

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**CURCUMA LONGA (ZERDEÇAL) BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN  
KURKUMİN ETKEN MADDESİNİN KOLON KANSERİ HÜCRE HATTI  
ÜZERİNE APOPTOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Gülçin YAVUZ TÜREL  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU**

**İKİNCİ DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Dilek BAYRAM**

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimi tarafından 4693-D2-16 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**Tez. No: 165**

**ISPARTA – 2017**

## KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28.11.2017

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU

SDÜ, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD

ÜYE: Prof.Dr. Aynur BAŞALP

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Bil. Fakültesi, Sağlık Yönetimi AD

ÜYE: Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR

SDÜ, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD

ÜYE: Doç. Dr. Zehra SAFİ ÖZ

Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD

ÜYE: Yrd. Doç.Dr. Dilek BAYRAM

SDÜ, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa KAYAN

Enstitü müdürü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından, yapımına ve yazımına kadar geçen tüm aşamalarda herhangi bir etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki tüm bilgileri akademik ve etik kurallar dahilinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı ve son olarak tezin yapılması ve yazımı sırasında patent ve telif hakları ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

“*Curcuma longa* (zerdeçal) Bitkisinden Elde Edilen Kurkumin Etken Maddesinin Kolon Kanseri Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkisinin Araştırılması” adlı doktora tezi Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü tez önerisi ve yazma yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

### Tezi Hazırlayan

Gülçin YAVUZ TÜREL



İmza

### Danışman

Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU



İmza

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın aslında bir başlangıcı olan lisansüstü eğitim sürecimin sonuna gelmiş bulunmaktayım. Bu süreç boyunca verdiğim her emeği gözeten, desteğini, yardımlarını, bilgilerini asla esirgemeyen, her koşulda gözlenebilen neşesi ve herkese karşı tükenmeyen samimiyetiyle gönlümde yeri olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU'na,

Tez konum belirlendiği andan itibaren yardımını, bilgilerini ve tüm çalışma koşullarını paylaşan, her konuda desteğini gördüğüm ikinci danışman hocam Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dilek BAYRAM'a, çalışmak istediğimiz her konuda bizlere ışık tutan, tüm imkanları zorlayıp arkamızda duran ve bilgi birikimini esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız saygıdeğer Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e, her konuda desteğini ve bilgisini paylaşan, kardeş gibi sahiplenen, derdimizi yorulmadan, bıkmadan dinleyen ve çözmek için elinden gelen her şeyi yapan sayın hocam Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR'a, Anabilim Dalımıza bilgi birikiminden ve daha önemlisi dostluğundan mahrum kalmam nedeniyle benim için geç katılan, her konuda destek olan sayın hocam Doç.Dr. Nilgün GÜRBÜZ'e, lisansüstü öğrenimimin ilk gününden itibaren her anımızı paylaştığımız, tez çalışmamın hücre kültürü kısmında desteğini esirgemeyen, kardeşim, değerli dostum Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Meltem ÖZGÖÇMEN'e, başladığım ilk andan bu yana hep yanımda olan, hayata dair mutlu anlarımızı aynı zamanlarda paylaştığımız, yol arkadaşım Arş. Gör. Dilek AŞCI ÇELİK'e, sadece mesai saatlerini paylaşmanın çok dışına çıkmış, birbirimize her zaman destek olduğumuz ve olacağımız, en kötü zamanlarda bile moral kaynaklarım olan dostlarım Arş. Gör. Eda EVGEN TÜLÜCEOĞLU, Arş Gör. Vehbi Atahan TOĞAY ve Arş. Gör. Yasemin ÇİÇEK'e,

İlk günden bu yana koşulsuz arkamda olan aileme, eşim Engin TÜREL'e ve hayatımda gerçekleştirmek istediğim her şeyin sebebi haline gelen, herşeye anlam katan kızım Gülin'e SONSUZ TEŞEKKÜRLER.

## İÇİNDEKİLER

<b>KABUL ve ONAY SAYFASI</b> .....	<b>ii</b>
<b>BEYAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>v</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Kolon ve Rektum Kanseri.....	3
2.2. Kolon ve Rektum Kanseri Gelişiminde Rol Alan Moleküler Mekanizmalar .....	4
2.3. Apoptoz .....	6
2.3.1. Apoptotik Regülatörler .....	8
2.3.1.1. Ölüm Reseptörleri .....	8
2.3.1.2. Antiapoptotik Proteinler .....	9
2.3.1.3. Proapoptotik Proteinler .....	10
2.3.1.4. Kaspazlar .....	10
2.4. Kolon Kanseri Apoptoz .....	13
2.5. Kolon Kanseri Tedavisinde Kullanılan Apoptotik Mekanizmalar Üzerinde Etkili Fitoterapötik Ajanların Önemi .....	15
2.6. Kurkumin.....	16
2.6.1. Kurkuminin Hücresel Etki Mekanizmaları ve Apoptoz ile İlişkisi .....	18
2.6.2. Kurkumin ve Kolon Kanseri Üzerine Etkileri .....	23
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>26</b>
3.1. Hücre Kültürü ve İmmünohistokimya Deneyi .....	26
3.1.1. Kullanılan Gereçler .....	26

3.1.2. Cihazlar .....	28
3.1.3. Yöntem .....	28
3.1.3.1. Hücre Hattının Temini, Açılması ve Kültür Ortamı Oluşturulması ...	28
3.1.3.2. Hücrelerin inkübasyonu, çoğaltılması ve pasaj işlemleri.....	29
3.1.3.3. Hücrelerin Sayımı .....	30
3.1.3.4. Hücrelerin Dondurulma İşlemi .....	31
3.1.3.5. Kurkumin'in Doz Belirleme Deneyi ve Deney gruplarının Oluşturulması .....	31
3.1.3.6. Hücre Kültürlerinde 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BrdU) İle İmmünohistokimyasal İşaretleme .....	32
3.1.3.7. Hücre Kültürlerinde TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl.....	34
3.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT PCR) ve Apoptotik Gen Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi .....	36
3.2.1. Kullanılan Gereçler.....	36
3.2.2. Cihazlar.....	36
3.2.3. Yöntem .....	36
3.2.2.1. Hücrelerin Kültür Ortamından Toplanması ve RNA izolasyonu.....	36
3.2.2.2. cDNA Sentezi.....	38
3.2.2.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT PCR).....	40
3.2.2.4. İstatistiksel Analiz.....	44
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>45</b>
4.1. Kurkumin Doz Belirleme Deneyi Bulguları .....	45
4.2. Proliferasyon Deneyi Bulguları.....	45
4.3. 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BrdU) İşaretleme Bulguları.....	46
4.4. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End Labeling) Bulguları .....	49
4.5. Kantitatif Real Time PCR( QRT PCR) ve Gen Ekspresyon Bulguları.....	52
4.5.1. 24. Saat Kontrol Grubu ve Kurkumin Grubu Gen Ekspresyon Bulgularına ait Değişim .....	53
4.5.2. 48. Saat Kontrol Grubu ve Kurkumin Grubu Gen Ekspresyon Bulgularına ait Değişim .....	57
4.5.3. 72. Saat Kontrol Grubu ve Kurkumin Grubu Gen Ekspresyon Bulgularına ait Değişim .....	60

4.5.4. Kurkumin ve Kontrol Grupları Arasında Tüm Saat ve Doz Uygulamalarına ait İfade Değişimi Analizi .....	63
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>65</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>72</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>74</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>75</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>76</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>83</b>



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Apaf-1</b>	: Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü 1
<b>APC</b>	: Adenomatous polyposis coli
<b>AVEN</b>	: Apoptoz ve kaspaz aktivasyon inhibitörü
<b>Bax</b>	: BCL-2-associated x protein
<b>Bcl-2</b>	: B-cell lenfoma 2 ailesi proteinleri
<b>BRAF</b>	: B-RAF protoonkogen
<b>BrdU</b>	: 5-bromo-2'-deoksiüridin
<b>CAD</b>	: Kaspaz aktive edici deoksiribonükleaz
<b>CDK</b>	: Siklin-bağımlı kinaz
<b>CaCo-2</b>	: Kolon kanser hücreleri
<b>COX-1</b>	: Siklooksijenaz 1
<b>COX-2</b>	: Siklooksijenaz 2
<b>CRADD</b>	: Ölüm alanı olan Kaspaz 2 ve RIPK1 alan içeren adaptör
<b>Ct</b>	: Eşik döngü değeri
<b>ICAD</b>	: Kaspaz aktive edici deoksiribonükleaz inhibitörü
<b>IC50</b>	: İnhibisyon konsantrasyonu
<b>DFFA</b>	: DNA parçalanma faktörü alt birim alfa
<b>DIABLO</b>	: Düşük pl direkt IAP bağlayıcı protein
<b>DISC</b>	: Ölüm-başlatan sinyal kompleksi
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>EGF</b>	: Epidermal büyüme faktörü
<b>EGFR</b>	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
<b>FADD</b>	: Fas-ilişkili ölüm domaini
<b>FAP</b>	: Ailesel Adenomatöz polipoz
<b>Fas (CD95/APO-1)</b>	: Hücre yüzeyi ölüm reseptörü
<b>FasL</b>	: Fas ligandı
<b>FasR</b>	: Fas reseptörü
<b>FBS</b>	:Yenidoğan sığır serumu
<b>FLIP</b>	: FLICE inhibitör protein



<b>FLICE</b>	: FADD benzeri IL-1 $\beta$ dönüştürücü enzim
<b>HCT-8/VCR</b>	: Vincristin dirençli insan kolon kanser hücre hattı
<b>HNPCC</b>	: Herediter non-polipoz kolorektal kanseri
<b>HT-29</b>	: Kolon kanser hücre hattı
<b>IAP</b>	: Proteaz internal aktivatör
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>KCL</b>	: Potasyum klorür
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Mono potasyum fosfat
<b>K-RAS</b>	: Kirsten rat sarkom viral onkogen homolog
<b>LRDD (PIDD)</b>	: p53 indükleyici ölüm domain proteini
<b>LoVo</b>	: Lenf nodu metastazlı gelişmiş kolon kanser hücre hattı
<b>MAPK</b>	: Mitojen aktive protein kinazlar
<b>MDA-MB-231</b>	: İnsan meme adenokarsinom hücre hattı
<b>MDR-1</b>	: Çoklu ilaç direnç geni
<b>MCF-7</b>	: İnsan meme adenokarsinom hücre hattı
<b>MMP</b>	: Matriksmetalloproteinaz
<b>MMR</b>	: Yanlış eşleşme tamir genleri
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	: Nükleer faktör-kappa B
<b>NPCC</b>	: Herediter non-polipoz kolorektal karsinoma
<b>NuMA</b>	: Nükleer mitotik aparat protein
<b>PARP</b>	: Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
<b>PBS</b>	: Fosfat Tampon Salin
<b>PI3K</b>	: Fosfatidilinozitol (phosphatidylinositol) 3 kinaz
<b>Pgp</b>	: P glikoprotein
<b>IAP</b>	: Apoptoz inhibe ediciler
<b>PTEN</b>	: Fosfataz ve tensin homologu
<b>QRT-PCR</b>	: Kantitatif Real time polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>Smac</b>	: Kaspazların ikinci mitokondriyal aktivatörü
<b>STAT</b>	: Sinyal çevirici ve transkripsiyon aktivatörü
<b>SW 480</b>	: İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforme edici büyüme faktörü $\beta$

<b>TNF</b>	: Tumor nekroz faktör
<b>TP53</b>	: Tumor protein 53
<b>TRADD</b>	: TNFR-ilişkili ölüm bölgesi
<b>TRAIL</b>	: TNF-ilişkili apoptoz indüklü ligant
<b>TUNEL</b>	: Terminal Deoksiniükleotidil Transferaz (Tdt) Aracılı dUTP etiketleme



## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Kaspaz ailesi üyelerinin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması.....	11
<b>Tablo 2.</b> RNA denatürasyonu işlemi için hazırlanan karışımın içeriği .....	39
<b>Tablo 3.</b> cDNA eldesi için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği.....	39
<b>Tablo 4.</b> cDNA eldesi için hazırlanan Termal döngü cihazı programı.....	39
<b>Tablo 5.</b> Real time PCR reaksiyon karışımının hazırlanışı .....	41
<b>Tablo 6.</b> Real Time PCR cihaz protokolü .....	44



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> Ekstrinsik ve intrinsik yollar	13
<b>Şekil 2.</b> Kurkuminin yapısı	17
<b>Şekil 3.</b> Kurkuminin etki gösterdiği patolojik durumlar	19
<b>Şekil 4.</b> Kurkuminin etki gösterdiği farklı yollarda yer alan aşağı/yukarı yönde regülasyonunu sağladığı hedef moleküller	21
<b>Şekil 5.</b> Kurkuminin ekstrinsik ve intrinsik yollardaki moleküler hedefleri	22



## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> RealTime Ready Custom Panel ve primer dizaynı gerçekleştirilmiş apoptotik genlerin panel üzerinde bir örnek için gösterilmiş konumları...	41
<b>Resim 2.</b> Light cycler 96 cihazı .....	43
<b>Resim 3.</b> 24. Saat Kontrol Grubu; BrdU ile işaretlenen hücreler .....	47
<b>Resim 4.</b> 24 Saat Kurkumin; BrdU ile işaretlenen hücreler .....	48
<b>Resim 5.</b> 48 Saat Kontrol Grubu; BrdU ile işaretlenen hücreler .....	48
<b>Resim 6.</b> 48. Saat Kurkumin Grubu; BrdU ile işaretlenen hücreler .....	48
<b>Resim 7.</b> 72. Saat Kontrol Grubu; BrdU ile işaretlenen hücreler .....	49
<b>Resim 8.</b> 72 Saat Kontrol Grubu; BrdU ile işaretlenen hücreler .....	49
<b>Resim 9.</b> 24. Saat Kontrol Grubu; TUNEL ile işaretlenen hücreler .....	50
<b>Resim 10.</b> 24. Saat Kurkumin Grubu; TUNEL ile işaretlenen hücreler .....	51
<b>Resim 11.</b> 48. Saat Kontrol Grubu; TUNEL ile işaretlenen hücreler .....	51
<b>Resim 12.</b> 48. Saat Kurkumin Grubu; TUNEL ile işaretlenen hücreler .....	51
<b>Resim 13.</b> 72 Saat Kontrol Grubu; TUNEL ile işaretlenen hücreler .....	52
<b>Resim 14.</b> 72 Saat Kurkumin Grubu; TUNEL ile işaretlenen hücreler .....	52

## GRAFİKLER DİZİNİ

<b>Grafik 1.</b> SW 480 Hücreleri için Kurkumin Doz İnaktivasyon Grafiği.....	45
<b>Grafik 2.</b> Zamana Bağlı Hücre Proliferasyon Verileri.....	46
<b>Grafik 3.</b> BrdU işaretlenme indeksi .....	47
<b>Grafik 4.</b> TUNEL işaretlenme indeksi .....	50
<b>Grafik 5.</b> 24 saat kontrol grubu ve Kurkumin grubu kat değişikliği bulguları .....	54
<b>Grafik 6.</b> 24 saat Kurkumin ve Kontrol Grupları ifade düzeyi değişimlerine ait Saçılım Grafiği (Scatter Plot) .....	55
<b>Grafik 7.</b> Hiyerarşik Kümeleme Grafiği .....	56
<b>Grafik 8.</b> 48 saat Kurkumin grubunda kontrol grubuna göre gerçekleşen kat değişikliği .....	58
<b>Grafik 9.</b> 48 saat Kurkumin ve Kontrol Grupları ifade düzeyi değişimlerine ait saçılım grafiği (Scatter Plot).....	59
<b>Grafik 10.</b> Hiyerarşik Kümeleme Grafiği (Clustering plot).....	60
<b>Grafik 11.</b> 72 saat Kurkumin grubunda kontrol grubuna göre gerçekleşen kat değişikliği .....	61
<b>Grafik 12.</b> 72 saat Kurkumin ve Kontrol Grupları ifade düzeyi değişimlerine ait saçılım grafiği (Scatter Plot) .....	62
<b>Grafik 13.</b> Hiyerarşik Kümeleme Grafiği .....	63
<b>Grafik 14.</b> Kurkumin ve kontrol gruplarına ait tüm saatler ve dozlar için belirlenen hiyerarşik kümeleme grafiği.....	64

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir toplumu oluşturan her bireyin yaşamı boyunca bütün ihtiyaçlarını karşılayabilmesi, sosyal ilişkilerinde uyumlu ve yeterli olması, kişisel hedeflerine ulaşabilmesi, hayattan zevk alabilmesi ve kendi varlığına saygı duyması gibi kavramlara sahip olması yaşam kalitesi olarak adlandırılmaktadır (1, 2). Bireylerin yaşam kalitesini etkileyen genetik ve çevresel faktörler sonucu meydana gelen birçok hastalık bulunmaktadır. Bu hastalıklardan biri olan ve kontrolsüz hücre bölünmesi olarak tanımlanan kanser, günümüzde oldukça yaygınlaşmış yüksek morbidite ve mortalite göstermesi sebebiyle de önemi giderek artan bir sağlık ve yaşam sorunu haline gelmiştir (1). Yapılan çalışmalar kanser gelişiminde genetik ve çevresel birçok faktörün söz konusu olabileceğini göstermektedir. Kolon ve rektum kanserleri bu yönden en iyi aydınlatılmış kanser türlerindedir. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre kolorektal kanser, ülkemizde kadınlarda meme ve tiroid kanserlerinden sonra üçüncü, erkeklerde akciğer, prostat ve mesane kanserlerinden sonra dördüncü sırada yer alırken, Dünya genelinde ise kadınlarda ikinci erkeklerde de üçüncü en sık görülen kanser türüdür (3, 4). Epidemiyolojik olarak bu derece büyük bir öneme sahip olan kolorektal kanserlerin moleküler düzeyde incelenmesi, hastalığın daha iyi tanınmasında ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde büyük önem arz etmektedir. Birçok kanser türü ile ilgili yapılan moleküler çalışmalar, hücrenin normal metabolizmasında görevli yollarda hangi aksaklıkların hastalığa neden olduğu ve bu aksaklıkların nasıl giderileceği konusunda yoğunlaşmıştır. Bu bağlamda en çok üzerinde durulan yollardan biri apoptozis yollarıdır (5).

Apoptoz (programlanmış hücre ölümü), embriyo gelişimi, normal hücre döngüsünün devamlılığı ve hücre yenilenmesi, organizmanın gelişimi, bağışıklık sisteminin işleyişi ve programlı hücre ölümü gibi hayati süreçlerin olmazsa olmaz bir bileşeni olan ve biyokimyasal mekanizmalar ile karakterize bir olaydır (6, 7). Apoptotik regülasyonda meydana gelebilecek anormallikler hücre homeostazını bozarak kanserinde dâhil olduğu çok çeşitli otoimmün hastalıkların gelişimine sebep olabilmektedir (8).

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan sentetik kemoterapatik ajanlar ile klinik açıdan her zaman başarılı sonuçlar elde edilememektedir ve çeşitli yan etkileri sebebiyle hastalar üzerinde fizyolojik ve psikolojik olumsuzluklar oluşturmaktadır. Ayrıca yüksek maliyetli olmaları da dezavantaj yaratmaktadır. Eski tıp tarihinden bu yana farklı hastalıklarda tedavi amaçlı kullanılan birçok kimyasal bileşim çeşitli bitki türlerinden elde edilmektedir. Özellikle son yıllarda kanser tedavisinde klinik tedaviye alternatif olarak antikanser özellik gösteren 3000'den fazla bitkinin dünya çapında birçok ülkede kullanıldığı ifade edilmektedir (9). Bu bitkilerden biri olan *Curcuma longa* (zerdeçal), Çin ve Hindistan'da yaygın olarak yetiştirilen, Zingiberaceae familyasına ait, sarı çiçekli ve büyük yapraklı bir bitkidir. *Curcuma longa* bitkisinin etkin bileşeni olan kurkumin son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli farmakolojik etkileri ve biyolojik faydaları açısından dikkat çekmektedir (10). Kurkuminin antibakteriyel, antioksidan, antitümör, antiinflamatuvar, antikarsinogenik, antialerjik, antidemans etkileri olduğu belirtilmiştir (11-13). Antitümör aktivitesi değerlendirildiğinde kurkuminin belirli doz ve zaman bağımlı kullanılması sonucu hücrede apoptoz dahil farklı bir çok moleküler yolak ve bu yollarda görevli proteinler üzerinden tümör oluşumunu engelleyici ya da geriletici bir etkisinin olduğu gözlenmiştir (14).

Bu bilgiler ve incelediğimiz literatürler ışığında kurkuminin uygun doz kullanımını belirleyerek SW-480 kolon kanseri hücre serileri üzerindeki apoptotik etkisini araştırmayı planlamaktayız. Bu etkiyi apoptotik mekanizmanın hangi yolağı üzerinden gösterdiğini, hangi genlerin ifade düzeylerini değiştirerek gerçekleştirdiğini belirleyerek klinik olarak hastalar üzerinde etkili olabilecek maliyeti düşük alternatif bir tedavi yönteminin oluşturulmasına katkıda bulunmayı ve kolon kanseri ile mücadele eden hastaların yaşam kalitesini bir nebze arttırabilmeyi hedeflemekteyiz.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kolon ve Rektum Kanserleri

Kanser organizmanın yaşam süreci boyunca maruz kaldığı kimyasal maddeler, radyasyon, bakteri ve virüsler, beslenme alışkanlıkları gibi çevresel faktörler ve bu faktörlere göre daha az risk oluşturan kalıtsal faktörler sonucu meydana gelebilen multifaktöriyel bir hastalıktır (15). Kolon ve rektum kanserleri etiyojisi yönünden en iyi tanımlanmış kanser türlerindedir. Ancak malign seyri ve tarama programlarının yetersizliği nedeniyle ölüm oranı oldukça fazladır. Dünya genelinde ve gelişmiş ülkelerde kolorektal kanser insidansı oldukça yüksek olup erkeklerde üçüncü, kadınlarda ise ikinci en sık görülen kanser türüdür. Ülkemizde ise erkeklerde mesane, prostat ve akciğer kanserlerinden sonra dördüncü, kadınlarda tiroit ve meme kanserlerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. 2012 verilerine göre tahmini olarak 1,4 milyon yeni kolon ve rektum kanserli vaka teşhis edilmiş ve ölüm oranı 693,900 olarak ifade edilmiştir (4).

Kolorektal kanser riski yaş ile doğru orantılı olarak artmaktadır ve 50 yaş üstü bireylerde yaklaşık %90 oranında sporadik şekilde, % 5 oranında ise kalıtsal mutasyonların meydana gelmesiyle gelişmektedir. Genel olarak bakıldığında ise vakaların sadece %20 oranında ailesel temellere dayandığı, fakat otozomal dominant kalıtılan türleri hariç direk olarak kalıtsal bir geçişin söz konusu olmadığı belirtilmektedir. Bu durum da çevresel risk faktörlerinin önemi göz ardı edilmemelidir (16, 17). Çevresel risk faktörleri arasında sedanter yaşam tarzı, obezite ve diyabet, lif, folat ve kalsiyum içeriği bakımından zengin olmayan gıdalarla beslenme, yüksek oranda yağ içeren kırmızı et, sigara ve alkol tüketimi önemli yer tutmaktadır (16, 18, 19). Ayrıca özel bağırsak kommensalleri, patojenleri ve tümör gelişiminden önce gözlenen kronik bağırsak inflamasyonu da kolon kanseri gelişimine sebep olan faktörler arasındadır. (17, 20).

## 2.2. Kolon ve Rektum Kanseri Gelişiminde Rol Alan Moleküler Mekanizmalar

Kolorektal kanserler, normal kolon epitel hücrelerinin invaziv adenokarsinom hücrelerine dönüşümüne sebep olan genetik ve epigenetik değişikliklerin kademeli birikimi ile gelişir (16, 21). Karsinogenezde ilk değişiklikler hücre büyümesi ve programlanmış hücre ölümü (apoptoz) arasındaki normal dengeyi etkileyen ve histopatolojik incelemelerle tespit edilemeyen oldukça hassas olaylardır.

Kolon epitel hücresinin neoplazik sürece girmesine sebep olan genetik değişimler temelde birbirinden farklı olan iki mekanizma ile açıklanmıştır.

Bunlardan biri allel kayıpları ve anoploidi ile karakterize olan kromozomal kararsızlıklar (genomic instability), diğeri de DNA (Deoksiribonükleik asit) yanlış eşleşme tamir mekanizması aktivitesinin kaybı ve diploidinin artışı ile oluşan değişikliklerdir (Microsatellite instability-MSI) (22). Genomik kararsızlık tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerde, tümörögenез için yeterli sayıda değişiklik oluşmasını tetikleyerek adenom ve kansinomların meydana gelmesinde önemli rol oynar (23). Mikrosatellit instabilite ise replikasyon sırasında DNA yapısının değişmeden sürdürülmesinde rol oynayan MMR (Miss-match Repair) genlerindeki değişiklikler sonucu oluşur ve sporadik vakaların %15 kadarında görülürken Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Kanseri (HNPCC) vakalarında %85'den fazla oranda tespit edilerek karakteristik bir bulgu olduğu ifade edilmektedir (24).

1990 yılında Fearon ve Vogelstein kolorektal kanser tümörögenезinde rol oynayan moleküler düzeydeki olayları tanımlamak amacıyla bir model oluşturmuşlardır (25).

Fearon ve Vogelstein'in oluşturdukları modele göre;

1- Kolorektal tümörler onkogenlerin belirli mutasyonlar sonucu aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucunda oluşurlar.

2- Malin tümör oluşumu için en az 4 veya 5 genin mutasyonu gerekmektedir. Daha az miktardaki değişiklikler benign tümör oluşumu için yeterli olmaktadır. Çok sayıda genetik hatanın rolü 4 farklı aktiviteye sahip onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde sıklıkla gerçekleşen mutasyonlarla ifade edilmiştir. Bunlar;

- Normal hücre çoğalması ve sağ kalımını uyararak ERK sinyal yolunu etkileyen rasK ve B-raf onkogenlerinin aktivasyonuna yol açan mutasyonlar
- Wnt sinyal yolunun bileşenlerinden olan APC inaktivasyonunu ve  $\beta$ -katenin stabilizasyonunu sağlayan mutasyonlar
- TGF- $\beta$  sinyal yolunda görevli tümör baskılayıcı proteinlerde gerçekleşen mutasyonlar
- P53 tümör baskılayıcı genin inaktivasyonunu sağlayan mutasyonlar olarak belirtilmektedir (26).

3- Genetik değişikliklerin birbirini takip eden bir sıra içinde olduğu kabul edilmiş olsa da tümörün biyolojik özelliklerinin belirlenmesinde bu genetik değişikliklerin birikimi oluş sırasından daha önemlidir.

4- Mutasyona uğramış bir tümör baskılayıcı gen heterozigot bir ortamda bulunduğu bile fenotipik etkisini gösterme eğilimindedir.

Bu model özellikle otozomal dominant özellikteki ailevi kolon polipozisi (Familial adenomatous polyposis-FAP) ve polipozisle birlikte olmayan herediter kolon kanseri (Hereditary non-polyposis colorectal cancer - HNPCC) gibi kolorektal kansere genetik yatkınlık oluşturan iki hastalığın özelliklerinin aydınlatılması adına birçok çalışma için yol gösterici olmuştur (25). Kolorektal kanserler bireylerde ailesel kaynaklı gelişmiş olsa bile ailede hastalığı taşıyan bireyde görülen bir mutasyon ile birlikte başka mutasyonların birikimi ile de gelişebilmektedir. Bu durum da hastalığın patogeneziindeki moleküler çeşitliliği ortaya koymaktadır.

Kolorektal kanser patogeneziinde genomik ve epigenomik instabilite kadar, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozis, immortalizasyon, anjiogenezis ve invazyon gibi karsinogenezi de kritik olayları düzenleyen çok özel genlerin mutasyonları ve bunun sonucu değişen sinyal yolları da rol oynamaktadır (27). Bu yollardan apoptozis özellikle kolorektal kanserlerin gelişim sürecinde önemli bir yere sahip olması ve uygulanan tedavi yöntemlerine gelişen direnç ile ilişkili olduğunun düşünülmesi sebebiyle üzerinde en çok çalışılmış konulardan biri olmuştur. Apoptozis ile ilgili biyokimyasal ve genetik mekanizmaların daha iyi

anlaşılabilmesi ve alternatif hedef moleküller kullanılarak daha başarılı tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılması araştırıcıların odaklandığı bir konu haline gelmiştir.

### 2.3. Apoptoz

Apoptoz, inflamasyon olmaksızın hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen ve kontrol edilen, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, hücre ölümünün ana formu olan programlı bir mekanizmadır (28, 29). Apoptoz normal olarak gelişim, yaşlanma ve dokulardaki hücrelerin devamını sağlamak için bir homeostatik mekanizma olarak fonksiyon görebileceği gibi, aynı zamanda patofizyolojik koşulların varlığı ve zararlı ajanlar tarafından hücrelerin zarar görmesi sonucu ya da immün reaksiyonlar gibi bir savunma durumu söz konusu olduğunda da gelişebilmektedir (30). Apoptoz genellikle, uyarana ve hücre tipine göre farklı karakteristik özellikler göstermektedir (29).

Apoptozu etkileyen hücre dışı uyarıların bazıları; büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, hormonlar ve bitişik hücrelerle temas olarak sıralanabilir. Hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, oksidatif stres, Tümör nekroz faktör (TNF), Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan p53' ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve glukokortikoidler olarak ifade edilmektedir (29). Ayrıca hipertermi, iyonize radyasyon, DNA hasarına sebep olan sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de beraberinde apoptoz meydana getirebilirler (31).

Tüm bu etkiler sonucu gelişebilen apoptoz boyunca hücrelerde gerçekleşen morfolojik değişimler sürecin nasıl ilerlediği konusunda yol gösterici olmuştur. Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında yapılan elektron mikroskobu çalışmaları apoptotik bir hücrede meydana gelen morfolojik değişimleri tanımlanmıştır (32).

Apoptoz, tek bir hücrede, büzüşme ve komşu hücrelerle olan temasın kaybolması ile başlar. Hücresel büzülmenin nedeni, Na, K, Cl taşıyıcı sistemin bozulan dengesi sonucu hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin gerçekleşmemesidir. Bunun sonucu, hücre sitoplazmik hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keserek mikrovilluslarını kaybeder. Daha ayrıntılı

gözlenen değişikliklerde ise, öncelikle plazma membranının şeklinin bozulduğu ve kabarcıklanmaların oluştuğu görülür (29). Bu değişikliklerin sebebi zar yapısındaki moleküllerin fonksiyonlarını kaybetmesiyle açıklanabilir. Normal bir hücrede fosfatidil serin “fosfatidil serin flippaz” enzimin ATP bağımlı işlevi ile hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde tutulur. Apoptotik hücrelerde ise flippaz enziminin etkisinin kaspazlar tarafından kaldırılmasıyla fosfatidil serin, hücre zarının dış yüzüne geçmektedir (33). Bunun sonucu kollektin (C1q) adı verilen çeşitli proteinler apoptotik hücre zarına bağlanarak makrofajlar tarafından tanınmasını sağlayıp hücrenin fagosite edilmesini uyarmaktadır (34). Hücre zarında meydana gelen değişimlerden biride sfingomiyelinaz enziminin (Smase) zar yapısında bulunan sfingomiyelini hidrolize ederek seramid molekülünü oluşturmasıdır. Seramidin ya Fas reseptör uyarı mekanizmasını aktifleştirdiği ya da kaspas-3 tarafından apoptoz sırasında oluşumunun tetiklendiği ifade edilmektedir (33).

Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik membran değişimlerinden biri de apoptotik sürecin sonlarına doğru gözlenen, hücre içeriklerini içine alan ve membran ile çevrili veziküller biçiminde apoptotik hücrelerden kopan tomurcuklardır. Bu küçük veziküller apoptotik cisim olarak da adlandırılırlar (35). Apoptozun en belirgin özelliklerinden biride hücre içi Ca ve Mg bağımlı endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile kromozomal DNA'nın nükleozomal birimlere parçalanmasıdır (36). Apoptotik hücre DNA'sı agaroz jel elektroforezinde merdiven basamağına benzer tipik bir görünüm sergiler. Fragmentasyon apoptotik hücrelerde CAD (Caspase Activated DNaz- kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz-) enzimi tarafından DNA'nın nükleozom birimlerine ayrılmasıyla sağlanır. CAD normal hücrelerde ICAD'a (İnhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease- kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü- DNA fragmentasyon faktör 45) bağlı inaktif formda bulunur ancak apoptoz sinyali alan hücrelerde kaspaz 3 tarafından aktive edilir ve bu enzim DNaz (endonükleaz) olduğu için çekirdek DNA'sının hızlı biçimde 180-200 baz çiftlik nükleozomal fragmanlara ayrılmasını sağlar (37).

Apoptoz sırasında gözlemlenen morfolojik olaylar apoptotik sürecin temelini oluşturan ve farklı aşamalarda görev alan moleküler mekanizmaların varlığı ile gerçekleşmektedir. Tüm bu mekanizmaların varlığını farklı yollarla gösteren ve hücrede apoptozun gerçekleştiğini belirlemek için kullanılan birçok yöntem vardır.

Bunlar; Morfolojik görüntüleme yöntemleri (Işık Mikroskobu (Hematoksilen ve Giemsa Boyama), Floresan Mikroskobu/Lazerli Konfokal Mikroskop, Elektron Mikroskobu ve Faz Kontrast Mikroskobu ile uygulanabilen yöntemler), immunohistokimyasal yöntemler (Anneksin V, TUNEL, M30 yöntemi, Kaspaz - 3 işaretleme), biyokimyasal yöntemler (Agoroz Jel Elektroforezi, Western Blot, Flow Sitometri), immunolojik yöntemler (Elisa, Flourimetrik Yöntem) ve moleküler biyoloji yöntemleri (RTPCR, DNA Microarrays) olarak sıralanabilir.

### **2.3.1. Apoptotik Regülatörler**

Multiselüler organizmalarda hücre döngüsü ve apoptoz hayati dengenin korunmasında rol alan olmazsa olmaz mekanizmalardır (6). Her iki süreci düzenleyen ve kontrolünü sağlayan birbiriyle ilişkili, paralel ya da zıt fonksiyon gösteren birçok molekülün varlığı söz konusudur. Bu moleküller fonksiyonlarına göre farklı yapılarda olup ölüm reseptörleri, antiapoptotik (apoptozu baskılayıcı) proteinler, proapoptotik (apoptozu indükleyici) proteinler ve kaspazlar olarak dört ana başlık altında ifade edilebilir (38).

#### **2.3.1.1. Ölüm Reseptörleri**

Apoptoz ile ilişkili ölüm reseptörleri Fas Reseptör (Fas), Tümör Nekroz Faktör Reseptör1 (TNFR1), Death Reseptör 3 (DR3), Death Reseptör 4/TRAILR-1 (DR4) ve Death Reseptör 5/TRAILR-2 (DR5), DR6, Ectodysplasin A reseptör (EDAR) ve Nerve Growth Factor Reseptör (NGFR) olarak bilinmektedir. Bu reseptörler Tümör Nekroz Faktör gen ailesinin üyeleri olup hücre membranında yer alırlar. Sitoplazmik bölgelerinde ‘Ölüm Domaini’ adı verilen ve kendilerine bağlanan özel ligandların oluşturduğu sinyallerin iletimini sağlayarak proteolitik sinyal kaskadını başlatırlar (38, 39). Direk olarak apoptotik fonksiyonu gerçekleştiren reseptörler Fas, DR4 ve DR5’dir. Bu reseptörler sitoplazmik alanlarında ‘Ölüm Domaini’ ile bağlı konumda ve prokaspaz 8 ile birleşerek onu aktifleştirecek özelliğe sahip olan ‘Efektör Ölüm Domain’ bulundurmaları yönüyle karakterizedirler. Meydana gelen bu yapıya ise ‘Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (Death Inducing Signaling Complex, (DISC))’ adı verilir. TNFR1, DR3, DR6 ve EDAR reseptörleri

ise dolaylı olarak hem apoptozu indükleyebilir, hem de NF- $\kappa$ B üzerinden hücre yaşam sinyallerinin oluşumunu düzenlerler (40).

### **2.3.1.2. Antiapoptotik Proteinler**

Apoptotik regülatörlerin en önemli ve çok yönlü fonksiyona sahip molekülleri B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) gen ailesi üyeleridir. Bcl-2 gen ailesinin ürünleri transmembran yapıda olup, apoptozun kilit organeli olan mitokondri, çekirdek zarı ve endoplazmik retikulum zarı üzerinde yer alırlar (29). Kimyasal yapılarında fonksiyonlarını etkileyen farklılıklar söz konusudur. Bu yapısal farklılıklar BH1, BH2, BH3 ve BH4 bölgeleri bulundurmaları ile ilgilidir. Antiapoptotik proteinlerde bu dört bölgenin tamamı bulunurken proapoptotik proteinlerde BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri bulunmaktadır.

Bcl-2 ailesi üyelerinin apoptozu inhibe edici üyeleri Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo, Mcl-1 olarak tanımlanmıştır. Bcl-2, 24-26 kDa'luk protein kodlayan bir protoonkogendir ve mitokondrinin sitoplazmaya dönük dış zarında konumlanmıştır. Bcl-2 ve Bcl-XL apoptozu engelleme fonksiyonunu ya kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da kaspaz akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-C gibi apoptojenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir (24). Ayrıca Bcl-2, proapoptotik bir protein olan Bax ile heterodimer oluşturarak Bax'ın homodimer yapı oluşturmasını ve mitokondriyal membrana entegre olmasını engelleyip aktivitesini inhibe eder. Bu nedenle hücrelerdeki Bax/Bcl-2 oranı hücrelerde apoptotik yolağının aktivasyonunun belirlenmesi için önemli bir göstergedir (5).

Programlanmış hücre ölümünün negatif düzenleyicileri olarak görev yapan diğer moleküller ise XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, ML-IAP Bruce, Survivin, pIAP olarak tanımlanmıştır. Bunların çoğu apoptozu uyaran proteinler olan kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'a doğrudan bağlanıp inhibisyonlarını sağlayarak apoptozun engellenmesinde rol alırlar (41).

### 2.3.1.3. Proapoptotik Proteinler

Apoptozu indükleyici olarak görev alan proteinlerden en önemlileri Bax, Bak, Bad, Bid, Bcl-Xs, Bok, Bim, Bik, Noxa, Puma'dır. Proapoptotik üyelerin çoğu (Bad hariç) ölüm sinyalinden önce sitozol veya hücre iskeletinde bulunur ve daha sonrasında mitokondri dış zarına yönelenerek lokalize olur (5). Bu lokalizasyon da yine BH yapılarına göre farklılıklar göstermektedir (38). Proapoptotik proteinlerde kendi aralarında BH1, BH2, BH3 ve sadece BH3 bölgeleri içermelerine göre iki alt gruba ayrılmıştır. Bu alt gruplardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (örn., Bax, Bak ve Bok), diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur (42). Proapoptotik proteinlerden Bax gibi BH1 ve BH2 bölgelerinin her ikisini içeren üyeler heterodimerizasyon yoluyla kaspaz aktivasyonunu sağlar ve mitokondri zarında porların açıklığını değiştirerek sitokrom-c'yi serbestleştirir (24). Sadece BH3 bölgesi içeren üyeler ise antiapoptotik proteinler ile etkileşimler göstererek apoptozun baskılanmasında etkili olabildiği gibi proapoptotik proteinler ile heterodimer oluşturarak fonksiyon gösterebilmektedir (Bid ve Bim'in Bax ve Bak'ı indüklemesi gibi) (43, 44). Dimerizasyonun yanısıra proapoptotik proteinler fosforilasyon (Bad), translokasyon (Bax) ya da proteolitik bölünme (Bid) şeklinde aktivasyon mekanizmalarına da sahiptirler.

Proapoptotik fonksiyon gösteren diğeri moleküller ise apoptotik inhibitör ailesi (IAP) proteinlerinin efektör kaspazlara bağlanmasını engelleyen Smac/Diablo, HtrA2 (Omi) ve DNA fragmentasyonu ile ilişkili AIF ( Apoptoz indükleyici faktör) ve Endonükleaz G olarak ifade edilmektedir (41).

### 2.3.1.4. Kaspazlar

Kaspazlar, apoptozda görev alan Sistein Aspartat Spesifik Proteaz (Cystein Aspartat Spesifik Protease - CASPASE) olarak tanımlanan bir protein ailesidir. Bu proteaz ailesinin üyeleri aktif bölgelerinde sistein rezidülerine sahiptir. Etki gösterdikleri substratların kesim bölgesi genelde aspartik asitten sonra gelen kısımdır. Kaspazlar ilk sentezlendiklerinde inaktif prokaspaz veya zimojen olarak bulunur. Kaspazların zimojen formu (prokaspaz) apoptozun indüklemesinden sonra kesilerek aktif kaspaz formuna dönüşür (45). Kaspaz ailesi üyeleri apoptotik



fonksiyonlarına göre ‘başlatıcılar’, ‘efektörler’ ve ‘inflamatuvar kaspazlar’ olarak üç gruba ayrılmaktadır (Tablo.1). Başlatıcı kaspazlar ölüm reseptörü aracılı bir uyarıyla adaptör proteinlerle etkileşerek dimerize olup daha sonra bu dimerizasyon ile otolitik kesim gerçekleştirerek aktive olurlar. Aktif başlatıcı kaspazlar ise efektör kaspazların kesimini sağlayarak aktive olmalarını ve hedef moleküllerin proteolitik yıkımı sonucu apoptozun morfolojik değişikliklerinin gerçekleşmesine yol açarlar (38, 45). Kaspazların substratlarına örnek olarak PARP ve DNA-PK gibi DNA tamir mekanizmasında rol alan protein ve enzimler, Rb gibi hücre siklusu ile ilişkili genlerin ürünleri, hücre siklusunda görevli proteinler, NuMA gibi nükleer proteinler,  $\beta$ -aktin gibi hücre iskeleti yapısal proteinleri verilebilir (29).

**Tablo 1.** Kaspaz ailesi üyelerinin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması (46).

Kaspaz ailesi alt grupları		
I	Apoptotik başlatıcılar	Kaspaz-2 Kaspaz- 8 Kaspaz- 9 Kaspaz-10
II	Apoptotik efektörler	Kaspaz- 3 Kaspaz- 6 Kaspaz- 7
III	İnflamatuvar mediatörleri	Kaspaz- 1 Kaspaz- 4 Kaspaz- 5 Kaspaz- 11 ( Fare) Kaspaz- 12 Kaspaz- 13 (Sığır) Kaspaz-14

Apoptotik süreç, kaspazların aktivasyonu noktasında keşişen transmembran reseptörler aracılı etkileşimlerle uyarılan ekstrinsik yol (Ölüm reseptör yolu), hücre içi oluşan bir etki sonucu mitokondriyal sinyaller aracılı uyarılan intrinsik yol (Mitokondri yolu) ve bu iki yoldan bağımsız olarak uyarılan Perforin/Granzim yolu olmak üzere 3 şekilde gerçekleşebilmektedir (30). Bu mekanizmalarda görev alan moleküller hücre dışı veya hücre içi uyarıların tipine göre aktifleşerek apoptozun gerçekleşeceği yolağın belirlenmesinde etkili olurlar (43).

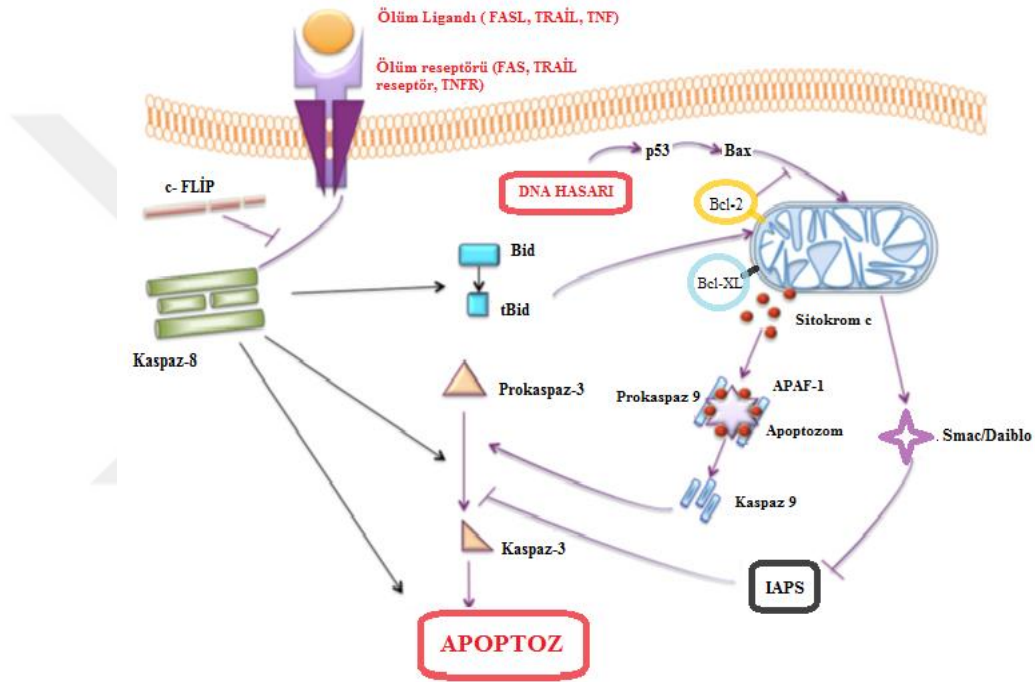
Ekstrinsik yol, TNF reseptör gen ailesi üyelerinin transmembran reseptör aracılı etkileşimleri ile başlatılır ve en iyi FasL/FasR ve TNF- $\alpha$ /TNFR1 modelleri ile

karakterize edilir. Ligand reseptörüne bağlandığında sitoplazmik adaptör proteinler ölüm domainlerinin aktivasyonuna yol açmaktadır. Fas ligandının reseptörüne bağlanması, reseptörün Fas ilişkili ölüm domainine (FADD) bağlanmasına, TNF ligandının reseptörüne bağlanması ise FADD ve reseptör inaktif protein (RİP) birimleri ile adaptör TNFR-1 ilişkili ölüm domainin (TRADD) bağlanmasına yol açar (30, 40). Ölüm domainlerinin dimerizasyonu ve prokaspaz-8 ile birleşerek otokatalitik aktivasyonu sonucu DISC (Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi) oluşturulur. Aktifleşen kaspaz-8 hem efektör kaspazların (kaspaz 3-6-7) direk kesilmesiyle aktifleşmelerini hem de Bid'in kesilmesini sağlayarak mitokondri yolağını indükler (47). Ekstrinsik yolak inhibisyonu, kaspaz-8'in aktifleşmesini inhibe eden cFLIP ve RİP birimleri üzerinde ubiquitin ligaz aktivitesi gösteren c-IAP1 ve c-IAP2 molekülleri tarafından düzenlenmektedir (41, 48).

İntrinsik yol ise ölüm reseptörü sinyalinin bağımsız, mitokondriyal bir uyarı sonucu aktifleşen hücre içi sinyaller ile gerçekleştirilir. Bu yol hücre içinde gerçekleşen pozitif ya da negatif uyarılara bir yanıt olarak meydana gelir (49). Bu uyarılar mitokondri dış zarlarında konumlanan Bcl-2 ailesi üyelerinden Bax'ın mitokondrial permeabilite geçiş poru (MPT) açıklığını arttırmasına, mitokondrial transmembran potansiyelinin değişimine ve sitozolün iç membran boşluğundan proapoptotik proteinlerin iki ana grubunun salınımına yol açmaktadır. İlk grup sitokrom c, Smac/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi'den oluşur. Sitokrom c prokaspaz-9 ve Apaf-1 ile birleşerek apoptozomu meydana getirir. Apoptozom kaspaz-9 aktivasyonuna yol açar ve kaspaz-9 da kaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlayarak hücre içi hedeflerin katalitik yıkımlarını gerçekleştirir. İkinci grup ise, mitokondriyelerden salınan AIF, endonükleaz G ve CAD'dır. Bu durum apoptotik sürecin sonlarında hücre ölümünden sonra gerçekleşen bir olaydır. AIF çekirdeğe transloke edilerek DNA'nın 50-300kb'lik parçalara bölünmesine ve periferal çekirdek kromatininin kondensasyonuna yol açmaktadır. Bu aşamadan sonra apoptotik cisimler adı verilen hücre kalıntıları fagosistoz ile elimine edilmektedir (30).

Granzim/Perforin yolağı ise tümör hücreleri veya virüs ile enfekte olmuş hücrelerde sitotoksik T-Lenfositler tarafından ölüm reseptör yoluna alternatif olarak başlatılabilmektedir. Sitotoksik T-lenfositler, hedef hücre membranlarında perforin

olarak adlandırılan protein ile porlar oluşmasını sağlar ve bulundukları Granzim A ve Granzim B içerikli granüllerini açılan bu porlardan salgırlar. Granzim B, serin proteaz özelliği göstermesi nedeniyle prokaspaz-3 ve 10 ile ICAD (Inhibitor of caspase-activated DNase) gibi proteinlerin kesilerek aktifleşmesinde rol oynar. Ayrıca, Bid'in kesilerek tBid (kesilmiş Bid) oluşturulmasında da fonksiyon göstererek mitokondriden sitokrom c salınmasını tetikleyebilmektedir. Granzim A özellikle tümör hücrelerinde, kaspaz bağımsız bir mekanizma ile programlı hücre ölümünün gerçekleşmesinde görevlidir (31).



Şekil 1. Ekstrinsik ve intrinsik yolaklar (49).

#### 2.4. Kolon Kanserlerinde Apoptoz

Kolorektal kanserlerin gelişiminde rol oynayan mekanizma, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması sonucunda hücrelerin ölüm yerine çoğalmayı tercih etmek yönündeki davranışları olarak ifade edilmektedir. Yeni ve eski hücreler arasındaki denge, organ boyutunu ve kolonik kript yapısını koruyan en önemli faktörlerden biridir (50). Tümör büyümesi sadece çoğalma hızına değil, aynı zamanda apoptoz oranına da bağlıdır. Tümör hücreleri apoptotik yolları transkripsiyonel, translasyonel ve post translasyonel olarak düzenleyebilmektedir. Tümör hücreleri Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonu, Bax gibi

proapoptotik proteinlerin mutasyonu veya down regülasyonu ile apoptoza karşı direnç kazanabilir. Kolon kanserlerinde özellikle ekspresyon değişiklikleri, çok sayıda mutasyonun meydana gelmesi sonucu gerçekleşen karakteristik bulgulardandır. Örneğin, Bcl-2 ekspresyonu, normal kolonik epitelin kripleri boyunca yukarı doğru azalır yani taban kısmında en yüksek ifade edilirken, kriptin uç kısımlarında minimal düzeyde gerçekleşir. Bu durum, programlanmış hücre ölümünün, kriptlerin tabanında hücre bölünmesine izin vererek aktif halde olduğuna, ancak hücre kolonik kript boyunca olgunlaştığında ve yaşlandığında apoptozun uyarılmasına izin verme eğiliminde olduğunu ortaya koymaktadır (50). Kolon tümör hücrelerinde ise apoptotik fonksiyon, artmış Bcl-2 ekspresyonu nedeniyle durdurulmuş ve proliferasyon devam etmektedir.

Normal kolon epitel hücrelerinde tümör baskılayıcı gen olan p53 indüklendiğinde Bax'ın aktifleşmesi sağlanarak apoptoz başlatılır. p53, Bax'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılmasına neden olarak da apoptozu başlatabilir. Yapılan çalışmalar kolon kanseri tümör hücrelerinin, adenom oluşumunun ilk evrelerinde Fas ligandını (FasL) ve reseptörünü ifade etse de ileri evrelerde bu ifade düzeyinin azaldığını, bununla birlikte Fas aracılı apoptoza, FasR için pozitif olsalar bile direnç göstererek bu sinyal yolunda kusurlar olduğunu ortaya koymaktadır. Söz konusu kusurun p53 geninde meydana gelen bir mutasyon sonucu apoptotik yolağı uyarmaması ile ilişkili olduğu ve reseptör aracılı uygulanan tedavilere gelişen direncin bu sebepten kaynaklandığı belirtilmektedir (51).

Kolon kanserlerinde %30-50 oranında mutasyonu görülen diğer önemli genlerden biri de K-Ras onkogenidir. K-Ras onkogeni normal koşullarda Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) uyarısı sonucu hücre proliferasyonu ve apoptozun baskılanması ile ilişkilidir. Mutant K-Ras bir büyüme faktörünün uyarısı olmadan sürekli GTP bağlı aktif konumda kalmaktadır. Dolayısıyla tedavide büyüme faktörleri yerine bağlanan kemoterapötik ajanların kullanımını etkisiz kılan bir durum oluşturması nedeniyle kolorektal kanserlerin terapötik tepkisinin kritik bir belirleyicisi olarak kabul edilmektedir. Sürekli aktif K-Ras, efektör PI3K aracılığıyla apoptotik sinyalleme kaskadını inhibe edebilir, bu da proapoptotik Bad'ın

fosforilasyonunun engellenmesi gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla apoptozu inhibe eden güçlü bir sağkalım indükleyici kinaz olan AKT'yi aktiveştirir (52).

Kolon kanserleri ile ilişkili olabilecek yollar incelendiğinde klinik tedavi yöntemlerinde oldukça sık karşılaşılan ilaç direnci gelişiminin apoptoz ile yakından ilgili olabileceği görülmektedir. Bu noktada tedavi sürecinin doğru şekilde devam etmesi için kullanılan ajanların, apoptotik yolları bazı mekanizmalardan bağımsız olarak aktive etmesi ya da bu yolda görevli diğer proteinleri hedefleyerek fonksiyon göstermelerini sağlamak yönünde bir tercih yapılabilir.

## **2.5. Kolon Kanseri Tedavisinde Kullanılan Apoptotik Mekanizmalar Üzerinde Etkili Fitoterapötik Ajanların Önemi**

Kolon kanserinde genel olarak tercih edilen tedavi yöntemi cerrahi ve hastalığın evrelendirilmesine göre belirlenen kemoterapi uygulamalarıdır. Ancak kemoterapi ilaçlarının klinik tedavide kullanımı, saç dökülmesi, kan hücreleri yapımının baskılanması ve buna bağlı bağışıklık durumunun azalması, gastrointestinal lezyonlar, nörolojik disfonksiyonlar, kardiyak toksisite ve ilaç direnci gibi istenmeyen yan etkilere sebep olmaktadır (53). Son yıllarda yeni kemoterapi kombinasyon rejimlerinin geliştirilmiş olması ve moleküler olarak hedeflenmiş antikanserlerin belirlenmesi ile daha etkili olabilecek tedaviler sunulmaktadır (54). Bu tedavi yöntemleri ile özellikle radikal kemoterapötik ajanların ortaya çıkardığı yan etkilerin azaltılacağı düşünülmektedir. Bu nedenle kanser gelişiminde oldukça etkili bir rolü olan apoptotik mekanizmaların anlaşılmasıyla birlikte kanser hücrelerinin ölümünü indükleyen, sitotoksik ajanlara ve radyasyon tedavisine duyarlılığını arttıran tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi önemli çalışma konularından biri olmuştur.

Eski tıp tarihinden bu yana farklı hastalıklarda tedavi amaçlı kullanılan birçok kimyasal bileşim bitki türlerinden elde edilmektedir. Dünya çapında antikanser özellik gösteren 3000'den fazla bitkinin birçok ülkede kullanıldığı ifade edilmektedir (9). Bitkisel kaynaklı ajanlar antikanser özelliklerini hücre döngüsünde görevli regülatör proteinler, hücre yüzey reseptörleri ve reseptör tirozin kinazlar, büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri, hücre adezyon molekülleri, serbest radikaller ve apoptotik mekanizmalar üzerinden çok yönlü etkiler göstererek gerçekleştirilmektedir.

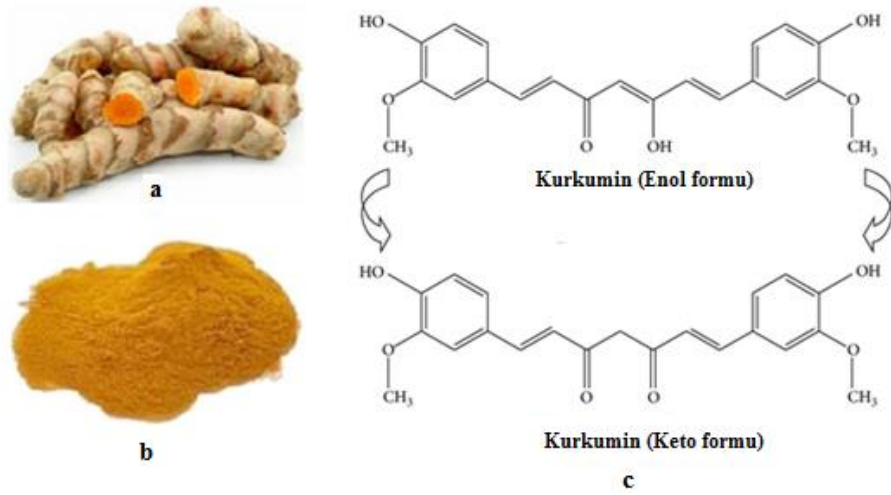
Bu noktadan yola çıkılarak multifaktöriyel nitelikteki kolon kanserlerinin tedavisinde sistemik bir etki oluşturan kimyasal ajanların kullanılması yerine bireye özgü hastalık türü ve modeli belirlenerek sentetik bitkisel ajanlar ile spesifik moleküler hedefler üzerinden doğru tedavi yöntemlerinin uygulanması oldukça yaygınlaşmıştır. Kolon kanseri gelişimi ile ilgili farklı birçok yolakta etkinliği ve koruyucu potansiyeli olabilecek bitki ekstraktlarıyla yapılan deneysel çalışmalar sürdürülmekte ve umut ışığı olmaya devam etmektedir (55).

## 2.6. Kurkumin

*Curcuma longa* (zerdeçal), Çin ve Hindistan'da yaygın olarak yetiştirilen, 'Turmerik' ya da 'Hint safranı' olarak da isimlendirilen, Zingiberaceae (zencefilgiller) familyasına ait, sarı çiçekli ve büyük yapraklı bir bitkidir (56).

Yapısında suda çözünebilen bir peptid olan turmerin ile birlikte turmeron, atlantone ve zingiberene olmak üzere esansiyel yağları, şeker, protein, reçine ve en yüksek oranda kurkumini de kapsayan kurkuminoid bileşenlerini bulundurmaktadır (10). Bu bileşenlerden kurkumin son yıllarda yapılan çalışmalarda çok yönlü farmakolojik etkileri ve biyolojik faydaları açısından dikkat çekmektedir.

Kurkumin, yapısal olarak iki fenolik halka ile bu halkaların orto konumlarında birer metoksi eter bulundurur ve para konumlarından bir alifatik doymamış hepten bağlayıcı ile birleşmiştir (57).



**Şekil 2.** Kurkuminin yapısı **a:** *Curcuma longa* bitkisinin kök kısımları, **b:** Kurkumin **c:** Kimyasal formu

Kurkumin, düşük molekül ağırlığına sahip (368,37 g/mol), hidrofobik karakterde, plazma membranından sitozole direk geçebilen, tautomerik formda ve ışığa duyarlı olan bir bileşiktir. Alkali ortamlarda elektron vericisi olarak işlev gören enol formu, nötral ve asidik çözeltilerde ise güçlü bir proton vericisi olan bis-keto formu baskındır (57).

Kurkuminin oral alımı sonrası absorpsiyonu, metabolizması ve dokulardaki dağılımı, son otuz yıldır deney hayvanları ve insanlar ile yapılan çalışmalarda incelenmektedir. İnsanlarda günlük 12 gram kurkumin kullanımının güvenilirliği ve toksik olmadığı belirlenmiş ancak oral yolla alındığında biyoyararlanımının çok düşük olduğu ifade edilmiştir (58).

Vücuda alınan herhangi bir maddenin biyoyararlanımının düşük olmasının sebepleri düşük aktivite, zayıf absorpsiyon, yüksek metabolizasyon hızı, metabolik ürünlerinin fonksiyonlarının yavaş olması veya hızlı elimine edilerek atılımı ile ilgili olabilmektedir. Kurkumin yüksek aktivite gösteren bir ajan olmasına rağmen yapısal olarak hidrofobik özellik göstermesi, absorpsiyonunun düşük olması ve hızlı metabolize edilmesi nedeniyle biyoyararlanımı düşük bir moleküldür. Bu nedenle kurkuminin yarılanma ömrünün uzatılmasını sağlamaya yönelik birçok deneysel çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalarda fareler üzerinde oral olarak uygulanmış olan belirli dozların kısa bir süre sonunda barsak ve karaciğer mikrozomlarında kurkumin glukuronid ve kurkumin sülfat bileşiklerine ayrıştığı ifade edilmiştir. İntravenöz ya

da intraperitonel olarak uygulanmış dozlarda ise kurkumin sırasıyla dihidrokurkumin, tetrahidrokurkumin, heksahidrokurkumin, heksahidrokurkuminol bileşiklerine dönüşerek son olarak ferulik asit ve dihidroferulik asit metabolitlerine ayrılmaktadır. Bunun sonucuda oral yolla alınımına göre kurkuminin intravenöz ya da intraperitonel uygulanmasının daha iyi biyoyararlanım özelliği gösterdiği belirtilmektedir (58-60). Biyoyararlanım düzeyinin artırılmasına ilişkin yapılan diğer çalışmalar ise kurkumin ile birlikte kullanılabilen bazı bitkisel ajanlar üzerinedir. Bu ajanlar kurkumin ile birlikte sinerjik bir etki oluşturarak tedavi desteği sağlamanın yanı sıra koruyucu etkinliğin artırılmasında da rol almaktadır. Özellikle karabiber, resveratrol, turmeron, kuersetin ve silibin gibi bitkisel ajanlar kurkumin ile birlikte kullanıldığında çeşitli kanser türleri üzerine son derece olumlu etkisi olduğu belirlenen ve çalışmalarda sıkça rastlanan maddelerdendir (61, 62).

Kurkuminin kanser olgularında uygulanan tedavide tek başına kullanımının da etkin olduğunun belirtilmesinin yanı sıra dozetaksel, asetilsistein, gemsitabin, kuersetin, sülfasalazin gibi çeşitli anti-kanser bileşikler ile kombine edilerek de çok olumlu yanıtlar alındığı belirtilmiştir (57, 63). Bununla beraber nanopartikül, lipozom, fosfolipid kompleksleri gibi yeni nesil taşıyıcıların ve biyoyararlanımının artırılması için etkin yöntemlerin geliştirilmesi, diğer anti-kanser ilaçlar ile etkileşimlerinin incelenmesi yönünde in vivo etkileri yansıtacak yeni klinik çalışmaların devam etmesi, bu denli faydalı bir molekülün kullanım alanının artırılması için çok önemlidir.

### **2.6.1. Kurkuminin Hücresel Etki Mekanizmaları ve Apoptoz ile İlişkisi**

Kurkuminin antioksidan, antitümör, antiinflamatuvar, antikarsinojenik, antialerjik, antidemans, antidiyabetik, antifertilite, antikoagulan, antiviral, antibakteriyel ve antifungal etkileri olduğu belirtilmiştir (13, 64). Yapılan çalışmalarda en çok öne çıkan özellikleri antiinflamatuvar ve antikarsinojenik etkileridir (11, 65).



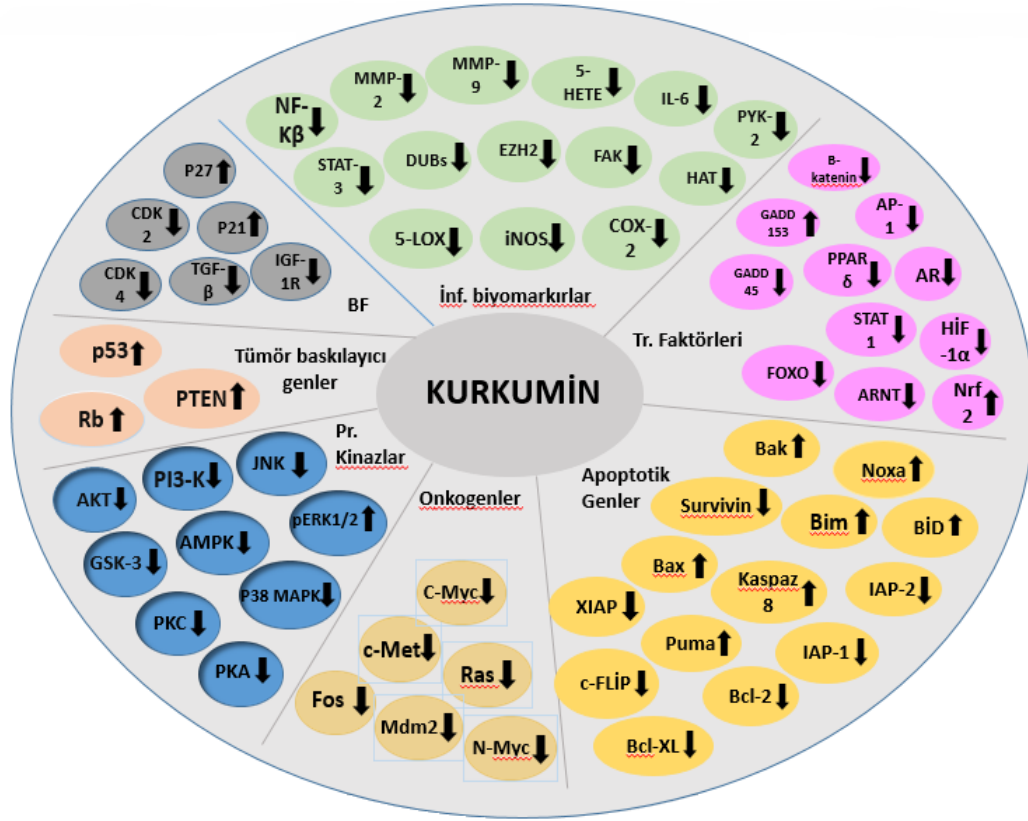
<p><b><u>Kronik Hastalıklar</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gastrik ülser</li> <li>• Skleroderma</li> <li>• Alzheimer</li> <li>• Parkinson</li> <li>• Diyabet</li> <li>• Epilepsi,</li> <li>• Hiptroidizm</li> <li>• Myokard Enfarktüs</li> <li>• Osteoporoz</li> <li>• Artrit</li> <li>• Ateroskleroz</li> <li>• Akciğer Hastalıkları</li> <li>• Kistik Fibroz</li> <li>• Kanser</li> </ul>		<p><b><u>Diğer</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Yara iyileşmesi</li> <li>• Hipolipidemi</li> <li>• Antihelmintik</li> <li>• Hyalin Membran Hastalığı</li> <li>• Antidepresan</li> <li>• Antispazmodik</li> <li>• Katarakt</li> <li>• Fanconi Anemisi</li> <li>• Safra Taşı</li> </ul>
	<p><b><u>Enfeksiyon</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sıtma</li> <li>• Cinsel yolla bulaşan hastalıklar</li> </ul>	<p><b><u>İnflamasyon</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• İnflamatuvar Barsak Hastalığı</li> <li>• Alerji</li> <li>• Pankreatit</li> <li>• Ateş</li> </ul>

**Şekil 3.** Kurkuminin etki gösterdiği patolojik durumlar (57).

Moleküler etkileri açısından değerlendirildiğinde kurkumin, antiinflamatuvar ve antikanser özelliklerini ilgili gen ekspresyonunun değişiklikleri, reseptörler, transkripsiyon faktörleri, protein kinazlar, bazı enzimler ve özellikle apoptoz ilişkili proteinler üzerinden hedef spesifik olarak göstermektedir (65). Kurkuminin anti-inflamatuvar aktivitesi olduğu ve etkisini her hücre tipinde bulunan bir transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B aktivasyonunu baskılayarak sağladığı, ilk kez 1995 yılında Singh ve Aggarwal tarafından ifade edilmiştir (66). Bu bulgunun yayınlanmasından sonra kurkuminin, NF- $\kappa$ B, STAT3 ve AKT sinyal yollarında görevli, kanser gelişimi ile ilişkili yollarda ise inhibe edici ve apoptozu indükleyici rolü olduğu belirtilmiştir (67, 68). NF $\kappa$ B bakteriyel lipopolisakkaritler ya da proinflamatuvar sitokinler gibi uyarılarla aktive edildiğinde, hücre nükleusuna transloke olarak hücre proliferasyonu, transformasyonu ve tümör oluşumu ile ilişkili olan TNF $\alpha$ , VEGF ve IL1, 2, 6, 8, 12 gibi hedef genlerin ekspresyonunu başlatır (67, 69). Kurkuminin NF- $\kappa$ B yolağındaki bu moleküllerin inhibisyonu aracılığı ile pankreatik, meme, kolorektal, oral, baş-boyun, glioblastoma, over, prostat ve T-hücreli lenfoma gibi birçok kanser hücresinde anti-kanser ve antianjiogenez etkisinin olduğu çok sayıda araştırmacı tarafından bildirilmiştir (57, 70). Ayrıca kurkuminin tümör anjiogenezinde rol alan Matriks Metalloproteinaz Ailesi (MMP) üyelerinden MMP-8 ve MMP-9 moleküllerinin ekspresyonunu baskılayarak da kanser hücrelerin metastazını önlediği belirtilmektedir (67). Hücre sağ kalım mekanizmalarından PI3-kinaz/AKT sinyal yolağı da onkojenik transformasyonda ve kanser gelişiminde rol

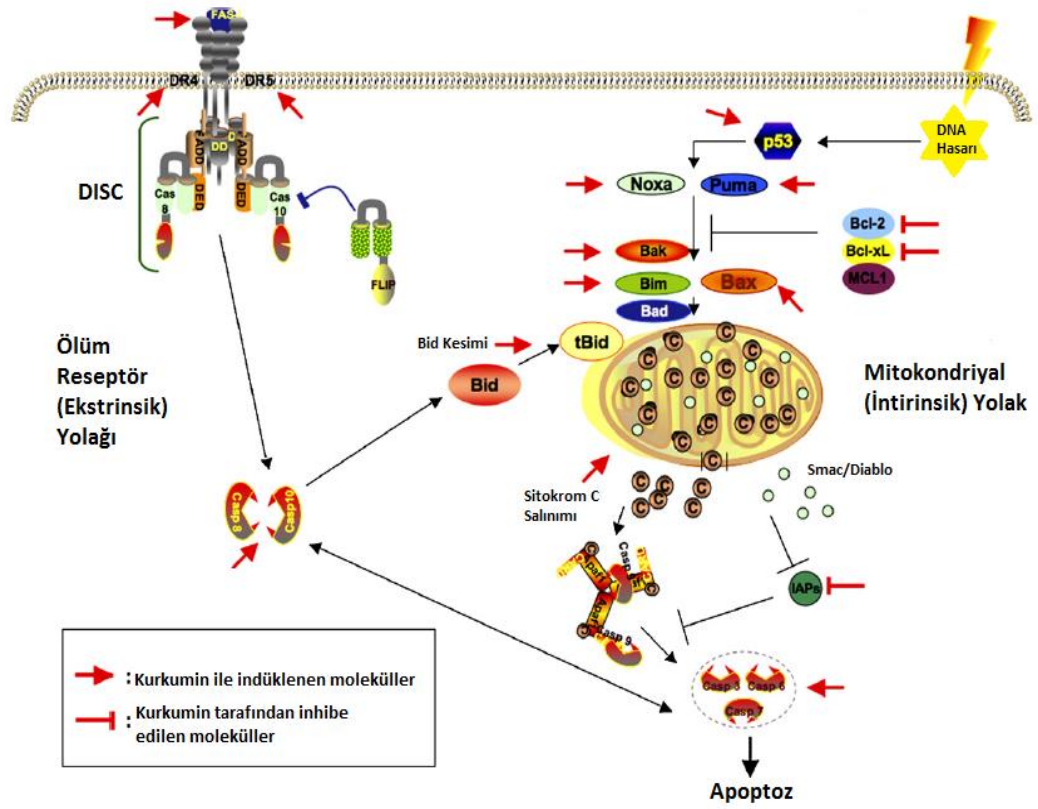
oynamaktadır. Bu yolda görevli AKT apoptozu düzenleyen çok sayıda proteini fosforilleyerek ve transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonu yoluyla anti-apoptotik sinyaller üretmek apoptozu önler. AKT'nin hedefleri arasında apoptoz baskılayıcı proteinler, proapoptotik bir protein olan Bad, NF- $\kappa$ B ile protein sentezi ve transkripsiyon faktörleri aktivasyonundan sorumlu bir protein kinaz olan Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) gibi moleküller yer almaktadır. Bad, normal şartlarda mitokondriden sitokrom c salınımını sağlayarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Ancak AKT tarafından fosforile edildiğinde sitozoldeki Bad grubu proteinler için bağlanma bölgesi oluşturulur ve böylece mitokondri zarına geçişi engellenir (26, 68). Kurkumin PI3-kinazın yapısal olarak aktive olmuş hedeflerini baskılamak yoluyla proliferasyonu inhibe ederek, kaspaz bağımlı apoptozun indüksiyonunu sağlar (68).

AKT sinyal yolunun kurkumin aracılı baskılanması, NF- $\kappa$ B sinyal yolunun inhibisyonu ile sonuçlanır. Bu inhibisyon sonucu da antiapoptotik protein ailesinden Bcl-2 ve Bcl-XL üyeleri, siklin D1, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR), matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), COX-2, aktivatör protein-1 (AP-1) gibi kanser gelişiminde önemli rolü olan gen ürünlerinin ekspresyon düzeylerini azaltarak hücre döngüsünün durdurulması, proliferasyonun baskılanması ve apoptozun indüklenmesi gerçekleşmektedir (56, 71).



Şekil 4. Kurkuminin etki gösterdiği farklı yollarda yer alan aşağı/yukarı yönde regülasyonunu sağladığı hedef moleküller

Kurkuminin, kanser hücrelerinde farklı yollar aracılığıyla apoptoza etkisi olduğu kadar, direk olarak hedefi olan apoptotik moleküller üzerinden de etkisi de söz konusudur (72).



**Şekil 5.** Kurkuminin ekstrinsik ve intrinsik yollardaki moleküler hedefleri (73).

Kurkumin mitokondriyal yolaktaki direk hedefleri olan p53, Bax, Bim, Bak, Puma ve Noxa ekspresyonunu arttırıp, Bcl-2, Bcl-XL ve IAP proteinleri ekspresyonunu ise azaltarak kanser hücrelerinde hücre ölümünü indüklemektedir.

Kurkuminin, apoptotik ölüm reseptörlerinin (TRAIL-R1 / DR4 ve TRAILR2 / DR5) ekspresyon seviyelerinde artış sağladığı bilinmektedir (74).

Kurkuminin anti-kanser etkilerini farklı yollar üzerinden inceleyen diğer araştırmalar p53, Ras, STAT, Wnt/ $\beta$ -katenin, antioksidan yanıt elementi (ARE), transkripsiyon faktörü Nrf-2-Keap aktivasyonu, epigenetik regülasyon, histon modifikasyonları gibi mekanizmalar üzerinden de etkili olduğunu ifade etmektedir (75).

Kurkuminin etki ettiği hücresel ölüm mekanizmalarının apoptoz ile sınırlı olmadığı konusunda araştırmalar devam etmekte ve birçok veri literatüre değer katmaktadır. Bazı kanser hücre hatlarında kurkuminin endoplazmik retikulum stresi aracılı hücre ölümüne ve otofajik mekanizmaların aktivasyonuna sebep olduğu da belirtilmektedir. Tüm bu etkiler de birçok kanser türünde apoptotik mekanizmaları

indükleyen hedef tedavilere gelişen direncin kırılabileceği fikrini sunmaktadır. Dolayısıyla, kurkuminin proliferasyon, metastaz, invazyon ve anjiyogenez gibi karsinogenezin hemen hemen her aşamasını ve karsinogenezde rol alan sinyal ileti yollarını çok yönlü ve etkili bir şekilde inhibe etmesi nedeniyle kanser tedavisinde önemli yere sahip olabileceği yönünde araştırmalar sürdürülmektedir.

### **2.6.2. Kurkumin ve Kolon Kanseri Üzerine Etkileri**

Birçok kanser türünün gelişiminde hücrenin normal faaliyetlerini sürdürmekle görevli pek çok molekül, fonksiyonlarını birbiri ile ilişkili birden fazla durumla bağlantılı olarak durdurmakta ya da değiştirmektedir. Kolon kanseri gelişimi ise farklı pek çok moleküler değişikliğin kademeli olarak birikimi ile gerçekleşmektedir. Kurkuminin göstermiş olduğu çok yönlü hücresel etkileri değerlendirildiğinde, kolon kanseri dahil birçok kanser türünde alternatif ya da destekleyici şekilde tercih edilen tedavi yöntemlerinden biri olarak kullanılması yadsınmaz. Son yıllarda yapılan çalışmalar kurkuminin alternatif tedavi seçeneği olarak kullanılmasının yanı sıra, kemoterapinin yan etkilerine karşı koruyucu etkinliğe de sahip olduğunu göstermektedir.

Kanserli dokularda sıklıkla hücre döngüsü düzenleyicileri olarak görev yapan siklin-bağımlı kinazların (Cdk 4, 6, 1 ve 2) aşırı ekspresyonu, tümör baskılayıcı gen olan p53'ün ekspresyonunda azalma ve hücre döngüsü düzenleyici proteinler p21, p27 ve p57'nin düzeylerinde değişim görülmektedir (57). Özellikle kolon kanserlerinde Cdk-2 ekspresyon seviyesi oldukça artmış durumdadır. Kurkuminin Cdk-2 tarafından düzenlenen G1 hücre döngüsü fazında durdurulmasını tetikleyerek proliferasyonu engelleyen ve hedef spesifik fonksiyon gören alternatif bir anti-kanser madde olduğu ifade edilmiştir (76). p53 miktarındaki değişimler direk olarak apoptotik mekanizmaları etkileyebilmektedir. Kolon kanserlerinde p53 genetik mutasyonlarının görülme sıklığının yüksek olması nedeniyle kurkumin kaynaklı sitotoksitede p53 sinyalizasyonuna bağımlılık ilişkisi göz önüne alındığında, potansiyel kullanımının ciddi şekilde sınırlanabileceği düşünülmektedir (77). Ancak kurkumin, p53 aracılı apoptozda etkisini bağımsız olarak da gösterebilmektedir. İnsan kolon adenokarsinom hücrelerinde kurkumin, p53'ün serin fosforilasyonunu

sağlayarak ekspresyonunu artırır ve pro-apoptotik faktör Bax'ın ekspresyonunu yukarı yönde regüle ederek, Bcl-2 / Bax oranını düşürür ve apoptozu tetikler (73). Eğer p53 geninde bir mutasyon söz konusu ise kurkumin, p53 yolağının aşağı yönünde yer alan proapoptotik proteinleri aktive ederek, mitokondriden sitokrom c salınımında ve kaspaz bağımlı apoptozun başlatılmasında etkili olabilmektedir. p53 mutasyonlarının özellikle ileri aşama kolon kanserlerinde Fas-kontrollü apoptozu önlediği düşünülmektedir (78). Yapılan çalışmalar kurkumin'in p53'den bağımsız bir Fas reseptörü / kaspaz-8 yolu vasıtasıyla insan melanoma, mide ve kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini hatta farklı kanser tiplerinde, farklı moleküler mekanizmalar üzerinden etkili olduğunu göstermektedir (73, 79).

Kolon ve rektum kanserlerinde en önemli mekanizmalardan biri de organizmada erişkin dönemde yenilenen hücrelerin adezyonu, proliferasyon, hücre siklusu ve farklılaşmada rol alan hedef hücre genlerinin transkripsiyonunun kontrolünde fonksiyonu olan Wnt sinyal yoludur (80). Kurkumin, Wnt sinyal yolunda aktif komponent olan  $\beta$  kateninin fosforillenerek parçalanmasını sağlayan Axin, GSK-3 $\beta$  gibi proteinlerin ekspresyonunu düzenleyerek nükleer translokasyonunu engellemektedir.

Kurkuminin terapötik etki gösterdiği önemli yollardan birinin de, kolon kanserleri gelişiminde karakteristik rol oynayan K-Ras onkogeni ve ERK proteinleri üzerinden apoptoz aracılığı ile olduğu belirtilmekte ancak yeni çalışmalarla aydınlatılması gereken bir konu olduğu ifade edilmektedir (81).

Kolon ve rektum kanserlerinin agresif seyri, bulundurduğu sıralı mutasyonlar nedeniyle bir çok tedavi türüne yanıt vermemesi ya da direnç geliştirmiş olması klinikte farklı ve etkin biyomoleküllerin kullanımını teşvik etmektedir. Kanser tedavisinde kurkumin gibi etkili birçok maddenin kullanımının artırılması adına yapılan deneysel çalışma ve araştırmalardan elde edilen bulguları destekleyecek nitelikteki klinik çalışmaların sayısı henüz çok azdır. Sınıflandırmada evre, derece, tip olarak farklı tümör örneklerinden elde edilen, hücre serileri bilinen kemoterapötik ajanların etkinliği dışında alternatif tedaviler geliştirebilmek adına oldukça başarılı sonuçlar sunmaktadır.

Hücre serilerinden SW-480 kolon adenokarsinom hücreleri karakteristik olarak K-Ras mutasyonlarına sahiptir ve hücre serileri ile ilgili yapılan çalışmalarda belirlenmiş p53 polimorfizmlerinin olduğu bilinmektedir. Bu durumda “Kurkumin SW480 kolon adenokarsinom hücrelerinde aktif K-Ras aracılı baskılanan apoptozu p53 bağımsız bir mekanizma ile hedef spesifik olarak indükleyebilir mi?” sorusundan yola çıkarak tez çalışmamızı planladık. Bu noktada, biz de kanser tedavisinde klinik olarak kullanılabilir bitkisel ajanların önemini ortaya koymak ve mevcut literatüre katkıda bulunmak amacıyla kurkuminin SW-480 insan kolon kanseri hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin doz ve zamana bağlı olarak hangi moleküler yollar aracılığı ile ne düzeyde gerçekleştiğini araştırmayı hedefledik.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hücre Kültürü ve İmmünohistokimya Deneyi

##### 3.1.1. Kullanılan Gereçler

###### Hücre Hattı

Çalışmamızda CCL-228-SW 480 insan kolon adenokarsinom hücre hattı DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Culture)'den temin edilmiştir. (DSMZ, ACC313)

SW 480 kolon adenokarsinom hücre hattı spesifik olarak 12.kodonda yer alan Kras mutasyonları ve p53 polimorfizmlerine sahip olduğu bilinen, epitelyal kökenli, Dukes tip B sınıflandırmasındadır.

###### Besiyeri ve solüsyonlar

FBS ( Fetal Bovine Serum)( Sigma, F7524)

RPMI 1640 Medium (Sigma, 21875-034)

L-Glutamin (Biological Industries, 03-020-1B)

DPBS (Dulbeco's Phosphate Buffered Saline)( Sigma, 79378)

Trypan Blue (Sigma, T6146)

###### Bitki Ekstraktı

Hücre hattımız üzerine etkisini belirlemeyi amaçladığımız Kurkumin ekstraktı, (Sigma, C1386) *Curcuma longa* bitkisinden toz halde elde edilmiş ve ticari olarak Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır. Işık ve ısıya duyarlı olması sebebiyle karanlık ortamda -20 °C 'da saklanmıştır.

###### Enzimler

Hücreleri pasaj ve diğer işlemler için kültür yüzeyinden kaldırmak amacıyla enzim olarak %0,25 oranında EDTA içerikli Trypsin (Biobundle, T4049) kullanılmıştır.



## **İlaçlar**

Penisilin-Streptomisin ( Biological industries, 03-031-1B)

## **Kimyasallar ve Kitler**

DMSO ( Dimethyl Sulfoxide)( Sigma, D5879)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Alkol

Ethanol

Ksilol

Streptavidin-Biotin System for BrDU Staining Kit (Sigma 93-3943)

BrDU (Sigma B5002)

Apop Tag Plus Peroxidase İn Situ Apoptosis Detection Kit ( Merck S7101)

## **Boyalar**

Mayer Hematoksilen

Metil green

## **Sarf Malzemeler**

Şırınga uyumlu filtre, 0.25 µm (Sartorius, 16534K)

Filtre Kapaklı Hücre Kültürü Flaskları, 75 cm<sup>2</sup> - 25 cm<sup>2</sup> (İSOLAB, 120.01.075)

Steril Santrifüj Tüpleri (İSOLAB, 078.02.004)

Yuvarlak lamel, 18 mm (MENZEL, Y18)

Tek Kullanımlık Steril Cam Pipetler, 10ml (İSOLAB,083.03.010)

Steril Pastör Pipetleri, 3 ml (İSOLAB, 084.22.001)

Serolojik pipetler (10 mL) (Costar Stripette 4488)

Eppendorf (Labasel Direvite 98/79/CE)

Kriyo tüpler (Greiner Bioone E130203P).

6 Kuyucuklu Hücre Kültür Plakları, 3 ml (İSOLAB, 22.01.006)

24 Kuyucuklu Hücre Kültür Plakları, 1 ml (İSOLAB,122.01.024)

Thoma Lamı (İSOLAB,075.03.002)

### **3.1.2. Cihazlar**

Laminar Akım Kabini (ISO TS EN 12469)

İnvert Mikroskop (Olympus, CKX41)

CO<sup>2</sup> İnkübatörü (Heal Force)

Sıvı Azot Tankı (Thermolyne)

Su Banyosu (Leica)

Hassas Terazi (Radwag WTB 200)

Otoklav ( Hirayama- HV50)

Manyetik Karıştırıcı (Nüve)

Santrifüj (Nüve NF 200)

Buzdolabı (Siemens)

Derin Dondurucu (U 410 Premium)

Pipet Aid (LEVO PLUS).

### **3.1.3. Yöntem**

#### **3.1.3.1. Hücre Hattının Temini, Açılması ve Kültür Ortamı Oluşturulması**

Çalışmamızda DSMZ'den ticari olarak temin ettiğimiz CCL-228-SW 480 kolon adenokarsinom hücre hattı dondurulmuş ve kuru buz ile muhafaza edilmiş şekilde laboratuvarımıza ulaştırıldı. Laboratuvarın ve cihazların sterilitesi sağlanarak uygun bir çalışma ortamı hazırlandı. Hücre hattının özellikleri ve uygun üretim

koşulları bilgileri ilgili firmadan sağlanarak gerekli şartlar oluşturuldu ve hücrelerin çözünme prosedürüne uygun olarak aşağıdaki aşamalar uygulandı.

- Hücreler buldukları tüp ile birlikte 37 °C'lik steril hazırlanmış su banyosunda çözülmeye bırakıldı.
- Çözünen hücre süspansiyonu üzerine medyum (50 ünite/ml penisilin ve streptomisin, 1.0 mM sodyum piruvat, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 mM esansiyel olmayan aminoasit, % 90; inaktive edilmiş % 10 fetal sığır serumu ile zenginleştirilmiş RPMI 1640 mediumlu hücre) eklenerek santrifüj tüpüne alındı ve 4000 g de 3 dk santrifüj edildi
- Santrifüj işlemi sonrası süpernatant kısım pipet aid yardımıyla dikkatlice alınarak, üzerine 1-2 ml medium ilavesi yapıldı ve santrifüj tekrarlandı. Bu işlem 3 defa tekrarlandı.
- Daha sonra 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür flaskı hazırladığımız oda ısısındaki mediumdan 5 ml ilave edilerek hazırlandı.
- Santrifüjden alınan tüpün süpernatant kısmı atıldıktan sonra, dipte bulunan pellet üzerine 2-3 ml medium ilave edilerek pipetaj yapıldı ve hazırlanan flaska ekimi yapılarak bir gün süreyle inkübasyonu sağlandı.

### **3.1.3.2. Hücrelerin inkübasyonu, çoğaltılması ve pasaj işlemleri**

- CCL-228-SW 480 kolon karsinoma hücreleri; %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C sıcaklık şartlarındaki CO<sub>2</sub> inkübatöründe 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklar içerisinde steril şartlarda inkübe edilerek çoğalmaları sağlandı.
- Hücreler maksimum yoğunluklarına ulaşır flaskın yüzeyini tamamen kaplayınca haftada ortalama iki kez pasajlanarak tekrar inkübasyonu sağlandı.
- Çoğalmaya devam eden hücreler yaklaşık %80 oranında doyumluğa (confluent) ulaşınca pasaj işlemi tekrarlandı.
- Bu işlem sırasında öncelikle flaskların içerisindeki besiyeri ve ölü hücreler pipet aid yardımıyla alındı ve 4 ml kadar PBS ile yıkanarak

ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelerin flaskta tutundukları yüzeyden kaldırılması amacıyla 3 ml Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek etüvde bekletildi.

- Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskopta kontrol edilerek tamamının kalktığına kanaat getirildikten sonra tripsin aktivasyonunu sonlandırmak amacıyla flask içerisine 2 ml kadar medium eklenerek santrifüj işlemi gerçekleştirmek üzere 15 ml'lik tüplere aktarıldı.
- Tüpe alınan süspansiyon 4000 g'de 3 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler taze hazırlanmış ve oda ısısındaki medyum ile süspanse edilip 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslara bölünerek yeniden pasajlandı.

### 3.1.3.3. Hücrelerin Sayımı

SW 480 Kolon adenokarsinom hücrelerinin pasajlanma sonrası canlılık ve sayılarının belirlenmesi Tripan mavisi ile hemostirometrik yöntemle gerçekleştirildi. Bu yöntem ölü hücrelerde meydana gelen membran hasarı nedeniyle bu hücrelerin boyanması, canlı hücrelerin ise boyayı bünyelerine almaması prensibine dayanmaktadır.

- Pasaj işlemi sırasında hücreler flask yüzeyinden tripsin ile kaldırılıp santrifüj işlemi gerçekleştirildikten sonra 1 ml medium ile süspanse hale getirildi ve bu süspansiyondan yaklaşık 10 µl alınıp üzerine 90 µl Tripan Mavisi eklenerek bir ependorfta karıştırıldı.
- Sayım işlemi gerçekleştirmek üzere Thoma Lamı üzerine karışımdan bir damla ilave edildi.
- Thoma lamı üzerinde bulunan 16 kareden 1'i sayılarak ortalama canlı hücre sayısı belirlendi.

**Toplam Hücre Sayısı/ ml = Hemasitometre sayım sonucu x 16 x 10<sup>4</sup> x Medium miktarı**

#### **3.1.3.4. Hücrelerin Dondurulma İşlemi**

Hücreler DSMZ'den temin edilen dondurma prosedürüne uygun koşullar sağlanarak dondurulmuştur. Bu prosedüre göre;

- Pasaj için flask yüzeyinden kaldırılan hücreler santifüj edildi. Daha sonra üst kısım alındı ve hücreler üzerine 2 ml %70 RPMI, %20 FBS ve %10 oranında DMSO ile hazırlanmış dondurma mediumu eklendi.
- Pipetaj yapılarak bir kriyo tüpe aktarıldı ve tekrar çözülüp kullanılmak üzere önce -20 °C, daha sonra -80 °C'de 1 gece bekletildikten sonra sıvı azot tankına alındı.

Hücreleri dondurma prosedüründe, DMSO kullanılmasının nedeni; penetran özellik göstermesine rağmen hızlı difüzyon yeteneği olan bir kriyoprezervatif olması ve dondurma işlemi sonrasında hücreler tekrar kültüre edilmek üzere çözdürüldüğünde canlı hücre geri dönüşünün daha fazla oranda olmasıdır. Ancak yine de hücreleri, çözünme sırasında ekstraselüler alanın hipotonik özellik kazanması nedeniyle oluşan ozmotik şoktan korumaya yetmemektedir. Bunun için yapılan çalışmalara dayanılarak önerilen çözüm, nonpenetran özellik gösteren ve yapısındaki nişasta molekülleri nedeniyle donma çözünme kararlılığına sahip bir kriyoprotektan olan HES (Hydroxyethylstarch)'in DMSO ile birlikte dondurma işlemleri sırasında kullanılmasıdır (82).

#### **3.1.3.5. Kurkumin'in Doz Belirleme Deneyi ve Deney gruplarının Oluşturulması**

- Pasaj için uygun doyum noktasındaki hücreler flask yüzeyinden tripsin yardımıyla kaldırıldı ve üzerine medyum ilave edilip tüplere konularak santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı atılan tüplere tekrar medyum ilave edilerek pipetaj yapıldı. Süspansiyon haline getirilen hücrelerin sayımı yapıldı.
- Doz belirleme deneylerinde, sayıca uygun olacağı belirlenen 500.000 canlı hücrenin ekimi 5 ml RPMI 1640 medyum ilavesiyle 6 kuyucuklu kültür plakları kullanılarak gerçekleştirildi.

- Ekimi yapılan hücreler bir gece inkübe edildi.
- Kurkuminin kullanılacak doz miktarı aralığının belirlenmesi için incelenen literatürler dikkate alındı. 0,5 mg Kurkuminin moleküler ağırlığı göz önünde bulundurularak yapılan hesaplama göre final konsantrasyonu 100  $\mu\text{M}$  olacak şekilde 13,5 ml DMSO'da çözüldü.
- Daha sonra 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında olacak şekilde dilüsyonları gerçekleştirilerek 100'er  $\mu\text{l}$ 'lik eşit hacimlerde 6 kuyucuklu kültür plaklarına uygulandı.
- Kurkuminin her bir dozu için 3'er kuyucuğa ekim yapıldı.
- Tüm gruplar için 24, 48 ve 72. saatler sonunda kuyucuklarda bulunan hücreler tripsin ile ayrı ayrı toplandı ve hemasitometre de sayılarak kaydedildi.
- Buna göre; Kurkumin'in inhibisyon dozu (ID50 ya da IC50) 24 saat için 50  $\mu\text{M}$ , 48 saat için 75  $\mu\text{M}$  ve 72 saat için 100  $\mu\text{M}$  olarak ayrı ayrı belirlendi.
- İmmünohistokimya ve Kantitatif Real Time PCR deneyleri için belirlenen saat ve dozlarda kontrol ve Kurkumin grupları olmak üzere üçlü validasyonlar halinde iki grup oluşturuldu.

### **3.1.3.6. Hücre Kültürlerinde 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BrdU) İle İmmünohistokimyasal İşaretleme**

Hücre proliferasyonu, genomik DNA replikasyonu ile belirlenebilmektedir. DNA sentezi hücre proliferasyonunda indirekt bir parametredir. Hücre proliferasyonunu değerlendirmek için yapmayı planladığımız BrdU (5-bromodeoksiüridin) testinin prensibi, proliferasyon gösteren hücrelerdeki DNA'ya BrdU bağlanmasını saptamaya dayanmaktadır. Klor, brom ve iyot atomlarının bağlanma özellikleri metil grubunun (CH<sub>3</sub>) bağlanma özellikleri ile benzerlik gösterir. Bunun sonucu olarak, halojenli pirimidinler grubunda yer alan BrdU halojen yapı göstermesi yönüyle, DNA molekülünün yapı taşı olan timidin yapısında bulunan metil grubu ile çok benzerdir. Bu halojenli pirimidinler, DNA sentezi sırasında

timidin molekülünün yerini alarak DNA zincirinin yapısına girebilirler. Bu nedenle bu maddelere ‘timidin analogu’ adı verilir. Proliferasyon gösteren hücrelerin DNA’sındaki timidinle BrdU yer değiştirmektedir. Nonradyoaktif timidin analogu olan bromodeoksiüridin S fazındaki hücrelerin DNA’ına bağlanması sonucunda, anti-BrdU antikollarının kullanımı ile S fazındaki hücrelerin belirlenmesi sağlanır. Bu yöntem ile, sadece S fazındaki hücrelerin BrdU ile işaretlenmesi ve bu işaretli hücre grubunun hücre siklusundaki ilerlemesinin izlenmesi mümkün olmaktadır (83).

- BrdU deneyi için öncelikle 24 kuyucuklu kültür plakları içerisine yuvarlak lameller yerleştirilerek uygulama yapılan her bir kuyucuk için 100.000 hücre sayılarak lamel üzerine ekildi.
- Kurkumin’in doz belirleme deneyinde hesaplanmış olan inhibisyon dozları kullanıldı. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda hücreler 1 saat BrdU ile 37 °C’de inkübe edildi. Üst medyum çekilip atıldıktan sonra PBS eklenerek 37 °C etüvde 15 dakika bekletildi.
- PBS çekilip atıldıktan sonra % 70 etanol ilave edildi ve 4 °C’de 30 dakika bekletilerek hücreler tespit edildi.
- İmmünohistokimya için lameller PBS içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra metanolde hazırlanmış % 0,5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’de 10 dakika bekletildi ve 3 kez 2’şer dakika distile su ile yıkandı.
- BrdU Staining Kit Streptavidin-Biotin System adı verilen BrdU boyama kiti kullanılarak boyama yapıldı.
- Kit içerisinde bulunan denatürasyon solüsyonunda 30 dakika bekletilip PBS ile 3 kez 2 dakika yıkandı.
- 10 dakika Blocking solüsyonunun ardından 1 saat primer antikorda, (Biyotinli Mouse Anti-BrdU monoclonal) nemli ortamda oda ısısında tutulup, 3 kez PBS ile 2’şer dakika yıkandıktan sonra streptavidin peroksidazda 10 dakika bekletildi.
- PBS ile yıkamanın ardından primer ve sekonder antikor kompleksine bağlanarak renklenmeyi sağlayan substrat-kromojende (DAB) 5 dakika karanlık ortamda bekletildikten sonra distile su ile yıkama işlemi yapıldı.

- Mayer Hematoksilen ile zemin boyası yapıldıktan sonra kesitler musluk suyunda 20 dakika morarma için bırakıldı ve kapatıcı (Ultramount) ile kapatılarak, ışık mikroskobunda sayım yapıp işaretlenme oranları belirlendi.

Bu test ile farklı doz ve zamanlarda SW480 hücreleri üzerine uygulanan kurkuminin hücre proliferasyonunu ne derece etkilediği belirlenmiştir.

### **3.1.3.7. Hücre Kültürlerinde TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl**

#### **Transferase (Tdt) Mediated Nick-End Labeling) Metodu**

TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) apoptoza uğrayan hücreleri tespit etmek için uygulanan bir testtir. Bu test ile apoptozun ileri evrelerinde belirleyici olarak rol alan apoptotik hücrelerdeki nükleer kromatin fragmentasyonu saptanmaktadır. TUNEL metodu prensibi genel olarak apoptotik fragmentasyon sonucu oluşan DNA kırık uçlarının terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi kullanılarak in situ olarak tanınmasına dayanır (35). Bu yöntem, apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarını, serbest 3'-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon ile tespit ederek apoptozise giden hücrelerin görüntülenmesini sağlamaktadır (83).

Metodun uygulanması aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirildi.

- 24 kuyucuklu kültür kaplarına yuvarlak lameller konularak uygulama yapılacak her bir kuyucuk için 100.000 hücre lamel üzerine ekildi ve Kurkumin'in doz belirleme deneyinde hesaplanan inhibisyon dozları kullanıldı.
- 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda üst medyum çekilip atıldıktan sonra PBS ilave edilerek 37 °C etüvde 15 dakika bekletildi.
- PBS çekilip atıldıktan sonra %70 etanolde 4 °C'de 30 dakika bekletilerek hücreler tespit edildi.



- İmmünohistokimya için lameller PBS eklenerek iki kez 5'er dakika yıkayıp 2:1 oranında hazırlanmış etanol-asetik asit karışımında -20 °C'de 5 dakika bekletildi.
- PBS ile iki kez 5'er dakika yıkandıktan sonra metanolde hazırlanmış %0,5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenip 5 dakika beklenerek tekrar iki kez 5 dakika PBS ile yıkandı.
- Kitin içeriğinde bulunan potasyum kokodilat, DTT, BSA, kobalt klorid ve Tris-HCl'den oluşan dengeleyici solüsyon (equilibration buffer) eklenerek oda ısısında 10 dakika bekletildi.
- Bu aşamadan sonra kesitler biotinli nükleotid karışımı (biotinylated nucleotide mix), rTdT enzimi ile dengeleyici solüsyondan oluşan rTdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) reaksiyon karışımı ile 37 °C'de 1 saat bekletildi.
- Negatif kontroller için rTdT enzimi yerine deiyonize su konuldu. Örnekler, 2X SSC ile oda ısısında 15 dakika bekledikten sonra PBS ile yıkayıp endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için hidrojen peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile muamele edildi.
- Tekrar PBS ile yıkama aşamasından sonra oluşması beklenen antijen antikör kompleksini görünür hale getirmek için kullanılan Streptavidin HRP (Horseradish peroxidase) solüsyonu ve seconder antikör (Rabbit anti Mouse) ile muamele sonrası oluşan son ürünün substratına bağlanan DAB kromojenle (DAB Chromogen) ile renk alması sağlandı.
- Kahverengi renk gözlendikten sonra metil green ile zıt boyama yapılarak deiyonize su ile yıkayıp alkol ve ksilol serilerinden geçirildi ve kapatıcı (Mounting Medium) ile kapatılarak ışık mikroskopunda işaretlenme oranları belirlendi.
- Metil green ile yeşile boyanmış hücre çekirdekleri normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi.

## **3.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT PCR) ve Apoptotik Gen Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi**

### **3.2.1. Kullanılan Gereçler**

#### **Kimyasal Kitler ve Panel**

High Pure RNA Isolation Kit (Roche, 118286650011)

FastStart Essential DNA Probes Master (Roche, 6402682001)

Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, 4379012001)

RealTime ready Custom Panels 24 gene (Roche, 553288400)

### **3.2.2. Cihazlar**

PCR cihazı (Peqlab Primus 96)

Light Cycler 96 (Roche)

Kar Makinası (Hoshizaki FM-120EE)

Santrifüj (Heraus Biofuge D-37520)

### **3.2.3. Yöntem**

#### **3.2.2.1. Hücrelerin Kültür Ortamından Toplanması ve RNA izolasyonu**

Kantitatif Real Time PCR deneyi için sayımı yapılan 500.000 SW480 hücresinin 6 kuyucuklu kültür plaklarına ekimi gerçekleştirildi. Bir günlük inkübasyon sonrası 24, 48 ve 72. Saatler için kontrol ve deney grupları oluşturuldu. Kurkumin grupları 24, 48 ve 72. saatlerde ayrı ayrı belirlediğimiz sırasıyla 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M'lık doz uygulamaları için üçerli tekrarlar şeklinde oluşturuldu. Yani her saat için kontrol grubuna ait üç örnek ve kurkumin grubuna ait belirlenen doz aralığında üç örnek elde edildi. Daha sonra hücreler kültür plaklarından pasaj prosedürüne uygun olarak kaldırılarak ependorf tüpleri içerisine üzerlerine 2 ml medium eklenip toplanarak, gruplar etiketlendi.

Elde edilen örneklerden gen ifadesi değişimleri belirlenmek üzere gerçekleştirilecek ilk adım olan RNA izolasyonu aşağıdaki prosedüre uygun olarak uygulandı.

- RNA izolasyonu High Pure RNA Isolation Kit ile yapıldı.
- Öncelikle liyofilize haldeki DNase üzerine 0,55 ml Elution Buffer eklenerek 0.5 ml'lik ependorf tüplere bölüştürüldü (-20 °C' de 12 ay saklanabilir). Kit içerisinde yer alan Wash Buffer I içine 20ml ve Wash Buffer II içine 40 ml absolute etanol eklenerek kullanıma hazır hale getirildi. .
- Toplanan hücrelerin medyum içeriğinden arınması amacıyla santrifüj yapılarak üst kısımları atıldı ve üzerine 200 ul PBS eklendi
- Pellet hafifçe vurarak süspanse hale gelmesi sağlandı.
- Bu süspanسیون üzerine 400 µl Lysis/-Binding Buffer eklendi ve 15saniye vortekslendi.
- Çalışılacak örnek sayısı kadar toplama ve filtreli tüpler hazırlanıp, filtreli tüpler toplama tüplerine geçirildi.
- Tüm karışım filtreli tüplere aktarıldı.(700 µl)
- 15 saniye 8000 x g de santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpünde biriken sıvı kısım dökülerek filtreli tüp tekrar aynı toplama tüpüne geçirildi.
- Ayrı bir 1,5 ml'lik ependorfa her örnek için 90 µl DNase Incubation Buffer ve 10 µl DNaz eklendi ve pipetaj yapıldı. Bu karışımdan her tübe 100 µl dağıtıldı.
- 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Her tüpe 500µl Wash Buffer I eklendi ve 15 saniye 8000 g'de santrifüj yapıldı. Toplama tüpü dökülerek filtreli tüp aynı toplama tüpüne geçirildi.
- Her tüpe 500 µl Wash Buffer II eklenir. Ve 15 saniye 8000 g de santrifüj yapıldı.

- Toplama tüpündeki sıvı döküldü ve filtreli tüp tekrar kullanılmak üzere geçirildi.
- Her tüpe 200 µl Wash Buffer II eklenir ve 2 dakika maximum hızda tüm solüsyonlardan uzaklaştırmak amacıyla (13000 g de) santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler 1.5ml'lik steril ependorflara alındı.
- Her tübe 50 µl Elution Buffer eklendi ve 1dakika 8000xg de santrifüj yapıldı.
- Filtreli tüpler atıldı. Ependorf tüpte RNA elde edilmiş olarak -80 °C'de saklandı.

İzolasyonun ardından RNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle belirlenir. 260 ve 280 nm'de ölçülen optik yoğunluk: 260 nm'deki 1,0 OD değeri yaklaşık olarak 40 ng/ml tek iplikli RNA'ya eşdeğerdir. 1,8-2,1 arasındaki A260/A280 oranı yüksek seviyede saflaştırılmış RNA göstergesidir. Spektrofotometrik ölçümün yanı sıra RNA degradasyonunun kontrolü agaroz jel elektroforeziyle de gerçekleştirilebilir. Genel olarak reaksiyon başına 5ng total RNA'nın ortalama düzeyde ifade edilen mRNA tespitinde yeterli olacağı düşünülmektedir. Buna bağlı olarak gen ifadesi bakılacak materyalin özelliğine bağlı olarak RNA miktarı reaksiyon başına 5ng ile 5 µg arasında alınmalıdır.

Gerekli tüm işlemler yapıldıktan sonra elde edilen uygun miktardaki RNA'dan cDNA sentezi aşamasına geçildi

#### **3.2.2.2. cDNA Sentezi**

- cDNA sentezi için "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" kullanılmıştır. Her örnek için ortalama 100 ng/µl RNA+ H<sub>2</sub>O'dan 10 µl konuldu ve kit içerisinde yer alan Random hexamer primer'den 2 µl ve 1 µl de oligo dT primer eklendi.

**Tablo 2.** RNA denatürasyonu işlemi için hazırlanan karışımın içeriği

	<b>Tek reaksiyon için</b>
<b>RNA örneği</b>	10 µl
<b>Oligo dT primer</b>	1 µl
<b>Random hexamer primer</b>	2 µl
<b>Toplam</b>	13 µl

- Tüpler PCR cihazına yerleştirildi. 65 °C’de 10 dakika RNA örnekleri denatüre edildi. Bu süre içinde bir sonraki işlem için örnek sayısına uygun olarak miktarı hesaplanmış reaksiyon karışımı hazırlandı.

**Tablo 3.** cDNA eldesi için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği

	<b>Tek reaksiyon için</b>
Reaction Buffer	4 µl
Protector RNase Inhibitor	0,5 µl
Deoxynucleotide Mix	2 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase	0,5 µl
<b>Toplam</b>	<b>7 µl</b>

- Cihazdan alınan örnekler buz üzerine yerleştirildi. Her tüpe 7 µl hazırlanan karışımdan dağıtıldı ve pipetle 3-4 kez karıştırıldı. Tüpler termal döngü cihazına yerleştirilerek ve aşağıdaki hazırlanmış program çalıştırıldı.

**Tablo 4.** cDNA eldesi için hazırlanan Termal döngü cihazı programı

<b>25 °C</b>	<b>10 dakika</b>
<b>50 °C</b>	<b>60 dakika</b>
<b>85 °C</b>	<b>5 dakika</b>
<b>4 °C</b>	∞

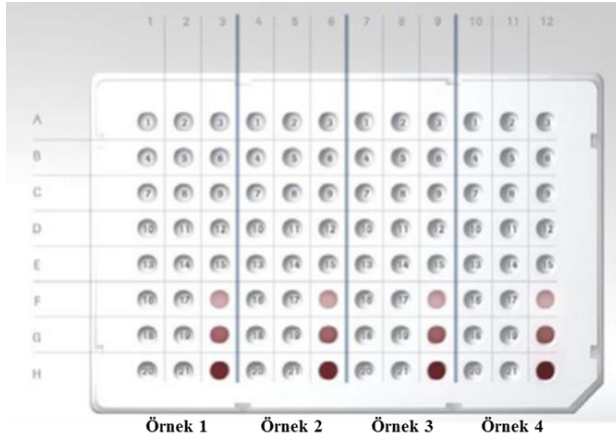
- İfade analizi deneyleri öncesi elde edilen cDNA örneklerinin kalitesini belirlemek ve tüm örnekleri aynı yoğunlukta reaksiyona tabi tutmak amacıyla Real Time PCR cihazında referans genlerin Ct değerleri baz alınarak, kıyaslamalı olarak bir değerlendirme yapıldı.

### 3.2.2.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT PCR)

Nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (QRT-PCR), gen ekspresyon seviyelerinin nicel olarak belirlenmesi için yaygın şekilde kullanılan, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesi prensibine dayanan ve kısa sürede kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Her devirde floresans emisyonu miktarını kaydederek, üstel faz boyunca PCR reaksiyonunu izlemek mümkündür; PCR ürün miktarındaki ilk önemli artış hedef şablonun başlangıç miktarı ile korelasyon göstermektedir. Nükleik asit hedefinin başlangıç kopya sayısı ne kadar yüksek olursa, flüoresansta o kadar belirgin bir artış gözlenmektedir. Real time PCR cihazı ile saptanan Ct parametresi (Threshold cycle = Eşik çevrimi), floresans emisyonunun sabit eşiğin üzerine çıktığı döngü sayısı olarak tanımlanır. Başlangıç ürün miktarı ne kadar yüksek olursa, PCR işlemi sırasında biriken üründen daha erken evrede saptanır ve Ct değeride o kadar düşük olur. <http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>

QPCR verilerini analiz etmek için kullanılan, absolute (mutlak) ve relatif (göreceli) kantifikasyon olarak ifade edilen iki strateji vardır. Absolut kantifikasyon, standart bir eğriye dayalı girdi gen miktarını tanımlar. Relatif kantifikasyon ise, bir referans numuneye kıyasla gen ekspresyonundaki değişiklikleri belirler. Relatif kantifikasyon, standart bir eğri üretmeye ihtiyaç olmaması, daha az reaktif kullanılması, standart dilüsyonlar ya da DNA/RNA miktarlarındaki standartlar oluşturulurken yapılabilecek hatalar gibi risk oluşturacak manipülasyonların bulunmaması yönüyle daha avantajlıdır (84).

- Relatif kantitasyon yapılmak üzere elde edilen cDNA'lar, üretici firma tarafından hazırlanan 'Realtime Ready Custom Panel'ler (Roche, 553288400) kullanılarak ve aşağıdaki karışım ve cihaz protokolleri ile 'LightCycler' 96 (Roche, 05815916001) ile çalışılmıştır (Resim 1 ve 2).



	1	2	3
A	APAF1	AVEN	BAX
B	BİD	BİK	BCL-2
C	CASP3	CASP7	CASP8
D	CASP9	CRADD	DFFA
E	DİABLO	ENDOG	FADD
F	FAS	FASLG	ACTB
G	LRDD	PTEN	B2M
H	TP53	TRAF1	GAPDH

**Resim 1.** RealTime Ready Custom Panel ve primer dizaynı gerçekleştirilmiş apoptotik genlerin panel üzerinde bir örnek için gösterilmiş konumları

- Örneklerin panelde yer alan kuyucuklara aktarımı öncesinde reaksiyon tüpünde, tek bir reaksiyon için nükleaz içermeyen su, cDNA, enzim ve dNTP reaktiflerinin her birinden eklendi ve örnek sayısı kadar hazırlanması gereken miktar hesaplanarak reaksiyon karışım elde edildi. Karışım santrifüjde yüksek devirde çevrildi ve panelin her bir kuyucuğuna, her bir reaksiyon için 20 µl olacak şekilde aktarıldı.

**Tablo 5.** Real time PCR reaksiyon karışımının hazırlanışı

	Tek reaksiyon için
Nükleaz içermeyen su	9.25 µl
cDNA	0.75 µl
Enzim ve dNTP miksi (probes master)	10 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

- Hazırlanan paneller karışım ilave edildikten sonra soğuk bloktaki adaptörleri ile birlikte 2000 rpm' de 15 saniye santrifüjlenerek olası pipetleme hatalarından dolayı oluşabilecek yanlış ışımalara karşı önlem alındı.
- Paneller cihaza yerleştirilmeden üzerleri özel şeffaf bantları ile kapatılarak örneklerin korumalı hale gelmesi sağlandı.

- Her bir panelde çalışılmak üzere yüklemesi yapılan örnek grupları Resim 2'de görülen Light Cyclor 96 cihazının bölmesine yerleştirildi.

Panelin çalışma prensibi her bir kuyucuğunda seçilen ilgili genlere ait, Universal Probe Library Assay Design Center programı ile dizayn edilmiş primerler bulunmasına ve doğrulanmış tasarım algoritmalarına dayanarak çalışan Universal Probe Library (UPL) prob teknolojisine dayanmaktadır. UPL probları, Kilitli nükleik asitler ( Locked Nucleic Acid), 5 'ucunda floresan (FAM) boya ve 3' ucunda koyu renk bir söndürücü boya ile etiketlenen kısa hidroliz problarıdır. Kilitli Nükleik Asitler (LNA), riboz halkasının 2'-O atomunu 4'-C atomuyla birleştiren bir metilen köprüsü ile kilitli olduğu bir nükleik asit analogları sınıfıdır. LNA oligonükleotidleri, tamamlayıcı tek sarmallı RNA'ya ve tamamlayıcı tek veya çift sarmallı DNA'ya benzeri görülmemiş hibridizasyon afinitesi sergileyerek duplekslerin termal kararlılığını ve ayırıcı gücünü artırır. LNA'lar, diğer nükleik asitlerle mümkün olmayan koşullar altında tek baz uyumsuzluklarını ayırt eder.

LNA nükleotidleri ayrıca DNA mikrodizileri, FISH sondaları, kantitatif PCR probları ve oligonükleot temelli diğer moleküler biyoloji tekniklerindeki ekspresyonun hassasiyetini ve özgüllüğünü arttırmak için kullanılmaktadır (84).





**Resim 2.** Light cycler 96 cihazı

Real Time PCR programı tamamladıktan sonra relatif kantitasyonda analiz yapıldı ve standartları baz alarak cihazın örneklere ait verdiği değerler not edildi.

**Tablo 6.** Real Time PCR cihaz protokolu

Program	Denatürasyon	Amplifikasyon			Cooling
Analiz modu	Yok	Kantifikasyon modu			Yok
Döngü	1	55			1
Hedef [°C]	95	95	60	72	37
Süre	10 dk	10 sn	30 sn	5 sn	30 sn
Ramp.Rate [°C/s]	20	20	20	20	20

#### 3.2.2.4. İstatistiksel Analiz

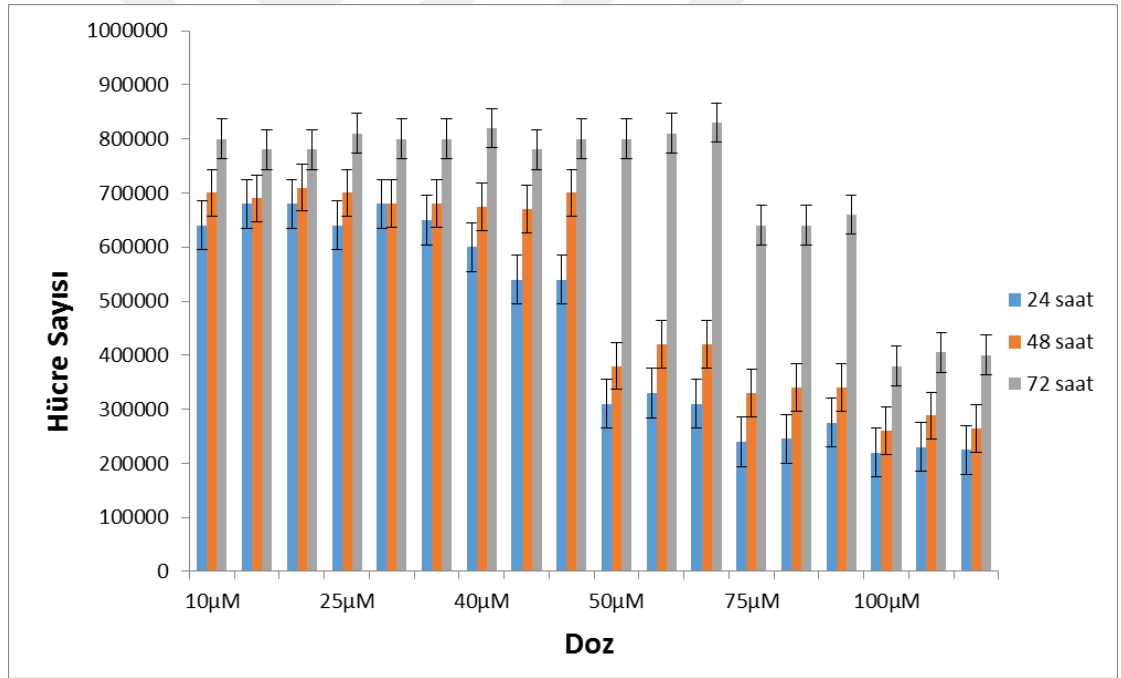
QRT-PCR yönteminde elde edilen sonuçlara göre relatif kantitasyon yapabilmek için  $2^{(-\Delta CT)}$  metodu kullanıldı.  $2^{(-\Delta CT)}$  methodu, QPCR sistemi tarafından üretilen eşik döngülerini (Ct) doğrudan kullanan, normalleştirici olarak referans genler baz alınır, farklı örnekler arasındaki göreceli gen ekspresyon düzeylerini hesaplamak için uygun bir yöntemdir (84). Bu yöntemin nihai sonucu, bir referans gen ile normalize edilmiş bir referans numuneye göre, hedef numunedeki gen ekspresyonunun kat değişikliği (Fold change) olarak sunulmaktadır. Yani, matematiksel olarak kontrol örneğindeki normalleştirilmiş gen ifadesine ( $2^{(-\Delta CT)}$ ) bölünmüş test örneğindeki normalleştirilen gen ifadesi ( $2^{(-\Delta CT)}$ ) Kat değişimini ( $2^{(-\Delta \Delta CT)}$ ) vermektedir. Bu değer bize ilgili genlerin kurkumin etkisi sonucu kolon adenokarsinom hücrelerindeki ifade düzeyinin, kontrol baz alınarak kıyaslanmasını sağlamaktadır. Katlanma düzenleme (Fold Regulation) kat değişiklik sonuçlarını biyolojik açıdan anlamlı bir biçimde temsil eden kavramdır. Birden büyük katlanma değişimi değerleri, pozitif veya yukarı doğru düzenlemeyi belirtmektedir. Elde edilen bu bilgiler ve sayısal veriler ışığında kurkumin uygulanmış kolon adenokarsinom hücrelerinde kontrol gruplarına kıyasla apoptotik genlerin ifadesinin ne yönde değiştiği belirlendi ve yorumlandı.

Sonuçlar istatistiksel olarak, Student's t testi uygulanarak karşılaştırıldı. İstatistiksel çözümlenelerde  $p < 0,05$  değeri anlamlı kabul edilerek, 0,95 güven aralığında değerlendirme yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Kurkumin Doz Belirleme Deneyi Bulguları

Doz belirleme deneyi için 6 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna canlı 500.000 SW 480 hücre ekimi gerçekleştirildi. Kurkumin moleküler ağırlığı baz alınarak yapılan hesaplamalar sonucu belirlenen miktarda DMSO içerisinde çözünerek 10- 25- 40- 50- 75 -100  $\mu\text{M}$  doz dilüsyonlarında ve 100'er  $\mu\text{l}$ 'lik eşit hacimlerde hücrelere uygulandı. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda kuyucuklardaki hücreler tripsin ile kaldırılarak toplanıp santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra 1 ml medyum eklenip, pipetaj yapılarak thoma lamına damlatıldı ve sayım yapıldı. Hücre sayımı kaydedilip IC50 her saat için ayrı olarak; 24 saat için 50  $\mu\text{M}$ , 48 saat için 75 ve 72. saat için 100  $\mu\text{M}$  olarak hesaplandı (Grafik 1).

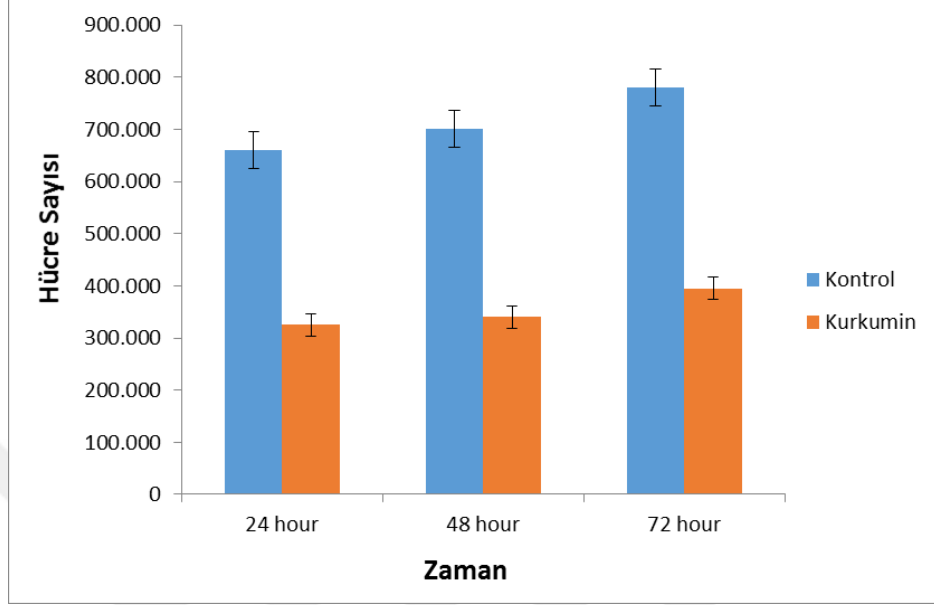


**Grafik 1.** SW 480 Hücreleri için Kurkumin Doz İnaktivasyon Grafiği

### 4.2. Proliferasyon Deneyi Bulguları

6 kuyucuklu kültür plakları her bir doz için kontrol ve kurkumin grubu olarak 3 tekrarlı şekilde ayrılarak sayım işlemi gerçekleştirildi. Kontrol grubuna ait kuyucuklardaki hücre sayılarında zamanla orantılı olarak artış gözlemlendi. Deney

grubunda her üç saat için ayrı ayrı belirlenen IC50 dozuna uygun olarak kurkumin ekstraktı uygulanarak sayım yapıldı ve hücre sayılarında anlamlı şekilde azalma gözlemlendi ( $p < 0.05$ ), (Grafik 2).

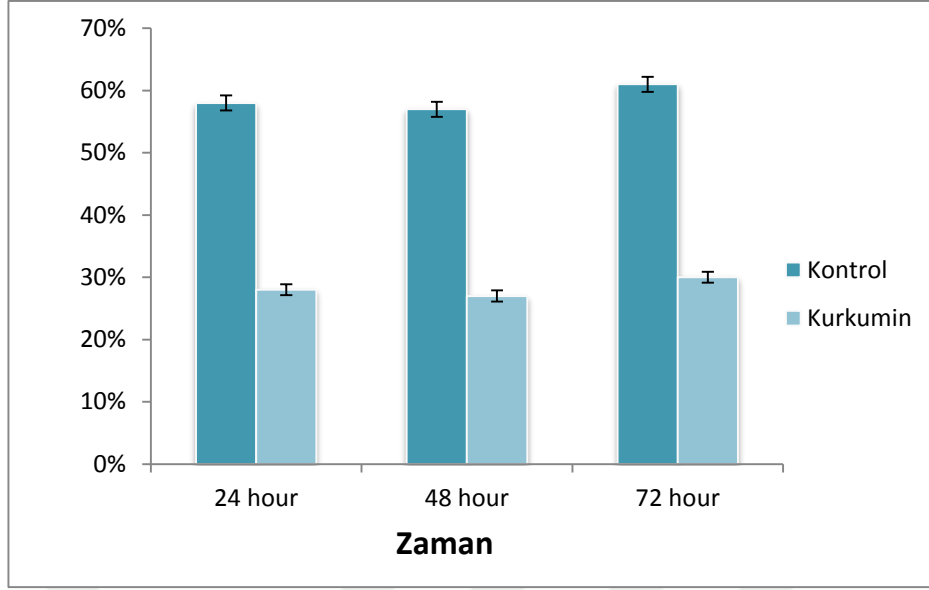


**Grafik 2.** Zamana Bağlı Hücre Proliferasyon Verileri

#### **4.3. 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BrdU) İşaretleme Bulguları**

24 kuyucuklu kültür plakları içerisine yerleştirilen yuvarlak lameller üzerine ekilen 100.000 SW 480 hücresiyle yapılan BrdU işaretleme; 24, 48 ve 72. saatler için ayrı ayrı kontrol ve deney grupları oluşturularak gerçekleştirildi. Kontrol grubunda tüm saatlerde sentez fazında çok sayıda BrdU ile işaretlenmiş hücreler gözlemlendi (Resim 3,5,7).

24, 48 ve 72. saatlerde uygulanan Kurkumin gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla BrdU işaretleme indeksinde anlamlı bir azalma belirlendi ( $p < 0.05$ ). (Grafik 3, Resim 4,6,8).

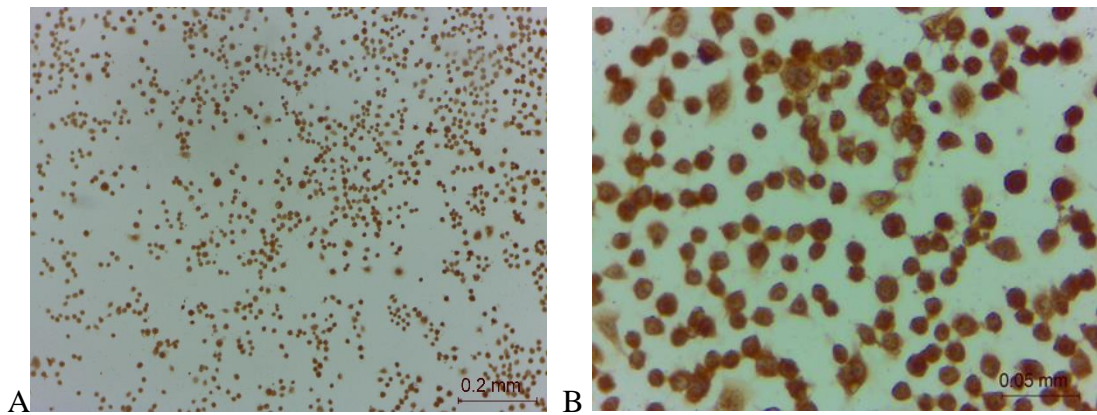


**Grafik 3.** BrdU işaretlenme indeksi

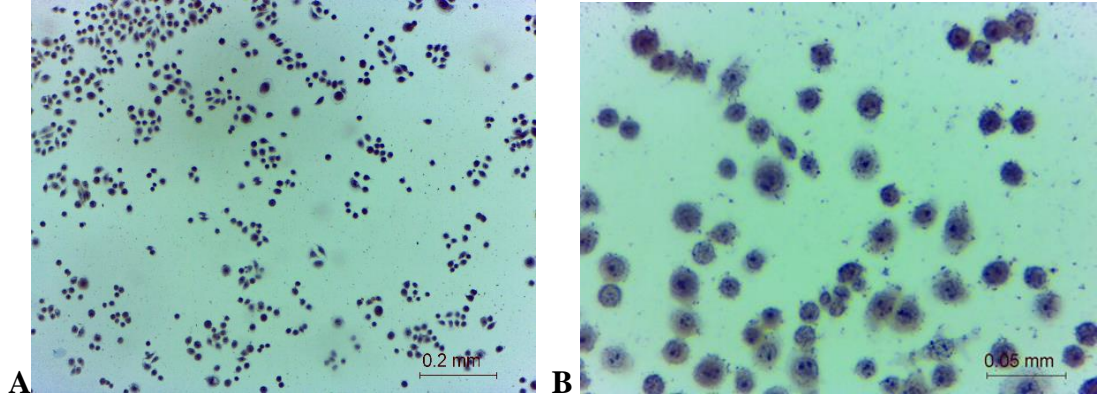
Grafik 3’ de görülen BrdU işaretleme indeksi, zamana bağlı belirlenen konsantrasyonlarda uygulanan kurkuminin SW 480 kolon adenokarsinom hücreleri üzerinde proliferasyonu anlamlı şekilde azaltıcı etkisi olduğunu ifade etmektedir.

Hücreler BrdU metodu ile boyandıktan sonra ışık mikroskop ve dijital kamera kullanılarak fotoğraflandı.

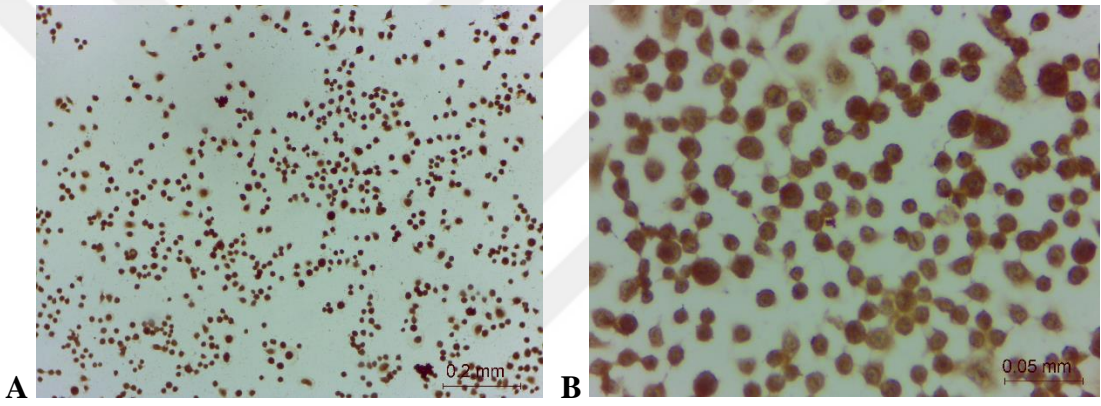
Kontrol grubunu oluşturan hücrelerde 24, 48 ve 72. saatler için BrdU pozitif olarak kabul edilen ve proliferasyonun devamlılığını belirten, kahverengi renk varlığı görülmektedir.



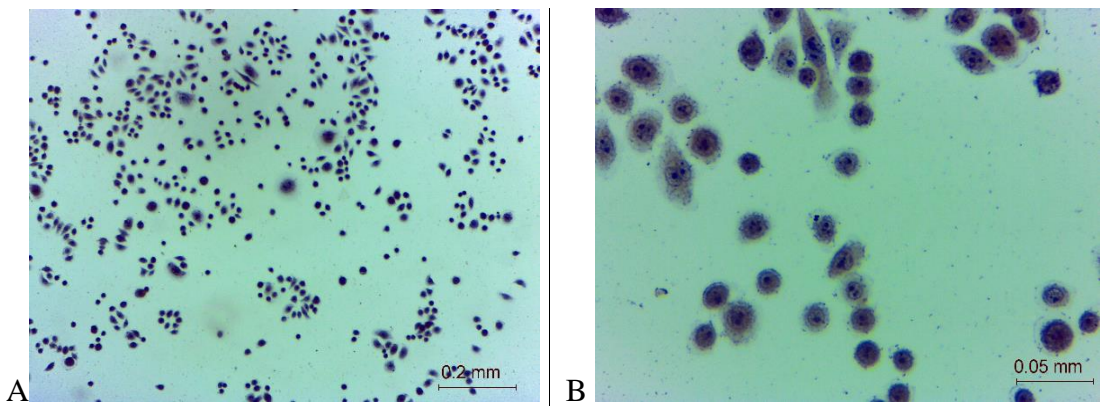
**Resim 3. 24. Saat Kontrol Grubu; BrdU ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)**



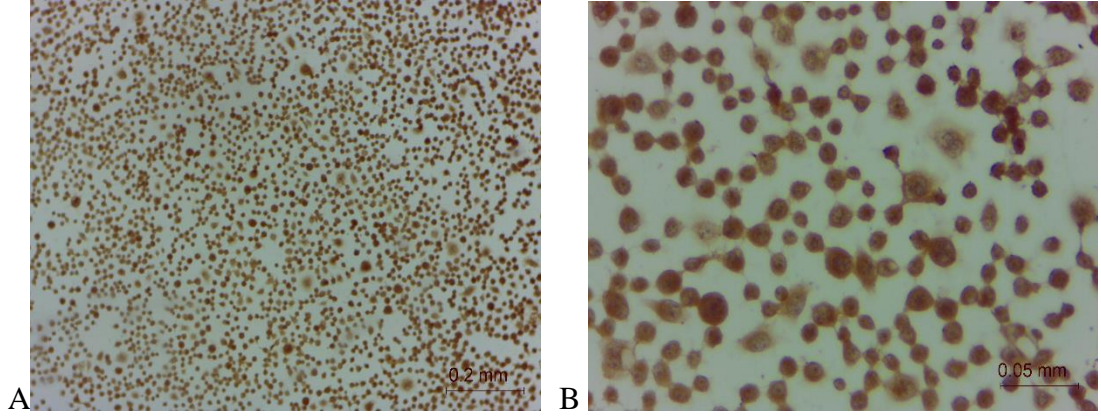
**Resim 4.** 24 Saat Kurkumin; BrdU ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)



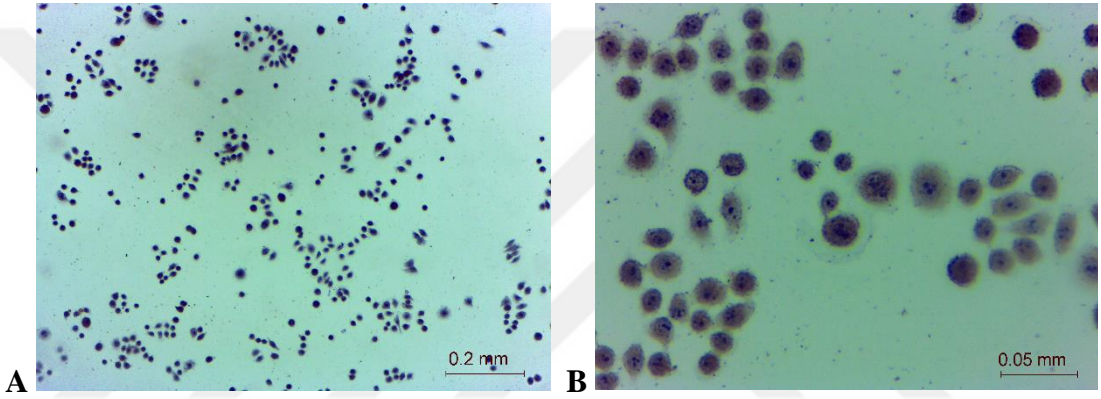
**Resim 5.** 48 Saat Kontrol Grubu; BrdU ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)



**Resim 6.** 48. Saat Kurkumin Grubu; BrdU ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)



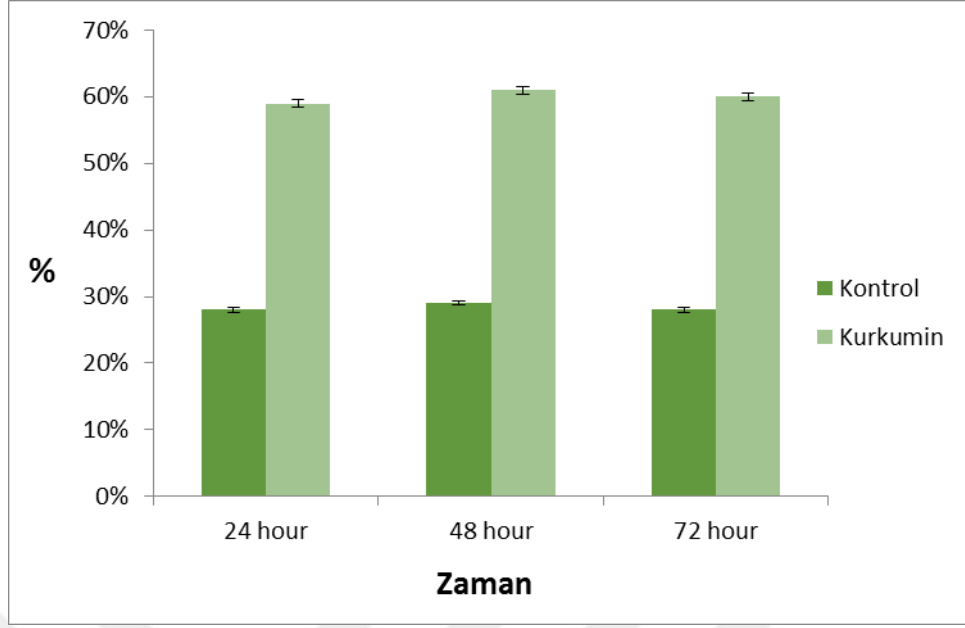
**Resim 7.** 72. Saat Kontrol Grubu; BrdU ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)



**Resim 8.** 72 Saat Kurkumin Grubu; BrdU ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)

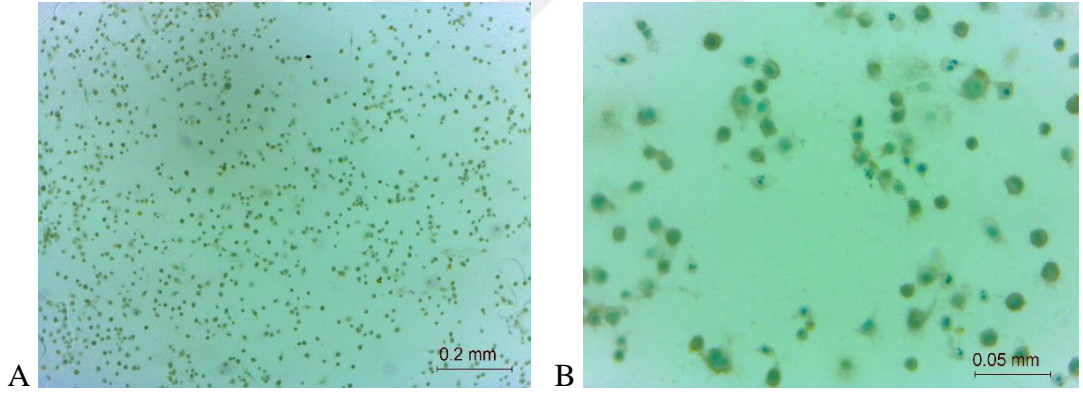
#### **4.4. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End Labeling) Bulguları**

24 kuyucuklu platalere yuvarlak lameller üzerine ekilen 100.000 SW 480 hücresiyle yapılan TUNEL işaretlemesi; 24, 48 ve 72. saatler için ayrı ayrı kontrol ve deney grupları şeklinde belirlendi. Kontrol grubunda tüm saatlerde çok az sayıda apoptotik hücre (TUNEL ile pozitif boyanan hücre) gözlemlenirken (Resim 9,11,13); 24, 48 ve 72. saatleri için verilen kurkumin gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla çok fazla sayıda apoptotik hücre gözlemlendi (Grafik 4, Resim 10,12,14).



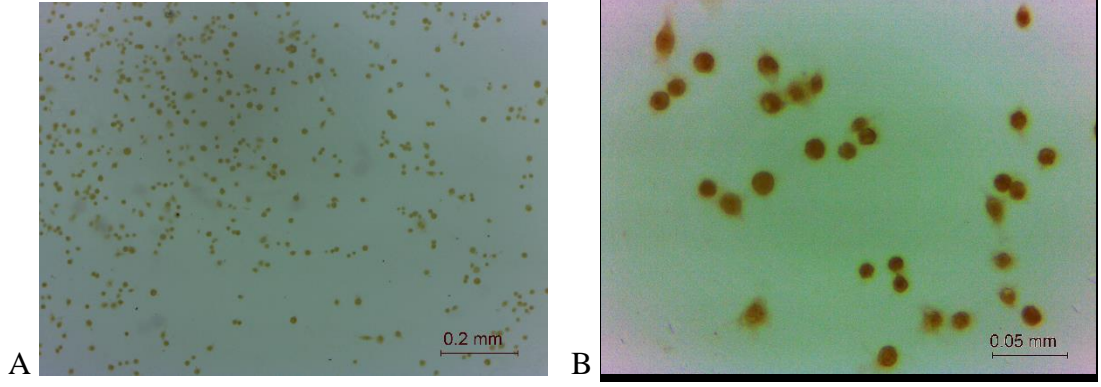
**Grafik 4.** TUNEL işaretlenme indeksi

Grafik 4’de görülen TUNEL işaretlenme indeksi, zamana bağlı belirlenen konsantrasyonlarda uygulanan kurkuminin SW 480 kolon adenokarsinom hücreleri üzerinde apoptozu anlamlı şekilde artırıcı etkisi olduğunu ifade etmektedir ( $p<0,05$ ).

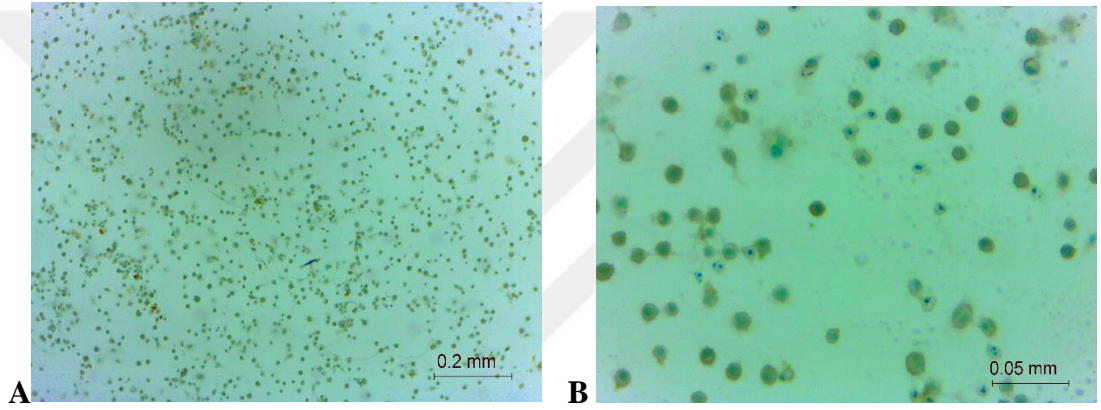


**Resim 9. 24.** Saat Kontrol Grubu; TUNEL ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)

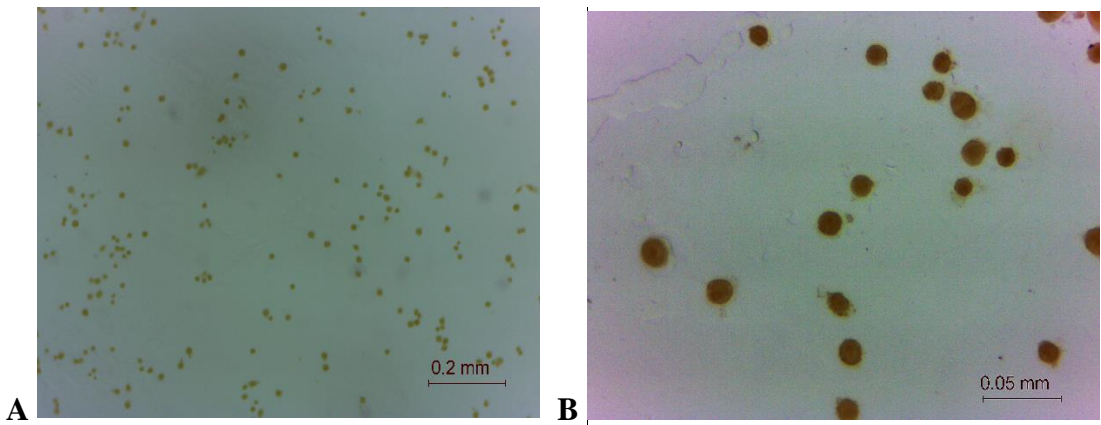




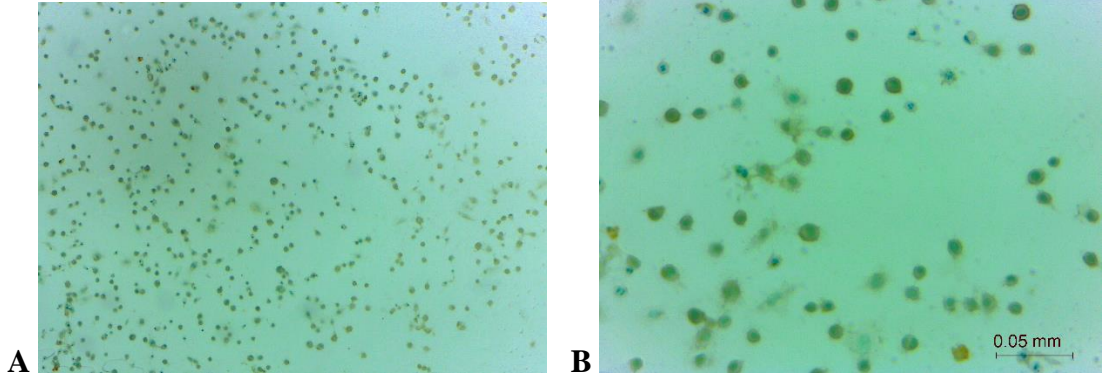
**Resim 10. 24.** Saad Kurkumin Grubu; TUNEL ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)



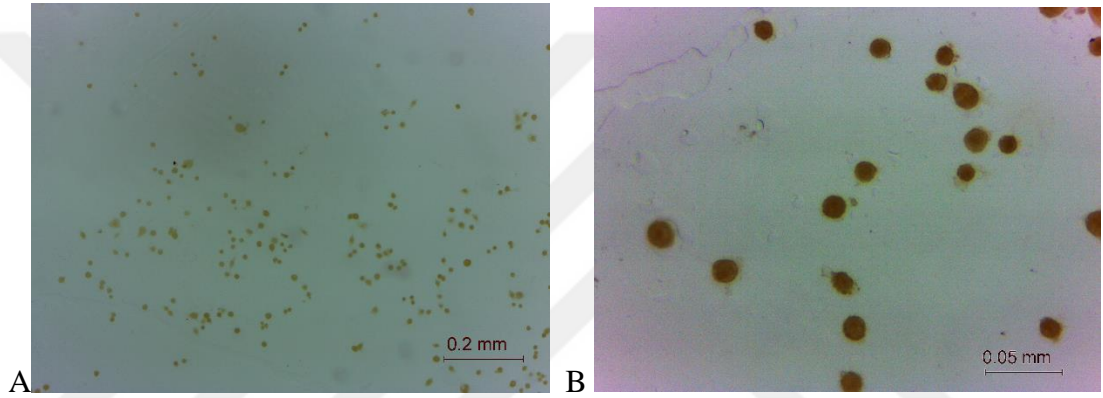
**Resim 11. 48.** Saad Kontrol Grubu; TUNEL ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)



**Resim 12. 48.** Saad Kurkumin Grubu; TUNEL ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)



**Resim 13.** 72 Saat Kontrol Grubu; TUNEL ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)



**Resim 14.** 72 Saat Kurkumin Grubu; TUNEL ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)

#### **4.5. Kantitatif Real Time PCR( QRT PCR) ve Gen Ekspresyon Bulguları**

Elde edilen sonuçlar, Light cyclor cihazından kontrol ve kurkumin gruplarına ait örneklerden elde edilen sayısal Ct (Cycle threshold) değerleri kullanılarak QRT PCR deneyleri için popüler yazılım programlarında en sık kullanılan ölçme yöntemlerinden biri olan  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi ve Student t testi ile analiz edilmiştir. (Light cyclor 96 Software version 1.1)

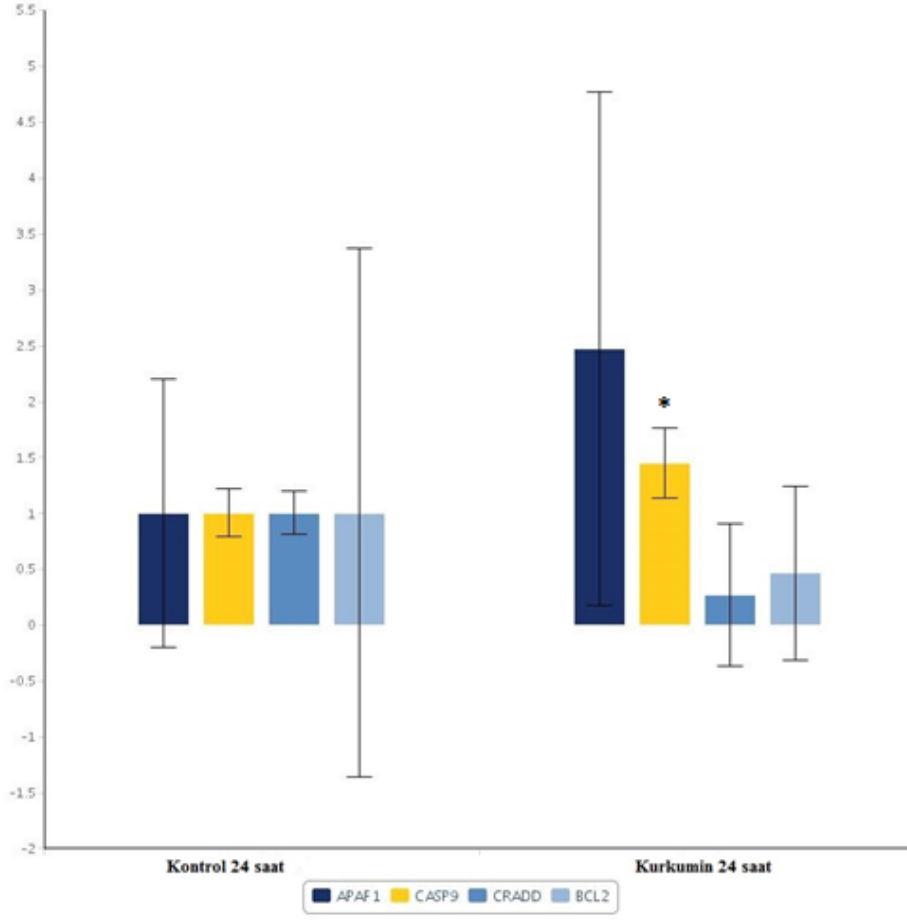
Buna göre; SW480 hücreleri üzerinde kurkuminin etkisini gösterebiliyor olabileceğini düşündüğümüz 21 apoptotik genden 24. Saat 50  $\mu M$ 'lık doz uygulamasında kontrol grubuna göre sadece CASP9 ( $p=0,044296$ ) geni ifade düzeyinde yukarı yönde düzenlenen anlamlı bir farklılık elde edilmiştir. ( $p<0,05$ )

48 saat 75  $\mu M$ 'lık doz uygulamasında kurkumin grubunda kontrol grubuna göre gen ifade düzeyinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).

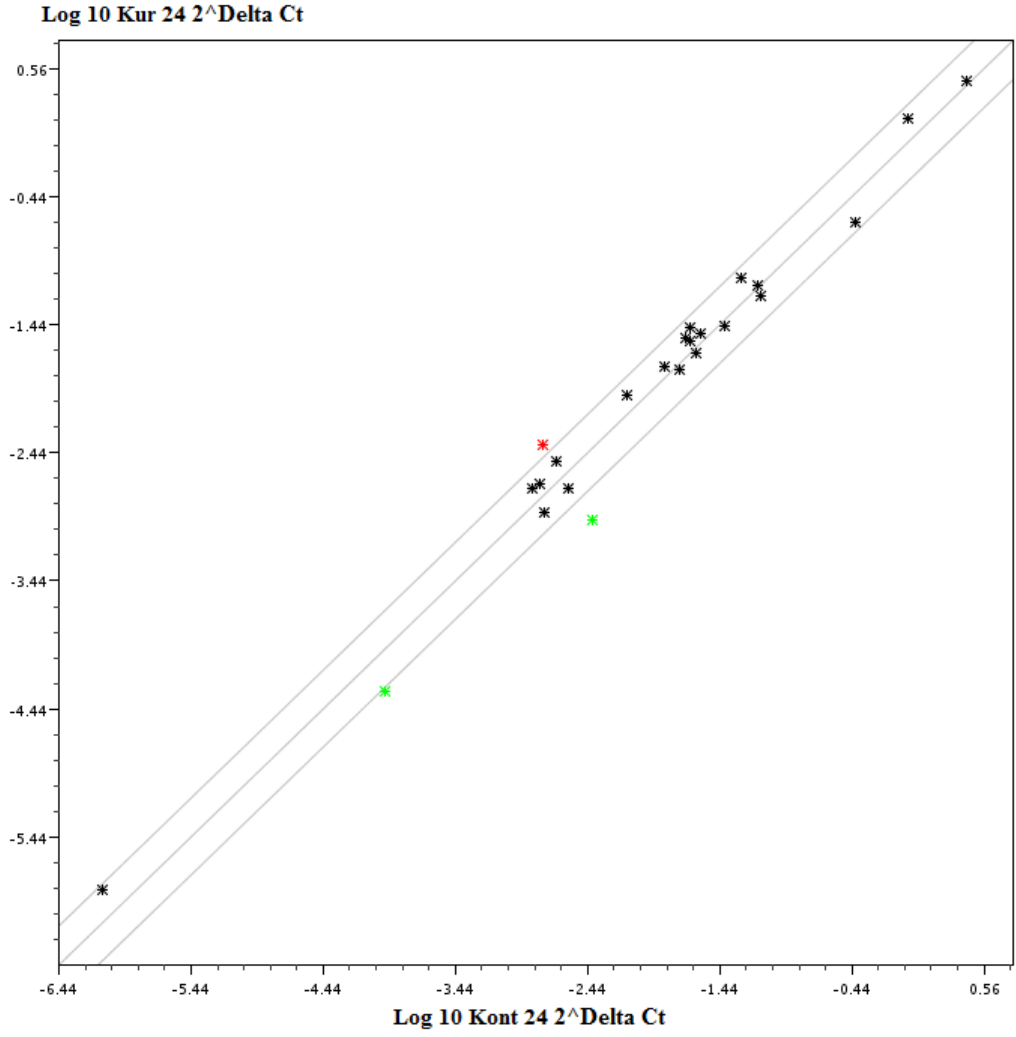
72. saat 100  $\mu$ M'lık doz uygulamasında ise kontrol grubuna göre CASP3 ( $p=0,005964$ ), CASP9 ( $p= 0,044288$ ), BİK ( $p=0,032763$ ) ve CRADD ( $p= 0,038466$ ) genleri ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Tüm saatler kendi içerisinde karşılaştırıldığında ise 24 saat Kurkumin grubuna göre 48 ve 72. Saatlerde CASP7 ( $p= 0,006458$ ), BİD ( $p=0,049296$ ) ve PTEN ( $p=0,049801$ ) genlerinde ekspresyonun anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Bu bulgularda kurkuminin apoptotik etkinliğinin zaman ve doz bağımlı artışını desteklemektedir.

#### **4.5.1. 24. Saat Kontrol Grubu ve Kurkumin Grubu Gen Ekspresyon Bulgularına ait Değişim**

Student t testi kullanılarak, 24 saat kontrol ve 24 saat kurkumin örnek çiftleri arasındaki gen ekspresyonu değişiminde anlamlı farklılıklar yalnızca CASP-9 için gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Kat değişikliği bulgularına bakıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir değer elde edilemese de APAF1'in Kurkumin gruplarında kontrol gruplarına kıyasla 2,41 kat daha yüksek düzeyde ifade edildiği, CRADD'ın 3,70 ve Bcl-2'nin ifade düzeyinin 2,16 kat azaldığı belirlenmiştir.



**Grafik 5.** 24 saat kontrol grubu ve Kurkumin grubu kat değişikliği bulguları

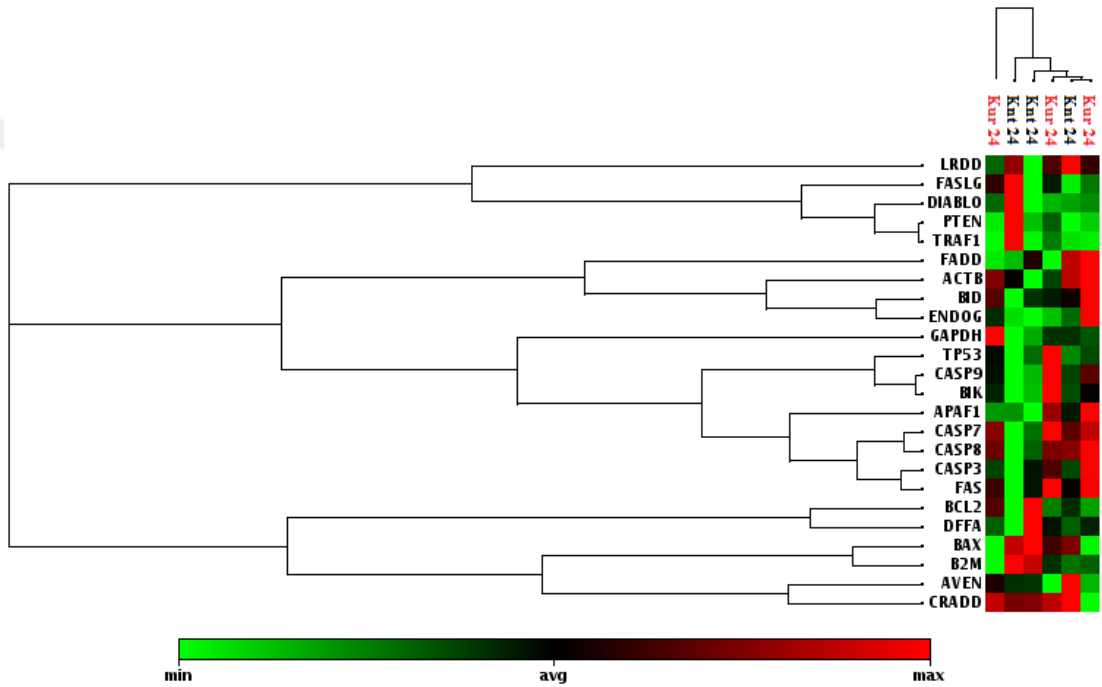


**Grafik 6.** 24 saat Kurkumin ve Kontrol Grupları ifade düzeyi değişimlerine ait Saçılım Grafiği (Scatter Plot)

APAF1	2,468
CRADD	-3,6978
BCL2	-2,1287

Grafik 6 ile gösterilen saçılım grafiğinde, her nokta biri x eksenini üzerinde, diğeri de y eksenini üzerinde çizilen iki deneyde hedef genin ifade değerini temsil eder. Diyagonalin altındaki noktalar, x-eksenini üzerinde çizilen deneyde daha yüksek ifade genleri temsil ederken benzer şekilde, diyagonalin üstündeki noktalar, y eksenini üzerinde çizilen deneyde daha yüksek ifade değerleri olan genleri temsil etmektedir (85).

Bu bulgular kurkuminin 24 saat 50  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında antiapoptotik Bcl-2 geni üzerinden gösterdiği inhibe edici etkisiyle SW480 hücrelerinin apoptoza gitmesinde etkili olabileceğini göstermektedir. Kaspaz-2 ve FASL / TNF reseptör etkileşimli protein RIP için spesifik apoptotik adaptör molekülü olan CRADD'ın ise kurkumin uygulanan gruplarda ifadesinin kontrol gruplarına göre 3 kat azaldığı gözlemlenmektedir. Bu durum ise SW-480 kolon adenokarsinom hücrelerinin BCL-2 yolağı inhibisyonu üzerinden apoptoza gösterdiği dirence karşılık CRADD yolağı aracılığıyla apoptoza gitmeye çalıştığını düşündürmektedir.



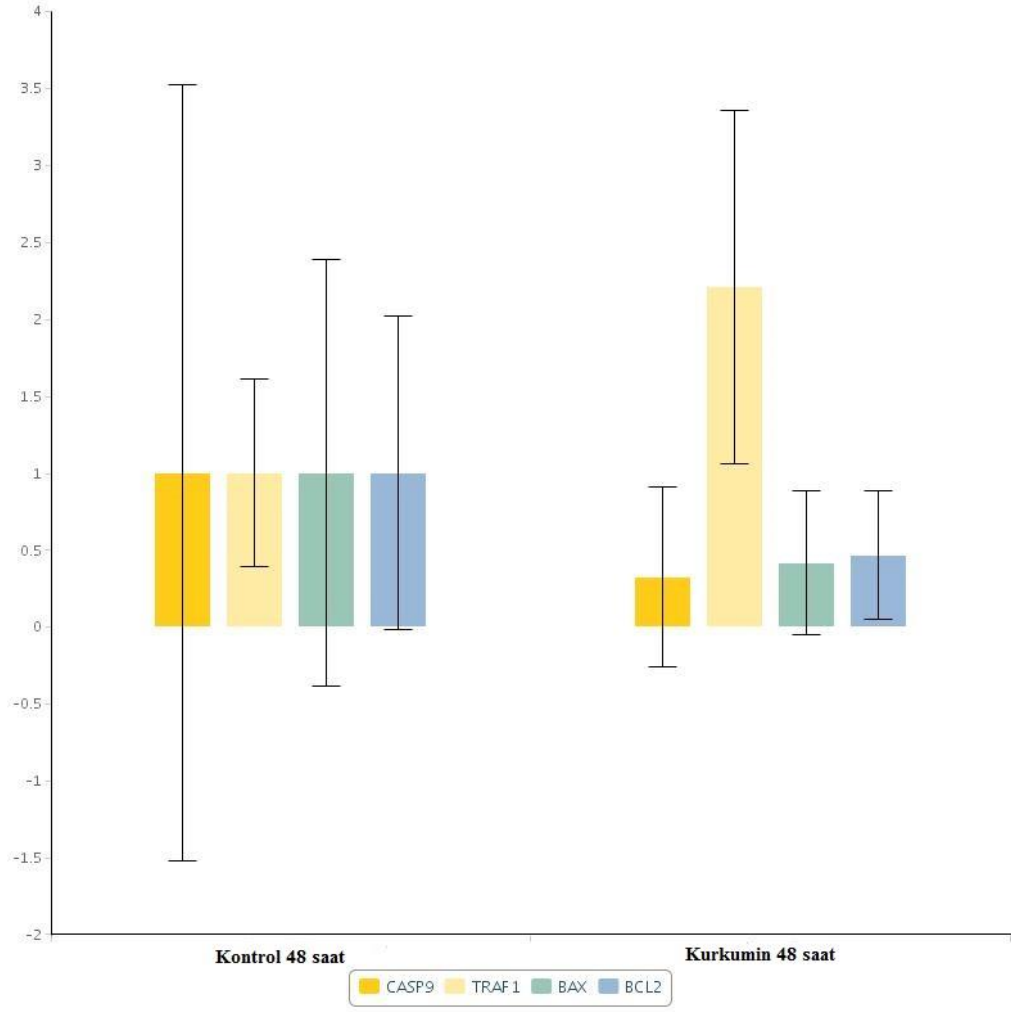
**Grafik 7.** Hiyerarşik Kümeleme Grafiği (Clustering plot)

Sonuçlar benzer ifade düzeylerine sahip genleri birbirine yakın şekilde gruplayarak verilerin hiyerarşik bir düzen içerisinde sınıflandırılmasını sağlayan bir metod olan kümeleme analizi (clustering metodu) ile de ekspresyon seviyelerinin değişimine göre gösterildi (Grafik 7). Buna göre; kontrol gruplarına göre, kurkumin gruplarında ifade düzeyi değişikliği belirlenmek istenilen apoptotik genlerden APAF1, CASP9, CRADD'ın daha yüksek düzeyde ve antiapoptotik BCL2 geninin daha düşük düzeyde ifade edildiği görülmüş ancak istatistiksel olarak yalnızca CASP9 için anlamlı bir değer elde edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Bu değer bize kurkuminin 24 saat 50  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında, apoptotik yolda görevli kilit moleküllerden biri olan CASP9'un aktivasyonu aracılığı ile etki gösterebileceğini kanıtlamaktadır.

Aynı zamanda istatistiksel olarak anlamlı bir değer elde edilemese de kurkumin grubunda APAF1 gen ifadesinde yukarı yönde görülen düzenlenme, apoptoz için önemli rol oynayan apoptozom molekülünün oluştuğu düşüncesini desteklemektedir.

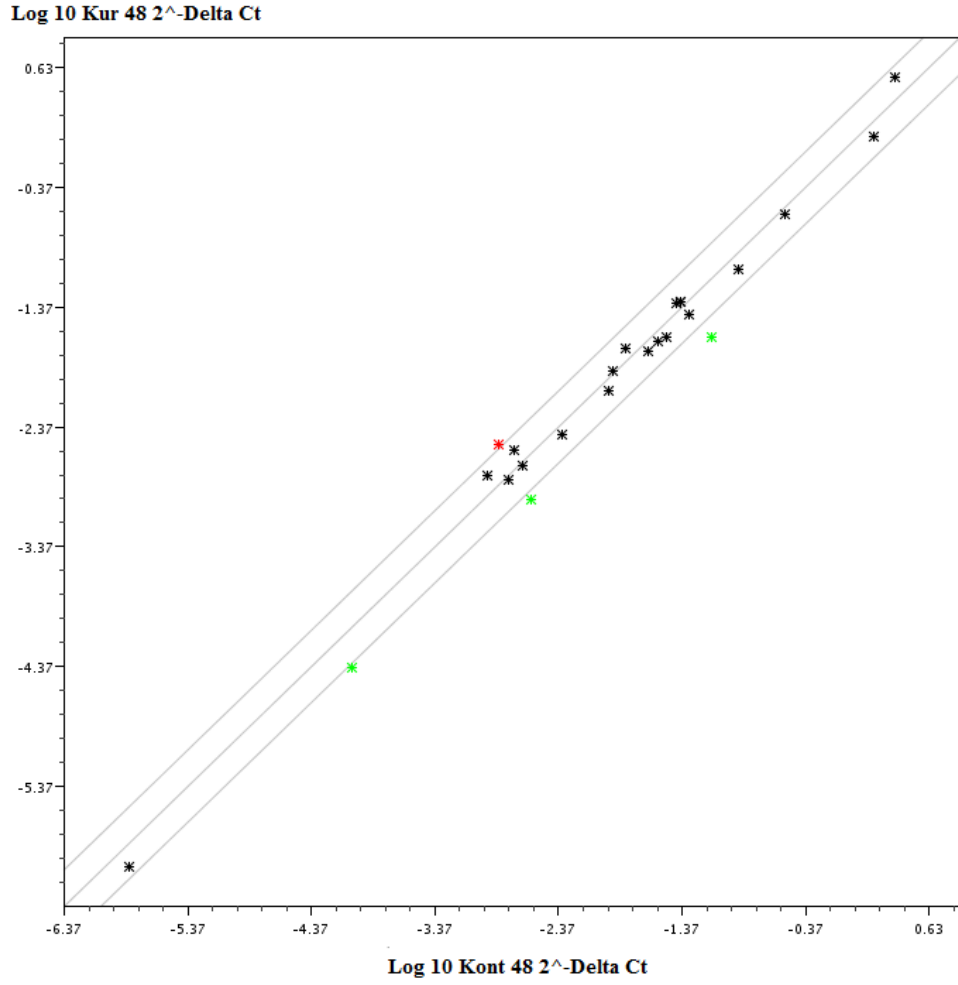
#### **4.5.2. 48. Saat Kontrol Grubu ve Kurkumin Grubu Gen Ekspresyon Bulgularına ait Değişim**

Student t testi kullanılarak yapılan analizde, 48 saat kontrol ve 48 saat 75 µM'lık kurkumin uygulanmış örnek çiftleri arasındaki gen ekspresyonu değişiminde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). Kat değişimi bulgularına bakıldığında ise kurkumin grubunda BCL2'nin kontrol grubuna göre 2,1 kat daha düşük düzeyde ifade edildiği gözlenmiştir. Apoptotik proteinler olan BAX ve CASP9 genleri ifade düzeyinde kurkumin grubunda kontrol grubuna göre beklenmedik bir azalma meydana geldiği görülmüştür. Kurkumin grubunda ise TRAF1'in, kontrol grubuna göre yaklaşık 2,2 kat artış gösterdiği belirlenmiştir (Grafik 8).



**Grafik 8.** 48 saat Kurkumin grubunda kontrol grubuna göre gerçekleşen kat değişikliği

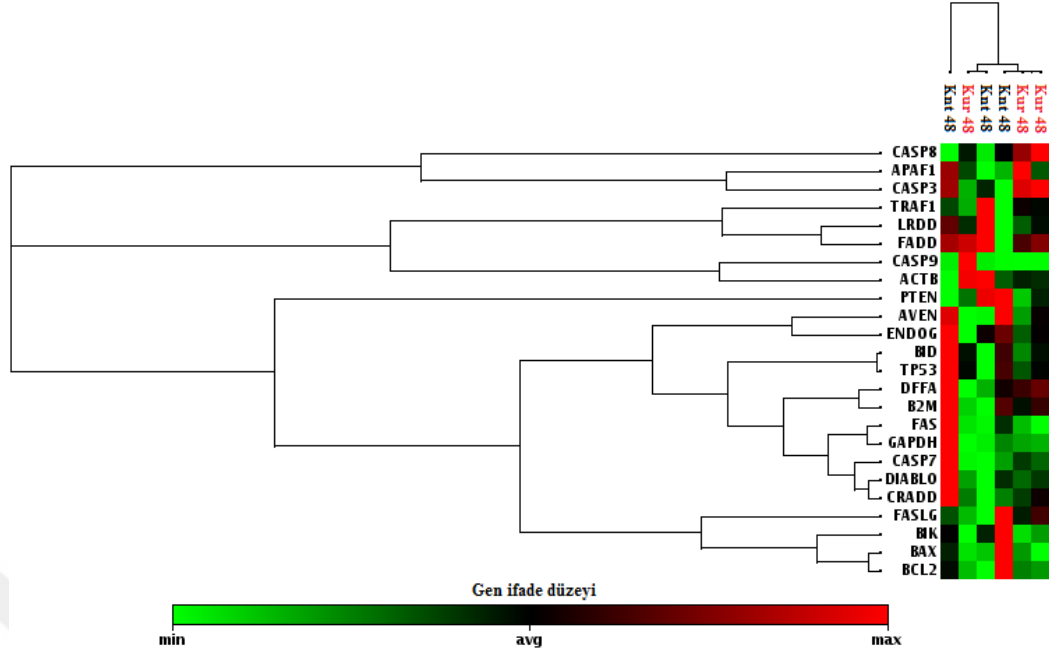




**Grafik 9.** 48 saat Kurkumin ve Kontrol Grupları ifade düzeyi değişimlerine ait saçılım grafiği (Scatter Plot)

<b>TRAF1</b>	<b>2,21</b>
<b>BAX</b>	<b>-2,40</b>
<b>BCL2</b>	<b>-2,15</b>
<b>CASP9</b>	<b>-3,10</b>

Grafiğe göre; 48 saat kurkumin grubunda TRAF1 gen ifadesinin kontrol grubuna göre, kontrol grubunda ise BAX, BCL2 ve CASP9 genlerinin kurkumin grubuna göre ifade düzeyinin yüksek olduğu gözlenmektedir. Ancak bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı bir değer aralığında bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).



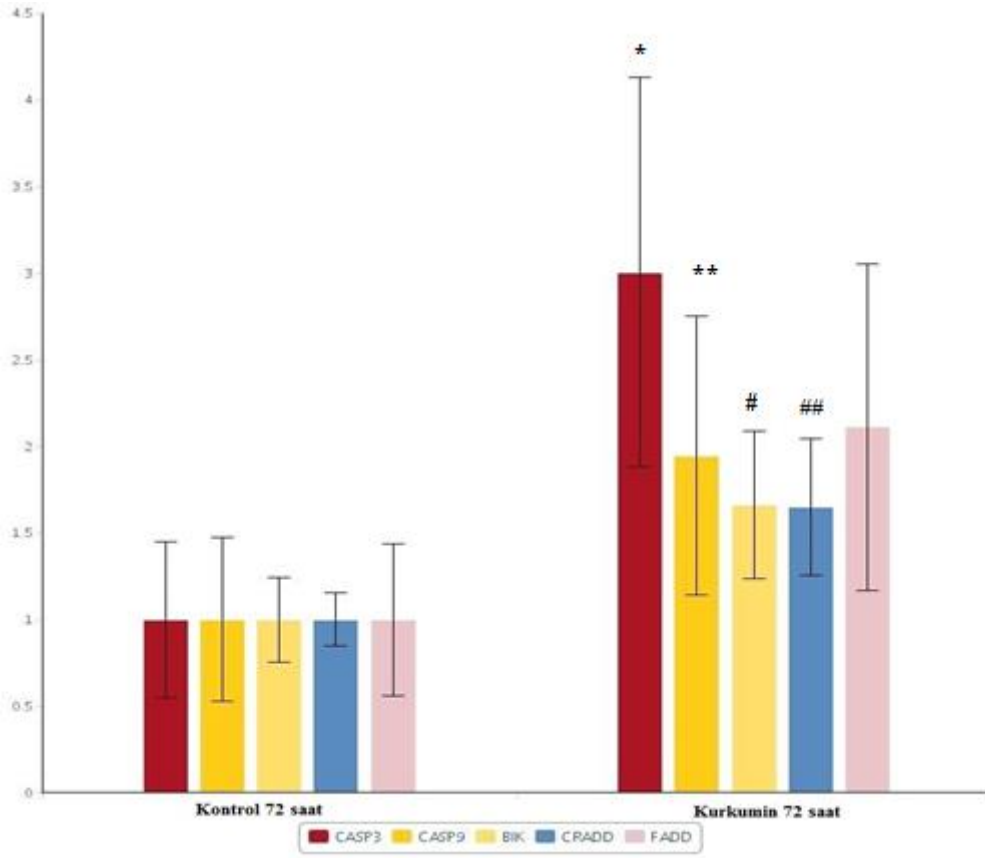
**Grafik 10.** Hiyerarşik Kümeleme Grafiği (Clustering plot)

Kontrol grubunda BAX, BCL2 ve CASP9 genlerinin ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir değer aralığında olmasa da, kurkumin grubuna göre yüksek olduğunun gözlenmesi kurkumin grubunda BCL2 geninin ifadesinin baskılandığını düşündürmektedir. Proapoptotik düzenleyici olarak fonksiyon gösteren BAX ve CASP9 genlerinin ifade düzeyinin kontrol gruplarında artış göstermesi ise kanser hücrelerinde apoptotik sürecin sürdürülmeye çalışıldığı ancak BCL2 ifade düzeyinin bu iki genden yüksek olması, antiapoptotik mekanizmanın aktifliğini öne çıkarmaktadır. Kurkumin grubunda ifadesi yukarı yönde değiştiği gözlenen tek gen ise TRAF1'dir. TRAF1 ve TRAF2, TNF-alfa aracılı MAPK8/JNK ve NF- $\kappa$ B aktivasyonu için gerekli olan bir heterodimerik kompleks oluşturur ve aynı zamanda IAP'ı aktive edebilir. Bu durumda SW480 kolon adenokarsinom hücrelerinin uygulanan kurkumin etkilerine direnç olarak sağkalım sinyallerini başlattığı sonucuna varılmıştır (Grafik 10).

#### 4.5.3. 72. Saat Kontrol Grubu ve Kurkumin Grubu Gen Ekspresyon Bulgularına ait Değişim

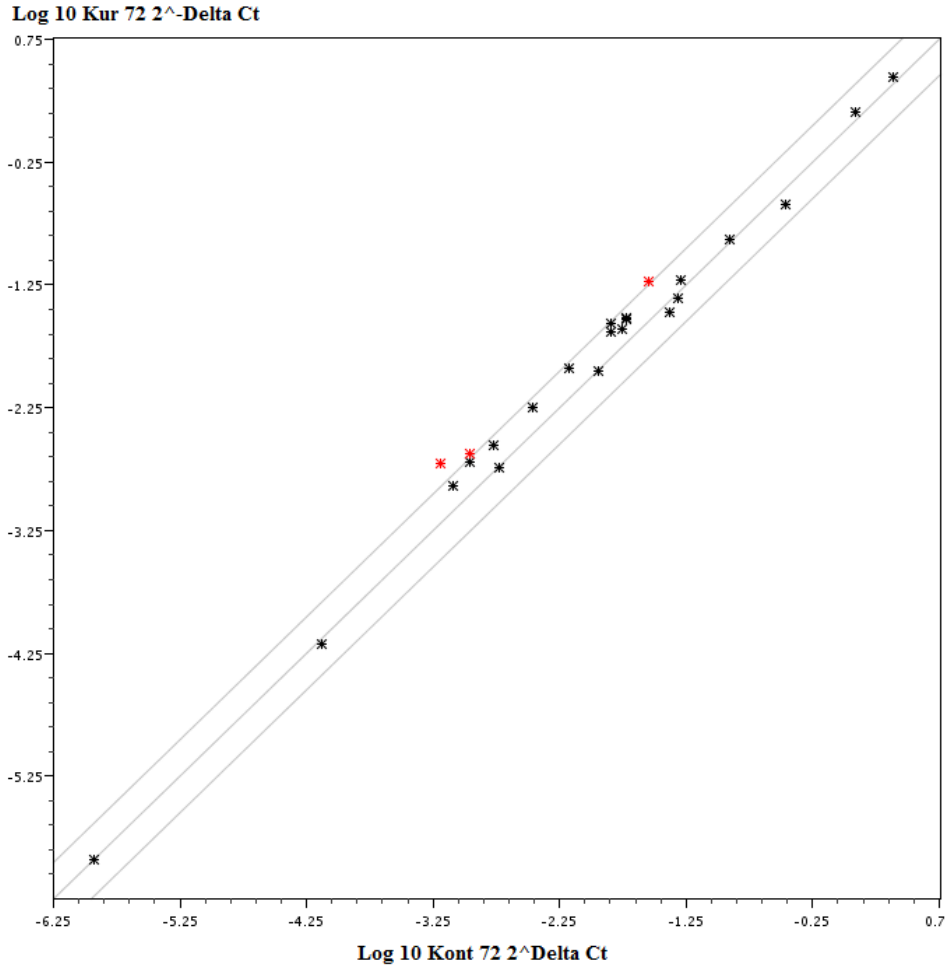
Student t testi kullanılarak, 72 saat kontrol grubu ve kurkumin uygulanmış örnek çiftleri arasında proapoptotik fonksiyon gösteren CASP3, CASP9, BİK ve

CRADD genleri ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ).



**Grafik 11.** 72 saat Kurkumin grubunda kontrol grubuna göre gerçekleşen kat değişikliği

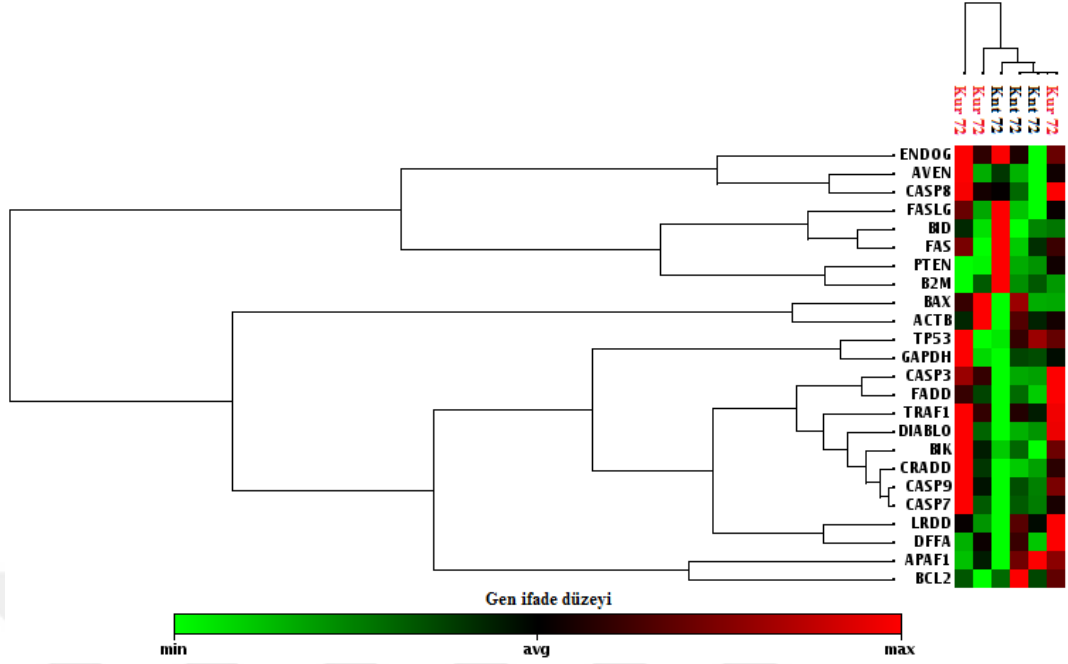
72 saat Kurkumin gruplarında apoptotik süreci destekleyen APAF1, CASP3, CASP9, LRDD ve FADD genleri ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 2 kat artış gözlenirken, antiapoptotik fonksiyon gösteren TRAF1 geninde kurkumin grubunda kontrol grubuna göre 2 katın üzerinde bir artışın söz konusu olduğu belirlenmiştir (Grafik 11).



**Grafik 12.** 72 saat Kurkumin ve Kontrol Grupları ifade düzeyi değişimlerine ait saçılım grafiği (Scatter Plot)

<b>CASP3</b>	<b>3,0035</b>
<b>TRAF1</b>	<b>2,1485</b>
<b>FADD</b>	<b>2,1092</b>

Grafik 12’de görülen saçılım grafiğine göre 72 saat 100  $\mu$ M kurkumin uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak ifade düzeyi artan CASP3 ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlenemeyen TRAF1 ve FADD genlerindeki ifade düzeyi artışı gözlenmiştir.

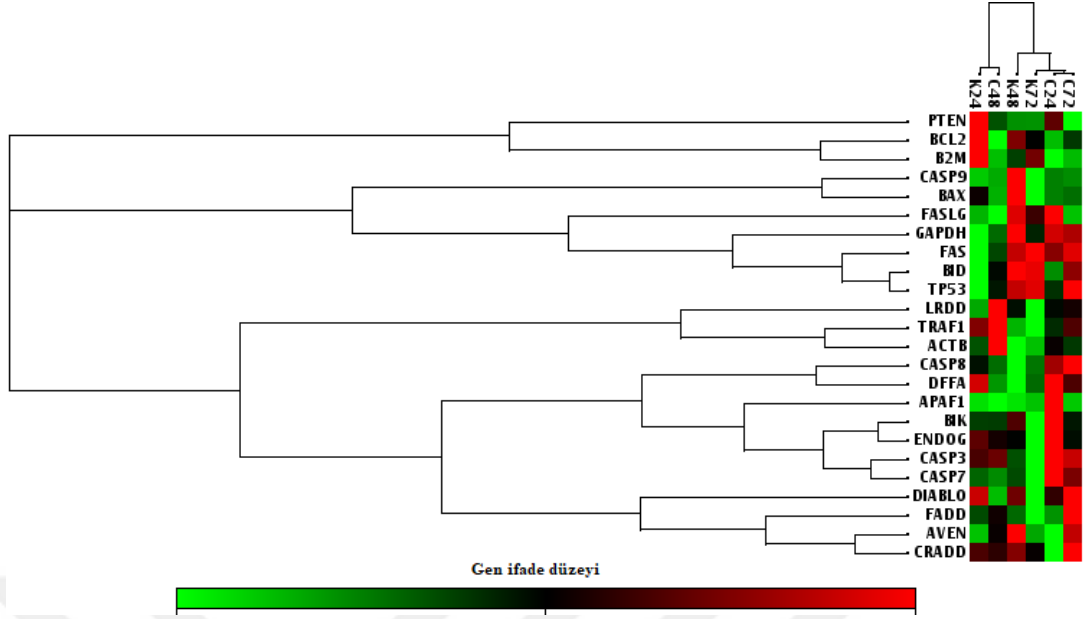


**Grafik 13.** Hiyerarşik Kümeleme Grafiği (Clustering plot)

72 saat kurkumin grubunda CASP3, CASP9, BİK ve CRADD gen ifadeleri düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış söz konusu olduğunu belirtmiştik. ( $p < 0,05$ ). Ayrıca FADD, CASP8, ENDOG, BAX genleri ifade düzeyinde de istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubuna göre bir artış olduğu görülmektedir (Grafik 13). Bu durum Kurkumin 72 saat  $100\mu\text{M}$ 'lık doz uygulaması ile SW480 hücrelerinde apoptotik sürecin hem reseptör hemde mitokondriyal yollar üzerinden maximum seviyede seyrettiğini ifade etmektedir.

#### 4.5.4. Kurkumin ve Kontrol Grupları Arasında Tüm Saat ve Doz Uygulamalarına ait İfade Değişimi Analizi

Kurkumin grupları için belirlenmiş olan 24 saat  $50\mu\text{M}$ , 48 saat  $75\mu\text{M}$  ve 72 saat  $100\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamaları için kendi aralarında bir kıyaslama yapıldı. Uygulanan dozlar arasında gerçekleştirilen Student t testi ile elde edilen değerlere göre 24 saate göre 48. saat'te CASP7 geninin ifadesinde anlamlı bir artışın olduğu gözlenmiştir ( $0,006458; p < 0,05$ ). 72. Saatte ise BID ve PTEN genleri ifade (Sırasıyla  $p = 0,049296$ ,  $p = 0,049801$ ;  $p < 0,05$ ) düzeyinde 24 ve 48. saatlere göre anlamlı bir değişiklik gözlenmiştir.



**Grafik 14.** Kurkumin ve kontrol gruplarına ait tüm saatler ve dozlar için belirlenen hiyerarşik kümeleme grafiği (C: Kurkumin, K: Kontrol gruplarını ifade etmektedir).

Bu bulgular Kurkuminin SW 480 kolon adenokarsinom hücreleri için belirlenen saat ve dozlardaki etkinliğini apoptotik yolda görevli birçok molekül üzerinden doğrudan ya da dolaylı yoldan gösterebileceği hipotezimizi desteklemektedir. Elde ettiğimiz bulgular değerlendirildiğinde moleküllerin ağırlıklı olarak kurkuminin direk hedeflerinden olan ölüm reseptörleri ilişkili proteinlerden FADD, aktivatör kaspazlar grubunda yer alan CASP3-7 ve 9, mitokondriyal ölüm yolağının temel molekülleri proapoptotik BİK, BAX, BID üzerinden olabileceği görülmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Kolorektal kanser dünyadaki mortalite ve morbiditenin başlıca nedenlerinden biri olması yönüyle önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Risk faktörleri coğrafi konum, beslenme alışkanlıkları, statü farklılıkları gibi temel çevresel etkenlerden dolayı değişiklik gösterse de genetik etkiler de kolon kanseri gelişiminde önemli yer tutmaktadır. Gelişmiş ülkelerde kolon kanseri insidansının, sigara ve alkol kullanımının artışı, hızlı hazırlanan gıda ürünlerinin tüketimi, doğal besin kaynaklarının azalması gibi farklı birçok nedenden dolayı her geçen yıl daha da yükseldiği görülmektedir. Buna karşı bu ülkelerde uygulanan tarama yöntemleri ve tedavi stratejileri nedeniyle ölüm oranlarının düşüş gösterdiği de ifade edilmektedir (85). Günümüzde kolon kanseri dahil bir çok kanser türünün tedavisinde kullanılmak üzere hibridoma ve rekombinant DNA teknolojilerine dayanılarak üretilmiş farklı etkiler sunan kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır. Bu ajanlar antitümöral etkilerini genellikle kanser gelişiminde önemli rol oynayan yollarda yer alan reseptörleri ve büyüme faktörlerini bloke etmek suretiyle sinyalizasyon kaskadını bozarak sağlamaktadır. Ayrıca tümör hücrelerine direk olarak inflamatuvar yanıt oluşumunu ve onların fagosite edilmelerini sağlayan antikora-bağlı hücrel sitotoksikite ve komplemana bağlı sitotoksikite yolu ile de gösterebilmektedirler (86). Cerrahi tedavinin ve sonrasında kullanılan kemoterapötik ajanların yanısıra tıp tarihinin temelini oluşturan fitoterapötik ajanların da benzer etkiler gösterebildiği yapılan çalışmalarla desteklenmiş, alternatif ve tamamlayıcı tedavi yöntemleri olarak uygulanması yaygınlaşmıştır. Son yıllarda bu noktada yapılmış ve literatüre değer katmış birçok çalışma mevcuttur. Bunlardan en önemlileri arasında çok yönlü moleküler etkileri görülen zerdeçal bitkisinin etken maddesi olan kurkuminin birçok kanser türü üzerindeki etkisi yer almaktadır. Kurkuminin anti-neoplastik aktiviteye sahip olması, molekül ağırlığının düşük olması ve toksisitesinin olmaması gibi özellikleri son yıllarda kanser araştırmalarında kullanılmak üzere potansiyel kemoterapötik ilaçların geliştirilmesinde kullanılan ideal öncü molekül haline getirmektedir. Göğüs, servikal, kolon, gastrik, hepatik, lösemi, oral epitel, yumurtalık, pankreas ve prostat gibi çeşitli kanser hücreleri serilerinde yapılan prelinik invitro ve invivo çalışmalar, kurkumin'in farklı antioksidan, anti-

inflatuar ve anti-kanser aktivitelerini içeren çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğunu ve farklı sinyal yollarını düzenleyerek tedavi edici ve koruyucu yönünün bulunduğunu ifade etmektedir (87, 88).

Kurkumin birçok patolojik durumun gelişmesinden sorumlu yollarda görev alan moleküllere hedef spesifik bağlanma yetisine sahip olan bir etken maddedir. Özellikle tümör hücreleri için bu yollardan en önemli olanı apoptozdur. İnvitro çalışmalar kurkuminin dolaylı veya direk yollardan birçok kanser türü üzerinde apoptozu indükleyici etkisinin olduğunu kanıtlamıştır. Ancak bu derece etkin bir molekülün klinikte kullanımı için henüz yeterli kanıt elde edilememiştir. Bunun sebebi, kurkuminin hızlı metabolize olması, biyoyararlanımının oral yolla alındığında oldukça düşük olması, fizyolojik konsantrasyonlarının düşük olması, her kanser türünün farklı evrelerindeki tümörlerde hücresel davranışın ve dolayısıyla oluşan yanıtın farklı olması, hastaların kişisel hayat tarzı farklılıklarına sahip olması ve kişilere özgü bazı genetik polimorfizmlerin görülebilmesi gibi problemlerdir. Bu problemlerden en önemlisi kurkuminin düşük biyoyararlanım özelliği göstermesidir. Biyoyararlanımın artırılması yönünde son yıllarda başarılı birçok çalışma yapılmıştır ve halen devam etmektedir. Çalışmalar genel olarak kurkuminin çeşitli nanopartiküller ve lipozom molekülleri ile daha etkili olabilecek analogları ya da etkinliğini desteklemesi beklenen diğer polifenolik maddelerle birlikte farklı yollar ile uygulanması yönündedir (62). Özellikle her kanser türü için farklı hücre serileri ile yapılan çalışmalar neticesinde farklı yanıtların elde edilmesi, kurkuminin bu etkileri gösterirken izlediği yolların anlaşılması açısından oldukça önemlidir. Kurkuminin kanser hücreleri üzerindeki etkinliğini siklinler, siklin bağımlı kinazlar (özellikle Cdk-2) ve NFKB aracılı düzenlenen Bcl2, COX2, MMP-9, TNF, siklinD1 ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak gösterdiğine dair birçok invitro çalışma mevcuttur (68).

Kanser hücreleri ve apoptoz arasındaki ilişki apoptozun tanımlandığı ilk yıllardan beri araştırılan bir konu olmuştur. Kurkuminin kanser hücreleri üzerine etkinliği ile ilgili yapılan çalışmalarda özellikle apoptotik yollarda görev alan molekülleri indüklediği ifade edilmiştir.



2009 yılında Prasad ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada kurkuminin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre serileri üzerinde doz ve zaman bağımlı olarak artan antiproliferatif ve apoptotik etkinliği olduğunu ifade etmişlerdir (14). Kurkuminin bu etkinliğini NF $\kappa$ B,  $\beta$ -katenin, siklin D1 ve Bcl-2'nin ekspresyon düzeyini azaltırken; p53, p21 ve BAX ekspresyon düzeylerini arttırarak düzenlediği belirtilmiştir (14, 89).

Özellikle apoptotik inhibitörlerden en önemlisi olan Bcl-2 inhibisyonunu sağlayan p53 ekspresyon düzeyini arttırması, kurkuminin apoptotik etkisinin hücrelerin farklı davranış özelliklerine göre p53 bağımlı mekanizma aracılı gösterdiğini ifade etmektedir. Guo ve arkadaşları 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada kurkuminin LoVo insan kolorektal kanser hücre serileri üzerindeki etkisini gen ifadesi, immünohistokimya ve protein miktar tayini yöntemleri ile araştırmışlardır. 24, 48 ve 72. saatlerde uygulanan 0-30  $\mu$ M'lık kurkumin uygulaması sonucu hücrelerde p53, BAX, kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeylerinde zaman ve doz bağımlı bir artış, antiapoptotik prokürsörlerden Bcl-2 ile Survivin genlerinde ve protein miktarlarında anlamlı bir azalma olduğunu ifade etmişlerdir. Dolayısıyla kurkuminin LoVo hücre serilerinde etkisini p53 bağımlı mekanizma üzerinden mitokondriyal yolak aracılığı ile gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir (90).

Bizde çalışmamızda KRAS mutasyonlarına ve p53 polimorfizmlerine sahip olduğu bilinen SW480 kolon adenokarsinom hücre serileri üzerinde kurkuminin farklı zaman–doz bağımlı apoptotik etkilerini immünohistokimyasal olarak, bu etkileri ne yönde hangi yolak ve hedef genler üzerinden gerçekleştirebileceğini de gen ekspresyon analizi yöntemlerinden QRT-PCR ile araştırmayı amaçladık. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, yapılmış çalışmalarını destekleyecek şekilde SW480 kolon adenokarsinom hücre hattı için kurkuminin apoptotik etkinliğinin doz ve zaman bağımlı arttığını belirtebiliriz. Çalışmamızda kurkumin etkinliğinin immünohistokimyasal olarak ve gen ekspresyonu düzeyinde en yüksek olduğu gözlenen saat ve doz aralığının 72 saat 100  $\mu$ M olduğunu belirledik. Bu saat ve dozda immünohistokimyasal olarak hücre proliferasyonunun anlamlı düzeyde azaldığı, apoptozun ise arttığı belirlenmiştir. Ekspresyon düzeyi anlamlı farklılıklar gösteren genlere bakıldığında, apoptozun genellikle kolon kanserlerinin ileri evrelerinde mutasyona uğradığı bilinen FAS aracılı ölüm reseptör yolağı yerine

CRADD üzerinden kaspaz 8 aktivasyonunun sağlandığı ve mitokondriyal yolaktaki hedef genler olan BİK, kaspaz 3 ve 9'u aktifleştirerek gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu nedenle kurkumin etkinliğinin mitokondriyal yolak üzerindeki hedef moleküllerde daha fazla olduğu ifade edilebilir. Ayrıca SW480 kolon adenokarsinom hücrelerinin çalışmamızda belirlemiş olduğumuz 72 saat 100 µM'lık doz uygulamasında gen ekspresyonu düzeyindeki etkinliğini p53 bağımsız yolak üzerinden gösterdiğini ifade edebiliriz. Dolayısıyla kurkuminin apoptotik etkisi p53 mutant/polimorfik kanser türlerinde p53 bağımsız yolaklar aracılığı ile de meydana gelebilmektedir. Bush ve arkadaşlarının 2001 yılında, 4'ü p53 mutant 4'ü de normal olmak üzere 8 adet insan melonoma hücre serisi ile yapmış oldukları çalışmada kurkumin'in p53'ü indüklediğini, diğer apoptoz yolaklarından Fas ve kaspaz 8 yolaklarını aktive ettiğini belirtmişlerdir. Bu durumun da çalışmamızı destekler nitelikte birçok kanser türünde olduğu gibi melonoma hücrelerinde de görülen p53 mutasyonları ve diğer mutasyonlar sebebiyle ortaya çıkan kemoterapötik dirence karşı, kurkuminin farklı mekanizmalar aracılığıyla etkili olabileceğini ifade etmişlerdir (79).

Kolon kanserlerinin meydana gelişinin hücre için hayati önem arzeden p53, Kras, BRAF, Wnt/β-katenin, APC, FasR/FasL, PIK3, PTEN ve daha birçok gende meydana gelmiş çeşitli moleküler mutasyonların birikimi sonucu olması kurkumin ve birçok terapötik maddenin potansiyel kullanımını sınırlandıran ekstra bir durum oluşturmaktadır (91). Bu nedenle kolon kanserleri en agresif seyreden ve tedaviye en çok direnç gösteren kanser türlerinden biri olmuştur.

Kolon kanserlerinin kemoterapiye ve antikanser ajanlara direnç göstermesinin sebebi yalnızca hücre döngüsü ve apoptotik sinyal yollarında görevli moleküllerde meydana gelen mutasyonlardan dolayı değildir. Bu sinyal yollarını uyarması hedeflenerek uygulanan ajanların Emilimi, taşınması gibi fizyolojik süreçlerden sorumlu membran bariyer proteinlerinin fonksiyonları da ilaç direnci gelişimi ile sonuçlanabilmektedir (92). Çalışmamızda 48 saat 75 µM'lık kurkumin uygulanan grupta kontrol grubuna göre antiapoptotik Bcl-2'nin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha düşük düzeyde ifade edilmesi kurkuminin apoptoz üzerindeki etkinliğini göstermektedir. Ancak kurkumin grubunda apoptotik proteinler olan BAX ve CASP9 genleri ifade düzeyinde beklenmedik bir azalma meydana gelmesi ve TRAF1 molekülü ifadesinin artışı da söz konusudur. TRAF1, hücre proliferasyonu

ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan TNF reseptör ilişkili faktör ailesi üyelerindedir ve TRAF2 ile protein kompleksi oluşturarak apoptoz inhibitörleri (IAP) ile etkileşime girerek, TNF reseptörleri üzerinden anti-apoptotik sinyallere aracılık etmektedir. Dolayısıyla bu bulgu CASP9 ve BAX genlerinin ifade düzeyinin azalmasını destekler nitelik taşımakta ve kurkuminin 48 saat 75 µM'lık doz uygulamasında SW480 kolon adenokarsinom hücre serilerinde apoptoza karşı bir direncin gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca bu doz uygulamasında immünohistokimyasal TUNEL metodu ile apoptotik hücrelerin yoğunluğu belirlenmiş ancak gen ekspresyon düzeyinde sözkonusu olabileceğini düşündüğümüz dirençle ilişkili herhangi bir bulguya rastlanmamıştır.

İncelediğimiz literatürlerde HT29, Caco-1, Lovo, HCT-8/VCR gibi kolon kanseri hücre serileri üzerinde kurkuminin antiproliferatif ve apoptotik etkileri yanında kemoterapötik ajanlar ile birlikte kullanıldığında mevcut ilaç direnci üzerindeki etkinliği de tartışılmıştır. HCT-8/VCR hücre serilerinde kurkuminin 25 µM ve üstü doz-zaman bağlı uygulamalarında kolon kanserinin klinik tedavisinde oldukça sık kullanılan vinkristine, sisplatin, fluorourasil ve hidrokamptotesiye duyarlılığını arttırdığını, proliferasyonu durdurduğunu ve MDR-1, P-gp gibi ilaç direnci ile ilişkili genlerin ve antiapoptotik protein olan survivinin ifade düzeyini azalttığı belirtilmiştir. (93). Bu noktada etkisini çoklu hücre sinyal yolları aracılığı ile yönlendiren kurkumin için direnç geliştirme olasılığının daha az olabileceği düşünülse de çalışmamızda SW480 kolon adenokarsinom hücreleri için 48 saatlik 75µM doz uygulamasında apoptotik gen ekspresyon düzeyinde benzer şekilde direnç bulgularına rastlanmıştır.

Çalışmamızda 24 saat 50 µM dozda kurkumin uygulanan gruplarda ise proapoptotik CASP9 geni ifade düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde bir artış olduğu belirlenmişti. Ancak p53 yolağı üzerinden uyarılan proapoptotik diğer genlerin ifade düzeylerinde anlamlı bir farklılık elde edilememiştir. Bu durum kurkuminin direk hedefleri arasında olan kaspazlar üzerinden etkinliğini göstererek hücrede apoptotik süreci başlatabileceğini göstermektedir. Kurkuminin bu saat ve doz uygulamasından sonraki gen ifadesi değişimlerine bakılırsa, SW480 kolon adenokarsinom hücrelerinin agresif proliferasyon özelliği göstererek direnç geliştirmesi 50 µM dozun yeterince etkin olmadığını düşündürmektedir. Benzer

şekilde Song ve arkadaşlarının 2005 yılında, HT-29 kolon kanseri hücre serilerinde kurkuminin apoptotik etkinliği üzerine yapmış oldukları bir çalışmada 48 saat 50 µM kurkumin uygulanan hücrelerde apoptotik aktivasyon görüldü de 72 saat 75 µM kurkumin uygulanan hücrelerde proliferasyonun da durdurulduğu belirtilmiş, Goel ve arkadaşları tarafından aynı hücre serisi ve kurkumin ile yapılan başka bir çalışmada bu dozun etkinliği desteklenmiştir (94, 95). Biz de çalışmamızda immünohistokimyasal olarak 24 ve 48. saatlerde uyguladığımız 50 ve 75 µM'lık kurkumin dozlarında SW480 kolon adenokarsinom hücrelerinin proliferasyonunun anlamlı şekilde azaldığını belirledik. Yapılan çalışmalarda meme, mesane, karaciğer, pankreas, melanomlar, kolon ve rektum kanserlerinde kurkuminin ve kimyasal yollarla elde edilen analoglarının hücre proliferasyonu üzerine olan inhibe edici etkinliğini, özellikle NFκβ ve COX1-2 yolakları aracılığıyla gösterdiği ifade edilmiştir (71, 87, 96-98). Çalışmamızda ise 48 saat 75 µM ve 72 saat 100 µM kurkumin uyguladığımız dozlarda NF-κB aktivasyonu ile ilişkili olan antiapoptotik TRAF1 gen ifade düzeyinde anlamlı olmasada iki katın üzerinde bir artış gözlemledik. Bu durum da SW480 kolon adenokarsinom hücrelerinin, kurkumin etkisine karşı oluşturdukları dirençle proliferasyonun devamlılığını sağlama yönünde davrandıklarını ifade etmektedir. Ancak 72 saat 100 µM'lık dozda CASP9, CASP3 başta olmak üzere ana apoptotik genlerin ifade düzeyinin anlamlı şekilde artışı, bu direncin kırılarak kurkumin etkinliğinin doz ve zamana bağlı olarak arttığı düşüncemizi desteklemektedir.

İncelediğimiz, farklı neoplastik koşulları temsil eden farklı kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalarda kurkumin ve türevlerinin proliferasyon ve apoptoz üzerindeki etkinliğini birbiri ile ilişkili birçok farklı yolak üzerinden gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Kurkuminin etki gösterdiği bilinen hedef moleküller hücrede aynı göreve sahip olsa da kanser hücre serilerinin tipi, bulundukları mutasyonlar ya da polimorfizmler, davranış biçimleri ve hatta üretim koşulları gibi faktörlere göre farklılık göstermektedir. Yapılan in vivo çalışmalarda ise biyoyaralanımı düşük olan kurkuminin oral uygulama nedeniyle hücre serilerine göre daha az etkinlik gösterdiği belirtilmiştir (99). Bu nedenle laboratuvar çalışmalarının klinik ile desteklenerek bu denli faydalı bir etken olan kurkuminin biyoyaralanımının arttırılması yönünde ve özellikle kanser hastalarında tedavi prosedürlerinin bir parçası haline gelebilmesi için

daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızın, en agresif seyreden kanser tiplerinden biri olan SW480 kolon adenokarsinom hücreleri üzerine kurkuminin in vitro ortamda apoptotik etkinliğini ortaya koymak için yapılan çalışmalara katkıda bulunacağını düşünmekteyiz ve immünohistokimyasal olarak da bu etkiyi destekleyen bulgular elde etmiş bulunmaktayız.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser, genetik olarak ve günümüz çevresel şartları altında, insidansı her geçen gün dünya çapında artan ve bireyin yaşam kalitesini etkileyen bir ‘çağ hastalığı’ haline gelmiştir. Son yıllarda gelişen teknoloji ile birçok hastalığın tedavi yöntemlerinde önemli adımlar atılsa da kanser tedavilerinde cerrahi ve sonrasında uygulanan kemoterapatik ajanlar hastaların iyileşmesi için yeterli olmamaktadır. Bu nedenle, araştırmacıların doğanın sunduğu kaynaklara yönelerek, invivo ve invitro şartlarda bitkisel ajanları ve onların etki mekanizmalarını belirleyip alternatif tedavi yöntemleri oluşturmayı amaçlamalarına rağmen; halen klinik kullanım için yeterli kanıt elde edilememiştir. Kurkumin, hücrede çok yönlü moleküler hedefler aracılığıyla etki göstermesi açısından özellikle birçok kanser türünde uygulanan tedavi yöntemlerine alternatif olanaklar sunması nedeniyle önemli bir etken maddedir.

Çalışmamız ile SW480 kolon adenokarsinom hücre serileri üzerine apoptotik etkinliğini immunohistokimyasal ve gen ekspresyonu düzeyinde araştırdığımız kurkuminin, kaspaz yolağı aracılığıyla kanserli hücrelerde apoptozun meydana gelmesini sağladığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçtan yola çıkarak, araştırmayı hedeflediğimiz bazı noktalar ile çalışmamızı destekleyecek yeni veriler elde etmeyi planlamaktayız.

Bunlar;

- SW480 kolon adenokarsinom hücre serileri üzerinde kurkuminin apoptotik etkisini gen ifadesi düzeyinde belirlenen kaspaz aracılı yolağı ile gerçekleştirdiği bilgisinin, Kaspaz 3 işaretleme yöntemi ile de immunohistokimyasal olarak da desteklenmesi,
- Aynı hücre serilerine bu kez in vitro ortamı yansıtabilecek şekilde, üç boyutlu kültür ile sferoid model oluşturularak kurkuminin etkinliğinin araştırılması,
- Aynı hastalık için uygulanan tedavi yöntemlerinde kişisel farklılıklara yol açan genetik ve etiyolojik faktörlerin göz önünde bulundurularak farklı hücre serilerinde çalışılarak karşılaştırılması,

- Kurkuminin klasik kemoterapide kullanılan ilaçlarla ya da diğer bitkisel ajanlarla etkileşiminin ve farklı kanser hücreleri için kullanılması gereken etkin dozlarının belirlenmesi,
- Biyoyararlanımı oldukça düşük olan kurkuminin metabolizasyonunu ve etkinliğini arttırmak amacıyla uygun kimyasal türevlerinin elde edilerek ya da daha etkili olduğu düşünülen nanolipozom molekülleri ile kaplanması sonrası uygulanması olarak sıralanabilir.

Çalışmamızın kolon kanserli hastalarda alternatif tedavi yöntemlerini geliştirmeye yönelik yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacağı ve aydınlatmayı hedeflediğimiz bu noktalar ile kurkuminin kanser hücreleri üzerine olan etkinliğinin daha iyi anlaşılabilceği kanaatindeyiz.

## ÖZET

### ***Curcuma longa* (zerdeçal) Bitkisinden Elde Edilen Kurkumin Etken Maddesinin Kolon Kanseri Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkisinin Araştırılması**

Kolorektal kanser dünyada üçüncü en yaygın teşhis edilen kanser ve kansere bağlı ölüme neden olan dördüncü kanser türü olması nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunudur. Son yıllarda, kemoterapötik maddeler ve alternatif bitkisel tedavi yöntemleri kolon kanseri tedavisinde önem kazanmıştır.

Kurkumin, *Curcuma longa* bitkisinin etkili bir özütüdür ve birçok önemli etkisinin yanında kemoterapötik fonksiyona sahiptir. Kurkumin apoptozun indüklenmesi yoluyla anti-kanser etkilerini göstermektedir. İncelediğimiz literatürler ışığında, insan kolon kanseri hücre hattı üzerinde, kurkuminin uygun doz kullanımı ve zaman aralığını belirleyip immünohistokimyasal olarak ve gen ekspresyonu seviyesindeki apoptotik etkisini araştırmayı amaçladık. Kurkumin'in spesifik hedefi olarak bilinen 21 apoptotik geni seçtik ve kültür ortamında kolon kanseri üzerindeki aktivitesini belirledik.

Çalışmamızda, CCL-228-SW 480 insan kolon adenokarsinoma hücre dizisi, uygun üretim koşullarında çoğaltılmıştır. Etkili kurkumin konsantrasyonu, deney grupları için 24 saat 50 uM, 48 saat 75 uM ve 72 saat 100 uM olarak belirlendi. Uygulanan dozların proliferasyon ve apoptoz için etkinliği, hücre canlılık testi, Brdu, TUNEL ve ayrıca Quantitative Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile kurkumin uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslanarak analiz edildi.

Sonuç olarak, kurkumin gruplarında kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı ve çoğalmasında belirgin bir azalma olduğunu ve doz ve zamana bağlı olarak apoptotik oranının arttığını bulduk ( $p<0,05$ ).

Çalışmamızın, kolon kanseri tedavisinde kurkuminin klinik kullanımının geliştirilmesi adına yapılacak olan diğer çalışmalarını destekleyeceğine inanıyoruz.

**Anahtar Kelimeler:** Kolon adenokarsinom, kurkumin, in-vitro



## ABSTRACT

### **Investigation of the Apoptotic Effect of Agent Curcumin Obtained From Plant *Curcuma longa* (turmeric) on Colon Cancer Cell Line**

Colorectal cancer is an important public health issue because of it is the third most commonly diagnosed cancer in the world and the fourth cancer type that causes cancer-related deaths. In recent yaers, chemotherapeutic agents and alternative herbal treatment methods have gained importance for colon cancer treatment. Curcumin is an effective extract of the plant *Curcuma longa* and has a chemoterapatic function as well as many other important effects. Curcumin shows anticancer effects mainly through induction of apoptosis.

In the light of the literatures, we aimed to investigate the apoptotic effect of curcumin immunohistochemically and at the level of gene expression, by determining the appropriate dose and time interval, on SW-480 colon adenocarsinoma cell line. We choose to study 21 apoptotic genes known as the specific target of curcumin and determine its activity on colon cancer in culture medium. In our study, CCL-228-SW 480 human colon adenocarcinoma cell line was replicated in appropriate production conditions. Effective curcumin concentration was determined as 24 h 50  $\mu$ M, 48 h 75  $\mu$ M and 72 h 100  $\mu$ M for experimental groups. The efficacy of the administered doses for proliferation and apoptosis, were analyzed by cell viability test, Brdu, TUNEL and also Quantitive Real Time Polymerase Chain Reaction with comparison to nontreated control group.

As a result, we found that in the curcumin groups, there was a significant decrease in cell viability and proliferation compared to the control groups and there was an increase in apoptotic ratio depending on dose and time ( $p < 0,05$ ). We believe that our study will support the other study for the development of clinical use of curcumin in the treatment of colon cancer.

**Keywords:** Colon adenocarsinoma, curcumin, in-vitro

## KAYNAKLAR

1. Gedikli S. Melatoninin MCF-7 hücre kültüründeki apoptoz aktivasyonunun ve sitotoksitesinin polimeraz zincir reaksiyonu (pcr), mtt hücre canlılık testi ve immunsitokimya yöntemleriyle araştırılması. Doktora Tezi 2013.
2. Arslan S. Kanserli hastalarda yaşam kalitesinin değerlendirilmesi. *Journal of Anatolia Nursing and Health Sciences*. 2003;6(3).
3. Gültekin M, Boztaş G. Türkiye kanser istatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2014;43.
4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(2):87-108.
5. Ayhan B. İnsan kolon kanseri hücre hatlarında emodin'in mitokondriyal sinyal iletim yolağı aracılığı ile apoptoze etkisi. Doktora Tezi 2013.
6. Canpolat F. Hücre Siklüsü ve Apoptoz. *Güncel Dermatoloji Dergisi*. 2016;1(1):11-7.
7. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(8):592-603.
8. Lin L, Baehrecke EH. Autophagy, cell death, and cancer. *Molecular & Cellular Oncology*. 2015;2(3):e985913.
9. Syng-ai C, Kumari A L, Khar A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2004;3(9):1101-8.
10. Sharma R, Gescher A, Steward W. Curcumin: the story so far. *European journal of cancer*. 2005;41(13):1955-68.
11. Tohda C, Nakayama N, Hatanaka F, Komatsu K. Comparison of anti-inflammatory activities of six *Curcuma* rhizomes: a possible curcuminoid-independent pathway mediated by *Curcuma phaeocaulis* extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2006;3(2):255-60.
12. Wang C, Youle R J. The role of mitochondria in apoptosis. *Annual review of genetics*. 2009;43:95.
13. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41(1):40-59.
14. Prasad C P, Rath G, Mathur S, Bhatnagar D, Ralhan R. Potent growth suppressive activity of curcumin in human breast cancer cells: Modulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Chemico-biological interactions*. 2009;181(2):263-71.
15. Yokuş B, Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2012;1:7-18.

16. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2012;27(9):1423-31.
17. Fettah K. Isırgan Otu (*Urtica Dioica*) Ekstresinin Kolon Kanseri Hücre Serileri Üzerindeki Apoptotik, Antiproliferatif Ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. 2010.
18. Durko L, Malecka-Panas E. Lifestyle modifications and colorectal cancer. *Current colorectal cancer reports*. 2014;10(1):45-54.
19. Kim Y-I. Role of folate in colon cancer development and progression. *The Journal of nutrition*. 2003;133(11):3731S-9S.
20. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044-58.
21. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2004;23(1-2):11-27.
22. Boland C R, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073-87.
23. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1079-99.
24. Başpınar M. Kanserli kolon hücre dizisinde seranib-2 maddesinin apoptoz oluşumuna ve hücre yaşamına olası etkileri. *Tıpta Uzmanlık Tezi*. 2015.
25. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
26. Cooper GM, Hausman RE. *Hücre: Moleküler Yaklaşım*. Third ed: İzmir Tıp Kitabevi; 2006.
27. Canbay E, Buğra D. Kolorektal kanser: Genetik ve moleküler biyoloji araştırmaları hasta tedavisine yeterince yansıyor mu? *Ulusal Cerrahi Dergisi*. 2011;27(4):198-205.
28. Yu CX, Zhang XQ, Kang LD, Zhang PJ, Chen WW, Liu WW, et al. Emodin induces apoptosis in human prostate cancer cell LNCaP. *Asian journal of andrology*. 2008;10(4):625-34.
29. Tomatır AG. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2003;23(6):499-508.
30. Eröz R, Alkoç OA, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S. Apoptozis Hakkında Bilinenler. *Düzce Tıp Dergisi*. 2012;14(2):87-101.
31. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
32. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239.
33. Lawen A. Apoptosis an introduction. *Bioessays*. 2003;25(9):888-96.

34. Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehiwet B, Gaboriaud C, et al. C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *The Journal of Immunology*. 2008;180(4):2329-38.
35. Güleş Ö, Ülker E. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2008;19(2):73-8.
36. Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in cell biology*. 1995;5(1):21-6.
37. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research*. 2000;256(1):12-8.
38. Kartlaşmış K, Kökbaş U, Kayrın L. Apoptozisin Biyokimyası. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2016;25(1):52.
39. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*. 2009;23(6):1625-37.
40. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *Journal of cell science*. 2005;118(2):265-7.
41. De Almagro M, Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol*. 2012;34(3):200-11.
42. Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current opinion in cell biology*. 2003;15(6):691-9.
43. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2004;1644(2):83-94.
44. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry*. 2011;351(1-2):41-58.
45. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(6):a008672.
46. Fan T-J, Han L-H, Cong R-S, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2005;37(11):719-27.
47. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(4):a008656.
48. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.
49. Kiraz Y, Adan A, Yandim MK, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*. 2016:1-16.
50. Huerta S, Goulet EJ, Livingston EH. Colon cancer and apoptosis. *The American journal of surgery*. 2006;191(4):517-26.
51. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends in cell biology*. 2013;23(12):620-33.

52. Knickelbein K, Zhang L. Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer. *Genes & diseases*. 2015;2(1):4-12.
53. Ghorbani A, Hosseini A. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna journal of phytomedicine*. 2015;5(2):84-97.
54. Bernold DM, Sinicrope FA. Kolorektal kanser kemoterapisinde gelişmeler. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2006;1(3):126-40.
55. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology*. 2006;71(10):1397-421.
56. Palve YP, Nayak P. Curcumin: a wonder anticancer drug. *Int J Pharm*. 2012;3(2):60-9.
57. Yalçın AS, Yılmaz AM, Altundağ EM, Koçtürk S. Kurkumin, Kuersetin ve Çay Kateşinlerinin Anti-Kanser Etkileri. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2017;21(1).
58. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics*. 2007;4(6):807-18.
59. Ireson CR, Jones DJ, Orr S, Coughtrie MW, Boocock DJ, Williams ML, et al. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2002;11(1):105-11.
60. Yang K-Y, Lin L-C, Tseng T-Y, Wang S-C, Tsai T-H. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *Journal of chromatography B*. 2007;853(1):183-9.
61. Majumdar AP, Banerjee S, Nautiyal J, Patel BB, Patel V, Du J, et al. Curcumin synergizes with resveratrol to inhibit colon cancer. *Nutrition and cancer*. 2009;61(4):544-53.
62. Moorthi C, Kathiresan K. Curcumin-Piperine/Curcumin-Quercetin/Curcumin-Silibinin dual drug-loaded nanoparticulate combination therapy: A novel approach to target and treat multidrug-resistant cancers. *Journal of Medical Hypotheses and Ideas*. 2013;7(1):15-20.
63. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *The AAPS journal*. 2013;15(1):195-218.
64. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Curr Sci*. 2004;87(1):44-53.
65. Aggarwal BB, Kumar A, Aggarwal MS, Shishodia S. Curcumin derived from turmeric (*Curcuma longa*): a spice for all seasons. *Phytopharmaceuticals in cancer chemoprevention*. 2005;23:351-87.
66. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(50):30235b-b.
67. Shehzad A, Wahid F, Lee YS. Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. *Archiv der Pharmazie*. 2010;343(9):489-99.

68. Hussain A, Al-Rasheed M, Manogaran P, Al-Hussein K, Plataniias L, Al Kuraya K, et al. Curcumin induces apoptosis via inhibition of PI3'-kinase/AKT pathway in acute T cell leukemias. *Apoptosis*. 2006;11(2):245-54.
69. Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst I, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin—from molecule to biological function. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012;51(22):5308-32.
70. Sandur SK, Deorukhkar A, Pandey MK, Pabón AM, Shentu S, Guha S, et al. Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible NF- $\kappa$ B activity. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*. 2009;75(2):534-42.
71. Park J, Contreas CN. Anti-carcinogenic properties of curcumin on colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2010;2(4):169-76.
72. Shankar S, Srivastava RK. Bax and Bak genes are essential for maximum apoptotic response by curcumin, a polyphenolic compound and cancer chemopreventive agent derived from turmeric, *Curcuma longa*. *Carcinogenesis*. 2007;28(6):1277-86.
73. Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochemical pharmacology*. 2008;76(11):1340-51.
74. Shankar S, Chen Q, Sarva K, Siddiqui I, Srivastava RK. Curcumin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells: molecular mechanisms of apoptosis, migration and angiogenesis. *Journal of molecular signaling*. 2007;2(1):1.
75. Link A, Balaguer F, Shen Y, Lozano JJ, Leung H-CE, Boland CR, et al. Curcumin modulates DNA methylation in colorectal cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(2):e57709.
76. Lim TG, Lee SY, Huang Z, Chen H, Jung SK, Bode AM, et al. Curcumin suppresses proliferation of colon cancer cells by targeting CDK2. *Cancer Prevention Research*. 2014;7(4):466-74.
77. Watson JL, Hill R, Yaffe PB, Greenshields A, Walsh M, Lee PW, et al. Curcumin causes superoxide anion production and p53-independent apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer letters*. 2010;297(1):1-8.
78. O'connell J, Bennett MW, Nally K, Houston A, O'sullivan GC, Shanahan F. Altered Mechanisms of Apoptosis in Colon Cancer: Fas Resistance and Counterattack in the Tumor-Immune Conflict. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;910(1):178-95.
79. Bush JA, Cheung K-JJ, Li G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Experimental cell research*. 2001;271(2):305-14.
80. Tanır HG, Demirezen Ş. Wnt sinyal yolunun biyolojisi ve bu yolda görev alan biyomoleküller. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2009;29(5):1292-7.

81. Kasi PD, Tamilselvam R, Skalicka-Woźniak K, Nabavi SF, Daglia M, Bishayee A, et al. Molecular targets of curcumin for cancer therapy: an updated review. *Tumor Biology*. 2016;1-12.
82. Clapisson G, Salinas C, Malacher P, Michallet M, Philip I, Philip T. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES)+ dimethylsulfoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone. *Bulletin du cancer*. 2004;91(4):97-102.
83. Kılınçlı A. Resveratrolün hücresel yaşlanmanın indüklenmesi ve sirtuinlerin aktivasyonunda rolünün insan dermal fibroblastlarında araştırılması: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü; 2013.
84. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*. 2013;3(3):71.
85. Favoriti P, Carbone G, Greco M, Pirozzi F, Pirozzi REM, Corcione F. Worldwide burden of colorectal cancer: a review. *Updates in surgery*. 2016;68(1):7-11.
86. Demirelli FH. Hedefe yönelik kanser tedavisi ve monoklonal antikorlar. *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği (ANKEM) Dergisi*. 2005;19:123-5.
87. Bimonte S, Barbieri A, Leongito M, Piccirillo M, Giudice A, Pivonello C, et al. Curcumin AntiCancer Studies in Pancreatic Cancer. *Nutrients*. 2016;8(7):433.
88. Johnson JJ, Mukhtar H. Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer letters*. 2007;255(2):170-81.
89. Liu D, Chen Z. The effect of curcumin on breast cancer cells. *Journal of breast cancer*. 2013;16(2):133-7.
90. Guo Ld, Chen Xj, Hu Yh, Yu Zj, Wang D, Liu Jz. Curcumin inhibits proliferation and induces apoptosis of human colorectal cancer cells by activating the mitochondria apoptotic pathway. *Phytotherapy Research*. 2013;27(3):422-30.
91. Ahmed D, Eide P, Eilertsen I, Danielsen S, Eknæs M, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013;2(9):e71.
92. Hu T, Li Z, Gao C-Y, Cho CH. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(30):6876.
93. Lu W-D, Qin Y, Yang C, Li L. Effect of curcumin on human colon cancer multidrug resistance in vitro and in vivo. *Clinics*. 2013;68(5):694-701.
94. Song G, Mao Y, Cai Q, Yao L, Ouyang G, Bao S. Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2005;38(12):1791-8.
95. Goel A, Boland CR, Chauhan DP. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer letters*. 2001;172(2):111-8.

96. Sundram V, Chauhan SC, Ebeling M, Jaggi M. Curcumin attenuates  $\beta$ -catenin signaling in prostate cancer cells through activation of protein kinase D1. *PloS one*. 2012;7(4):e35368.
97. Park C, Kim GY, Kim GD, Choi BT, Park Y-M, Choi YH. Induction of G2/M arrest and inhibition of cyclooxygenase-2 activity by curcumin in human bladder cancer T24 cells. *Oncology reports*. 2006;15(5):1225-31.
98. Toptaş BAA. Kurkumin ve analoglarının antikanserojen etkileri. *Ankara Ecz Fak Derg*. 2016;2(40):58-82.
99. Bachmeier B, Iancu C, Mohrenz I, Mirisola V, Schleicher E, Nerlich A, et al. The anti-metastatic effect of the chemopreventive polyphenol Curcumin-in vitro and in vivo studies on the molecular mechanisms. *AACR*; 2008.





## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Gülçin	<b>Soyadı</b>	YAVUZ TÜREL
<b>Doğum Yeri</b>	İzmit	<b>Doğum Tarihi</b>	18.08.1986
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>Telefon</b>	05556036550
<b>Elektronik Posta</b>	gulcinnyavuz@gmail.com	<b>Adres</b>	Emek Mah. Yahya Kemal Cad. No:58 Türel apt./ BURDUR

### Eğitim Bilgileri

	<b>Mezun Olduğu Kurum</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora</b>	SDÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD	2017
<b>Yüksek lisans</b>	SDÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD	2012
<b>Lisans</b>	SDÜ Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü	2008

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl)</b>
Araştırma Görevlisi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2012 - 2017

### Dil Puanı

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>KPDS / ÜDS Puanı</b>	<b>Diğer Puanı</b>
İngilizce	75	Yok