

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Rheum ribes* L. BİTKİ EKSTRELERİNİN KOLOREKTAL KANSER HÜCRE  
HATLARINDA ANTİKANSEROJENİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

İLKNUR ÇINAR

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. H. Gül DURSUN

KONYA-2018

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Rheum ribes* L. BİTKİ EKSTRELERİNİN KOLOREKTAL KANSER HÜCRE  
HATLARINDA ANTİKANSEROJENİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

İLKNUR ÇINAR

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. H. Gül DURSUN

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 161418001 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA-2018

### TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi İLKNUR ÇINAR'ın "*Rheum ribes* L. bitki ekstraktlarının kolorektal kanser hücre hatlarında antikanserojenik etkisinin araştırılması" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya, TÜRKİYE/12.10.2018



Tez Danışmanı

Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji A.D.

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ercan KURAR

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji A.D.

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Hasibe VURAL

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji A.D.

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hülagü BARIŞKANER

Selçuk Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Farmakoloji A.D.

Jüri Üyesi

Doç. Dr. İpek SÜNTAR

Gazi Üniversitesi

Eczacılık Fakültesi

Farmakognozi A.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 17/10/2018 tarih ve 20/11. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü




## APPROVAL


We certify that we have read this dissertation entitled “**Investigation of anticancerogenic effect of *Rheum ribes* L. plant extracts on colorectal cancer cell lines**” by İLKNUR ÇINAR that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the Department of “Medical Biology”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan.

Konya, TURKEY/12.10.2018


  
Principal Advisor

Assoc. Prof. Dr. Hatice Gül DURSUN  
Necmettin Erbakan University  
Meram Faculty of Medicine  
Department of Medical Biology

  
Examination Committee Member  
Assoc. Prof. Dr. Ercan KURAR  
Necmettin Erbakan University  
Meram Faculty of Medicine  
Department of Medical Biology

  
Examination Committee Member  
Assoc. Prof. Dr. Hasibe VURAL  
Necmettin Erbakan University  
Meram Faculty of Medicine  
Department of Medical Biology

  
Examination Committee Member  
Prof. Dr. Hülagu BARIŞKANER  
Selcuk University  
Faculty of Medicine  
Department of Medical Pharmacology

  
Examination Committee Member  
Assoc. Prof. Dr. İpek SÜNTAR  
Gazi University  
Faculty of Pharmacy  
Department of Pharmacognosy

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of  
Health Sciences

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK  
Director of Institute of Health Sciences



## **BEYANAT**

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

12.10.2018

İlknur ÇINAR



- [Ödevler](#)  
[Öğrenciler](#)  
[Not Defteri](#)  
[Kütüphaneler](#)  
[Takvim](#)  
[Tartışma](#)  
[Tercihler](#)


Bu sayfa hakkında

Bu sizin ödev kutunuzdur. Bir yazılı ödevi görüntülemek için yazılı ödevin başlığını seçin. Bir Benzerlik Raporunu görüntülemek için yazılı ödevin benzerlik sütunundaki Benzerlik Raporu ikonunu seçin. Tıklanabilir durumda olmayan bir ikon Benzerlik Raporunun henüz oluşturulmadığını gösterir.

## Doktora tezi

### Gelen Kutusu | Görüntüleniyor: yeni ödevler ▼

Dosyayı Gönder Çevrimiçi Derecelendirme Raporu | Ödev ayarlarını düzenle | E-posta bildirmeyenler

<input type="checkbox"/>	Yazar	Başlık	Benzerlik	web	yayın	student papers	Puanla	cevap	Dosya	Ödev Numarası	Tarih
<input type="checkbox"/>	Ilknur Çınar	 RHEUM RİBES BİTKİ EKSTRAKTLARININ KOLORE...	%9 <input type="text" value="%9"/>	3%	7%	2%	--	--	ödev indir	1007711892	25-Eyl-2018

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim sürem boyunca hem bilimsel hem de insani ve ahlaki yönden örnek aldığım, çalışmalarım sırasında desteğini, sabrını ve zamanını esirgemeyen sevgili hocam, tez danışmanım Doç. Dr. H. Gül DURSUN'a,

Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. Ercan KURAR'a ve bölüm hocalarımdan Doç. Dr. Hasibe CİNGİLLİ VURAL'a,

Tezin deney aşamalarında bize laboratuvarının kapılarını açan ve tecrübelerini paylaşan Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç Dr. İpek SÜNTAR'a,

Araştıma sırasında bizi destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Akademik yaşantımın temellerini atan, hayatımda yeri doldurulamaz bir değere sahip, dinlemekten hiç yorulmadığım, her zaman anne şevkatini üzerimde hissettiğim, daimi hayat öğretmenim, çok kıymetli yüksek lisans tez danışmanım Prof. Dr. Sennur DEMİREL'e,

Beni bugünlere getiren, yapmak istediklerimden bahsettiğimde daha da şevklenmem için desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ilk öğretmenlerim, sırtımı yasladığım en kuvvetli dayanaklarım, annem Canan ÇINAR, babam M. Erkal ÇINAR'a, iyi ki varlar diye hep şükrettiğim, sayelerinde paylaşmayı öğrendiğim en zor zamanlarımda destekçileri kardeşlerim-biriciklerim H. Şükrü ÇINAR, Ceren ÇINAR'a,

Hayatı onunla paylaşmaya başladığımdan beri aynadaki silüetimi anlamlı hale getiren, akademik hayatımın en zorlu süreçlerini kolaylaştırmak için tüm gücüyle yardım eden, evlilik hayatını gerçek manada müşterek kılan, her konuda süper kahramanım olmayı başaran değerli eşim Candaş AYAN'a,

Beni kendimden bile daha iyi tanıyan, konuşmadan anlaşabildiğim, her türlü zorlu süreci birlikte geçirdiğim, can dostum Sümeyra ÇETİNKAYA'ya,

Zor zamanlarımda vakitlerini, ilgilerini esirgemeyen, değerli arkadaşlarım Ebru AVCI ve Canan EROĞLU'na teşekkürlerimi bir çorç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

<i>Tez Onay Sayfasi</i> .....	<i>ii</i>
<i>Approval</i> .....	<i>iii</i>
<i>Beyanat</i> .....	<i>iv</i>
<i>Teşekkür</i> .....	<i>v</i>
<i>Kisaltmalar Ve Simgeler Listesi</i> .....	<i>ix</i>
<i>Şekiller Listesi</i> .....	<i>xi</i>
<i>Tablolar Listesi</i> .....	<i>xiv</i>
<i>Özet</i> .....	<i>xvi</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>xvii</i>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. <i>Kolorektal Kanserin Epidemiyolojisi</i> .....	4
2.1.1. <i>İnsidansı</i> .....	4
2.1.2. <i>Risk Faktörleri</i> .....	5
2.2. <i>Kolorektal Kanserin Prognozu</i> .....	6
2.3. <i>Kolorektal Kanserin Tedavisi</i> .....	6
2.3.1. <i>5-FU'nun Etki Mekanizması</i> .....	9
2.4. <i>Kanserin Gelişiminde mikroRNA'ların Rolü</i> .....	11
2.4.1. <i>mikroRNA'ların Keşfi ve Adlandırılması</i> .....	11
2.4.2. <i>miRNA Biyogenezi</i> .....	12
2.4.3. <i>miRNA ve Kansere</i> .....	13
2.5. <i>Kanserin Tanısı ve Prognozunda miRNA'ların Rolü</i> .....	15
2.5.1. <i>miR-200 Ailesi</i> .....	15
2.6. <i>Kanserin Kemoprevensiyonunda Bitkisel Ürünlerin Rolü</i> .....	20
2.6.1. <i>Tıbbi Bitkiler</i> .....	22
2.6.2. <i>Kansere ve Fenolik Bileşikler</i> .....	25
2.6.3. <i>Rheum ribes L.'nin Botanik Özellikleri</i> .....	27
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>33</b>
3.1. <i>Kullanılan Sarf Malzemeler Ve Cihazlar</i> .....	33
3.2. <i>Bitki Materyali</i> .....	35
3.3. <i>Bitki Örneklerinin Kurutulması ve Ekstraksiyonu</i> .....	36
3.4. <i>Ekstreler Üzerinde Gerçekleştirilen Fitokimyasal Analizler</i> .....	37
3.4.1. <i>Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi</i> .....	37
3.4.2. <i>Toplam Flavonoit Madde Miktarının Belirlenmesi</i> .....	38



3.4.3. Kromatografik Analiz.....	39
3.5. Biyolojik Aktivite Analizleri.....	40
3.5.1. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi .....	40
3.6. Kombinasyon Analizi (İzobologram Analizi) .....	44
3.7. miRNA Ekspresyon Analizi.....	46
3.7.1. Total RNA İzolasyonu.....	46
3.7.2. İzole Edilen RNA'ların Jelde Yürütülmesi .....	46
3.7.3. Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması İçin DNase Uygulaması .....	47
3.7.4. cDNA Sentezi.....	48
3.7.5. RT-qPCR .....	48
3.8. Gen Ekspresyon Analizi.....	49
3.8.1. cDNA Sentezi.....	49
3.8.2. RT-qPCR .....	50
3.9. Apoptozun Belirlenmesi.....	53
3.9.1. TUNEL Analizi .....	53
3.9.2. Anneksin V Analizi.....	56
3.10. Hücre Döngüsü Analizi.....	57
3.11. Hücre İnvazyonunun Analizi.....	59
3.12. Protein Analizi .....	61
3.12.1. ELISA Testi (Enzim-Bağlı İmmunosorbent Testi).....	61
3.13. İstatistiksel Analiz .....	68
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>69</b>
4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Analiz Sonuçları .....	69
4.2. Toplam Flavonoit Madde Miktarı Analiz Sonuçları.....	70
4.3. Kromatografik Analiz Sonuçları.....	71
4.4. Rheum Ribes L. Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Analiz Sonuçları .....	78
4.5. Sitotoksite Analiz Sonuçları .....	79
4.5.1. R. ribes'e ait ekstrelerin HCT 116 ve HT-29 Hücre Hatları Üzerinde ki Sitotoksite Analiz Sonuçları .....	79
4.5.2. 5-FU'nun HCT 116 ve HT-29 Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksite Analiz Sonuçları.....	87
4.6. Kombinasyon analizi .....	89
4.7. miRNA Ekspresyon Analizi Sonuçları .....	90
4.8. Genlerin Ekspresyon Analizi Sonuçları.....	92
4.9. Apoptoz Analizi.....	95
4.9.1. Annexin V Analiz Sonuçları.....	95
4.9.2. TUNEL Analiz Sonuçları.....	97
4.10. Hücre Döngüsü Fazlarının Flow Sitometrik Analizi .....	99

4.11. Hücre İnvazyonu Analiz Sonuçları .....	104
4.12. ELISA Analiz Sonuçları .....	107
4.12.1. BCL-2 ELISA Analiz Sonuçları.....	108
4.12.2. ZEB1 ELISA Analiz Sonuçları.....	108
4.12.3. GATA4 ELISA Analiz Sonuçları .....	109
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>111</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>124</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>126</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>137</b>



## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<b>5-FU</b>	: 5-Florourasil
<b>CRC</b>	: Kolorektal kanser
<b>miRNA</b>	: Mikro RNA
<b>IARC</b>	: Uluslararası kanser araştırmaları ajansı
<b>HNPCC</b>	: Herediter nonpolipozis kolorektal kanser
<b>TS</b>	: Timidilat sentaz
<b>FdUMP</b>	: Fluorodeoksiüridin monofosfat
<b>FdUTP</b>	: Fluorodeoksiüridin trifosfat
<b>FUTP</b>	: Fluorüridin trifosfat
<b>DGCR8</b>	: DiGeorge syndrome critical region 8
<b>B-CELL</b>	: B-hücre kronik lenfositik lösemi
<b>KLL</b>	: Kronik lenfositik lösemi
<b>UTR</b>	: Untranslated region
<b>EMT</b>	: Epitelyal-mezenkimal geçiş
<b>ZEB</b>	: Zinc finger E-box binding homeobox
<b>TGF<math>\beta</math></b>	: Transforming growth factor beta
<b>CDKN1B</b>	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1B
<b>RND3</b>	: Rho family GTPase 3
<b>CCND1</b>	: Siklin D1
<b>WHO</b>	: Dünya sağılık örgütü
<b>NCI</b>	: ABD Ulusal kanser enstitüsü
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>HPLC</b>	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
<b>DPPH</b>	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
<b>FCR</b>	: Folin-Ciocalteu reaktifi
<b>EIC</b>	: Ekstra iyon kromatogramı
<b>ESI</b>	: Elektrosprey iyonizasyon
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu

<b>DMSO</b>	: Dimetil slfoksit
<b>PBS</b>	: Phosphate buffered saline
<b>OD</b>	: Optik sansite
<b>CI</b>	: Kombinasyon indeksi
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>RT-qPZR</b>	: Gerek zamanlı-Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
<b>rTdT</b>	: Rekombinant terminal deoksinkleotidil transferaz
<b>DAM</b>	: Diaminobenzidin
<b>DAB</b>	: Deoksiaminobenzidin
<b>PI</b>	: Propidium iyodr
<b>7-AAD</b>	: 7-aminoactinomycin D

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Kanserin temel özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011).....	4
Şekil 2.2: 5-FU, Urasil ve Timin'in kimyasal yapısı (Longley ve ark., 2003).....	9
Şekil 2.3: 5-FU'nun etki mekanizması. ....	10
Şekil 2.4: miRNA biyogenezini. ....	13
Şekil 2.5: miR-200 ailesine ait iki kümenin iki farklı kromozom üzerindeki yerleşimleri. ....	16
Şekil 2.6: Olgun miR-200 ailesi üyelerinin nükleotid dizileri. ....	17
Şekil 2.7: Gazi üniversitesi herbaryumunda kayıt altına alınmış ve taze toplanmış <i>Rheum ribes L.</i> 'nin gövdesi. ....	28
Şekil 3.1: <i>Rheum ribes</i> 'in kök ve gövdesine ait kısımlarının ekstraksiyon işlemi. ....	37
Şekil 3.2: XTT tetrazolium tuzunun, formazan kristallerine dönüşümü. ....	43
Şekil 3.3: İzole edilen RNA bantlarının jel görüntüsü. ....	47
Şekil 3.4: BCL-2 için seri dilüsyon hazırlanması. ....	63
Şekil 3.5: ZEB1 için seri dilüsyon hazırlanması. ....	64
Şekil 3.6: GATA4 için Seri dilüsyon hazırlanması. ....	66
Şekil 3.7: FAS/CD95 için seri dilüsyon hazırlanması. ....	67
Şekil 4.1: Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde kullanılan gallik asit standart eğri grafiği. ....	69
Şekil 4.2: Toplam flavonoit madde miktarının belirlenmesinde kullanılan kersetin standart eğri grafiği. ....	70
Şekil 4.3a : <i>Rheum ribes L.</i> kök metanol ekstresine ait negatif mod LC-ESI-QTOF-MS analizi kromatogram sonucu (0-40. dakika). ....	72
Şekil 4.3b: <i>Rheum ribes L.</i> kök metanol ekstresine ait negatif mod LC-ESI-QTOF-MS analizi kromatogram sonucu (0-10. dakika). ....	73
Şekil 4.4a: <i>Rheum ribes L.</i> kök metanol ekstresine ait pozitif mod LC-ESI-QTOF-MS analizi kromatogram sonucu (0-40. dakika). ....	74
Şekil 4.4b: <i>Rheum ribes L.</i> kök metanol ekstresine ait pozitif mod LC-ESI-QTOF-MS analizi kromatogram sonucu (0-10. dakika). ....	75
Şekil 4.5: Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılan L-askorbik asit standart eğrisi grafiği. 78	
Şekil 4.6: <i>Rheum ribes L.</i> kök n-hekzan ekstresinin HCT 116 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri. ....	79
Şekil 4.7: <i>Rheum ribes L.</i> kök etil asetat ekstresinin HCT 116 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri. ....	80
Şekil 4.8: <i>Rheum ribes L.</i> kök metanol ekstresinin HCT 116 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri. ....	80
Şekil 4.9: <i>Rheum ribes L.</i> gövde n-hekzan ekstresinin HCT 116 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri. ....	81

<b>Şekil 4.10:</b> <i>Rheum ribes L.</i> gövde etil asetat ekstresinin HCT 116 hücre hattında ki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri. ....	82
<b>Şekil 4.11:</b> <i>Rheum ribes L.</i> gövde metanol ekstresinin HCT 116 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık .....	82
<b>Şekil 4.12:</b> <i>Rheum ribes L.</i> kök n-hekzan ekstresinin HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri. ....	83
<b>Şekil 4.13:</b> <i>Rheum ribes L.</i> kök etil asetat ekstresinin HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri. ....	84
<b>Şekil 4.14:</b> <i>Rheum ribes L.</i> kök metanol ekstresinin HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri. ....	85
<b>Şekil 4.15:</b> <i>Rheum ribes L.</i> gövde n-hekzan ekstresinin HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri. ....	85
<b>Şekil 4.16:</b> <i>Rheum ribes L.</i> Gövde etil asetat ekstresinin HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri. ....	86
<b>Şekil 4.17:</b> <i>Rheum ribes L.</i> gövde metanol ekstresinin HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri. ....	87
<b>Şekil 4.18:</b> 5-FU'nun HCT 116 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri. ....	88
<b>Şekil 4.19:</b> 5-FU'nun HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri. ....	88
<b>Şekil 4.20:</b> HCT 116 hücresine kombinasyon muamelesinin ardından elde edilen izobologram analiz grafiği. ....	89
<b>Şekil 4.21:</b> HT-29 hücresine kombinasyon muamelesinin ardından elde edilen izobologram analiz grafiği. ....	90
<b>Şekil 4.22:</b> HCT 116 kontrol grubu hücrelerine göre doz grubundaki apoptotik etkinin anneksin V yöntemi ile gösterilmesi. ....	96
<b>Şekil 4.23:</b> HT-29 kontrol grubu hücrelerine göre doz grubundaki apoptotik etkinin anneksin V yöntemi ile gösterilmesi. ....	97
<b>Şekil 4.24:</b> HCT 116 hücrelerinde kontrol ve doz gruplarının 48 saatlik muamelenin ardından TUNEL yöntemi sonuçlarının inverted mikroskop altında görüntülenmesi ([A]-Kontrol; [B]-KM; [C]-5-FU; [D]-KM+5-FU). ....	98
<b>Şekil 4.25:</b> HT-29 hücrelerinde kontrol ve doz gruplarının 48 saatlik muamelenin ardından TUNEL yöntemi sonuçlarının inverted mikroskop altında görüntülenmesi ([A]-Kontrol; [B]-KM; [C]-5-FU; [D]-KM+5-FU). ....	98
<b>Şekil 4.26:</b> A) HCT116 hücrelerinin doz (KM, 5-FU, KM+5-FU) ve kontrol gruplarının 48 saatlik inkübasyonun ardından flow sitometri florasan yoğunluk histogramları. B) Hücre döngüsünün her bir evresindeki hücre popülasyonunun yüzde grafiği. ....	102
<b>Şekil 4.28:</b> HCT 116 hücresinde sırasıyla kontrol (A), KM (B), 5-FU (C) ve KM+5-FU (D), gruplarının invazyon testi sonrası mikroskop görüntüleri. ....	105
<b>Şekil 4.30:</b> HCT 116 ve HT-29 hücrelerinin doz ve kontrol gruplarına ait invazyon yüzdeleri. ....	107
<b>Şekil 4.31:</b> Doz gruplarıyla 48 saatlik muamelenin ardından HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde BCL-2 proteini konsantrasyon farklılıkları (* p<0,05). ....	108
<b>Şekil 4.32:</b> Doz gruplarıyla 48 saatlik muamelenin ardından HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde ZEB1 proteini konsantrasyon farklılıkları (* p<0,05). ....	109

**Şekil 4.33:** Doz gruplarıyla 48 saatlik muamelenin ardından HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde GATA4 proteini konsantrasyon farklılıkları (\*  $p<0,05$ ). ..... 110

**Şekil 4.34:** Doz gruplarıyla 48 saatlik muamelenin ardından HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde FAS/CD95 proteini konsantrasyon farklılıkları (\*  $p<0,05$ )..... 110

**Şekil 4.35:** miRNA ve hedef gen anlamlı ekspresyon farklılıklarının hücre ve doz grupları için gösterilmesi. .... 120



## TABLolar LİSTESİ

**Tablo 2.1:** TNM sınıflandırması

**Tablo 2.2:** Ticari üretim için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayını alan yedi bitki kaynaklı antikanser ilacı listelenmiştir.

**Tablo 3.1:** Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler.

**Tablo 3.2:** Çalışmadakullanılan kitler

**Tablo 3.3:** Kullanılan cihazlar

**Tablo 3.4:** Çalışma materyali ve kayıt bilgileri

**Tablo 3.5:** *Rheum ribes*'in kök ve gövde ekstralarının % verimleri

**Tablo 3.6:** Çalışmada kullanılan hücre hatlarının özellikleri

**Tablo 3.7:** Kombinasyon indeksi ve etki tablosu (Cghou 2010)

**Tablo 3.8:** Dnase I uygulamsı komponentleri.

**Tablo 3.9:** miRNA'dan cDNA sentezi için gerekli olan komponentler

**Tablo 3.10:** Çalışılan miRNA'lar ve erişim numaraları

**Tablo 3.11:** miRNA analizleri için gerekli olan PCR komponentleri

**Tablo 3.12:** miRNA'ların analizi için RT-qPCR Koşulları

**Tablo 3.13:** cDNA sentezi için kullanılan komponentler.

**Tablo 3.14:** Hedef genlerin ekspresyon analizi için RT-qPCR komponentleri.

**Tablo 3.15:** Hedef genlerin analizi için RT-qPCR Koşulları.

**Tablo 3.16:** RT-qPCR analizinde kullanılan genlerin primer dizileri.

**Tablo 3.18:** Hücre invazyon testi için solüsyon hacimleri,

**Tablo 4.1.:** *Rheum ribes*'in farklı ekstralarına ait toplam fenolik içeriğin gallik asit eşdeğeri olarak miktarı.

**Tablo 4.2.:** *Rheum ribes*'in farklı ekstralarına ait toplam flavonoit içeriğin kersetin eşdeğeri olarak miktarı

**Tablo 4.3:** *Rheum.ribes* kök metanol ekstresinin kromatografik analiz

**Tablo 4.4:** *Rheum ribes*'in farklı ekstralarına ait antioksidan aktivite IC<sub>50</sub> değerleri.

**Tablo 4.5:** HCT 116 hücrelerine uygulanan *R.ribes L*'nin kök ve gövdesine ait ekstraların IC<sub>50</sub> değerlerinin toplu gösterimi.

**Tablo 4.6:** HT-29 hücrelerine uygulanan *R.ribes L*'nin kök ve gövdesine ait ekstraların IC<sub>50</sub> değerlerinin toplu gösterimi.

**Tablo 4.7:** HCT 116 hücre hattında 5-FU ve Kök-metanol (KM) kombinasyon indeksi.

**Tablo 4.8:** HT-29 hücre hattında 5-FU ve Kök-metanol kombinasyon indeksi.

**Tablo 4.9:** HCT 116 hücrelerine uygulanan KM (ekstre), 5-FU ve kombine 5-FU+KM'nin IC<sub>50</sub> dozlarının miR-200 ailesi ekspresyonu üzerinde ki etkisi.



**Tablo 4.10:** HT-29 hücrelerine uygulanan KM (ekstre), 5-FU ve Kombine 5-FU+KM'nin IC<sub>50</sub> dozlarının miR-200 ailesi ekspresyonu üzerinde ki etkisi.

**Tablo 4.11:** HCT 116 hücrelerine uygulanan KM (ekstre), 5-FU ve Kombine 5-FU+KM IC<sub>50</sub> dozlarının hedef genlerin ekspresyonu üzerinde ki etkisi.

**Tablo 4.12:** HT-29 hücrelerine uygulanan KM (ekstre), 5-FU ve Kombine 5-FU+KM IC<sub>50</sub> dozlarının hedef genlerin ekspresyonu üzerinde ki etkisi (\*: p≤ 0,05).

**Tablo 4.13:** Uygulanan doz gruplarının HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde ki apoptotik etkileri

**Tablo 4.14:** HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde doz ve kontrol gruplarının her bir hücre döngüsü fazında ki hücre popülasyonu yüzdeleri.



## ÖZET

### T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Rheum ribes* L. Bitki Ekstrelerinin Kolorektal Kanser Hücre Hatlarında Antikanserojenik Etkisinin  
Araştırılması

İlknur ÇINAR

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi/KONYA-2018

Kanserin tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların ciddi yan etkilere neden olmaları ve tedavinin ileri dozlarında kemodirenç gelişimi nedeniyle alternatif yeni sitotoksik ajanların belirlenmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bizim çalışmamızda ise ülkemizin doğusunda geniş yayılış gösteren ve halk arasında sıklıkla tüketilen *Rheum ribes* L. (Polygonaceae) bitki türünün CRC hücre hatları üzerinde antikanserojenik etkiye sahip olup olmadığı araştırılacaktır. Bu bitki türü ile ilgili yapılan çalışmalar daha çok fitokimyasal analiz ve antioksidan ve antibakteriyel etkisinin değerlendirilmesine yönelik olup antikanserojenik etkilerinin moleküler düzeyde araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda *R. ribes*'e ait kök ve gövde kısımlarından 6 farklı ekstre elde edilmiştir. Tüm ekstrelerin toplam fenolik, flavonoit madde miktarları, antioksidan aktiviteleri ve HCT 116 ve HT-29 kolorektal kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Bu analizler sonucunda en düşük dozla en yüksek sitotoksik aktivite gösteren ekstrenin kök metanol (KM) ekstresi olduğu belirlenmiş ve çalışmaya KM ekstresi ile devam edilmiştir. Sonrasında KM ekstresinin kromatografik analize biyoaktif madde içeriği tespit edilmiştir. KM ekstresinin, CRC'nin tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ajanı 5-FU ile kombinasyon dozları izobologram analizi için kanser hücrelerine uygulanmış ve kombinasyonun IC<sub>50</sub> dozunun her iki hücre içinde hafif sinerjizm gösterdiği belirlenmiştir. KM, 5-FU ve KM+5-FU'nun IC<sub>50</sub> dozlarının uygulandığı hücrelerde miR-200 ailesi (miR-200a/b/c ve miR-141) ve hedef genlerin (EMT ve invazyonla ilişkili ZEB1, CDH1 (E-kaderin), CDH2 (N-kaderin); apoptoz ile ilişkili BCL-2, BAX, Kaspaz-3,7,8,9, CYCS (Sitokrom C), PPAR $\gamma$ , XIAP, FAS/CD95, FAP-1; hücre döngüsü ile ilişkili p53, p21, CDK4, CDK6, CCND1, CCND2, CCND3, CDKN1B, RND3; ve TGF $\beta$  yolağıyla ilişkili TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ R1, TGF $\beta$ R2, SMAD2,3,4,7) ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar gerçek zamanlı qPCR ile değerlendirilmiştir. Morfolojik düzeyde apoptoz, TUNEL ve Anneksin V analizi ile; hücre döngüsü evrelerinin belirlenmesi, hücre döngüsü analizi ile; hücrelerin invaziv karakterleri; invazyon testi ile BCL-2, ZEB1, GATA4 ve FAS/CD95 proteinlerinin ekspresyon düzeyindeki farklılıkları ise ELISA yöntemi ile belirlenmiştir.

miRNA ekspresyon analizi sonuçlarına göre, her iki hücre hattında tümör baskılayıcı fonksiyon gösteren 4 miRNA'nın ekspresyon seviyesinde de anlamlı (p<0,05) artışın olduğu tek doz grubu yalnız KM'dir. Doz gruplarına göre; apoptoz, hücre döngüsü, EMT ve TGF $\beta$  yolağıyla ilişkili hedef genlerdeki anlamlı artış ve azalışlar birlikte değerlendirildiğinde, antiproliferatif ve apoptotik etkinin tek başına uygulanan 5-FU'ya göre KM ve KM+5-FU kombine gruplarında daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar, KM'nin miR-200a/b/c ve miR-141'in ekspresyonlarında anlamlı artışa neden olduğunu; BCL-2, ZEB1, GATA4 ekspresyonlarını baskıladığını göstermiştir. KM'nin tek başına ya da 5-FU ile kombine uygulamasının, kanser hücrelerinin tek başına 5-FU ile tedavisine göre daha iyi yanıt oluşturduğunu düşündürmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Antikanser, HCT 116, HT-29, invazyon, miRNA, Polygonaceae, *Rheum ribes*, sitotoksite.

## ABSTRACT

### NECMETTIN ERBAKAN UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Investigation Of Anticancerogenic Effect Of *Rheum ribes* L. Plant Extracts On Colorectal Cancer Cell Lines.

İlknur ÇINAR

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi/KONYA-2018

Studies are continuing to identify alternative new cytotoxic agents as chemotherapeutic drugs used in the treatment of cancer due to the serious side effects and chemo-dimer resistance in further doses of the treatment. In our study, we will investigate whether *Rheum ribes* L. (Polygonaceae), widespread in the eastern part of our country and a frequently consumed plant species by the population, has anti-carcinogenic effect on CRC cell lines. Studies related to this plant species mostly focus on phytochemical analysis and estimation of antioxidant and antibacterial effects, and no studies have been reported that investigated the anti-cancerogenic effects of this plant species at the molecular level.

In our study, 6 different extracts were obtained from the root and stem parts of *R.ribes*. Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant activities, and cytotoxic effects of all extracts on HCT 116 and HT-29 colorectal cancer cells were determined. According to the results of these analyses, it was found that, the extract which showed the highest cytotoxic activity at the lowest dose was the root methanol (KM) extract, and hence, the study proceeded with the KM extract. Afterwards, the bioactive content of KM extract was determined by chromatographic analysis. The combination of KM extract with 5-FU, a widely used chemotherapeutic agent in the treatment of CRC, was administered to cancer cells for isobologram analysis and it was determined that, the IC<sub>50</sub> dose of the combination shows slight synergism in both cells. Differences in expression levels of the miR-200 family (miR-200a/b/c and miR-141) and target genes (EMT and invasion related ZEB1, CDH1 (E-cadherin), CDH2 (N-cadherin); apoptosis related BCL-2, BAX, Caspase-3,7,8,9, CYCS (Cytochrome C), PPARG, XIAP, FAS/CD95, FAP-1; cell cycle related p53, p21, CDK4, CDK6, CCND1, CCND2, CCND3, CDNK1B, RND3; and TGFβ pathway related TGFβ1, TGFβR1, TGFβR2, SMAD2,3,4,7) were assessed by real-time qPCR in cells in which IC<sub>50</sub> doses of KM, 5-FU and KM+5-FU were administered. Apoptosis at morphological level was determined by TUNEL and Annexin V analysis; detection of cell cycle stages was determined by cell cycle analysis; invasive character of the cells was determined by invasion test; and finally, the differences in the expression levels of BCL-2, ZEB1, GATA4 and FAS/CD95 proteins were determined by ELISA method.

According to the results of miRNA expression analysis, the only dose group with a significant increase ( $p < 0,05$ ) in the expression level of 4 miRNAs that showed tumor suppressor function in both cell lines was KM alone. According to dose groups, when the significant increases and decreases in the target genes associated with apoptosis, cell cycle, EMT and TGFβ pathway were evaluated together, anti-proliferative and apoptotic effects were found to be higher in the combined groups of KM and KM+5-FU than the 5-FU alone.

Our results showed that, KM caused a significant increase in the expressions of miR-200a/b/c and miR-141, and it suppressed BCL-2, ZEB1, GATA4 expressions, with this way. Thus, it has been suggested that the administration of KM alone, or combined administration of KM with 5-FU result in a better response than cancer cells treated with 5-FU alone.

**Keywords:** Anticancer, HCT 116, HT-29, invasion, miRNA, Polygonaceae, *Rheum ribes*, cytotoxicity

## 1. GİRİŞ

Karsinogenez; tümörün oluşumu, gelişimi ve devamlılığında oluşan çok aşamalı bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Bu süreç normal bir hücrenin transformasyonu ile başlar, hiperproliferasyonla devam eder, büyüme baskılayıcılarından kaçınır, programlanmış hücre ölümüne (apoptoz) karşı direnç gösterir, invaziv ve anjiyogenik özellikler kazanır sonra metastatik lezyonların oluşumuyla son bulur (Northcott ve ark., 2018) .

Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, bitkilerdeki fenolik bileşiklerin yüksek miktarda alınmasının insanlarda düşük kanser prevalansı ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Ahmed ve ark., 2013). Hücre döngüsünün durdurulması, antiproliferasyon, karsinojen inaktivasyonu, apoptozun uyarılması, anjiogenezin baskılanması, antioksidasyon ve çoklu ilaç direncinin azaltılması ya da tüm bu mekanizmaların kombinasyonu fenolik asitlerin kansere karşı etki mekanizmalarını teşkil etmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelere de zarar verebilmektedir. Bu nedenle başta bitkiler olmak üzere doğal kaynaklardan elde edilen, yan etki potansiyelleri düşük ilaçların araştırılması giderek önem kazanmaktadır (Rasouli ve ark., 2016).

Kanserin tedavisi ağır kemo-radyoterapi kürlerinin toksisitesi ve özellikle kemoterapi ilaçlarına karşı gelişen direnç nedeniyle başarısız olmaktadır. Bu nedenle özellikle tedaviye bu şekilde yanıt oluşturan hastalarda daha etkili terapötik yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir. Diyetle tüketilen ve şifalı bitkilerden elde edilen bazı fitokimyasallar yoluyla tümör hücresi ölümünün uyarılması kanser tedavisi araştırmaları için yeni ufuklar açmaktadır (Henkin ve ark., 2018). Kolorektal kanserin tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçların başında 5-FU (5-florourasil) gelmektedir (Grem, 2000). Ancak tedavinin ilerleyen kürlerinde tedaviye yanıt oldukça düşük olmakla birlikte ilaca karşı direnç de gelişebilmektedir (Cartwright, 2012). Terapötik etkinliği arttırmak, biyokimyasal modülasyonu sağlamak ve yan etkileri azaltmak için birden fazla kemoterapötik ilaç kombine halde kullanılmaktadır (Ahmed ve ark., 2013). Yapılan çalışmalarla, zengin fitokimyasal kompleksleri içeren bitkilerin, kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanıldığı durumlarda

kemoterapötiklerin etkin dozunu düşürerek, yan etkilerinin azalmasında etkili olabileceği gösterilmiştir (Weidner ve ark., 2015).

Kanserin gelişiminde yer alan kritik mekanizmalardan biri de miRNA'lardır. miRNA ekspresyonu ve işlevindeki değişiklikler kanser sürecinin başlaması, ilerlemesi, onarımı, invazyonu, metastaz gibi birçok aşamayı kontrol eder (Shen ve ark., 2015). Bu nedenle toksik olmayan kemopreventif ajanlarla, regülasyonu bozulmuş olan miRNA'ların hedeflenmesi kanser tedavisi için umut vadeden bir strateji olabilir.

Ülkemizde yetişen birçok bitki türü, çeşitli hastalıkların semptomlarını hafifletmek için halk arasında kullanılmaktadır. Bu bitkilerin en yaygın etkileri antispazmotik, atikanserojenik ve deri hastalıklarına karşıdır (Abu-Irmaileh ve Afifi, 2003). *Rheum ribes* L. türü de birçok çalışmaya konu olmuş Türkiye'de de yetişen tıbbi bitkilerdendir. Literatürde, Polygonaceae familyasına ait *R. ribes* türünden elde edilen ekstraların tedaviye yanıtın düşük olduğu tümör tiplerinden biri olan CRC (kolorektal kanser) üzerindeki etkilerini ortaya koyan bir çalışma bulunmamaktadır.

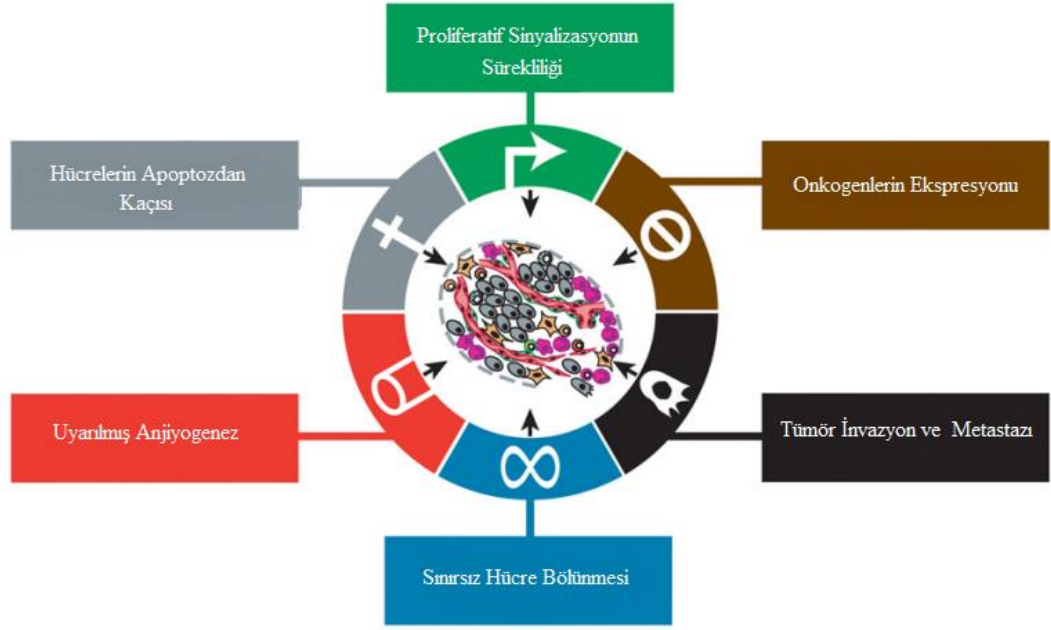
Literatürdeki bu eksiklikten yola çıkarak mevcut çalışmada *R. ribes* türünün içerik ve fitokimyasal analizlerinin ardından *R. ribes* ve 5-FU, kolorektal kanser hücre hatlarına hem tek başına hem de birlikte muamele edilerek, 3 farklı doz grubu uygulamasının antikanserojenik etkileri karşılaştırılmıştır. Ayrıca, miR-200 ailesi ile ilişkili yolakların bu antikanserojenik etkilerin altında yatan moleküler mekanizmalar üzerindeki olası rolünün çeşitli *in vitro* yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Kanser, hücrelerin anormal büyümesi ve bu hücrelerin vücutta köken aldıkları yerlerden diğer bölgelere göç etmesi ile karakterize olan multifaktöriyel bir hastalıktır (Alberts ve ark., 2002). Kanser dünya çapında önemli bir sağlık sorunu olup, yüksek gelirli ülkelerde ikinci, gelişmekte olan ülkelerde ise 3. sırada yer alan ölüm nedenidir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından yapılan istatistikler, dünya çapında 2017 yılında yaklaşık 14 milyon vakaya kanser teşhisi konulduğunu göstermiştir (American Cancer Society 2012a).

Doku kökenlerine göre sınıflandırılmış 100'den fazla kanser türü bulunmaktadır. Karsinomlar; epitelyal hücrelerden, lenfoma; lenfatik sistem hücrelerinden, sarkomlar; kemik ve kaslar gibi mezodermden, adenokarsinomlar ise meme gibi glandüler dokudan köken alan kanser türleri olarak tanımlanmaktadır (Alberts ve ark., 2002). Kanser, iç ve dış olarak ayrılan çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir. İç faktörler; DNA replikasyonu sırasında ortaya çıkabilen genomik instabilite ve mutasyonlar, dış faktörler ise ultraviyole, diyet ve sigara kullanımı gibi çevresel etkenleri içermektedir (American Cancer Society, 2012b).

Hanahan ve Weinberg (2011), kanserin temel özelliklerini tanımlamışlardır. Bu özellikler arasında, proliferatif sinyalizasyonun sürekliliği, onkogenlerin ekspresyonu, hücrelerin apoptozdan kaçışı, sınırsız hücre bölünmesi, uyarılmış anjiyogenez, tümör invazyon ve metastaz yer almaktadır (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1:** Kanserin temel özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011)

Tümörler, göç durumlarına göre benign veya malign olarak sınıflandırılabilir. Benign-primer tümörler, spesifik bir dokudan köken alan ve farklı yerlere göç etmeyen, sessiz bir halde biriken anormal hücrelerden oluşur (Adams ve ark., 2010; Teiten ve ark., 2010). Bununla birlikte, malign tümörlerin sekonder tümör geliştirmek için primer bölgeden göç ederek; etkilenen dokuların, ekstraselüler matriks (ECM), kan, lenf ve endotelinden geçtiği bilinmektedir (Pecorino, 2012).

## **2.1. Kolorektal Kanserin Epidemiyolojisi**

### **2.1.1. İnsidansı**

Kolorektal kanser (CRC), gelişmiş ülkelerde erkek ve kadınlar için kanser mortalitesinin en yaygın ikinci nedenidir (Xu ve ark., 2006). Her yıl bir milyon üzerinde yeni kanser vakası ve yarım milyondan fazla ölümle dünya çapında en yaygın görülen üçüncü sıradaki kanser türüdür (Jemal ve ark., 2011; Siegel ve ark., 2017). Batılı yaşam tarzı, sanayileşme ve kentleşme CRC'nin insidansı ile doğrudan ilişkili olup, erkeklerde bu oranlar kadınlardan daha yüksektir (Tenesa ve Dunlop, 2009; Labianca ve ark., 2010).

### **2.1.2. Risk Faktörleri**

Yapılan göç çalışmalarında, CRC için risk faktörlerinin en önemlilerinin çevresel olduğu gösterilmiştir. Popülasyonlar düşük riskli yerlerden, yüksek riskli bölgelerde (örneğin Japonya'dan ABD'ye) göç ettiklerinde, ilk nesil göçmenlerde CRC gelişiminin artış gösterdiği belirlenmiştir (Marchand, 1999). CRC görülme sıklığındaki artış; beslenme alışkanlıkları, obezite ve sigara kullanımı gibi eksojen faktörlerden kaynaklandığını göstermektedir (Le Marchand ve ark., 1997). Tüm bu veriler değerlendirildiğinde CRC'nin etiolojisinde diyetin çok önemli bir faktör olduğu görülmektedir. Diyet dışındaki diğer risk faktörleri ise sigara kullanımı, genetik faktörler, metabolik sendrom, ileri yaş ve diğer kolorektal hastalıklardır (Labianca ve ark., 2010).

Tüm kanser türleri için ana risk faktörü ileri yaştır: CRC'nin %90'ının 50 yaşından sonra ortaya çıktığı (Sidney, 1999) ve hastaların yaklaşık %70'inin 65 yaşın üzerinde olduğu bilinmektedir (Labianca ve ark., 2010). Bu durum, CRC'nin çoğunlukla sporadik olarak geliştiğini göstermektedir. Tanımlanmış genetik faktörler CRC vakalarının sadece %5'lik diliminde gözlenirken (Kwak ve Chung, 2007), hastaların sadece yaklaşık %1'inin inflamatuvar bağırsak hastalığından muzdarip olduğu ve yüksek risk altındaki kişilerin %20'sinde ise, tanımlanmış bir genetik yatkınlık olmaksızın ailede CRC öyküsü olduğu belirlenmiştir (Sidney, 1999).

CRC için tanımlanmış genetik risk faktörleri arasında; ailesel adenomatöz polipozis (FAP) (Half ve ark., 2009), Lynch sendromu (Gala ve Chung, 2011) ve FAP'ın alt tipi olarak kabul edilen Gardner sendromu (Gomez ve ark., 2009) yer almaktadır.

FAP sendromu tüm CRC vakalarının yaklaşık %1'ini oluşturur ve hastalarda çoğunlukla 40 yaşından önce adenokarsinomla birlikte ortaya çıkar. Bu nedenle, FAP hastaları için erken yaşlarda profilaktik kolektomi önerilmektedir (Vasen ve ark., 2008). Sendromun tanısı, 100'den fazla polip, ailesinde hastalık öyküsü, APC genindeki mutasyonların varlığına dayanmaktadır. APC genindeki mutasyon tipine bağlı olarak, akut ile hafif polipoz formunda farklı fenotipler ortaya çıkabilir. APC geni, morfogenez yoluyla embriyogenezden sorumlu olan WNT yolağının önemli bir düzenleyicisidir. APC genindeki mutasyonlar sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %60-80'inde görülmektedir (Waller ve ark., 2016).



Gardner sendromu, APC genindeki iki mutasyondan kaynaklanan FAP'ın nadir görülen fenotipik bir varyantıdır. Gardner hastalarında kolon poliplerinin yanı sıra osteomalar, epidermoid kistler, fibromlar, desmoid ve tiroid tümörü gibi farklı tümörler de eşlik etmektedir. Hastalık tedavi edilememekte ve yaşam süresi 35-45 yıl arasında değişmektedir (Witold ve ark., 2018).

Lynch Sendromu olarak da bilinen Hereditör Nonpolipöz Kolorektal Kanser (HNPCC), %2-4'lük bir oranla kolorektal kanserle ilişkili en yaygın genetik sendromdur. Bu sendrom embriyonik DNA onarım genlerindeki (PMS2, MSH2, MSH6, MLH1) mutasyonların sonucu olup, otozomal dominant kalıtım göstermektedir. Bu sendromun karakteristik diğer bir özelliği de mikrosatellit instabiliteyeneden olmasıdır. Mikrosatellit instabilitesinin ise hastalığın tanısı için önemli bir belirteç olduğu bilinmektedir (Barrow ve ark., 2013).

## **2.2. Kolorektal Kanserin Prognozu**

Hastalığın sağkalım oranı, tümörün bağırsak duvarı boyunca penetrasyonu ve nodal tutulumunun dereceleri gibi tümör gelişiminin evrelerine bağlıdır (Tenesa ve Dunlop, 2009). CRC hastalarında 5 yıllık sağkalım oranı %5'ten az olduğu için erken teşhis oldukça önemlidir (Coleman ve ark., 2003). Tedavi edilmeyen ileri evre CRC hastalarında ortalama sağkalım süresi 5-6 ay civarındadır. Sadece 5-fluorourasil (5-FU) bazlı kemoterapi ile bu süre 10-12 ay civarında iken; 5-FU irinotekan/oksalipatin kombine uygulamasında sağkalım süresi 18-24 aya kadar yükselmektedir. Tedaviye yanıt oranları, ayrıca semptomların varlığına ve hastalığın derecesine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Labianca ve ark., 2010).

## **2.3. Kolorektal Kanserin Tedavisi**

Kolorektal kanser hastaları için uygulanan tedavi, tümörün büyüklüğüne ve penetrasyon derecesine göre belirlenen hastalık evresine bağlı olarak değişiklik gösterir. Tavsiye edilen evreleme sisteminde TNM kategorileri kullanılır (Tablo 2.1) (Walther ve ark., 2009). TNM sınıflandırması klinik (ön tedavi, cTNM) ve patolojik (ameliyat sonrası histopatolojik, pTNM) sınıflandırmayı içerir. Tedavi seçimini açıklayan sınıflandırma ise cTNM olarak tanımlanmaktadır. TNM sınıflandırması ile tümörün evresi belirlenebilmektedir (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1:** TNM sınıflandırması (Labianca ve ark., 2010)

<b>Evre</b>	<b>T evresi</b>	<b>N evresi</b>	<b>M evresi</b>	<b>5-yıllık sağkalım (%)</b>
I	T1 ya da T2	N0	M0	<b>93.2</b>
Ia	T3	N0	M0	<b>84.7</b>
Ib	T4	N0	M0	<b>72.2</b>
IIa	T1 ya da T2	N1	M0	<b>83.4</b>
IIb	T3 ya da T4	N1	M0	<b>64.1</b>
IIc	Herhangi bir T	N2	M0	<b>44.3</b>
IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1	<b>8.1</b>

\*T kategorileri, kolon duvarının katmanları boyunca yayılma derecesini, N kategorileri lenf düğümleri ve M kategorileri metastazın gelişip gelişmediğini tanımlamaktadır.

Tümör sadece bağırsakta lokalize olduğunda, CRC genellikle tedavi edilebilirdir. Tümörün bağırsakta lokalize olduğu hastalarda ( I / II. evre) cerrahi temel tedavidir ve hastaların yaklaşık % 50'sinin tedavisinde etkilidir. Cerrahinin amacı, ilgili bağırsak segmentinin ve lenfatik drenajının geniş bir rezeksiyonudur. CRC'in tedavisindeki en büyük sorun ve en sık görülen ölüm nedeni, cerrahi müdahalenin ardından kanserin nüks etmesidir. Adjuvan (postoperatif) terapi, nüks riskini azaltmak için ameliyat sonrası verilen sistemik tedavinin bütünüdür. Uygulama, hastaların kanser evrelerine bağlı olarak değişiklik gösterir (Labianca ve ark., 2010).

Tümör küçük olduğu ve henüz mukoza tabakasına nüfuz etmediği erken evrede (Evre I) teşhis edildiğinde, hastalara küratif cerrahi rezeksiyonuyla müdahale edilir. Lenf bezi tutulumunun olmadığı ve kas duvarına lokal yayılımın gerçekleştiği evre II hastalarının tedavisinde cerrahi ya tek başına ya da 5-FU bazlı adjuvan kemoterapi ile birlikte uygulanır. Tek başına cerrahi rezeksiyon uygulanan evre II hastalarının 5 yıllık sağkalımı yaklaşık %75 olup, sadece %25'inin potansiyel olarak adjuvan kemoterapiden fayda sağlayabildiği bilinmektedir. Yakın lenf nodu tutulumu (Evre III) ile ya da uzak organlara nadir görülen metastaz (Evre IV) ile karakterize olan hastalığın en ileri aşamalarında, mevcut tedavi paradigması 5-FU adjuvan bazlı kemoterapinin ardından cerrahi rezeksiyondur (Hector ve Prehn, 2009).

İleri evreli kolorektal kanserin kemoterapi tedavisinde, 5-FU en yaygın kullanılan ajanlardandır (Curren ve ark., 1958). 5-FU, aktif bir metabolite dönüştürülen ve timidilat sentaz (TS) ile kararlı bir kompleks oluşturarak DNA ve RNA sentezini ve tamirini inhibe eden bir moleküldür (de Gramont ve ark., 1997). Ancak tedavide 5-FU tek başına uygulandığında, %10-15 gibi başarısız sayılabilecek

düşük bir cevap oranı elde edilebilmektedir. Yakın zamanlarda ise tedavide daha büyük başarılar elde edebilmek için primer bileşen 5-FU olacak şekilde çeşitli kombine uygulamalar denenmeye başlanmıştır (Goldberg ve Gill, 2004; André ve ark., 2004).

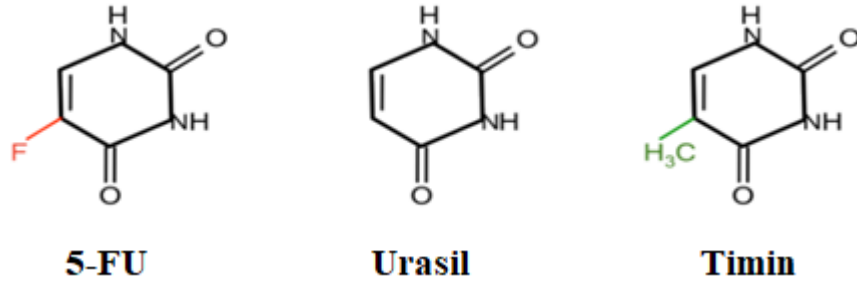
5-FU en yaygın olarak ilacın TS'ye bağlanmasını stabilize eden Leucovorin (yani folinik asit) ve Irinotekan (DNA onarımını ve muhtemelen TS'nin downregüle edilmiş ekspresyonunu engelleyen bir topoizomerez inhibitörü) ile kombine halde kullanılmakta ve genellikle FOLFIRI (folinik asitten FOL, 5-FU'dan F ve Irinotekan'dan IRI) olarak adlandırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu kombinasyonun, gelişmiş tümör kontrolü ve uzun süreli sağkalım dahil olmak üzere bir çok klinik olumlu yanıtlar sergilediği belirlenmiştir (Saltz, 2000; Douillard ve ark., 2000). Oxaliplatin ile kombine edildiğinde sıklıkla FOLFOX (Oxaliplatin'den OX) olarak adlandırılmaktadır. Oksaliplatin ve Irinotekan, hücre hasarının durdurulmasına ve/veya apoptozun indüklenmesine yol açan DNA hasar cevabının uyarılmasıyla sitotoksik etkilerini göstermektedir (Goldberg ve Gill, 2004).

Mevcut FOLFIRI ve FOLFOX kombinasyonları ile ilgili temel endişe, diyare, bulantı ve nörotoksisite gibi yan etkileri gösteriyor olmalarıdır (Falcone ve ark., 2007; Ramanathan ve ark., 2003). Hastalar FOLFOXIRI kombinasyonu ile tedavi edildiklerinde, FOLFIRI tedavisine kıyasla artış gösteren fakat genel olarak yönetilebilir toksisitelere rağmen daha iyi yanıt oranları elde edilmiştir (Anon, 1995; Falcone ve ark., 2007; Montagnani ve ark., 2010). Bu tür yan etkilerin dezavantajı, hastalığın tedavisinde çeşitli sınırlamalara yol açmalarıdır. Bu nedenle yeni terapötik stratejilerin araştırılmasının önemli nedenlerinden biri, bu yan etkilerin azaltılmasının yanında tedavinin etkinliğini arttırmaktır. Tedavide Oxaliplatin ve irinotekanın 5-FU ile kombine uygulanması, 5-FU'nun tek başına uygulamasının %10-15'lik (Giacchetti ve ark., 2000) yanıt oranlarını %40-50'ye çıkarmıştır (Douillard ve ark., 2000). Bu nedenle terapi ve ilaca karşı direncin geri döndürülmesi amacıyla yeni stratejilerin gerekli olduğu anlaşılmıştır (Zhang ve ark., 2008).

Kemoterapötik ajanlara karşı gelişen direnç (hem intrinsik hem de edinilmiş), cerrahi sonrası hastaların en önemli ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Bu durum, kolorektal kanser hücrelerinde 5-FU duyarlılığının ve direncinin belirleyicilerinin anlaşılmasını gerektirmektedir. Bu nedenle, kolorektal

kanser hastaları için hastaya özel tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde 5-FU kaynaklı hücre ölümünün anahtar mekanizmalarının belirlenmesi büyük bir önem taşımaktadır. Buna göre, hastaların 5-FU tedavisinden yararlanma olasılıklarının olup olmadığını veya farklı bir kombinasyon tedavisinin daha başarılı olup olmadığını belirlemek için tarama yapılması gerekmektedir (Jianming ve ark., 2017).

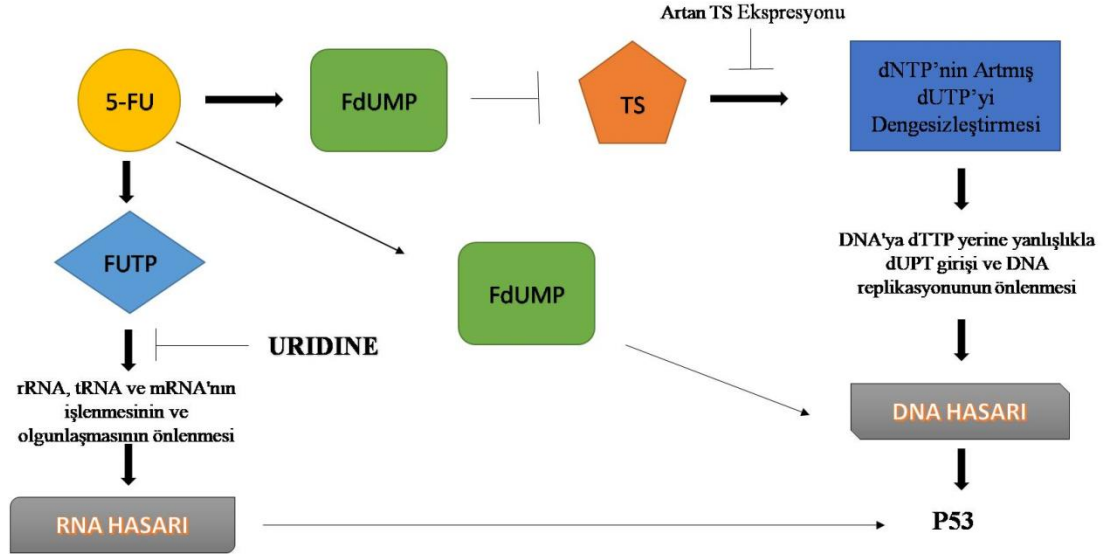
5-FU, DNA (timin) ve RNA (urasil) pirimidin molekülleri ile benzer bir yapıya sahip heterosiklik aromatik organik bileşiktir. Bu yapı, C-5 konumunda hidrojen yerine bir flor atomuna sahip bir urasil analogudur (Şekil 2.2). 5-FU nükleosit metabolizmasına müdahale ederek DNA ve RNA'ya dahil olabilmektedir. Bu yapıysından dolayı sitotoksiteye ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Rutman ve ark., 1954).



Şekil 2.2: 5-FU, Urasil ve Timin'in kimyasal yapısı (Longley ve ark., 2003)

### 2.3.1. 5-FU'nun Etki Mekanizması

Memeli hücrelerinde 5-FU, hücre içinde birkaç aktif metabolite dönüştürülür. Bunlar; fluorodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), fluorodeoksiüridin trifosfat (FdUTP) ve fluorouridin trifosfat (FUTP). 5-FU'nun aktif metabolitleri RNA sentezini (FUTP) bozar, nükleotid sentez enzimi olan timidilat sentaz (TS)'in (FdUMP) etkisini inhibe eder ve aynı zamanda DNA'ya (FdUTP) doğrudan yanlış olarak da eklenebilir (Wyatt ve Willson, 2009) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: 5-FU'nun etki mekanizması

Deoksünükleotid havuzunda ki dengesizliklerin DNA sentezini ve onarımını ciddi şekilde bozduğu ve ölümcül DNA hasarına yol açtığı düşünülmektedir (Yoshioka ve ark., 1987; Houghton ve ark., 1995). 5-FU metaboliti florodeoksiüridin trifosfatın (FdUTP) DNA'nın yapısına yanlış bir şekilde katılması durumunda, urasil-DNA-glikozilaz (UDG) enzimi aracılığıyla eksizyon onarım mekanizmasının aktifleşmesi ile urasil ve 5-FU'in DNA'nın yapısından uzaklaştırılması sağlanır. Bu durum DNA'da kırılmalara ve hücre ölümüne neden olur (Lindahl 1974).

Sinyal yolları, DNA hasarını takiben, hasarın onarımı için hücre döngüsünü durdurmak üzere gelişmiştir ve sadece onarım tamamlanmadığında (DNA hasarı çok fazla olduğunda) hücrelerde ölüm yolları aktifleşecektir. 5-FU metaboliti olan FUTP ayrıca RNA'ya da yoğun olarak dahil edilerek, RNA işlemlerini bozmaktadır. Elde edilen bulgulara göre, bu metabolitin RNA bazlı etkilerin sitotoksitesinde de önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. Bir kanser hücresinin DNA'yı onarması veya hücre ölümünü başlatabilme kapasitesi, 5-FU gibi DNA hasarını indükleyen kemoterapötik ilaçlara karşı direnci ya da duyarlılığını belirleyebilir (Pritchard ve ark., 1997).

## 2.4. Kanserin Gelişiminde mikroRNA'ların Rolü

### 2.4.1. mikroRNA'ların Keşfi ve Adlandırılması

mikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ifadesinin transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası düzenlemesinde işlev gören, uzunlukları 22-24 nükleotid olan küçük ve kodlamayan RNA molekülleridir. Küçük kodlamayan RNA'lar (lin-4 ve Let-7), İlk olarak *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)'da tanımlanmıştır (Lee ve ark., 1993).

Daha sonra yapılan çalışmalarla miRNA'ların virüslerden (Pfeffer ve ark., 2004) memelilere (Lagos-Quintana ve ark., 2001) kadar birçok organizmada bulunduğu keşfedilmiştir. Belirlenen miRNA'ların listelendiği ortak bir veri tabanı kullanılmaktadır (<http://www.mirbase.org/>). miRBase'in en güncel sürümünde (miRBase sürüm 21), 206 türden 24.521 miRNA yer almaktadır. Bunların 2.588'i ise insana aittir (Kozomara ve Griffiths-Jones, 2014). miRNA'lar gelişimsel zamanlama, embriyogenez, hücre farklılaşması, organogenez, metabolizma, apoptozis gibi biyolojik süreçlerde ve kanserin de yer aldığı birçok hastalıkta önemli rol oynamaktadır (Shah ve Calin, 2014).

miRNA'lar insan genomunun sadece %1-3'ünü oluştursalar da, insan genlerinin %30-40'ını düzenledikleri öne sürülmüştür (Carthew ve Sontheimer, 2009). Keşfedildikleri günden bu yana, insanlarda 2000'den fazla miRNA tanımlanmıştır ve bu sayı artmaya devam etmektedir (Nugent ve ark., 2012). Kısa bir süre içinde çok sayıda miRNA keşfedilmiş olduğundan, isimlendirilmeleri için oldukça katı kurallar belirlenmiştir. İlk üç harf organizmayı temsil eder (örneğin hsa-miR-379, *Homo sapiens* miR-379). miRNA'ların numaralandırılması ise keşfedildikleri sırayla ilişkilidir. miR-121a veya miR-121b gibi harfli ekler, yakından ilişkili oldukları miRNA'ları ifade eder. Eğer 2 miRNA aynı prekürsörden köken alıyorsa, prekürsörün 5'kolundan oluşan miRNA; miR-149-5p, 3' kolundan oluşan ise miR-149-3p olarak adlandırılır. Let-7a gibi bazı miRNA isimleri tarihsel nedenlerle korunmuştur (Kozomara ve Griffiths-Jones, 2014).

#### 2.4.2. *miRNA Biyogenezi*

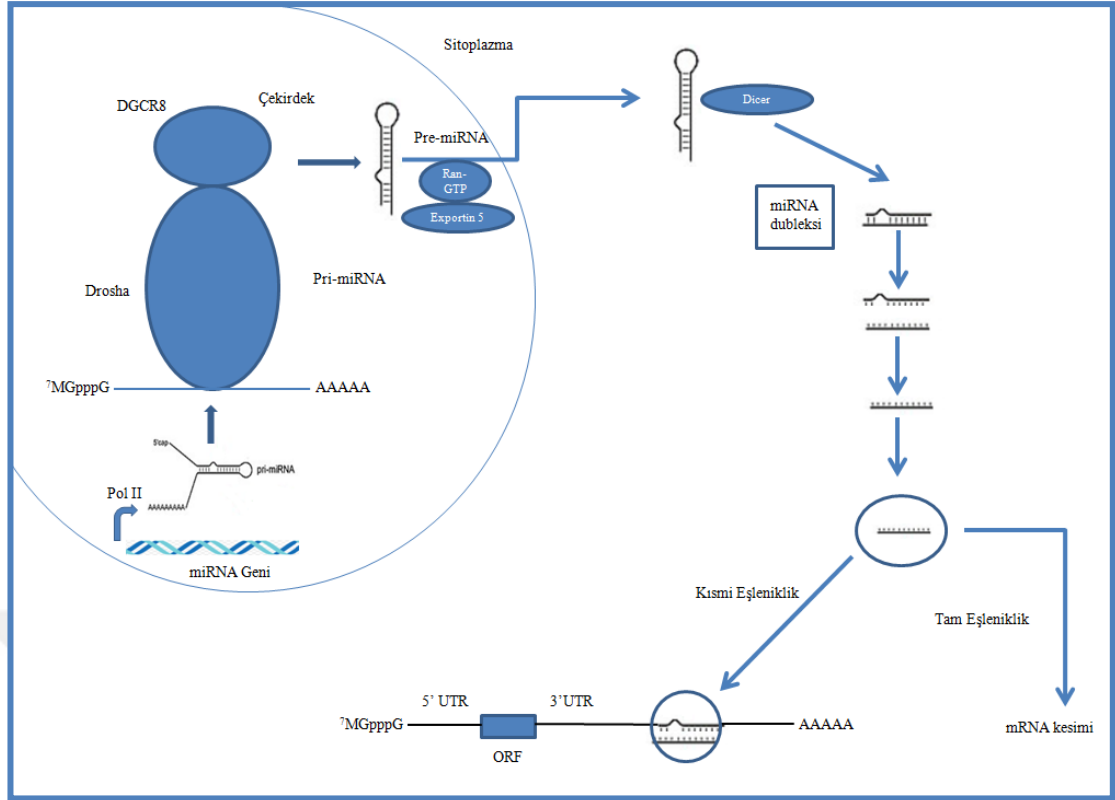
RNA polimeraz II veya III tarafından, nükleusta miRNA genlerinden primer (Pri) miRNA'lar transkripte edilir. Pri-miRNA'lar 3-4 kb uzunluğunda, tek iplikli ve en az bir stem-loop içeren karmaşık bir ikincil yapıya sahiptir (Rodriguez ve Griffiths-Jones, 2004).

Pri-miRNA'lar DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8) ve DROSHA enzimlerinden oluşan mikroşlemci kompleks aracılığıyla 70-90 nükleotid uzunluğundaki bir/birden fazla pre-miRNA (prekürsör-mikroRNA)'lara dönüştürülür (Lee ve ark., 2003, Gregory ve ark., 2004).

Pre-miRNA'lar EXPORTİN-5 olarak adlandırılan özel taşıyıcı proteinler aracılığıyla çekirdekte sitoplazmaya transfer edilir. pri-miRNA'ların exportin-5 tarafından tanınmalarını sağlayan hairpin yapısını içeriyor olmaları ise bu basamağın gerçekleşmesini sağlayan kritik aşamadır (Murchiso ve Hannon, 2004).

Pre-miRNA'nın ileri işleme basamağı sitoplazmik RNaz III enzimi olan DİCER tarafından sitoplazma içerisinde gerçekleştirilir. Dicer enzimi pre-miRNA'yı 20-25 nt uzunluğundaki çift iplikli olgun miRNA dubleksine dönüştürür. Sonuçta çift iplikli yapıda yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda bir molekül oluşur. miRNA dubleksi dicer'in helikaz domaini ile açılır. İpliklerden biri kılavuz (guide) iplik olarak adlandırılır. Bu iplik miRNA aracılı RNA baskılanmasında kullanılır. İkinci iplik ise antisense iplik ya da yolcu (passenger) iplik adını alır (Bartel, 2004; Wahid ve ark., 2014).

Olgun miRNA ile hedef mRNA'yı bir araya getirmek için RISC (RNA-indüklenmiş susturucu kompleks) kompleksi gereklidir. RISC kompleksinin şekillenebilmesi için TRBP (transactivation-responsive RNA-binding protein), PACT (PKR activating protein), AGO (Arganaute) proteinlerinin bir araya gelmesi gerekmektedir (Schwarz ve ark., 2003). Sadece kesilmiş ara dubleksin olgun miRNA zinciri (kılavuz zincir olarak da tanımlanır) RISC kompleksine girer ve stabilize edilir. Antisense miRNA zinciri ve prekürsör yapının geri kalanı ise degrade olur (Lowery ve ark 2008, McDermott ve ark 2011)(Şekil 2.4).



Şekil 2.4: miRNA biyogenezi

### 2.4.3. miRNA ve Kanser

İlk olarak hayvanlarda keşfedilen miRNA'ların hücre büyümesi, sağkalım ve apoptozun kontrolünü sağladığı belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak kanser gibi proliferatif hastalıkların oluşumunda miRNA regülasyonu bozukluklarının katkısı olabileceği düşünülmektedir (Wahid ve ark., 2014).

miRNA'lar ve kanser arasındaki bağlantı ilk kez Calin ve ark. (2002), tarafından belirlenmiştir. İnsanda 13q14 kromozom bölgesinde, miR-15a ve miR-16-1'i kodlayan miRNA genleri yer almaktadır. B hücre kronik lenfositik lösemili (B-CELL) hastaların çoğunda bu iki miRNA'nın azalmış ekspresyonuyla sonuçlanan ilişkili miRNA'ların yer aldığı lokuslarda spesifik translokasyon ya da delesyon olduğu gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise bu miRNA'ların KLL (Kronik lenfositik lösemi) hastalarında, anti-apoptotik BCL-2 proteinini hedeflediği belirlenmiştir. İnsan miRNA'larının haritalandığı çalışmalarla, çoğunun genomdaki fragil bölgelerde lokalize olduğu ve miRNA seviyelerindeki değişikliklerin tümör hücrelerinde oldukça yaygın bir defect olabileceği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2006, Zhang ve ark., 2007).



Tüm genom boyunca yapılan analizler, miRNA ekspresyon profilinin çeşitli insan tümörlerini sınıflandırmak için yeterli olabileceğini ortaya koymuştur. miRNA profilleri aslında belli bir kanserin farklı alttiplerini hatta spesifik onkogenik anormallikleri bile ayırt edebilmektedir. miRNA'lar birçok hastalığın biomarker'ı (belirteci) olarak da tanımlanabilmektedir (Lu ve ark., 2005). Tümör gelişiminde miRNA'ların etkisi geride bıraktığımız son 15 yılda detaylı olarak incelenmiştir. Birbirinden farklı miRNA'lar tümör baskılayıcı ya da onkogenik potansiyeli olan özgün protein seviyelerini düzenleyerek onkogenik ya da tümörbaskılayıcı gen gibi hareket edebilmektedirler (Chang ve ark., 2008).

Daha sonra yapılan çalışmalarda, çeşitli insan kanserlerinde miRNA'ların önemli rollerinin olduğu gösterilmiştir. Normal dokularla karşılaştırıldığında tümörlerde belli miRNA'ların seviyesi belirgin artış ya da azalma göstermektedir. miRNA'ların çoğunlukla fragil bölgeler ve kırık nokta alanlarında yerleşmiş olması tümör gelişimi ve metastazında önemli rol oynadıklarını ortaya koymaktadır. miRNA'lar hedef genlerinin tümör oluşumundaki rollerine dayanılarak onkogenik ya da tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak isimlendirilebilir. Yani onkogenleri hedef alan miRNA'lar, tümör oluşumunu onkogenleri baskılayarak engeller ve bu nedenle tümör baskılayıcı olarak adlandırılırken; onkogenik miRNA'lar da tümör baskılayıcı genlerin inhibitörleri olarak tanımlanmaktadır. Çeşitli kanser vakalarında ekspresyonları artan onkogenik miRNA'lar oncomiR olarak isimlendirilirler ve tümör baskılayıcı ya da hücre farklılaşmasını kontrol eden genleri etkileyerek tümör gelişimine neden olurlar (Xing ve ark., 2014).

Normal dokularda uygun miRNA'nın hedef mRNA üzerindeki eşlenik diziyeye bağlanması, mRNA stabilitesini değiştirerek ya da protein translasyonunun engelleyerek hedef gen ekspresyonunun baskılanmasına yol açar. Tüm bunlar hücresel büyüme, gelişme, farklılaşma ve hücre ölümünün normal düzeyde devamlılığıyla sonuçlanır, yani denge korunur (Kerscher ve Slack 2006).

Tümör baskılayıcı fonksiyon gösteren bir miRNA'nın azalması ya da delesyonu (downregulasyonu) tümör oluşumuna yol açar. Olgun miRNA seviyesindeki azalma ya da tamamen yokluğu durumunda miRNA biyogenez basamaklarında defektler oluşabilir, bu da onkogen ürünü olan mRNA'ların translasyonu ile sonuçlanır. Tüm bunlar çoğalma, invazyon ve anjiyogenezin artışı,

apoptozun azalması ve doku farklılaşmasının da yer aldığı tümör oluşumuna yol açar (Blandino ve ark., 2014).

Onkogen olarak fonksiyon gösteren bir miRNA seviyesindeki artış da tümör oluşumuyla sonuçlanabilir. Bu durumda uygunsuz doku ve zamanda miRNA ekspresyonundaki artış, miRNA ve hedef tümör baskılayıcı gen ekspresyonunu baskılar. Tüm bu koşullar kanser gelişimine yol açar. Yapısal olarak aktif bir promotörün etkisi altındaki miRNA geninin ekspresyonunun artışıyla olgun miRNA amplifikasyonu, artan miRNA işlenmesi ya da miRNA stabilitesi etkilerine neden olur. Her iki durumda da ortaya çıkabilecek sonuçlar: artan proliferasyon, invazyon ya da anjiogenez, azalmış apoptoz ve farklılaşmayan dokulardır. Tüm bunların sonucunda tümör oluşumu gerçekleşir (Chen ve ark., 2014).

### **2.5. Kanserın Tanısı ve Prognozunda miRNA'ların Rolü**

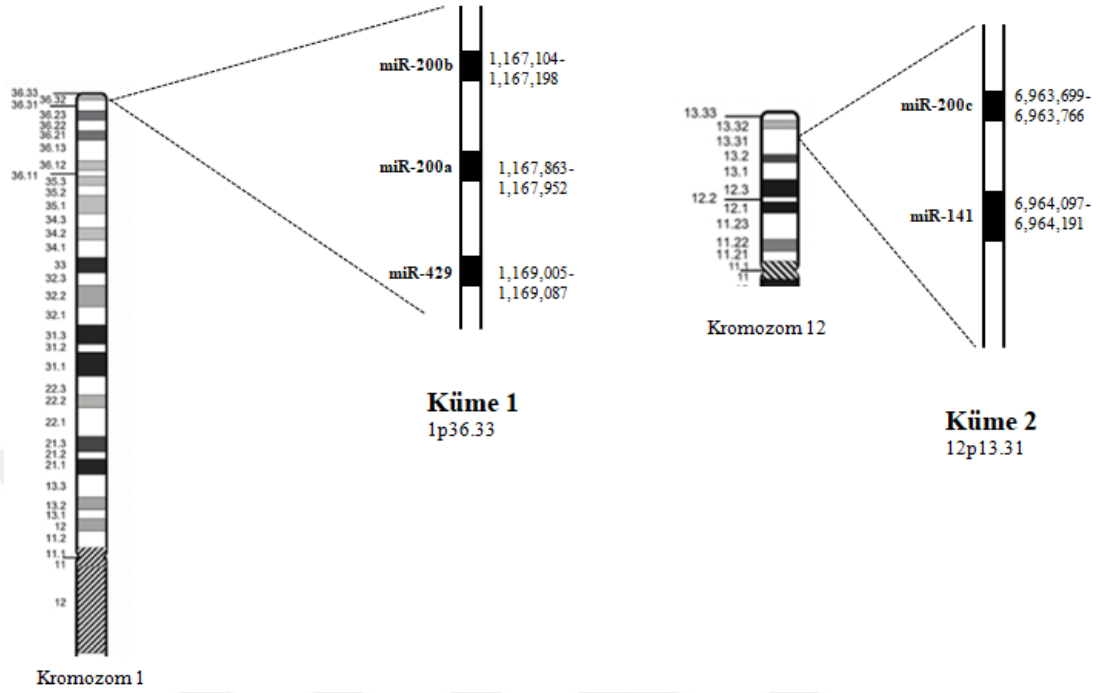
Tümör tiplerinin embriyonik ve gelişimsel orjinlerinin belirlenmesinde miRNA ekspresyon profillemenin daha kesin ve duyarlı sonuç verdiği ve bu nedenle tümör sınıflandırmasında bir biomarker olarak kullanılabilceği ortaya konmuştur (Lu ve Deutsch, 2005). Rosenfeld ve ark. (2008), yaptıkları bir çalışmada da 22 farklı tümör tipinde yapılan miRNA ekspresyon profillemeye %90'ın üzerindeki doğrulukla dokuların kökenlerine göre sınıflandırabileceğini ortaya koymuşlardır.

miRNA'ların kanser prognozunda da rol oynadığı kanıtlanmış olup, hastaların metastatik akibetlerinin tahmin edilebilmesi için de kullanılabilceği ileri sürülmüştür (Pencheva ve Tavazoie, 2013). Png ve ark. (2012),'nın yaptıkları diğeri bir çalışmada da meme kanserinde miRNA ekspresyon profili değışikliğinin metastatik süreçle ilişkili olduğı ve kanser prognozunun belirlenmesinde etkili bir biomarker olarak kullanılabilceği gösterilmiştir.

#### **2.5.1. miR-200 Ailesi**

Beş üyeden oluşan miRNA-200 ailesinin (miR-200a, miR-200b, miR200c, miR-429 ve miR-141), homeostazın düzenlenmesi için oldukça önemli rolere sahip olduğı bilinmektedir. miR-200 ailesi yer aldıkları kromozomal lokasyonlara dayanarak iki kümeye ayrılabilir. miR-200a, miR-200b ve miR-429'u içeren miR-200b/a/429 kümesi; 1p36 kromozom bölgesinde, miR-200c ve miR-141 içeren miR-

200c/141 kümesi ise ve 12p13 kromozom bölgesinde yer almaktadır (Şekil 2.5) (Korpal ve Kang, 2008).



**Şekil 2.5:** miR-200 ailesine ait iki kümenin iki farklı kromozom üzerindeki yerleşimleri

Bilindiği üzere miRNA biyolojisinde hedef genlerin 3' UTR (untranslated region)'leri ile eşleniklik gösteren miRNA'ların 5' bağlanma bölgesinde yer alan seed-çekirdek-tohum dizileri, miRNA aracılı gen ekspresyonu üzerinde önemli bir rol oynar (Lewis ve ark., 2005).

Bir miRNA ailesinin üyeleri, yüksek oranda kronmuş seed-çekirdek-tohum dizileri içerir ve benzer çekirdek dizileri taşıyan miRNA'lar aynı hedef gen profillerini paylaşabilir. miR-200 ailesi üyeleri için, sadece bir nükleotit farkı olan iki tip çekirdek dizi tanımlanmaktadır. miR-200b, miR-200c ve miR-429 kümesinde ortak olan çekirdek dizide, AAUACUG, miR-200a ve miR-141 kümesinde ortak olan çekirdek dizide ise, AACACUG nükleotidleri yer almaktadır (Humphries ve Yang, 2015) (Şekil 2.6).

Çekirdek  
Dizi

Grup 1	miR-200b	UAAUACUG	CCUGGUAAGAUGA
	miR-200c	UAAUACUG	CCGGGUAAGAUGGA
	miR-429	UAAUACUG	UCUGGUA AAAACCGU
Grup 2	miR-141	U AACACUG	UCUGGUAAGAUGG
	miR-200a	U AACACUG	UCUGGUAACGAUGU

Şekil 2.6: Olgun miR-200 ailesi üyelerinin nükleotid dizileri

miR-200 ailesi ve insan sağlığı arasındaki ilişkiyi gösteren ilk çalışmayla olfaktör nörogenezde, miR-200 ailesinin önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Choi ve ark., 2008). Sonrasında yapılan çalışmalarla, miR-200 ailesi üyelerinin, birçok insan malignitelerinde anormal düzeyde eksprese olması nedeniyle, karsinogenezin tüm aşamalarındaki tümör patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. miR-200 ailesi, EMT (epitelyal-mezenkimal geçiş) sürecinde rol oynayan E-cadherin, ZEB1 ve ZEB2 genlerini transkripsiyonel seviyede doğrudan baskılayarak EMT'nin anahtar inhibitörleri olarak fonksiyon göstermektedir (Korpal ve Kang, 2008). Ayrıca miR-200 ailesinin, kanser kök hücrelerinin kendini yenileme ve farklılaşmasını önlerken, apoptozu da modüle ederek hücre çoğalmasını baskıladığı belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular, miR-200 ailesinin tümör baskılayıcı olarak fonksiyon gösterdiğini ortaya koymaktadır. Tümör gelişimi esnasında miR-200 aile üyelerinin de, baskılandığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarla, miR-200 ailesinin tümör baskılayıcı rolleri; kolorektal (Hur ve ark., 2013; Paterson ve ark., 2013), mide (Lu ve ark., 2015), meme (Yao ve ark., 2015), endometrial (Torres ve ark., 2013), pankreatik kanserler (Zhu ve ark., 2014, Zhao ve ark., 2013), hepatosellüler karsinom (Feng ve ark., 2015), gliomalar (Wang ve ark., 2015) ve akciğer kanserlerinde (Berghmans ve ark., 2013) belirlenmiştir.

Bu sonuçlarla uyumlu olarak klinik hasta örneklerinin kullanıldığı sonraki çalışmalarda birçok kanser türünde, tümör gelişimi ve miR-200 ekspresyonları arasında kuvvetli korelasyon olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, miR-200'ün düşük

ekspresyon seviyesinin, kötü prognoz ve düşük sağkalım oranı ile korele olabileceği ve bu nedenle kanser hastaları için prognostik bir belirteç olarak kullanılabilceği düşünülmektedir (Cheng ve ark., 2011; Valladares-Ayerbes ve ark., 2012; Toiyama ve ark., 2014).

#### **2.5.1.1. *miR-200 Ailesinin EMT ve Metastazdaki Rolü***

miRNA ekspresyonunun, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenlemelerden etkilendiği bilinmektedir. Farklı mekanizmaların bir sonucu olarak tümörlerde farklı tipteki miRNA'lar deregülasyona uğramaktadır (Baer ve ark., 2013; Pal ve ark., 2015). Delesyon, amplifikasyon ve translokasyon, tümör gelişiminde yaygın olarak gözlenen genomik anormalliklerdir. Birçok pri-miRNA onkogen veya tümör baskılayıcı olarak fonksiyon göstermekte ve transkripsiyon faktörleri tarafından uyarılmaktadır (Meltzer, 2005). Kanserde, p53, c-myc ve E2F gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin miRNA'lar ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir (Azrak ve ark., 2013).

miRNA'ların işlenmesi ve stabilitesi, miRNA ifadesini belirleyen önemli faktörlerdir. Ayrıca miRNA işleme mekanizmasında görev alan Dicer veya Drosha enzimlerinin ekspresyon seviyeleri, muhtemelen miRNA'nın kopya sayısındaki artışa bağlı olarak çeşitli kanser türlerinde farklılık göstermektedir (Siomi ve siomi, 2010).

Metastaz, malign tümörlerin önemli bir özelliği olup, başlangıç aşaması da EMT olarak adlandırılmaktadır. miR-200 ailesinin EMT sürecini inhibe ettiği ve bir transmembran adezyon reseptörü olan E-kaderin'in transkripsiyonel baskılayıcılarını doğrudan hedefleyerek normal epitel fenotipinin korunmasında görev aldığı belirlenmiştir (Browne ve ark., 2010).

Kanser hücrelerindeki epitelyal belirteçlerin kaybı ve mezenkimal morfolojik özelliklerin kazanılmasının, E-kaderinin baskılanmasına ve vimentin, kollajen, fibronektin ve E-kaderin'in transkripsiyonel baskılayıcıları olan ZEB1 ve ZEB2 gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonunun artışına neden olduğu bilinmektedir (Kim ve ark., 2011).

Bu yaşamsal moleküller, integrin sinyal yolağının ekstrasellüler matriks-indüklü uyarımından olarak, hücre göçü, invazyonu ve metastazı kolaylaştıran

fokal adezyon oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Chang ve ark., 2011). ZEB1 ve ZEB2 transkripsiyon faktörleri ise, E-kaderin ekspresyonunu baskılayarak, kanser hücresi göçü, invazyonu ve metastaz oluşumunda rol alarak EMT'yi uyarmaktadır (Kim ve ark., 2011). Ayrıca TGF $\beta$ 'nın da epitel hücrelerdeki EMT sürecinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Gibbons ve ark., 2009).

Profibrotik sitokin olan TGF $\beta$ 'nın, tübüler epitelyal hücrelerde primer patojen faktör olduğu ve EMT'yi uyurabildiği saptanmıştır. TGF $\beta$ /SMAD sinyalizasyonunun, EMT'yi uyurabilen klasik bir yolak olduğu bilinmektedir. Bu yolak kanserin erken evresinde tümör gelişimini inhibe ederken, ileri kanser evrelerinde ise tümör progresyonunu uyarmaktadır. miR-200 ailesi üyelerinin, bir dizi gen ağını düzenleyerek epitelyal gen ekspresyonunu uyurarak, TGF $\beta$ /SMAD sinyal yolağını ve hücre invazyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Ahn ve ark., 2012).

Mide kanseri ile ilgili yapılan bir çalışmada, CpG adacıkları metilasyonu ve TGF $\beta$  sinyali aracılığıyla miR-200 ailesinin downregülasyonunun gerçekleştiği, bunun sonucu olarak ZEB1/2 ekspresyonunda belirgin artışın ve E-kaderin ekspresyonundaki belirgin azalışın meydana geldiği ve nihayetinde bu artış ve azalışın da hücre göçünü ve invazyonunu uyardığı belirlenmiştir (Zhou ve ark., 2015). ZEB ve TGF $\beta$  proteini arasındaki etkileşimde, ZEB/miR-200 döngüsü ve TGF $\beta$  sinyalizasyonunun karşılıklı transkripsiyonel olarak düzenlenmesinin etkili olduğu düşünülmektedir (Braun ve ark., 2010, Argast ve ark., 2011).

#### **2.5.1.2. miR-200 Ailesinin Hücre Döngüsü Ve Apoptozdaki Rolü**

Hücre bölünmesi, döllenen tek bir yumurtadan olgun bir organizmanın oluşumuna kadar gelişim basamaklarının yanı sıra hücrelerin, dokuların ve dolayısıyla organların yenilenmesinde de yer alan hayati bir süreçtir. miRNA'lar aracılığıyla hücre döngüsü kontrolünün de sağlandığı ve belirli miRNA'ların ektopik ekspresyonunun önemli hücre döngüsü düzenleyicilerinin mekanizmalarını bozarak, tümör gelişimine katkıda bulunabileceği belirlenmiştir. Uhlmann ve ark. (2010), tarafından yapılan çalışmada miR-200 ailesinin hücre döngüsünün düzenlenmesindeki rolü ilk kez tanımlanmıştır. miR-200a/141'ün overekspresyonunun, CDKN1B (siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1B-p27/Kipl) ekspresyonu artışına ve CDK6 (siklin bağımlı kinaz 6)'nın azalmış ekspresyonuna neden olabileceğinden dolayı hücre döngüsünü G1evresinde durdurduğu

belirlenmiştir. Buna karşılık miR-200b/c/429 kümesi ekspresyonunda ki artış p27/kip1 ekspresyonunun azalmasına ve CDC25C geninin inhibitör fosforilasyonunun artışına neden olmuştur. Böylece G1 popülasyonu azalırken, G2/M popülasyonu artmıştır. miR-200bc/429 ve miR-200a/141 kümelerinin, hücre döngüsünün düzenlenmesindeki farklı işlevlerini açıklayan, farklı tohum dizileri ve hedef gen havuzları kullanılarak tanımlanmıştır.

HeLa hücrelerinde yapılan bir çalışmada Xia ve ark. (2010), miR-200b'nin RND3 (Rho family GTPase 3)'ü doğrudan baskıladığı ve buna bağlı olarak S-fazı girişini kontrol eden downstream CCND1 (Siklin D1)'in ekspresyonunu uyardığını belirlemişlerdir.

Yapılan diğer bir çalışmada da Yao ve ark. (2013), miR-200b'nin, CCND1'in transkripsiyonel seviyede ekspresyonunu düzenleyen çinko parmak transkripsiyon faktörü GATA-4'ün önemli bir regülatörü olduğunu göstermişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre; miR-200b'nin, CCND1 ekspresyonunu downregüle etmek için, GATA-4'ü hedefleyerek tümör hücresi büyümesini ve farklılaşmasını düzenleyebilmektedir. Bu nedenle, elde edilen bu bulgular, miR-200'ün birden fazla faktörün modülasyonu aracılığıyla, hücre döngüsü üzerinde birçok seviyede kontrol sağlayabileceği görüşünü desteklemektedir.

Hücre döngüsünün düzenlenmesindeki rolüyle birlikte, miR-200 ailesinin apoptozu da modüle ettiği belirlenmiştir. miR-200c seviyesindeki düzensizliklerin, hücrelerin CD95 aracılı apoptoza karşı duyarlılığını da değiştirdiği bulunmuştur (Schickel ve ark., 2010). miR-200'ün inhibe edildiği hücrelerde, CD95 aracılı apoptoz duyarlılığının azalmasından, miR-200c'nin hedeflerinden biri olarak apoptoz inhibitörü FAP-1'in sorumlu olduğu belirlenmiştir (Magenta ve ark., 2011).

## ***2.6. Kanserın Kemoprevensiyonunda Bitkisel Ürünlerin Rolü***

Tümör, çoğalan tek tip hücrelerin bir yığını olmaktan ziyade, tümör gelişimi ve ilerlemesini destekleyen heterotipik etkileşimlere sahip çok sayıda farklı hücre tipinden oluşan karmaşık bir doku olarak tanımlanmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanser hücrelerinin ayırt edici diğer bir özelliği ise birden fazla sinyal yolağı ile düzenleniyor oluşlarıdır. Bu nedenle tek bir anahtar yolağı hedefleyen ajanların, kanser özelliklerini ortadan kaldırmada başarılı olamayabileceği vurgulanmaktadır.

Bu gibi durumlarda, kalıcı yeteneklere sahip bazı hücreler artık/residual fonksiyonlarla hayatta kalır. Stromal mikroçevrenin mutasyonlara, epigenetik yeniden programlanma veya modellenme gibi koşullara maruz kalması, bu hücrelerin uygulanan terapi ile indüklenen seçici etkilere uyum sağlamasına, fonksiyonel yeterliliğini tekrar kazanmasına ve klinik olarak nüks etmesine neden olan tümör büyümesini yenilemesine izin verdiğini göstermiştir (Bhowmick ve ark., 2004; Folkman ve Kalluri, 2004; Cheng ve ark., 2008).

Halihazırda kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların çoğu, kanser hücrelerine karşı seçici olmayan ve genellikle normal hücrelerde de toksisite oluşturan kimyasal maddelerin kombinasyonlarıdır. Bilindiği üzere, anti-kanser etki gösteren ilaçlar, lenfositleri ve kemik iliği hücrelerini baskılayarak konakçı bağışıklık sisteminde tahribat oluşturmaktadır. Kolorektal kanserin tedavisinde kullanılan mevcut ilaçların çoğunun, toksisiteleri, verimsizlikleri, direnç gelişimi ve masraflı oluşları nedeniyle sınırlı bir potansiyele sahip oldukları bilinmektedir. İlaçla tedavideki bu yetersizlikler değerlendirildiğinde, kanserin kemoprevansiyonu için çoklu hedefleme özelliğini gösteren ajanların kullanımıyla çok yönlü yaklaşımların gerekliliği ön plana çıkmaktadır. Kemoprevansiyon, tümör gelişimini engellemek, tersine çevirmek veya geciktirmek için ajanların kullanılması anlamına gelmektedir (Vickers, 2000; Aggarwal ve Shishodia 2006).

*In vitro* ve *in vivo* çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, pek çok bitkisel ürünün kemopreventif etki gösterebileceği belirlenmiştir (Surh, 2003). Bu bağlamda, çeşitli bitkisel ürünler, kanser sinyalizasyonunu etkileyen farklı sinyal yollarının eş zamanlı hedeflenmesi için güçlü bir kapasite sergilemektedir. Bu tür bitkisel ürünlerin, tümör gelişimi ve metastazına dirençli olan immünolojik efektör mekanizmaların yeniden aktive olmasını uyardığını ve kanser sinyalizasyonunu etkileyen farklı yolları eş zamanlı hedefleyebildiği bildirilmiştir (Werner ve Jolles, 1996; Wasser ve Weis, 1999). Bu nedenle önemli kanserojen yolları, belirgin yan etkiler göstermeden hedefleyebilen bu tür bitkisel ürünlerin, ideal kemoprevansiyon ajanları olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir (Aggarwal ve ark., 2007).

İyi tanımlanmış ve izole edilmiş doğal olarak oluşan bileşiklerin geniş bir yelpazesinin karakterizasyonu pahalı ve zaman alıcı olduğundan, çalışmalar güçlü terapötik özelliklerini uyarmak için sinerjistik ya da additif etkili bileşiklerin bir



karışımı olan bitki ekstraktlarının izolasyonu ve ayrıştırılmasına yoğunlaşmıştır (Quinn ve ark., 2008).

### **2.6.1. Tıbbi Bitkiler**

Tıbbi bitkiler, kısımlarından en az birinin, terapötik amaçlı kullanılabilen etken maddeleri içeren bitkiler olarak tanımlanabilmektedir. Tıbbi bitkiler geleneksel tıpta oldukça önemli bir yer teşkil etmektedir. Geleneksel tıp ise, birçok hastalığın tanısı, tedavisi ve önlenmesi için doğal kaynakların, spirüüel ve manual tekniklerin tek başına veya kombine muamelesiyle gerçekleştirilen yaklaşım, bilgi ve inançlar bütünü olarak tanımlanmaktadır (Sofowora, 1982).

Eski Mısırlılar, tıbbi doğru kurallarla uygulayan ilk uygarlık olarak kabul edilmektedir. Eski el yazmaları, Mısır (Ebers papirüs; M.Ö. 1550) ve Yunan uygarlıklarının bitkileri tıbbi amaçla kullandıklarını ve öneminin farkında olduklarını göstermektedir. Bilindiği üzere Hipokrat (M.Ö. 377-460) tıp alanındaki reçeteleri ve yazıları ile ünlü bir hekimdir. Yine yakın tarihlerde Theophrastus (M.Ö. 285 – 372), kullanım alanları bilinen 500 tıbbi bitkiyi Bitkilerin Etiyolojisi (Historia Plantarum) isimli çok önemli bir kitapta ilk kez bir araya getirmiştir (Edwin Smith, 2017).

Eski çağlardan beri geleneksel ilaçların en popüler formu olan tıbbi bitkiler dünyanın birçok yerinde (özellikle gelişmekte olan ülkelerde) oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Afrika nüfusunun %80'i, Güney Amerika, Çin ve Asya nüfusunun ise %40'ı geleneksel ilaçları kullanmaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, WHO 2002). Gelişmekte olan ülkelerin çoğunda, tıbbi bitkiler erişilebilirlik ve satın alınabilirlik nedeniyle birincil tıbbi tedavi kaynağı olarak kullanılmaktadır. Birçok gelişmiş ülkede, tıbbi bitkilerin tamamlayıcı ve alternatif ilaçlar olarak kullanımı giderek daha popüler hale gelmektedir. Avrupa Birliği Üye Devletleri arasında yapılan bir ankete göre, Avrupa Ekonomik Topluluğu'nda yaklaşık 1.400 tıbbi bitkinin kullanıldığı anlaşılmıştır. Dünya genelinde de tıbbi bitkileri en az bir kez kullanan nüfusun yüzdesi ise Avustralya'da %48, Kanada'da %70, ABD'de %42 (ABD), Belçika'da %38 ve Fransa'da %5 olarak belirlenmiştir (Dünya Sağlık Örgütü, WHO 2003).

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların olumsuz etkilerine ve allopatik ilaç varsayımlarının sorgulanmasına ilişkin endişeler, gelişmiş ülkelerde tıbbi bitkilerin kullanımını artırmıştır. 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından seçilmiş Tıbbi

bitkilerin doğru kullanımını teşvik etmek için bu bitkilerin güvenliği, etkinliği ve kalitesi hakkında en güncel bilgilerin yer aldığı WHO Monograflarının iki ciltlik bölümü yayınlanmıştır (Mahady, 2001).

Dünya çapında yaklaşık yarım milyon bitki türü mevcut olup, tıbbi amaçla araştırılan yaklaşık 70.000 bitki türü olduğu tahmin edilmektedir (Schippmann ve ark., 2006; Rasool Hassan, 2012). Digoksin, digitoksin, morfin, reserpin, taksol, vinblastin, vinkristin gibi ilaç özleri olarak doğrudan kullanılan izole edilmiş bileşenler ve tıbbi bitkiler, daha düşük toksisite ve daha yüksek aktivite gösteren yeni maddelerin [metformin, nabilone, oxycodone (ve diğer narkotik analjezikler), taxoter, teniposide, verapamil ve amiodaron gibi] ilaç olarak sentezlenmesi ve dizayn edilmesinde görev alabilirler (Fabricant ve Farnsworth, 2001). Son 20 yılda ilaç olarak kullanılan 850 küçük molekülün yaklaşık %50'si, tıbbi bitkilerden, bitki-türevli veya bitki taklitlerinden elde edilmiştir; bu, sentetik tıbbi bileşiklerin, bitki çalışmalarıyla keşfedildiğini göstermektedir. Bu nedenle tıbbi bitkilerin şimdi ve ileride yapılacak çalışmalarla modern toplumun karmaşık hastalıklarının çoğuyla mücadele için yeni ilaç arayışlarında kaçınılmaz bir adres olacağı düşünülmektedir (Fowler, 2006, Rasool Hassan, 2012).

Tıbbi bitkiler, içeriğindeki bileşiklerin birbirleriyle etkileşime girmesiyle sinerjik etki gösterebilirler, ilaç desteği olarak kullanılabilirler, koruyucu özellik gösterebilirler. Bitki bileşenlerinin, bazı hastalıkların ortaya çıkışını engelleyebildikleri gibi hastalık ortaya çıkmasının ardından kimyasal ilaçlarla uygulanan tedavinin yan etkilerini azaltmada da oldukça etkili oldukları kanıtlanmıştır (Van Wyk ve Wink, 2017).

#### **2.6.1.1. Antikanser Ajan Olarak Tıbbi Bitkiler**

Tıbbi bitkiler, kanserle mücadele tarihi boyunca modern antikanser ilaçların geliştirilmesinde önemli bir rol oynamıştır. Bitkisel kaynaklı antikanser ajan araştırma (keşif) çalışmaları, 1957 yılında ABD Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından, *Catharanthus roseus*'tan vinca alkaloidlerin (vinblastin ve vinkristin) keşfedilmesiyle başlamıştır (Johnson ve ark., 1963).

1960'dan 1982 yılına kadar, NCI'deki kapsamlı bir programla, anti-kanser aktivitelerinin belirlenmesi için 20 ülkeden tahmini 35.000 bitki örneğinden yaklaşık 114.000 ekstrakt taranmıştır (Balunas ve Kinghorn, 2005; Shoeb, 2006). Sonrasında,

1987 yılında *in vitro* insan kanser hücre hatları kullanılarak yeni bir natural product programı başlatılmıştır. 1991 yılının sonuna kadar, 20'den fazla ülkeden 2800 bitki örneği kemoterapötik aktivite yönünden taranmak üzere toplanmış olup (Cragg ve ark., 1993), Cragg ve ark. (1997), klinik olarak yararlı olduğu belirlenen 87 antikanser ilacın %62'sinin doğal kökenli olduğunu veya natural product soylar üzerinden modellendiğini göstermiştir (Tablo2.2).

**Tablo 2.2:** Ticari üretim için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayını alan yedi bitki kaynaklı antikanser ilacı listelenmiştir

İlaç	Bitki Kaynağı	Klinik Kullanımı	Kaynak
Taksol	<i>Taxus brevifolia</i>	Over ve meme kanseri	(Wani ve ark., 1971, Dubois ve ark., 2003)
Vinblastin, Vinkristin	<i>Catharanthus roseus</i>	Lösemi, mesane ve testis kanseri	(Ngan ve ark., 2001, Dhamodharan ve ark., 1995)
Etoposid ve Teniposid	<i>Podophyllum peltatum</i>	Küçük-hücreli akciğer, testis kanseri ve lenfoma	(Maanen ve ark., 1988, Huff ve Kreuzer, 1990)
Topotekan	<i>Camptotheca acuminata</i>	Over ve küçük-hücreli akciğer kanseri	(Arun ve Frenkel, 2001, Liew ve Yang, 2008)
Irinotekan	<i>Camptotheca acuminata</i>	Metastatik kolorektal kanser	(Fujiwara ve Minami, 2010, Innocenti ve Ratain, 2006)

Her ne kadar birçok ilaç şirketi “doğal ürün”(natural product) keşif programını son on yılda sonlandırmış olsa da, yeni doğal bileşik arayışları pek tatmin edici olmadığından, doğal ürün araştırmaları özellikle akademi-özel sektör işbirlikleri ile sessiz bir şekilde devam etmektedir. Ayrıca keşif sürecinin etkinliği, potansiyel biyomarkerların belirlenmesi için bitki karışımlarındaki metabolamikslerin ortaya çıkarılmasının yanısıra yeni biyoaktif bileşenlerin hızlı bir şekilde tanımlanabilmesi için gelişmiş yapı tahmini yazılımı ve ultra duyarlı analitik tekniklerle geliştirilmeye devam etmektedir. Bu nedenle, tıbbi bitkilerin doğada bol miktarda bulunuyor oluşları ve doğal ürünlerden başarılı antikanser ilaçların geliştirilmesi tarihi göz önüne alındığında, daha fazla potansiyel antikanser bileşiğin doğada var olduğuna ve uygun strateji, çaba ve teknolojik gelişmelerle ilerleyen zamanlarda keşfedilebileceklerine inanmak oldukça gerçekçi görünmektedir (David ve ark., 2014).

### 2.6.2. *Kanser ve Fenolik Bileşikler*

Doğal ürünler, temel olarak bitkilerden, mantarlardan, mikroorganizmalardan ve deniz canlılarından elde edilmektedir. Bunlar, doğada bulunan canlı bir organizma tarafından üretilen kimyasal ürünlerdir (Samuelson, 1999; Dias ve ark., 2012). Geçmişte oldukça eskiye dayanan doğal ürünler, birçok hastalığı tedavi etmek için insanlar tarafından oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu materyallerin ya yapısal olarak orijinal formları kullanılmakta ya da suda çözülebilir ve ısıya dayanıklılık gibi farmakolojik özelliklerini geliştirmek için kimyasal sentez yoluyla da elde edilmektedir (Foye ve ark., 2008). “Doğal ürünler” terimi genellikle bir organizmadaki birincil biyokimyasal rolleri bilinmeyen bileşik anlamına gelmektedir. Bitki metabolitleri genellikle primer ve sekonder olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Primer metabolitler, büyüme, gelişme ve farklılaşma gibi temel metabolik süreçlere katılırken, sekonder metabolitler ise organizma tarafından ekolojik veya savunma amaçlı üretilirler. Böylece canlılığın devamının sağlanmasında görev alırlar (Messina ve Barnes, 1991).

Doğal ürün bileşikleri "ikincil/sekonder metabolitler" olarak da adlandırılmaktadır. Sekonder metabolitler alkaloidler, fenolik bileşikler, terpenoidler gibi kategorilere ayrılmaktadır. Fenolik bileşikler yapısında yer alan hidroksi grubu ve fenolik halkanın sayısına göre basit fenoller (fenolik asit ve kumarinler) ve polifenoller (flavonoidler, stilbenler, tanenler, lignanlar) olarak sınıflandırılmaktadır (Bernards, 2010).

Birçok fenolik bileşik, birden fazla hidroksil grubuyla birkaç fenolik halka içerdiğinden dolayı bu bileşikler için sıklıkla polifenol terimi kullanılır. Quideau ve ark. (2011), polifenol terimini “Birden fazla fenolik halkaya sahip olmaları ve temel yapılarında nitrojenbazlı fonksiyonel grubun eksikliği” olarak tanımlamışlardır.

Fenolik bileşikler birçok yiyecek ve içecekte yer almakta olup bitkilerin kök, gövde, yaprak, çiçek gibi farklı kısımlarına dağılmış halde; şifalı bitkiler, sebze, meyve, tahıl, çay, şarap gibi popüler ve sık tüketilen ürünlerde bulunduğu için dolayı yararlı etkilerinden birçok kişi faydalanabilmektedir. Bitkideki fenolik içeriği mevsimsel değişikliklere ve bitkinin yetiştirme koşullarına göre değişiklik göstermektedir. 8000’den fazla fenolik bileşik tanımlanmış olup, yarısından fazlası flavanoid yapısındadır (Anantharaju ve ark., 2016).

Fenolik bileşiklerin, güçlü anti-kanser aktivitesi sergilemelerinin yanısıra, oksidatif stresle ilişkili çeşitli hastalıklarda da etkili oldukları bilinmektedir (Arts ve Hollman, 2005). Daha önce yapılan çalışmalarla, diyetle alınan fenollerin yararlı etkilerinin, antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-kaltojenik aktivitelerinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Fenolik bileşiklerin hücre döngüsünü durdurması, hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve apoptozu kontrol eden onkogenik sinyal yollarını inhibe etmesi, hücre içi ROS seviyesini düzenlemesi, p53 gibi tümör baskılayıcı proteinlerin sentezini ve normal hücrelere farklılaşma ve dönüşümünü uarması nedeniyle antikarsinojenik etkiye de sahip oldukları gösterilmiştir (Lambert ve ark., 2005).

Fenolik bileşiklerin doğal kaynaklardan saflaştırılması oldukça zorlu bir süreçtir. Bu nedenle *in vitro* ve *in vivo* kanserlerle ilgili birçok çalışmada ya fenolik bileşikler açısından zengin ham ekstrater ya da fenolik bileşiklerin bir kısmını içeren fraksiyonlar araştırılmıştır. Örneğin, gallik asit, sinamik asit ve ferulik asit içeren *Pandanus amaryllifolius*'un (Malezya bölgesinden bir bitki türü) ekstraterinin meme kanseri hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe ettiği (Ghasemzadeh ve Jaafar, 2013), başka bir çalışmada ise; gallik asit, pirogallol, siringik asit ve kafeik asit içeren *Baccharis trimera* ekstraterinin, serviks kanseri hücrelerinin doza bağımlı olarak proliferasyonunu ve koloni oluşumunu baskıladığı belirlenmiştir (de Oliveira ve ark., 2013).

Ayrı ayrı saflaştırılmış bileşenlerin oral yolla tüketilmesinin aksine, diyet yoluyla alınan fitokimyasal karışımların; hücre döngüsü, farklılaşma, apoptoz ve metastazında dahil olduğu birçok hücre sel sinyal yolağına müdahale ederek güçlü biyoaktif özelliklerinden sorumlu olan sinerjistik etkilere sahip oldukları görülmüştür (Aggarwal and Shishodia, 2006). Bu durum, fitokimyasallar aracılığıyla gözlemlenen yararların tek bir ajan tarafından taklit edilememesinin nedeni olabilir (Liu, 2003).

### 2.6.3. *Rheum ribes L.*'nin Botanik Özellikleri

#### 2.6.3.1. *Rheum ribes L.*'nin Taksonomik Sınıflandırılması

**Alem:** Plantae  
**Şube:** Tracheophyta  
**Sınıf:** Magnoliopsida  
**Takım:** Caryophyllales  
**Aile:** Polygonaceae  
**Cins:** *Rheum*  
**Tür:** *Rheum ribes L.*

#### 2.6.3.2. *Rheum Cinsi*

*Rheum* veya yaygın olarak Rhubarb olarak bilinen bu cins, Polygonaceae ailesinin en çok bilinenidir. Bu cinste bulunan tüm türler çok yıllık olup, *Rheum rhaponticum L.*, *Rheum palmatum L.*, *Rheum officinale Baill L.*, *Rheum emodi L.* ve *Rheum ribes L.* gibi örneklere sahiptir (Wang ve ark., 2005).

Bu cinste bulunan türlerin çoğu, besin olarak veya tıbbi kullanım amacıyla tüketilmektedir. Tıbbi kullanımı, içinde bulunan antrasenin veya bunun türevleri olan kimyasal bileşiklerin (Antrakınonlar gibi) uygun kompozisyonlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bitkilerin tıbbi kullanımları nedeniyle, *Rheum* türlerinin çoğunda bulunan kimyasal bileşenler izole edilmiş ve karakterize edilmiştir (Ye ve ark., 2007; Han ve ark., 2008). Bu kimyasalların bir kısmının, fenollerin, stilbenlerim ve uçucu yağların farklı sınıflarına ait olduğu belirlenmiştir (Jun ve ark., 2002; Chengzhong ve ark., 2005; Lan ve ark., 2005).

Bu bitki türleri halk arasında antidiyabetik (Choi ve ark., 2005), antispazmodik (Yuan ve ark., 2005) ve hazmı kolaylaştırıcı (Zhou ve ark., 2006) amaçlarla kullanılmaktadır.

#### 2.6.3.3. *Rheum ribes L.*'nin Yayılışı

Halk arasında “Işkın, uşgun ya da uçgun” olarak isimlendirilen *R. ribes* özellikle Türkiye'nin doğusu, İran, Irak, Lübnan'dan Afganistan ve Pakistana kadar dünyanın subtropikal ve ılıman bölgelerinde, 1000-4000 m yükseklikteki taş, kaya ve yamaçlar arasında yayılım gösteren bir bitki türüdür. Bu bitki mayıs-haziran

aylarında yetişen, sarımsı beyaz renkte çiçekleri olan, 40-150 cm uzunluğunda otsu çok yıllık, yenilebilir lifli yapraklara sahip bir türdür (Yildirim ve ark., 2015).



Şekil 2.7: Gazi üniversitesi herbaryumunda kayıt altına alınmış ve taze toplanmış *Rheum ribes L.*'nin gövdesi

#### 2.6.3.4. *Rheum ribes L.*'nin Halk Arasındaki Kullanımı

Türkiye'de Polygonaceae ailesi, sekiz cins ve 70 türle temsil edilmektedir. *Rheum ribes* ise Türkiye'de yetişen tek *Rheum* türüdür (Cullen, 1966). *R. ribes*'in genç sürgün ve yaprak sapları ishal, mide ağrıları ve mide bulantısına karşı kullanılırken, kök gibi diğer kısımları ise kızamık, çiçek, hemoroidin tedavisinde ve aynı zamanda safra söktürücü olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999). Türkiye'nin doğusunda halk arasında hazmı kolaylaştırıcı ve iştah açıcı olarak da kullanılan *R. ribes*'in taze kök ve yaprak sapları sebze olarak tüketilirken, kurutulmuş kökleri ise tek başına antihelmintik ve balgam söktürücü olarak, ülser, hipertansiyon ve obezitenin tedavisinde de kullanılmaktadır (Tabata, 1994; Abu-Irmaileh ve Afifi, 2003). Bu bitkinin sahip olduğu güçlü aktif bileşiklerin tüm bu özelliklere temel oluşturduğu düşünülmektedir.

### 2.6.3.5. *Rheum ribes L.*'nin Kimyasal İçeriği, Farmakolojik Özellikleri ve Yapılan Çalışmalar

Literatürde *R. ribes*'in antioksidan aktivitesinin araştırıldığı ve içerdiği fenolik bileşiklerin analizinin gerçekleştirildiği bazı kimyasal çalışmalar bulunmaktadır. Flavonoidler, stilbenler ve antrakinonlar, *R. ribes*'e potansiyel bir antioksidan etki sağlayan başlıca fenolik bileşenlerdir (Uyar ve ark., 2014).

Naqishbandi ve ark. (2009)'nın, yaptığı bir çalışmada, *R. ribes*'in köklerinde aloe-emodin, emodin, krizofanol ve fiskiyon gibi dört antrakinon türevinin tanımlanması ve ayrımı için HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) yöntemi kullanılmıştır. Sonuç olarak bitki köklerinde dört antrakinonda tanımlanmış olup, aloe emodin, emodin, krizofanol ve fiskiyon yüzdeleri sırasıyla %0.39, %0.014, % 0.089 ve %0.072 olarak belirlenmiştir.

Yapılan bir diğer çalışmada, Hakkari'den toplanan *R. ribes*'in gövdesinden 3 antrakinon (krizofanol, fiskiyon ve emodin) ve 5 flavanoit (kersetin, 5-deoksikersetin, kersetin 3-O-ramnozid, kersetin 3-O-galaktozid ve kersetin 3-O-rutinozid) türevi izole edilmiştir (Tosun ve Akyuz-Kızılay,2003).

*R. ribes*'in kimyasal içeriğini tanımlamaya yönelik yapılan diğer bir çalışmada da Erzincan'dan toplanan bitkinin köklerinden krizofanol, fiskiyon, rein, aloe-emodin, fiskiyon-8-O-glukozit, aloe-emodin-8-O-glukozit, sennozid A ve rapontisin gibi fenolik bileşikler izole edilmiştir (Meriçli ve Tuzlacı, 1990).

*R. ribes*'in kök ve gövdesine ait örneklerin kloroform ve metanol ekstralarının antioksidan aktivitesi Öztürk ve ark. (2007), tarafından çalışılmıştır. Aynı ekip tarafından bu ekstraların toplam fenolik ve flavonoid bileşiklerinin içeriği belirlenmiş ve bu bileşiklerin oldukça yüksek miktarda bulunduğu gösterilmiştir. Sonuçlar *R.ribes*'in lipid peroksidasyonu ve serbest radikal hasarına karşı antioksidan olarak kullanılabilmesini ortaya koyarken, araştırmacılar da bitkinin güvenli bir gıda takviye ürünü aday olabileceğinin altını çizmişlerdir.

*R. ribes*'in meyve ve tohumlarının metanol ekstralarının protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonuna karşı total flavonoid, fenolik ve antosiyanin içeriğinin antioksidan özelliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmaya göre, toplam fenolik,



flavonoit ve antosiyanin içeriğinin tohum ekstralarında yüksek olduğu belirlenmiştir (Yıldırım ve ark., 2015).

Yıldırım, (2007), tiyosiyanat yöntemini kullanarak, *R. ribes*'in farklı bölümlerinin eter, etanol ve su ekstralarının toplam antioksidan aktivitesini araştırmıştır.

*R. ribes* köklerine ait örneklerin ait etanol ve su ekstralarının antioksidan potansiyelinin DPPH radikal süpürme testi kullanılarak çalışıldığı ve antibakteriyel aktivitenin ise gram pozitif (*S. aureus*) ve gram negatif (*E. coli*, *P. mirabilis* ve *P. aeruginosa*) bakteri türleri üzerinde değerlendirildiği diğer bir çalışmada da her iki kök ekstresinin de antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Aynı çalışmada HPLC yöntemiyle ekstradaki 10 fenolik bileşik belirlenmiştir (emodin, aloe-emodin, fiskeiyon, krizofanol, rein, klorojenik asit, gallik asit, tannik asit, kemferol ve rutin). *R. ribes*'in etanol kök ekstralarında bulunan fenolik içeriğin yüksek miktardaki bileşeninin test edilen organizmalara karşı yüksek antioksidan ve antibakteriyel aktiviteden sorumlu olduğu tespit edilerek *R. Ribes*'in kök ekstralarının çeşitli hastalıklara karşı terapötik bir ajan olarak kullanılabilceği öne sürülmüştür (Abdulla ve ark., 2014).

*R. ribes*'in antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirildiği başka bir çalışmada da, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa* ve *N. gonorrhoeae* ve *B. bronchiseptica*, *Micrococcus luteus*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens* ve *Staphylococcus aureus*'un üç izolatu gram negatif patojenlere karşı araştırılmıştır. *R. ribes*L. kök ekstralarının, *M. luteus*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* üzerinde etkili antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Bonjar, 2004).

Kırbağ ve Zengin (2005), *R. ribes* total ekstresinin mikroorganizma büyümesini inhibe ettiğini belirlemiş olup, kök ve gövde ekstralarının ise önemli antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir.

*R. ribes*'in çeşitli çözücülerle hazırlanan ekstralarının kullanıldığı bir başka çalışmada sadece kök, sap ve tohumlarına ait örneklerin etanol ve metanol ekstralarının *Bacillus subtilis* ve *Enterobacter aerogenes* bakterilerine karşı antimikrobiyal olduğu; bununla birlikte ekstraların hiçbirinin antifungal aktivite göstermediği belirlenmiştir (Alan ve ark., 2012).

*R. ribes*'in toz haline getirilmiş ve kapsüllenmiş köklerinin günlük kullanımının tip 2 diyabetli hastalar üzerinde ki antidiyabetik etkisi Adham ve Naqishbandi (2015), tarafından araştırılmıştır. Çalışma, 120 hasta üzerinde kök kapsüllerinin 12 haftalık periyot boyunca kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçta tip 2 diyabetli hastalarda kök kapsüllerin kan glukoz değerlerinin anlamlı düzeyde düşürdüğü görülmüştür.

Bir diğer çalışmada ise, alloksanın neden olduğu diyabetik farelerde, *R. ribes* kök ekstralarının, kan şekerini düşürmede önemli bir aktiviteye sahip olduğu, sağlıklı farelerde ise hipoglisemik etki göstermediği belirlenmiştir (Özbek ve ark., 2004).

*R. ribes*'in terapötik etkilerini ortaya koymaya yönelik çalışmaların çoğunda bitkinin antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan özellikleri değerlendirilmiştir. Bununla birlikte bitkinin antikanserojen özelliklerini değerlendiren çalışma sayısı çok azdır.

Sadari ve ark. (2009)'nın, yaptıkları çalışmada altı farklı kanser hücre hattı üzerinde (mide, meme, kolorektal, akciğer, melanom ve karaciğer) *R. ribes* 'in total etanol ekstresinin sitotoksitesi değerlendirilmiş olup, en anlamlı çıktığı SW742 kolorektal hücre hattında IC<sub>50</sub> değeri 11,2 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *R. ribes*'in antifungal aktiviteye sahip olduğu da belirlenmiştir. Antifungal MIC testi *C. albicans* üzerinde aday bitki ekstralarının sitotoksik etkisini ilkel/gelişmiş normal ökaryotik hücreler ve kanser hücreleri arasında karşılaştırmak için tamamlayıcı bir test olarak önerilmiştir.

İnsan promyelositik lösemi hücre hatları (HL-60) kullanılarak yapılan bir çalışmada da *R. ribes*'in kök ve gövdesinin etil asetat ekstralarının antioksidatif, sitotoksik ve apoptotik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada *R. ribes*'in doz ve zaman bağımlı olarak HL-60 hücrelerinin sağkalımını engellediği belirlenmiş olup, HL-60 hücrelerinin apoptozuna neden olduğu da flow sitometri yöntemiyle gösterilmiştir. Bu çalışmanın bulgularına göre *R. ribes*'in etil asetat kök ekstraları, gövde ekstralarına göre daha iyi antioksidan ve sitotoksik özellikler sergilemiş, sitotoksiteyi de apoptozu uyararak gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Uyar ve ark., 2014).

Son yıllardaki diğer bir çalışmada da *R. ribes*'in total metanol ekstresi 5 farklı kanser hücre hattına (T hücreli lösemi, Burkitt's lenfoma, mesane ve serviks kanser) uygulanmış ve hücreler üzerindeki sitotoksitesi değerlendirilmiştir. En fazla sitotoksite K562 (myeloid lösemi) hücre hattında belirlenmiş olup, bu hücre hattında elde edilen IC<sub>50</sub> değerri 115 µg/ml olarak llmřtir. Diğer hücre hatlarında ise büyüme üzerine anlamlı bir inhibitör etki görülmemiştir (Esmailbeig ve ark., 2015).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Sarf Malzemeler Ve Cihazlar

Deneyde kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1:** Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler

<b>Kullanılan Malzemeler</b>	<b>Marka</b>
<i>n</i> -hekzan	Sigma
Etil asetat	Sigma
Metanol	VWR
Folin & Ciocalteu's Phenol reagent	VWR
Gallik asit	Sigma
Alüminyum klorür	VWR
Potasyum asetat	VWR
DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)	Sigma
Quercetin	Sigma
5-FU (5-Florourasil)	Alfa Aesar
FBS (Fötal Sığır Serum)	Capricorn
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
Penisilin/Streptomisin	Capricorn
DMEM	Sigma
RPMI-1640	Sigma
L-glutamin	VWR
PBS	Capricorn
Cell scraper	Biologix
96-kuyucuklu hücre kültür kabı	Nest
6-kuyucuklu hücre kültür kabı	Nest
Cryovial tüp	Nest
Steril kültür kapları (flask)	Nest
Steril kültür kapları (petri)	Nest
Nükleaz-içermeyen steril su	Sigma

Deneyde kullanılan kitler Tablo 3.2’de verilmiştir.

**Tablo 3.2:** Çalışmada kullanılan kitler

<b>Kullanılan kitler</b>	<b>Marka</b>
XTT Hücre proliferasyon kiti	Biological Industries
TRIzol™ Reagent	VWR Amresco
First strand cDNA sentez kiti	Bio-Rad
Matrigel invasion chamber	Corning
DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System	Promega
Evagreen 2X qPCR Mastermix	abm (Applied Biological Materials)
DNase I (Rnase-free)	Thermo Fisher Scientific
Micro RNA primer set	Exiqon
Exilent SYBR green master mix	Exiqon
Annexin V and Dead Cell Assay Kit	Muse
Cell Cycle Assay Kit	Muse

Deneyde kullanılan cihazlar Tablo 3.3’de verilmiştir.

**Tablo 3.3:** Kullanılan cihazlar

<b>Kullanılan cihazlar</b>	<b>Marka</b>
Homojenizatör	Hidolpe
Rotavapor	Heidolph Laborota 4000
CO <sub>2</sub> ’li inkübatör	Thermo
Class II biyogüvenlik kabini (Laminar Flow)	Scanlaf
İnverted mikroskop	Olympus
Nanodrop spektro fotometre	Meastro
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich
Santrifüj	Hettich
Yatay jel elektroforezi	Cleaver
Otoklav	VWR
Buz makinası	Skotsman
-80 ultra düşük derin dondurucu	VWR
Su banyosu	Nüve
Aydınlık alan mikroskobu	Olympus
Thermal cycler	Peqlab
qRT-PCR	Biorad
Mikroplate eliza okuyucu	Biotek
Jel görüntüleme sistemi	Syngene
Otomatik pipet seti	Eppendorf
Buzdolabı	Arçelik
Derin dondurucu	Arçelik
Hassas terazi	KERN
pH-metre	WTW
Manyetik karıştırıcı	Hidolpe

### **3.2.Bitki Materyali**

Yenilebilir bir bitki olan tek yıllık *R. ribes* türüne ait genç kök ve gövde (sap) kısımları Van bölgesi Erek dağından 2016 yılı mayıs ayında toplanmıştır. Toplanan kısımlarda herhangi bir çevresel kirlenme ya da atık bir madde olmamasına dikkat

edilmiştir. *Rheum ribes* bitkisinin toplandığı yer, toplanma tarihi, teşhislerini yapan araştırmacılar ve herbaryum kayıtları ile ilgili bilgiler tablo halinde sunulmuştur (Tablo 3.4).

**Tablo 3.4:** Çalışma materyali ve kayıt bilgileri

<b>Bitki Adı</b>	<b>Familiya</b>	<b>Toplandığı Yer</b>	<b>Toplanma Tarihi</b>	<b>Teşhis Eden</b>	<b>Herbaryum</b>
<i>Rheum ribes</i> L.	Polygonaceae	Van-Erek Dağı	Mayıs-2016	Prof.Dr. Zeki AYTAÇ	GAZİ

### 3.3. Bitki Örneklerinin Kurutulması ve Ekstraksiyonu

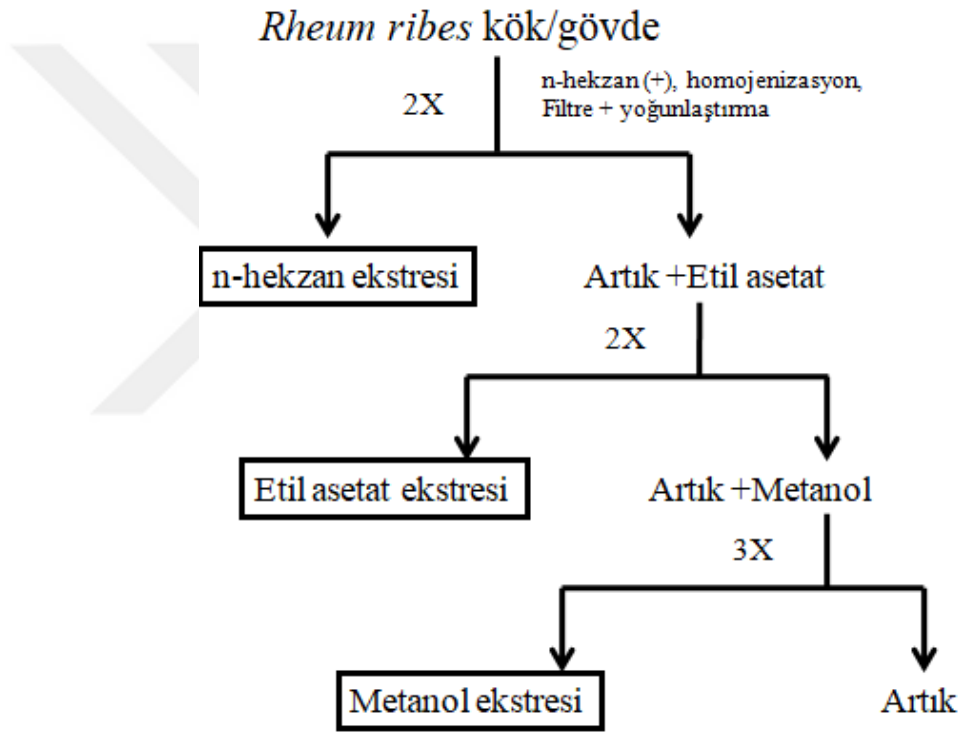
Bitkinin kök ve gövde (sap) kısımlarına ait örnekler, ayrı ayrı filtre kağıtları üzerinde hava akımının olduğu karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında, sık sık filtre kağıtları değiştirilerek kurutulmuştur. Kurutulan bitki kısımları ayrı ayrı sanayi tipi blender'dan geçirilerek toz haline getirilmiştir. Toz halindeki örnekler için sırasıyla polariteleri non-polar'dan polara doğru üç ayrı solvent (*n*-hekzan, etil asetat, metanol) ile fraksiyonlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

*R. ribes*'in toz haline getirilmiş 338 g'lık kök ve 185.03 g'lık gövde kısmının üzerine 2.5 lt *n*-hekzan ilave edilmiş ve oda sıcaklığında homojenizatör kullanılarak ekstreler elde edilmiştir. Elde edilen ekstreler pilili süzgeç kağıdı kullanılarak süzölmüş; çözücüler kontrollü sıcaklık ve düşük basınç ile rotavoporda uzaklaştırılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra süzgecin üstünde kalan bitki kısımları yeni bir kaba alınarak üzerine etil asetat solventi ilave edilmiştir. İlk solventteki aşamalar bu solventde de tekrarlanmış olup, etil asetat muamelesi iki kez gerçekleştirilmiştir. Etil asetat ekstrelerinin eldesinden sonra süzgecin üzerinde kalan bitki kısımları başka bir kaba alınarak üzerine metanol solventi ilave edilmiştir. İşlem basamakları yine diğer solventlerin ekstrelerinin elde edilmesiyle aynı olup bu işlem *n*-hekzan ve etil asetat solventlerinden farklı olarak üç kez tekrarlanmıştır. *R. ribes*'e ait kök ve gövde kısımlarına ait ekstrelerin verimleri aşağıdaki formül ile hesaplanmış olup Tablo 3.5'de gösterilmiştir.

$$\% \text{ Verim} = \frac{\text{Kuru ekstre ağırlığı}}{\text{Kuru bitki ağırlığı}} \times 100$$

**Tablo 3.5:** *Rheum ribes*'in kök ve gövde ekstralarının % verimleri

Bitki Materyali	Kullanılan solventler	Ekstrelerin Adları	Ekstre Verimleri
<i>R. ribes</i> ↙ ↘ Kök Gövde	n-hekzan	Kök-n-hekzan	% 0.488
		Gövde-n-hekzan	% 0.733
	Etil asetat	Kök-Etil asetat	% 0.21
		Gövde-Etil asetat	% 0.176
	Metanol	Kök-Metanol	% 29.25
		Gövde-Metanol	% 11.82



**Şekil 3.1:** *R. ribes*'in kök ve gövdesine ait kısımlarının ekstraksiyon işlemi

### 3.4. Ekstreler Üzerinde Gerçekleştirilen Fitokimyasal Analizler

#### 3.4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Elde edilen tüm ekstraların toplam fenolik içeriği Singleton ve ark. (1999)'nın, uyguladığı metotta bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde toplam çözünebilen fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) aracılığı ile hesaplanmış olup standart madde olarak 'gallik asit' kullanılmıştır.



Yöntemin prensibi, fenolik bileşiklerin FCR çözeltisi ile mavi renk oluşturması esasına dayanmaktadır.

Bitkiye ait tüm ekstrelerin her birinden 500 µg/ml konsantrasyonda stok solüsyonları hazırlanmıştır. Örneklerin konsantrasyon aralıkları ise 50-100-200-300-400-500 µg/ml olacak şekilde dilüe edilmiştir. Herbir örneğin konsantrasyonuna göre hacmini 4 ml'ye tamamlamak için distile su ilave edilmiştir. Ardından 250 µl FCR çözeltisinden ilave edilerek yaklaşık 5 dk beklenmiştir. Sonrasında Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden 750 µl ilave edilip iyice karışması sağlanmıştır. Son hacmin 10 ml olması içinde üzerine 5 ml distile su ilave edilip kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. 25 °C'de karanlık bir ortamda 24 saat bekletildikten sonra UV spektrofotometrede 760 nm dalga boyunda okutulmuştur. Gallik asit standardını hazırlamak için 0.1 g gallik asit tartılarak 10 ml metanol içinde çözdürülmüştür. Örneklerle aynı adımlar takip edilerek spektrofotometrede ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı sonuçları gallik asit üzerinden hesaplanmış, bu amaçla farklı konsantrasyon aralığında (50-100-200-300-400-500-600-700-1000 µg/ml) hazırlanan standart çözeltilerden gallik asit eğrisi çizilmiştir.

#### **3.4.2. Toplam Flavonoit Madde Miktarının Belirlenmesi**

Doğal antioksidanlar içerisinde önemli bir yer teşkil eden flavonoitler bitkilerde bol miktarda bulunmaktadır. Flavonoitlerin bitkiler içerisindeki miktarının belirlenmesi amacı ile basit bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde hazırlanan ekstrelerin toplam flavonoit içerikleri kersetine eşdeğer olarak alüminyum klorür metodu ile bulunmaktadır (Moreno ve ark., 2000). Standart olarak kersetin kullanılmaktadır. Bu yöntemin prensibi AlCl<sub>3</sub>'in flavon ve flavanollerin bazı keto ve OH gruplarıyla asit kararlı kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır.

Stok kersetin hazırlama: 10 mg kersetin 100 ml metanol içerisinde çözdürülmüştür (0.1 mg/ml). Kersetin'e ait 6 farklı dilüsyon serisi (6.25-12.5-25-50-80-100 µg/m) hazırlanmıştır. Deneyde kullanılacak tüm solüsyonlar whatman filtre kağıdından geçirilmiştir. Her bir kersetin dilüsyonunun yer aldığı test tüpünün üzerine 1.5 ml metanol, 0.1 ml AlCl<sub>3</sub>, 0.1 ml KH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K (potasyum asetat), 2.8 ml dH<sub>2</sub>O ve 0.05 ml kersetin dilüsyonu eklenmiştir.

Her bir ekstreye ait stok konsantrasyonu 1000 µg /ml olacak şekilde 10 ml metanolde çözdürülerek hazırlanmıştır. Her bir ekstre için 6 farklı deney tüpünde 6

farklı konsantrasyon çalışılmıştır. Deney tüpleri içerisine ilave edilen kimyasalların miktarları yukarıda belirtilen quercetin dilüsyonlarıyla aynıdır. Yalnızca tüplerin içerisine her bir quercetin dilüsyonu yerine her bir ekstrenin farklı konsantrasyonu ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 40 dakika bekletildikten sonra her bir tüpün absorbansı 415 nm dalga boyunda olacak şekilde UV spektrometrede okutulmuştur. Total flavonoit konsantrasyonu quercetin standardı kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.4.3. Kromatografik Analiz

Çalışmamızda *R. ribes* kök metanol ekstresinin biyoaktif madde içeriğini belirleyebilmek için Agilent Dual Jet Stream elektrosprey iyonizasyon (Dual AJS ESI) arayüzü ile donatılmış bir Agilent 6550 iFunnel yüksek çözünürlüklü Kesin Kütle QTOF-MS (LC-ESI-QTOF-MS) cihazı kullanılmıştır. Kütle spektrometresine (QTOF) bağlı sıvı kromatografisi (LC), geniş bir dinamik aralıkta mükemmel bir kütle doğruluğu sağlamaktadır. Ayrıca örnek içindeki bilinmeyen metabolitlerin moleküler formülünü yüksek güvenilirlikte ortaya koyabildiği için gerçek izotop paterninin ölçümlerini de sağlayabilmektedir. Kütle spektrometresi yöntemi ile örnek içerisinde pikogram düzeyindeki çok düşük yoğunluklu biyoaktif maddelerin bile analizi gerçekleştirilebilmektedir (Nuengchamng ve ark., 2016).

Bu cihaz aynı zamanda standart bileşikler mevcut olmadığında yapısal onaylama aracı olarak tandem MS'yi de gerçekleştirmektedir. Ayrıca, QTOF, özellikle herbir bileşiğin m/z (kütle/yük)'sini yeniden doğrulamak için iyon filtrelemesini mümkün kılan, üst üste binen pikler olduğunda, ekstra iyon kromatogramı (EIC) modunu kullanarak yüksek seçicilik sağlamaktadır (Dechayont ve ark 2017). Kütle spektrumları, 50-1700 m/z'lik bir kütle aralığında Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ile daha fazla veri elde etmek için hem negatif hem pozitif iyon modlarında kaydedilmiştir.

Kimyasal bileşenler, ESI-QTOF-MS / MS spektrumları ve fragmentasyon patternleri ile tanımlanmıştır. Elde edilen veriler "METLIN" (Metabolite Personal Compound Database (PCD, Agilent Technologies)), Chempider ve Massbank gibi kütüphaneler kullanılarak karşılaştırılmıştır. Moleküler formüller Agilent "MassHunter Qualitative Analysis" yazılımı B 06.00 tarafından oluşturulmuştur.

### 3.5. Biyolojik Aktivite Analizleri

#### 3.5.1. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

Günümüzde doğal ekstraların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biride DPPH üzerinden serbest radikal süpürme aktivitesidir. DPPH ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. Yöntem ekstraların proton transferi yeteneğine bağlı olarak, mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımındaki absorbansın düşmesi ve DPPH çözeltisinin renginin sarıya doğru açılması yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir (Blois, 1958). *R. ribes*'in kök ve gövde kısımlarına ait ekstraların DPPH üzerinden serbest radikal süpürme aktivitesinin belirlenmesi amacı ile 10 mg/ml'lik stok ekstre çözeltisinin metanolla seyreltilerek, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml, 250 µg/ml, ve 300 µg/ml'lik konsantrasyonları hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak da L-askorbik asit kullanılmıştır. Antioksidan aktivitesi belirlenmek istenen her bir ekstrenin 6 farklı dozu için hazırlanan her bir örnek ayrı tüplerde DPPH çözeltisiyle karıştırıldıktan sonra karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve UV spektrometrede 517 nm dalga boyundaki absorbansları okunmuştur. Her bir ekstrenin %DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir:

$$\% \text{ DPPH Radikali Giderme Aktivitesi} = \frac{\text{Kontrolün Absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100$$

#### 3.5.2. Sitotoksite Analizi

##### 3.5.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullandığımız HT-29 hücre hattı Prof.Dr.Engin ULUKAYA ve HCT 116 hücre hattı ise Doç.Dr.Abdullah YALÇIN'ın laboratuvarlarından temin edilmiştir. Hücrelerin özellikleri Tablo 3.6'da gösterilmiştir. HT-29 hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 IU/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin ilave edilmiş RPMI-1640 besiyerinde, HCT 116 hücreleri ise %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 IU/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin ilave edilmiş yüksek glukozlu DMEM besiyeri içinde, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 37 °C'de kültüre edilerek çoğaltılmıştır.

**Tablo 3.6:** Çalışmada kullanılan hücre hatlarının özellikleri

<b>HT-29 (ATCC® HTB-38™)</b>	
<b>Organizma</b>	<i>Homo sapiens</i> , İnsan
<b>Doku</b>	Kolon
<b>Morfoloji</b>	Epitelyal
<b>Büyüme özelliği</b>	Yapışarak çoğalan (adherent)
<b>Hastalık</b>	Kolorektal adenokarsinom
<b>Cinsiyet</b>	Kadın
<b>Yaş</b>	44
<b>HCT 116 (ATCC® CCL-247™)</b>	
<b>Organizma</b>	<i>Homo sapiens</i> , İnsan
<b>Doku</b>	Kolon
<b>Morfoloji</b>	Epitelyal
<b>Büyüme özelliği</b>	Yapışarak çoğalan (adherent)
<b>Hastalık</b>	Kolorektal adenokarsinom
<b>Cinsiyet</b>	Erkek
<b>Yaş</b>	yetişkin

#### **3.5.2.1.1. Hücre Hatlarının Dondurulması**

Flaskta bulunan en az %80-90 konfluent hale gelmiş hücreler Tripsin-EDTA ile muamele edildikten sonra hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için 37 C<sup>0</sup>'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde yaklaşık 1-2 dk bekletilmiştir. Flask yüzeyinden tamamen kalktığı belirlenen hücreler 15 ml'lik falkon tüplere aktararak 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı uzaklatıldıktan sonra dondurulmak istenen hücre yoğunluğuna göre istenen sayıda cryotüpler hazırlanmıştır. Pelletin üzerine her bir cryotüp için 9:1 oranında besiyeri-DMSO dondurma ortamı ile resüspanse edildikten sonra tüplere dağıtılmıştır. Cryotüpler -20 C<sup>0</sup>'de 1-2 saat dondurulduktan sonra -80 C<sup>0</sup>'e kaldırılmıştır.

#### **3.5.2.1.2. Dondurulan Hücre Hatlarının Çözdürülmesi**

Derin dondurucuda (-80 C<sup>0</sup>) muhafaza edilen cryotüplerdeki hücrelerin DMSO'dan zarar görmemesi için hızlı bir şekilde çözdürülmesi gerekmektedir. Bu nedenle cryotüpler 37 C<sup>0</sup>'de su banyosunda çözdürülüp içerisine taze besiyeri ilave

edilmiştir. Hücreler pipet yardımıyla karıştırılarak 15 ml'lik falkon tüpe aktarılmıştır. Falkon tüpün üzerine bir miktar daha besiyeri ilave edilerek 1500 RPM'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pelletteki hücreler, uygun miktarda besiyeri ile resüspanse edilerek ekim kaplarına (flask/petri) aktarılmıştır. Flask/petirler 37°C' deki %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüv içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin ekiminden sonraki iki gün sonuna kadar hücrelerin yüzeye yapışmaları inverted mikroskop kullanılarak takip edilmiştir. Besiyerleri, hücreler %80-90 yoğunluğa ulaşana kadar iki günde bir değiştirilmiş ve istenilen yoğunluğa ulaşan hücrelerin canlılıklarının devamını sağlamak içinde pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

#### **3.5.2.1.3. Hücre Hatlarının Pasajlanması**

Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında, T75 flaskı içerisindeki eski besiyeri uzaklaştırılmıştır. Flaska 7.5 ml PBS (phosphate buffered saline) ilave edilerek hücrelerin yıkanması sağlanmıştır. Hücrelerin üzerine 2.5 ml tripsin-EDTA ilavesinin ardından 1-2 dakika etüvde bekletilmiştir. Inverted mikroskop altında hücrelerin tamamının yüzeyden kalktığından emin olduktan sonra flaskın üzerine tripsini inaktive etmek için taze serumlu besiyerinden 10 ml ilave edilmiştir. Karışımın pipet ile homojenizasyonu gerçekleştirildikten sonra falkon tüpe aktarılmıştır. 1500 RPM'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Kalan pelletin üzerine, bölünecek flask hacmi kadar taze besiyeri ilave edildikten sonra pipet yardımı ile hücreler iyice homojenize edilmiştir. İstenen hücre yoğunluğuna göre hücre-besiyeri karışımı flaslara bölünmüştür.

#### **3.5.2.1.4. Hücrelerin Sayımı**

Kültür ortamında yetiştirilen hücrelerin sayılarını ve canlılıklarını belirlemek amacıyla Tripan Mavisi Testi kullanılmıştır. Bunun için tripsinize edilen hücre süspansiyonu 1:1 oranında tripan mavisi boyasıyla karıştırılmıştır (100 µl hücre/100 µl boya). Boya ve hücre karışımından hemositometrenin her iki odacığına da ilave edilmiştir. Hücreler ışık mikroskobu altında sayıldıktan sonra her bir odacığın ortalaması alınarak, 1 ml için hücre sayısı aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

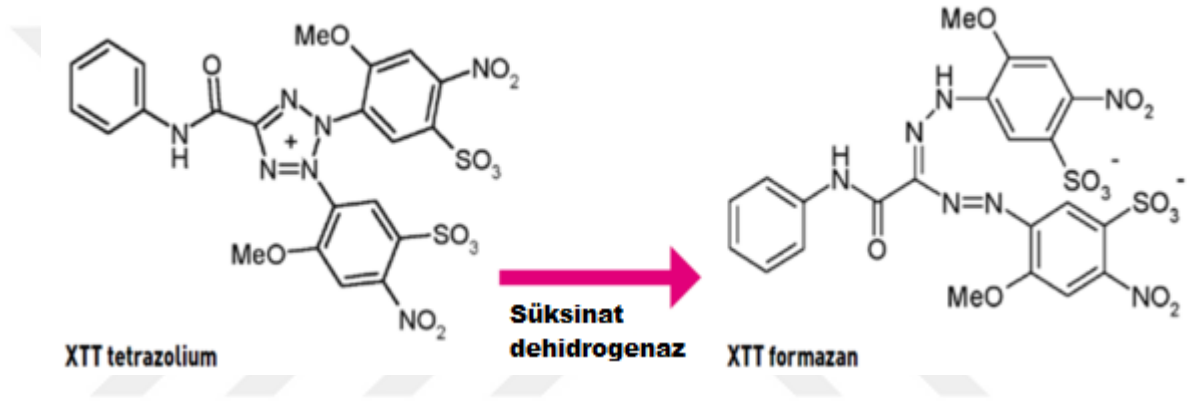
$$\text{Hücre sayısı/ml} = \text{Canlı hücre sayısı ortalaması} \times \text{DF} \times 10^4$$

$$\text{DF} = \text{Tripan mavisi ile yapılan seyreltme faktörü}$$

$$10^4 = \text{Hemositometre boyutlarından hesaplanan faktör}$$

### 3.5.2.1.5. XTT Testi

*R. ribes*'e ait 6 farklı ekstrenin her birinin HCT 116 ve HT-29 hücrelerin canlılığına etkisi, kolorimetrik tabanlı bir test olan XTT hücre proliferasyon kiti ile belirlenmiştir. Bu yöntem canlı hücrelerde suda çözünen sarı renkli XTT [2,3-bis(2-methoxy-4nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] tuzunun mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi aktivitesi ile turuncu renkli formazan kristallerine dönüşmesi esasına dayanır (Şekil 3.2). Bu kristaller suda kolaylıkla eriyebilir formda olmaları nedeniyle oluşan bu renk şiddeti eliza cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında kolorimetrik olarak ölçülür.



Şekil 3.2: XTT tetrazolium tuzunun, formazan kristallerine dönüşümü  
([https://www.applichem.com/fileadmin/Service/Downloads\\_en/Proliferation\\_e\\_Applications\\_No12\\_150dpi\\_Webversion.pdf](https://www.applichem.com/fileadmin/Service/Downloads_en/Proliferation_e_Applications_No12_150dpi_Webversion.pdf))

XTT analizi için HCT 116 ve HT-29 hücreleri 96 kuyuluk hücre kültürü plakalarına  $0.5 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde 100 µl hacimde ekilmiştir. Hücrelerin kültür kaplarına yapışması için %95 nem ve %5'lik CO<sub>2</sub> içeren etüv içerisinde 37 °C'de 24 saat bekletilmiştir. *R. ribes*'e ait her bir ekstrenin stok konsantrasyonu 2000 µg/ml olacak şekilde tartılarak %10 serumlu besiyeri içinde, 5-FU'nun ise stok konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde tartılarak %0,1'lik DMSO içinde çözdürüldükten sonra besiyeri ile istenilen hacime tamamlanmıştır. Uygulanan dozlar ön çalışma verilerine göre seçilmiştir. Yöntem protokolü üretici firmanın talimatlarına göre uygulanmıştır. Her bir ekstre için son konsantrasyonları 50 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1250 µg/ml, 1500 µg/ml olacak şekilde 8, 5-FU için ise 0.1 µ, 1 uM, 10 µM, 50 µM ve 100 µM olacak şekilde 5 farklı dozun yer aldığı tüpler %10 serumlu besiyerleri ile hazırlanmıştır. Hücrelerin

kuyucukların tabanına yapıştıkları inverted mikroskop altında kontrol edildikten sonra eski besiyerleri uzaklaştırılarak hazırlanan farklı doz konsantrasyonları doz grubu kuyularına ve kontrol kuyularına ise yalnızca serumlu besiyeri; zamana bağlı etkinin belirlenmesi için de 24, 48 ve 72. saat (her doz tüm saatler için 3 tekrar kuyusu olacak şekilde) boyunca 100 µl hacimde hücrelere uygulanmıştır. Dozların istenilen saatlerde muamele edilmesinin ardından eski besiyerleri uzaklaştırılarak her bir kuyu için 100 ul besiyeri üzerine 50 µl XTT reaksiyon solüsyonu (49 µl XTT reagent solüsyonuna 1ul aktivasyon solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır) ilave edilmiştir. Uygulamadan 4 saat sonra kontrol ve doz kuyularına ait absorbans değerleri (OD) mikroparka okuyucu ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunmuştur. Her bir doz 3 tekrarlı çalışılmıştır. Tüm konsantrasyonların % canlılık ve sitotoksite değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = [\text{Doz grubunun absorbansı (OD)}/\text{Kontrol grubunun absorbansı (OD)}] \times 100$$

$$\% \text{ Sitotoksite} = [1 - (\text{Doz grubunun absorbansı}/\text{Kontrol grubunun absorbansı})] \times 100$$

Elde edilen sonuçlara göre, ekstrelerin son konsantrasyonlara karşı % hücre canlılığı grafiği çizilerek 24, 48 ve 72 saatlik IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir.

### **3.6. Kombinasyon Analizi (İzobologram Analizi)**

İlaç kombinasyonları AIDS, kanser gibi kötü prognoz sergileyen hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Kombine tedavilerde sinerjik terapötik etkinin sağlanması, doz ve buna bağlı toksisitenin azaltılması ve ilaç direnci uyarımının minimum düzeye indirilmesi hedeflenmektedir. Kombine tedavilerde uygulanan ajanlar ya da ilaçlar ile sinerjik etki, additif etki ve antagonistik etki sağlanabilmektedir. Sinerjik etki, tedavi amaçlı kombine uygulanan ajanların toplam etkisinin, herbir ajanın tek başına gösterdiği etkiden daha fazla olması; additif etki, kullanılan ajanların birleşik etkisi, tek başına verilen her bir maddenin etkisinin toplamına eşit olması; antagonistik etki ise kombine uygulanan ajanların toplam etkisinin, her bir ajanın tek başına kullanıldığında gösterdiği etkiden daha az olmasıdır (Chou, 2010).

İlaç kombinasyonu çalışmalarında uygulanan Chou-Talalay yöntemi medyan etki denkleminde dayanmaktadır. Bu yöntem ajanların belirli bir doz seviyesinde ki sinerjizm ve/veya antagonizm etkisini bilgisayar programı üzerinde gösteren algoritmaları oluşturur. Bu çalışmada kullanılan ilaç kombinasyonunun etkileri, Chou-Talalay'ın çoklu ilaç etkisi denkleminde dayanan kombinasyon indeksi (CI) kullanılarak değerlendirildi.  $CI < 1$  sinerjistik etkiyi,  $CI = 1$  additif etkiyi,  $CI > 1$  ise antagonistik etkiyi tanımlamaktadır (Tablo 3.7).

**Tablo 3.7:** Kombinasyon indeksi ve etki tablosu (Chou 2010)

<b>Kombinasyon indeksi (CI)</b>	<b>Etki</b>
<b>&lt;0,1</b>	Çok güçlü sinerjizm
<b>0,1-0,3</b>	Güçlü sinerjizm
<b>0,3-0,7</b>	Sinerjizm
<b>0,7-0,85</b>	Orta sinerjizm
<b>0,85-0,9</b>	Hafif sinerjizm
<b>0,9-1,1</b>	Additif etki
<b>1,1-1,2</b>	Hafif antagonizm
<b>1,2-1,45</b>	Orta antagonizm
<b>1,45-3,3</b>	Antagonizm
<b>3,3-10</b>	Güçlü antagonizm
<b>&gt;10</b>	Çok güçlü antagonizm

*R. ribes*'e ait kök-metanol ekstresi ve 5-FU'nun sinerjik etkisini belirlemek için bu iki ajanın  $IC_{50}$  oranları ( $IC_{50-5-FU}/IC_{50-Kök-metanol}$ ) kombinasyonun farklı kat dilüsyonları hücrelere 48 saat uygulanarak sitotoksite testi tekrar gerçekleştirilmiştir. Her doza karşılık gelen absorpsiyon değerleri ile formül kullanılarak hesaplanan sitotoksite yüzdeleri Calcsyn 2.0 programına girilmiştir. Uygulanan her ajanın ve doz-etki tablosu ve eğrisi program tarafından çizilmiştir. Program tarafından CI değerleri hesaplanmıştır.

Bu aşamadan sonraki çalışmalara kombinasyon dozu olarak 5-FU + *R. ribes* kök-metanol ekstresinin her iki hücre hattında hafif sinerjizm gösterdiği belirlenen 48. saatteki dozları ile devam edilmiştir.



### **3.7. miRNA Ekspresyon Analizi**

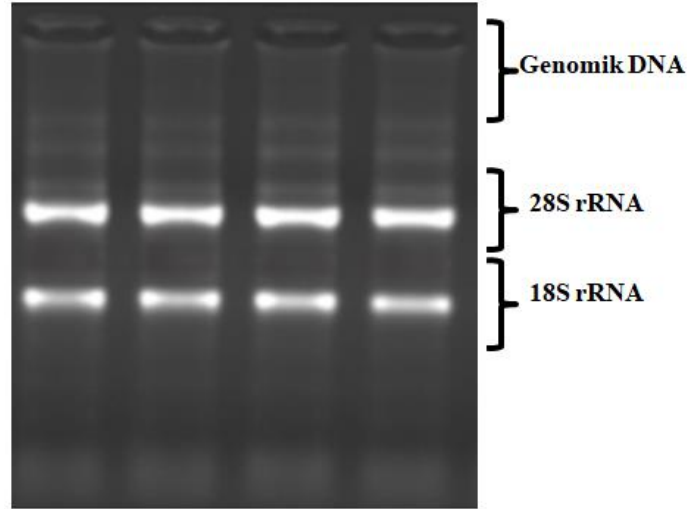
#### **3.7.1. Total RNA İzolasyonu**

miRNA ekspresyon analizi için hücrelerden RNA izolasyonu işlemi, trizol reagent ile gerçekleştirilmiştir. 6'lık hücre plakalarına doz ve kontrol grupları oluşturulacak şekilde her bir kuyuya 500.000 hücre ekilerek 24 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında HCT 116 ve HT-29 hücrelerine KM (*R.ribes*-kök metanol ekstresi), 5-FU ve Kombine 5-FU+KM'nin 48. Saatteki etkin dozları uygulanmıştır. Bu sürenin sonunda her bir kuyucuğa 500 µl Trizol konularak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında kuyucuklar scraper ile kazandıktan sonra ependorflara aktarılmıştır. Ependorfun üzerine 100 µl kloroform konulduktan sonra 15 sn vorteklenerek 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında 4 C<sup>0</sup>'de 12000 RPM'de 15 dk santrifüj edildikten sonra oluşan üstteki faz pipet yardımıyla başka bir tüpe aktarılmıştır. Aktarılan fazın üzerine 500 µl izopropanol ilave edildikten sonra 4 C<sup>0</sup>'de 12000 RPM'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine 500 µl %70'lik etanol ilave edildikten sonra pellet pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir. Ardından 12000 RPM'de 10 dk santrifüj edilerek oluşan süpernatantın tamamı uzaklaştırılmış ve kalan etanol havada kısa bir süre tutularak tamamen kurutulmuştur. Sonrasında pelletin yaklaşık 30 µl nükleaz içermeyen su içerisinde çözünmesi sağlanmıştır.

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonlarının ve kalitelerinin belirlenmesi amacıyla herbir örnek RNA'sından 1 µl alınarak nanodrop cihazında (Maestrogen, ABD) 230, 260, ve 280 nm UV dalga boylarında ölçüldükten sonra -80 C<sup>0</sup>'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.7.2. İzole Edilen RNA'ların Jelde Yürütülmesi**

Bu basamak için öncesinde %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. İzole edilen her bir örneğin RNA'sından 1 µg alınarak, 6X'lik yükleme boyasıyla karıştırıldıktan sonra jele yüklenerek yatay jel elektroforeziyle yürütülmüştür. RNA bantları UV jel görüntüleme cihazında gözlenmiştir (Şekil3.3).



Şekil 3.3: İzole edilen RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

### 3.7.3. Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması İçin DNase Uygulaması

İzole edilen RNA örneklerinden olası DNA kontaminasyonunu uzaklaştırmak için DNase-I enzim muamelesi üretici firmanın (Thermo Scientific, ABD) talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.8: DNase I uygulaması komponentleri

RNA	1 µg
10X reaksiyon buffer (MgCl <sub>2</sub> )	1 µl
DNase I enzimi (RNase-free)	1 µl
Nükleaz-free su	10 µl'ye tamamlanmıştır

Tablo 3.8'de verilen komponentler RNase içermeyen bir tüpün içerisinde birleştirildikten sonra 37 C<sup>0</sup>'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 50mM EDTA solüsyonundan 1 µl tüpe eklenerek 65 C<sup>0</sup>'de 10 dakika inkübe edilmiştir.

miRNA ekspresyon analizi için üretici firma başlangıç RNA miktarını 5 ng/µl olarak belirlemiştir. Elde edilen RNA'nın DNase uygulamasının ardından nanodropta (Maestrogen, ABD) ölçümleri gerçekleştirilmiştir. 5 ng/µl'lik son konsantrasyon ise nükleaz içermeyen su ile hazırlanmıştır.

miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR protokolü iki aşamadan oluşmaktadır:

1. First Strand cDNA sentezi
2. RT-qPCR(Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu) amplifikasyonu

#### 3.7.4. cDNA Sentezi

miRNA'dan cDNA sentezi işlemi, miRCURY Universal cDNA Synthesis Kit'in prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre, ilk önce her bir RNA örneğinin konsantrasyonu 5 ng/µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Tablo 3.9'da belirtilen miktarlarda ki komponentler nükleaz içermeyen pcr tüpünde buz üzerinde biraraya getirildikten sonra 5 ng/ml olarak hazırlanmış RNA örnekleri ilave edilmiştir. Tamamlanan PCR karışımları thermal cyler cihazında 42 C<sup>0</sup>'de 60 dakikanın ardından 95°C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve hemen sonrasında 4 C<sup>0</sup>'ye soğutulularak cDNA eldesi gerçekleştirilmiştir. RT-qPCR amplifikasyonu basamağında kullanılmak üzere her bir cDNA örneği 1/80 oranında nükleaz içermeyen su ile dilue edilmiştir.

**Tablo 3.9:** miRNA'dan cDNA sentezi için gerekli olan komponentler

<b>Komponentler</b>	<b>Hacim/reaksiyon</b>
5x Reaction buffer	2 µl
Nükleaz içermeyen su	5 µl
Enzim mix	1 µl
Kalıp total RNA	2 µl
Toplam	10 µl

#### 3.7.5. RT-qPCR

Sentezlenen cDNA'lar kolorektal kanserin oluşumunda ve prognozunda, hücre döngüsü, apoptoz, ve metastaz ile ilgili sinyal yollarının düzenlenmesinde rol oynadığı belirlenen miR-200 ailesine ait 4 miRNA'nın ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Çalışılan miRNA'lar ve erişim numaraları Tablo 3.10'da gösterilmiştir. Bu basamağın çalışılmasında sybergreen ile işaretleme temelli ExiLENT SYBR® Green master mix kullanılmıştır. RT-qPCR reaksiyonu BioRad

CFX Connect cihazında gerçekleştirilmiştir. Uygulanan RT-PCR komponentleri ve PCR koşulları Tablo 3.11 ve Tablo 3.12’de verilmiştir.

**Tablo 3.10:**Çalışılan miRNA’lar ve erişim numaraları

miRNA sanger ID	miRBase erişim numarası
hsa-miR-200a	MIMAT0000682
hsa-miR-200b	MIMAT0000318
hsa-miR-200c	MIMAT0000617
hsa-miR-141	MIMAT0000432

**Tablo 3.11:** miRNA analizleri için gerekli olan PCR komponentleri

Komponentler	Hacim/reaksiyon
PCR mastermix	5 µl
PCR primer set	1 µl
Dilue cDNA kalıbı (1/80)	4 µl
Toplam	10 µl

**Tablo 3.12:** miRNA’ların analizi için RT-qPCR koşulları

Enzim aktivasyon basamağı / Denatürasyon	95 C <sup>0</sup> ,de 10 dk
Amplifikasyon basamağı (40 döngü)	
-Denatürasyon	95 C <sup>0</sup> ,de 10 sn
-Bağlanma	60 C <sup>0</sup> ,de 1 dk
Erime eğrisi analiz basamağı	65- 95 (0,2 C <sup>0</sup> )

### 3.8. Gen Ekspresyon Analizi

#### 3.8.1. cDNA Sentezi

miRtarbase, miRWalk veri tabanları ve literatür araştırmalarına göre miR-200 ailesinin hedefi olarak belirlediğimiz 13 gen ve bu hedeflerle ilişkili olabileceğini düşündüğümüz 19 genin ekspresyon analizi için, DNase ile muamele edilmiş total RNA’ların cDNA sentezleri, iScript<sup>TM</sup> cDNA Sentez Kiti (BIO-RAD, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir örneğin cDNA sentezi için RNase

içermeyen PCR tüplerine Tablo 3.13'teki komponentler ilave edilip karıştırıldıktan sonra hafif bir spin işlemi gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.13:** cDNA sentezi için kullanılan komponentler

5X iScript reaksiyon mix	4 µl
iScript reverse transkriptaz	1 µl
RNA	1 µg
Nukleaz free su	20 µl'ye tamamlanmıştır

Hazırlanan reaksiyon karışımları thermal cycler cihazında 25 C<sup>0</sup>'de 5 dakika, 42°C'de 30 dakika, 85°C'de de 5 dakika inkübe edildikten sonra cDNA'lar elde edilmiştir. Elden edilen cDNA'lar çalışılncaya kadar -80 C<sup>0</sup>'de saklanmıştır.

### 3.8.2. RT-qPCR

Belirlenen genlerin mRNA ekspresyon analizi için doz ve kontrol gruplarından elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır. Tablo 3.16'da listelenen genlerin ekspresyonlarının kantitatif olarak belirlenmesi için Evagreen 2X qPCR Mastermix (Applied Biological Materials, Kanada) kullanılmıştır. RT-qPCR reaksiyonu ise Biorad CFX Connect cihazında gerçekleştirilmiştir. Analiz için uygulanan RT-qPCR komponentleri ve PCR koşulları Tablo 3.14 ve Tablo 3.15'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.14:**Hedef genlerin ekspresyon analizi için RT-qPCR komponentleri

Komponentler	Hacim/Reaksiyon	Son Konsantrasyon
EvaGreen 2X qPCR Mastermix	5 µl	1X
Primer Mix	0.3 µl	300 nM
Nukleaz-Free su	3.7 µl	
cDNA	1 µl	

**Tablo 3.15:** Belirlenen genlerin analizi için RT-qPCR Koşulları

Enzim aktivasyon basamağı	95 C <sup>0</sup> 'de 4 dk
Amplifikasyon basamağı (40 döngü)	
-Denatürasyon	95 C <sup>0</sup> 'de 30 sn
-Bağlanma	60 C <sup>0</sup> 'de 30 sn
-Uzama	72 C <sup>0</sup> 'de 30 sn
Denatürasyon	95 C <sup>0</sup> 'de 10 sn
Erime eğrisi analiz basamağı	65- 95 (0,2 C <sup>0</sup> )

Ekspresyon seviyeleri değerlendirilen genlerin ve referans olarak kullanılan housekeeping genlerin primer dizileri Tablo 3.16'da gösterilmiştir.

**Tablo 3.16:** RT-qPCR analizinde kullanılan genlerin primer dizileri

<b>miR-200 Ailesinin Hedef Genleri</b>		
<b>Gen Adı</b>	<b>Primer Dizisi</b>	<b>Amplikon Büyüklüğü (bp)</b>
<b>BCL-2</b>	F:5-GTGGATGACTGAGTACCTGAAC-3 R:5-GAGACAGCCAGGAGAAATCAA-3	125
<b>TP53</b>	F:5-GAGATGTTCCGAGAGCTGAATG-3 R:5-TTTATGGCGGGAGGTAGACT-3	129
<b>XIAP</b>	F:5-GAGGAACCCTGCCATGTATAG-3 R:5-GTGTAGTAGAGTCCAGCACTTG-3	111
<b>FAP1</b>	F:5-GCCTCAGAGCCAACCTATTAAG-3 R:5-CAGCACAGTCCGAACAGAAA-3	103
<b>GATA4</b>	F:5-GAAGGCAGAGAGTGTGTCAA-3 R:5-GCCGTTTCATCTTGTGGTAGA-3	111
<b>CDK6</b>	F:5-ATGCCGCTCTCCACCATC-3 R:5-GTGACACTGTGCACACATCAAA-3	100
<b>CDKN1B</b>	F: 5-GAGCAATGCGCAGGAATAAG-3 R: 5-TCCACAGAACCGGCATTT-3	119
<b>RND3</b>	F: 5-GACACTTCGGGTTCTCCTTAC-3 R: 5-AGGGTCTCTGGTCTACTGATG-3	101
<b>ZEB1</b>	F: 5-GGCTCCTATAGCTCACACATAAG-3 R: 5-TGCTGAAAGAGACGGTGAAG-3	114
<b>CDH1</b>	F: 5-CTTCTGCTGATCCTGTCTGATG-3 R: 5-TGCTGTGAAGGGAGATGTATTG-3	144
<b>TGFB1</b>	F: 5-CGTGGAGCTGTACCAGAAATAC-3 R: 5-CTAAGGCGAAAGCCCTCAAT-3	159
<b>SMAD2</b>	F: 5-GGGACTGAGTACACCAAATACG-3 R: 5-TACCTGGAGACGACCATCAA-3	97

<b>SMAD3</b>	F: 5-CCTGAGTGAAGATGGAGAAACC-3 R: 5-GGCTGCAGGTCCAAGTTATTA-3	117
<b>miR-200 Ailesi Hedef Genleriyle İlişkili Apoptoz, Hücre Döngüsü, EMT ve TGF-<math>\beta</math> Yolağı Genleri</b>		
<b>BAX</b>	F:5-GGAGCTGCAGAGGATGATTG-3 R:5-GGCCTTGAGCACCAGTTT-3	151
<b>KASPAZ 3</b>	F:5-GAGCCATGGTGAAGAAGGAATA-3 R:5-TCAATGCCACAGTCCAGTTC-3	162
<b>KASPAZ 7</b>	F:5-CGAAACGGAACAGACAAAGATG-3 R:5-TTAAGAGGATGCAGGCCAAG-3	169
<b>KASPAZ 8</b>	F:5-GCCCAAACCTTCACAGCATTAG-3 R:5-GTGGTCCATGAGTTGGTAGATT-3	160
<b>KASPAZ 9</b>	F:5-CGACCTGACTGCCAAGAAA-3 R:5-CATCCATCTGTGCCGTAGAC-3	153
<b>CYCS</b>	F:5-GGAGAGGATACACTGATGGAGTA-3 R:5-GTCTGCCCTTCTTCTTCTT-3	102
<b>PPARG</b>	F:5-TGGGTGAAACTCTGGGAGAT-3 R:5-AAGTTGGTGGGCCAGAATG-3	127
<b>p21</b>	F:5-TGGACCTGTCACCTGTCTTGTA-3 R:5-AGAAATCTGTATGCTGGTCTG-3	120
<b>Rel A</b>	F:5-CTGCTTCCAGGTGACAGTG-3 R:5-TTGAGCTCGGCAGTGTTG-3	108
<b>CD95</b>	F:5-CTTTTCGTGAGCTCGTCTCTGA-3 R:5-CTCCCCAGAAGCGTCTTTGA	69
<b>CCND1</b>	F:5-GTTCGTGGCCTCTAAGATGAA-3 R:5-AGGTTCCACTTGAGCTTGTT-3	135
<b>CCND2</b>	F: 5-GAAGGACATCCAACCCTACAT-3 R: 5-AGAAGTGCGAAGAAGAGGTC-3	155
<b>CCND3</b>	F: 5-GACCTGGCTGCTGTGATT-3 R: 5-AAGGTCTGGGCATGCTTT-3	104
<b>CDK4</b>	F:5-ATTGGTGTCCGGTGCCTATG-3 R:5-AACTGTGCTGATGGGAAGG-3	129
<b>CDH2</b>	F: 5-GACAGTTCCTGAGGGATCAAAG-3 R: 5-CGATTCTGTACCTCAACATCCC-3	104
<b>TGFBR1</b>	F: 5-GTTCCGTGAGGCAGAGATTTAT-3 R: 5-ACCAGAGCTGAGTCCAAGTA-3	107
<b>TGFBR2</b>	F: 5-GTCGCTTTGCTGAGGTCTATAA-3 R: 5-CTCTGTCTTCCAAGAGGCATAC-3	113
<b>SMAD4</b>	F: 5-TCCAGCATCCACCAAGTAATC-3 R: 5-GCAGTGCTGGTAGCATTAGA-3	91
<b>SMAD7</b>	F: 5-AGGCTGTGTTGCTGTGAA-3 R: 5-TCCATCGGGTATCTGGAGTAA-3	125
<b>Referans (Housekeeping) Genler</b>		
<b>GAPDH</b>	F: 5-GTCAACGGATTTGGTCGTATTG-3 R: 5-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3	106

<b>ACTB</b>	F: 5-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3 R: 5-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3	178
<b>CYPA</b>	F:5-TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG-3 R:3-CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3	126

### ***3.9. Apoptozun Belirlenmesi***

#### ***3.9.1. TUNEL Analizi***

Apoptoz, membran blebleri, nükleer-sitoplazmik büzüşme ve kromatin kondensasyonu gibi bazı morfolojik özellikler ile karakterize olan hücre içinde birçok önemli süreçte görev alan programlı hücre ölümüdür. Kolayca fagosite olan ve bir inflamatuvar yanıt üretmeden makrofajlar veya komşu hücreler tarafından sindirilen, membrana bağlı apoptotik cisimler içinde hücreler apoptoz fragmentasyonuna uğrarlar. Bu hücre ölümü, hücre şişmesi, kromatin topaklaşması, membran bütünlüğünün kaybı, hücre parçalanması ve lokal inflamasyon reaksiyonu oluşumu ile karakterize olan nekroz olarak bilinen hücre ölümü tipinin tersi özellikler sergilemektedir. Apoptotik hücrelerin çekirdeğinde gözlenen morfolojik değişiklikler, kısmen endojen endo-nükleazların etkisi ile DNA fragmentlerinin oluşmasından kaynaklanmaktadır. Tipik olarak, apoptotik hücrelerin DNA'sı, agaroz jel üzerinde 180-200 bp'lik fragmentler halinde gözlemlenir (Saraste, 2000, Doonan ve Cotter, 2008).

DeadEnd™ Kolorimetrik TUNEL Sistemi, tek hücre seviyesinde, apoptotik hücrelerin basit, doğru ve hızlı bir şekilde saptanmasını sağlamak için tasarlanmış, radyoaktif olmayan bir sistemdir. Sistem, birçok hücre tipinde apoptozun önemli bir biyokimyasal göstergesi olan nükleer DNA fragmentasyonunu ölçerek hem doku kesitlerinde hem de kültüre edilmiş hücrelerde apoptotik hücre ölümünü test etmek için kullanılabilir. Biotinlenmiş nükleotid, rekombinant Terminal Deoksinükleotidil Transferaz, (rTdT) enzimi kullanılarak çift iplikli DNA'da oluşan kırıklarda ki 3'-OH uçlarına bağlanır. Horseradish peroksidaz işaretli streptavidin (Streptavidin HRP), bu biyotinlenmiş nükleotitlere bağlanır ve sonrasında peroksidaz substratı, hidrojen peroksit, kararlı kromojen, diaminobenzidin (DAM) kullanılarak apoptotik hücreler daha koyu renkte tespit edilebilmektedir.



## Gerekli Solüsyonların Hazırlanışı

**%4'lük Metanolsüz Formaldehit:** %10'luk stok formaldehit'ten 100 ml alınarak, 150 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözdürülmüştür.

**%0.2'lik Triton X-100:** Öncelikle %10'luk stok hazırlanmıştır. Bunun için; 10 ml triton X-100, 90 ml PBS içinde homojenize edilmiştir. Sonrasında 5 ml %10'luk stoktan alınarak, 250 ml'ye PBS ile tamamlanmıştır.

**%0.3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 2.5 ml alınarak, 250 ml'ye PBS ile tamamlanmıştır.

### Yöntem:

1.  $5 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6'lık kuyucuklara ekilen kontrol ve apoptozu uyarılmış hücreler, tripsinize edilerek santrifüj edilmiştir.
2. Santrifüjün ardından hücreler PBS ile bir kez yıkandıktan sonra resüspanse edilerek Poly-L-Lysine kaplı lamlara damlatılmıştır.
3. Fiksasyondan önce laminar kabinde yaklaşık 15 dakika boyunca kurutulmuştur.
4. Lam üzerindeki hücreler şale içinde ki %4'lük metanolsüz formaldehit solüsyonu içine daldırılarak oda sıcaklığında 25 dakika süreyle fikse edilmiştir.
5. Fiksasyonun ardından lamlar, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca taze PBS'e daldırılarak yıkanmıştır (Bu basamak 2 kez tekrar edilmiştir).
6. Lamlar, hücreleri geçirgen hale getirmek için %0.2 Triton X-100 solüsyonda oda sıcaklığında 5 dakika boyunca bekletilmiştir.
7. Lamlar, taze PBS'te oda sıcaklığında 5 dakika tutularak durulanmıştır (Bu basamak 2 kez tekrar edilmiştir).
8. Lamların üzerindeki sıvı faz uzaklaştırılmıştır.
9. Lamlar 100 µl equilibration buffer ile kaplanarak 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
10. 9. Basamak esnasında biotinlenmiş nükleotid mix'i çözdürülmüştür. Tüm reaksiyonlar için yeterli rTdT karışımı hazırlandıktan sonra buz içinde tutulmuştur. Her bir lam için 100 µl 'lik rTdT (Tablo 3.17) reaksiyon miksi kullanılmıştır.

**Tablo 3.17:** rTdT Reaksiyon Miksinin Hazırlanışı

<b>Tampon Komponentleri</b>	<b>Hacimler (100 ul'lik her bir reaksiyon için)</b>
Equilibration Buffer	98 µl
Biotinlenmiş Nucleotid Mix 1µl	1µl
rTdT Enzyme*	1µl

\* Kontrol örnekleri için rTdT enzimi yerine 1 ul deiyonize su ilave edilmiştir.

11. Equilibration Buffer ile muamele edilmiş alanların çevresi kurutma kağıdı ile kurutulduktan sonra lam üzerindeki bölümlere 100 µl'lik rTdT reaksiyon miksi ilave edilmiştir. Fakat bu alanların kurummasına izin verilmemiştir.
12. Reaktifin lam üzerinde eşit olarak dağılımını sağlamak için bu bölümler plastik lameller ile kapatılmıştır.
13. Lamlar nemlendirilmiş bir kap içerisinde 37 C<sup>0</sup>'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
14. 20X SCC solüsyonu 1:10 oranında olacak şekilde deiyonize su ile seyreltilmiştir. Plastik lameller çıkarıldıktan sonra lamlar, oda sıcaklığındaki 20X SCC solüsyonu içerisinde 15 dakika tutularak reaksiyon sonlandırılmıştır.
15. Lamlar, taze PBS'te oda sıcaklığında 5 dakika tutularak durulanmıştır (Bu basamak 2 kez tekrar edilmiştir).
16. Lamlar, endojen peroksidazları bloklamak için %0.3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda oda sıcaklığında 3-5 dakika tutulmuştur.
17. Lamlar, taze PBS'te oda sıcaklığında 5 dakika tutularak yıkanmıştır (Bu basamak 2 kez tekrar edilmiştir).
18. Streptavidin HRP solüsyonu, 1/500 olacak şekilde PBS ile sulandırılmıştır. Her bir lam üzerine 100 µl hacim olacak şekilde streptavidin HRP solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
19. Lamlar oda sıcaklığında 5 dakika boyunca PBS'te yıkanmıştır (Bu basamak 2 kez tekrar edilmiştir).
20. DAB (Deoksiaminobenzidin) komponentleri kullanılmadan hemen önce hazırlanmıştır. Bunun için; 950 µl dH<sub>2</sub>O üzerine 50 µl DAB substrat 20X buffer eklenmiştir. Sonrasında 50 µl DAB 20X Chromogen ve 50µl of Hydrogen Peroxide 20X ilave edilmiştir (Bu solüsyon ışıktan uzak tutulmuş ve 30 dakika içinde kullanılmıştır).

21. Her bir lama DAB solüsyonundan 100 µl ilave edildikten sonra kahverengi arka plan oluşana kadar (yaklaşık 10 dk) beklenmiştir.
22. Lamlar, dH<sub>2</sub>O ile birkaç kez yıkanmıştır.
23. Lamlar %100'lük gliserol ile kalıcı preparat haline getirilerek ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

### 3.9.2. *Anneksin V Analizi*

Apoptozun erken evrelerinde, hücre yüzeyinde değişiklikler meydana gelir. Plazma membranı değişikliklerinden biri, membranının iç tarafından dış yüzüne fosfatidilserin (PS) translokasyonunun gerçekleşmesidir. Anneksin V, PS için yüksek afiniteye sahip, Ca<sup>+</sup> bağımlı 35-36 kDa büyüklüğünde fosfolipid bağlayıcı bir proteindir. Dolayısıyla bu protein, apoptotik hücrelerin flow sitometri yöntemi ile belirlenmesinde PS'e spesifik olarak kullanılabilir. PS translokasyonu, apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün ileri aşamalarına eşlik eden zar bütünlüğü kaybından önce gerçekleşir. Bu nedenle Anneksin V boyası, erken ve geç apoptotik hücreleri belirlemek için propidium iyodür (PI) ya da 7AAD (7-aminoactinomycin D) gibi vital bir boya ile birlikte kullanılmaktadır. PI/7AAD membranı bozulmamış canlı hücrelere giremezken, ölü ve hasarlı hücrelerin membranları bu boyalara karşı geçirgendir (Zimmermann ve Meyer 2011, Zemruski ve ark 2012).

Çalışmada kullanılan MUSE Annexin V & Dead Cell Kiti, hem adherent hem de süspanse hücre hatlarında hücre ölümünün, canlılığının, hücrenin erken ve geç apoptozunun Muse™ Cell Analyzer'da kantitatif analizini sağlamaktadır. Yazılım; canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücreler için konsantrasyon (hücre/mL) ve yüzdeleri hakkında bilgi sağlamaktadır. Bu testle dört hücre popülasyonu ayırt edilebilir:

- Apoptotik olmayan hücreler: Annexin V (-) ve 7-AAD (-)
- Erken apoptotik hücreler: Annexin V (+) ve 7-AAD (-)
- Geç evre apoptotik ve ölü hücreler: Annexin V (+) ve 7-AAD (+)
- Çoğunlukla nükleer debris: Annexin V (-) ve 7-AAD (+)

## Yöntem:

1. Bu analiz için  $7,5 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6'lık kuyucuklara hücreler ekildikten sonra  $IC_{50}$  dozları ile 48 saat süreyle muamele edilmiştir.
2. Analize başlamadan önce MUSE Annexin V & Dead Cell Reagent oda sıcaklığına getirilmiştir.
3. 48 saatlik süre sonunda kuyuculardaki besiyeri aspire edilmiş ve PBS ile yıkanmıştır.
4. Tripsinle muamele edilerek hücreler süspanse hale getirilmiştir.
5. Ependorf tüpüne aktarılan süspanse haldeki hücreler 350 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
6. Süpernatant uzaklaştırılarak 100 µl PBS ile hücreler tamamen homojenize hale getirilmiştir.
7. Her bir tüpe PBS ile aynı hacimde olan 100 µl MUSE AnnexinV & Dead Cell Reagent eklenmiştir (Önerilen bu hacim örnek özelliğine göre artırılabilir).
8. Hücreler vorteksle orta hızda 3-5 sn kadar karıştırılmıştır.
9. Hücreler oda sıcaklığında 20 dakika boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir.
10. MUSE Cell Analyzer'da anneksin V ve 7AAD ölçümü gerçekleştirilmiştir (Örneklerin cihaza yüklenmeden önce iyice karıştırılması gerekmektedir).

### **3.10. Hücre Döngüsü Analizi**

Ökaryotik hücrelerde en önemli ve temel süreçlerden biri olan hücre döngüsü, hücre büyümesi ve bölünmesiyle sonuçlanmaktadır. Hücre döngüsünün regülasyonu, genetik hasarın onarılması ve kontrolsüz hücre bölünmesinin durdurulmasıyla ilişkili olduğundan, hücre sağkalımı için kritik bir öneme sahiptir. Hücre döngüsü regülasyonunda ki bozukluklar, tümör hücrelerinin karakteristik bir özelliğidir ve hücre döngüsünün kontrol edilmesinde rol oynayan genlerdeki mutasyonların, kanserde oldukça yaygın olduğu bilinmektedir. Hücre döngüsü analizi, antikanser bileşiklerin etkilerini anlamada veya hücre bölünmesi mekanizmalarının araştırılmasında giderek daha önemli hale gelmiştir (Cecchini ve ark., 2012). Çalışmamızda kullandığımız Muse™ Hücre Döngüsü Kiti, G0 / G1, S ve G2'deki hücre yüzdesinin kolay ve hızlı kantitatif ölçümüne olanak sağlamaktadır. Bu kit

kültüre edilmiş memeli hücre hatlarına ait hücre süspansiyonlarındaki hücre döngüsü fazlarını nicelleştirmektedir.

Muse™ Hücre Döngüsü Testinde, özel bir formülasyonda nükleer DNA interkalasyon boyası olan PI ve RNase A içeren karışım halindeki bir reaktif kullanılır. PI, DNA boyanmasının spesifikliğini arttırmak için RNase varlığında DNA içeriğindeki farklılığa dayanarak hücre döngüsünün farklı aşamalarında hücrelerin ayırt edilmesini sağlar. Dinlenim fazındaki (G0/G1) hücreler her bir kromozomun iki kopyasını içermektedir. Hücreler döngüye girmeye başladıkça, kromozomal DNA'yı da sentezlemeye başlarlar (S fazı). Tüm kromozomal DNA iki katına çıkana kadar (G2 / M fazı) PI'dan kaynaklanan floresan yoğunluğu da artış gösterir. Bu aşamada; G2/M hücreleri, G0/G1 popülasyonunun iki katı floresan yoğunluğa erişir. G2 / M hücreleri evrenin sonunda iki hücreye bölünür. Bu test, her bir hücre döngüsü evresindeki (G0 / G1, S ve G2 / M) hücre yüzdesini ayırt etmek ve ölçmek için DNA içeriğinin PI bazlı boyanması esasına dayanmaktadır.

Yöntem:

1. Bu analiz için  $1 \times 10^6$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6'lık kuyucuklara hücreler ekilmiş olup,  $IC_{50}$  dozları ile 48 saat süreyle muamele edilmiştir.
2. Analizden hemen önce MUSE AnnexinV & Dead Cell Reagent oda sıcaklığına getirilmiştir.
3. Süre sonunda kuyuculardaki besiyeri aspire edilmiş ve PBS ile yıkanmıştır.
4. Tripsinle muamele edilerek hücreler süspansiyon haline getirilmiştir.
5. Ependorf tüpüne aktarılan süspansiyon haldeki hücreler  $350 \text{ g}'de$  5 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Süpernatant uzaklaştırılarak her bir tüp için 1 ml PBS ilave edilmiştir. Hücreler tamamen homojenize olana kadar iyice pipetajlanmıştır.
7. Hücreler,  $350 \text{ g}'de$  5 dakika santrifüj edilmiştir.
8. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra her  $10^6$  hücre için 50  $\mu\text{l}$  PBS ilave edilmiştir.
9. Az miktardaki PBS ile hücreler yeniden süspansiyon haline getirilmek için hafifçe vortekslenerek pipetajlanmıştır.

10. Orta hızda vorteks yaparken, buz üstündeki soğuk 1 mL%70'lik etanol içeren tüpe damla damla süspanse halde ki hücreler eklenmiştir. Tüpler boyanmadan önce en az 3 saat süreyle -20 ° C'de tutularak dondurulmuştur.
11. 12 x 75-mm polystyrene test tüplerine 200 µl etanol ile fikse edilmiş süspanse hücreler ilave edilmiştir.
12. Etanol ile fikse edilmiş hücreler 300 g'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir.
13. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra her bir  $5 \times 10^5$  hücre için 0.25 ml PBS'te hücre pelleti resüspanse edilmiştir.
14. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti Muse™ Cell Cycle Reagent ile resüspanse edilmiştir.
15. Tüpler oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
16. Her bir hücre süspanسیون örneği, Muse™ Cell Analyzer cihazında analiz edilmeden önce 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.

### **3.11. Hücre İnvazyonunun Analizi**

IC<sub>50</sub> dozlarının uygulandığı HCT 116 ve HT-29 hücrelerinin invaziv özelliklerinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi için 24 kuyucuklu Corning BioCoat Matrigel Invasion Chamber'ları kullanılmıştır. Corning BioCoat Matrigel Invasion Chamber'larında, 8 mikron çaplı PET membranı yer alır. Bu membran ise ince bir Matrigel Basement Membrane Matrix ile kaplıdır. Matrigel Matrix, *in vitro* olarak yeniden yapılandırılmış bir bazal membran olarak işlev görmektedir. Bu matriks, membranın gözeneklerini tıkayarak, invaziv olmayan hücrelerin membrandan geçişini engellemektedir. İnvaziv karakterli hücreler (malign ve malign olmayan) ise Matrigel Matrix ve 8 mikron'luk membran gözeneklerinden geçerek invaze olabilmektedir. Membran, ışık ve elektron mikroskopunda işlenebilmekte ve boyamadan sonra kolaylıkla çıkarılabilmektedir. Matrigel Invasion Chamber, *in vitro* hücre invazyonunu incelemek için oldukça kullanışlı, kullanıma hazır bir sistemdir.

## Yöntem:

**Tablo 3.18:** Hücre invazyon testi için solüsyon hacimleri

<b>Matrigel İnvazyon Chamber'ları için Solüsyon Hacimleri</b>	
	<b>24-Kuyucuklu</b>
İnsert ve kuyucuk rehidrasyonu	0.5 ml (insert) ve 0.5 ml (kuyucuk)
Kuyucuk (kemoatraktan)	0.75 ml
Hücre	0.5 ml
Boya	0.5 ml
Durulama	150 ml

### 1. Rehidrasyon

- 1.1. Ürünün -20 °C'den çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.
- 1.2. İnsert ve kuyucukların dibine 37 °C'ye getirilmiş bikarbonat bazlı kültür ortamları ilave edilmiştir. Nemlendirilmiş doku kültürü inkübatörü içerisinde, 37 °C'de %5'lik CO<sub>2</sub> atmosferinde, 2 saat süreyle rehidrate olmasına izin verilmiştir.
- 1.3. Rehidrasyon sonrası, dikkatli bir şekilde membrana zarar vermeden kültür ortamları uzaklaştırılmıştır.

### 2. İnvazyon Basamağı

- 2.1. Rehidrasyonun ardından steril pens kullanılarak plakanın boş kuyularına matrigel insert'lerle eşit sayıda kontrol insertleri yerleştirilmiştir
- 2.2. 24-kuyucuklu plakalar için her bir kuyucuğa 2.5x10<sup>5</sup> hücre/ml içeren kültür ortamındaki hücre süspansiyonları hazırlanmıştır.
- 2.3. Plakanın kuyularına kemoatraktan (%5'lik FBS) içeren besiyeri ilave edilmiştir.
- 2.4. Kuyucukları ve kontrol insert'lerini kemoatraktan içeren chamber'lara aktarmak için steril pens kullanılmıştır.
- 2.5. Aktarımın ardından membranların altında hava kabarcıklarının kalmadığından emin olduktan hemen sonra 24'lük chamber'lara 500 µl'lik hücre süspansiyonu eklenmiştir.
- 2.6. Nemlendirilmiş bir doku kültürü inkübatöründe 37 °C'de, %5'lik CO<sub>2</sub> atmosferinde, 22 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

### 3. Hücre İnvazyonunun Ölçülmesi

**3.1.** İnkübasyondan sonra, İnvaze olmayan hücreler, membranın üst yüzeyinden pamuk bir çubuk yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Ovma işlemi, ortam ile nemlendirilmiş ikinci bir çubukla tekrarlanmıştır. Membranın alt yüzüne yapışan hücrelerin kurumaması için bu işlemin olabildiğince hızlı bir şekilde yapılması önerilmektedir.

**3.2.** Hücrelerin Boyanması: hücrelerin fikse edilmesi için boş kuyulara %100 metanol eklenmiş sonrasında ise chamber'lar bu kuyucuklara aktarılarak 2 dakika bekletilmiştir. Hücrelerin boyanması için chamber'lar kristal viyole boyasının yer aldığı kuyucuklara aktarılmış ve 2 dakika beklenmiştir. Fazla boyayı uzaklaştırmak için chamber'lar dH<sub>2</sub>O ile 2 kez durularak ters bir şekilde kurumaya bırakılmıştır.

**3.3.** İnvaze Hücrelerin Sayılması: Kuruma gerçekleşikten sonra chamber'ın tabanındaki membran bistüri yardımıyla kesilerek üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılmış lamın üzerine pens yardımıyla aktarıldıktan sonra membran lamel ile arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlardaki hücreler mikroskop altında fotoğraflandıktan sonra ZEN programı ile sayılmıştır. İnvazyon yüzdesi ise kontrol grubu hücrelerle karşılaştırılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnvazyon} = \frac{\text{Matrigel Matrix membranda ki invaze hücre sayısı}}{\text{Kontrol membranda ki göç eden hücre sayısı}} \times 100$$

#### 3.12. Protein Analizi

##### 3.12.1. ELISA Testi (Enzim-Bağlı İmmunosorbent Testi)

Çalışmada kullandığımız kitler Sandwich-ELISA prensibine dayanmaktadır. Kitin içinde yer alan 96'lık plakada ki her bir kuyucuk, kitin tespit edeceği antijene özgü antikor ile önceden kaplanmıştır. Antijen olarak standartlar veya örnekler mikro ELISA plakası kuyucuklarına eklenir ve spesifik antikor ile birleştirilerek reaksiyonun başlaması sağlanır. Sonrasında kuyucuklara birincil antikora bağlanan enzim-bağlı sekonder antikorlar eklenir. Bağlanmamış antikor-enzim konjugatları yıkanarak uzaklaştırılır. Bağlanma reaksiyonunun tamamlanmasının ardından ortama enzim tarafından hidrolize edilen ve ayırt edilebilir renk değişikliğini sağlayacak substratı ilave edilir. Substrat-enzim reaksiyonu, durdurma çözeltisi ilave edilerek



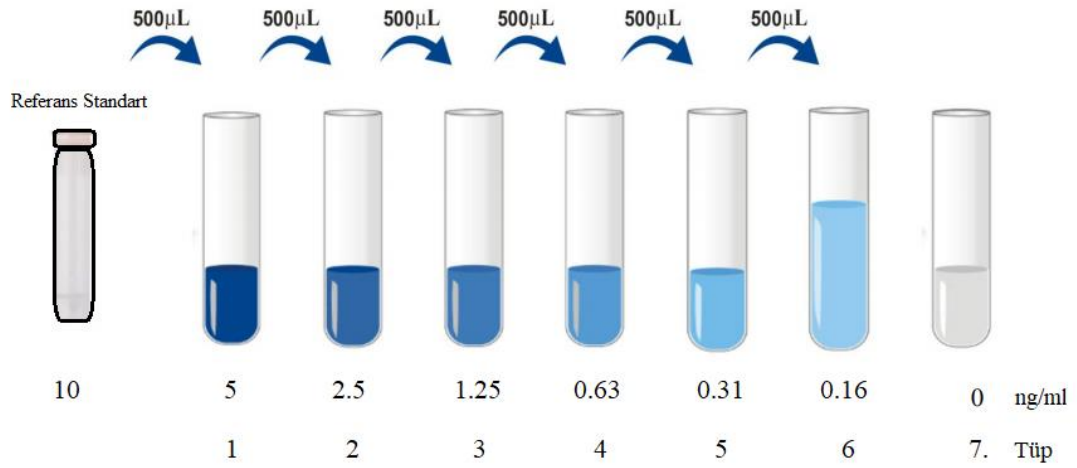
sonlandırılır ve renk değişikliği gözlenir. Optik dansite (OD), ELISA mikropilaka okuyucu cihazında 450 nm dalga boyunda ölçülür. OD değeri, ilgili antijenin konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin OD'leri standart eğri ile karşılaştırarak örneklerdeki spesifik antijenin konsantrasyonu hesaplanır.

Çalışmada BCL-2, ZEB1, GATA4 ve CD95'in protein düzeyinde konsantrasyonlarını (miktarlarını) belirlemek için Sandwich-ELISA yöntemi kullanılmıştır. Örnekler, hücre lizatlarından hazırlanmış olup deneylerde çalışılincaya kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.12.1.1. BCL-2 ELISA Kit**

#### **Solüyonların Hazırlanması**

- 1. Wash Buffer'ın Hazırlanışı:** Toplam hacmi 250 ml olacak şekilde, 10 ml'lik konsantre wash buffer, 240 ml distile su ile seyreltilmiştir.
- 2. Biotinlenmiş Detection Ab Working Solution Hazırlanışı:** Çalışmaya başlamadan önce gerekli olan miktar hesaplanmıştır (100 µl / kuyu). Kullanım öncesinde stok tüp santrifüj edilmiştir. 100X konsantre biotinlenmiş detection Ab, biotinlenmiş detection Ab diluent ile 1X working solüsyonuna seyreltilmiştir.
- 3. Standard Working Soluion Hazırlanışı:** Standart, 1 dakika 1000 g'de santrifüj edilmiştir. Reference Standard & Sample Diluent'ten 1 ml alınarak standarda ilave edilmiştir. 10 dakika bekletildikten sonra tüp birkaç kez alt üst edilmiştir. Tamamen çözdürüldükten sonra pipet yardımıyla iyice karıştırılarak homojenize edilmiştir. Bu sulandırma işlemi ile 10 ng/ml'lik stok solüsyon elde edilmiştir. Sonrasında da seri dilüsyonlar yapılmıştır. Önerilen dilüsyon gradienti Şekil 3.4'teki gibidir.



Şekil 3.4: BCL-2 için seri dilüsyon hazırlanması

- 4. Biotinlenmiş Detection HRP Conjugate Working Solution:** Çalışmaya başlamadan önce gerekli olan miktar hesaplanmıştır (100 µl / kuyu). 100x konsantre biotinlenmiş detection HRP Conjugate, biotinlenmiş detection HRP Conjugate diluent ile 1x working solusyonuna seyreltilmiştir.

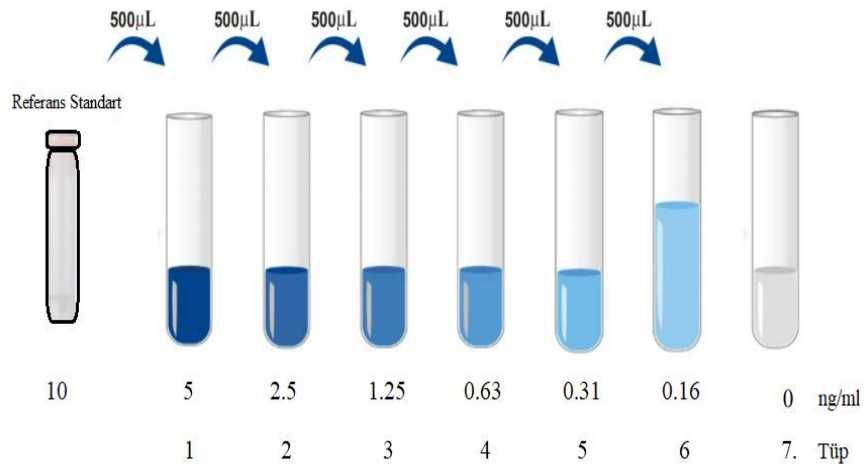
#### BCL-2 ELISA Kit Prosedürü

- Her bir kuyuya standart ya da örnekten 100 µl ilave edildikten sonra 37 °C'de 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Süre sonunda sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Ardından biotinlenmiş detection Ab solüsyonundan 100 µl ilave edilerek 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Her bir kuyudan solüsyon aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra wash buffer ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Her bir kuyuya 100 µl HRP conjugate working solution eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Her bir kuyudan solüsyon aspire edilerek wash buffer ile yıkama işlemi 5 kez tekrarlanmıştır.
- Her bir kuyuya 90 µl substrate reagent eklendikten sonra 37 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu basamakta plaka ışıktan korunmuştur.
- 50 µl stop solüsyonu eklenerek, 450 nm dalga boyunda her bir kuyunun OD değeri belirlenmiştir.

### 3.12.1.2. ZEB1 ELISA Kit

#### Solüyonların Hazırlanması

- 1. Wash Buffer'ın Hazırlanışı:** Toplam hacmi 250 ml olacak şekilde, 10 ml'lik konsantre wash buffer, 240 ml distile su ile seyreltilmiştir.
- 2. Biotinlenmiş Detection Ab Working Solution Hazırlanışı:** Çalışmaya başlamadan önce gerekli olan miktar hesaplanmıştır (100 µl / kuyu). Kullanmaya başlamadan önce stok tüp santrifüj edilmiştir. 100X konsantre biotinlenmiş detection Ab, biotinlenmiş detection Ab diluent ile 1X working solusyonuna seyreltilmiştir.
- 3. Standard Working Solutuion Hazırlanışı:** Standart 1 dakika 1000 g'de santrifüj edilmiştir. Reference Standard & Sample Diluent'ten 1 ml alınarak standarda ilave edilmiştir. 10 dakika bekletildikten sonra birkaç kez tüp alt üst edilmiştir. tamamen çözüldükten sonra pipet yardımıyla iyice karıştırılarak homojenize edilmiştir. Bu sulandırma işlemi ile 10ng/ml'lik stok solüsyon elde edilmiştir. sonrasında da seri dilüsyonlar yapılmıştır. Önerilen dilüsyon gradienti Şekil 3.5'deki gibidir.



Şekil 3.5: ZEB1 için seri dilüsyon hazırlanması

- 4. Biotinlenmiş Detection HRP Conjugate Working Solution:** Çalışmaya başlamadan önce gerekli olan miktar hesaplanmıştır (100µl/kuyu). 100x konsantre biotinlenmiş detection HRP Conjugate, biotinlenmiş detection HRP Conjugate diluent ile 1x working solusyonuna seyreltilmiştir.

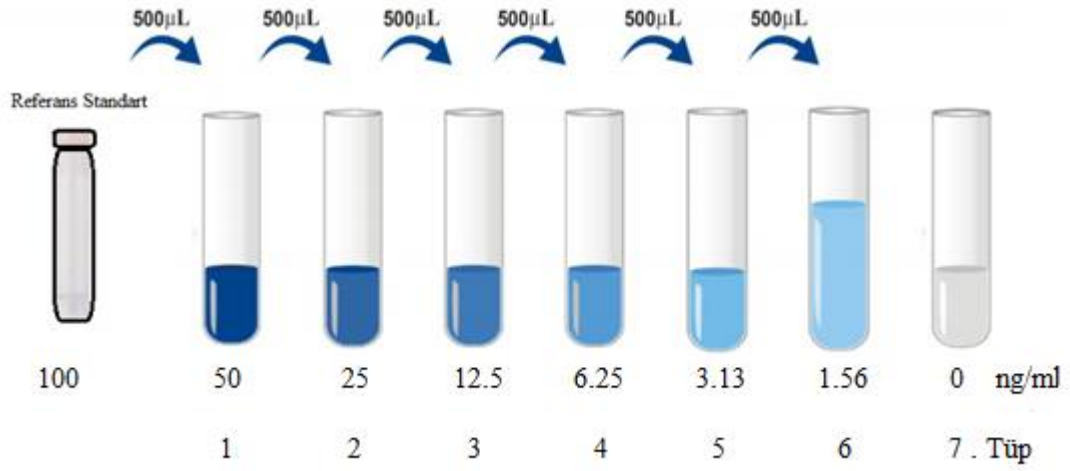
## **ZEB1 ELISA Kit Prosedürü**

1. Her bir kuyuya standart ya da örnekten 100 ul ilave edildikten sonra 37 °C'de 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
2. Süre sonunda sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Ardından biotinlenmiş detection Ab solüsyonundan 100 ul ilave edilerek 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
3. Her bir kuyudan solüsyon aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra wash buffer ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
4. Her bir kuyuya 100 ul HRP conjugate working solution eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
5. Her bir kuyudan solüsyon aspire edilerek wash buffer ile yıkama işlemi 5 kez tekrarlanmıştır.
6. Her bir kuyuya 90 ul substrate reagent eklendikten sonra 37 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu basamakta plaka ışıktan korunmuştur.
7. 50 ul stop solüsyonu eklenerek, 450 nm dalga boyunda her bir kuyunun OD değeri belirlenmiştir.

### **3.12.1.3. GATA4 ELİSA Kit**

#### **Solüyonların Hazırlanması**

1. **Wash Buffer'in Hazırlanışı:** Toplam hacmi 250 ml olacak şekilde, 10 ml'lik konsantre wash buffer, 240 ml distile su ile seyreltilmiştir.
2. **Biotinlenmiş Detection Ab Working Solution Hazırlanışı:** Çalışmaya başlamadan önce gerekli olan miktar hesaplanmıştır (100 ul / kuyu). Kullanmaya başlamadan önce stok tüp santrifüj edilmiştir. 100x konsantre biotinlenmiş detection Ab, biotinlenmiş detection Ab diluent ile 1x working solüsyonuna seyreltilmiştir.
3. **Standard Working Soluion Hazırlanışı:** standart 1 dakika 1000 g'de santrifüj edilmiştir. Reference Standard & Sample Diluent'ten 1 ml alınarak standarda ilave edilmiştir. 10 dakika bekletildikten sonra birkaç kez tüp alt üst edilmiştir. tamamen çözüldükten sonra pipet yardımıyla iyice karıştırılarak homojenize edilmiştir. Bu sulandırma işlemi ile 100 ng/ml'lik stok solüsyon elde edilmiş, sonrasında da seri dilüsyonlar yapılmıştır. Önerilen dilüsyon gradienti şekil 3.6'daki gibidir.



Şekil 3.6: GATA4 için Seri dilüsyon hazırlanması

- 4. Biotinlenmiş Detection HRP Conjugate Working Solution:** Çalışmaya başlamadan önce gerekli olan miktar hesaplanmıştır (100 ul / kuyu). 100x konsantre biotinlenmiş detection HRP Conjugate, biotinlenmiş detection HRP Conjugate diluent ile 1x working solüsyonuna seyreltilmiştir.

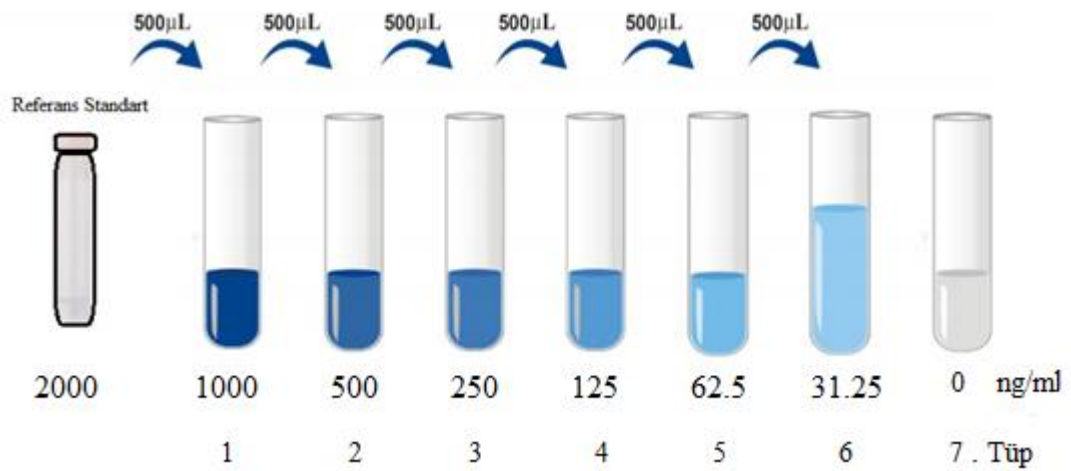
#### GATA4 ELISA Kit Prosedürü

1. Her bir kuyuya standart ya da örnekten 100 µl ilave edildikten sonra 37 °C'de 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
2. Süre sonunda sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Ardından biotinlenmiş detection Ab solüsyonundan 100 µl ilave edilerek 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
3. Her bir kuyudan solüsyon aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra wash buffer ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
4. Her bir kuyuya 100 µl HRP conjugate working solution eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
5. Her bir kuyudan solüsyon aspire edilerek wash buffer ile yıkama işlemi 5 kez tekrarlanmıştır.
6. Her bir kuyuya 90 µl substrate reagent eklendikten sonra 37 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu basamakta plaka ışıktan korunmalıdır.
7. 50 µl stop solüsyonu eklenerek, 450 nm dalga boyunda her bir kuyunun OD değeri belirlenmiştir.

### 3.12.1.4. FAS/CD95 ELISA Kit

#### Solüyonların Hazırlanması

- 1. Wash Buffer'ın Hazırlanışı:** Toplam hacmi 250 ml olacak şekilde, 10 ml'lik konsantr wash buffer, 240 ml distile su ile seyreltilmiştir.
- 2. Biotinlenmiş Detection Ab Working Solution Hazırlanışı:** Çalışmaya başlamadan önce gerekli olan miktar hesaplanmıştır (100 µl / kuyu). Kullanmaya başlamadan önce stok tüp santrifüj edilmiştir. 100X konsantr biotinlenmiş detection Ab, biotinlenmiş detection Ab diluent ile 1X working solusyonuna seyreltilmiştir.
- 3. Standard Working Solutuion Hazırlanışı:** Standart 1 dakika 1000 g'de santrifüj edilmiştir. Reference Standard & Sample Diluent'ten 1 ml alınarak standarda ilave edilmiştir. 10 dakika bekletildikten sonra birkaç kez tüp alt üst edilmiştir. tamamen çözüldükten sonra pipet yardımıyla iyice karıştırılarak homojenize edilmiştir. Bu sulandırma işlemi ile 2000 ng/ml'lik stok solüsyon elde edilmiş, sonrasında da seri dilüsyonlar yapılmıştır. Önerilen dilüsyon gradienti Şekil 3.7'deki gibidir.



Şekil 3.7: FAS/CD95 için seri dilüsyon hazırlanması

- 4. Biotinlenmiş Detection HRP Conjugate Working Solution:** Çalışmaya başlamadan önce gerekli olan miktar hesaplanmıştır (100 µl / kuyu). 100X konsantr biotinlenmiş detection HRP Conjugate, biotinlenmiş detection HRP Conjugate diluent ile 1X working solusyonuna seyreltilmiştir.

## **FAS/CD95 ELİSA Kit Prosedürü**

- 8.** Her bir kuyuya standart ya da örnekten 100 µl ilave edildikten sonra 37 °C’de 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 9.** Süre sonunda sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Ardından biotinlenmiş detection Ab solüsyonundan 100 µl ilave edilerek 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 10.** Her bir kuyudan solüsyon aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra wash buffer ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- 11.** Her bir kuyuya 100 µl HRP conjugate working solution eklenerek 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- 12.** Her bir kuyudan solüsyon aspire edilerek wash buffer ile yıkama işlemi 5 kez tekrarlanmıştır.
- 13.** Her bir kuyuya 90 µl substrate reagent eklendikten sonra 37 °C’de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu basamakta plaka ışıktan korunmalıdır.
- 14.** 50 µl stop solüsyonu eklenerek, 450 nm dalga boyunda her bir kuyunun OD değeri belirlenmiştir.

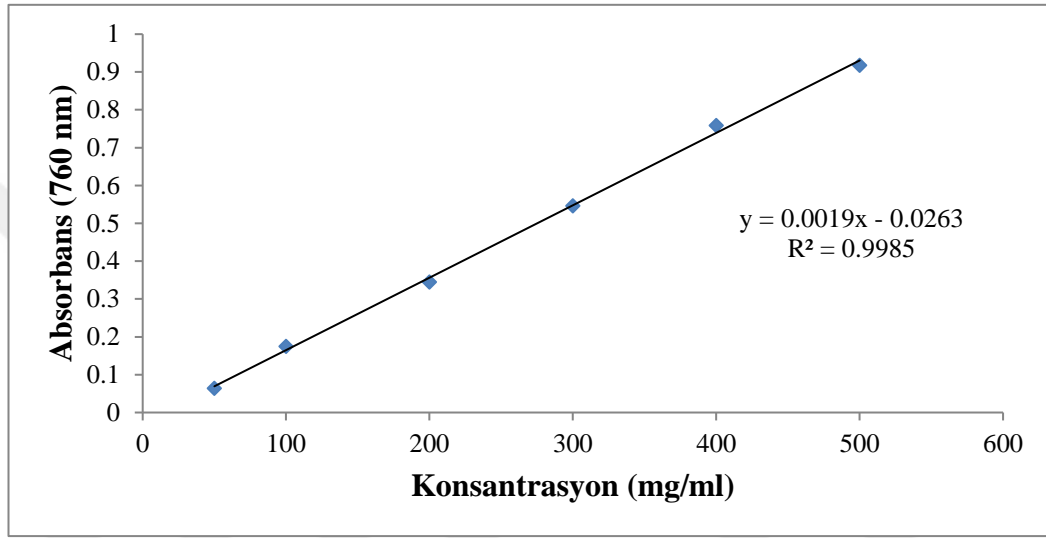
### **3.13. İstatistiksel Analiz**

Tüm deneyler 3 tekrarlı çalışılmış olup, tüm sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Sitotoksite analizi için GraphPad Prism 7, kombinasyon analizinde ise CompuSyn program kullanılmıştır. miRNA ve hedef gen ifadelerinin kat değişikliklerinin istatistiksel analizleri için internet tabanlı “Qiagen RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data Analysis” programı kullanılmıştır. Tüm analizlerde doz ve kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlılığı değerlendirmek için student t-testi ve tek yönlü ANOVA testi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Analiz Sonuçları

Bir fenol bileşiği olan gallik asit, folin reaktifi içindeki yüksek çözünürlüğü nedeniyle bu deneyde standart olarak kullanılmıştır. Tüm ekstreler gallik asitle karşılaştırılmıştır. Bu amaçla gallik asitin absorbansına bağlı standart eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.1)



Şekil 4.1: Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde kullanılan gallik asit standart eğri grafiği

Grafiğin eğimi örneklerin toplam fenol içeriğini hesaplamak için kullanılmıştır. Standart eğriye göre elde edilen denklem kullanılarak tüm ekstrelerin fenol konsantrasyonu gallik asit eşdeğerleri (Gallic Acid Equivalent) cinsinden hesaplanmıştır. Sonuç mg/g olarak ifade edilmiştir. Tablo 4.1'de toplam fenol içeriği GAE olarak gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kök metanol ekstresinin  $63.83 \pm 0.066$  ile en yüksek, kök-*n*-hekzan ekstresinin ise  $25.70 \pm 0.000008$  ile en düşük fenolik madde içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1).

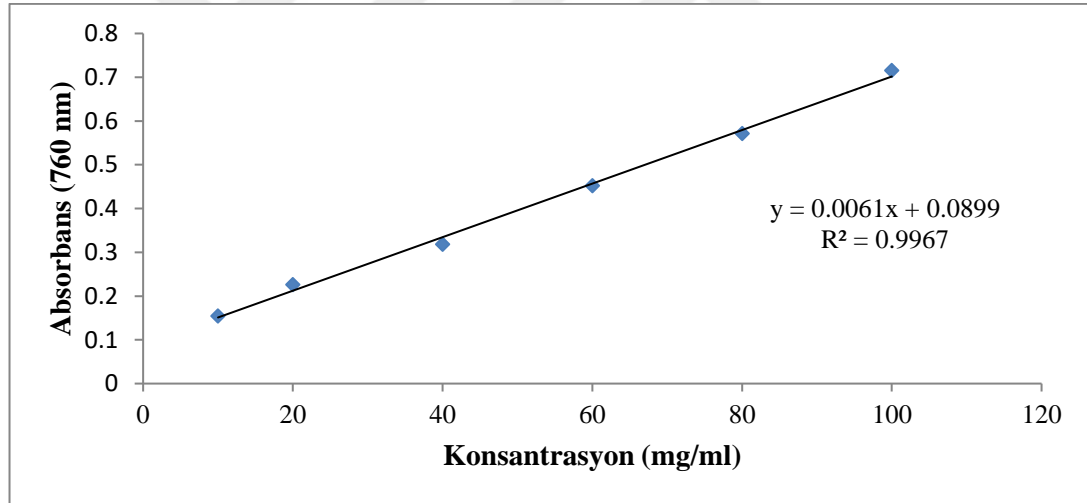


**Tablo 4.1:** *R. ribes*'in farklı ekstrelere ait toplam fenolik içeriğin gallik asit eşdeğeri olarak miktarı

Ektrenin Adı	Toplam Fenol GAE $\pm$ SS (mg/g)
Kök <i>n</i> -Hekzan	25.70 $\pm$ 0.000008
Kök Etil Asetat	45.80 $\pm$ 0.0073
Kök Metanol	63.83 $\pm$ 0.066
Gövde <i>n</i> -Hekzan	30.80 $\pm$ 0.0061
Gövde Etil Asetat	57.73 $\pm$ 0.0001
Gövde Metanol	63.75 $\pm$ 0.0725

#### 4.2. Toplam Flavonoit Madde Miktarı Analiz Sonuçları

Flavonoit bileşiği olan kersetin bu test için standart olarak kullanılmıştır. Tüm ekstrelere kersetinle karşılaştırılmıştır. Bu amaçla kersetinin absorbansına bağlı standart eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2:** Toplam flavonoit madde miktarının belirlenmesinde kullanılan kersetin standart eğri grafiği

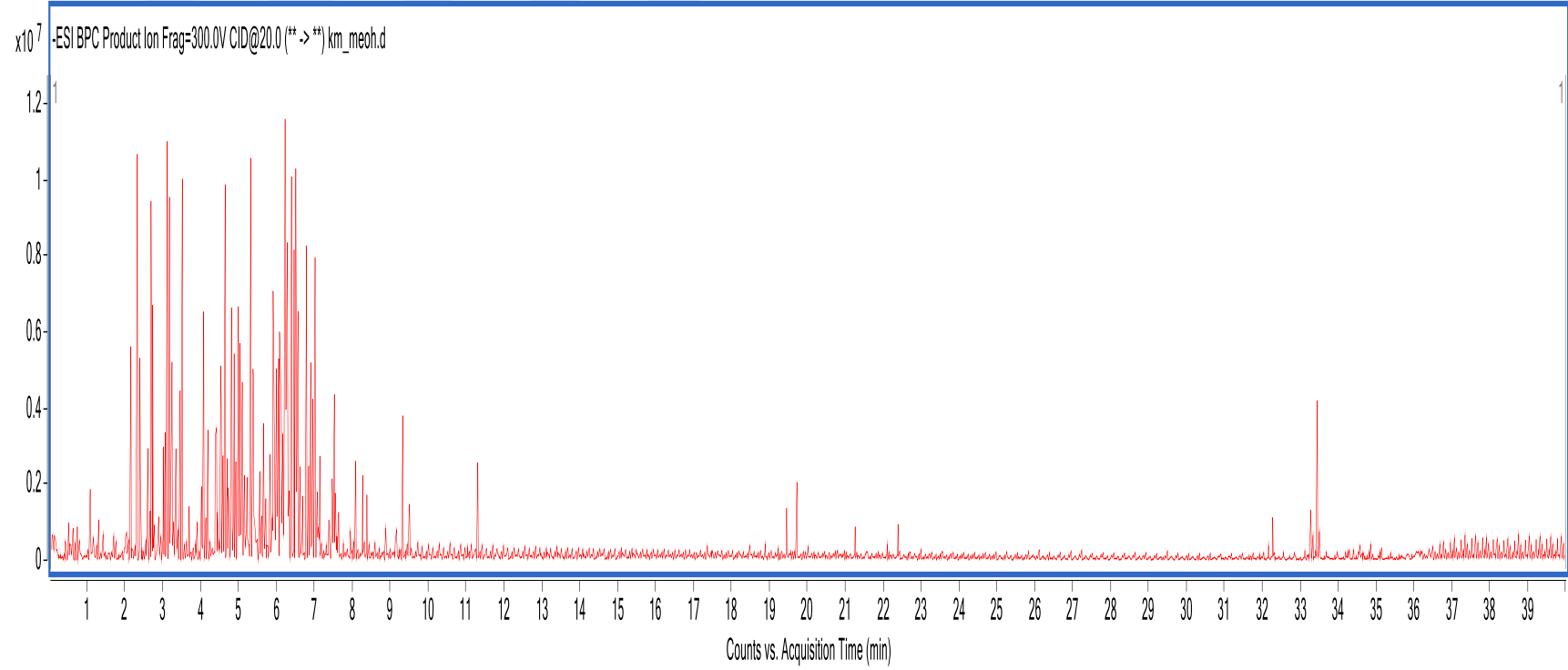
Grafiğin eğimi örneklerin toplam flavonoit içeriğini hesaplamak için kullanılmıştır. Standart eğriye göre elde edilen denklem kullanılarak tüm ekstrelere flavonoit konsantrasyonu kersetin eşdeğerleri cinsinden hesaplanmıştır. Sonuç mg/g olarak ifade edilmiştir. Tablo 4.2'de toplam flavonoit içeriği QE olarak gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kök metanol ekstresi  $68.31 \pm 0.000061$  ile en yüksek , kök-*n*-hekzan ekstresi ise  $17.23 \pm 0.00021$  ile en düşük flavonoit madde içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.:***R. ribes*'in farklı ekstrelere ait toplam flavonoit içeriğinin kersetin eşdeğeri olarak miktarı

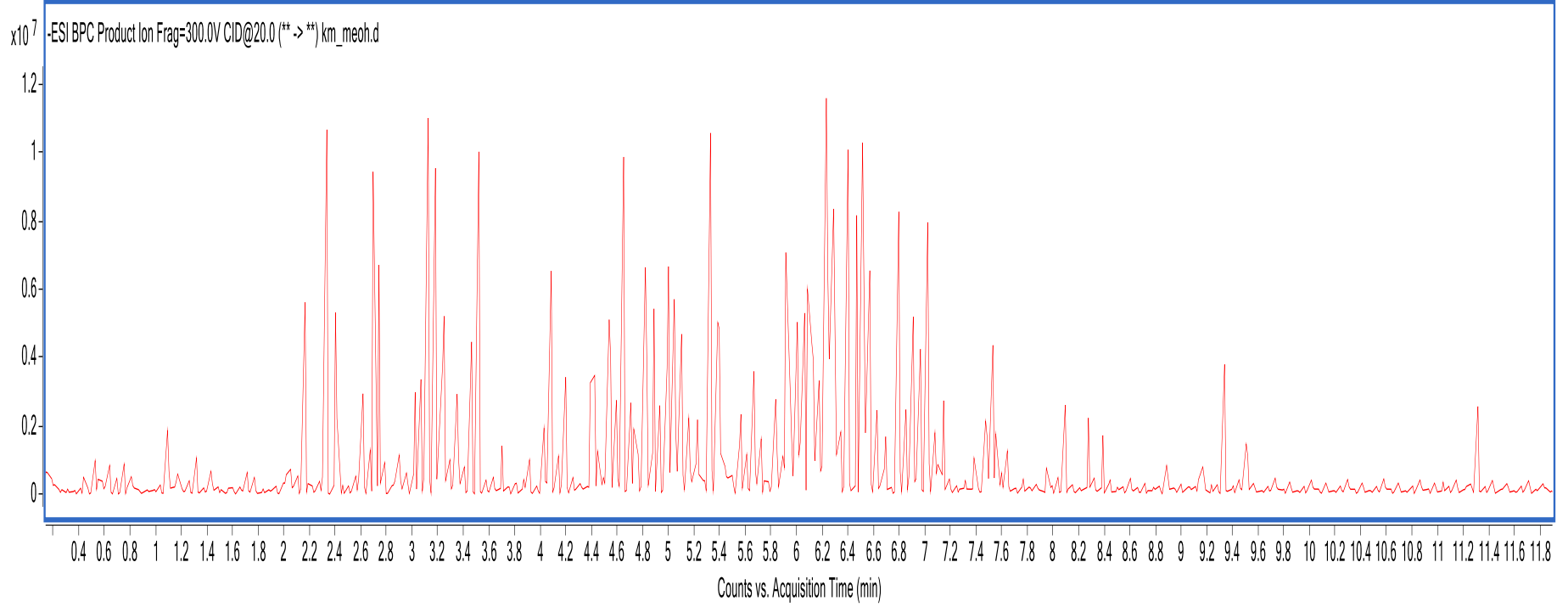
<b>Ektrenin Adı</b>	<b>Toplam Flavonoit QE <math>\pm</math>SS (mg/g)</b>
Kök <i>n</i> -Hekzan	23.77 $\pm$ 0.0000069
Kök Etil Asetat	29.10 $\pm$ 0.000046
Kök Metanol	68.31 $\pm$ 0.000061
Gövde <i>n</i> -Hekzan	17.23 $\pm$ 0.00021
Gövde Etil Asetat	17.72 $\pm$ 0.0000252
Gövde Metanol	33.13 $\pm$ 0.00000569

### **4.3. Kromatografik Analiz Sonuçları**

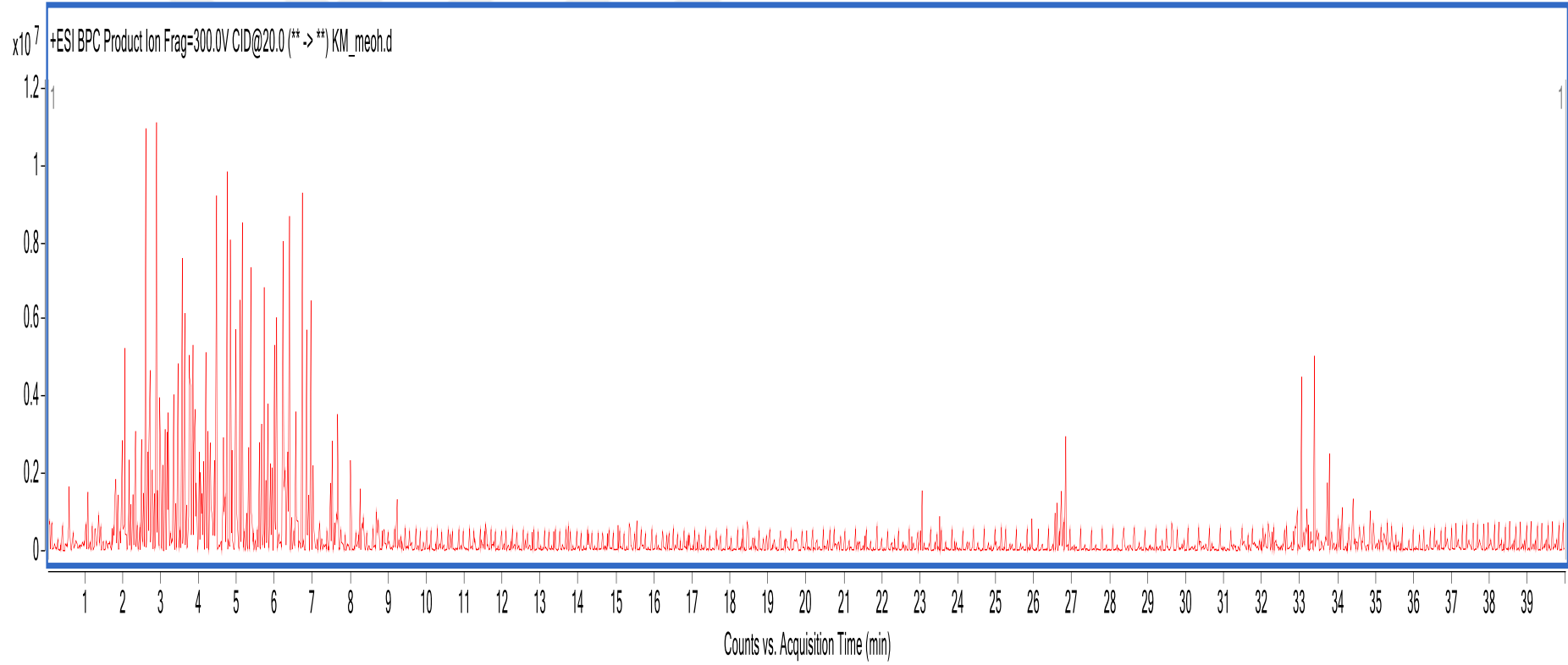
*R. ribes* kök metanol ekstresinin biyoaktif madde içeriğini belirleyebilmek için Agilent LC-ESI-QTOF-MS cihazı kullanılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen negatif ve pozitif iyon modu kromatogramları Şekil 4.3a, 4.3b, 4.4a ve Şekil 4.4b'de gösterilmiştir. Belirlenen biyoaktif madde içeriği ise detaylı olarak Tablo 4.3'de verilmiştir.



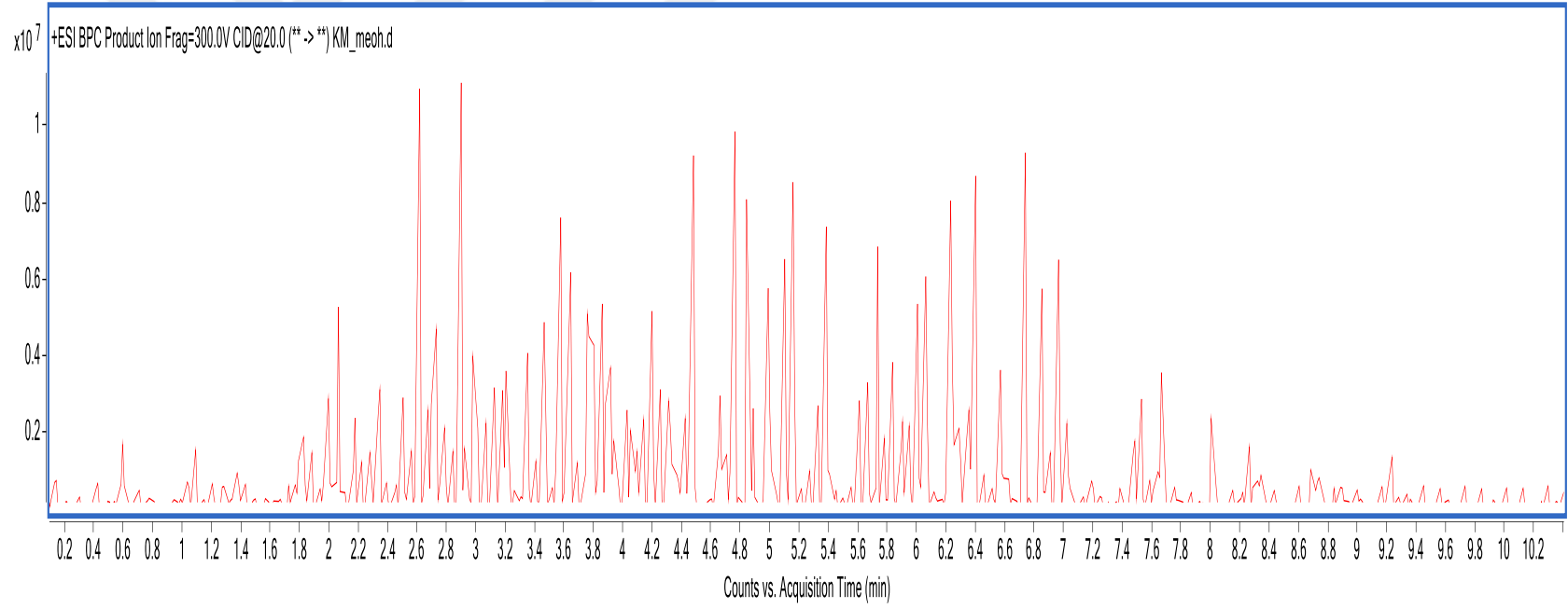
**Şekil 4.3a:** *R. ribes* kök metanol ekstresine ait negatif mod LC-ESI-QTOF-MS analizi kromotogram sonucu (0-40. dakika)



**Şekil 4.3b:** *R. ribes* kök metanol ekstresine ait negatif mod LC-ESI-QTOF-MS analizi kromotogram sonucu (0-10. dakika)



**Şekil 4.4a:** *R. ribes* kök metanol ekstresine ait pozitif mod LC-ESI-QTOF-MS analizi kromatogram sonucu (0-40. dakika)



**Şekil 4.4b:** *R. ribes* kök metanol ekstresine ait pozitif mod LC-ESI-QTOF-MS analizi kromotogram sonucu (0-10. dakika)

**Tablo 4.3:** *R. ribes* kök metanol ekstresinin kromatografik analizi

Pik No	Rt (dak)	Gözlenen m/z	Hesaplanan m/z	Ampirik Formül	Majör MS/MS Fragmentleri	Tanımlama
<b>Negatif İyon Modu</b>						
1	0.64	133.016	134.0232	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	115.0038	Malik asit
2	0.67	191.022	192.0292	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	87.0085; 167.9049	Sitrik asit
3	0.766	128.0363	129.0435	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	111.0085; 125.0243	Piroglutamik asit
4	1.263	169.0157	170.023	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	125.0232;152.9779; 160.9762	Gallik asit
5	1.285	125.0254	126.0327	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	112.9856	Pirogallol
6	1.85	137.0257	138.033	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	93.0341; 111.0084; 119.0358	4-Hidroksibenzoik asit
7	2.076	305.0681	306.0754	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	125.0242; 153.0226; 279.1083	Epigallokateşin
8	2.799	197.0473	198.0546	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	123.0086; 174.9565;182.0227	2-Hidroksi-3,4-dimetoksibenzoik asit
9	3.601	151.0416	152.0489	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	92.0268	Metil 4-hidroksibenzoat
10	4.085	441.0868	442.0941	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	169.0139; 289.0705	Epikateşin monogallat
11	4.355	303.0527	304.06	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	125.0232; 285.0386	(±)-Taksifolin
12	4.888	609.1495	610.1568	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	301.0303; 315.0834; 593.1843	Rutin
13	5.34	417.1218	418.1291	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	297.0746; 312.1222	Aloin A
14	5.442	211.042	212.0493	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	189.0564; 195.0460	2-Hidroksiksanton
15	5.668	431.1031	432.1103	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	174.9545; 269.0440; 270.0508	Apigenin 7-O-glukozit
16	6.346	253.0526	254.0599	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	233.0611; 239.0714; 245.0821	Krisin
17	7.034	285.0431	286.0503	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	174.9550; 281.0841	Luteolin
18	11.044	269.0477	270.055	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	174.9538	Baikalein

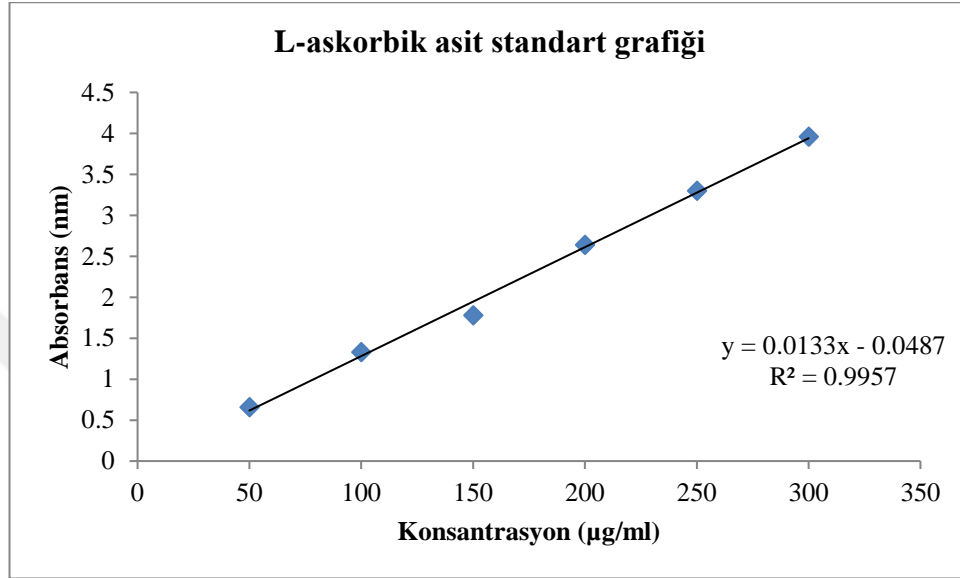
**Tablo 4.3.:** *R.ribes* kök metanol ekstresinin kromatografik analizi (önceki sayfanın devamı)

<b>Pozitif iyon Modu</b>						
19	2.393	291.0864	290.0791	$C_{15}H_{14}O_6$	139.0389	Epikateşin
20	3.692	433.1104	432.1031	$C_{21}H_{20}O_{10}$	271.0574; 411.1274	Genistin
21	6.978	285.0759	284.0687	$C_{16}H_{12}O_5$	267.1571; 279.0936	Prunetin
22	19.922	346.2715	345.2642	$C_{22}H_{35}NO_2$	214.9178	Himbasin



#### 4.4. *Rheum Ribes L.* Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Analiz Sonuçları

*R. ribes*'e ait tüm ekstrelerin L-askorbik asidin konsantrasyon inhibisyon grafiği oluşturularak denklemden IC<sub>50</sub> değeri hesaplanmıştır (Şekil 4.5). Çözeltideki DPPH radikallerinin % 50'sini gidermek için gerekli olan ekstre ve standart madde konsantrasyonu IC<sub>50</sub> olarak tanımlanır.



Şekil 4.5: Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılan L-askorbik asit standart eğrisi grafiği

Düşük IC<sub>50</sub> değeri yüksek radikal süpürme aktivitesinin göstergesidir. Bu değer çalışılan konsantrasyonlara karşı % serbest radikal giderme aktivite değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen grafik kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm ekstrelerin analiz sonuçlarına göre, kök etil asetat ekstresinin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: *R. ribes*'in farklı ekstrelerine ait antioksidan aktivite IC<sub>50</sub> değerleri

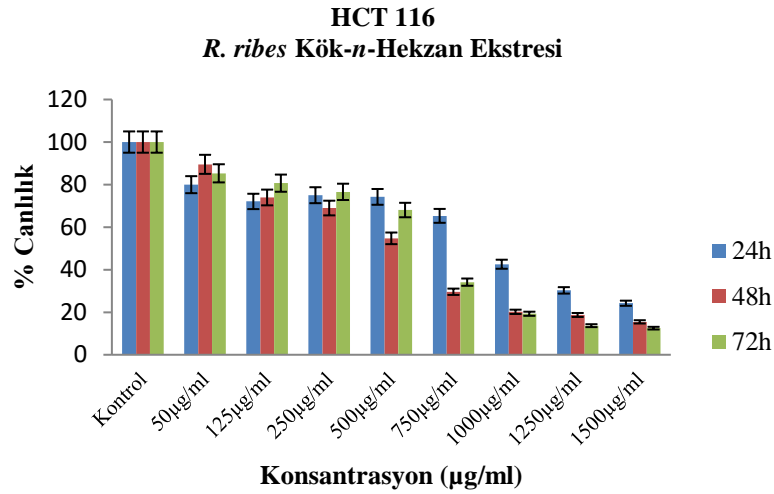
Ektrenin Adı	Antioksidan Aktivite (IC <sub>50</sub> ±SS mg/g)
Kök <i>n</i> -Hekzan	218,7±2,57
Kök Etil Asetat	137,77±2,08
Kök Metanol	187,52±2,68
Gövde <i>n</i> -Hekzan	448,13±0,85
Gövde Etil Asetat	238,25±1,7
Gövde Metanol	186,55±2,67

#### 4.5. Sitotoksite Analiz Sonuçlar

##### 4.5.1. *R. ribes*'e ait ekstrelerin HCT 116 ve HT-29 Hücre Hatları Üzerinde ki Sitotoksite Analiz Sonuçları

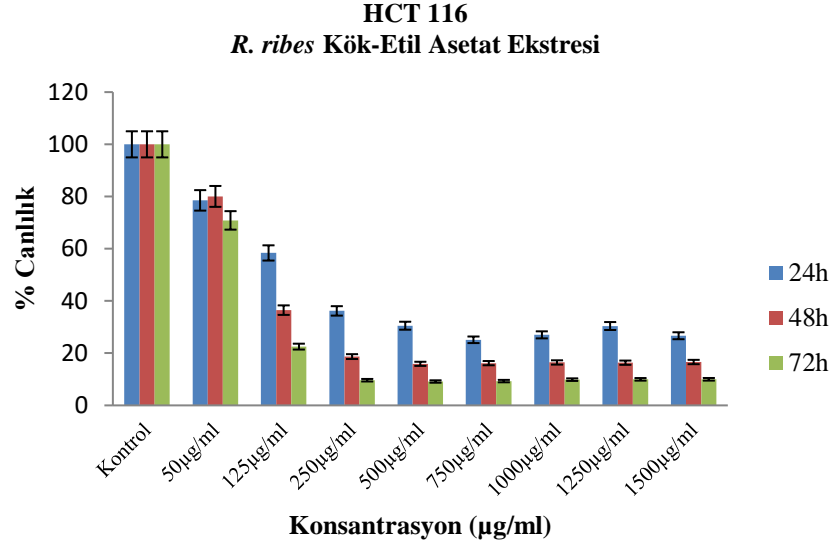
*R. ribes*'in kök ve gövde kısımlarından elde edilen 6 farklı ekstrenin HCT 116 ve HT-29 hücrelerinin canlılığına etkisi, XTT hücre proliferasyon kiti ile belirlenmiştir.

*R. ribes* kök *n*-hekzan ekstresinin, 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 µg/ml'lik son konsantrasyonları 24, 48, ve 72 saat boyunca HCT 116 hücre hattına uygulanmıştır. *R. ribes* kök *n*-hekzan ekstresinin IC<sub>50</sub> değeri, XTT testine göre 48. saatte 672 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6).



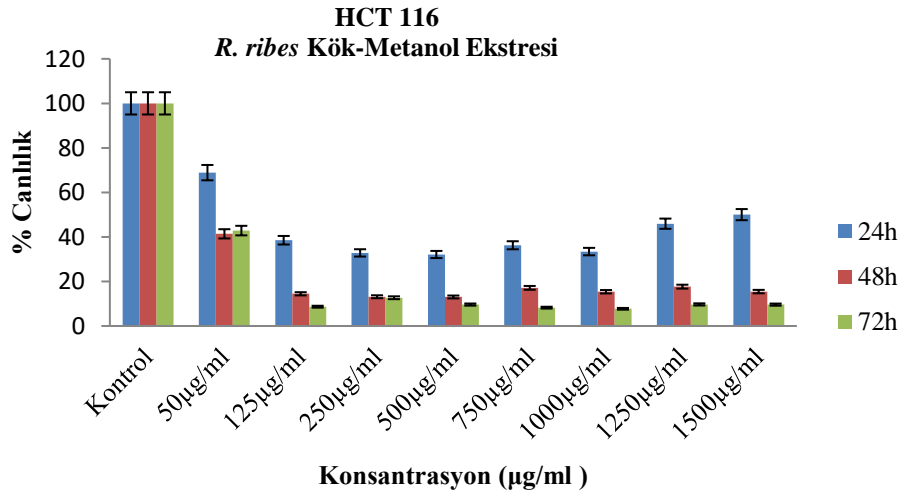
Şekil 4.6: *R. ribes* kök *n*-hekzan ekstresinin HCT 116 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

*R. ribes* kök etil asetat ekstresinin, 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 µg/ml'lik son konsantrasyonları 24, 48, ve 72 saat boyunca HCT 116 hücre hattına uygulanmıştır. *R. ribes* kök etil asetat ekstresinin IC<sub>50</sub> değeri XTT testine göre 48. saatte 96,32 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7).



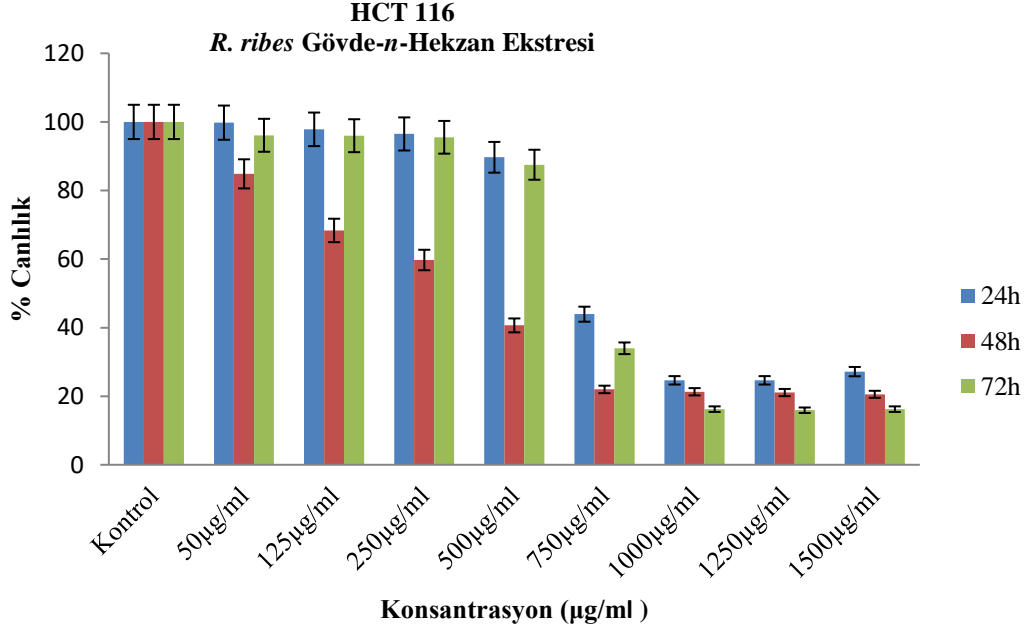
**Şekil 4.7:** *R. ribes* kök etil asetat ekstresinin HCT 116 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

*R. ribes* kök metanol ekstresinin, 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 µg/ml'lik son konsantrasyonları 24, 48, ve 72 saat boyunca HCT 116 hücre hattına uygulanmıştır. *R. ribes* kök metanol ekstresinin IC<sub>50</sub> değeri XTT testine göre 48. saatte 29,65 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8)



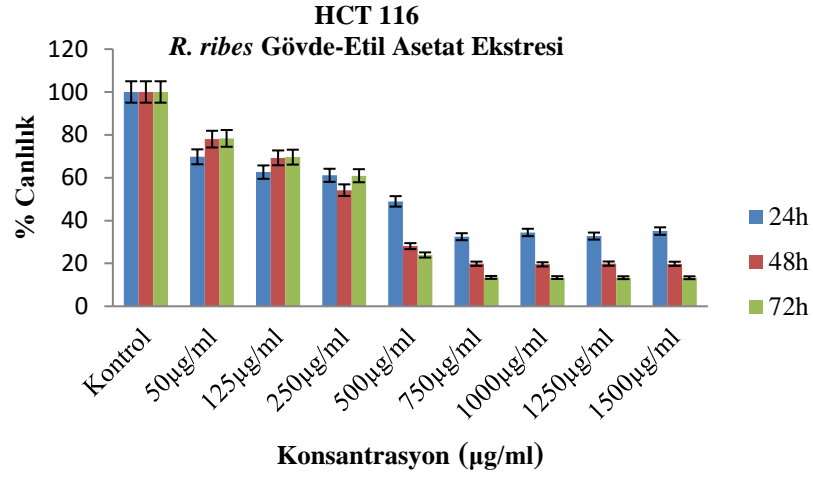
**Şekil 4.8:** *R. ribes* kök metanol ekstresinin HCT 116 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

*R. ribes* gövde *n*-hekzan ekstresinin, 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 µg/ml'lik son konsantrasyonları 24, 48, ve 72 saat boyunca HCT 116 hücre hattına uygulanmıştır. *R. ribes* gövde *n*-hekzan ekstresinin IC<sub>50</sub> değeri XTT testine göre 48. saatte 298,8 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).



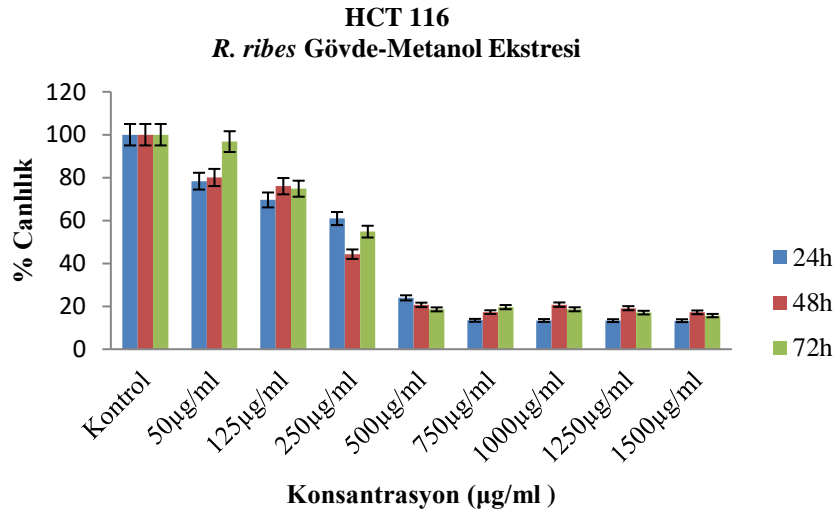
Şekil 4.9: *R. ribes* gövde *n*-hekzan ekstresinin HCT 116 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

*R. ribes* gövde etil asetat ekstresinin, 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 µg/ml'lik son konsantrasyonları 24, 48, ve 72 saat boyunca HCT 116 hücre hattına uygulanmıştır. *R. ribes* gövde etil asetat ekstresinin IC<sub>50</sub> değeri XTT testine göre 48. saatte 256,6 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10:** *R. ribes* gövde etil asetat ekstresinin HCT 116 hücre hattında ki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

*R. ribes* gövde metanol ekstresinin, 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 µg/ml’lik son konsantrasyonları 24, 48, ve 72 saat boyunca HCT 116 hücre hattına uygulanmıştır. *R. ribes* gövde metanol ekstresinin IC<sub>50</sub> değeri XTT testine göre 48. saatte 182,9 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11).

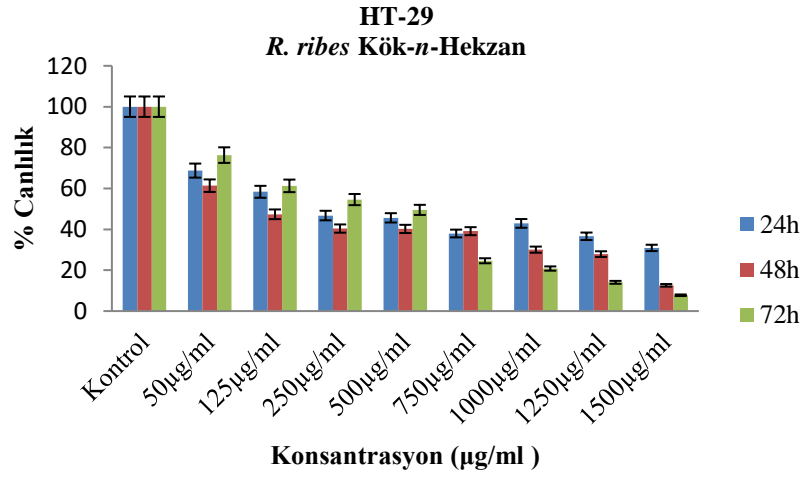


**Şekil 4.11:** *R. ribes* gövde metanol ekstresinin HCT 116 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

**Tablo 4.5:** HCT 116 hücrelerine uygulanan *R.ribes*'in kök ve gövdesine ait ekstrelerin IC<sub>50</sub> değerlerinin toplu gösterimi

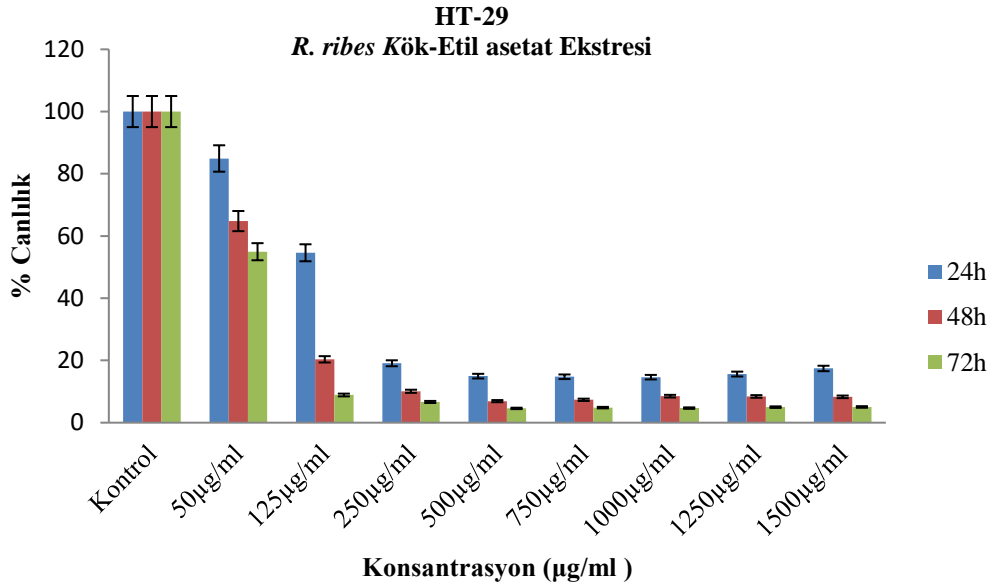
HCT 116	
Ektrenin Adı	IC <sub>50</sub> değeri (µg/ml)
Kök <i>n</i> -Hekzan	672±2,103
Kök Etil Asetat	96,32±3,625
Kök Metanol	29,65±3,343
Gövde <i>n</i> -Hekzan	298,9±0,1647
Gövde Etil Asetat	256,6±0,187
Gövde Metanol	182,9±0,2403

*R. ribes* kök *n*-hekzan ekstresinin 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 µg/ml'lik son konsantrasyonları 24, 48, ve 72 saat boyunca HT-29 hücre hattına uygulanmıştır. *R. ribes* kök *n*-hekzan ekstresinin IC<sub>50</sub> değeri XTT testine göre 48. saatte 98,1 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12).



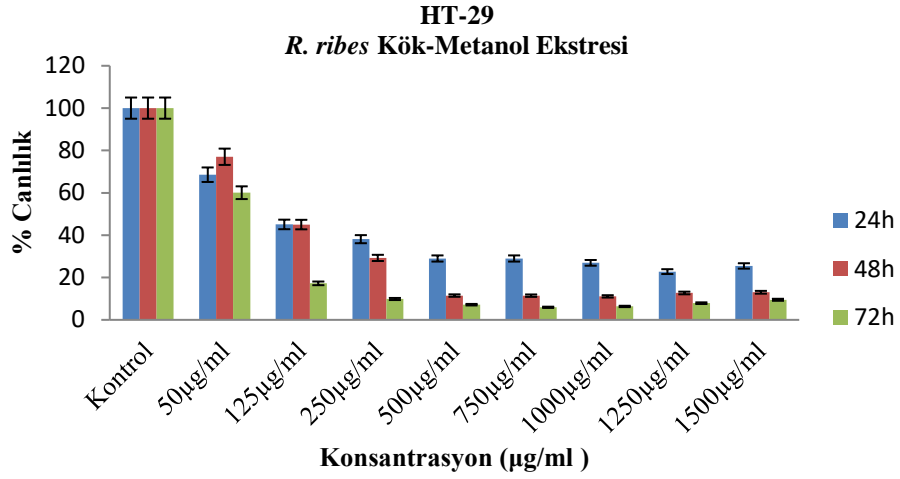
**Şekil 4.12:** *R. ribes* kök *n*-hekzan ekstresinin HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

*R. ribes* kök etil asetat ekstresinin 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500  $\mu\text{g/ml}$ 'lik son konsantrasyonları 24, 48, ve 72 saat boyunca HT-29 hücre hattına uygulanmıştır. *R. ribes* kök etil asetat ekstresinin  $\text{IC}_{50}$  değeri XTT testine göre 48. saatte 75,37  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13).



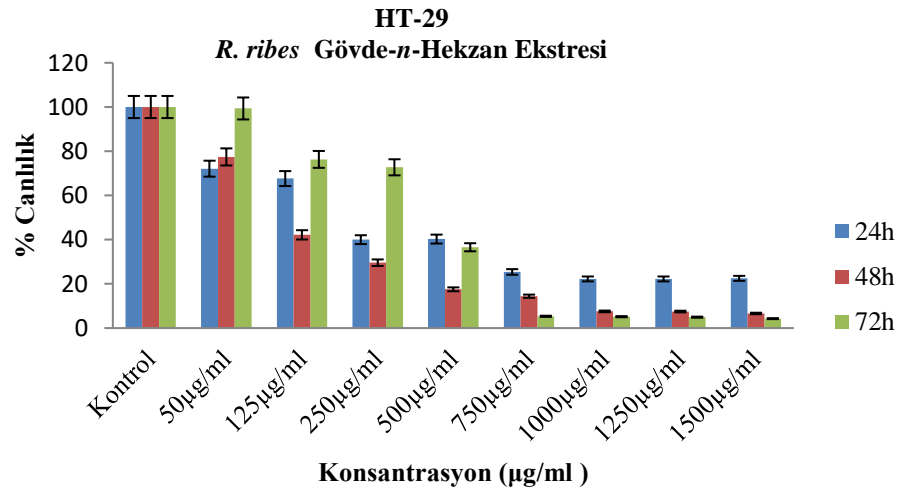
**Şekil 4.13:** *R. ribes* kök etil asetat ekstresinin HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

*R. ribes* kök metanol ekstresinin 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500  $\mu\text{g/ml}$ 'lik son konsantrasyonları 24, 48, ve 72 saat boyunca HT-29 hücre hattına uygulanmıştır. *R. ribes* kök metanol ekstresinin  $\text{IC}_{50}$  değeri XTT testine göre 48. saatte 82,68  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14:** *R. ribes* kök metanol ekstresinin HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

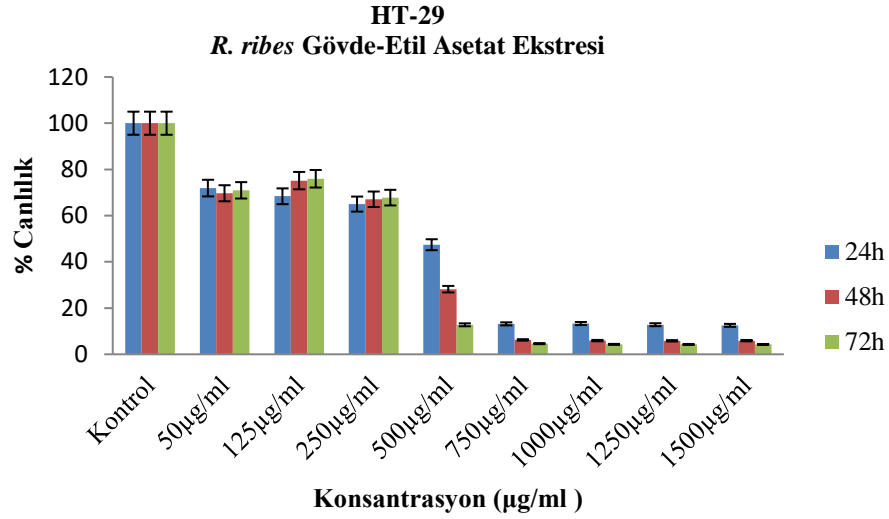
*R. ribes* gövde *n*-hekzan ekstresinin 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 µg/ml'lik son konsantrasyonları 24, 48, ve 72 saat boyunca HT-29 hücre hattına uygulanmıştır. *R. ribes* gövde *n*-hekzan ekstresinin IC<sub>50</sub> değeri XTT testine göre 48. saatte 98,1 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15:** *R. ribes* gövde *n*-hekzan ekstresinin HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

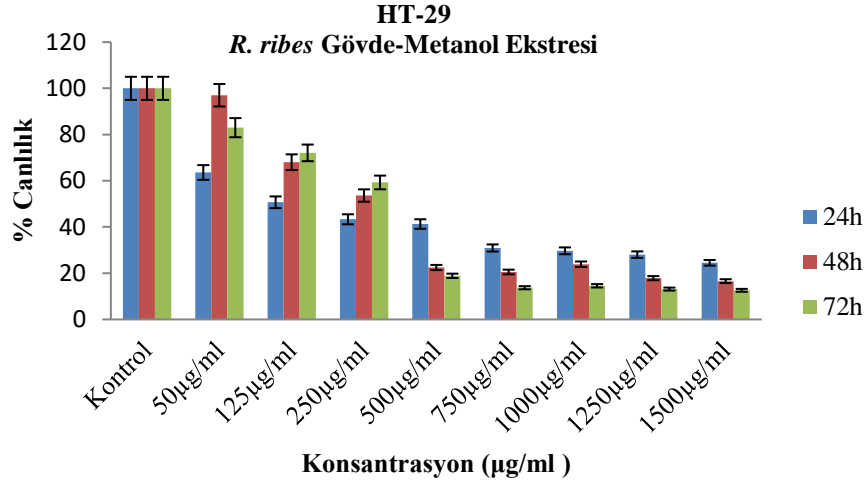


*R. ribes* gövde etil asetat ekstresinin 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500  $\mu\text{g/ml}$ 'lik son konsantrasyonları 24, 48, ve 72 saat boyunca HT-29 hücre hattına uygulanmıştır. *R. ribes* gövde etil asetat ekstresinin  $\text{IC}_{50}$  değeri XTT testine göre 48. saatte 439,1  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16:** *R. ribes* gövde etil asetat ekstresinin HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

*R. ribes* gövde metanol ekstresinin 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 $\mu\text{g/ml}$ 'lik son konsantrasyonları 24, 48, ve 72 saat boyunca HT-29 hücre hattına uygulanmıştır. *R. ribes* gövde metanol ekstresinin  $\text{IC}_{50}$  değeri XTT testine göre 48. saatte 275,5  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17).



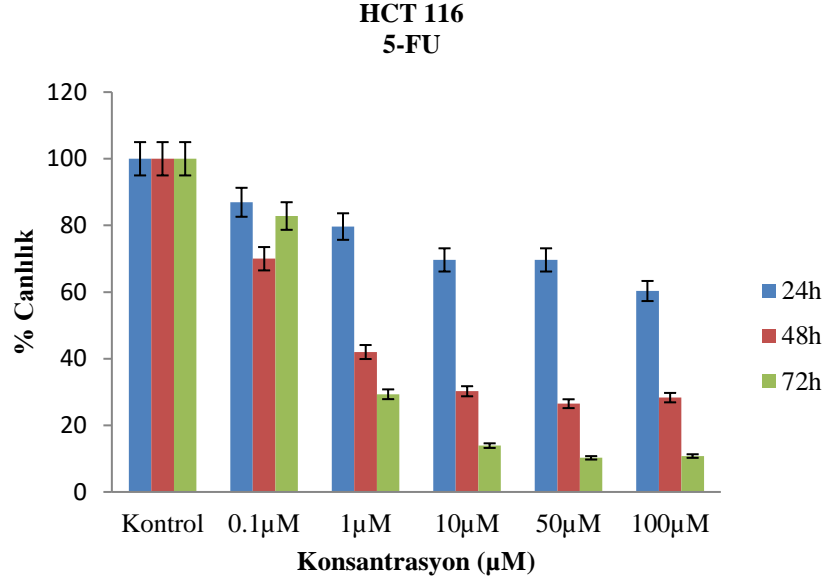
**Şekil 4.17:** *R. ribes* gövde metanol ekstresinin HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

**Tablo 4.6:** HT-29 hücrelerine uygulanan *R.ribes*'in kök ve gövdesine ait ekstraktların IC<sub>50</sub> değerlerinin toplu gösterimi

<b>HT-29</b>	
<b>Ektrenin Adı</b>	<b>IC<sub>50</sub> değeri (µg/ml)</b>
Kök <i>n</i> -Hekzan	98,1±5,832
Kök Etil Asetat	75,37±10,22
Kök Metanol	82,68±4,062
Gövde <i>n</i> -Hekzan	107,9±2,081
Gövde Etil Asetat	439,1±8,561
Gövde Metanol	275,5±1,682

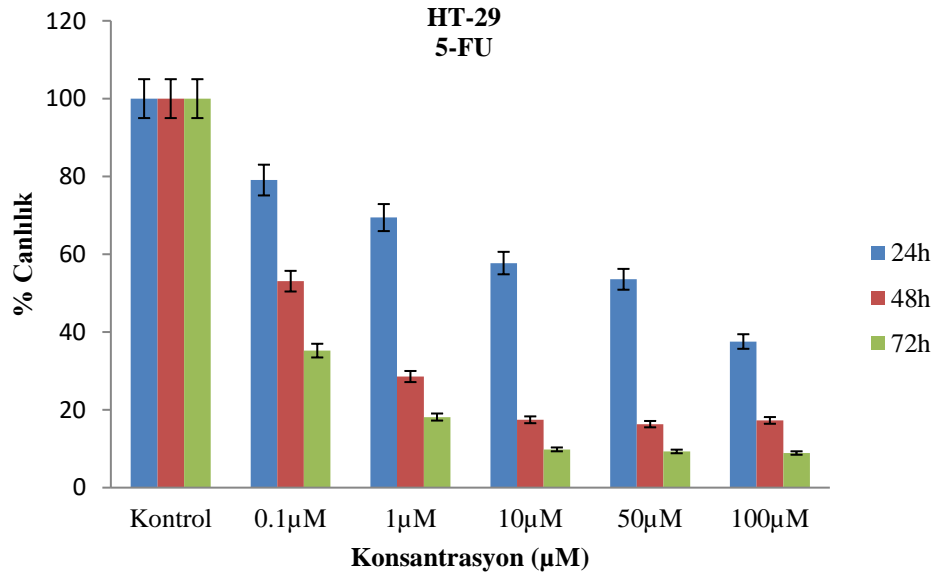
#### 4.5.2. 5-FU'nun HCT 116 ve HT-29 Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksite Analiz Sonuçları

5-FU'nun stok konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde hazırlanmıştır. 5-FU'nun 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 50 µM ve 100 µM konsantrasyondaki 4 farklı dozu 24, 48, ve 72 saat boyunca HCT 116 hücre hattına uygulanmıştır. 5-FU'nun IC<sub>50</sub> değeri XTT testine göre 48. saatte 0,55 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18).



**Şekil 4.18:** 5-FU'nun HCT 116 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

5-FU'nun 0,1 μM, 1 μM, 10 μM, 50 μM ve 100 μM konsantrasyondaki 4 farklı dozu 24, 48, ve 72 Saat boyunca HT-29 hücre hattına uygulanmıştır. 5-FU'nun IC<sub>50</sub> değeri XTT testine göre 48. Saatte 0,35 μM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.19).



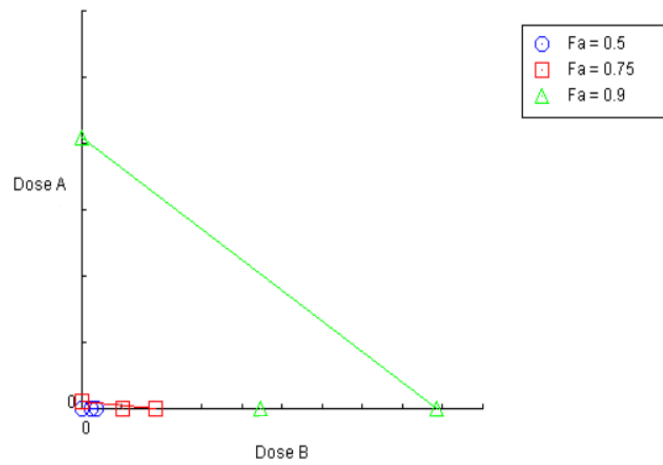
**Şekil 4.19:** 5-FU'nun HT-29 hücre hattındaki doz ve zaman bağımlı yüzde canlılık değerleri

#### 4.6. Kombinasyon analizi

XTT hücre canlılığı analiz yöntemi ile 5-FU ve *R. ribes* 'e ait KM ekstresinin her iki hücre hattı için 48. saatteki etkin  $IC_{50}$  dozlarının birbirine oranları ( $IC_{50-5-FU}/IC_{50-KM}$ ) HCT 116 için 1:50; HT-29 için ise 1:212,5 olarak belirlenmiştir. Kombinasyon deneyinde bu oranbaz alınarak her bir ajanın katlarıyla oluşturulan 12 farklı doz hücrelere uygulanmış ve canlılık testi tekrarlanmıştır. Her bir doz için elde edilen % sitotoksite değerleri Compusyn programına girilmiştir. HCT 116 hücrelerine uygulanan 5-FU ve KM'nin kombine etkisinin doz yanıt eğrisi ve Chou Talalay medyan etki denklemi belirlenmiş olup kombine doz yanıt ilişkisinin doğrusal bir regresyon (0,97582) gösterdiği belirlenmiştir. İzobologram analizine göre kombinasyon indeksi  $ED_{50}$  için 0,88140 (5-FU 0,53457  $\mu M$ , KM 26,7283  $\mu M$ ) ile hafif sinerjizim,  $ED_{75}$  için 0,59362 (5-FU 2,27591  $\mu M$ , KM 113,795  $\mu M$ ) ile sinerjizim,  $ED_{90}$  için 0,50820 (5-FU 9,68968  $\mu M$ , KM 484,484  $\mu M$ ) ile de sinejizim gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.7).

**Tablo 4.7:**HCT 116 hücre hattında 5-FU ve KM kombinasyon indeksi

Kombinasyon	Kombinasyon indeksi				
	$ED_{50}$	$ED_{75}$	$ED_{90}$	Dm	r
5-FU+KM	0,88140	0,59362	0,50820	27,2628	0,97582

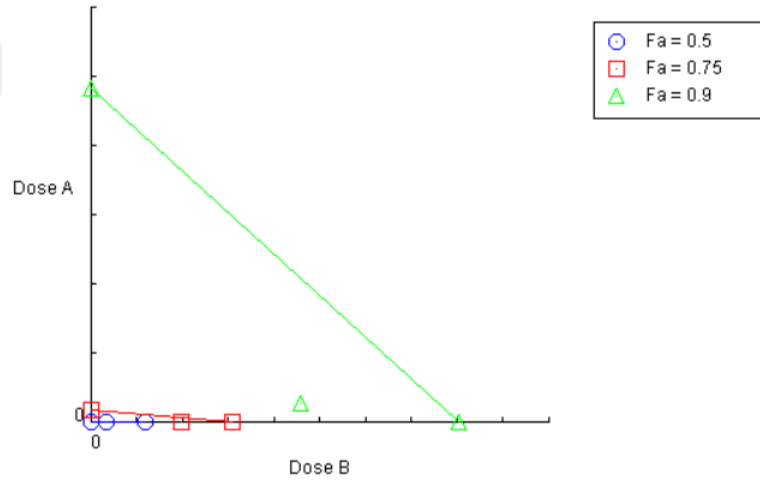


**Şekil 4.20:** HCT 116 hücrelerine kombinasyon muamelesinin ardından elde edilen izobologram analiz grafiği

HT-29 hücreleri için de uygulanan 5-FU ve KM'nin kombine etkisinin doz yanıt eğrisi ve Chou Talalay medyan etki denklemi belirlenmiş olup kombine doz yanıt ilişkisinin doğrusal bir regresyon (0,95177) gösterdiği belirlenmiştir. İzobologram analizine göre kombinasyon indeksi ED<sub>50</sub> için 0,88678 (5-FU 0,16601 µM, KM 35,2768 µg/ml) ile hafif sinerjizm, ED<sub>75</sub> için 1,0096 (5-FU 1,15055 µM, KM 244,492 µg/ml) ile additif, ED<sub>90</sub> için 1,90563 (5-FU 7,97409 µM, KM 1694,49 µg/ml) ile antagonizm gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8:** HT-29 hücre hattında 5-FU ve kök-metanol kombinasyon indeksi

Kombinasyon	Kombinasyon indeksi				
	ED <sub>50</sub>	ED <sub>75</sub>	ED <sub>90</sub>	Dm	r
5-FU+KM	0,88678	1,00960	1,90563	35,4429	0,95177



**Şekil 4.21:** HT-29 hücresine kombinasyon muamelesinin ardından elde edilen izobologram analiz grafiği

#### 4.7. miRNA Ekspresyon Analizi Sonuçları

miRNA ekspresyon profili web tabanlı “Qiagen RT<sup>2</sup> Profiller PCR Array Data Analiz Programı Versiyon 3.5” kullanılarak hesaplanmıştır. HT-29 ve HCT 116 hücrelerine ekstre, 5-FU ve her ikisinin de kombine olarak uygulandığı IC<sub>50</sub> dozlarının, muamele edilmemiş hücrelerle kıyaslandığında, miR-200 ailesine ait dört miRNA'nın ekspresyon değişiklikleri Tablo 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir.

**Tablo 4.9:** HCT 116 hücrelerine uygulanan KM, 5-FU ve kombine 5-FU+KM'nin IC<sub>50</sub> dozlarının miR-200 ailesi ekspresyonu üzerinde ki etkisi (\*: p<0,05)

<b>HCT 116</b>	<b>KAT ARTIŞI</b>		
	<b>KM</b>	<b>5-FU</b>	<b>5-FU+KM</b>
<b>miR-200a</b>	8,63*	34,1*	35,88*
<b>miR-200b</b>	6,57*	11,12*	13,69*
<b>miR-200c</b>	18,25*	68,59*	23,59
<b>miR-141</b>	7,52*	40,93	12,82

HCT 116 hücrelerinin analiz sonuçlarına göre, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında tümör baskılayıcı fonksiyon gösteren miR-200a'nın ekspresyonunu KM'nin 8,63; 5-FU'nun 34,1; 5-FU+KM'nin 35,88 kat, miR-200b'nin ekspresyonunu KM'nin 6,57; 5-FU'nun 11,12; 5-FU+KM'nin 13,69 kat, miR-200c'nin ekspresyonunu KM'nin 18,25; 5-FU'nun 68,59; 5-FU+KM'nin 23,59 kat, miR-141'in ekspresyonunu ise KM'nin 7,52; 5-FU'nun 40,93; 5-FU+KM'nin 12,82 kat arttırdığı belirlenmiştir.

**Tablo 4.10:** HT-29 hücrelerine uygulanan KM, 5-FU ve Kombine 5-FU+KM'nin IC<sub>50</sub> dozlarının miR-200 ailesi ekspresyonu üzerinde ki etkisi (\*: p<0,05)

<b>HT-29</b>	<b>KAT ARTIŞI</b>		
	<b>KM</b>	<b>5-FU</b>	<b>5-FU+KM</b>
<b>miR-200a</b>	7,74*	2,48	6,51*
<b>miR-200b</b>	3,02*	1,33	1,9*
<b>miR-200c</b>	3,19*	1,52*	1,72*
<b>miR-141</b>	10,98*	1,88	4,58

HT-29 hücrelerinin analiz sonuçlarına göre, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında miR-200a'nın ekspresyonunu KM'nin 7,74; 5-FU'nun 2,48; 5-FU+KM'nin 6,51 kat, miR-200b'nin ekspresyonunu KM'nin 3,02; 5-FU'nun 1,33; 5-FU+KM'nin 1,9 kat, miR-200c'nin ekspresyonunu KM'nin 3,19; 5-FU'nun 1,52; 5-FU+KM'nin 1,72 kat, miR-141'in ekspresyonunu ise KM 10,98; 5-FU 1,88; 5-FU+KM 4,58 kat arttırdığı belirlenmiştir.

#### 4.8.Genlerin Ekspresyon Analizi Sonuçları

miRWalk gibi veri tabanları ve literatür araştırmalarının ardından miR-200a/b/c ve miR-141'in regüle ettiği düşünülen hedef genlerin ekspresyon analizlerinde de "Qiagen RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analiz programı Versiyon 3.5" kullanılmıştır. HT-29 ve HCT 116 hücrelerine ekstre, 5-FU ve her ikisinin de kombine olarak uygulandığı IC<sub>50</sub> doz grupları, muamele edilmemiş hücrelerle kıyaslandığında, miR-200 ailesinin hedefi olduğu düşünülen genlerin ekspresyon seviyesindeki değişiklikler Tablo 4.11 ve 4.12'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.11:** HCT 116 hücrelerine uygulanan KM (ekstre), 5-FU ve Kombine 5-FU+KM IC<sub>50</sub> dozlarının miR-200 ailesi hedef genleri ve hedef genlerle ilişkili olabilecek apoptoz, hücre döngüsü, EMTve TGFβ yolağı genlerinin ekspresyonları üzerindeki etkisi (\*: p<0,05)

HEDEF GENLER	KAT DEĞİŞİKLİĞİ		
	KM	5-FU	5-FU+KM
<b>BCL-2</b>	3,4*	1,01	1,75*
<b>TP53</b>	1,38	1,1	1,54*
<b>XIAP</b>	6,31*	10,12*	5,34*
<b>FAP1</b>	1,61	1,06	1,9
<b>GATA4</b>	2,77*	7,27*	6,72*
<b>CDK6</b>	-1,55*	-3,34*	-5,35*
<b>CDNK1B</b>	1,23	-3,25*	-2,75*
<b>RND3</b>	-1,85*	1,45*	-4,23*
<b>ZEB1</b>	1,84*	1,44*	-1,03
<b>CDH1</b>	2,69*	2,33*	2*
<b>TGFβ1</b>	-1,65*	3,67*	-1,66*
<b>SMAD2</b>	-1,76*	-1,11	-1,84*
<b>SMAD3</b>	-2,4*	3,66	-1,02

<b>APOPTOZLA İLİŞKİLİ GENLER</b>	<b>KAT DEĞİŞİKLİĞİ</b>		
<b>BAX</b>	2,24*	1,37*	2,15*
<b>KASPAZ 3</b>	1,88*	1,82*	2,09*
<b>KASPAZ 7</b>	1,07	1,01	1,3
<b>KASPAZ 8</b>	1,49*	1,24	1,54*
<b>KASPAZ 9</b>	1,98	1,23	1,02
<b>CYCS</b>	3,19*	9,78	2,77*
<b>PPARG</b>	-1,86	-3,17	1,57
<b>CD95</b>	1,55	5,44*	2,05*
<b>HÜCRE DÖNGÜSÜ İLE İLİŞKİLİ GENLER</b>	<b>KAT DEĞİŞİKLİĞİ</b>		
<b>CDK4</b>	-1,54*	-2,61*	-1,19*
<b>CCND1</b>	-10,99*	-4,20*	-13,66*
<b>CCND2</b>	1,86	1,45	5,81*
<b>CCND3</b>	-1,25*	-1,75*	-1,82*
<b>p21</b>	1,93	6,48*	2,31
<b>Rel A</b>	-1,17	2,61*	-1,28
<b>EMT İLE İLİŞKİLİ GENLER</b>	<b>KAT DEĞİŞİKLİĞİ</b>		
<b>CDH2</b>	-1,12	-1,64*	-1,37*
<b>TGFβ YOLAĞI GENLERİ</b>	<b>KAT DEĞİŞİKLİĞİ</b>		
<b>TGFβR1</b>	-1,24*	-1,08	-1,52*
<b>TGFβR2</b>	-1,07	1,17	1,32
<b>SMAD4</b>	-1,17	-1,46	-1,03
<b>SMAD7</b>	1,06	1,87	1,09



**Tablo 4.12:** HT-29 hücrelerine uygulanan KM (ekstre), 5-FU ve Kombine 5-FU+KM IC<sub>50</sub> dozlarının miR-200 ailesi hedef genleri ve hedef genlerle ilişkili olabilecek apoptoz, hücre döngüsü, EMT ve TGFβ yolağı genlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisi (\*: p< 0,05)

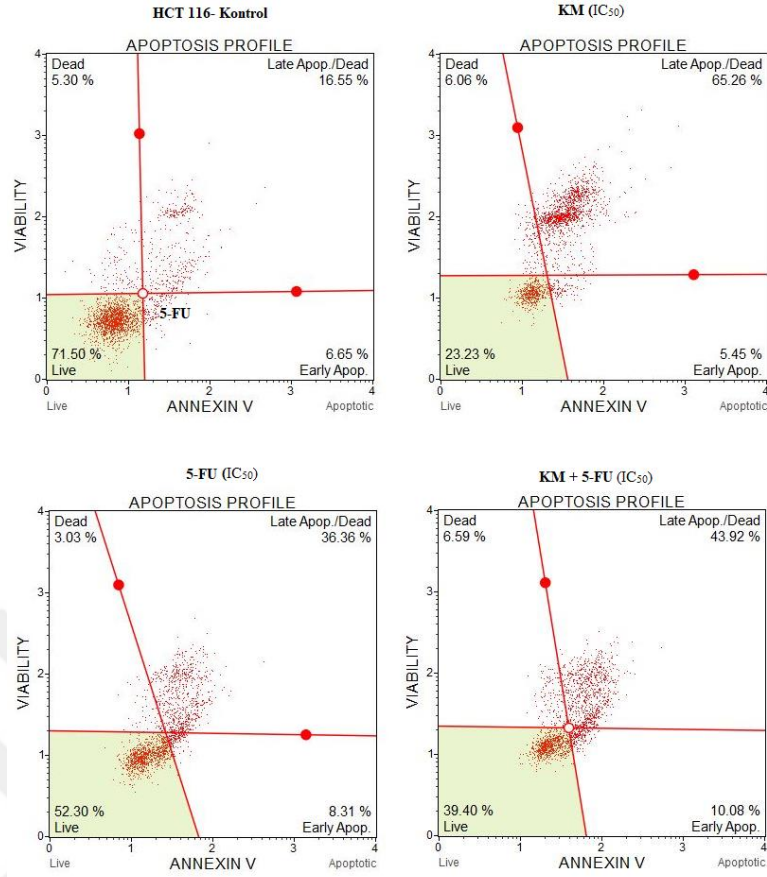
HEDEF GENLER	KAT DEĞİŞİKLİĞİ		
	KM	5-FU	5-FU+KM
<b>BCL-2</b>	1,16	2,68*	2,33*
<b>p53</b>	1,05	1,21	1,02
<b>XIAP</b>	1,92*	1,13	1,14
<b>FAP1</b>	1,02	1,06	1,09
<b>GATA4</b>	14,35*	15,96*	36,67*
<b>CDK6</b>	-4,97*	-1,74*	-3,18*
<b>CDNK1B</b>	1,44	1,38	1,3
<b>RND3</b>	-2,05*	-1,39	-1,2
<b>ZEB1</b>	1,46	-1,45	1,13
<b>CDH1</b>	2,38*	-1,01	1,73*
<b>TGFβ1</b>	4,78*	-7,11*	6,9*
<b>SMAD2</b>	1,05	1,13	1,19
<b>SMAD3</b>	1,29	1,15	1,11
APOPTOZLA İLİŞKİLİ GENLER	KAT DEĞİŞİKLİĞİ		
<b>BAX</b>	1,02	1,42*	1,08
<b>KASPAZ 3</b>	1,05	1,91*	1,24*
<b>KASPAZ 7</b>	1,99*	1,06	1,91*
<b>KASPAZ 8</b>	1,02	1,73*	1,44
<b>KASPAZ 9</b>	1,28	1,15	1,3
<b>CYCS</b>	1,82*	1,16	1,57
<b>PPARG</b>	-3,8	-1,49	-1,16
<b>CD95</b>	3,6*	1,53	3,19*

<b>HÜCRE DÖNGÜSÜ İLE İLİŞKİLİ GENLER</b>	<b>KAT DEĞİŞİKLİĞİ</b>		
<b>CDK4</b>	-1,5*	-1,52*	1,44*
<b>CCND1</b>	-2,82*	-1,39	1,17
<b>CCND2</b>	-8,57*	1,57*	-3,69*
<b>CCND3</b>	-3,30*	1,33	-2,56*
<b>p21</b>	2,13*	2,35*	4,02*
<b>Rel A</b>	-1,62*	2,99	-2,32*
<b>EMT İLE İLİŞKİLİ GENLER</b>	<b>KAT DEĞİŞİKLİĞİ</b>		
<b>CDH2</b>	-1,46*	-1,10	1,76*
<b>TGFβ YOLAĞI GENLERİ</b>	<b>KAT DEĞİŞİKLİĞİ</b>		
<b>TGFβR1</b>	1,27	1,24	-1,16
<b>TGFβR2</b>	1,30	1,34	-1,24
<b>SMAD4</b>	-4,17*	-2,68*	-4,16*
<b>SMAD7</b>	2,82*	1,95*	2,86*

#### **4.9. Apoptoz Analizi**

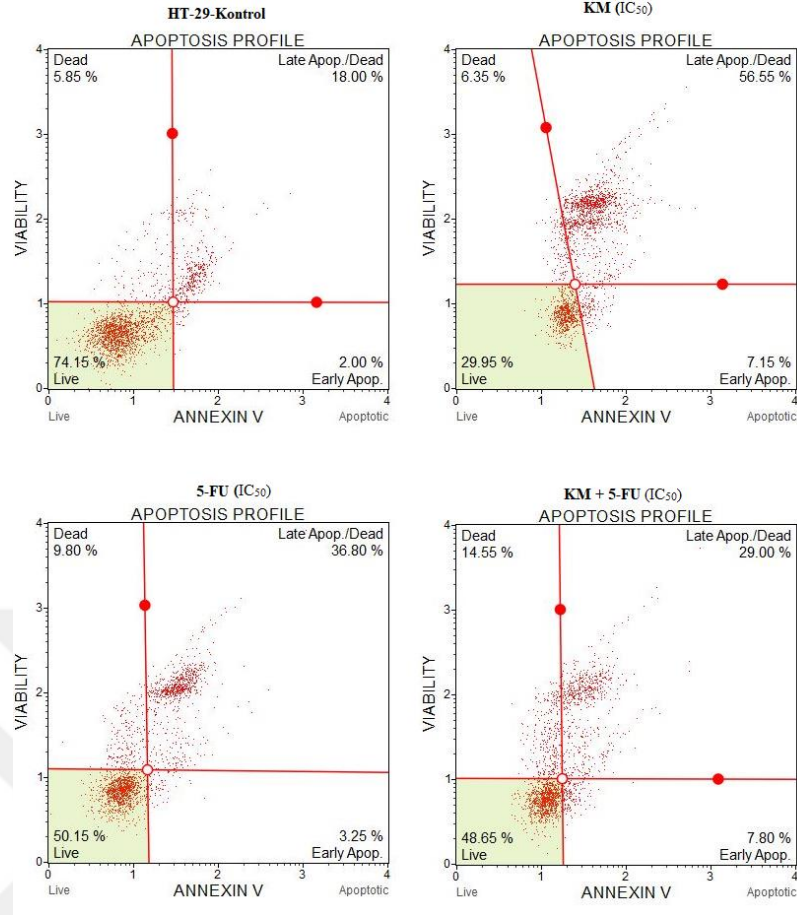
##### **4.9.1. Annexin V Analizi Sonuçları**

MUSE AnnexinV & Dead Cell Kiti ile gerçekleştirilen anneksin V analizi için HCT 116 hücrelerine KM, 5-FU ve KM+5-FU'nun IC<sub>50</sub> dozları uygulanarak 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, doz gruplarının toplam apoptoz yüzdesinin KM grubunda 47,51, 5-FU grubunda 21,47, KM+5-FU grubunda ise 30,8 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.22).



**Şekil 4.22:** HCT 116 kontrol grubu hücrelerine göre doz grubundaki apoptotik etkinin anneksin V yöntemi ile gösterilmesi

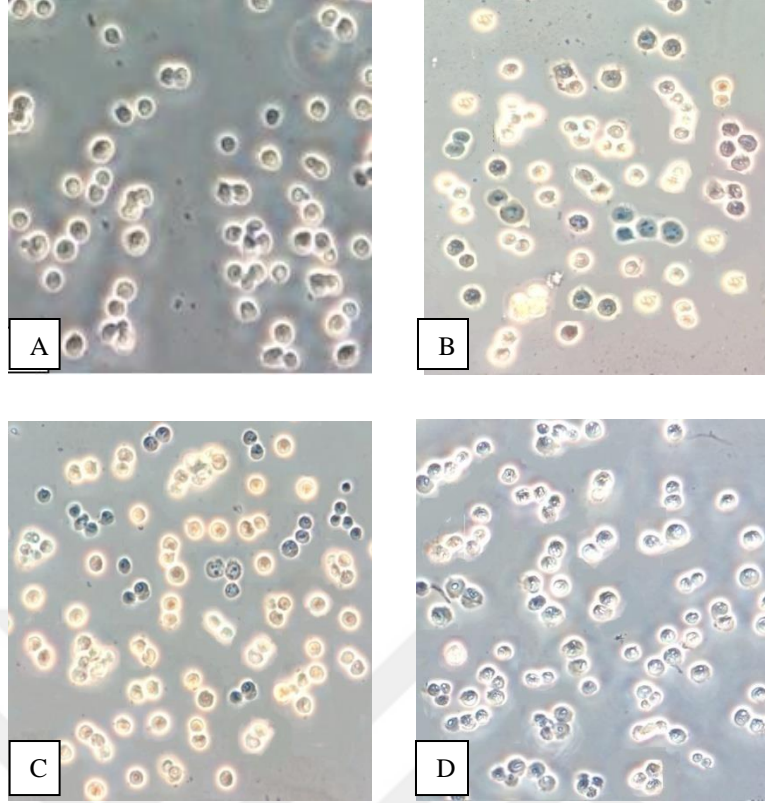
HT-29 hücrelerinin sonuçlarına göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, doz gruplarının toplam apoptoz yüzdesinin KM grubunda 43,7; 5-FU grubunda 20,05; KM+5-FU grubunda ise 36,8 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.23).



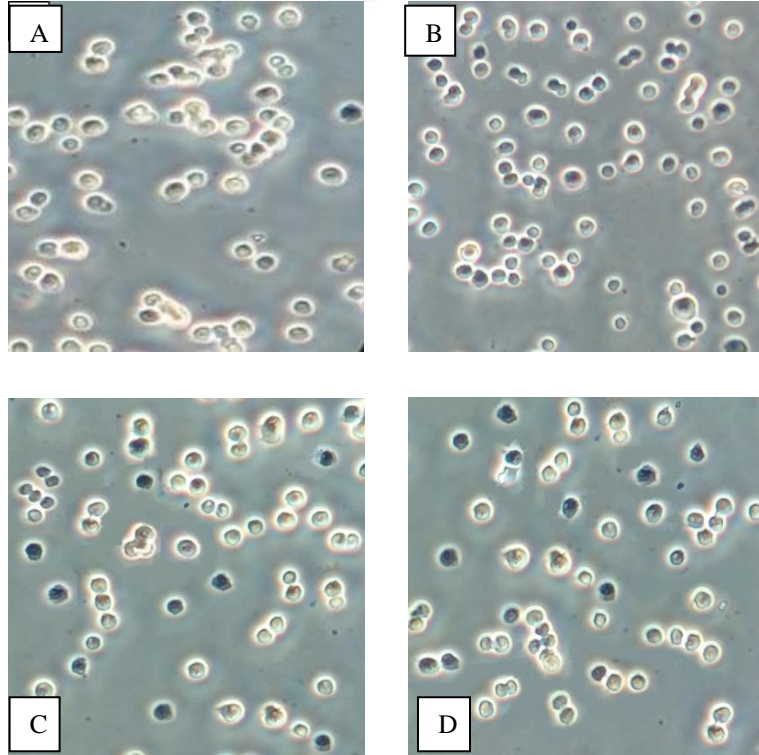
Şekil 4.23: HT-29 kontrol grubu hücrelerine göre doz grubundaki apoptotik etkinin aneksin V yöntemi ile gösterilmesi

#### 4.9.2. TUNEL Analizi Sonuçları

Apoptoza uğrayan hücrelerin görüntülenmesi için DeadEnd™ kolorimetrik TUNEL Sistemi kullanılmıştır. Her bir doz (KM, 5-FU, KM+5-FU) ve kontrol grubu için üç adet lam hazırlanmıştır. Lamaların görüntülenmesi ise 20X büyütmedeki inverted mikroskop ile gerçekleştirilmiştir. Apoptotik yüzdenin hesaplanması için her lamdan rastgele dört alan seçilmiştir (Şekil 4.24 ve 4.25).



**Şekil 4.24:** HCT 116 hücrelerinde kontrol ve doz gruplarının 48 saatlik muamelenin ardından TUNEL yöntemi sonuçlarının inverted mikroskop altında görüntülenmesi ([A]-Kontrol; [B]-KM; [C]-5-FU; [D]-KM+5-FU)



**Şekil 4.25:** HT-29 hücrelerinde kontrol ve doz gruplarının 48 saatlik muamelenin ardından TUNEL yöntemi sonuçlarının inverted mikroskop altında görüntülenmesi ([A]-Kontrol; [B]-KM; [C]-5-FU; [D]-KM+5-FU)

HCT 116 hücrelerinde; kontrol grubu hücreleriyle kıyaslandığında, KM IC<sub>50</sub> dozunun apoptoz yüzdesi 41,02; 5-FU IC<sub>50</sub> dozunun 25,89; KM+5-FU IC<sub>50</sub> dozunun ise 33,3 olarak belirlenmiştir. HT-29 hücrelerinde ise; KM IC<sub>50</sub> dozunun apoptoz yüzdesi 44,65; 5-FU IC<sub>50</sub> dozunun 31,95; KM+5-FU IC<sub>50</sub> dozunun ise 24,17 olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.13).

**Tablo 4.13:** Uygulanan doz gruplarının HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde ki apoptotik etkileri

Hücre	Doz Grubu	Apoptoz (%)
<b>HCT 116</b>	Kontrol	7,01±0,68
	KM (IC <sub>50</sub> )	41,02±3,48
	5-FU (IC <sub>50</sub> )	25,89±3,69
	KM+ 5-FU (IC <sub>50</sub> )	33,3±2,82
<b>HT-29</b>	Kontrol	4,86±0,93
	KM (IC <sub>50</sub> )	44,64±2,76
	5-FU (IC <sub>50</sub> )	31,95±2,64
	KM+ 5-FU (IC <sub>50</sub> )	24,17±3,13

#### 4.10. Hücre Döngüsü Fazlarının Flow Sitometrik Analizi

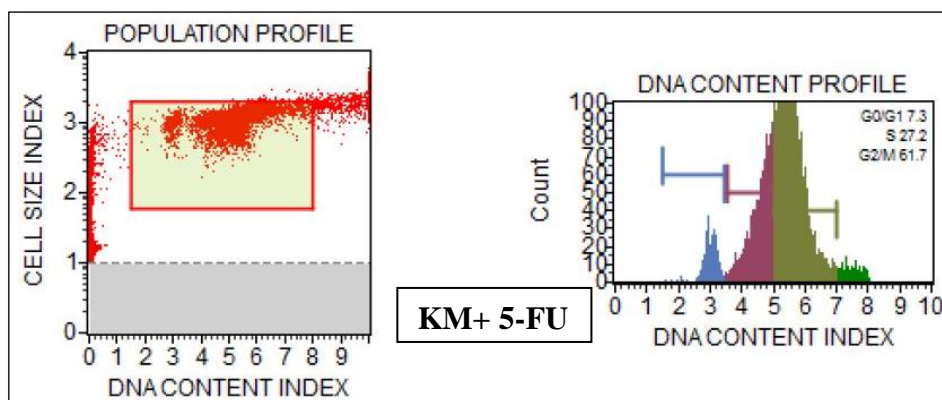
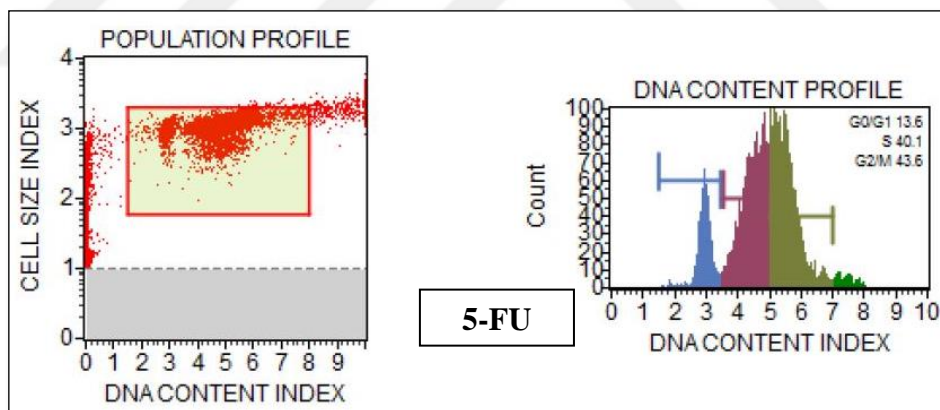
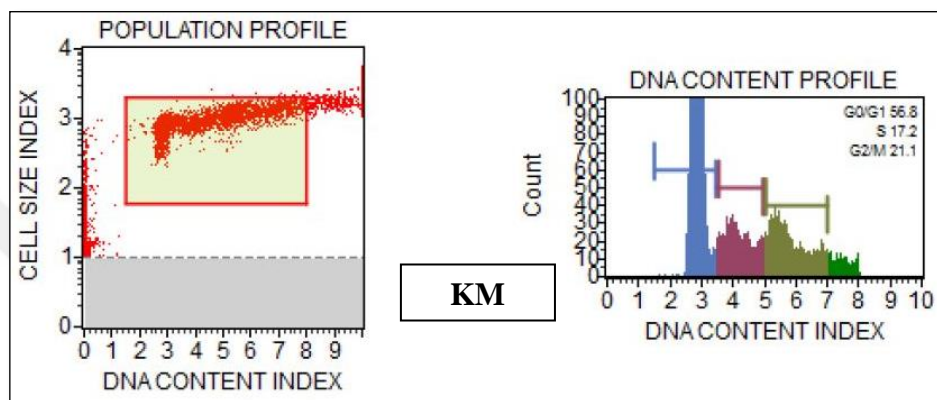
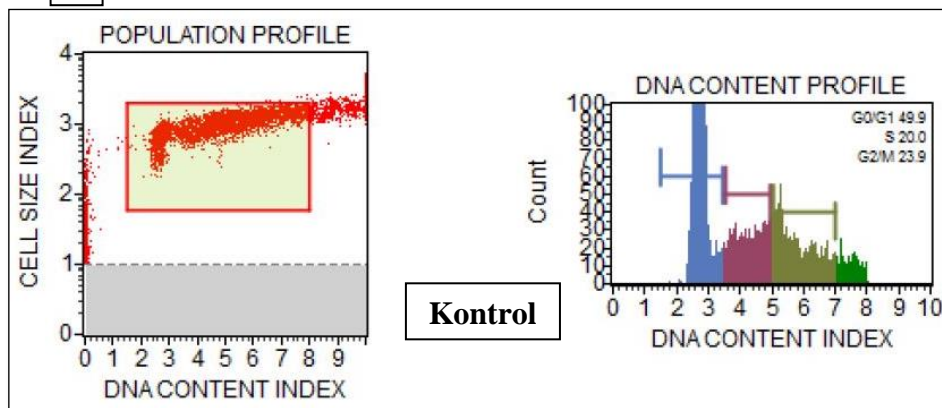
Doz gruplarıyla 48 saatlik inkübasyonun ardından HCT 116 ve HT-29 hücreleri tripsinize edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonları PI temelli Muse™ Hücre Döngüsü Kiti kullanılarak, PI işaretli hücrelerin hücre döngüsü fazlarının dağılımı, flow sitometri ile belirlenmiştir. Hücre döngüsünün her fazında ki hücre popülasyonları grafikler halinde gösterilmiştir (Şekil 4.26 ve 4.27).

Her iki hücre hattında doz (KM, 5-FU, KM+ 5-FU) ve kontrol gruplarının G0/G1, S ve G2/M hücre döngüsü fazlarındaki hücre popülasyonlarının yüzdeleri tablo 4.14'da gösterilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, HCT 116 hücrelerinde KM, 5-FU ve KM+ 5-FU doz grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla G0/G1, S+G2/M ve S+G2/M fazı hücre popülasyonlarında; HT-29 hücrelerinde ise G0/G1, S ve S fazı hücre popülasyonlarında artış belirlenmiştir.

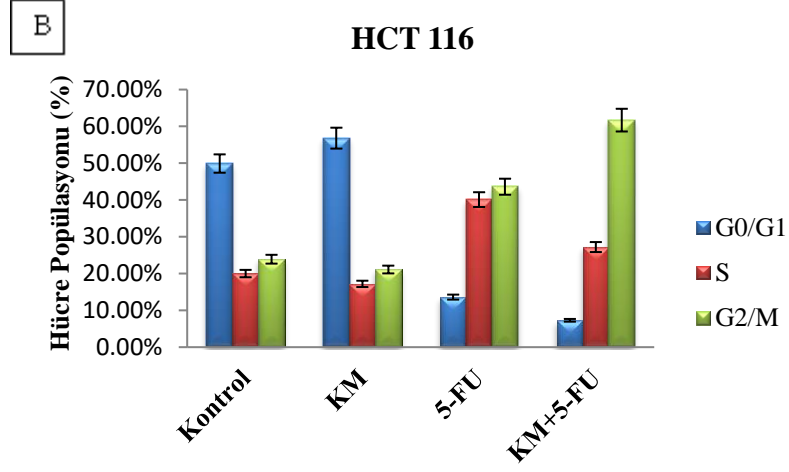
**Tablo 4.14:** HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde doz ve kontrol gruplarının her bir hücre döngüsü fazında ki hücre popülasyonu yüzdeleri

<b>HCT 116</b>			
	<b>G0/G1 (%)</b>	<b>S (%)</b>	<b>G2/M (%)</b>
<b>Kontrol</b>	49,9	20	23,9
<b>KM</b>	56,8	17,2	21,1
<b>5-FU</b>	13,6	40,1	43,6
<b>KM+ 5-FU</b>	7,3	27,2	61,7
<b>HT-29</b>			
	<b>G0/G1 (%)</b>	<b>S (%)</b>	<b>G2/M (%)</b>
<b>Kontrol</b>	42,2	23,8	29,7
<b>KM</b>	54,3	23	19,4
<b>5-FU</b>	36,2	37,6	23,7
<b>KM+ 5-FU</b>	35,9	31	27,7

A

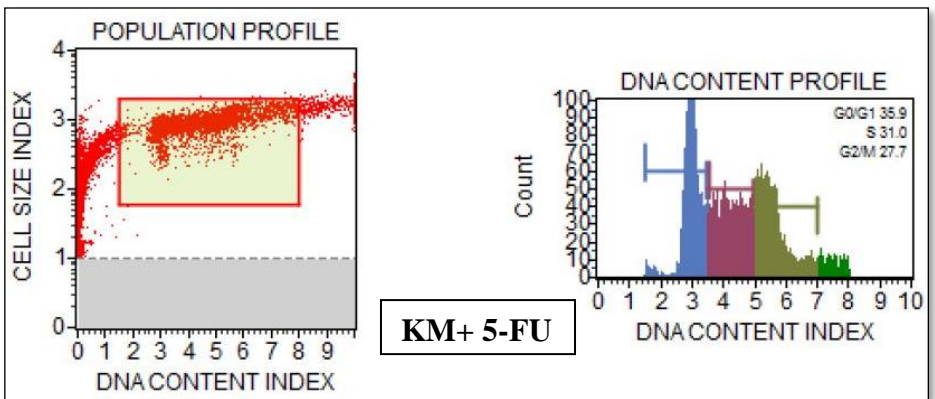
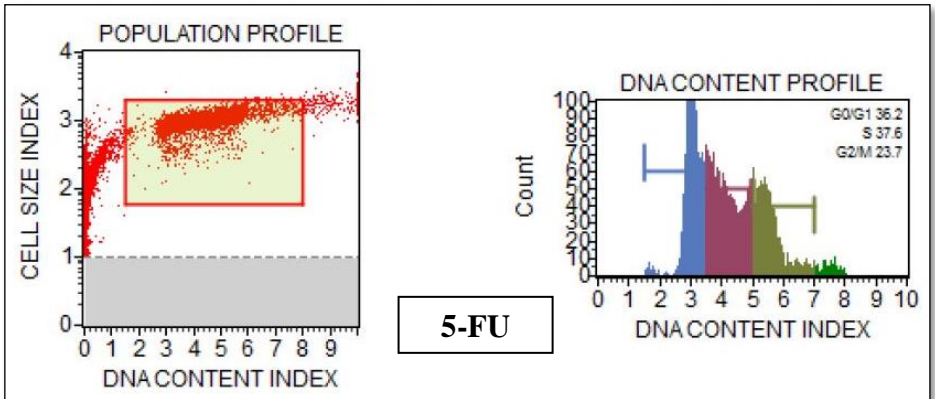
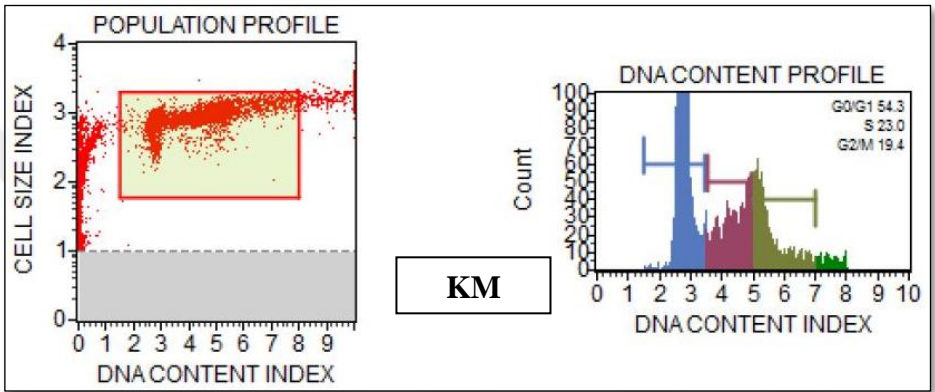
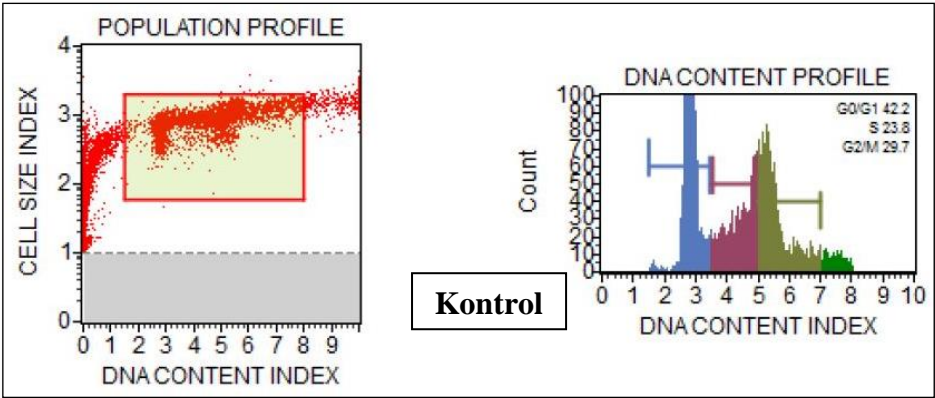


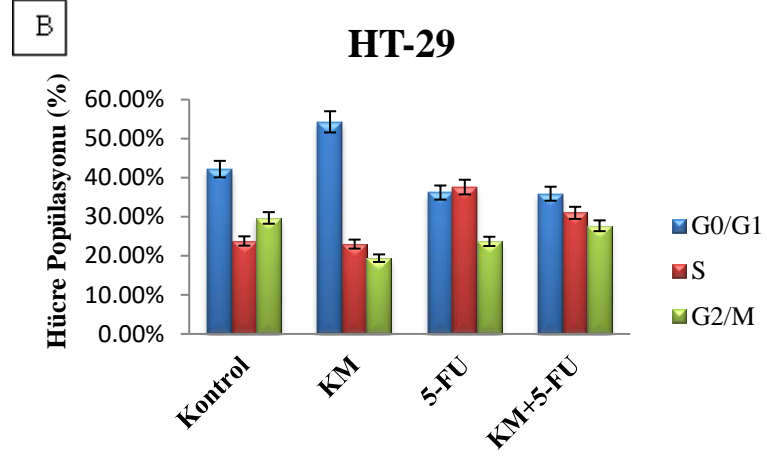




**Şekil 4.26:** A) HCT116 hücrelerinin doz (KM, 5-FU, KM+5-FU) ve kontrol gruplarının 48 saatlik inkübasyonun ardından flow sitometri floresan yoğunluk histogramları. B) Hücre döngüsünün her bir evresindeki hücre popülasyonunun yüzde grafiği

A

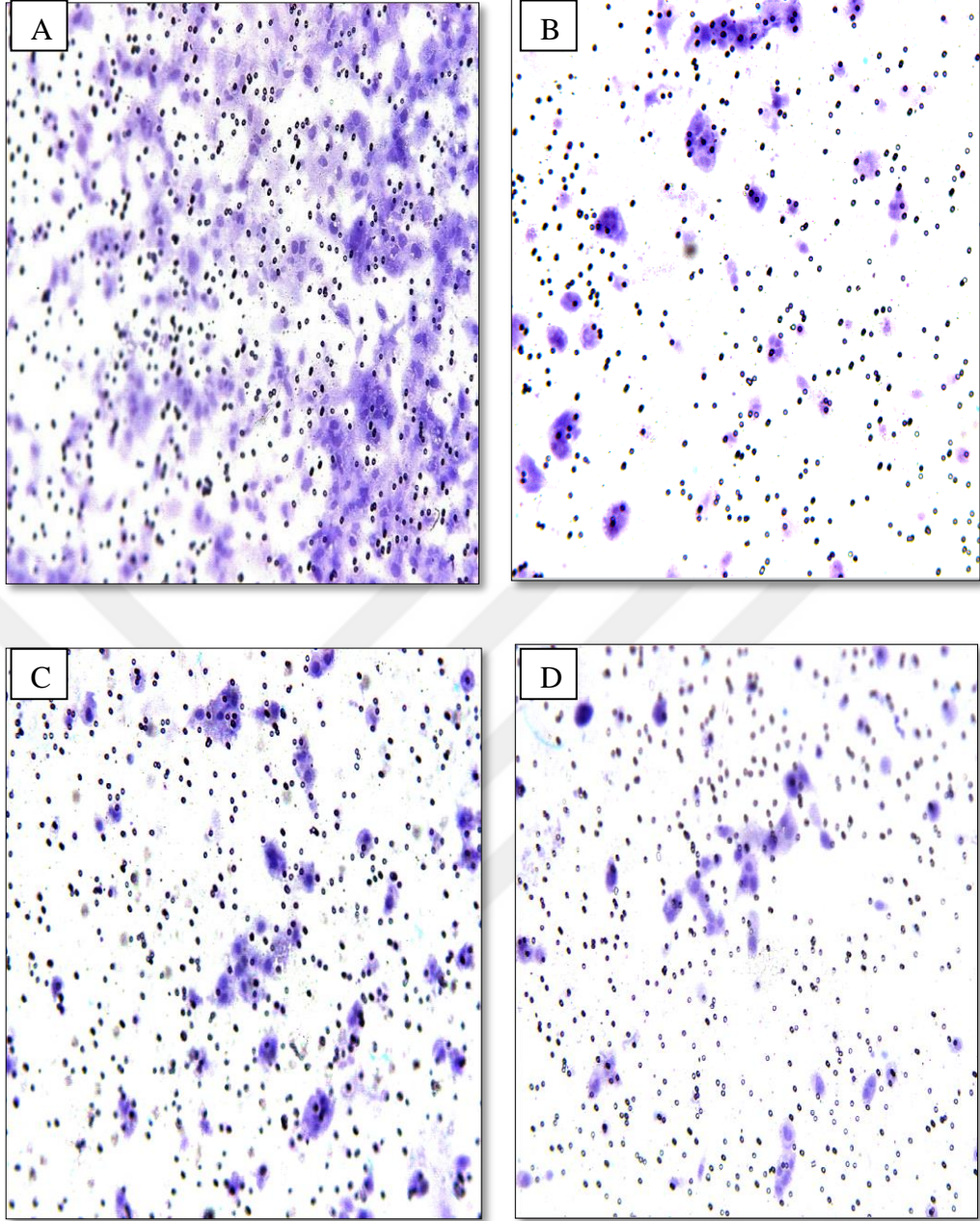




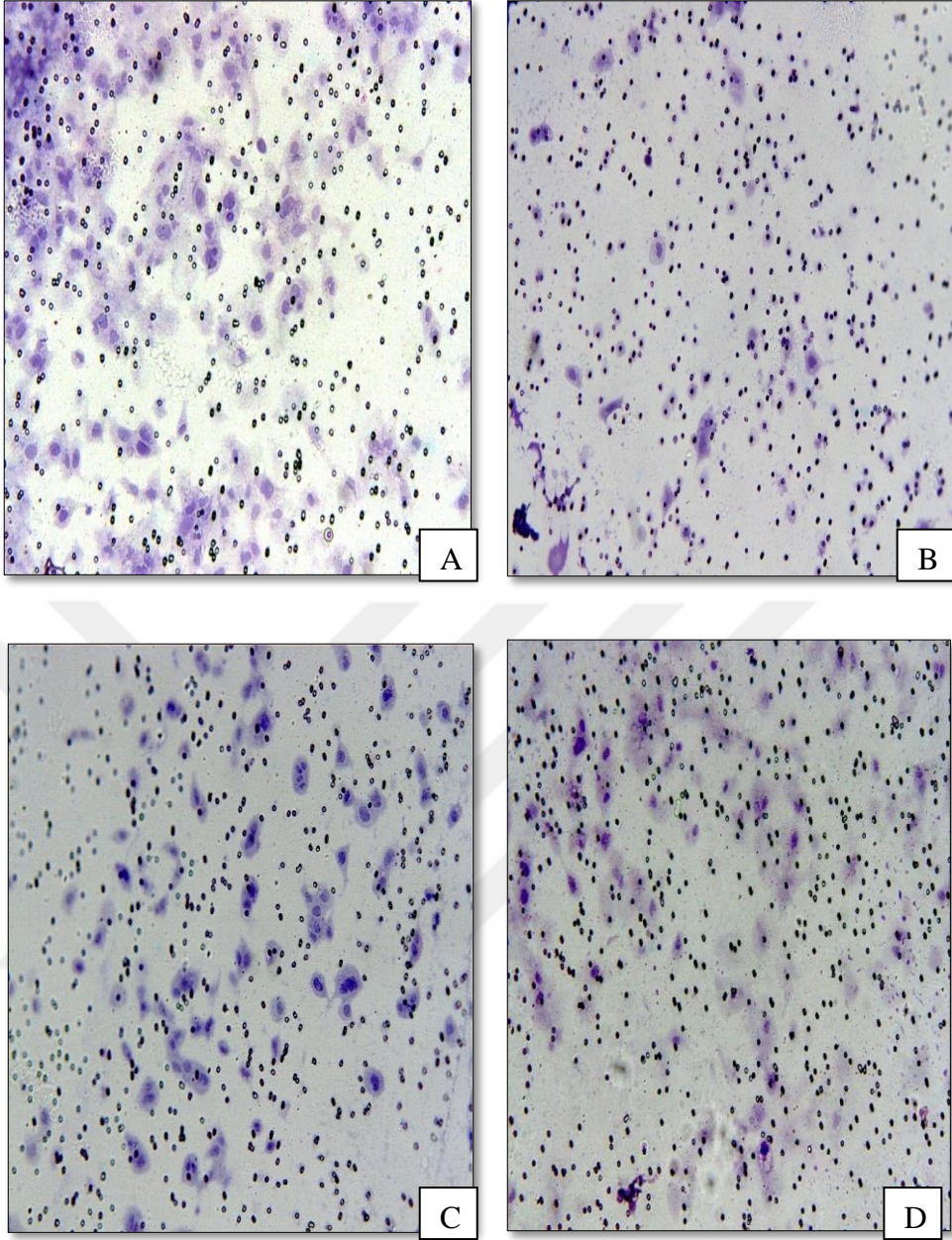
**Şekil 4.27:** HT-29 hücrelerinin doz (KM, 5-FU, KM+5-FU) ve kontrol gruplarının 48 saatlik inkübasyonun ardından flow sitometri florasan yoğunluk histogramları. B) Hücre döngüsünün her bir evresindeki hücre popülasyonunun yüzde grafiği

#### **4.11. Hücre İnvazyonu Analiz Sonuçları**

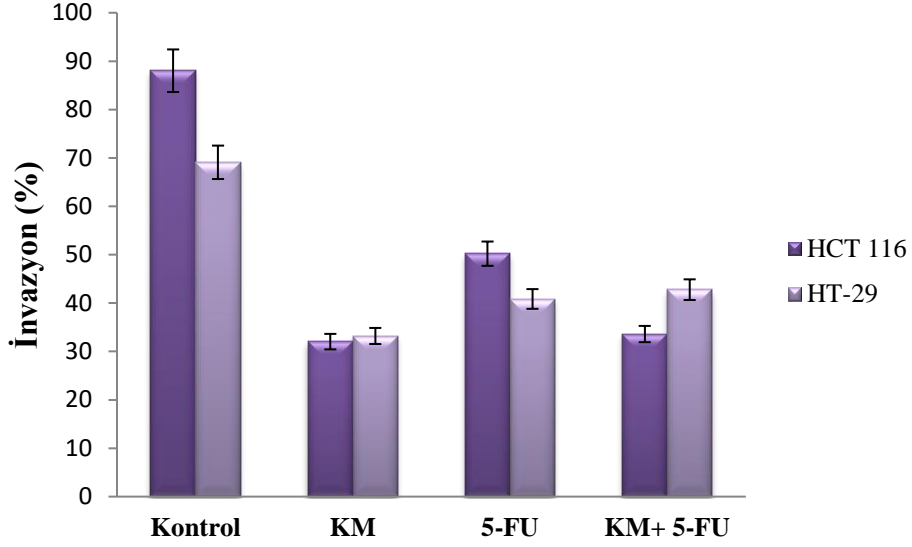
HCT 116 ve HT-29 hücre hatlarına uygulanan KM, 5-FU ve KM+5-FU doz gruplarının invazyon üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için matrigel invazyon testi gerçekleştirilmiştir. Testin tamamlanmasının ardından doz ve kontrol gruplarına ait hücreler mikroskop altında fotoğraflanmıştır (Şekil 4.28 ve 4.29). Sonrasında ise invaziv hücreler Zen programında sayılmış kontrol ve doz gruplarına ait invazyon yüzdeleri formüle göre hesaplanmıştır.



Şekil 4.28: HCT 116 hücre hattında sırasıyla kontrol (A), KM (B), 5-FU (C) ve KM+5-FU (D), gruplarının invazyon testi sonrası mikroskop görüntüleri



**Şekil 4.29:** HT-29 hücre hattında sırasıyla kontrol (A), KM (B), 5-FU (C) ve KM+5-FU (D), gruplarının invazyon testi sonrası mikroskop görüntüleri



Şekil 4.30: HCT 116 ve HT-29 hücrelerinin doz ve kontrol gruplarına ait invazyon yüzdeleri

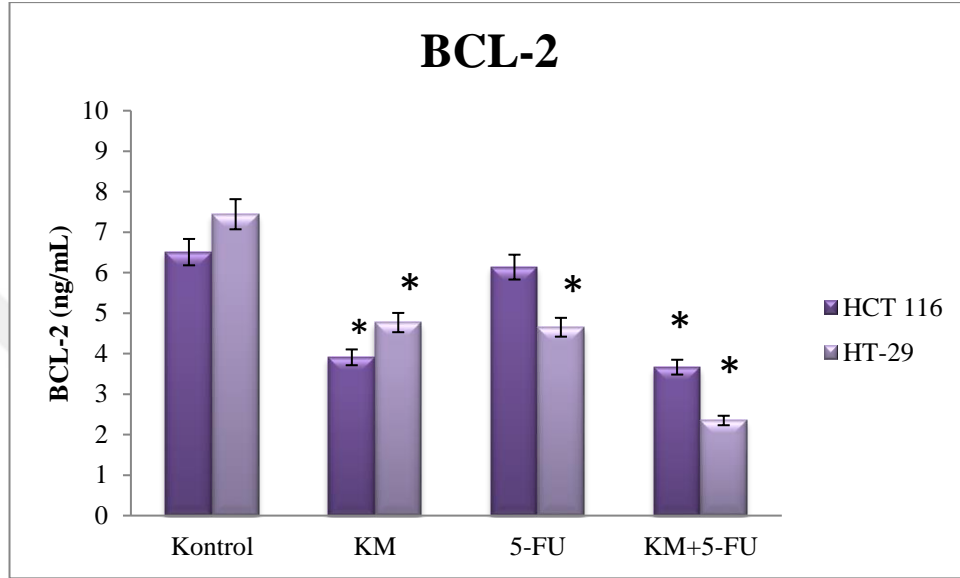
HCT 116 hücrelerinde kontrol grubunun invazyon oranı %88,02±3,86; KM, 5-FU ve KM+5-FU doz gruplarının invazyon oranı sırasıyla %32,03±1,66, %50,21±3,35, %33,6±2,76 olarak hesaplanmıştır (p<0,05). HT-29 hücrelerinde kontrol grubunun invazyon oranı %69,09±3,79; KM, 5-FU ve KM+5-FU doz gruplarının invazyon oranı ise sırasıyla %33,2±5,41, %40,85±3,32, %42,77±3,52 olarak hesaplanmıştır (p<0,05).

#### 4.12. ELISA Analiz Sonuçları

Doz gruplarının (KM, 5-FU, KM+ 5-FU) uygulandığı HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde BCL-2, ZEB1, GATA4, FAS/CD95 protein seviyeleri ELISA testi ile analiz edilmiştir. Her iki hücreye özgü IC<sub>50</sub> dozları uygulandıktan 48 saat sonra her bir örnek için hücre lizatı elde edilmiştir. Her bir örneğin BCL-2, ZEB1, GATA4, FAS/CD95 protein seviyelerini belirlemek için standartların 2/3. dereceden polinom grafikleri oluşturulmuştur. Her bir proteinin absorbansına karşı oluşturulan konsantrasyon grafiğinde elde edilen noktaların en iyi uyum gösterdiği polinom formülüne göre örneklerin konsantrasyonları belirlenmiştir. Kontrol gruplarına göre BCL-2, ZEB1, GATA4, FAS/CD95 düzeyindeki artış/azalış % olarak hesaplanmıştır. Her bir örnek 3 tekrarlı çalışılmış olup, p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

#### 4.12.1. BCL-2 ELISA Analiz Sonuçları

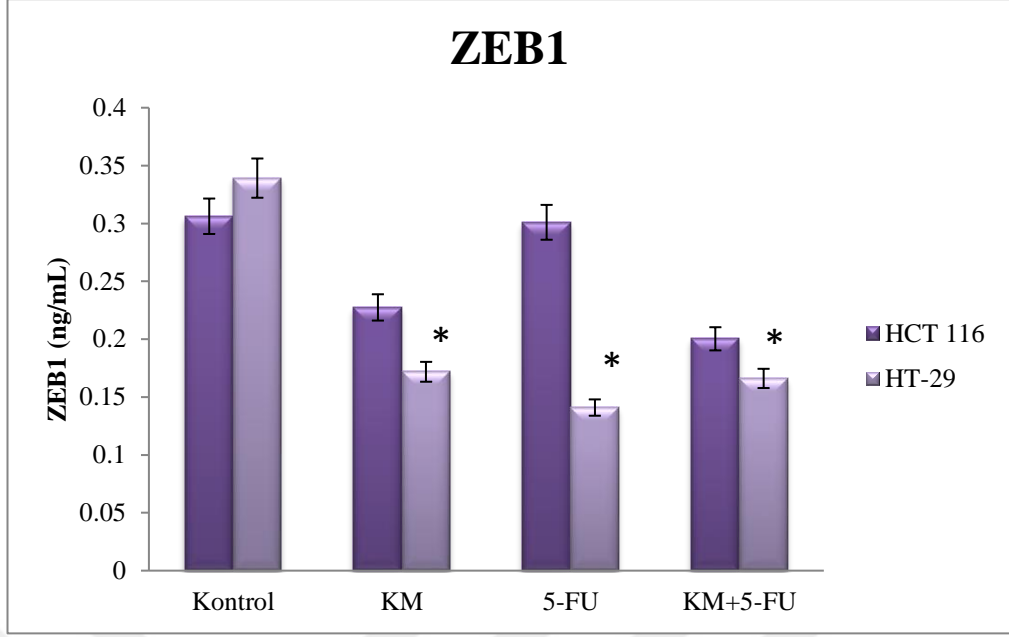
BCL-2 protein seviyesinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, KM, 5-FU ve KM+ 5-FU'nun birlikte uygulandığı doz grubu HCT 116 hücrelerinde sırasıyla %39,93±0,43; %5,68±0,008; %43,65± 0,54 oranında; HT-29 hücrelerinde ise %35,95±0,08; %37,95±0,0048; %68,43± 0,00048 oranında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31: Doz gruplarıyla 48 saatlik muamelenin ardından HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde BCL-2 proteini konsantrasyon farklılıkları (\* p<0,05)

#### 4.12.2. ZEB1 ELISA Analiz Sonuçları

Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında; ZEB1 protein seviyesinin, KM, 5-FU ve KM+ 5-FU'nun birlikte uygulandığı doz grubu HCT 116 hücrelerinde sırasıyla %25,72±0,28; %1,7 ± 0,05; %34,57±0,003; HT-29 hücrelerinde ise %49,33±0,019; %58,45±0,38; %51,02±0,004 oranında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.32).

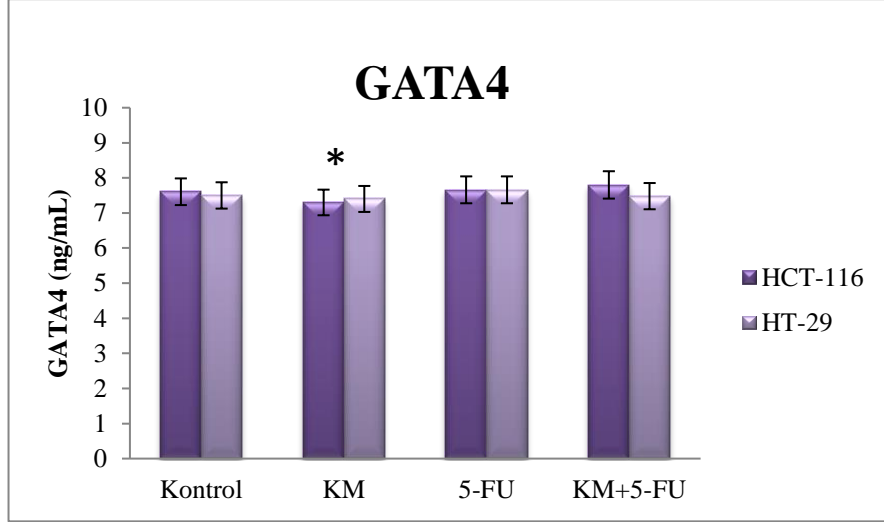


**Şekil 4.32:** Doz gruplarıyla 48 saatlik muamelenin ardından HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde ZEB1 proteini konsantrasyon farklılıkları (\* p<0,05)

#### 4.12.3. GATA4 ELISA Analiz Sonuçları

HCT 116 hücrelerinde GATA4 protein seviyesinin, kontrol hücrelerine göre KM'nin uygulandığı doz grubunda  $4,1 \pm 0,06$  oranında azaldığı, 5-FU ve KM+ 5-FU'nun uygulandığı doz gruplarında ise sırasıyla  $0,81 \pm 0,01$ ;  $2,56 \pm 0,03$  oranında artış gösterdiği belirlenmiştir. HT-29 hücrelerinde ise GATA4 protein seviyesinin, kontrol grubuna göre 5-FU'nun uygulandığı doz grubunda  $2,22 \pm 0,04$  oranında arttığı, KM ve KM+5-FU'nun uygulandığı doz gruplarında ise sırasıyla  $1,33 \pm 0,03$ ;  $0,26 \pm 0,004$  oranında azalış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.33).

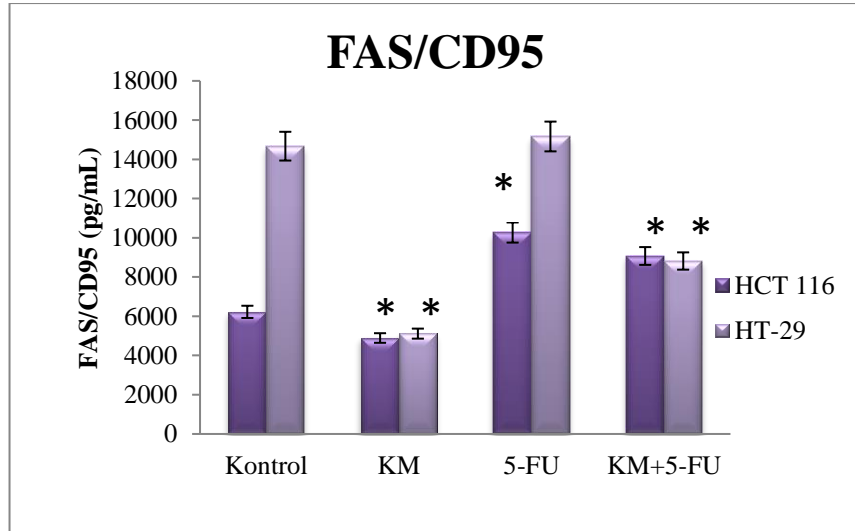




**Şekil 4.33:** Doz gruplarıyla 48 saatlik muamelenin ardından HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde GATA4 proteini konsantrasyon farklılıkları (\* p<0,05)

#### 4.12.4. FAS/CD95 ELİSA Analiz Sonuçları

HCT 116 hücrelerinde FAS/CD95 protein seviyesinin, kontrol hücrelerine göre KM'nin uygulandığı doz grubunda %27,43±4,25 oranında azaldığı, 5-FU ve KM+ 5-FU'nun uygulandığı doz gruplarında ise sırasıyla %52,47±8,8; %34,69 ±7,8 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir. HT-29 hücrelerinde ise FAS/CD95 protein seviyesinin, kontrol grubuna göre 5-FU'nun uygulandığı doz grubunda %3,3±0,03 oranında arttığı, KM ve KM+ 5-FU'nun uygulandığı doz gruplarında ise sırasıyla %65,14±0,04; %39,9±0,02 oranında azalış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.34).



**Şekil 4.34:** Doz gruplarıyla 48 saatlik muamelenin ardından HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde FAS/CD95 proteini konsantrasyon farklılıkları (\*: p<0,05)

## 5. TARTIŞMA

Kolorektal kanser dünya genelinde erken dönem ölüm nedenlerinin ilk sıralarında yer almaktadır. Kanserin önlenmesine ve yeni tedavi seçeneklerinin araştırılmasına yönelik yoğun çalışmalara rağmen ölümlerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Kanserin tedavisinde düzenli olarak kullanılan kemoterapötiklerin ve diğer güncel uygulamaların toksisiteleri, yüksek maliyetleri ve kanserli hücreleri sağlıklı hücrelerden ayırt edememelerinden dolayı spesifite/güvenlik yönüyle sınırlı bir potansiyele sahip oldukları bilinmektedir (Aggarwal ve ark., 2007)

Son yıllarda kanser araştırmalarında ciddi ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, kanserli hücrelerin tedaviye karşı direnç kazanmaları nedeniyle mevcut tedavi seçeneklerinin iyileştirilmesi ve alternatif tedavi yöntemlerinin belirlenmesi ihtiyacı giderek artmaktadır. Bu bağlamda, doğada kendiliğinden oluşan kimyasalların muazzam havuzunun bilimsel olarak keşfedilmesiyle yeni kemoterapötik ilaçlar için sürekli araştırma alanları oluşmaktadır. Güçlü anti-tümörejenik etkilere sahip birçok doğal bileşik tanımlanmış ve kanser gibi hastalıkların önlenmesinde 'sentetik' olandan 'doğal' olana kayma zaman ilerledikçe daha büyük bir önem kazanmıştır (Bravo 1998; Hollman ve ark. 1995; Lee ve ark. 1995). Bitkiler, kanserin birçok formunun tedavisi için yüksek derecede etkili geleneksel ilaçların birincil kaynağını oluşturmaktadır. Kanser tedavisi için kullanılan antikanser ajanların %60'ından fazlası bitki ya da mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Jain ve ark 2011).

Taksol, etoposid ve irinotekan gibi bileşenler bitkisel kaynaklı kemoterapötik ajan olarak kanserin tedavisinde uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Aynı zamanda fenolik asit, polifenol, flavanoit ve terpenoidler gibi farklı kimyasal yapıların fitokimyasal kompleks karışımlarını içeren bitkilerin, kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanıldığı durumlarda kemoterapötiklerin etkin dozunu düşürerek, toksik yan etkilerinin azalmasında etkili olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Ahmed ve ark 2013, Weidner ve ark 2015).

Türkiye'nin doğusunda geniş bir yayılım gösteren Polygonaceae familyasına ait *R. ribes* halk arasında ülser, diyabet, hipertansiyon gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmakta ve aynı zamanda hazmı kolaylaştırıcı ve antihelmintik olarak da tüketilmektedir (Abu-Irmaileh ve Afifi, 2003). Buradan hareketle mevcut

çalışmada *R. ribes*'in kök ve gövde kısımlarından elde edilen ekstrelerin tek başına ya da kemoterapötik bir ajan ile kombinlendiğinde antikarsinojenik bir özellik gösterip göstermeyeceğini belirlemek üzere ekstreler hem tek olarak ve hem de 5-FU ile kombinlenerek kolorektal kanser hücre hatlarına uygulanmış ve hücresel/moleküler düzeydeki etkiler çeşitli *in vitro* yöntemler kullanılarak ortaya konmaya çalışılmıştır.

Antioksidan aktivite DPPH yöntemi ile, antiproliferatif etki XTT Testi ile, biyoaktif madde içeriği LC-QTOF ile, miRNA ve hedef genlerinin ekspresyon farklılıkları RT-qPCR ile, morfolojik apoptoz bakımından farklılıklar TUNEL ve Anneksin V Testi ile, hücre döngüsü üzerindeki etkiler Cell Cycle Testi ile, hücresel invazyon üzerindeki etkiler Matrigel invazyon testi ile, transkript seviyesinde farklılık gösteren hedef genlerden 4'ünün protein düzeyindeki değişiklikleri ise ELISA Testi ile değerlendirilmiştir. *R. ribes*'in kök ve gövdesine ait tüm ekstrelerin antioksidan aktiviteleri ve antiproliferatif etkileri değerlendirilmiş, ancak LC-QTOF, RT-qPCR, TUNEL, anneksin V, hücre döngüsü, Matrigel-İnvazyon ve ELISA ileri analizlerine, XTT testi sonucuna göre 48. saatte en düşük dozda en yüksek sitotoksik etkiyi göstermesi nedeniyle sadece kök metanol ekstresi ile devam edilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında *R. ribes*'in kök ve gövde kısımları non-polardan polara doğru 3 farklı çözücüde (n-hekzan, etil asetat ve metanol) ekstre edilmiştir. Çözücüler uzaklaştırılarak her bir ekstrenin sabit tartım işleminin ardından % verimleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, verimi en yüksek ekstre %29,5 ile kök metanol, ikinci en yüksek verime sahip ekstre ise %11,82 ile gövde metanol olarak belirlenmiştir. Her iki kısma ait metanol ekstresinin de daha yüksek verime sahip olması, daha yoğun ve benzer biyoaktif bileşenleri içerebileceklerini düşündürmektedir.

Fenolik asitlerin kanser gibi çeşitli hastalıklarda rol oynayan serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen/nitrojen türlerine karşı güçlü antioksidanlar oldukları bilinmektedir (Yu ve ark., 2002). Fenolik asitlerin hidroksil türevleri, serbest radikallere bir proton bağlayarak radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırdıktan sonra yerine fenoksil radikali oluştururlar. Böylece fenolik asitler, yeni serbest radikallerin oluşum döngüsünün kırılmasını sağlayarak serbest radikal süpürme özelliği gösterirler (Pereira ve ark., 2009).

Çalışmada tüm ekstrelerin toplam fenolik-flavanoit içerik miktarlarının ve antioksidan aktivitelerinin analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre toplam fenolik madde içeriğinin en yüksek olduğu ekstre 63,83±0,066 GAE mg/g ile kök metanol olarak belirlenmiştir. Kök ve gövde kısımlarına ait üç ekstre arasında toplam fenolik madde içeriğinin en yüksekten en düşüğe doğru sıralamasının ise metanol > etil asetat > *n*-hekzan olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan solventler arasında en polar özellik gösteren metanoldür. Bu nedenle fenolik bileşiklerin en yüksek metanol ekstresinde belirlenmesi literatürle de uyumludur.

Toplam flavanoit madde miktarları değerlendirildiğinde ise sonuçların toplam fenolik miktarlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür. Toplam flavanoit madde içeriğinin en yüksek olduğu ekstre 63,31±0,00006 ile QE mg/g ile kök metanol olarak belirlenmiştir. Kök ve gövde kısımlarına ait üç ekstre arasında toplam flavanoit madde içeriği bakımından en yüksekten en düşüğe doğru sıralamanın da metanol>etil asetat>*n*-hekzan şeklinde olduğu görülmüştür.

ROS olarak adlandırılan serbest radikallerin birçoğu hücrel aerobik solunum sırasında üretilmektedir (Gutteridge ve Halliwell, 2000). Serbest radikaller hücre içinde çok sayıda biyomoleküle saldırarak bir dizi oksidatif hasarı başlatırlar. Bu zincir şeklindeki reaksiyonlar bir antioksidan molekül ile reaksiyona girene kadar devam eder (Hallwell, 1999). Antioksidanlar indirgeyici aktivite gösteren bileşiklerdir (Stehalin ve ark., 1989). Antioksidan terimi, herhangi bir hücre yapısı veya molekülü ile reaksiyona girmeden önce serbest radikalleri nötralize etme yeteneğine sahip herhangi bir türü tanımlamak için kullanılmaktadır (Schwartz, 1996). Antioksidanlar, oksidatif stres kaynaklı hasarın, nörodejeneratif, kardiyovasküler ve kanser gibi hastalıkların önlenmesinde koruyucu etki gösterebilirler (Riemersma 1994, Stehalin 1989, Halliwell ve Gutteridge 1989). Birçok deneysel ve klinik çalışmalar, antioksidan açısından zengin gıda alımının daha düşük kardiyovasküler hastalık ve kanser riski ile ilişkili olduğunu kanıtlamıştır (Vickers, 2002).

Çalışmamızda tüm ekstrelerin antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiş ve en yüksek aktiviteye sahip ekstrenin 137,77±2,08 IC<sub>50</sub> değeri ile kök etil asetat olduğu tespit edilmiştir. Kök kısmına ait üç ekstre arasında en yüksekten en düşüğe doğru

sıralama, etil asetat > methanol > *n*-hekzan, gövde kısmına ait ekstreler arasında ise methanol > etil asetat > *n*-hekzan olarak belirlenmiştir.

Abdulla ve ark. (2014)'nın, *R. ribes*'in kök kısmına ait etanol ve su ekstrelerinin fenolik içerik ve antioksidan etkilerini değerlendirdikleri bir çalışmada, en yüksek aktivite gösteren ekstrenin etanol olduğu belirlenmiştir. Öztürk ve ark. (2007)'nin, yaptıkları başka bir çalışmada *R. ribes*'in kök ve gövde kısmına ait kloroform ve metanol ekstrelerinin toplam fenolik, flavanoit ve antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Toplam fenolik içeriği en yüksek olan ekstre 48,66±1,23 ile kök kloroform, flavanoit içerik yönünden en zengin olan ekstre 145,59±0,22 ile kök kloroform, antioksidan aktivitesi en yüksek olan ekstre ise gövde metanol olarak belirlenmiştir.

Oktay ve ark. (2007)'nin yaptıkları diğer bir çalışmada ise *R. ribes*'in kök, gövdenin etli kısmı ve kabuklarına ait etanol ve su ekstreleri elde edilerek toplam fenolik içerikleri ve antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. En yüksek fenolik içerik ve antioksidan aktiviteye sahip ekstre kabuk etanol olarak belirlenmiştir. Yine yapılan başka bir çalışmada *R. ribes*'in kök ve gövdesine ait etil asetat ekstrelerinin toplam fenolik içerik, flavanoit içerik ve antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiş, kök etil asetat ekstresinin en yüksek etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Uyar ve ark., 2014).

*R. ribes* türünün terapötik etkinliğinin araştırılmasına yönelik çalışmalar daha çok antimikrobiyal, antifungal ve bitki içeriğiyle ilişkili olan fitokimyasal analizler üzerinedir. Bitkinin antikanserojenik özelliğinin değerlendirildiği az sayıdaki çalışmada ise bitkinin sadece sitotoksik ve apoptotik etkileri incelenmiştir. Literatürde bitkinin olası antikanser özelliklerinin altında yatan moleküler mekanizmaların araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

*R. ribes*'in total etanol ekstresinin AGS (mide), MCF-7 (meme), SW742 (kolorektal), SKLC6 (akciğer), A375 (melanom), PLC/PRF/5 (karaciğer) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, IC<sub>50</sub> dozları her bir hücre için sırasıyla; 25.372 µg/ml, 51.34 µg/ml, 11.21 µg/ml, 46.408 µg/ml, 21.373 µg/ml, 67.958 µg/ml olarak belirlenmiştir. Ekstrenin en düşük IC<sub>50</sub> dozu (11.21 µg/ml) ile en yüksek sitotoksik etki gösterdiği hücre hattının SW742 olduğu saptanmıştır (Sardari ve ark., 2009). *R. ribes*'in kök ve gövde etil asetat ekstresi ile

gerçekleştirilen başka bir çalışmada HL-60 akut myeloid lösemi hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri incelenmiştir. Her iki ekstrenin de doz ve zaman bağımlı olarak HL-60 hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği, kök ekstresinin gövde ekstresinden daha yüksek sitotoksik aktivite sergilediği belirlenmiştir (Uyar ve ark., 2014).

Esmailbeig ve ark. (2015)'nin *R. ribes*'in antitümör aktivitesini araştırmak için yaptıkları bir çalışmada total metanol ekstresini doz ve zaman bağımlı olarak kronik myeloid lösemi (K562), T hücreli lösemi (Jurkat), Burkitt's lenfoma (Raji), mesane (Fen) ve serviks (HeLa) kanseri hücre hatlarına uygulandıktan sonra sitotoksite analizi MTT testi ile gerçekleştirilmiş; en yüksek sitotoksik etki 115 µg/ml IC<sub>50</sub> değeri ile K562 hücrelerinde gözlenmiştir.

Yine başka bir çalışmada Rheum cinsinden *R. turkestanicum* türü kök kısmına ait etil asetat, *n*-hekzan ve su ekstralarının MCF-7 ve HeLa hücrelerine uygulanmasının ardından hücre canlılığı testi (MTS) gerçekleştirilmiştir. MCF-7 ve HeLa hücrelerinde *n*-hekzan ekstresi için 48. saatteki IC<sub>50</sub> dozu sırasıyla 320 µg/ml ve 130 µg/ml; etil asetat ekstresi için ise 155 µg/ml ve 150 µg/ml olarak belirlenmiştir. Su ekstresinin ise her iki hücre hattı için de sitotoksik olmadığı saptanmıştır (Shiezadeh ve ark., 2013). Chen ve ark. (2017)'nin yaptığı başka bir çalışmada da *R. palmatum* L.'nin etanol ekstresinin SCC-9 ve SAS insan ağız kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirmek için MTT testi kullanılmış; etkin doz SCC-9 hücresi için 40 µg/ml, SAS hücreleri için ise 20 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Mevcut çalışmada, *R. ribes*'in kök ve gövde kısımlarından elde edilen *n*-hekzan, etil asetat ve metanol ekstraları, doz (50-1500µg/ml) ve zaman (24, 48, 72 saat) bağımlı olarak HCT 116 ve HT-29 hücrelerine uygulanmıştır. HCT 116 hücrelerinde sitotoksik etkisi en yüksek ekstre 29,65 µg/ml ile kök metanol; HT-29 hücrelerinde sitotoksik etkisi en yüksek iki ekstre sırasıyla 75,37 µg/ml ile kök etil asetat ve 82,68 µg/ml ile de kök metanol olarak belirlenmiştir. Fitokimyasal analizler, diğer biyolojik aktivite testleri ve literatürdeki özgünlükleri ile birlikte değerlendirildiğinde en yüksek aktiviteye sahip ekstre olarak her iki hücre hattı için de kök metanol seçilmiştir. Kombinasyon analizi ve sonrasında gerçekleştirilen tüm testlere kök metanol ekstresinin, HCT 116 ve HT-29 hücre hatları için hesaplanan

IC<sub>50</sub> dozlarıyla devam edilmiştir. 5-FU'nun HCT 116 ve HT-29 hücrelerindeki IC<sub>50</sub> dozları ise sırasıyla 0,55 ve 0,35 µg/ml olarak belirlenmiştir. 5-FU ve kök metanol ekstresi her iki hücreye de doz ve zaman bağımlı olarak birlikte (kombine) uygulanmıştır. Sonrasında gerçekleştirilen kombinasyon analizi sonuçlarına göre, kombine uygulamanın HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde benzer şekilde hafif sinerjizm gösterdiği saptanmıştır.

Abdulla ve ark. (2014), *R. ribes*'in kök etanol ve su ekstresinin fenolik içeriklerini HPLC yöntemi kullanarak analiz etmişler ve fenolik içerik miktar sıralamasını krizofanol > emodin > fiskiyon > aloe-emodin > klorojenik asit > rhein > gallik asit > rutin > kemferol > tannik asit olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar, etanol ekstresindeki fenolik içeriğin ise su ekstresine göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada kök etanol ekstresi, standart ilaçlarla karşılaştırıldığında test edilen tüm bakteri türlerine karşı en yüksek antibakteriyel etkiyi sergilemiş ve etanol ekstresinde belirlenen fenolik bileşiklerin bu etkilerin kaynağı olduğu öngörülmüştür.

Yapılan başka bir çalışmada *R. ribes*'in gövde kısmından kloroform ve metanol ekstreleri elde edildikten sonra NMR yöntemi ile 3 antrakınon (krizofanol, fiskiyon, emodin) ve 5 flavanoit (kersetin, 5-desoksikersetin, kersetin 3-O-ramnosit, kersetin 3-O- galaktozit ve kersetin 3-O-rutinozit) bileşiği tanımlanarak izole edilmiştir. Meriçli ve Tuzlacı (1990)'nın, *R. ribes*'in köklerinin içerik analizlerini gerçekleştirdikleri çalışmada, krizofanol, fiskiyon, rhein, aloe-emodin, fiskiyon-8-O-glukozit, aloe-emodin-8-O-glukozit, sennozit A ve rapontisin gibi bileşikler izole edilmiştir.

*R. ribes* ve *R. emodi* ile yapılan bir çalışmada bitki köklerinin kloroform ekstreleri elde edildikten sonra emodin, aloe emodin, krizofanol ve fiskiyon antrakınonlarının tanımlanması için NMR analizi, belirlenen bileşiklerin miktar tayinleri için ise HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. *R. ribes* kök kloroform ekstresindeki antrakınon yüzdeleri büyükten küçüğe doğru aloe emodin > emodin > krizofanol > physicon olarak belirlenmiştir (Naqishbandi ve ark., 2009).

LC-ESI-QTOF-MS kromatografik analiz sonuçlarına göre pirogallol, epigallokateşin, epikateşinmonogallat, (±)-taksifolin, aloin A, 2-hidroksiksanton,

apigenin 7-O-glukozit, krisin, luteolin, epikateşin, genistin, prunetin gibi biyoaktif fenolik bileşik türevleri *R. ribes* için ilk kez bizim çalışmamızda saptanmıştır.

miRNA'lar kanserin de yer aldığı birçok hastalıkta önemli rol oynamaktadır. Hücre proliferasyonu, apoptoz ve metastaz gibi birçok onkogenik hücresel süreci düzenledikleri için miRNA'ların, tümör baskılayıcı ya da onkogenik fonksiyon gösterdikleri bilinmektedir (Shen ve ark 2015). Bu çalışmaya konu olan miR-200 ailesinde yer alan 4 miRNA'nın (miR-200a, -200b, -200c, -141, -149) kanserin başlangıç ve metastazında rol oynadığı, bu nedenle kanserin tanı/tedavisinde de oldukça değerli bir belirteç olabileceği ileri sürülmüştür (Humphries ve Yang 2015). miR-200 ailesinin hücre transformasyonu, kanser hücresi proliferasyonu, migrasyon, invazyon ve metastaz üzerinde güçlü tümör baskılayıcı etkilere sahip olduğu ortaya konmuştur (Chen ve Zhang 2017).

Sun ve ark. (2015), 40 hastaya ait CRC'li dokuları aynı hastaların sağlıklı dokularıyla karşılaştırdıkları çalışmalarında, miR-200 ailesinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı düzeyde azalış ve hedefi olan ZEB1'in ise artış gösterdiğini belirlemişlerdir. Yine aynı çalışmada miR-200'ün aşırı ekspresyonunun, ZEB1 aracılı hücresel invazyonu inhibe ettiği de saptanmıştır. TGFB ve TNF- $\alpha$  ile farklılaşmış pankreatik (HPAF2), kolorektal (DLD1) ve meme (MCF-7) kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada EMT'nin aktivasyonu ve buna bağlı olarak da ZEB1'in ekspresyonunda belirgin bir artış saptanmıştır. Farklılaşmamış hücrelerde ise ZEB1'in baskılanmasının ardından miR-141 ve miR-200c'nin ekspresyonunda anlamlı bir artış belirlenmiştir. Matrijel invazyon sonuçlarına göre ise miR-200c'nin aşırı ekspresyonunun, invazyon-migrasyonu azaltarak malign tümör gelişimi üzerinde inhibitör bir etki gösterebileceği öngörülmüştür (Burk ve ark., 2008).

Meme ve kolorektal kanser hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, miR-200 ailesinin transkripsiyonel olarak baskılanmasının mezenkimal fenotiple ilişkili ZEB1 ve ZEB2 ekspresyonlarının artışına, ZEB1 ve ZEB2'nin transkripsiyonel olarak baskılanmasının ise miR-200a, miR-200b ve miR-429 ile birlikte epitelyal fenotipin artışına neden olduğu belirlenmiştir (Bracken ve ark., 2008). Hu ve ark. (2008)'nin yaptıkları diğer bir çalışmada ise kolorektal kanser hücrelerinde miR-141 transfeksiyonunun, EMT regülatörü olan ZEB2'nin baskılanmasına ve hücresel invazyon-migrasyonun da inhibisyonuna neden olduğu saptanmıştır.



Mevcut çalışmada miR-200a/b/c ve miR-141'in KM, 5-FU, KM+5-FU uygulanmış HCT 116 ve HT-29 hücrelerinin doz gruplarındaki ekspresyon seviyeleri kontrol grubundaki ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırılmış ve farklılıklar Tablo 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir. HCT 116 hücrelerinin doz gruplarında, miRNA'ların ekspresyonlarındaki kat artışı büyükten küçüğe doğru miR-200a için KM+5-FU>5-FU>KM, miR-200b için KM+5-FU>5-FU>KM, miR-200c için 5-FU>KM+5-FU>KM, miR-141 için 5-FU>KM+5-FU>KM iken, HT-29 hücrelerinin doz gruplarındaki kat artışı ise miR-200a için KM>KM+5-FU>5-FU miR-200b için KM>KM+5-FU>5-FU miR-200c için KM>KM+5-FU>5-FU miR-141 için KM>KM+5-FU>5-FU olarak belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre HCT 116 hücrelerinde miR-200a/b'de ki en yüksek anlamlı kat artışları KM+5-FU kombinasyonunun uygulandığı grupta belirlenmiştir. miR-200c'deki en yüksek anlamlı kat artışı 5-FU'nun tek başına uygulandığı grupta saptanmış olmasına rağmen, KM'nin tek başına uygulandığı gruptaki kat artışının da anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür. miR-141'de ki en yüksek anlamlı kat artışı ise KM'nin tek başına uygulandığı grupta saptanmıştır. HT-29 hücrelerinde ise, miR-200a/b/c ve miR-141'deki en yüksek anlamlı kat artışları, KM'nin tek başına uygulandığı grupta belirlenmiştir.

Çalışmamızda miR-200 ailesinin hedefi olduğu düşündüğümüz genler literatür araştırmaları ve "miRWalk", "miRTarBase" gibi online veri tabanları kullanılarak belirlenmiştir. miRNA-gen etkileşimlerini değerlendirmek için miRNA hedefleri olarak EMT ve invazyonla ilişkili ZEB1, CDH1 (E-kaderin); apoptoz ile ilişkili BCL-2, p53, XIAP, FAP-1; hücre döngüsü ile ilişkili, CDK6, CDKN1B, RND3, GATA4; ve TGFβ yolağıyla ilişkili TGFβ1, SMAD2,3 genleri ve hedef genlerle ilişkili olan EMT ve invazyonla ilişkili CDH2 (N-kaderin); apoptoz ile ilişkili BAX, Kaspaz-3,7,8,9, CYCS (Sitokrom C), PPARG, FAS/CD95; hücre döngüsü ile ilişkili p21, CDK4, CCND1, CCND2, CCND3; ve TGFβ yolağıyla ilişkili TGFβR1, TGFβR2, SMAD4-7 genleri seçilmiştir.

miR-200 ailesi ve EMT/metastaz süreci arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışmada TGFβ sinyaliyle, miR-200 ailesi üyelerinin downregülasyonu sonucu ZEB1/2 ekspresyonunda belirgin bir artış, E-kaderin ekspresyonunda ise azalma

tespit edilmiş; ekspresyondaki bu artış ve azalışların sonucu olarak hücre invazyon ve migrasyonun da uyarıldığı ileri sürülmüştür (Zhou ve ark 2015).

miR-200 ailesinin hücre döngüsünün düzenlenmesindeki rolünün anlaşılmasına yönelik yapılan başka bir çalışmada miR-200a ve miR-141'in aşırı ekspresyonunun CDN1B ekspresyonunda belirgin bir artışa, CDK6 ekspresyonunda ise azalışa neden olduğu ve ekspresyonlardaki bu değişikliklerin hücre döngüsünü G1 fazında durdurduğu tespit edilmiştir (Uhlmann ve ark., 2010). Xia ve ark. (2010), serviks kanseri hücrelerinde miR-200b'nin RND3 ekspresyonunu azalttığını ve bu durumun ise S fazına ilerleyişi kontrol eden CCND1 ekspresyonunda artışa neden olduğunu belirlemişlerdir.

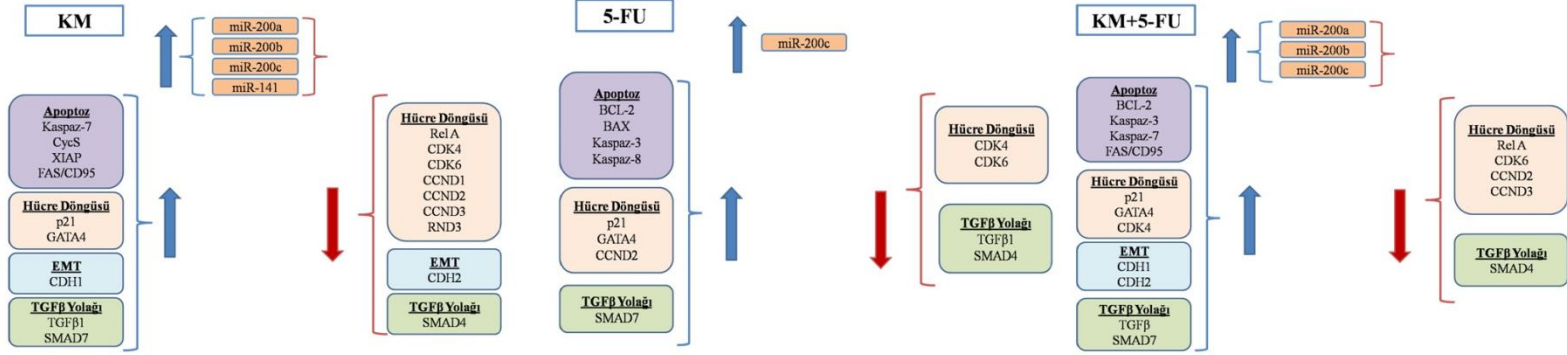
miR-200 ailesi ve ve apoptoz yolağı arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada ise mide ve akciğer kanseri hücrelerinde apoptotik yolakla ilişkili Bcl-2 ve XIAP ekspresyonlarının artışıyla birlikte miR-200b/c ve miR-429 kümesi ekspresyonlarında da belirgin bir azalış saptanmıştır (Zhu ve ark., 2012).

Çalışmamızda KM, 5-FU, KM+5-FU uygulanmış HCT 116 ve HT-29 hücrelerinin kontrollere göre hedef genlerinin ekspresyon seviyesindeki farklılıklar Tablo 4.11 ve 4.12'de; miR-200 ailesinin hedefi olarak değerlendirilen genlerin, hücre ve doz gruplarına göre miRNA-gen etikleşimleri ise Şekil 4.35'de gösterilmiştir.

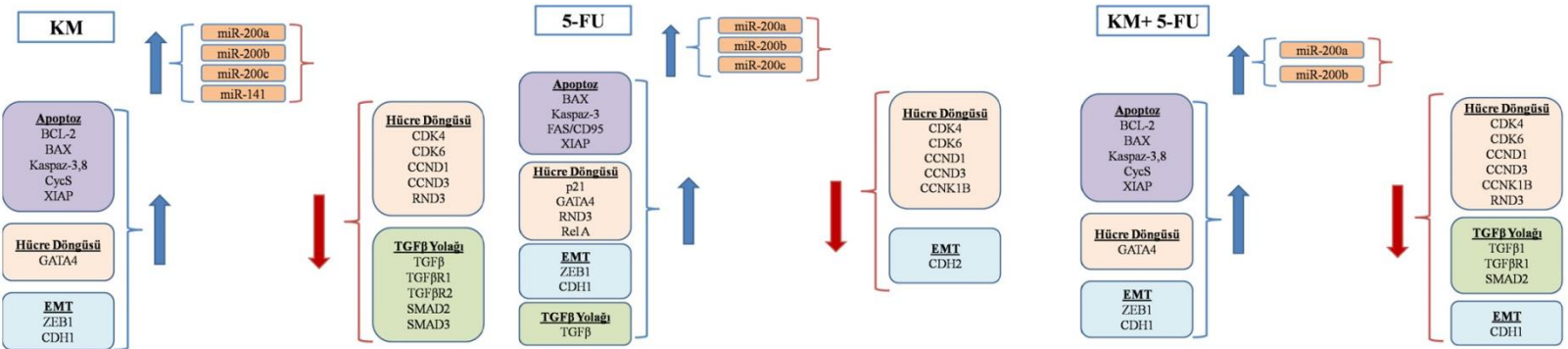
Çalışmamızda morfolojik olarak apoptozu değerlendirdiğimiz yöntemlerin ilki Anneksin V analiziydi. Her iki hücre hattına da KM, 5-FU ve KM+5-FU dozları uygulanarak toplam apoptoz yüzdeleri hesaplanmıştır. Dozların uygulandığı HCT 116 hücrelerindeki toplam apoptoz yüzdesi kontrol grubu hücrelerine göre KM için %47,51; 5-FU için %21,47; KM+5-FU için %30,8; HT-29 hücrelerindeki toplam apoptoz yüzdesi ise KM için %43,7; 5-FU için %20,05; KM+5-FU için %36,8 oranında artış göstermiştir.

Mevcut çalışmada morfolojik apoptozu mikroskop altında incelediğimiz bir yöntem olan TUNEL testi için; KM, 5-FU ve KM+5-FU dozları her iki hücre hattına da uygulanarak toplam apoptoz yüzdeleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre HCT 116 ve HT-29 hücrelerindeki tüm doz grubularında apoptoz yüzdelerinin kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ).

## HT-29



## HCT-116



Şekil 4.35: miRNA ve hedef gen anlamlı ekspresyon farklılıklarının hücre ve doz grupları için gösterilmesi

Doz gruplarının uygulandığı her iki hücre hattında, hücre döngüsü evrelerindeki hücre yüzdeleri hesaplanmıştır. Analiz sonucunda elde edilen verilere göre, HCT 116'da kontrol grubuna göre KM, 5-FU ve KM+5-FU dozlarının sırasıyla; G0/G1, S+G2/M ve S+G2/M fazı hücre populasyonu yüzdelerinde, HT-29'da ise G0/G1, S ve S fazı hücre populasyonu yüzdelerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir.

*R. ribes*'in kök ve gövde kısımlarına ait etil asetat ekstreleri HL-60 AML hücrelerine uygulanmış ve apoptotik etkileri Anneksin V flow sitometri yöntemi ile değerlendirilmiştir. HL-60 hücrelerine 72 saatlik etil asetat ekstrelerinin muamelesinin ardından apoptoz yüzdesinin %87 (erken/geç apoptoz)'ye ulaştığı, kök etil asetat ekstresinin gövde kısmına göre daha yüksek sitotoksik ve apoptotik etki gösterdiği ve oluşan toksisitenin kaynağının ise apoptoz uyarımı olabileceği ileri sürülmüştür (Uyar ve ark 2014).

Shiezadeh ve ark., (2013), HeLa ve MCF-7 hücrelerine *R. turkestanicum* etil asetat ekstreleri muamelesinin ardından apoptotik hücrelerin analizi için PI boyama temelli flow sitometri yöntemini kullanmışlardır. Her iki hücre hattında da kontrol gruplarına göre etil asetat ekstresinin sub-G1 pikini uyararak apoptoza neden olduğu belirlenmiştir.

*Rheum* cinsinden *R. palmatum* etanol ekstresinin ağız kanseri hücrelerindeki antimetastatik etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada kullanılan yöntemlerden birkaçı da hücre göçü ve inazyon testleridir. Hücre göçü testi için ekstrenin etkin dozu yara oluşturulan hücrelere uygulanmış, 24 saatlik inkübasyonun ardından hücrelerdeki yaranın %100 kapandığı belirlenmiştir. Hücre invazyon testi için ekstre uygulamasının ardından, hücresel invazyonda her iki hücre hattında da kontrol gruplarına göre anlamlı bir azalış saptanmıştır (Chen ve ark 2017).

Çalışmamızda *R. ribes* kök metanol ekstresi ve diğer doz gruplarının muamelesi, kontrol gruplarına göre her iki hücre hattının invazyon yüzdelerinde anlamlı bir azalışla sonuçlanmıştır. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında HCT 116 hücrelerinde KM'de invazyonun %55,99; 5-FU'de %37,81; KM+5-FU'de ise %54,42 oranında; HT-29 hücrelerinde ise KM'de invazyonun %35,89; 5-FU'de %28,24; KM+5-FU'da ise %26,32 oranında azaldığı belirlenmiştir.

mRNA ekspresyon analizi sonucunda, her iki hücre hattı ve tüm doz gruplarında kontrol gruplarında ekspresyon düzeyinde anlamlı farklılık seğıleyen BCL-2, ZEB1, GATA4 ve FAS/CD95 genlerinin ELISA yöntemiyle protein düzeyinde de ekspresyon farklılıkları gösterip göstermediklerideğerlendirilmiştir. Bu dört gen miR-200 ailesinin doğrudan ya da dolaylı hedefiolan genlerdi ve dolayısıyla mRNA seviyesinde ekspresyonu artan bu genlerin miR-200 ekspresyonlarındaki artışlara bağılı olarak post-transkripsiyonel seviyede baskılanması beklenmektedir.

ELISA testi sonuçlarına göre, HCT 116 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla BCL-2 protein seviyesindeki azalışın en yüksek olduğu doz grubu %43,65 ( $p<0,05$ ) oranı ile KM+5-FU kombinasyonu; en düşük olduğu grup %5,68 ( $p>0,05$ ) oranı ile 5-FU; ZEB1 protein düzeyindeki azalışın en yüksek olduğu grup %34,57 ( $p>0,05$ ) oranı ile KM+5-FU kombinasyonu, en düşük olduğu grup %1,7 ( $p>0,05$ ) oranı ile tek başına 5-FU; GATA4 protein düzeyindeki azalışın en yüksek olduğu grup %4,1 ( $p<0,05$ ) oranı ile tek başına KM, en düşük olduğu grup %0,81 ( $p>0,05$ ) oranı ile tek başına 5-FU olarak belirlenmiştir.

HT-29 hücrelerinde ise kontrol grubuna kıyasla BCL-2 protein seviyesindeki azalışın en yüksek olduğu doz grubu %68,43 ( $p<0,05$ ) oranı ile KM+5-FU kombinasyonu; en düşük olduğu grup %35,95 ( $p>0,05$ ) oranı ile tek başına KM; ZEB1 protein düzeyindeki azalışın en yüksek olduğu grup %58,45 ( $p<0,05$ ) oranı ile 5-FU, en düşük olduğu grup %49,33 ( $p<0,05$ ) oranı ile KM; GATA4 protein düzeyindeki azalışın en yüksek olduğu grup %1,33 ( $p>0,05$ ) oranı ile tek başına KM, artışın olduğu tek grup ise %2,22 ( $p>0,05$ ) oranı ile 5-FU olarak belirlenmiştir.

HCT 116 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla FAS/CD95 protein düzeyindeki artışın en yüksek olduğu grup ise %52,47 ( $p<0,05$ ) oranı ile tek başına 5-FU; azalışın gözleendiği tek grup ise %27,42 ( $p<0,05$ ) oranı ile KM, HT-29 hücrelerinde ise FAS/CD95 protein düzeyinde artışın gözleendiği tek grup %3,3 ile 5-FU; azalışın en yüksek olduğu grup ise %65,14 ( $p<0,05$ ) oranı ile KM olarak tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre; KM'nin miR-200a/b/c ve miR-141'in ekspresyonlarında anlamlı artışa neden olarak, BCL-2, ZEB1, GATA4 ve kısmen FAS/CD95 protein ekspresyonlarını baskıladığı belirlenmiş ve KM'nin tek başına ya

da 5-FU ile kombine uygulamasının, kanser hücrelerinin tek başına 5-FU ile tedavisine göre daha iyi yanıt oluşturduğu izlenimini vermektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda *R. ribes*'in kök ve gövde kısımlarına ait farklı polaritedeki çözücülerle hazırlanan 6 farklı ekstrenin tamamı ile fitokimyasal ve sitotoksik analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler birlikte değerlendirildiğinde HCT 116 ve HT-29 kolorektal kanser hücreleri üzerinde en yüksek sitotoksik aktiviteye sahip ekstrenin kök metanol (KM) olduğu belirlenmiş ve bu nedenle çalışmanın ileri analizlerine bu ekstrenin sitotoksik dozu ile devam edilmiştir. Her iki hücre hattında kök metanol ekstresinin 5-FU ile kombinasyonlarının sinerjistik etkinliği araştırılmış, izobologram analizi ile de kombinasyonun etkili IC<sub>50</sub> dozu belirlenmiştir. Tek başına uygulanan kök metanol ekstresi, 5-FU ve KM+5-FU'nun kombine olarak hafif sinerjizm gösterdiği IC<sub>50</sub> dozları HCT116 ve HT-29 hücrelerine uygulanarak tümör baskılayıcı fonksiyon gösteren miR-200 ailesi, miR-200 ailesinin hedef genleri ve hedef genlerle ilişkili apoptoz, hücre döngüsü, EMT ve TGFβ yolağı genlerinin ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Tüm miRNA (miR-200a/b/c ve miR-141) ekspresyonlarının her iki hücre hattında da anlamlı düzeyde artış gösterdiği tek doz grubunun kök metanol olduğu belirlenmiş ve apoptoz, hücre döngüsü, EMT ve TGFβ yolağı ile ilişkili genlerin ekspresyonlarındaki anlamlı artış ve azalışlar doz gruplarına göre değerlendirildiğinde ise tek başına KM ve KM+5-FU kombine uygulamasının tek başına 5-FU göre daha kuvvetli/yüksek antiproliferatif ve apoptotik etkiye sahip olduklarına/gösterdiklerine işaret etmektedir. Çalışmada morfolojik apoptoz, hücre döngüsü ve invazyonu incelediğimiz testler, ELISA analizi sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde ise diğer doz gruplarına göre KM'nin kanser hücrelerine karşı daha etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda kök metanol ekstresinin kromatografik analiziyle çok sayıda biyoaktif bileşik belirlenmiş ve şimdiye kadar yapılan çalışmalarla içerdiği bir çok antrakinon ve fenolik bileşiğin farklı kanser türlerinde antiproliferatif etkinliğe sahip oldukları gösterilmiştir. Kök metanol ekstresinin belirlediğimiz antikanserojenik etkisinin, içerdiği aktif bileşiklerin tek başınamı yoksa total ekstre içinde uygun kompozisyon ve miktarlarda birbirleriyle etkileşime geçmeleri nedeniyle mi oluştuğunu belirlemek için öncelikle izolasyon çalışmaları ile belirlenen ana bileşenlerin yapı tayini ve ekstredeki miktarlarının tespit edilmesi gerekmektedir.

Çalışmanın devamında ise belirlenen majör biyoaktif bileşiklerin miktar tayinleri ve tedaviye yönelik *in vivo* çalışmalar planlanmaktadır.





## 7. KAYNAKLAR

Abu-Irmaileh BE, Afifi FU. Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 89: 193–7.

Adams LS, Phung S, Yee N, Seeram NP, Li L, Chen S. Blueberry phytochemicals inhibit growth and metastatic potential of MDA-MB-231 breast cancer cells through modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer Research*. 2010;70(9):3594–3605.

Aggarwal BB, Banerjee S, Bharadwaj U, Sung B, Shishodia S, Sethi G. Curcumin induces the degradation of cyclin E expression through ubiquitin-dependent pathway and up-regulates cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in multiple human tumor cell lines. *Biochemical Pharmacology*. 2007; 73: 1024-32.

Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology* . 2006; 71: 1397-1421.

Ahmed M, Khan MI, Khan MR, Muhammad N, Khan AU. Role of medicinal plants in oxidative stress and cancer. *Open Access Sci Rep*. 2013;2(2):641.

Ahn SM, Cha JY, Kim J, Kim D, Trang HT, Kim YM, Cho YH, Park D and Hong S. Smad3 regulates E-cadherin via miRNA-200 pathway. *Oncogene*. 2012; 31: 3051-59.

Alan Y, Erbil N, Digrak M. *In vivo* antimicrobial activity of *Rheum ribes* extracts obtained from various plant parts from Turkey. *Journal of Selçuk University Natural and Applied Science*. 2012; 1(4): 23 -29.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 2002.4<sup>th</sup> Edition. Garland Science.

American Cancer Society. (2012a). *Cancer Facts & Figures 2012*. Retrieved November 16, 2015, from <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2012/>

American Cancer Society. (2012b). *What causes cancer?* Retrieved November 16, 2015, from <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/>

Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunapantula SV. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutr J*. 2016; 15(1): 99.

André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *The New England journal of medicine*. 2004; 350(23): 2343–2351.

Anon. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet*. 1995; 345(8955): 939–944.

Argast GM, Krueger JS, Thomson S, Sujka-Kwok I, Carey K, Silva S, O'Connor M, Mercado P, Mulford IJ, Young GD. Inducible expression of TGF $\beta$ , snail and Zeb1 recapitulates EMT in vitro and in vivo in a NSCLC model. *Clin Exp Metastasis*. 2011; 28: 593-614.

Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81: 317S–25S.

Arun B., Frenkel, E. P. Topoisomerase I inhibition with topotecan: pharmacologic and clinical issues. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2001; 2: 491505.

Azrak SS, Ginel-Picardo A, Drost M, Barbacid M and Santos E. Reversible, interrelated mRNA and miRNA expression patterns in the transcriptome of Rasless fibroblasts: Functional and mechanistic implications. *BMC Genomics*. 2013; 14: 731.

Baer C, Claus R and Plass C. Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer. *Cancer Res*. 2013; 73: 473-477.

Baker DD, Chu M, Oza U, Rajgarhia V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Product Reports*. 2007; 24:1225-1244.

Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*. 2005; 78: 431-441.

Barrow P, Khan M, Laloo F, Evans DG, Hill J. Systematic review of the impact of registration and screening on colorectal cancer incidence and mortality in familial adenomatous polyposis and Lynch syndrome. *Br J Surg*. 2013;100:1719–31.

Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004; 116: 281–297.

Baytop, T. *Rheum ribes L*. In T. Baytop (Ed.). *Therapy with medicinal plants in Turkey*, Nobel Tip Publication Press. 1999; 1: 319–320.

Berghmans T, Ameye L, Willems L. Identification of microRNA-based signatures for response and survival for non-small cell lung cancer treated with cisplatin-vinorelbine A ELCWP prospective study. *Lung Cancer*. 2013; 82(2): 340–345.

Bernards M.A. Plant natural products: a primer. *Can. J. Zool*. 2010; 88: 601–614.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004; 432: 332-337.

Blandino G, Fazi F, Donzelli S, Kedmi M, Chen AS, Muti P, Strano S, Yarden Y. Tumor suppressor microRNAs: A novel non-coding alliance against cancer. *FEBS Letters*. 2014; 19;588(16): 2639-52.

Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, Goodall GJ. A double negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2008;68: 7846-54.

Braun J, Hoang-Vu C, Dralle H, Hüttelmaier S. Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas. *Oncogene*. 2010; 29: 4237-4244.

Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 1998.; 56: 317-333.

Browne G, Sayan AE, Tulchinsky E. ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer. *Cell Cycle*.2010; 9: 886-891.

Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO reports* 2008;9: 582-9.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, NochE, Aldler H, Rattan S, Keating M, Kanti Rai, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS*. 2002; 99(24): 15524-15529.

Carthew R, Sontheimer E. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009; 136:642-655.

Chang CJ, Chao CH, Xia W, Yang JY, Xiong Y, Li CW, Yu WH, Rehman SK, Hsu JL, Lee HH. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol*. 2011; 13: 317-323.

Chang T, Yu D, Lee Y, Wentzel E, Arking D, West K, Dang C et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat. Genet*. 2008; 40: 43–50.

Chen Y, Fu LL, Wen X, Liu B, Huang J, Wang JH, Wei YQ. Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy. *Apoptosis*. 2014; 19(8): 1177-1189.

Chen YY, Hsieh MJ, Hsieh YS, Chang YC, Chen PN, Yang SF, Ho HY, Chou YE, Lin CW. Antimetastatic effects of *Rheum palmatum L.* extract on oral cancer cells. *Environ Toxicol*. 2017; 32(10): 2287-2294.

Cheng H, Zhang L, Cogdell DEH, Zheng AJ, Schetter M, Nykter CC, Harris K, Chen SR, Hamilton W. Circulating plasma miR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One*. 2011; 6: e17745.

Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming Growth Factor-beta Signaling-Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. *Molecular Cancer Research*. 2008; 6: 1521-1533.

- Chengzhong Z, Long S, Chong L, Yuhui W, Baoquan T. Isolation and structure identification of chemical constituents in *Rheum univerve Maxim.* *Zhongcaoyao.* 2005; 36 (5): 660-662.
- Choi PS, Zakhary L, Choi WY, Caron S, Alvarez-Saavedra E, Miska EA, McManus M, Harfe B, Giraldez AJ, Horvitz HR, Schier AF, Dulac C. Members of the miRNA-200 family regulate olfactory neurogenesis. *Neuron.* 2008; 57: 41–55.
- Choi SZ, Lee SO, Jang KU, Chung SH, Park SH, Kang HC, Yang EY, Cho HJ, Lee KR. Antidiabetic stilbene and anthraquinone derivatives from *Rheumundulatum.* *Archives of Pharmacal Research.* 2005; 28(9): 1027–1030.
- Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Estève J, Sant M, Storm H, Allemani C, Ciccolallo L, Santaquilani M, Berrino F Eurocare-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century. *Ann Oncol.* 2003; 14 (5): 128–149.
- Cragg G, Boyd M, Cardellina MR, Ii J, Grever H, Schepartz MR, Snader SA. Role of plants in the National Cancer Institute drug discovery and development programme In: Kinghorn, A. D. & Balandrín, M. F. (eds.) *Human Medicinal Agents from Plants.* 1993. American Chemical Society (ACS).
- Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products.* 1997; 60: 52-60.
- Cullen J. *Rheum L.* In PH. Davis (Ed.). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands .* 1966; 2: 268–269. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Curreri AR, Ansfield FJ, McIver FA, Waisman FA., Heidelberger C. Clinical studies with 5-fluorouracil. *Cancer Research.* 1958; 18(4):478–484.
- David B, Wolfender J-L, Dias DA. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews.* 2014; 14: 299-315.
- de Gramont A, Tournigand C, Louvet C, André T, Molitor JL, Raymond E, Moreau S, Vignoud J, Le Bail N, Krulik M. Oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (folfox) in pretreated patients with metastatic advanced cancer. *The GERCOD. La Revue de médecine interne.* 1997; 18(10):769–775.
- de Oliveira CB, Comunello LN, Maciel ES, Giubel SR, Bruno AN, Chiela EC, Lenz G, Gnoatto SC, Buffon A, Gosmann G. The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from *Baccharis trimera* in SiHa cells: differences in their activity and mechanism of action. *Molecules.* 2013; 18: 11022–32.
- Dhamodharan R., Jordan, MA, Thrower D, Wilson L, Wadsworth P. Vinblastine suppresses dynamics of individual microtubules in living interphase cells. *Molecular Biology of the Cell.* 1995; 6: 1215-1229.
- Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites.* 2012; 2(2):303-36.
- Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *The Lancet.* 2000; 355(9209): 1041–1047.
- Dubois J, Guenard D, Gueritte F. Recent developments in antitumour taxoids. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 2003; 13: 1809-1823.
- Edwin Smith papyrus. Egyptian medical book. 2017; (also available online <https://www.britannica.com/topic/Edwin-Smith-papyrus>). Last accessed. February, 2017.
- Esmailbeig M, Kouhpayeh SA and Amirghofran Z. An Investigation of the Growth Inhibitory Capacity of Several Medicinal Plants From Iran on Tumor Cell Lines. *Iran J Cancer Prev.* 2015; 8(5): e4032.
- Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives.* 2001; 109: 69-75.
- Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crinò L, Benedetti G, Evangelista W, Fanchini L, Cortesi E, Picone V, Vitello S, Chiara S, Granetto C, Porcile G, Fioretto L, Orlandini

C, Andreuccetti M, Masi G; Gruppo Oncologico Nord Ovest. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007; 25(13): 1670–1676.

Feng J, Wang J, Chen M. MiR-200a suppresses cell growth and migration by targeting MACC1 and predicts prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*. 2015; 33(2): 713–720.

Feng X, Wang Z, Fillmore R, Xi Y. miR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Lett*. 2014; 344(2): 166-73.

Folkman J, Kalluri R. Cancer without disease. *Nature*. 2004; 427: 787-787.

Fowler MW. Plants, medicines and man. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006; 86: 1797-1804.

Foye WO, Lemke TL, Williams DA. Textbook Foye's principles of medicinal chemistry: Lippincott Williams & Wilkins. 2008.

Fujiwara Y, Minami H. An overview of the recent progress in irinotecan pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*. 2010; 11: 391-406.

Gala M, Chung DC: Hereditary colon cancer syndromes. *Semin Oncol*. 2011, 38:490-499.

Ghasemzadeh A, Jaafar HZ. Profiling of phenolic compounds and their antioxidant and anticancer activities in pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) extracts from different locations of Malaysia. *BMC Complement Altern Med*. 2013; 13: 341.

Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, Chollet P, Llory JF, Letourneau Y, Coudert B, Bertheaut-Cvitkovic F, Larregain-Fournier D, Le Rol A, Walter S, Adam R, Misset JL, Lévi F. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000; 18(1): 136–147.

Gibbons DL, Lin W, Creighton CJ, Rizvi ZH, Gregory PA, Goodall GJ, Thilaganathan N, Du L, Zhang Y, Pertsemliadis A and Kurie JM. Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression. *Genes Dev*. 2009; 23: 2140-2151.

Goldberg RM, Gill S. Recent phase III trials of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin as chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2004; 54(1):57–64.

Gomez Garcia EB, Knoers NV. Gardner's syndrome (familial adenomatous polyposis): a cilia-related disorder. *Lancet Oncol*. 2009; 10:727-735.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004; 432: 235-240.

Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;899:136-47

Half E, Bercovich D, Rozen P: Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009; 4:22.

Halliwell B. Antioxidant defense mechanisms; from the beginning to the end(of the beginning). *Free Radic. Res*.1999; 31: 261-272.

Halliwell B, Gutteridge JMC. “Free radicals, ageing and disease”. In: *Freeradicals in biology and medicine*.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxford:Clarendon Press. 1989;416-508.

Han J, Ye M, Xu M. Comparison of phenolic compounds of rhubarbs in the section *deserticola* with *Rheum palmatum* by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Planta Medica*. 2008; 74: 873–879.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.

Hanahan D, Weinberg, RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144(5):646–674.

Harvey A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*. 2000; 5: 294-300.

- Hector S, Prehn JHM. Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review. *Biochimica et biophysica acta*. 2009; 1795(2):117–129.
- Hollman PCH, Devries JHM., Vanleeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB. Absorption Of Dietary Quercetin Glycosides And Quercetin In Healthy Ileostomy Volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1995; 62: 1276-1282.
- Houghton JA, Tillman DM, Harwood FG. Ratio of 2'-deoxyadenosine-5'- triphosphate/thymidine-5'-triphosphate influences the commitment of human colon carcinoma cells to thymineless death. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1995; 1(7): 723–730.
- Huff AC, Kreuzer KN. Evidence for a common mechanism of action for antitumor and antibacterial agents that inhibit Type-II DNA Topoisomerases. *Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265: 20496-20505.
- Humphries B, Yang C. The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget*. 2015; 6(9): 6472-98.
- Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J, Hemmi H, Koi M, Boland CR, Goel A, MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2013;62: 1315–1326.
- Innocenti F, Ratain MJ. Pharmacogenetics of irinotecan: clinical perspectives on the utility of genotyping. *Pharmacogenomics*. 2006; 7: 1211-1221.
- Jain D, Pathak N, Khan S, Raghuram GV, Bhargava A, Samarth R., Mishra PK.. “Evaluation of cytotoxicity and anticarcinogenic potential of Mentha leaf extracts”, *International Journal of Toxicology*. 2011; 30 (2): 225-36.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*.2011; 61: 69–90.
- Jianming H, Li P, Heng J, Weiwen Y, Jianfang C, Liang H. Chemoresistance of colorectal cancer to 5-fluorouracil is associated with silencing of the BNIP3 gene through aberrant methylation. *J Cancer*. 2017; 8(7): 1187–1196.
- Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Research*. 1963; 23: 1390-1427.
- Zhao J, Junmin C, Niansheng D. Studies on chemical constituents in root of *Rheum rhizostachyum*. *Zhongyao Zazhi*. 2002; 27(4): 281-282.
- Kerscher AE ve Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. 2006; 6: 259-269.
- Kim T, Veronese A, Pichiorri F, Lee TJ, Jeon YJ, Volinia S, Pineau P, Marchio A, Palatini J, Suh SS. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J Exp Med*. 2011; 208: 875-883.
- Korpál M, Kang Y. The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *RNA Biology*. 2008; 5(3): 115–119.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42: D6873.
- Kwak EL, Chung DC. Hereditary colorectal cancer syndromes: an overview. *Clin Colorectal Cancer*. 2007; 6: 340–344.
- Labianca R et al. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*.2010;74: 106–133.
- Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, Pessi MA, Prochilo T, Quadri A, Gatta G, de Braud F, Wils J.Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*.2010; 74: 106–133.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001; 294(5543): 853-8.
- Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:284S–91S.

- Xiang L, Xuehui L, Guoqiang F, Yuxin C, Lijun D, Dean G, Junhua Z. Chemical constituents in *Rheum nanum*. *Zhongcaoyao*. 2005; 36 (9): 1306- 1309.
- Le Marchand L, Wilkens LR, Hankin JH, Kolonel LN, Lyu LC. A case-control study of diet and colorectal cancer in a multiethnic population in Hawaii (United States): lipids and foods of animal origin. *Cancer Causes Control*.1997; 8: 637–648.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75:843–854.
- Lee Y, Ahn C, Han Y, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature*.2003; 425: 415-419.
- Lee, M.J., Wang, Z.Y., Li, H., Chen, L.S., Sun, Y., Gobbo, S., Balentine, D.A., Yang, C.S., 1995. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human-subjects. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 4, 393-399.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120: 15–20.
- Liew ST, Yang LX. Design, synthesis and development of novel camptothecin drugs. *Current Pharmaceutical Design*. 2008; 14: 1078-1097.
- Lindahl T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974; 71(9):3649–3653.
- Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003; 78: 517-520.
- Longley DB, Boyer J, Allen WL, Latif T, Ferguson PR, Maxwell PJ, McDermott U, Lynch M, Harkin DP, Johnston PG. The role of thymidylate synthase induction in modulating p53-regulated gene expression in response to 5-fluorouracil and antifolates. *Cancer Research*. 2002; 62(9): 2644.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(5): 330-8.
- Lowery A, Miller N, McNeill R, Kerin M. MicroRNAs as prognostic indicators and therapeutic targets: potential effect on breast cancer management. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 360–5.
- Lu J, Deutsch C. Folding zones inside the ribosomal exit tunnel. *Nat Struct Mol Biol*. 2005;12:1123-9.
- Lu J, Getz G, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A. MicroRNA expression profiles classify human cancer. *Nature* 2005; 435: 834-838.
- Lu YB, Hu JJ, Sun WJ, Duan XH, Chen X. Prognostic value of miR-141 downregulation in gastric cancer. *Genetics and Molecular Research*. 2015; 14(4): 17305–17311.
- Magenta A, Cencioni C, Fasanaro P, Zaccagnini G, Greco S, Sarra-Ferraris G, Antonini A, Martelli F, Capogrossi MC. MiR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition. *Cell Death Differen*. 2011; 18; 1628–1639.
- Mahady GB. 2001. Global harmonization of herbal health claims. *Journal of Nutrition*. 2001; 131: 1120S-1123S.
- Marchand LL. Combined influence of genetic and dietary factors on colorectal cancer incidence in Japanese Americans. *J Natl Cancer Inst Monographs*.1999;(26): 101–105.
- McDermott A, Heneghan H, Miller N, Kerin M. The therapeutic potential of microRNAs: disease modulators and drug targets. *Pharm Res*. 2011; 28:3016-29.
- Meltzer PS. Cancer genomics. Small RNAs with big impacts. *Nature*. 2005; 435: 745-746.
- Mericlí AH., Tuzlacı E. Constituents of *Rheum ribes*. *Fitoterapia*. 1990; 61: 375.
- Messina M, Barnes S. The role of soy products in reducing risk of cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1991; 83(8): 541-546 .

- Montagnani F, Chiriatti A, Licitra S, Aliberti C, Fiorentini G. Differences in efficacy and safety between capecitabine and infusional 5- fluorouracil when combined with irinotecan for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*. 2010; 9(4): 243-247.
- Murchison E, Hannon G. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol*. 2004; 16:223–9.
- Mutlu M SÖ, Raza U, Eyüpoglu E, Yurdusev E, Sahin Ö. MIR200C (microRNA 200c). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2015; 19: 270-285.
- Naqishbandi AM, Josefsen K, Pedersen ME, Jäger AK. Hypoglycemic activity of Iraqi Rheum ribes root extract. *Pharmaceutical Biology*. 2009; 47(5): 380-383.
- Ngan VK, Bellman K., Hill BT, Wilson L, Jordan, MA. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by the semisynthetic vinca alkaloids vinorelbine and its newer derivative vinflunine. *Molecular Pharmacology*. 2001; 60: 225-232.
- Nugent M, Miller N, Kerin M. Circulating miR-34a levels are reduced in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2012; 106: 947-52.
- Özbek, H., Ceylan, E., Kara, M., Özgökce, F., & Koyuncu, M. Hypoglycemic effect of Rheum ribes roots in alloxan induced diabetic and normal mice. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*. 2004; 31: 113–115.
- Öztürk M, Aydogmus-Öztürk F , Duru ME, Topçu G. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry* 103 (2007) 623–630.
- Pal MK, Jaiswar SP, Dwivedi VN, Tripathi AK, Dwivedi A, Sankhwar P. MicroRNA. A new and promising potential biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Biol Med*. 2015; 12: 328-341.
- Paterson EL, Kazenwadel J, Bert AG, Khew-Goodall Y, Ruzskiewicz A, Goodall GJ. Down-regulation of the miRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression. *Neoplasia*. 2013; 15: 180–191.
- Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. 2012. 3<sup>rd</sup> edition.
- Pencheva N, Tavazoie SF. Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 546-54.
- Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, Andradem PB. Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules* 2009;14: 2202-2211.
- Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. 2004;304(5671): 734-6.
- Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature*. 2012; 481: 190-4.
- Pritchard DM., Alastair JM. Watson, Christopher S Potten, Ann L, Jackman, John A. Hickman. Inhibition by uridine but not thymidine of p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil: evidence for the involvement of RNA perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94(5): 1795–1799.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységü L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2011 50: 586–621.
- Quinn RJ, Carroll AR, Pham NB, Baron P, Palframan ME, Suraweera L, Pierens GK, Muresan S. Developing a Drug-like Natural Product Library. *Journal of Natural Products*. 2008; 71: 1792-1792.
- Ramanathan RK, Clark JW, Kemeny NE, Lenz HJ, Gococo KO, Haller DG, Mitchell EP, Kardinal CG. Safety and toxicity analysis of oxaliplatin combined with fluorouracil or as a single agent in patients with previously treated advanced colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003; 21(15): 2904–2911.
- Rasool Hassan B. Medicinal plants (importance and uses). *PharmaceutAnal Acta*. 2012; 3: e139.
- Riemersma RA. Epidemiology and the role of antioxidants preventing coronary heart disease: a brief overview. *Proc. Nutr. Soc.* 1994;53: 59-65.

- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst J, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004; 14: 1902–10.
- Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol.* 2008; 26: 462-9.
- Rutman RJ, Cantarow A, Paschkis KE. The catabolism of uracil in vivo and in vitro. *The Journal of biological chemistry.* 1954; 210(1): 321–329.
- Saltz L. Irinotecan-based combinations for the adjuvant treatment of stage III colon cancer. *Oncology.* 2000; 14(12): 47-50.
- Samuelson G. *Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy*: Taylor & Francis Group. 1999.
- Sardari S, Shokrgozar MA, Ghavami G. Cheminformatics based selection and cytotoxic effects of herbal extracts. *Toxicology in Vitro.* 2009; 23: 1412–1421.
- Schippmann U, Leaman D, Cunningham A. A comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects. *Frontis.* 2006; 17: 75-95.
- Schickel R, Park SM, Murmann AE, Peter ME. miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1. *Mol. Cell.* 2010; 38: 908–915.
- Schwartz JL. The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants; their effects on tumor cell growth. *J. Nutr.* 1996; 126: 1221-1227.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell.* 2003; 115: 199–208.
- Shah MY, Calin GA. MicroRNAs as therapeutic targets in human cancers. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014; 5(4): 537-48.
- Shiezadeh F, Mousavi SH, Amiri MS, Iranshahi M, Tayarani-Najaran Z, Karimi G. Cytotoxic and Apoptotic Potential of Rheum turkestanicum Janisch Root Extract on Human Cancer and Normal Cells
- Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh journal of pharmacology.* 2006; 1(2): 35-41.
- Sidney J W. Natural history of colorectal cancer. *The American Journal of Medicine.* 1999; 106: 3–6.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer Statistics.* CA Cancer J Clin. 2017; 67(1): 7-30.
- Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell.* 2010; 38: 323-332.
- Sofowora A. *Medicinal plants and traditional medicine in Africa.* John Wiley and sons LTD. İng. 1982; xviii + 256pp.
- Stahelin HB, Gey F, Brubacher G. “Preventive potential of antioxidative vitamins and carotenoids on cancer”. In *Elevated Dosages of Vitamins.* Toronto. 1989; 232-241.
- Sun Y, Shen S, Liu X, Tang H, Wang Z, Yu Z, Li X, Wu M. MiR-429 inhibits cells growth and invasion and regulates EMT-related marker genes by targeting Onecut2 in colorectal carcinoma. *Molecular and cellular biochemistry* 2014;390: 19-30.
- Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer.* 2003; 3: 768-780.
- Tabata M, Sezik E, Honda G, Yesilada E, Fuki H, Goto K. Traditional medicine in Turkey III. Folk Medicine in East Anatolica, Van and Bitlis provinces. *International Journal of Pharma- cognosy.* 1994; 32: 3–12.
- Teiten MH, Gaascht F, Eifes S, Dicato M, Diederich M. Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer. *Genes & Nutrition.* 2010; 5(1): 61–74.
- Tenesa A, Dunlop MG. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat Rev Genet.* 2009; 10: 353–358.



- Toiyama Y, Hur K, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M, Boland CR, A. Goel. Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Ann. Surg.* 2014; 259: 735–743.
- Torres A, Torres K, Pesci A. Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. *International Journal of Cancer.* 2013; 132(7): 1633–1645.
- Tosun F, Akyuz-Kızılay C. Anthraquinones and flavonoids from *Rheum ribes*. *Journal of Faculty of Pharmacy Ankara.* 2003; 32: 31–35.
- Uhlmann S, Zhang JD, Schwager A, Mannsperger H, Riazalhosseini Y, Burmester S, Ward A, Korf U, Wiemann S, Sahin O. MiR-200bc/429 cluster targets PLC $\gamma$ 1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer. *Oncogene.* 2010; 29: 4297–4306.
- Uyar P, Coruh N, İscan M. Evaluation of *in vitro* antioxidative, cytotoxic and apoptotic activities of *Rheum ribes* ethyl acetate extracts. *Journal of Plant Sciences* 2014; 2(6): 339-346.
- Valladares-Ayerbes M, Reboredo M, Medina-Villaamil V, Iglesias-Diaz P, Lorenzo-Patino MJ, Haz M, Santamarina I, Blanco M, Fernandez-Tajes J, Quindos M, Carral A, Figueroa A, Anton-Aparicio LM, Calvo L. Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 186.
- Van Maanen J, Retel J, De Vries J, Pinedo H. Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review. *Journal of the National Cancer Institute.* 1988; 80: 1526-1533.
- Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Aretz S, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Bulow S, Burn J, Capella G, Colas C, Engel C, Frayling I, Friedl W, Hes FJ, Hodgson S, Jarvinen H, Mecklin JP, Moller P, Myrhoi T, Nagengast FM, Parc Y, Phillips R, Clark SK, de Leon MP, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Tejpar S, Thomas HJ, Wijnen J: Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut.* 2008; 57:704-713.
- Vickers A. Botanical medicines for the treatment of cancer: rationale, overview of current data, and methodological considerations for phase I and II trials. *Cancer Invest.* 2002; 20: 1069-1079.
- Vickers A. Recent advances: Complementary medicine. *British Medical Journal.* 2000; 321: 683.
- Wahid F, Khan T, Kim YY. MicroRNA and diseases: Therapeutic potential as new generation of Drugs. *Biochimie.* 2014; 104: 12-26.
- Waller A, Findeis S, Lee MJ. Familial adenomatous polyposis. *J Pediatr Genet.* 2016; 5: 78–83.
- Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 489–499.
- Wang A., Yang, M., Liu, J. Molecular phylogeny, recent radiation and evolution of gross morphology of the rhubarb genus *Rheum* (Polygonaceae) inferred from chloroplast DNA trnL-F sequences. *Ann. Bot. (Lond.).* 2005; 96: 488–498.
- Wang B, Li M, Wu Z, Li X, Li YU, Shi X, Cheng W. Associations between SOX2 and miR-200b expression with the clinicopathological characteristics and prognosis of patients with glioma. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2015;10(1): 88–96.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents .VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus-Brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society.* 1971; 93: 2325-7.
- Wasser SP, Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Critical Reviews in Immunology.* 1999; 19: 65-96.
- Weidner C, Rousseau M, Plauth A, Wowro S, Fischer C, Abdel-Aziz H, Sauer S. *Melissa officinalis* extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species. *Phytomedicine.* 2015; 22: 262–270.
- Werner GH, Jolles P. Immunostimulating agents: What next? A review of their present and potential medical applications. *European Journal of Biochemistry.* 1996; 242: 1-19.

Witold K, Anna K, Maciej T, Jakub J. Adenomas - Genetic factors in colorectal cancer prevention. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2018; 23(2): 75-83.

World Health Organization (WHO). Fact Sheet No. 134: Traditional medicine [Online]. 2003. Geneva, Switzerland.

World Health Organization (WHO). Traditional medicine strategy. 2002. Geneva, Switzerland.

Wu H, Tschopp J, Lin SC. Smac mimetics and TNF alpha: A dangerous liaison? *Cell.* 2007; 131, 655-658.

Wyatt MD, Wilson DM. Participation of DNA repair in the reponse to 5-fluorouracil. *Cellular and molecular life sciences.* 2009; 66(5): 788-99.

Wyk Van BE, Wink M. Medicinal plants of the world. Textbook Medicinal plants of the world. 2017; Ed. 2.

Xia W, Li J, Chen L, Huang B, Li S, Yang G, Ding H, Wang F, Liu N, Zhao Q, Fang T, Song T, Wang T, Shao N. MicroRNA-200b regulates cyclin D1 expression and promotes S-phase entry by targeting RND3 in HeLa cells. *Mol. Cell Biochem.* 2010; 344 ; 261–266.

Xing Z, Li D, Yang L, Xi Y, Su X. MicroRNAs and anticancer drugs. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2014; 46(3): 233-239.

Xu R, Zhou B, Fung PCW, Li X. Recent advances in the treatment of colon cancer. *Histol Histopathol.* 2006; 21: 867–872.

Yao CX, Wei QX, Zhang YY, Wang WP, Xue LX, Yang F, Zhang SF, Xiong CJ, Li WY, Wei ZR, Zou Y, Zang MX. MiR-200b targets GATA-4 during cell growth and differentiation. *RNA Biol.* 2013; 10: 465–480.

Yao Y, Hu J, Shen Z. MiR-200b expression in breast cancer: a prognostic marker and act on cell proliferation and apoptosis by targeting Sp1. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2015; 19 (4): 760–769.

Ye M., Han J, Chen H, Zheng J, Guo D. Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry.* 2007; 18: 82–91.

Yildirim A. Antioxidant Activity of Different Parts of Isgin (*Rheum ribes* L.). 2007; 19 (4):25240.

Yildirim I, Kutlu T and Takim K. Comparison of Antioxidant Activity of Rheum ribes Fruits and Seed Methanolic Extracts against Protein Oxidation and Lipid Peroxidation. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 2015; 18 (5): 232-239.

Yoshioka A, Tanaka S, Hiraoka O, Koyama Y, Hirota Y, Ayusawa D, Seno T, Garrett C, Wataya Y. Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance: 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *The Journal of biological chemistry.* 1987; 262 (17): 8235–8241.

Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., and Qian, M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 1619-1624.

Yuan XG, Li SP, Wang YT, Li P, Yang FQ. Simultaneous determination of anthraquinones in Rhubarb by pressurized liquid extraction and capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis.* 2005; 26 (9): 1778–1782.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology.* 2007; 302: 1–12.

Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, Jenkins AO, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Pnas.* 2006;103(24):9136–9141.

Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: Mechanism of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules.* 2008; 13: 1551-69.

Zhao G., Wang B., Liu Y. MiRNA-141, downregulated in pancreatic cancer, inhibits cell proliferation and invasion by directly targeting MAP4K4. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2013; 12(11): 2569–2580.

Zhou X, Wang Y, Shan B, Han J, Zhu H, Lv Y, Fan X, Sang M, Liu XD and Liu W. The downregulation of miR-200c/141 promotes ZEB1/2 expression and gastric cancer progression. *Med Oncol*. 2015; 32: 428.

Zhou X, Baoan S, Linhong J, Deyu H, Chunling D, Guangfang X, Zhihui Z, Song Y. Isolation and inhibitory activity against ERK Phosphorylation of hydroxyanthraquinones from rhubarb. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006; 16: 563–568.

Zhu ZM, Xu YF, Su QJ. Prognostic significance of microRNA-141 expression and its tumor suppressor function in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2014; 388(1-2): 39–49.

Zhu SH, He XC, Wang L. Correlation analysis of miR-200b, miR-200c, and miR-141 with liver metastases in colorectal cancer patients. *European review for medical and pharmacological sciences* 2017;21: 2357-63.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

İlknur ÇINAR 1986 yılında Bingöl’de doğdu. Lise eğitimini 2004 yılında Bursa Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2005 yılında kazandığı Selçuk Üniversitesi Biyoloji bölümünden 2009 yılında mezun oldu. 2010 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında başladığı yüksek lisans eğitimini 2013 yılında tamamladı. Yine aynı bölümde 2013 yılında doktora eğitimine başladı. 2011 yılından beri Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

