel Faktörler*

Pek çok çalışma, “Batılı yaşam tarzını” yaşamaya yönelik kolorektal kanser geliştirme riskini arttırmıştır (Johns & Houlston, 2001). Bu terim obezite, hareketsiz davranış, etli ağırlıklı beslenme, yüksek kalorili, yağ bakımından zengin, lifsiz bir belenmeyi kapsar ve kolorektal kanser riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Bastide, Pierre, & Corpet, 2011). İlk olarak diyet yağını kolon kanseri kanseri riskine bağlayan temel çalışma 1969'da Ernst Wynder ve iş arkadaşlarının öncülüğünde yapıldı. Sosyoekonomik durumu yüksek Japon bireylerinin, muhtemelen Batılılaşmış diyetleri nedeniyle, daha az refah sahibi olanlardan daha fazla kolon kanseri geliştirme

ihtimalinin daha yüksek olduğunu keşfettiler. Daha sonra ilk olarak diyet yağının bakteriyel flora üzerindeki etkisiyle kolon kanseri patogenezi üzerinde bir etkisi olduğu varsayılmıştır (Santarelli, Pierre, & Corpet, 2008). Bu hipotezden yola çıkarak daha sonra araştırmacılar, yüksek yağlı diyetlerin deoksikolik asit ve litokolik asit oluşumuyla karsinojenezi desteklediğini teori haline getirdi. Yüksek yağ alımı, karaciğerdeki safra asitlerinin üretimini uyarır; bu kolondaki anaerobik bakterilerle temas ettikten sonra, bu bileşikleri oluşturmak için dehidrojenize edilir (Seitz, 2004).

Alkol tüketimi ve tütün içmek de kolorektal kanser için riskleri artırır. 2007'de, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), alkolün kolorektal kanser için nedensel bir faktör olduğunu ortaya koymak için yeterli kanıt olduğunu ortaya koymuştur (Botteri vd., 2008). Araştırma o zamandan beri, ara sıra içmeyenlere göre, günde en az 4 içki tüketen kişilerin bu hastalığın gelişimi için % 52 oranında artmış risk altında olduğunu ortaya koymuştur (Botteri vd., 2008). Mekanik olarak, bu kanserojen işlem, alkolün folat sentezi üzerindeki etkisini yansıtabilir. Spesifik olarak, kolona giren alkol, folatı in vivo olarak parçalayan asetaldehit içine mikrobik olarak metabolize edilir (Cross vd., 2014). Folat, DNA sentezi ve onarımı için gerekli olduğu için, folat eksikliği, kromozom kırılmasına, urasil yanlış yerleşmesine ve tümü kanserojenize katkıda bulunabilecek diğer DNA prekürsör dengesizliklerine yol açabilir (Liang, Chen, & Giovannucci, 2009). Sigara içmeyle ilgili olarak, araştırmalar, tütün dumanının kolorektal kanser insidansını ve mortalitesini önemli ölçüde arttırdığını ve kolorektal adenoma gelişme riskinde iki ila üç kat artışla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Grady & Carethers, 2008). Bu, gastrointestinal sistem ve dolaşım sisteminin sigara kanserojenlerini kolorektal mukozaya yayma, iltihaplanma, mutajenez ve karsinojeniz riskini artırarak kabiliyetinden kaynaklanmaktadır (Seitz, 2004).

Yukarıdaki çevresel risk faktörlerine ek olarak, yüksek kan düzeyleri insülin, gastrointestinal inflamasyon ve bazı et pişirme yöntemleri de kolorektal karsinojeniz riskini artırabilir (Seitz, 2004). Hiperinsülinemi, kolon hücresi çoğalmasının desteklenmesi ve apoptozis azalması ile kolorektal kanser riskini artırır (Boland & Goel, 2010). Gastrointestinal inflamasyon ve kolorektal kanser ile ilgili olarak, araştırmalar ülseratif kolit ve kolorektal karsinogenez arasında bir bağlantı olduğunu ortaya koydu. Kanıtlar, tüm kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %1'inin ülseratif

kolit ile ilişkili kronik enflamasyondan kaynaklandığını ve kanser gelişimi riskinin bir hastanın enflamatuvar duruma katlandığı zamanla doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir (Lao & Grady, 2011). Benzer şekilde, bağırsak iltihabı ile belirginleşen Crohn hastalığının, ülseratif kolitle aynı derecede olmasa da kolorektal kanser riskini arttırdığı gösterilmiştir (Seitz, 2004). Ek olarak, bazı et pişirme yöntemleri de kolorektal kanser geliştirme riskini artırabilir. Çalışmalar, kızartma, kaynatma, odun kömürü kızartması veya etin çok yüksek sıcaklıklarda pişirildiği diğer yöntemlerle, mutajenik heterosiklik aminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonların oluşabileceğini göstermiştir. Kolon (Brocardo & Henderson, 2008; Seitz, 2004). Bu mutajenler, endişenin tek nedeni olmayabilir, çünkü daha fazla araştırma, kinoksalin ve piridin gibi diğer bileşiklerin de kolorektal kanser riskini, özellikle de distal adenomları artırabileceğini ileri sürdüğünü göstermiştir (The Cancer Genome Atlas Network vd., 2012).

Bununla birlikte, tüm bu risk faktörlerine doğrudan muhalif olarak, birkaç çevresel faktör aslında kolorektal kanser geliştirme riskini azaltır. Bu koruyucu faktörlerden biri, sadece kolonik tümörlerin tanıtımını boğmadığı ve aynı zamanda bu tümörlerin insidansını azalttığı gösterilen balık ve balık yağı alımıdır (Brocardo & Henderson, 2008). Aslında, balık tüketimi o kadar güçlü olabilir ki bir çalışma, tipik olarak yüksek miktarda diğer et ve hayvansal yağ tüketen Avrupa popülasyonlarında bile kolorektal karsinogenlere karşı korunma kanıtlarını belgelemiştir (Herzig & Tsikitis, 2015).

Kolorektal kansere karşı bir diğer koruyucu faktör, yüksek miktarda diyet lifi alımıdır. 1971'de Denis Burkitt, ilk önce lif tüketimini kolorektal kansere karşı korumaya bağlayan dönüm noktası çalışmasını gerçekleştirdi. Kolorektal kanserin ve diğer bulaşıcı olmayan bağırsak hastalıklarının, oldukça lifli bir diyetle hayatta kalan topluluklarda oldukça nadir olduğunu, ancak düşük lifli diyetlerin baskın olduğu ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde yaygın olduğunu gözlemledi (Rennoll, 2015). Burkitt daha sonra, yeterli diyet lifine sahip olmayan bir yaşam tarzının, muhtemelen bakteriyel florada anormal kanserojen değişiklikler nedeniyle, ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde görülen artmış kolorektal kanser insidansı için nedensel bir faktör olabileceğini varsaymıştır (Rennoll, 2015).

Kolorektal kansere karşı koruma sağladığı belgelenen diğer faktörler şunlardır: yüksek D vitamini alımı, yüksek kalsiyum alımı, alışılmış fiziksel egzersiz ve düzenli aspirin kullanımı. Kanıtlar, 1000 IU / gün D vitamini almanın kolorektal kanser riskini% 50 azaltabileceğini ve 1250 mg / gün kalsiyum alımının kolorektal kanser riskini önemli ölçüde azaltabileceğini göstermektedir (Toon vd., 2014). Mekanik olarak, kalsiyum kolonik epitel proliferasyonunu yavaşlatarak ve safra asitlerini nötralize ederek bu korumayı sağlar (Toon vd., 2014). Fiziksel aktivitenin yararları ile ilgili olarak, çalışmalar tanıdan önceki ve sonraki egzersizlerin artmış mortalite ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Chen vd., 2014). Bu çalışmalardan biri, düzenli fiziksel egzersizin kolorektal kanser riskini neredeyse% 25 azaltabildiğini özellikle bulmuştur (W. Li vd., 2015). Başka bir çalışma düzenli olarak aspirin kullananların (haftada en az iki kez) kolorektal kanser riskini daha az kullananlara göre daha düşük olduğunu göstermiştir. Bu etkinin altında yatan hipotez mekanizması, aspirinin kolorektal kanserojen inflamasyon ve hücre proliferasyon süreçlerini uyaran bir enzim olan siklooksijenaz-2'yi inhibe etme kabiliyetidir (Ogino vd., 2009).

### **1.2.2.Kolorektal Kanserin Histopatolojik Teşhisi**

Patolojik teşhis süreci, mikrosatellit instabilitesine işaret eden tümörlerin histolojik analizinde; MSI testi, KRAS ve BRAF mutasyon analizi için uygun doku seçiminde ve bu önemli terapötik ve prognostik testlerin sonuçlarını yorumlamada merkezi bir rol oynamaktadır (Wang, Lopategui, Amin, & Patterson, 2010).

Kolorektal kanserlerin yüzde doksanından fazlası kolorektal mukozanın epitel hücrelerinden oluşan adenokarsinomlardır. Nöroendokrin, skuamöz, adenoskuamöz, iğsi hücre ve farklılaşmamış kolorektal kanser tipleri ise daha nadir olan diğer tiplerdir. Konvansiyonel adenokarsinom, beze oluşumu ile karakterize olmaktadır. Beze oluşumu, tümör sınıflandırmasının temeli olup, yeterince farklılaşmış adenokarsinomların yüzde doksan beşinden fazlasında beze oluşumu gözlenmektedir. Bu oran kısmen farklılaşmış adenokarsinomlarda yüzde elli ile doksan beş arasındayken, az farklılaşmışlarda yüzde elliden azdır (Fleming, Ravula, Tatishchev, & Wang, 2012).

### 1.3.KOLOREKTAL KANSERDE TEDAVİ YÖNTEMLERİ

CRC hastaları için birinci basamak tedavi yöntem, söz konusu tümörün karakteristik özellikleri, tümör sayısı, metastaz lokalizasyonu, ilerleyişi, biyo-belirteçlerin varlıkları ya da yokluklukları, ile belirlenir. Tüm bu özellikler hastaların dört farklı risk grubundan birinde sınıflandırılmasına olanak verir. Grup 0 hastalar, metastazı olmayan veya rezektabl karaciğer ve akciğer metastazına sahip hastalardan oluşur. Bu durumda tavsiye edilen tedavi şekli cerrahi rezeksiyon olup kemoterapinin bu grubun genel sağ kalımında büyük bir avantaj sağladığı tespit edilmemiştir. Grup 1 hastalar potansiyel olarak rezektabl metastaza sahiplerdir. İlk olarak metastaz sayısını ve boyutunu düşürmek için indüksiyon kemoterapisiyle tedavi edilirler. Tavsiye edilen kemoterapi, sitotoksik dublet veya tripletlerden oluşur. KRAS doğal tip tümörlerde anti-VEGF veya anti-EGFR stratejiler izlenebilir. Grup 2 hastalar yayılmış ve rezektabl olmayan kansere sahip hastalardan oluşur. Grup 1 hastalarda olduğu gibi ilk uygulanacak tedavi, metastazı azaltmaya yönelik olmalıdır. Grup 3 rezektabl olmayan hastalığa sahip hastalardan oluşur (Mármol, Sánchez-de-Diego, Dieste, Cerrada, & Yoldi, 2017).

1950'lerden bu yana 5-floroaçil (5-FU) merkezli kemoterapi yaygın olarak kullanılmaktadır. Oxaliplatin, Irinotecan gibi kemoterapi ilaçlarının 5-FU ve lökoverin (LV) ile kombine edilmesinden oluşan FOLFOX, CAPOX ve FOLFIRI gibi ilaçların kullanımı konvansiyonel tedavi yöntemini oluşturur. Bevacizumab ve Cetuximab gibi monoklonal antikolar da kullanılmakta olmasına rağmen; metastatik kolorektal kanser vakalarında beş yıllık kurtulma oranı halen yüzde on iki civarındadır. Bunun en büyük sebeplerinden birisi ilaç direncinin gelişmesi olup metastatik CRC hastalarının neredeyse yarısı 5-FU merkezli kemoterapiye dirençlidir (Mármol, Sánchez-de-Diego, Dieste, vd., 2017; Van Der Jeught vd., 2018; Wolpin & Mayer, 2008).

Monoklonal antikor kullanımını kapsayan hedefe yönelik tedaviler, kemoterapinin ardından uygulanan etkili tedavilerdir. Kemoterapiye kıyasla daha az yan etkiye sahiplerdir. Bevacizumab ilk anti-anjiyogenik ilaç olup endotel büyüme faktörünü (VEGF) hedef almaktadır. Ancak metastatik hastalarda gözlemlendiği üzere ilaca karşı direnç, yalnızca aylar içerisinde kazanılmaktadır. Hepatosit büyüme faktörünün (HGF) azalması anti-VEGF terapisine kazanılan dirençle doğru orantılı

olmaktadır. Diğer hedefe yönelik antikör içeren ilaçlar, Cetuximab ve Panitumumab denilen epidermal büyüme faktörü (EGFR) hedefli ilaçlardır. Bu ilaçların inhibe ettiği aşağı yollar, proliferasyonun engellenmesine ve apoptozun indüklenmesini sağlar. KRAS ve NRAS mutasyonlarına sahip hastaların, anti-EGFR terapisine karşı görece daha dirençli oldukları bilinmektedir. Hem anti-VEGF, hem de anti-EGFR tedavilerinde gözlenen ilaç direnci mekanizmalarının araştırılması ve potansiyel inhibitörler üzerinde çalışılması gerekmektedir (Mármol, Sánchez-de-Diego, Dieste, vd., 2017; Van Der Jeught vd., 2018; Wolpin & Mayer, 2008).

### 1.3.1. Anjiyogenezin Durdurulması

Yeni bir kan damarı oluşum süreci olan anjiyogenez, çoğalmakta olan tümöre oksijen ve besin sağlamak için tümör büyümesinin ön şartıdır. Anjiyojenik süreç, tümörün ilerlemesine, yayılmasına ve metastazına katkıda bulunabilir ve genel olarak tümör prognozunun bir göstergesi olarak kabul edilir (El-Kenawi & El-Remessy, 2013a). Bu nedenle, tümör anjiyogenezinin hedeflenmesi klinik olarak anlamlılık kazanmıştır.

Tümör anjiyogenezini içeren neovaskülarizasyon temel olarak dört aşamalı bir işlemdir. İlk olarak, dokulardaki bazal membran lokal olarak yaralanmıştır. Derhal imha ve hipoksi var. İkincisi, anjiyojenik faktörler tarafından aktive edilen endotel hücreleri göç eder. Üçüncüsü, endotel hücreleri çoğalır ve stabilize olur. Dördüncü olarak, anjiyojenik faktörler anjiyojenik süreci etkilemeye devam etmektedir. Vasküler endotel hücreleri ortalama olarak her 1000 günde bir bölünürler (Denekamp, 1993). Anjiyogenez, tümör dokuları besin ve oksijen gerektirdiğinde uyarılır. Anjiyogenez, hem aktivatör hem de inhibitör molekülleri tarafından düzenlenir. Bununla birlikte, anjiyojenik faktörlerin aktivitesinin düzenlenmesi, neoplazmanın anjiyojenizi için yeterli değildir. Negatif regülatörlerin veya damar büyümesi inhibitörlerinin de aşağı regüle edilmesi gerekir (Şekil 1) (Dameron, Volpert, Tainsky, & Bouck, 1994)

Anjiyogenez inhibitörleri, büyüyen vaskülatürdeki endotel hücrelerini hedef alan doğrudan inhibitörler veya anjiyojeniz indükleyicilerin ekspresyonunu önleyen veya aktivitesini bloke eden dolaylı inhibitörler olarak sınıflandırılır. İkinci sınıf, onkojenlere, geleneksel kemoterapötik ajanlara ve tümör mikro-ortamının diğer

hücrelerini hedef alan ilaçlara karşı hedefe yönelik tedaviyi içerecek şekilde uzanır. Anjiyogenez inhibitörleri, monoterapi olarak veya diğer antikanser ilaçları ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Bu bağlamda, birçok prelinik ve klinik çalışma, bireysel tedavilere kıyasla kombine tedavilerin daha yüksek terapötik etkinliğini ortaya koydu. Anjiyogenez inhibitörlerinin sinerjistik tedavi yöntemlerinin yanı sıra geniş hücresel hedeflerinin doğru anlaşılması, birçok kanser türünün gelecekteki tedavileri için etkili araçlar sağlayabilir (El-Kenawi & El-Remessy, 2013b).

#### 1.4.KOLON KANSERİ MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Kolorektal kanser vakalarının yaklaşık yüzde doksanı sporadik olup, ailenin genetiğinden bağımsızdır. Genellikle herhangi bir genetik yatkınlık görülmezken, yüzde ondan daha az vakada genetik bağlantı tespit edilmiştir. Yaşa bağlı tümör insidansının matematiksel modellenmesi, invaziv kolorektal kanser fenotipi gözlenmeden önce en az beş veya altı somatik genetik olayın gerçekleşmesi gerektiğini göstermektedir. Belirli bir hücrede proliferatif avantaj sağlayarak kolorektal kansere ve diğer kanserlere yol açan değişiklikler, proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genlerinde meydana gelir .

##### 1.4.1.Apoptozis

Apoptozis terimi Yunanca'dan türemiş olup "ayrılarak düşmek" anlamına gelmektedir. Programlanmış hücre ölümünün ana tiplerinden biri olup, nekrozdan farklı olarak bir hücrenin belirli uyarılar alındığında aktif olarak ölüm yolunda ilerlemekte olduğu durumu ifade etmek için kullanılır. Keşfinden bu yana biyolojinin en çok araştırılan konularından olup, hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde önemli bir süreçtir. Embriyonik gelişim sırasındaki programlanmış hücre ölümü, örneğin parmaklar arasındaki boşlukların oluşabilmesi için buralardaki hücrelerin ölümü, bağırsak epitelindeki hücrelerin yenilenmesi için normal yıkımları gibi süreçler fizyolojik örneklerken; sitotoksik T hücreleri tarafından tetiklenen hücre ölümleri, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi dejeneratif hastalıklardaki hücre ölümleri, miyokard enfarktüsü gibi kalp hastalıklarında meydana gelen hücre ölümleri, hepatit

B veya C gibi virüsler tarafından tetiklenen hücre ölümleri patolojik süreçlere örnektir (Wong, 2011).

#### *1.4.1.1. Apoptozisde Gözlenen Morfolojik Değişiklikler*

Apoptoz, çeşitli morfolojik değişimler ile karakterize olur ve nekrozisden ayrılır. Hücre membranı nekrozisden farklı olarak yırtılmayıp bütünlüğü korunmasına rağmen tomurcuklanmalar oluşur. Nekrozisde ise membran yırtıldığı için sitoplazmik materyal hücreler arasına geçerek inflamasyonu başlatır. Laminin ve aktin filamentleri kesildiği için sitoplazma daha kondanse bir hale gelir ve hücre küçülür. Organeller sağlam kalmasına rağmen, mitokondri, ribozom, çekirdek parçaları ve diğer organelleri içeren apoptotik cisimler oluşur. Çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin parçalanması ile kromatin, nüklear membranın altına toplanarak yoğunlaşır. Hücrenin komşu hücreler ile bağlantısı kesilir ve yuvarlaklaşır. Genellikle makrofajlar gibi fagositik hücreler apoptotik cisimler meydana gelmeden önce apoptotik hücreleri yutarlar. Bu sebepten ötürü apoptoz hücre biyolojisinin geç keşfedilen konularından olmuştur (Dinçel & Kul, 2016; Özay GÜLEŞ, 2008; Wong, 2011).

#### *1.4.1.2. Apoptozisde Gözlenen Biyokimyasal Değişiklikler*

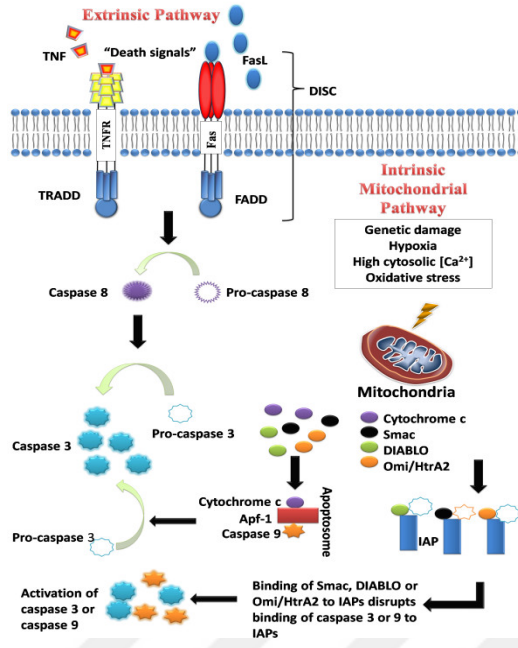
En karakteristik değişikliklerden birisi normalde membran alt yüzeyinde bulunan fosfatidilserin (PS) moleküllerinin membran dış yüzeyine çıkmasıdır. Membranda meydana gelen değişiklikler fagositik hücreler için çeşitli sinyaller teşkil ederler. Transglutaminaz aktivasyonu membranı parçalayarak apoptotik cisimlerin ortaya çıkmasını sağlar. Bu apoptotik cisimler dış membranlarındaki PS aracılığıyla makrofaj hücrelerine fagositik sinyaller verirler. Hücre içi yüksek ATP seviyeleri apoptoz için gereklidir. ATP seviyesi düşükse hücre apoptoz için yeterli enerjiyi temin edemeyecek ve nekrozis ile ölecektir. Diğer karakteristik bir değişim ise hücre içi Ca ve Mg konsantrasyonunun artışı ve bu sebeple aktifleşen endojen endonükleazların DNA'yı nükleozomal parçalara ayırmasıdır. Kaspaz ile aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD), normal hücrelerde inhibitörüne (ICAD) bağlı olarak bulunur. Kaspaz 3 ile aktifleştirilir ve çekirdek DNA'sını yaklaşık 200 baz uzunluğunda parçalara ayırır (Dinçel & Kul, 2016; Nagata, 2000; Özay GÜLEŞ, 2008)



### *1.4.1.3. Apoptozis Mekanizmaları*

#### *1.4.1.3.1. Ekstrinsik Yolak*

Bu yolak ölüm ligandı ölüm reseptörüne (DR, death receptor) bağlandığında başlar. Ölüm reseptörleri tip 1 transmembran ailesinden olup, ekstrasellüler domainlerindeki sisteince zengin tekrarlar ve protein-protein etkileşim domaini olan ve ölüm domaini (Death Domain: DD) olarak bilinen modüller ile karakterize olurlar (J. Li & Yuan, 2008). Farklı ölüm reseptörleri keşfedilmiş olmasına karşın en iyi bilinen ölüm reseptörü tip 1 TNF (TNFR1: Tumor Necrosis Factor Receptor 1) reseptörü ve bununla ilişkili olan Fas proteini ile bunların ligandları olan TNF ve Fas ligandlarıdır. Fas, tümör nekrozis faktörü reseptörleri süper-ailesinin bir üyesi olup Apo-1 ya da CD95 olarak da bilinir. Bu ölüm reseptörleri, TNF reseptörü ilişkili ölüm domaini (TRADD), Fas ilişkili ölüm domaini (FADD) ve kaspaz 8 gibi sistein proteazlarını tutan bir hücre içi ölüm domainine sahiptirler. En iyi karakterize edilmiş ligandlar ve karşılık gelen reseptörleri olarak FasL/FasR, TNF-alfa/TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5 sayılabilir. Ölüm ligandının reseptörüne bağlanması, adaptör proteini için bir bağlanma bölgesi oluşumu ile sonuçlanır ve tüm ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi, ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinir. DISC, pro-kaspaz 8 aktivasyonunu sağlar ve oluşan aktif kaspaz 8 aşağı yollardaki kaspaz 3 ve 7 ile etkileşerek apoptozisi başlatır (Şekil 1.4) (Ghobrial, Witzig, & Adjei, 2005; Lowe & Lin, 2000; Wong, 2011).



Şekil 1.4: Apoptozisin intrinsik ve ekstrinsik yolları (Wong, 2011)

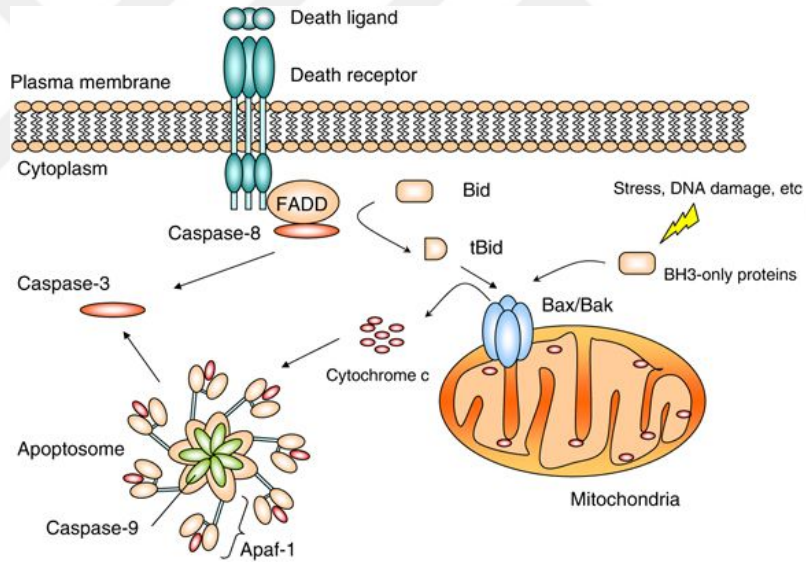
#### 1.4.1.3.2.İntrinsik Mitokondriyel Yolak

Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, aşırı yüksek sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonları ve şiddetli oksidatif stres gibi içsel uyarılar, içsel mitokondriyal yolağın başlamasının tetikleyicileridir. Uyarılara bakılmaksızın, bu yolak artan mitokondriyal geçirgenliğin ve sitokrom-c gibi pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınmasının sonucudur. Çeşitli sinyaller Bcl-2 familyası proteinlerinin işlevini etkiler. İki tip Bcl-2 ana grubu bulunmaktadır. Bunlardan ilki Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk proteinlerinin de içinde bulunduğu pro-apoptotik proteinler iken diğeri Bcl-X<sub>L</sub>, BCL-2, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1 proteinlerini kapsayan anti-apoptotik proteinlerdir. Anti-apoptotik proteinler, sitokrom-c'nin mitokondriyal salıverilmesini bloke ederek apoptozu düzenlerken, pro-apoptotik proteinler bu salınımı teşvik ederler (Lowe & Lin, 2000; Wong, 2011).

Bcl-2 ailesi proteinlerden Bid, sitoplazmada inaktif halde bulunur. TNF-alfa ya da FasL in caspase 8 ile etkileşimini takiben kaspaz 8 tarafından kesilir ve mitokondriye göç ederek Bax veya Bak pro-apoptotik moleküllerinin aktivasyonunu sağlar (Şekil 1.5). Bu iki proteinin yüksek ifadeleri mitokondri membran geçirgenliği (MOMP) artmasına ve Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu ile bloke edilebilen sitokrom c

salınımına neden olabilir. Sitokrom c, daha sonrasında apoptozomu oluşturan Apaf-1 proteinini bağlayabilir. Apaf-1, kaspaz-3, -7 kesimini ve aktivasyonunu sağlayan kaspaz-9'u aktive eder (Brennall, Rodriguez-Menocal, De Guevara, Cepero, & Boise, 2013).

Mitokondri intermembran bölgesinden sitoplazmaya salınan diğer apoptotik faktörler arasında apoptoz tetikleyici faktör (AIF), mitokondriden türemiş ikinci kaspaz aktivatörü (Smac), düşük pI direkt apoptozis inhibitör bağlayıcı protein (DIABLO) ve Omi/yüksek sıcaklık gereklilik proteini A (HtrA2) bulunmaktadır. Bunlar apoptoz inhibitörleri (IAP) olarak adlandırılan ve kaspaz-3, -9 aktivasyonunu engelleyen proteinlerini bağlayıp inhibe ederler. DIABLO/Smac ve Omi/HtrA2 salınımını, mitokondride bulunan BAK proteininin aktivasyonu takip etmektedir (Reed, 2000; Wong, 2011).



Şekil 1.5: Bax/Bad Aktivasyonu (J. Li & Yuan, 2008)

#### 1.4.1.3.3. Ortak Yolak

Genel olarak apoptozun gerçekleştirilmesi bir dizi kaspazın aktivasyonu üzerinden olur. İntrinsik yolağın üst kaspazı kaspaz 9 iken ekstrinsik yolak için bu kaspaz 8 molekülüdür. Her iki yolak da kaspaz 3 üzerinden birleşirler. Kaspaz 3, nükleer apoptozisten sorumlu kaspaz-aktifleştirilmiş deoksiribonükleaz inhibitörünü keser. Ek olarak, daha aşağı kaspazlar, protein kinazların, sitosekeletal proteinlerini

DNA tamir proteinlerinin ve endonükleaz ailesinin inhibe edici alt birimlerinin inhibitörlerinin kesilmesini tetkiler. Ayrıca apoptozdaki tipik morfolojik değişikliklere katkıda bulunan hücre iskeleti, hücre döngüsü ve sinyal yolları üzerinde etkilidirler (Wong, 2011).

#### *1.4.1.3.4. Endoplazmik Retikulum Yolağı*

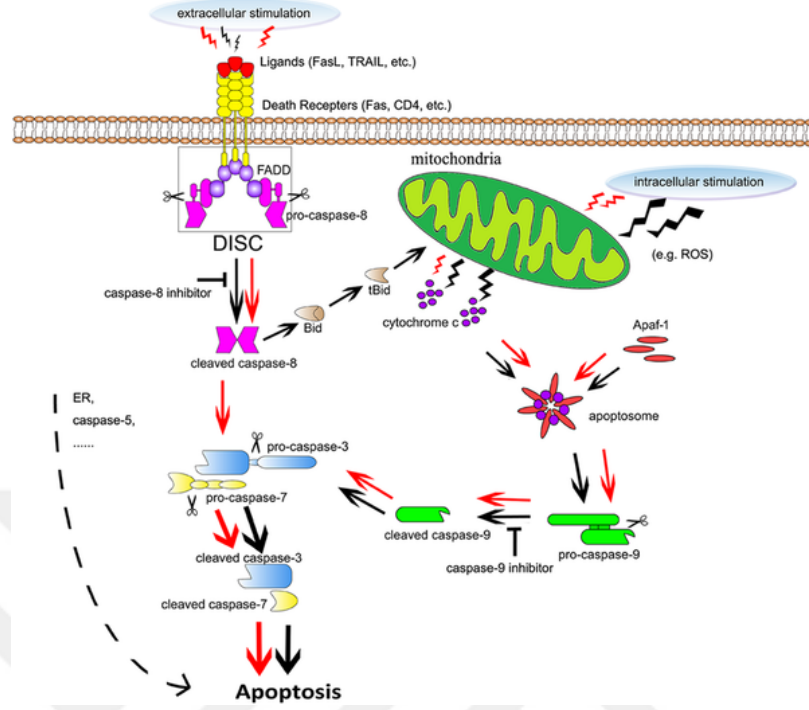
En az bilinen yolak olan endoplazmik retikulum yolağının mitokondriden bağımsız ve kaspaz 12 ilişkili olduğu düşünülmektedir.  $Ca_2^+$  homeostasisindeki dengesizlikler, hipoksi-iskemi, serbest radikaller, glukoz açlığı ya da katlanmamış proteinlerin ER'de fazla birikmesi gibi faktörler ER stresine sebep olurlar. Aktivasyonu kalpain tarafından kontrol edilen kaspaz-12, ER stresine bağlı olarak prokaspaz-12 formundan aktif hale gelir ve ER membranına lokalize olur. Kaspaz-12'nin aktivasyonu aşağı yolaklardaki kaspaz-7, -9 gibi nihayetinde kaspaz-3'ü aktive eden kaspazları indükler (Kara & Oztas, 2019; Szegezdi, Fitzgerald, & Samali, 2003; Wong, 2011).

#### *1.4.1.3.5. Kaspazlar*

Kaspazlar (Caspases: cysteine aspartic proteases), hücre ölümü ve inflamasyon sinyal ağlarında oldukça kritik rollere sahip bir sistein endoproteaz ailesidir. Kaspaz aktif bölgesindeki katalitik sistein kalıntılarına bağlı olan bir reaksiyon ile peptit bağlarını hidrolize ederler ve bu reaksiyon substrattaki belirli aspartik asit kalıntılarının tanınmasına bağlıdır. Tüm kaspazlar, aktive edilmesi gereken, katalitik olarak inaktif zimojenler olarak salgılanırlar (McIlwain, Berger, & Mak, 2013; Shi, 2004).

Bilinen rollerine göre kaspazlar apoptozisde rol alanlar, kaspaz-3, -6, -7, -8, -9 (memelilerde); ve inflamasyonda rol alanlar, kaspaz-1, -4, -5, -12 (insanlarda) ve kaspaz-1, -11, -12 (farelerde) olarak sınıflandırılmıştır. Kaspaz-2, -10 ve -14'ün fonksiyonları ve görevleri kolayca sınıflandırılmamaktadır. Apoptozis sürecine dahil olan kaspazlar öncü ve efektör olarak ikiye ayrılmakta olup, kaspaz-3, -6, -7 gibi

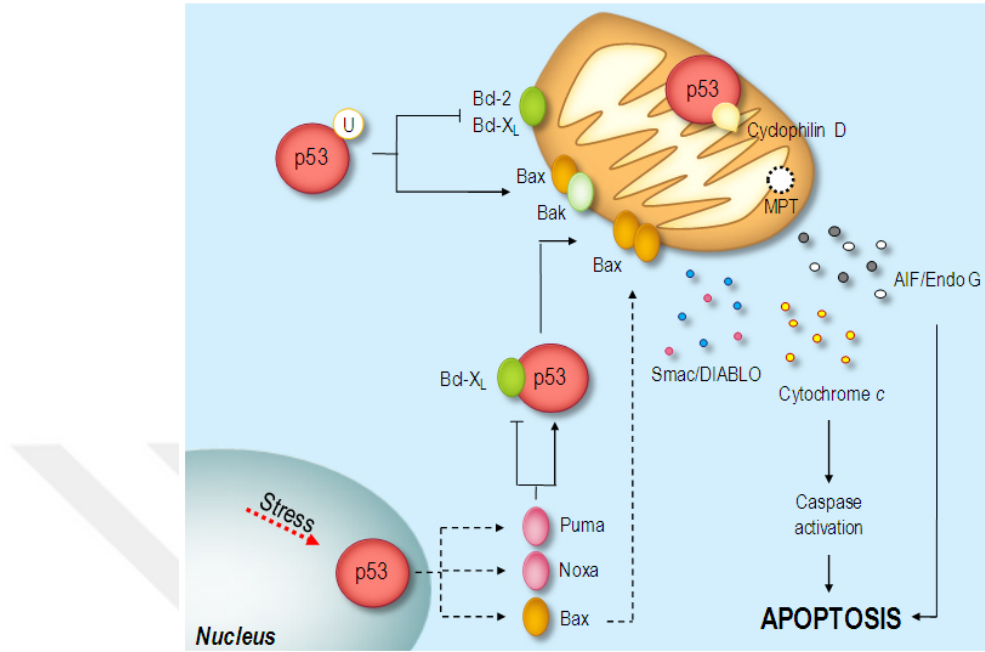
efektör kaspazların, kaspaz-8, -9 gibi öncü kaspazlar tarafından aktive edilmeleri gerekmektedir (McIlwain vd., 2013).



Şekil 1.6: Kaspaz Aktivasyonu (Shi, Y., 2004)

Kaspaz-3 geninde meydana gelen değişikliklerin insan tümörigenezini teşvik edip etmediğini araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Bir çalışmada 944 tümörün kaspaz-3 kodlayan bölgesine bakılmış fakat sadece 14 tanesinde somatik mutasyonlar saptanmıştır. Ancak başka önemli bir çalışmada 128 miyeloma vakasındaki 5 farklı tekil nükleotit polimorfizmi incelenmiş ve CASP3 genindeki bir mutasyonun çoklu miyeloma riskini 5 kat artırdığı bulunmuştur. Son olarak 1028 endometriyal kanser vakasındaki tek bir CASP3 mutasyonunun haploid durumlarda kanser riskini önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur. Beraber ele alındığında bu sonuçlar göstermektedir ki CASP3 polimorfizmi ve bunların haploitleri bireyin kansere yatkınlığının belirlenmesinde önemli olabilir (McIlwain vd., 2013).

### 1.4.1.3.6. Apoptozis ve p53 Geni



Şekil 1.7: p53'ün Apoptozisde Görevi (Amaral, J.D., 2010)

Hem ekstrinsik hem de intrinsik yollar tümör baskılayıcı p53 proteinini tarafından aktive edilmektedir. Normal hücrelerde p53, Mdm2 proteini tarafından bağlanarak inaktive edilir ve apoptoz bu şekilde baskılanır. MYC, RasV12, E2F-1 gibi onkogenler, p53'ü tümör baskılayıcısı olan ARF (Adp ribozilasyon faktörü) üzerinden dolaylı olarak etkileyebilirler. ARF, Mdm2/p53 etkileşimine müdahale ederek p53 stabilizasyonu ve aktivasyonuna sebep olur. Benzer şekilde ATM ve ATR kinazları, DNA hasarına yanıt olarak p53 fosforilasyonunu gerçekleştirirler. Fosforile edilmiş p53, Mdm2'den ayrılarak aktif hale gelir. Aşırı ifade edilen p53, proapoptik BH-3 ailesinden PUMA (p53 tarafından üstregüle edilmiş apoptozis modülatörü), NOXA (latince hasar) ve BAX proteinlerinin transkripsiyonunu indükler. Mitokondriye lokalize olan PUMA, NOXA ve BAX, Bcl-2 proteinlerinin etkisi pro/anti apoptotik Bcl2 proteinlerinin oranını artırarak apoptozisi teşvik etmektir (Amaral, Xavier, Steer, & Rodrigues, 2010; Fridman & Lowe, 2003; Maximov & Maximov, 2008).

## 1.5.TERPENOİDLER, QUINONE-METHİDE TRİTERPENLER (QMTS) VE TİNGENON

Terpenoidler (isoprenoidler) ya da terpeneler, birçok farklı bitkide çeşitli roller üstlenen geniş bir doğal bileşik grubudur. Tüm terpenoidler beş karbonlu yapıtaşlarından sentezlenir. Karbon atomu sayısına göre, yani yapıtaşı sayısına göre monoterpenler, sesquiterpenler, diterpenler, sesterterpenler, triterpenler, tetraterpenler ve politerpenler olarak sınıflandırılırlar. Kırk binden fazla terpenoid türü izole edilmiş olup, bunların büyük bir kısmı başta kanser olmak üzere çeşitli insan hastalıklarına karşı farmakolojik aktivite göstermiştir (Rabi & Bishayee, 2009).

Triterpenoidler stereoidleri de içeren terpenoid alt grubudur. Anti-inflamatuar ve anti-karsinojenik etkilere sahip oldukları gösterilmiştir(Mañez, Recio, Giner, & Ríos, 1997). Asiyatik asit olarak adlandırılan triterpenin HepG2 hücreleri üzerinde, Ca<sup>2+</sup> salınımını ve p53 üst-regulasyonunu artırarak sitotoksik etkide bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca insan MCF-7 ve MDA-MB-MB-231 göğüs kanseri hücrele hatlarının büyümesini inhibe ederek, apoptozise uğrattığı görülmüştür (Lee vd., 2002).

Celastraceae ailesi, 106 cins ve 1300 tür barındıran, Kuzey Afrika, Güney Amerika ve başta Çin olmak üzere Doğu Asya gibi tropikal ya da astropikal bölgelere dağılım gösteren geniş bir bitki ailesidir. Bu ailenin temsilci cinsleri Maytenus, Euonymus, Cassine ve Celastrus cinsleridir. Kanser hücrelerine karşı gösterdikleri sitotoksik ve antiproliferatif etkiler sebebiyle geniş bir araştırma alanı teşkil etmektedirler(Veloso, Soares, Perez, Rodrigues, & Silva, 2017). Örneğin *Pleurostyliia opposita* bitkisinden elde edilen pyridine alkaloidlerin HCT116 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Whitson vd., 2006).

Quinonemethide triterpenoid (QMT) bileşikleri (celastroidler) sadece Celastraceae familyasından bitkiler tarafından üretilmekte olan sekonder metabolitler olup, bu familyanın kemotaksonomik sınıflandırılmasında kullanılan indikatörlerdir. Selastrol, *Tripterygium wilfordii* bitkisinden elde edilen bir QMT olup, kronik inflamasyonun ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmış olup; çeşitli tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (Rabi & Bishayee, 2009). İlk kez 2003 yılında selastrolün insan lösemi HL-60 sisteminde apoptozisi indükleyebildiği keşfedilmiş olup, topoizomeraz II' nin güçlü bir inhibitörü olduğu

bulunmuştur. Hatta kemoterapi ilacı olarak kullanılan topoizomeraz II inhibitörü etopozid'den bile kuvvetli bir inhibitör olduğu tespit edilmiştir (Nagase vd., 2003).

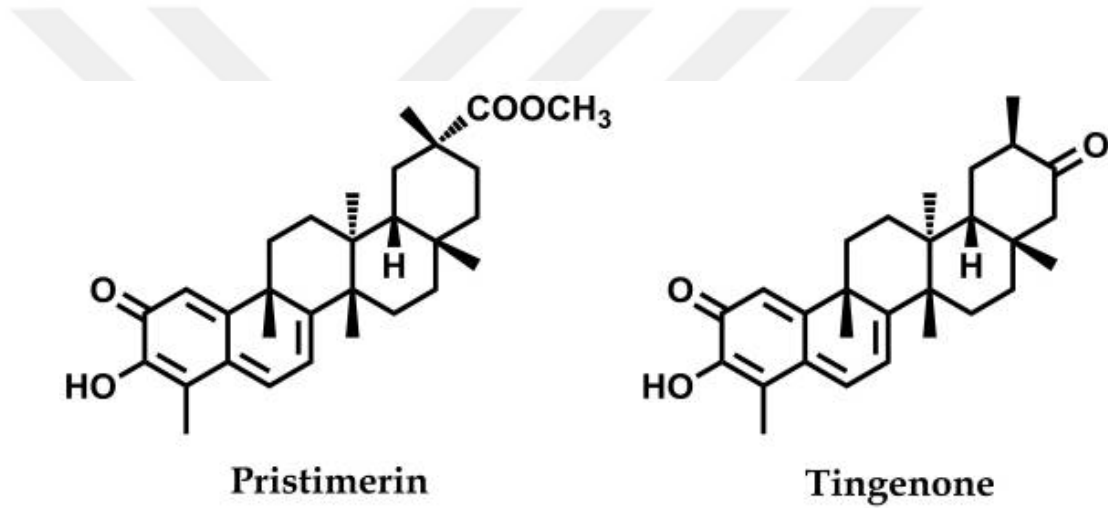
Pristimerin, bir selastrol-metilester olup, QMT bileşiklerindedir. Çeşitli kanser hatları üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. 2005 yılında yapılan bir çalışmada *Reissantia buchananii* (Celastraceae) bitkisinden elde edilen 21 sitotoksik bileşik arasından, 9 farklı kanser hücre hattı üzerinde en güçlü etkiye sahip olan olduğu bulunmuştur. Bunlar arasında vincristine dirençli orofaringeal KB kanser hücreleri ve taxol dirençli ovaryum PTX10 kanser hücreleri de bulunmaktadır (Rabi & Bishayee, 2009). Celastraceae and Hippocrateaceae ailelerine ait çeşitli bitkilerden primisterin elde edilebilmekte olup, *Maytenus chuchuhuasca* ve *Maytenus laevis* bitkileri başta olmak üzere *Maytenus* cinsi bitkiler, Güney Afrika'da artiritis ve cilt kanseri tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. Tokyo Üniversitesi'nden araştırmacılar 1994 yılında, Paraguay'dan aldıkları ve yerel halk arasında kangorosa olarak bilinen *M. Illicifolia* ve Brezilya'dan aldıkları *M. chuchuhuasca* bitkilerinin kök kabuklarından elde ettikleri ekstraktlardan elde ettikleri organik bileşikler ile tümör hücre hatlarında MTT sitotoksik testi yapmışlardır. Tablo'da da görüldüğü üzere bu bileşiklerden birisi Primisterin, ikisi de tingenon a ve b'dir (Şekil 1.9) (Shirota, Morita, Takeya, Itokawa, & Iitaka, 1994). *M. Illicifolia* ekstraktı kullanan başka bir ekip, HT-29 ve HepG2 hücrelerinde Bcl-2 proteini seviyesinin azaldığını ve kaspaz 3'ün aktive olduğunu göstermişlerdir (Júnior vd., 2013).

	IC <sub>50</sub> (µg/ml)		
	L-1210	P-388	KB
6-Oxotingenol [1] .....	6.0	2.6	30
6-Oxopristimerol [2] .....	2.8	1.5	2.8
3-Methyl-6-oxotingenol [3] .....	>100	>100	11
3-Methyl-22β,23-diol-6-oxotingenol [4] .....	—	4.3	—
<b>Pristimerin [5] .....</b>	<b>0.36</b>	<b>0.12</b>	<b>0.55</b>
<b>Tingenone [6] .....</b>	<b>0.14</b>	<b>0.041</b>	<b>0.28</b>
22β-Hydroxytingenone [7] .....	—	0.012	—

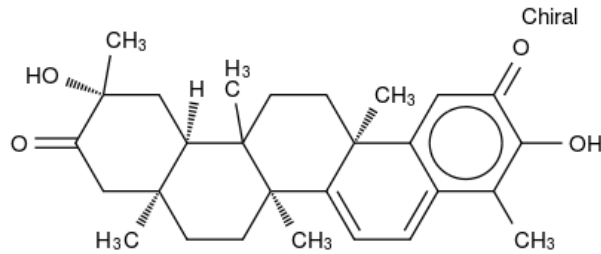
Şekil 1.8: *M. illicifolia* ve *M. chuchuhuasca* bitkilerinden elde edilen organik bileşikler ile yapılan MTT sitotoksik testi sonuçları (Shirota vd., 1994)



Primisterinin apoptozis üzerindeki etkisini anlamak adına, Wu ve arkadaşları p53-mutant ve yüksek derecede metastatik göğüs kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerini primisterin ile muamele ettiklerinde, apoptoza has olan hücre küçülmesi, apoptotik cisim oluşumu ve çekirdek fragmentasyonu gibi morfolojik belirteçleri tespit etmişlerdir. Ayrıca primisterinin pro-kaspaz 3'ü keserek aktive ettiğini bularak, apoptozis sırasında kaspaz 3 tarafından kesilen PARP degradasyonunu tespit ederek primisterinin kaspazlar üzerinden apoptozisi indüklediğini kanıtlamışlardır. Mitokondri membran potansiyelinde artış ve sitokrom c salınımı gözlemlenmişler ancak bu sürecin kaspazlar ile bağlantısı olmadığını tespit etmişlerdir (Wu vd., 2005).



Şekil 1.9: Primisterin ve tingenon moleküler yapısı (Taddeo vd., 2019)



Şekil 1.10: 20-Hidroksi-20-Epi-Tingenon

Son zamanlarda QMT maytenin (tingenon a) molekülü, geniş bir kanser hücre hattı paneline yaptığı yüksek toksik etki sebebi ile popülerdir. Anti-inflamatuar, antioksidan, antifungal, antitrypanosomal, antimikrobiyal ve antitümör gibi biyolojik aktivitelere sahiplerdir. Tingenon, primisterinle beraber Latin Amerika’da geleneksel bir ilaç olarak kabul görmektedir (Taddeo vd., 2019). Tingenon B ya da diğer adıyla 22-hidroksitingenon, tingenon A ile yapısal olarak benzer olup, Bavovada ve arkadaşları tarafından çeşitli kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 1.11) (Bavovada, Blaskó, Shieh, Pezzuto, & Cordell, 1990).

Cell line	ED <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>a</sup>
P-388	0.073
KB	0.62
COL-2	0.61
HT-1080	0.44
LU-1	0.84
MEL-2	0.39
BC-1	0.75

<sup>a</sup> A sample is considered active if it shows an ED<sub>50</sub> of  $\leq 4$  µg/ml.

Şekil 1.11: 22-Hidroksitingenonun çeşitli kanser hücre hatları üzerinde ED50 değerleri (Bavovada vd., 1990)

## 2.MATERYAL ve METOD

### 2.1.MATERYAL

#### 2.1.1.Kimyasal Maddeler

- RPMI 1640, Gibco, USA
- Tingenon, İstinye Üniversitesi, Türkiye
- Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco, USA
- Fosfat tuz tamponu (PBS), HyClone, Thermo Scientific, USA
- 0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, USA
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya
- Tripkan mavisi (%0,5), Biological Industries, İsrail
- Muse Caspase 3/7 Analiz Kiti
- Muse Annexin V Analiz Kiti
- Muse ROS Analiz Kiti

#### 2.1.2.Sarf Malzemeleri

- 25cm<sup>2</sup> ve 75cm<sup>2</sup> lik flask, Thermo Scientific, USA
- 96 kuyulu flat plate, Corning Incorporated, USA -5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Set inject, Çin
- 10µl'lik pipet uçları, Biohit, Finlandiya
- 100µl'lik pipet uçları, Expell
- 1000µl'lik pipet uçları, Aysset, Türkiye
- Steril santrifüj tüpleri (15ml), Orange Scientific, Belçika
- Steril santrifüj tüpleri (50ml), Nest, Çin
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA
- 10 ml'lik pastör pipetler, Corning Incorporated, USA
- 25 ml'lik pastör pipetler, Lp Italiana Spa, İtalya
- 2 ml'lik cam pastör pipetler, Heinz Herenz, Almanya
- 1 ml ve 5 ml'lik Kombi tip, Eppendorf, Almanya
- Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab, Almanya

### 2.1.3.Cihazlar

- Spektrofotometre, BGM Labtech
- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D
- CO<sub>2</sub> inkübatörü, Panasonic
- Buzdolabı, Panasonic
- Steril kabin, Telstar
- Muse Cell Analyzer, MerckMillipore Sigma, Toronto
- Multipipet cihazı, Multipette eppendorf
- Inverted mikroskop, Nikon, Japonya
- Santrifüj, Hitachi, Japonya
- 10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific
- 0,5-5ml pipet, Brand
- 10ml pipet, Eppendorf
- 5-50µl Transferpipet, Thermo Scientific
- Pipet boy, ISO fill
- 20-200µl Transferpipet, Brand, Almanya

## 2.2.YÖNTEMLER

### 2.2.1.Hücre Kültürü

İstinye Üniversitesi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalında görev yapan Prof. Dr. Engin Ulukaya'nın laboratuvarından temin edilen HCT116 (ATCC® CCL-247) kolon kanseri hücre soyları kriyovial kaplar içerisinde -80°C'den alınarak çözünerek kültüre edilerek çalışmalarda kullanıldı.

#### 2.2.1.1.Hücre Kültür Besiyerinin Hazırlanması

50 ml'lik hazır besiyeri için 5 ml FBS, 0.5 ml penisilin-streptomisin, 0.5 ml L-glutamin, 44 ml RPMI ("Roswell Park Memorial Institute Medium") falkon tüp içerisinde konularak homojen olacak kadar karıştırılır. Falkon tüpleri kapakları parafilm ile sarılarak 2-8°C'de saklanır.

#### 2.2.1.2.HCT116 Hücrelerinin Stoktan Çıkarılması

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere, kriyoviallerin içinde bulunan hücreler -80°C den alınarak 37°C'de hızlı bir şekilde çözüldü. Falkon tüpte bulunan

hazır besiyerine alınarak 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant kısmı pastör pipet ile dikkatlice çekilerek hücre peleti 1 ml hazır besiyeri ile sulandırılarak hücrelerin homojen hale gelmesi sağlandı. Hücreler thoma lamı ile sayımı yapıldı. Yaklaşık 500 bin hücre, 5 ml besiyeri bulunan 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara (Thermo Scientific) alınarak 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildi.

#### 2.2.1.3.HCT116 Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin yoğunluğu flask üzerinde %70-80'lara ulaştığında pasajları gerçekleştirildi. Bu süre yaklaşık 2-3 gün olarak ön görülmektedir. Öncelikle hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla 25 cm<sup>2</sup>'lik flask içerisine besiyeri aspire edildikten sonra, 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek flask yüzeyleri yıkandı. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0.5 ml %0.05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu eklendi ve hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, flaska hafif bir fiziksel kuvvetle hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Mikroskopla incelenip yüzeyden ayrıldığından emin olunur. Tripsinin inhibe olması için serum içeren hazır besiyeri ile muamele edildi. Böylelikle tripsinin hücrelere zarar vermeye başlaması engellenmiş olur. Flaskda bulunan hücre süspansiyonu, 15ml'lik falkon tüp içerisine alınarak 800 rpm'e 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım atılır ve elde edilen hücre peleti 1 ml hücre besiyerinde çözülür. Sayım işlemi thoma lamı ile yapılır ve yeterli miktarda hücre miktarı istenilen flasklara alınarak 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakılır.

#### 2.2.1.4.Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

Tripsinizasyon işlemi sonrası elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve 96 kuyucuklu bir hücre kültürü kabının boş bir kuyusuna eklendi. Üzerine 10 µl %0.5 tripan mavisi (Biological Industries, İsrail) konularak en az 10 kez pipetaj işlemi yapıldı. Bu karışımdan 10µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde 16 büyük kareden rastgele seçilen beş kare alanındaki hücreler sayılarak ortalaması alındı. Alınan bu ortalama sayı 16 ile çarpılarak toplam yaklaşık hücre sayısı belirlendi. Ardından aşağıdaki formül kullanılarak 1 ml'de bulunan toplam hücre sayısı hesaplandı.

Hücre Sayısı/ml=A x SF x 10.000

A= 16 Karedeki Toplam Hücre Sayısı

SF= Seyreltme Faktörü

## 2.2.2.SRB Methodu ile Sitotoksisite Belirleme

### 2.2.2.1.Tingenon Doğal Aktif İlaç Çözeltisinin Hazırlanması

#### **Stok Çözeltisi**

İstinye Üniversitesi Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi Bölümü tarafından Tingenon A bileşiğinin stok çözeltisi (10 mM); 1000 µl DMSO içerisinde 0,004366 g Tingenon bileşiğinin çözülmesi ile hazırlanmış şekilde 20 µl alikotlar halinde -20°C'de saklanmaktadır.

#### **Çalışma Çözeltisi**

40 µl stok tingenon çözeltisi alınır. 9960 µl RPMI 1640 medium içerisinde karıştırıldıktan sonra kullanıma hazırdır. Stabilitesi hakkında bir çalışma olmadığından, kalan miktarlar tıbbi atığa atılır.

### 2.2.2.2.Kimyasalların Hazırlanması

#### **- %50 TCA Çözeltisi**

50 gram TCA tartılır ve 100 ml deiyonize su ile çözünür. 2-8 derecede muhafaza edilir.

#### **- %1 Asetik Asit Çözeltisi**

1 ml asetik asit içerisinde 99 ml steril deiyonize su eklenerek hazırlanır.

#### **- SRB Çözeltisi**

400 mg SRB, 100 ml %1'lik asetik asit çözeltisi içerisinde çözündürülür. Ardından karanlık bir ortamda 2-8 derece arasında saklanarak kullanılmaktadır.

### - 10 mM Tris Bazı Çözeltisi

121 mg tris bazı, 100 ml steril deiyonize su içerisinde çözündürüldükten sonra kullanıma hazırdır.

### - Deiyonize Su

#### *2.2.2.3.SRB Testi*

1990 yılında geliştirilen sulforhodamine B (SRB) deneyi, in vitro sitotoksosite taraması için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olmaya devam etmektedir (Skehan vd., 1990). Deneysel, SRB'nin trikloroasetik asit (TCA) tarafından hücre kültürü plakalarına sabitlenmiş hücrelerin protein bileşenlerine bağlanma kapasitesine dayanır. SRB, hafif asidik koşullar altında bazik amino asit tortularına bağlanan ve bazik koşullar altında ayrışan iki sülfonik gruba sahip parlak-pembe bir aminoksanten boyadır (Lillie, Conn, & Biological Stain Commission., 1977). SRB'nin bağlanması stokiyometrik olduğundan, boya miktarı doğrudan hücre kütlesi ile orantılıdır.

Skehan ve ark., testin kuyucuk başına 1.000-2000 hücre kadar düşük ve kuyucuk başına 5.000 hücre yoğunluğunda 4.83 sinyal-gürültü oranı ile yoğunlukları tespit edebildiklerini tespit etmişlerdir (Skehan vd., 1990). Bu hassasiyet seviyesi, diğer boyama yöntemleriyle karşılaştırıldığında, geleneksel floresan boyama ve diğer protein boyama yöntemlerinden üstündür (McCaffrey, Agarwal, & Weksler, 1988; Skehan vd., 1990). SRB testinden elde edilen sonuçlar, kuyucuk başına 7.500-180.000 hücre yoğunlukları üzerinde lineer bir dinamik aralık sergilemektedir, bu da 1-200% yoğunluktaki hücre artışına karşılık gelmektedir (Skehan vd., 1990). Ayrıca, SRB yönteminin pratik olduğu kanıtlanmıştır. Sebebi ise hücre tabakaları kurutulmadan önce TCA ile proteinler sabitlendiği ve SRB ile boyandığı için, süresiz olarak depolanabilirler. SRB boyalı hücrelerden çıkarılan renk böylelikle sabittir. Bu test metodu, farklı tipteki kanserli ve kanserli olmayan hücre hatlarına karşı ilaç toksisite testi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Monks vd., 1991).

SRB tahlilinin etkinliği, başka bir yöntem olan Thiazolyl Mavi Tetrazolium Bromür (MTT) ile sıklıkla karşılaştırılır. MTT, hücre metabolik aktivite ile renksiz

tetrazoliumu mor renkli formazan boyasına dönüştürmesinden yararlanarak canlılık ölçen bir yöntemdir (Plumb, Milroy, & Kaye, 1989). Bu nedenle sadece canlı hücreleri algılar, oysaki SRB yöntemi canlı ve ölü hücreleri birbirinden ayırmaz. Ancak bu fark, SRB metodunu bir ilacın sitotoksik etkilerini tespit etme kabiliyetini tehlikeye atmaz. Birkaç grup tarafından yapılan çalışmalarda, SRB yöntemi kullanılarak test edilen bileşiklerin IC50 değerleri biraz daha yüksek olmasına rağmen SRB testinin sonuçlarının MTT testinin sonuçları ile iyi korele olduğunu gösterdi (Haselsberger, Peterson, Thomas, & Darling, 1996; Perez, Godwin, Handel, & Hamilton, 1993; Rubinstein vd., 1990). Bununla birlikte, SRB tahlilinin MTT tahliline göre çeşitli avantajları vardır. Örneğin, bazı bileşikler, hücre yaşayabilirliği üzerinde herhangi bir etkisi olmadan doğrudan MTT redüksiyonuna müdahale edebilirler, oysa SRB boyaması bu tip bir girişimden nadiren etkilenir. Ayrıca, SRB boyama, hücre metabolik aktivitesinden bağımsızdır; bu nedenle, spesifik hücre soyları için test koşullarını optimize etmek için MTT testine göre daha az adım gerektirir (Keepers vd., 1991).

SRB metodu için, ilk olarak 100 µl hazır besiyeri her kuyuya eklendi. Ardından 100 µl 400 µM'luk tingenon çözeltisi ilk sütunun 3 kuyusuna eklendi. 3 kez pipetaj edildikten sonra, 100 µl çekilerek yan sütuna eklenir. Bu şekilde 100 µM - 0.05 µM arasında 12 farklı konsantrasyonda seri dilüsyon yapılmıştır. Ardından 100 µl içerisinde yaklaşık  $5 \times 10^3$  hücre bulunan hücre karışımından, 12 konsantrasyon ilaç denemesi ve ilaçsız kontrol grubu için 3 tekrarlı olacak şekilde üzerine ekildi. Kör kuyu için sadece 200 µl hazır besiyeri eklenir. Uygun doz seçimi yapabilmek amacıyla hücreler, Tingenon bileşiği ile farklı konsantrasyonlarda (0,05-100 µM) 12, 72 saat süreyle muamele edildi. Deneyde, negatif kontrol için sadece hazır besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Kör için ise 200 µl hazır besiyeri bulunan kuyular kullanıldı. Ardından hücreler, istenilen tedavi süreleri boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 72 saat inkübasyona bırakıldı. Tedavi süresi sonunda hücresel proteinleri fikse etmek için %50'lik TCA solüsyonundan 50 µl eklendi ve 2-8°C'de 1 saat inkübe edildi. Sonrasında plaka ters çevrilerek bağlanmayan proteinler uzaklaştırıldı. TCA'nın uzaklaştırılması için 5 kez deiyonize su ile yıkandı. Yıkama sonunda sudan uzaklaştırılan plakadaki kuyucuklara 50 µl SRB solüsyonu eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında SRB boyası ters çevrilerek hızlı ve dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Bağlanmamış boyayı uzaklaştırmak için



%1'lik asetik asit çözeltisi ile 5 kez yıkanır. Yıkama sonrası, kuyucuklarda hiç çözelti kalmayacak şekilde kurutulur. Proteinlere bağlanan boyanın çözünmesi için 10 mM tris bazı çözeltisinden 150 µl eklendi ve 150 rpm'de 10 dakika inkübe edildi. ELISA okuyucusuna yerleştirilerek 564 nm'de ölçümü yapıldı.

İlk çalışmalar neticesinde 72 saat süresinde hücrelerin yüzde ellisini öldüren doz olarak  $13,27 \pm 2,1 \mu\text{M}$ , hücrelerin yüzde doksanını öldüren doz ise  $16,91 \pm 3,6 \mu\text{M}$  olarak hesaplandı.

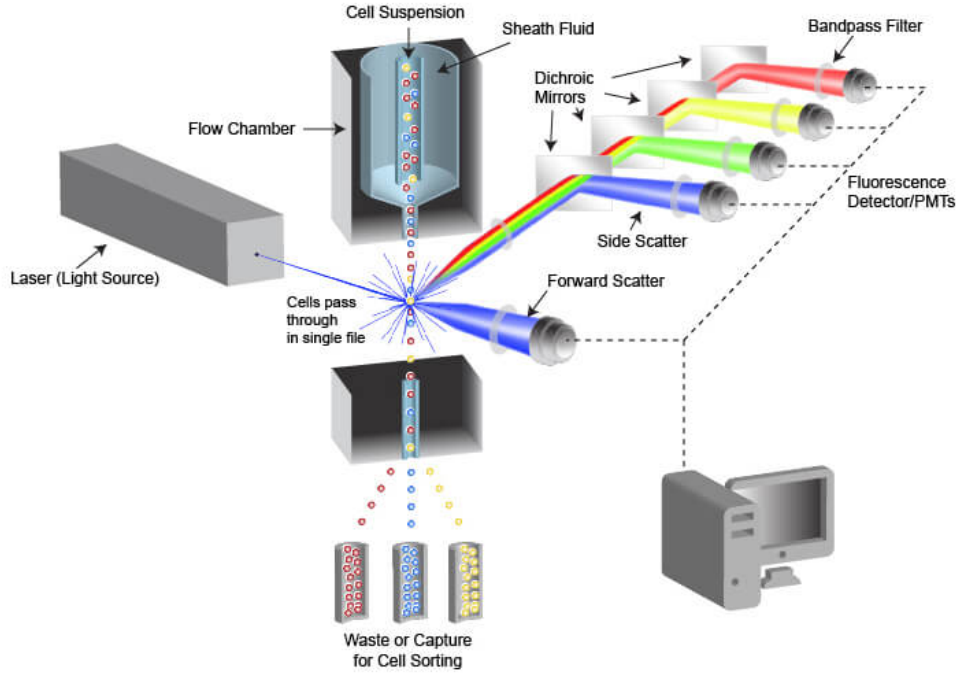
### **% Canlılık Hesabı:**

İlaç uygulanmamış kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, ilaç uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Her bir konsantrasyon birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbanası ortalaması} - \text{kör ortalama})}{\text{Kontrol hücre absorbanası ortalaması} - \text{kör ortalama}}$$

### 2.2.3. Akım Sitometrisi Analizleri

Akış sitometrisi, hücre bir ölçüm cihazı boyunca süspansiyon içinde akarken aynı anda, boyut ve granülite gibi tek bir hücrenin çoklu fiziksel özelliklerini ölçen sofistike bir araçtır. Çalışması, yüzey üzerinde bulunan hücre dışı molekülleri veya hücre içindeki molekülleri hedef alan boyalardan veya monoklonal antikorlardan türetilen, araştırılmakta olan hücrelerin ışık saçılma özelliklerine bağlıdır. Bu yaklaşım, akış sitometrisini, karmaşık popülasyonların kısa sürede ayrıntılı analizleri için güçlü bir araç haline getirir. Periferik kan hücrelerinin immünofenotiplemesi, apoptoz analizi ve sitokinlerin tespiti gibi genel akış prensibi ve seçilen akım sitometrisinin uygulamalarını kapsar (Adan, Alizada, Kiraz, Baran, & Nalbant, 2017)



Şekil 2.1: Akım Sitometri Çalışma Prensibi (n.d.)

Akışkan sistemi, hücreler saptama için kullanılan ışık kaynağı ile aydınlatıldığında uygun analiz sağlamak için tek bir hücre akışı oluşturmak üzere tasarlanmıştır. Bu, bir örnek tüpten bir akış alanına hücreleri enjekte etmek için basınçlı hatlar kullanılarak gerçekleştirilir. Hücre numunesi bir kaptan çekilir ve kılıf sıvısı olarak bilinen bir akışkan sıvının laminer akışının ortasındaki akış odasına enjekte edilir. Kılıf sıvısı, hidrodinamik odaklanma adı verilen bir işlemle hücre akışını daraltmaya yardımcı olur ve hücreleri kabaca sıralı bir hat halinde düzenler. Bu, hücrelerin sitometrede optik sistemi geçerken eşit şekilde aydınlatılmasını ve algılanmasını sağlar. Böylelikle hücre yüzeyine bağlı boyalı belirteçler hücreleri ayırmada, seçmede ve tanımlamada kullanılmasına olanak sağlar.

#### 2.2.2.3.1. Kaspaz 3/7 Testi

Kaspazlar, pro-apoptotik sinyallere yanıt olarak programlı hücre ölümünü koordine eden yegane moleküllerdir. Kaspaz-8 ve 9'un aktivasyonu ile aktifleşen kaspaz-3, -7, proteinleri apoptozun final aşamasında merkezi rolü üstlenirler (Shim vd., 2017). Hücre membranından geçebilen Muse kaspaz 3/7 solüsyonu hücrelere toksik etki yapmamaktadır. Solüsyon, dört amino asitten oluşan DEVD peptidine bağlı olarak bulunan ve DNA'ya bağlanma özelliği olan floresan bir belirteç içermektedir.

Apoptotik hücrelerde kaspaz 3/7 tarafından kesilen peptitten salınan boya DNA'ya bağlanarak floresan olarak parlar. Böylece artan floresan miktarı aktif kaspaz 3/7 hakkında bilgi verir. Ölü hücre belirteci olan 7-AAD, apoptotik olmayan hücrelere giriş yapamayıp, apoptotik ve ölü hücrelere girebilmektedir. Bu sayede ölü hücrelerden floresan sinyal alınabilmektedir (*Muse™ Caspase-3/7 Kit User's Guide Catalog No. MCH100108 (100 Tests), y.y.*).

Kaspaz 3/7 testi için HCT116 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1 ml içerisinde  $300 \times 10^3$  hücre 4 kuyucuğa ekim yapıldı. Ardından 1 ml içerisinde IC90 konsantrasyonun 2 katı olacak şekilde (45,16  $\mu$ M) tingenon çözeltisi hazır besiyeri ile hazırlandı. Bunun için 16,91  $\mu$ l stok tingenon çözeltisi ile 4983,09  $\mu$ l hazır RPMI besiyeri karıştırıldı. Kuyucuğa tedavinin etkisini gözlemlemek amaçlı 1 ml bu karışımdan eklendi. Kontrol gruplarına ise normal hazır RPMI hazır besiyeri eklendi. 48 saat süreyle  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda teste başlamadan önce kit oda sıcaklığına gelmesi için dışarı çıkarıldı. 6 kuyucuklu plakalarda bulunan hücre besiyeri dikkatli aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla 2 ml 1X PBS ile kuyular yıkandı. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0.5 ml %0.05 Trypsin-EDTA solüsyonu eklendi ve hücreler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, flaska hafif bir fiziksel kuvvetle hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Mikroskopla incelenip hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olunduktan sonra tripsinin inhibe olması için serum içeren hazır besiyeri ile muamele edildi. Böylelikle tripsinin hücrelere zarar vermeye başlaması engellenmiş olunur. Flaskda bulunan hücre süspansiyonu, 15ml'lik falkon tüp içerisine alınarak 800 rpm'e 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım atılır ve elde edilen hücre peleti 1 ml hücre besiyerinde çözülür. Sayım yapıldıktan sonra 1 ml'sinde  $2 \times 10^4$ -  $5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde hücre peleti sulandırıldı. Etiketlenmiş tedavi grubu ependorfuna 50  $\mu$ l hücre süspansiyonu eklendi. Daha sonra kaspaz3/7 kit solüsyonundan 5  $\mu$ l konuldu. Pipetaj işleminin ardından ependorflar kapakları açık bir şekilde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda 30dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, 150  $\mu$ l 7-AAD ependorf içerisine eklenerek kısa bir pipetaj gerçekleştirildi. Daha sonra, oda sıcaklığından karanlıkta 5 dk inkübe edildi. Sonrasında Muse Cell Analyser cihazında kaspaz3/7 aktivitesi değerlendirildi.

#### 2.2.2.3.2. Anneksin-V Testi

Apoptoza giren hücrelerin karakteristik özelliklerinden birisi de normalde hücre membranının iç yüzeyinde bulunan fosfaditilesterin (PS) moleküllerinin membran yüzeyine çıkmasıdır. Anneksin-V kalsiyuma bağlı, fosfolipid bağlayıcı bir protein olup fosfaditilesterine yüksek afinite göstermektedir. Bu sayede, floresan bir belirteç ile işaretlendiğinde, apoptotik hücrelerin ayırt edilebilmesine olanak sağlar. 7-AAD gibi diğer belirteçler ile kullanımı apoptozun hangi evrede olduğu hakkında fikir verebilmektedir. Örneğin apoptotik olmayan hücrelerde hem anneksin hem de 7-AAD negatifken, apoptozun geç evresinde bulunan ya da ölü hücrelerde her ikisi de poziftir (*Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit User's Guide Catalog No. MCH100105 (100 Tests)*, y.y.).

Anneksin-V testi için HCT116 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1 ml içerisinde  $300 \times 10^3$  hücre 4 kuyucuğa ekim yapıldı. Ardından 1 ml içerisinde IC90 konsantrasyonun 2 katı olacak şekilde (45,16  $\mu$ M) tingenon çözeltisi hazır besiyeri ile hazırlandı. Bunun için 16,91  $\mu$ l stok tingenon çözeltisi ile 4983,09  $\mu$ l hazır RPMI besiyeri karıştırıldı. Kuyucuğa tedavinin etkisini gözlemlemek amaçlı 1 ml bu karışımdan eklendi. Kontrol gruplarına ise normal hazır RPMI hazır besiyeri eklendi. 48 saat süreyle 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda teste başlamadan önce kit oda sıcaklığına gelmesi için dışarı çıkarıldı. 6 kuyucuklu plakalarda bulunan hücre besiyeri dikkatli aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla 2 ml 1X PBS ile kuyular yıkandı. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0.5 ml %0.05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, flaska hafif bir fiziksel kuvvetle hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Mikroskopla incelenip hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olunduktan sonra tripsinin inhibe olması için serum içeren hazır besiyeri ile muamele edildi. Böylelikle tripsinin hücrelere zarar vermeye başlaması engellenmiş olunur. Flaskda bulunan hücre süspansiyonu, 15ml'lik falkon tüp içerisine alınarak 800 rpm'e 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım atıldı ve 100  $\mu$ l %1 FBS içeren besiyeri eklendi. Etiketlenmiş ependorflara 100 $\mu$ l bu hücre süspansiyonu alındı. Ardından, 100 $\mu$ l Muse Annexin V & Dead Cell solüsyonu

eklendi. Orta hızda yaklaşık 5-10 saniye vorteks yapıldı. Karanlık ortamda 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonunda Muse Cell Analyzer cihazı ile ölçümü yapıldı.

#### 2.2.2.3.3.ROS Testi

Reaktif oksijen türleri (ROS, intrinsik apoptotik yolağın iyi bilinen tetikleyicilerindendir. ROS varlığında kesilen BID proteini Bax/Bak oligomerizasyonuna ve takiben mitokondri membran geçirgenliğinin artmasına sebep olur. Artan sitokrom c salınımı apoptozom kompleksinin oluşmasına ve kaspaz-9 aktivasyonuna sebep olur. Bu sayede apoptozu gerçekleştiren kaspaz 3 aktif hale gelir(Stojnev, Risti-Petrovi, & Jankovi-Velikovi, 2013) . Oksidatif stres solüsyonu, dihidroetidyum (DHE) içermektedir. DHE hücre membranından geçebilmekte olup, süper-oksit anyonlarıyla reaksiyona girebilmektedir. Bu sayede redoks duyarlı floresan bir sonda olma özelliğine sahiptir. Oksitlenene kadar mavi floresan boyası özelliği göstermekte olup, süperoksit anyonlar ile reaksiyonundan oluşan 2-hidroksietidyum, DNA'yı interkale ederek kırmızı floresan özelliği göstermeye başlar (Wojtala vd., 2014).

ROS (Reaktif Oksijen Türleri) testi için HCT116 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1 ml içerisinde  $300 \times 10^3$  hücre 4 kuyucuğa ekim yapıldı. Ardından 1 ml içerisinde IC90 konsantrasyonun 2 katı olacak şekilde (45,16  $\mu$ M) tingenon çözeltisi hazır besiyeri ile hazırlandı. Bunun için 16,91  $\mu$ l stok tingenon çözeltisi ile 4983,09  $\mu$ l hazır RPMI besiyeri karıştırıldı. Kuyucuğa tedavinin etkisini gözlemlemek amaçlı 1 ml bu karışımdan eklendi. Kontrol gruplarına ise normal hazır RPMI hazır besiyeri eklendi. 48 saat süreyle  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda teste başlamadan önce kit oda sıcaklığına gelmesi için dışarı çıkarıldı. 6 kuyucuklu plakalarda bulunan hücre besiyeri dikkatli aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla 2 ml 1X PBS ile kuyular yıkandı. PBS ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0.5 ml %0.05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve hücreler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, flaska hafif bir fiziksel kuvvetle hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Mikroskopla incelenip hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olunduktan sonra tripsinin inhibe olması için serum içeren hazır besiyeri ile muamele edildi. Böylelikle tripsinin hücrelere zarar

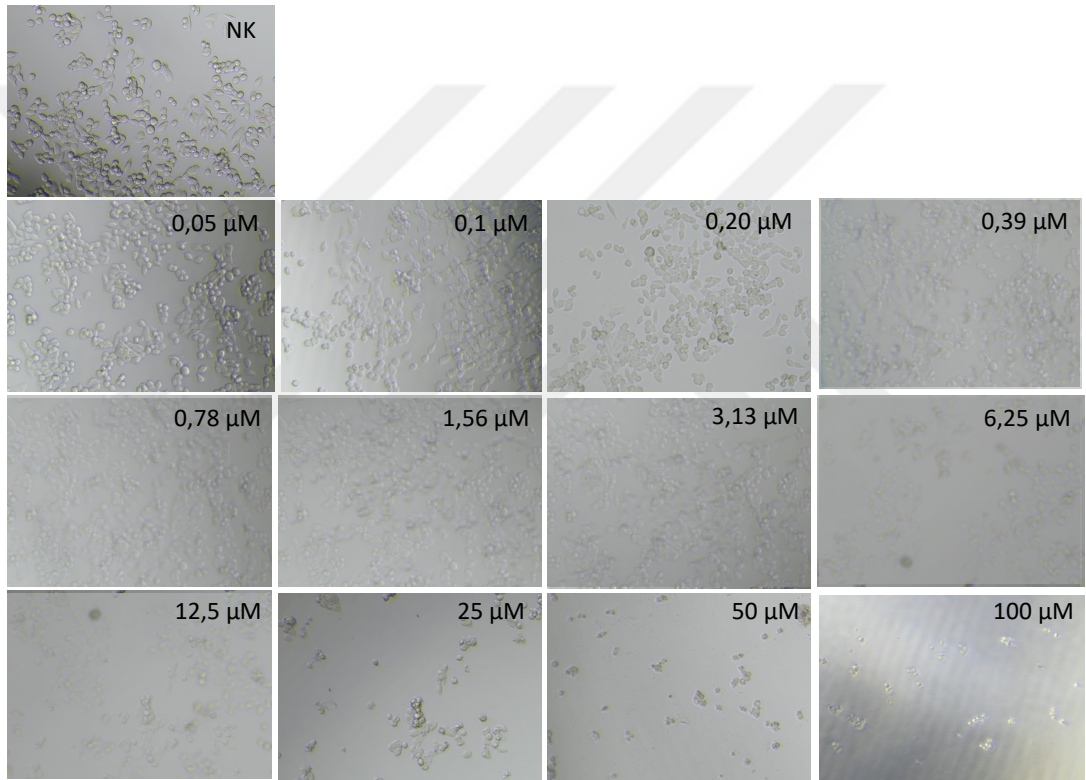
vermeye başlaması engellenmiş olunur. Flaskda bulunan hücre süspansiyonu, 15ml'lik falkon tüp içerisine alınarak 800 rpm'e 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım atılır ve elde edilen hücre peleti 1 ml hücre besiyerinde çözülür. Sayım yapıldıktan sonra 1 ml'sinde  $1 \times 10^6$ -  $1 \times 10^7$  hücre olacak şekilde hücre peleti kit içeriğindeki oksidatif stres çalışma solüsyonu ile sulandırıldı. Pipetaj işleminin ardından ependorflar kapakları açık bir şekilde oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, Muse Cell Analyser cihazında ölçüm gerçekleştirildi.



### 3.BULGULAR

#### 3.1. SRB SİTOTOKSİSİTE TESTİ BULGULARI

HCT116 kolon kanseri hücrelerine farklı konsantrasyonla tingenon molekülü uygulandı. 72 saatlik inkübasyon sonucunda hücreler SRB sitotoksosite testi için boyamaya alındı. Öncesinde hücrelerin morfolojik yapıları faz-kontrast mikroskopta incelenerek fotoğrafları alındı. Hücre soylarında 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda tingenon bileşiği uygulaması sonrası ortaya çıkan sonuçlar Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1:** Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Tingenon çözeltisinin faz-kontrast 10X mikroskop görüntüleri (NK: Negatif Kontrol)

SRB testi uygulaması sonucunda ortaya çıkan absorbans değerleri negatif kontrol’e göre % canlılık hesabı yapılmıştır. Bu değerlere göre sonraki aşamalarda kullanılmak üzere IC50 ve IC90 hesaplamaları tahmin edilmiştir. Tahmini IC50 (kontrol hücrelerine kıyasla tingenon bileşiği ile muamele sonrası hücrelerin %50’sini öldüren konsantrasyon) ve IC90 (kontrol hücrelerine kıyasla tingenon bileşiği ile muamele sonrası hücrelerin %90’ını öldüren konsantrasyon) değerleri sırasıyla  $13,27 \pm 2,1 \mu\text{M}$  ve  $16,91 \pm 3,6 \mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır. SRB verilerine göre, IC50 ve

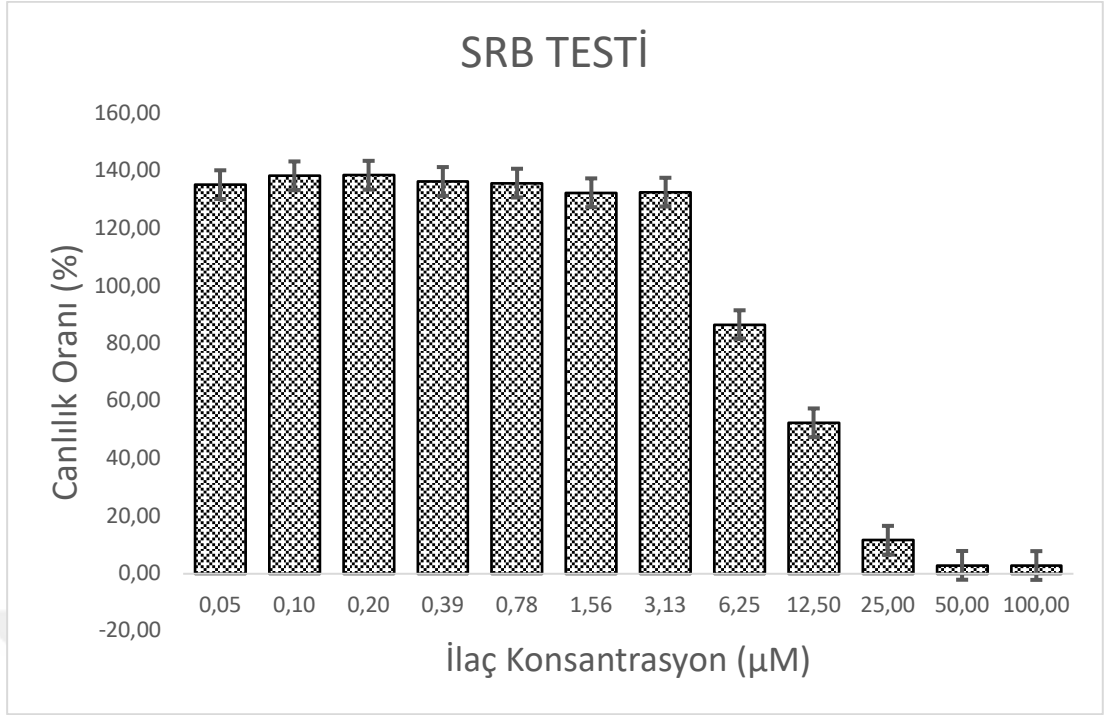
IC90 değerleri HCT116 hücre soylarında tingenon bileşiminin sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli bir parametredir.

**Tablo 3.1.** Tingenon molekülü uygulanan HCT-116 hücrelerinde SRB sitotoksiste testi sonuçlarına göre 72 saat tedavi süresindeki IC50 ve IC 90 değerleri.

<b>Doz (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>HCT-116</b>
IC <sub>50</sub>	13,27 $\pm$ 2,1
IC <sub>90</sub>	16,91 $\pm$ 3,6

Tingenon moleküllerinin 72 saat tedavi süresi boyunca hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmalara neden olduğu bulundu ( $p<0,001$ ). 72 saat tingenon tedavisi sonucunda bu hücrelerde doza bağlı olarak kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ( $p<0,05$ ;  $p<0,001$ ) (Şekil 3.2). HCT-116 hücrelerinde tingenon uygulaması sonucu 72 saatte ilk 6 düşük konsantrasyon (0,05-6,25  $\mu\text{M}$ ) dozları hücre canlılığında azalmaya neden olurken bu hücrelerde kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülmemiştir. Fakat, artan doza bağlı olarak kontrole kıyasla son 4 dozun 72 saat uygulaması sonucu hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar olduğu görülmüştür. Bu hücrelere 12.50, 25.00, 50.00, ve 100.00  $\mu\text{M}$  dozlarında tingenon uygulaması sonucu kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar bulunmuştur ( $p<0,05$ ;  $p<0,001$ ;  $p<0,001$ ;  $p<0,001$ ).





**Şekil 3.2.** Farklı dozlarda uygulanan Tingenon bileşiğinin HCT-116 hücrelerinde kontrole göre % canlılık oranları

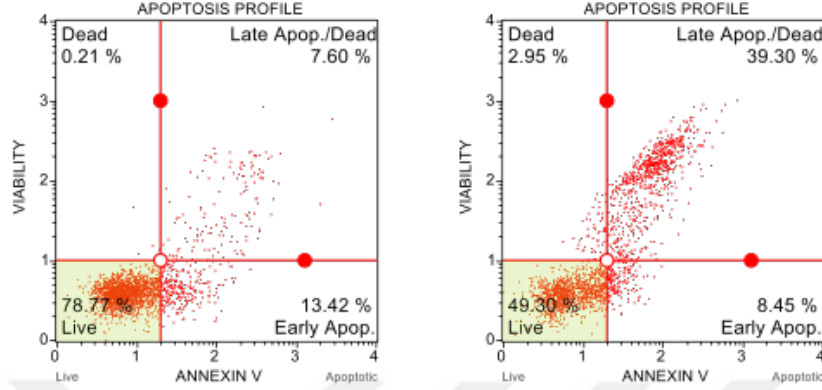
### 3.2. AKIM SİTOMETRİSİ TESTİ BULGULARI

Yapılan sitotoksosite testi sonucu IC90 konsantrasyonda dozun kolon kanseri hücreleri üzerinde ne gibi apoptotik mekanizmalarını etkilediğini daha iyi anlamak adına hüresel proteinlerine akış sitometri ile bakıldı.

#### 3.2.1. Anneksin-V Testi Bulguları

Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının akım sitometrisinde Anneksin-V aktivitesi değerlendirilmesi sonucunda; HCT116 hücrelerinin 48 saatlik tedavi sonrasında, tingenon molekülleri uygulandığında apoptotik hücre yüzdesi %21.02'den, %47.75'e yükselmiştir. Şekil 3.3'de görüldüğü üzere kolon kanseri hücreleri erken ve geç evre apoptoza giren hücre popülasyonu, kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir.

## HCT-116 KONTROL HCT-116 TİNGENON

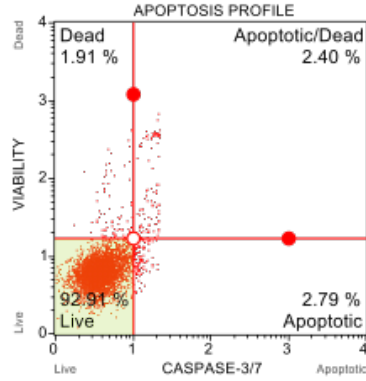


Şekil 3.3: Tingenon (16,91 µM) ile tedavi sonrasında kolon kanseri hücrelerinde Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Sol Üst=Nekroz, Sağ Üst=Geç Apoptoz, Sol Alt=% Canlılık, Sağ Üst=Erken Apoptoz)

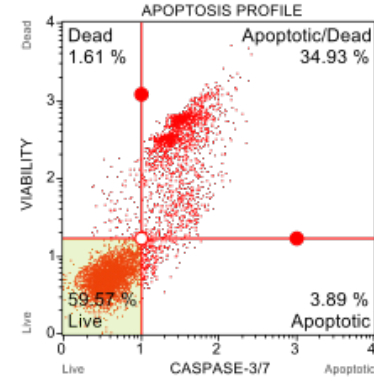
### 3.2.2. Kaspaz 3/7 Testi Bulguları

Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının akım sitometrisinde Kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirilmesi sonucunda; HCT116 hücrelerinin 48 saatlik tedavi sonrasında, tingenon molekülleri uygulandığında apoptotik hücre yüzdesi %5.19'dan, %38.82'ye yükselmiştir. Şekil 3.4'de görüldüğü üzere HCT-116 hücrelerinde erken ve geç evre apoptoza giren hücre popülasyonu, kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir.

### HCT-116 KONTROL



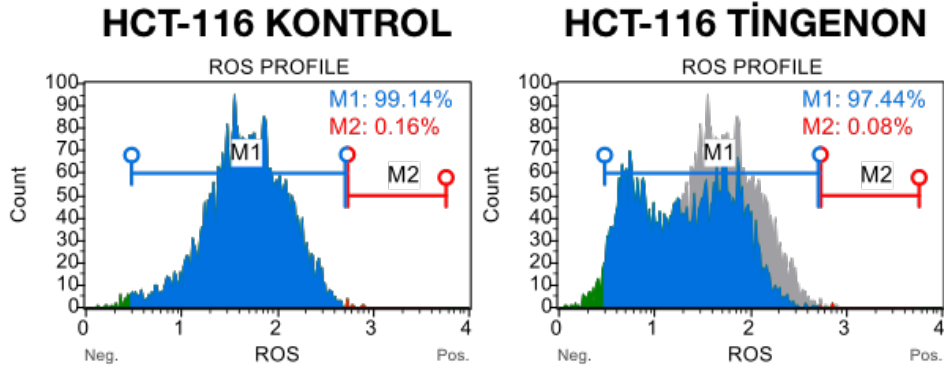
### HCT-116 TİNGENON



Şekil 3.4. Tingenon (16,91 µM) ile tedavi sonrasında kolon kanseri hücrelerinde Kaspaz değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Sol Üst=Nekroz, Sağ Üst=Geç Apoptoz, Sol Alt=% Canlılık, Sağ Üst=Erken Apoptoz)

### 3.2.3. ROS Testi Bulguları

Meydana gelen hücre ölümlerinin ROS kaynaklı mı yoksa değil mi sorusuna yanıt olarak akım sitometrisinde ROS miktarı incelendi (Şekil 3.5). HCT-116 hücrelerinde tingenon bileşiği uygulamasının kontrole kıyasla ROS miktarında bir değişime neden olmadığı görüldü (Kontrol ROS miktarı: % 0,16; Tingenon ROS miktarı: %0,08).



Şekil 3.5: Tingenon (16,91 µM) ile tedavi sonrasında kolon kanseri hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramı. M1: ROS negatif hücreler; M2: ROS pozitif hücreler

### 3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler Graph Pad programı ile one-way ANOVA testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  değerine göre belirlendi.

#### 4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolorektal kanser, yetişkinler arasında kanserden kaynaklanan ikinci ölüm nedenidir. Hastalık, yüksek dereceli displazili ileri bir adenomda gelişen ve daha sonra invaziv bir kansere ilerleyen, iyi huylu bir adenomatous polip olarak başlar. Apoptoz hücreler arası sağlıklı bir dengeyi korumak için önemlidir. Apoptotik yolun değerlendirilmesi, birçok kanserin belirgin bir işareti olarak belirlenmiştir. Kolorektal kanser gelişiminde en önemli etken bağırsak epitel hücre homeostazını koruyan apoptozisin dengesinin giderek bozulmasıdır (Abraha & Ketema, 2016). Apoptozis yetersizliğinin kolorektal kanserin evriminde ve kemoterapi ve radyasyona zayıf cevabında önemli bir faktör olabileceği hipotezini desteklemek için kanıtlar giderek artmaktadır (Zhang & Yu, 2013). Kanser tedavisinde apoptotik yolağı hedeflemenin diğer bir nedeni, bu işlemin kanser hücrelerinde düzenlendiği, normal hücrelerde düzenlenmediği gözlemine dayanmaktadır. Sonuç olarak, hedef hücrelerde apoptozu uyarmak için tasarlanan kolorektal kanser tedavileri, gelişimini ve ilerlemesini kontrol etmede kritik bir rol oynayacaktır. Apoptotik sinyal yollarının ve kanser hücrelerinin apoptotik ölüme neden olduğu mekanizmaların daha iyi anlaşılması, minimal toksisite ve kemoterapiye yüksek yanıtlarla kanser hücresi çoğalmasımı inhibe etmek için etkili terapötik stratejilere yol açabilir (Abraha & Ketema, 2016).

Kemoterapötik tedavilerindeki ilerlemelere rağmen, çoğu hasta, başlıca yan etkiler veya çoklu ilaç direnci nedeniyle kemoterapide başarısız olur, bu yüzden antikanser aktivitesi olan, daha etkili ve daha küçük yan etkilere sahip yeni moleküller için araştırmanın gerekliliğini ve önemini kanıtlamaya gerek duyulmaktadır. Bitki sekonder metabolitlerinden türetilen çeşitli bileşikler, kansere karşı kemoterapide yaygın olarak kullanılır ve bu doğal ürünler, yeni moleküller için araştırmada önemli bir rol oynamaktadır (Rodrigues vd., 2019).

Bu tez çalışmasında, farklı türevleri apoptotik etki gösteren doğal aktif Tingenon molekülünün insan kolon kanseri hücre hattı üzerine olan sitotoksik/apoptotik etkisi araştırılmıştır. Bu etkinin araştırılması için öncelikle İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde bulunan önceden karakterize edilmiş hücre hatları çözümlere kültür işlemleri yapılmıştır. Hücrelerin ilk pasajından sonra, daha önce kolon kanseri üzerinde denenmemiş olan doğal aktif bileşenimizin sitotoksik etkisinin

olup olmadığını belirlemek için SRB testi uygulanmıştır. SRB yöntemi, 1990'da geliştirilmesinden bu yana, hücre bazlı çalışmalarda sitotoksiteyi araştırmak için çeşitli tarama deneylerinde kullanılan bir yöntemdir (Orellana & Kasinski, 2016). SRB testi sonuçlarına göre, canlılık düşük konsantrasyonların insan kolon karsinoma hücrelerinde önemli bir ölüme sebep olmadığı gözlenmiştir. Fakat 6,25  $\mu\text{M}$ 'lık dozun üst seviyelerinde gittikçe artan bir ölüm oranı gözlenmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında, tingenon ve benzeri diğer bileşiklerin (22-hidroksitingenon ve pristimerin) çeşitli kanser hatları üzerinde  $\text{IC}_{50}$  dozları 0.1-0.6  $\mu\text{M}$  arasında değişmektedir. Bu farklılık, elde edilen ekstraktın saflığı açısından değişiklik göstermiş olabilir. Ayrıca, bu moleküllerin stabilitesi hakkında henüz detaylı bir bilgi bulunmamaktadır. Fakat, Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü'ndeki antikanser tarama programına göre, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'nin altında  $\text{IC}_{50}$  değerlerine sahip ham bir ekstrakt antikanser ilaç geliştirme aracı olarak ümit verici olarak kabul edilmektedir (Rodrigues vd., 2019). SRB testine göre  $\text{IC}_{50}$  değeri  $13,27 \pm 2,1 \mu\text{M}$  olarak tahmin edilmektedir. Bu sonuçlara göre elimizdeki tingenon ekstratı uygun bir antikanser ilacı olarak değerlendirilebilmektedir. Farklı konsantrasyonda uygulanan bu çalışmada şekil.. de görüldüğü gibi hücreler artan dozlarda morfolojik yapılarının bozularak öldüğü gözlenmiştir. Bu ölümlerin nasıl olduğunu araştırmaları için diğer deneysel adımlara geçilmiştir. Apoptosis belirteçlerinden en önemlisi olan Anneksin-V, akım sitometrisi ile izlenmiştir. Sonuçlarda canlılık yüzdesinde azalma, hem de apoptotik hücre oran yüzdesinde artış belirlenmiştir. Fakat Anneksin-V tek başına apoptoz belirteci olarak değerlendirilmektedir. Çünkü nekroza giden hücrelerde de Anneksin-V bağlanması görülmektedir. Bu yüzden gelecek çalışmalarda PI boyaması ile desteklenmesi gerekmektedir. Aynı şekilde kontrol ve tedavi hücrelerinde Kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirilmiştir. Akım sitometrisine göre sonuçlar göz önüne alındığında, kontrole göre canlı hücre oranında azalış ve apoptoza giden hücrelerde artış gözlenmiştir. Son olarak, ROS seviyeleri incelendiğinde hücrelerin herhangi bir oksidatif strese maruz kalmadığı gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar ışığında, çalışmanın en önemli özelliği kullanılan tingenon molekülünün kolon kanseri hücre soyunda (HCT-116) güçlü bir sitotoksik aktiviteye sahip olmasıyla beraber apoptoza gittiği gözlenmiştir. Gomes J.P.M ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada pristimerin molekülü kanser hücrelerinde DNA hasarına sebep olarak apoptoza gittiğini ileri sürmüşlerdir. Pristimerin bir tingenon türevi olduğundan ve benzer kimyasal yapıya sahip olduklarından aynı etkinin de gözlenmesi sorusu ROS seviyeleri düşük çıkmasından

dolayı göz ardı edilmektedir. Tingenon molekülü HCT-116 hücrelerinde DNA hasarına sebep olsaydı ROS seviyelerinde artış gözlenmesi gerekmektedir (Yang vd., 2018). Fakat ROS seviyelerine bakıldığında böyle bir artış gözlemlenmediği için hücreler dış faktörler yoluyla apoptoza gittiğini öne sürebiliriz. Kaspaz 3/7 aktivitelerinde önemli artış hücre yüzeyinde apoptozun indüklenmesine öncülük eden hücre yüzeyi proteinlerine bağlanıp hücre içi kaskad mekanizmasını başlatması olabilir. Veya mitokondriden sitokrom c'lerin salınımıyla kaspaz 9'un kaspaz 3/7'leri aktifleştirmesi ve böylelikle apoptozu indüklemesi ihtimaller arasında düşünülmektedir (Shi, 2004). Bu yollardan hangisinin olduğunu belirlemek için sitokrom c düzeyleri incelenmesi gerekmektedir. Ayrıca, sitokeratinler de kanser tanısında kullanılan bir proteindir. Apoptoz sırasında hücre iskeletinin parçalanmasında önemli rol oynayan CK18 (Sitokeratin 18), sadece apoptoz sırasında aktifleşen bir proteindir. Apoptoz sırasında kaspazların yardımıyla CK18 proteini kırılır. M30 antikoru bu kırılmış proteinleri tanıyarak, apoptoz belirteç olarak kullanılabilir (Tabuchi vd., 2010). Morita ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Tingenon ve Pristimerinin, insan miyelom RPMI8226 hücrelerinin tubulin polimerizasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (Rodrigues vd., 2019). Bu yüzden, apoptozun varlığını göstermek için ileri çalışmalarda M30 antijen testi de yapılması düşünülmektedir. Son olarak, mTOR protein kompleksi hücrelerin büyümesinde ve metabolik aktivitelerinde önemli bir rol oynayan bir proteindir. mTOR, protein sentezi ve hücre büyümesini düzenlemek için büyüme faktörü seviyeleri, oksijen seviyeleri ve besin ve enerji kullanılabilirliği gibi çeşitli sinyalleri birleştirir (Crino, 2016). mTOR proteini bir dizi kinaz kaskadı tarafından düzenlenmektedir. Bu zincirde görevli önemli iki protein PI3K ve Akt proteinleridir. AKT/ mTOR sinyal yolağı otofajinin negatif düzenleyicisidir. Fakat, sadece otofajiye özgü değildir. Aynı zamanda apoptoz sürecinde de önemli rol oynamaktadırlar (Crino, 2016). PI3K/Akt/mTOR/p70S6K sinyal yolağının hem otofaji hem de apoptoz sürecindeki rolünü araştırmak amacıyla akım sitometrisi yapılması ölüm yolunu belirlemede önemli katkısı bulunacaktır.

Bu tez çalışmasının sonuçlarından yola çıkarak, Tingenon molekölü insan kolon hücre soyunda (HCT-116) güçlü bir apoptotik etkiye neden olduğu, fakat kesin olarak apoptoza girdiğini yapılan deneyler ile yorumlanmamaktadır. Fakat, literatür bilgilerine göre önceki diğer türevlerinin yeni antikanser tedavisi ilacı olarak değerlendirilebileceklerini ifade etmektedirler (Rodrigues vd., 2019). Bu çalışma; tingenon bileşiminin yeni bir terapötik hedef olabileceğini açıkça ortaya konulamamaktadır. Bir sonraki inceleme basamağı olarak bu bileşimin moleküler düzeyde hücrenin sağkalım ve ölüm süreçlerinde farklı moleküler hedefleri de kanıtlanmasıyla bu çalışmanın sonuçları kolon kanseri üzerinde de tingenon'un etkisini netleştirebiliriz



## KAYNAKLAR

Abraha, A. M., & Ketema, E. B. (2016). Apoptotic pathways as a therapeutic target for colorectal cancer treatment. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8(8), 583.

Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017, Şubat 17). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. Taylor and Francis Ltd.

Al-Shamsi, H. O., Jones, J., Fahmawi, Y., Dahbour, I., Tabash, A., Abdel-Wahab, R., ... Wolff, R. A. (2016). Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, TP53, and APC somatic gene mutations in Arab patients with colorectal cancer: Determination of frequency and distribution pattern. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 7(6), 882–902.

Amaral, J. D., Xavier, J. M., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. (2010). The Role of p53 in Apoptosis. *Discovery Medicine*, 9(45), 145–152.

Amin, A., Gali-Muhtasib, H., Ocker, M., & Schneider-Stock, R. (2009). Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 5(1), 1–11.

Aykan, N. F., Yalcin, S., Turhal, N. S., Özdoğan, M., Demir, G., Özkan, M., ... Dişçi, R. (2015). Epidemiology of colorectal cancer in Turkey: A cross-sectional disease registry study (a Turkish oncology group trial). *Turkish Journal of Gastroenterology*, 26(2), 145–153.

Bastide, N. M., Pierre, F. H. F., & Corpet, D. E. (2011). Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 4(2), 177–184.

Bavovada, R., Blaskó, G., Shieh, H.-L., Pezzuto, J., & Cordell, G. (1990). Spectral Assignment and Cytotoxicity of 22-Hydroxytingenone from *Glyptopetalum sclerocarpum*. *Planta Medica*, 56(04), 380–382.

Bhome, R., Mellone, M., Emo, K., Thomas, G. J., Sayan, A. E., & Mirnezami, A. H. (2018). The Colorectal Cancer Microenvironment: Strategies for Studying the Role of Cancer-Associated Fibroblasts BT - Colorectal Cancer: Methods and Protocols. İçinde J.-F. Beaulieu (Ed.) (ss. 87–98). New York, NY: Springer New York.

Bogaert, J., & Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of gastroenterology*, 27(1), 9–14.



- Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, *138*(6), 2073-2087.e3.
- Botteri, E., Iodice, S., Bagnardi, V., Raimondi, S., Lowenfels, A. B., & Maisonneuve, P. (2008). Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*, *300*(23), 2765–2778.
- Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E., & Boise, L. H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*, *14*(1).
- Brocardo, M., & Henderson, B. R. (2008). APC shuttling to the membrane, nucleus and beyond. *Trends in cell biology*, *18*(12), 587–596.
- Caldas, C., & Venkitaraman, A. R. (2001). Tumor Suppressor Genes. İçinde *Encyclopedia of Genetics* (ss. 2081–2088). Elsevier.
- Calvisi, D. F., Ladu, S., Conner, E. A., Seo, D., Hsieh, J. T., Factor, V. M., & Thorgeirsson, S. S. (2011). Inactivation of Ras GTPase-activating proteins promotes unrestrained activity of wild-type Ras in human liver cancer. *Journal of Hepatology*, *54*(2), 311–319.
- Çefle, K. (y.y.). Kanser Genetiği.
- Chen, J., Guo, F., Shi, X., Zhang, L., Zhang, A., Jin, H., & He, Y. (2014). BRAF V600E mutation and KRAS codon 13 mutations predict poor survival in Chinese colorectal cancer patients. *BMC cancer*, *14*, 802.
- Cole, L., & Kramer, P. R. (2016). Human Cancers and Carcinogenesis. İçinde *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine* (ss. 197–200). Elsevier.
- Crino, P. B. (2016). The mTOR signalling cascade: paving new roads to cure neurological disease. *Nature reviews. Neurology*, *12*(7), 379–392.
- Cross, A. J., Boca, S., Freedman, N. D., Caporaso, N. E., Huang, W.-Y., Sinha, R., ... Moore, S. C. (2014). Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*, *35*(7), 1516–1522.
- Dameron, K. M., Volpert, O. V, Tainsky, M. A., & Bouck, N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science (New York, N.Y.)*, *265*(5178), 1582–1584.
- Denekamp, J. (1993). Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *The British journal of radiology*, *66*(783), 181–196.
- Diñçel, G. Ç., & Kul, O. (2016). *Patolojik Apoptozis ve Tanı Yöntemleri*.

*Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi / Gümüşhane University Journal of Health Sciences (C. 5).*

Du, W., & Pogoriler, J. (2006, Ağustos 28). Retinoblastoma family genes. *Oncogene*. El-Kenawi, A. E., & El-Remessy, A. B. (2013a). Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales. *British journal of pharmacology*, 170(4), 712–729.

El-Kenawi, A. E., & El-Remessy, A. B. (2013b). Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales. *British journal of pharmacology*, 170(4), 712–729.

Fernández-Medarde, A., & Santos, E. (2011). Ras in cancer and developmental diseases. *Genes and Cancer*.

Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(3), 153–173.

Fridman, J. S., & Lowe, S. W. (2003, Aralık 8). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*.

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(3), 178–194.

Goodrich, D. W. (2006, Ağustos 28). The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene*.

Grady, W. M., & Carethers, J. M. (2008). Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*. W.B. Saunders.

Gryfe, R., Bapat, B., Gallinger, S., Swallow, C., Redston, M., & Couture, J. (1997a). Molecular biology of colorectal cancer. *Current Problems in Cancer*, 21(5), 233–299.

Gryfe, R., Bapat, B., Gallinger, S., Swallow, C., Redston, M., & Couture, J. (1997b). Molecular biology of colorectal cancer. *Current Problems in Cancer*, 21(5), 233–299.

Haselsberger, K., Peterson, D. C., Thomas, D. G., & Darling, J. L. (1996). Assay of anticancer drugs in tissue culture: comparison of a tetrazolium-based assay and a protein binding dye assay in short-term cultures derived from human malignant glioma. *Anti-cancer drugs*, 7(3), 331–338.

Herzig, D. O., & Tsikitis, V. L. (2015). Molecular markers for colon diagnosis, prognosis and targeted therapy. *Journal of surgical oncology*, 111(1), 96–102.

Islam, F., Gopalan, V., & Lam, A. K.-Y. (2019). C06 Cancer Stem Cells: Role

in Tumor Progression and Treatment Resistance. İçinde *Oncogenomics* (ss. 77–87). Elsevier Inc.

Jiang, Z. S., Sun, Y. Z., Wang, S. M., & Ruan, J. S. (2017). Epithelial-mesenchymal transition: Potential regulator of ABC transporters in tumor progression. *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher.

Johns, L. E., & Houlston, R. S. (2001). A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *The American Journal of Gastroenterology*, *96*(10), 2992–3003.

Júnior, R. F. de A., Oliveira, A. L. C. de S. L., Pessoa, J. B., Garcia, V. B., Guerra, G. C. B., Soares, L. A. L., ... de Araújo, A. A. (2013). Maytenus ilicifolia dry extract protects normal cells, induces apoptosis and regulates Bcl-2 in human cancer cells. *Experimental Biology and Medicine*, *238*(11), 1251–1258.

Kalyan, A., Kircher, S., Shah, H., Mulcahy, M., & Benson, A. (2018). Updates on immunotherapy for colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, *9*(1), 160–169.

Kara, M., & Oztas, E. (2019). Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Cell Death. İçinde *Programmed Cell Death [Working Title]*. IntechOpen.

Keepers, Y. P., Pizao, P. E., Peters, G. J., van Ark-Otte, J., Winograd, B., & Pinedo, H. M. (1991). Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, *27*(7), 897–900.

Kim, K. M., Lee, E. J., Ha, S., Kang, S. Y., Jang, K. T., Park, C. K., ... Odze, R. D. (2011). Molecular features of colorectal hyperplastic polyps and sessile serrated adenoma/polyps from Korea. *American Journal of Surgical Pathology*, *35*(9), 1274–1286.

Lao, V. V., & Grady, W. M. (2011, Kasım). Epigenetics and colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*.

Lee, Y. S., Jin, D. Q., Kwon, E. J., Park, S. H., Lee, E. S., Jeong, T. C., ... Kim, J. A. (2002). Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca<sup>2+</sup> release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells. *Cancer Letters*, *186*(1), 83–91.

Li, J., & Yuan, J. (2008, Ekim 20). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*.

Li, W., Qiu, T., Zhi, W., Shi, S., Zou, S., Ling, Y., ... Lu, N. (2015). Colorectal carcinomas with KRAS codon 12 mutation are associated with more advanced tumor

stages. *BMC cancer*, 15, 340.

Liang, P. S., Chen, T.-Y., & Giovannucci, E. (2009). Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *International journal of cancer*, 124(10), 2406–2415.

Lillie, R. D. (Ralph D., Conn, H. J. (Harold J., & Biological Stain Commission. (1977). H.J. Conn's Biological stains : a handbook on the nature and uses of the dyes employed in the biological laboratory.

Little, M., Vineis, P., & Li, G. (2008). A stochastic carcinogenesis model incorporating multiple types of genomic instability fitted to colon cancer data. *Journal of Theoretical Biology*, 254, 229–238.

Lowe, S. W., & Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. Oxford University Press.

Máñez, S., Recio, M. C., Giner, R. M., & Ríos, J. L. (1997). Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 334(1), 103–105.

Marley, A. R., & Nan, H. (2016). Epidemiology of colorectal cancer. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 7(3), 105–114.

Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Dieste, A. P., Cerrada, E., & Yoldi, M. J. R. (2017, Ocak 19). Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG.

Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodriguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 197.

Maximov, G. K., & Maximov, K. G. (2008). The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 22(2), 664–668.

McCaffrey, T. A., Agarwal, L. A., & Weksler, B. B. (1988). A rapid fluorometric DNA assay for the measurement of cell density and proliferation in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 24(3), 247–252.

McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), 1–28.

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., ... Vaigro-Wolff, A. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a

diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), 757–766.

*Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit User's Guide Catalog No. MCH100105 (100 Tests)*. (y.y.). Tarihinde adresinden erişildi [www.millipore.com](http://www.millipore.com)

*Muse™ Caspase-3/7 Kit User's Guide Catalog No. MCH100108 (100 Tests)*. (y.y.). Tarihinde adresinden erişildi [www.millipore.com/muse](http://www.millipore.com/muse).

Nagase, M., Oto, J., Sugiyama, S., Yube, K., Takaishi, Y., & Sakato, N. (2003). Apoptosis induction in HL-60 cells and inhibition of topoisomerase II by triterpene celastrol. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(9), 1883–1887.

Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research*, 256(1), 12–18.

Ogino, S., Nosho, K., Kirkner, G. J., Kawasaki, T., Meyerhardt, J. A., Loda, M., ... Fuchs, C. S. (2009). CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*, 58(1), 90–96.

Orellana, E. A., & Kasinski, A. L. (2016). Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio-protocol*, 6(21).

Özay GÜLEŞ, Ü. E. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, (2), 73–78.

Perez, R. P., Godwin, A. K., Handel, L. M., & Hamilton, T. C. (1993). A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 29A(3), 395–399.

Plumb, J. A., Milroy, R., & Kaye, S. B. (1989). Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer research*, 49(16), 4435–4440.

Porru, M., Pompili, L., Caruso, C., Biroccio, A., & Leonetti, C. (2018). Targeting kras in metastatic colorectal cancer: Current strategies and emerging opportunities. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 37(1).

Prakash, O., Bardot, S. F., & Cole, J. T. (2007). Chicken sarcoma to human cancers: a lesson in molecular therapeutics. *The Ochsner journal*, 7(2), 61–64.

Prieto-Vila, M., Takahashi, R.-U., Usuba, W., Kohama, I., & Ochiya, T. (2017a). Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *International journal of molecular sciences*, 18(12).

Prieto-Vila, M., Takahashi, R. U., Usuba, W., Kohama, I., & Ochiya, T. (2017b, Aralık 1). Drug resistance driven by cancer stem cells and their niche. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG.

Rabi, T., & Bishayee, A. (2009, Mayıs). Terpenoids and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Research and Treatment*.

Rajasekharan, S. K., & Raman, T. (2013). Ras and Ras mutations in cancer. *Central European Journal of Biology*.

Reed, J. C. (2000). Mechanisms of Apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157(5), 1415–1430.

Rennoll, S. (2015). Regulation of MYC gene expression by aberrant Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in colorectal cancer. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(4), 290.

Rich, J. N. (2016). Cancer stem cells: Understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins.

Rodrigues, A. C. B. da C., Oliveira, F. P. de, Dias, R. B., Sales, C. B. S., Rocha, C. A. G., Soares, M. B. P., ... Bezerra, D. P. (2019). In vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith (Celastraceae). *Journal of ethnopharmacology*, 231, 516–524.

Rubinstein, L. V, Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Skehan, P., ... Boyd, M. R. (1990). Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1113–1118.

Santarelli, R. L., Pierre, F., & Corpet, D. E. (2008). Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and cancer*, 60(2), 131–144.

Seitz, H. K. (2004). G. PÖSCHL and H. K. SEITZ\*. *Online*, 39(3), 155–165.

Shi, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Science*, 13(8), 1979–1987.

Shim, M. K., Yoon, H. Y., Lee, S., Jo, M. K., Park, J., Kim, J. H., ... Kim, K. (2017). Caspase-3/-7-Specific Metabolic Precursor for Bioorthogonal Tracking of Tumor Apoptosis. *Scientific Reports*, 7(1).

Shirota, O., Morita, H., Takeya, K., Itokawa, H., & Iitaka, Y. (1994). Cytotoxic aromatic triterpenes from *maytenus ilicifolia* and *maytenus chuchuhuasca*. *Journal of*

*Natural Products*, 57(12), 1675–1681.

Shortt, J., & Johnstone, R. W. (2012). Oncogenes in cell survival and cell death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12).

Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1348(1), 20–31.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., ... Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107–1112.

Stojnev, S., Risti-Petrovi, A., & Jankovi-Velikovi, L. (2013). VOJNOSANITETSKI PREGLED Strana 675 Reactive oxygen species, apoptosis and cancer Reaktivne vrste kiseonika, apoptoza i kancer. *Vojnosanit Pregl*, 70(7), 675–678.

Szegezdi, E., Fitzgerald, U., & Samali, A. (2003). Caspase-12 and ER-Stress-Mediated Apoptosis: The Story so Far. İçinde *Annals of the New York Academy of Sciences* (C. 1010, ss. 186–194). New York Academy of Sciences.

Tabuchi, M., Tomioka, K., Kawakami, T., Murakami, Y., Hiramatsu, M., Itoshima, T., ... Tsukamoto, I. (2010). Serum cytokeratin 18 M30 Antigen Level and Its Correlation with Nutritional Parameters in middle-aged Japanese males with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 56(5), 271–278.

Taddeo, V., Castillo, U., Martínez, M., Menjivar, J., Jiménez, I., Núñez, M., & Bazzocchi, I. (2019). Development and Validation of an HPLC-PDA Method for Biologically Active Quinonemethide Triterpenoids Isolated from *Maytenus chiapensis*. *Medicines*, 6(1), 36.

The Cancer Genome Atlas Network, Kucherlapati, R., Wheeler, D., Muzny, D. M., Bainbridge, M. N., Chang, K., ... Others. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407), 330–337.

Toon, C. W., Chou, A., Clarkson, A., DeSilva, K., Houang, M., Chan, J. C. Y., ... Gill, A. J. (2014). Immunohistochemistry for myc predicts survival in colorectal cancer. *PloS one*, 9(2), e87456.

Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Rüschoff, J., ... Srivastava, S. (2004). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability.

*Journal of the National Cancer Institute*, 96(4), 261–268.

Van der Jeught, K., Xu, H.-C., Li, Y.-J., Lu, X.-B., & Ji, G. (2018). Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 24(34), 3834–3848.

Van Der Jeught, K., Xu, H. C., Li, Y. J., Lu, X. Bin, & Ji, G. (2018, Eylül 14). Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co., Limited.

Vélez-Cruz, R., & Johnson, D. G. (2017, Ağustos 16). The retinoblastoma (RB) tumor suppressor: Pushing back against genome instability on multiple fronts. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG.

Veloso, C. C., Soares, G. L., Perez, A. C., Rodrigues, V. G., & Silva, F. C. (2017). Pharmacological potential of maytenus species and isolated constituents, especially tingenone, for treatment of painful inflammatory diseases. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. Sociedade Brasileira de Farmacognosia.

Wang, H. L., Lopategui, J., Amin, M. B., & Patterson, S. D. (2010). KRAS mutation testing in human cancers: The pathologist's role in the era of personalized medicine. *Advances in anatomic pathology*, 17(1), 23–32.

Weisenberger, D. J., Siegmund, K. D., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., ... Laird, P. W. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature genetics*, 38(7), 787–793.

Whitson, E. L., Mala, S. M. V. D., Veltri, C. A., Bugni, T. S., De Silva, E. D., & Ireland, C. M. (2006). Oppositines A and B, sesquiterpene pyridine alkaloids from a Sri Lankan *Pleurostyliia opposita*. *Journal of Natural Products*, 69(12), 1833–1835.

Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2010). Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology*. American Physiological Society.

Wojtala, A., Bonora, M., Malinska, D., Pinton, P., Duszynski, J., & Wieckowski, M. R. (2014). Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. *Conceptual background and bioenergetic/mitochondrial aspects of oncometabolism*, 542, 243–262.

Wolpin, B. M., & Mayer, R. J. (2008). BASIC AND CLINICAL Systemic Treatment of Colorectal Cancer, 1296–1310.

Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*.



Wu, C. C., Chan, M. L., Chen, W. Y., Tsai, C. Y., Chang, F. R., & Wu, Y. C. (2005). Pristimerin induces caspase-dependent apoptosis in MDA-MB-231 cells via direct effects on mitochondria. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(8), 1277–1285.

Yang, H., Villani, R. M., Wang, H., Simpson, M. J., Roberts, M. S., Tang, M., & Liang, X. (2018, Kasim 1). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. BioMed Central Ltd.

Zhang, L., & Yu, J. (2013). Role of apoptosis in colon cancer biology, therapy, and prevention. *Current colorectal cancer reports*, 9(4).

