

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***LIQUIDAMBAR ORIENTALIS* MILL. VAR. *ORIENTALIS*'İN
ANTIOKSİDAN, ANTI-KARSİNOJENİK,
ANTI-İNFLAMATUVAR VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
HÜCRESEL VE MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

SÜMEYRA ÇETİNKAYA

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. HATİCE GÜL DURSUN

KONYA-2018

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***LIQUIDAMBAR ORIENTALIS* MILL. VAR. *ORIENTALIS*'İN
ANTIÖKSİDAN, ANTI-KARSİNOJENİK,
ANTI-İNFLAMATUVAR VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
HÜCRESEL VE MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

SÜMEYRA ÇETİNKAYA

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. HATİCE GÜL DURSUN

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
161418002 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2018

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **SÜMEYRA ÇETİNKAYA**'nın "**Liquidambar orientalis** Mill. var. **orientalis**'in Anti-oksidan, Anti-karsinojenik, Anti-inflamatuvar ve Apoptotik Etkilerinin Hücresel ve Moleküler Düzeyde Araştırılması" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya, TÜRKİYE/21.06.2018



Tez Danışmanı

Doç.Dr. Hatice Gül DURSUN

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji A.D.

Jüri Üyesi



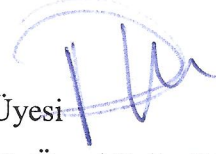
Doç. Dr. Ercan KURAR

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji A.D.

Jüri Üyesi



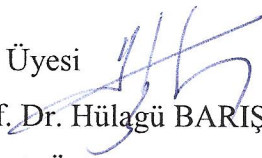
Dr.Öğr.Üyesi Pelin TAŞDEMİR

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 05./07/2018 tarih ve 14./03.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü



APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “**Assessment of Anti-oxidant, Anti-carcinogenic, Anti-inflammatory and Apoptotic Effects of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis* in Cellular and Molecular Levels**” by **SÜMEYRA CETİNKAYA** 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 Department”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan.

Konya, TURKEY/21.06.2018



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

Asst.Prof.Dr.Pelin TAŞDEMİR

Necmettin Erbakan University

Meram Faculty of Medicine

Department of Medical Biology



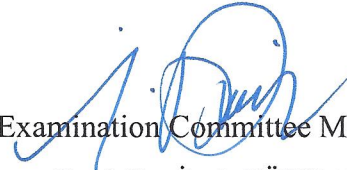
Examination Committee Member

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 haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

21.06.2018

Sümeyra ÇETİNKAYA



[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.

Sümevra Çetinkaya - LIQUIDAMBAR ORIENTALIS MILL. ...

Gelen Kutusu | Görüntüleniyor: yeni ödevler ▼

[Dosyayı Gönder](#) [Çevrimiçi Derecelendirme Raporu](#) | [Ödev ayarlarını düzenle](#) | [E-posta bildirmeyenler](#)[Sil](#) [İndir](#) [Şuraya taşı...](#)

<input type="checkbox"/>	Yazar	Başlık	Benzerlik	web	yayın	student papers	Puanla	cevap	Dosya	Ödev Numarası	Tarih
<input type="checkbox"/>	Sümevra Çetinkaya	LIQUIDAMBAR ORIENTALIS MILL. VAR. ORIENT...	%8 <input type="text" value="%8"/>	4%	5%	5%	--	--	ödev indir	970286848	30-May-2018

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmalarım boyunca her türlü araştırma desteğini sağlayan, ihtiyacım olan her an ilgi ve sevgisini esirgemeyen, erdemli ve karakterli olma konusunda rol modelim kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN'a, en zorlu koşullarda bile deney yapmam için laboratuvarını paylaştan, deney ve yazım aşamalarında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren değerli hocam Doç. Dr. İpek SÜNTAR'a, tezimin düzeltilmesinde destek olan değerli hocalarım Doç. Dr. Ercan KURAR, Doç. Dr. Hasibe VURAL ve Yrd. Doç. Dr. Pelin TAŞDEMİR'e, laboratuvar çalışmalarımı yaptığım Tıbbi Biyoloji laboratuvarı ekip arkadaşlarım Canan EROĞLU ve Ebru AVCI'ya, kromatografik analizlerin yapılmasında bize destek olan Ege MATAL'a en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, emeklerini ödeyemeyeceğim annem, babam, teyzem ve canım kardeşim Faruk ÇETİNKAYA'ya, ailemizden biri gibi olan hayatın tüm getirilerini birlikte göğüslediğimiz İlknur ÇINAR'a ve son olarak en büyük destekçim, hayat arkadaşım eşim Burak GÜLTEKİN'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından NEÜ-BAP-161418002 kodlu proje ile desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Necmettin Erbakan Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkürlerimi arz ederim.

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i>	<i>i</i>
<i>Tez Onay Sayfası</i>	<i>ii</i>
<i>Tez Beyan Sayfası</i>	<i>iv</i>
<i>Teşekkür</i>	<i>v</i>
<i>İçindekiler</i>	<i>vi</i>
<i>Kısaltmalar ve Simgeler Listesi</i>	<i>x</i>
<i>Şekiller Listesi</i>	<i>xii</i>
<i>Tablolar Listesi</i>	<i>xv</i>
<i>Özet</i>	<i>xvi</i>
<i>Abstract</i>	<i>xvii</i>
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Karsinogenez Süreci</i>	5
2.2. <i>Kanserin Moleküler Biyolojisi</i>	9
2.2.1. <i>Kanserin Karakteristik Özellikleri</i>	10
2.2.1.1. <i>Sürekli Proliferatif Sinyalizasyon</i>	10
2.2.1.2. <i>Büyüme Karşıtı Sinyallere Duyarsızlık</i>	11
2.2.1.3. <i>Apoptozdan Kaçınmak</i>	11
2.2.1.4. <i>Replikatif Ölümsüzlüğü Etkinleştirmek</i>	11
2.2.1.5. <i>Sürekli Anjiyogenez</i>	11
2.2.1.6. <i>İnvazyon ve Metastazı Aktive Etmek</i>	12
2.3. <i>Tümör Mikroçevresi ve Hipoksisi</i>	12
2.3.1. <i>Tümör Hipoksisine Hücrel Adaptasyon Mekanizmaları</i>	13
2.4. <i>Kolorektal Kanseri ve Epidemiyolojisi</i>	14
2.4.1. <i>Türkiye’de Kolorektal Kanseri Epidemiyolojisi</i>	14
2.5. <i>Kolon ve Rektumun Morfolojisi ve Histolojisi</i>	15
2.5.1. <i>Kolon ve Rektumda Poliplerin Morfolojisi ve Histolojisi</i>	17
2.6. <i>Risk Faktörleri</i>	18
2.6.1. <i>Kalıtısal Kolorektal Kanseri Sendromları</i>	18
2.6.2. <i>İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı</i>	20
2.6.3. <i>Diğer Risk Faktörleri</i>	20
2.7. <i>Kolorektal Kanseri Moleküler Patogenezi</i>	21
2.8. <i>İnflamasyon ve Kanseri Bağlantısı</i>	23

2.8.1. Tümör Gelişiminde Rol Oynayan Sitokinler.....	25
2.8.1.1. İnterlökin-6 (IL-6).....	25
2.8.1.2. İnterlökin-8 (IL-8).....	26
2.8.1.3. İnterlökin-10 (IL-10).....	26
2.8.1.4. Tümör Nekroz Faktörü (TNF- α).....	26
2.9. Kolorektal Kanser Patogenezinde İnflamasyon ve NF- κ B Sinyal Yolağı	28
2.9.1. Nükleer Faktör- κ B (NF- κ B) Transkripsiyon Faktörü Ailesi.....	30
2.9.2. NF- κ B Sinyal İletim Yolağının Aktivasyonu	31
2.9.2.1. Klasik Yolak.....	33
2.9.2.2. Alternatif Yolak.....	34
2.9.3. NF- κ B Sinyal İletim Yolunun Aktivatörleri ve Hedef Genler	35
2.10. Hücre Ölümü (Apoptoz)	35
2.10.1. Apoptozun Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	35
2.10.2. Apoptoz Mediatorlerinin Büyük Bir Sınıfı Olarak Kaspazlar	35
2.10.3. İntrinsik (Mitokondri Aracılı) Yolak	36
2.10.3.1. Bcl-2 Ailesi Üyeleri.....	37
2.10.4. Ekstrinsik Yolak	37
2.11. Bitkisel Kaynaklı Tedavi.....	38
2.11.1. Karsinogenezde Fenolik Bileşiklerin Rolü	39
2.12. <i>Liquidambar orientalis</i> Mill. var. <i>orientalis</i>	41
2.12.1. <i>L.orientalis</i> 'in Taksonomik Sınıflandırılması	41
2.12.2. <i>L.orientalis</i> 'in Yayılışı	41
2.12.3. <i>L.orientalis</i> 'in Halk Arasında Kullanılışı ve Üzerinde Yapılan Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları	42
3. MATERYAL ve METOD	49
3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	49
3.2. Bitkinin Temini ve Numunelerin Hazırlanışı	52
3.3. Bitki Ekstraksiyonu.....	52
3.3.1. Balsam	52
3.3.2. Yaprak.....	53
3.3.3. Meyve.....	53
3.3.4. Sabit Tartım	53
3.4. Ekstreler Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Analizler	53
3.4.1. <i>L.orientalis</i> 'in Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi	53
3.4.2. <i>L.orientalis</i> 'in Toplam Flavonoit İçeriğinin Belirlenmesi	54

3.4.3. Kromatografik Analiz	55
3.5. Biyolojik Aktivite Tayinleri.....	55
3.5.1. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi	55
3.5.2. Anti-proliferatif Etkinin Belirlenmesi	57
3.5.3. Hücre Kültürü.....	59
3.5.3.1. Hücre Hattı Temini	59
3.5.3.2. Hücre İnkübasyon Koşulları.....	59
3.5.3.3. HCT-116 Hücre Morfolojisi ve Özellikleri.....	59
3.5.3.4. HT-29 Hücre Morfolojisi ve Özellikleri	60
3.5.3.5. Hücrelerin Çözdürülmesi.....	61
3.5.3.6. Hücrelerin Dondurulması.....	62
3.5.3.7. Hücrelerin Pasajlanması	62
3.5.3.8. Hücre Sayımı	63
3.6. Ekstrelerin Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması.....	63
3.7. Gen Ekspresyon Analizi.....	64
3.7.1. HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinden Trizol İle Total RNA İzolasyonu	64
3.7.2. RNA Miktarının Belirlenmesi	65
3.7.3. İzole Edilen RNA'ların Jelde Yürütülerek Kalitesinin Belirlenmesi	65
3.7.4. DNaz Muamelesi ile Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması	66
3.7.5. cDNA Sentezi	66
3.7.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR).....	67
3.7.6.1. NF- κ B Yolağı Gen Ekspresyon Analizi	67
3.7.6.2. Apoptotik Gen Ekspresyonlarının Analizi	69
3.7.6.3. RT-PZR Koşulları	71
3.8. Apoptozun Belirlenmesi.....	72
3.8.1. TUNEL Yöntemi.....	72
3.8.2. Akış Sitometrisi	74
3.9. Hücre İnvazyonunun Belirlenmesi	74
3.10. Protein Analizi.....	77
3.10.1. Enzim Bağlı İmmüno Sorbent Testi (ELISA)	77
3.10.2. Anti-inflamatuvar Etkinin Belirlenmesi.....	78
3.10.2.1. IL-6 ELISA Kit Protokolü	79
3.10.2.2. IL-8 ELISA Kit Protokolü	80
3.10.2.3. IL-10 ELISA Kit Protokolü	81
3.11. İstatistiksel Analiz.....	82

4. BULGULAR	83
4.1. <i>L.orientalis</i> 'e Ait Ekstrelerin Verimleri	83
4.2. <i>L.orientalis</i> 'in Toplam Fenolik İçerik Bulguları.....	83
4.3. <i>L.orientalis</i> 'in Toplam Flavonoit İçerik Bulguları.....	84
4.4. Kromatografik Analiz Bulguları.....	85
4.5. <i>L.orientalis</i> 'in Antioksidan Aktivite Bulguları	92
4.6. <i>L.orientalis</i> Estrelerinin IC ₅₀ Dozlarına Ait Bulgular	93
4.7. RT-PZR Bulguları.....	110
4.7.1. NF-κB Yolağı Gen Ekspresyon Analizi Bulguları	110
4.7.2. Apoptotik Genlerin Ekspresyon Seviyelerine Ait Bulgular.....	116
4.8. Apoptotik Etkinin Belirlenmesi.....	117
4.8.1. TUNEL Bulguları	117
4.8.2. Akış Sitometrisi Bulguları.....	119
4.9. Hücre İnvazyonunun Belirlenmesi	120
4.10. <i>L.orientalis</i> 'in Anti-inflamatuvar Etkisinin in vitro Olarak Belirlenmesi...	122
4.10.1. <i>L.orientalis</i> 'e Ait Yaprak Metanol Ekstresinin IL-6, IL-8 ve IL-10 Salınımı Üzerine Etkisi	123
4.10.1.1. IL-6 ELISA Bulguları.....	124
4.10.1.2. IL-8 ELISA Bulguları.....	124
4.10.1.3. IL-10 ELISA Bulguları.....	125
5. TARTIŞMA	126
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	141
7. KAYNAKLAR	142
8. ÖZGEÇMİŞ	160

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

°C	: Santigrad Derece
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar
Bax	: BCL2 İlişkili X Proteini
Bcl-2	: B hücresi lenfoma geni 2
Bcl-3	: B hücresi lenfoma geni 3
Bcl-xL	: B hücresi lenfoma-ekstra büyük
cDNA	: Komplementer DNA
CAM	: Hücre adezyon molekülü
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DF	: Dilüsyon faktörü
DMEM	: Dulbecco tarafından modifiye edilen eagle besiyeri
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	: Epitelyal mezenkimal geçiş
FBS	: Fötal sığır serumu
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
HGF	: İnsan büyüme faktörü
ICAM-1	: Hücrelerarası adezyon molekülü-1
IKK	: İnhibitör kappa B kinaz kinaz
IL	: İnterlökin
IL-1R	: İnterlökin 1 reseptörü
IκB	: İnhibitör kappa B
JNK	: Jun N terminal kinaz
LPS	: Lipopolisakkarit
MAPK	: Mitojenle etkileşen protein kinaz
MMP	: Matriks metaloproteinaz
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa B
NF-κB1 (p50)	: Nükleer faktör-kappa B1
iNOS/NOS2	: Uyarılabilir nitrik oksit sentaz

PBS	: Fosfat tamponlu tuz
p53	: Tumor protein 53
PI3K	: Fosfatidilinositol 3 kinaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RelA (p65)	: Retikuloendotelial viral onkogen homologu A
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
TNF- α	: Tumor nekroz faktör- α
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. T.C. Sağlık Bakanlığı 2014 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri (Erkeklerde En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları).....	3
Şekil 2.2. T.C. Sağlık Bakanlığı 2014 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri (Kadınlarda En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları)	3
Şekil 2.3. Kanser gelişiminde genlerin ve çevrenin rolü. A) Kansere genetik ve çevresel faktörlerin katkısı. B) Seçilen kanserler için aile riski oranları	5
Şekil 2.4. Karsinogenezin Basamakları	6
Şekil 2.5. Kanserde epitelyal-mezenkimal geçişin mekanizması ve düzenlenmesi ...	8
Şekil 2.6. Kanser karakteristlik özellikleri.....	10
Şekil 2.7. İnsanlarda kolon ve rektum anatomisi.....	16
Şekil 2.8. Kolon kanserinin çok adımlı gelişim süreci	23
Şekil 2.9. Kolorektal kanserde sitokin rolü.....	30
Şekil 2.10. Klasik ve alternatif NF-κB yolağı	33
Şekil 2.11. Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz sinyal yolları.....	38
Şekil 2.12. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması.....	39
Şekil 2.13. Kolon kanserinde fenolik asitlerin anti-kanser mekanizmaları	40
Şekil 2.14. Taksonun Türkiye üzerindeki dağılımı.....	41
Şekil 2.15. <i>L.orientalis</i> meyve ve yaprağının görünümü.....	42
Şekil 3.1. DPPH reaksiyon mekanizması (R:H; antioksidan radikal süpürücü,R; antioksidan radikali)	56
Şekil 3.2. XTT tetrazolyumun XTT formazana indirgenmesi.....	57
Şekil 3.3. XTT testlerinin 96 kuyulu plakalardaki düzeninin gösterimi.....	58
Şekil 3.4. HCT-116 Hücre Hattı Morfolojisi (ATCC)	60
Şekil 3.5. HT-29 Hücre Hattı Morfolojisi (ATCC)	61
Şekil 3.6. Hemositometre lamına ait bir odacık.....	63
Şekil 3.7. İzole edilen RNA'ların kalitesini gösteren örnek jel görüntüsü	65
Şekil 3.8. İnvazyon deneyi için kullanılan odacıklar.....	75
Şekil 3.9. ELISA testi basamakları.....	78
Şekil 3.10. IL-6'nın seri dilüsyon hazırlama prosedürü	80
Şekil 3.11. IL-8'in seri dilüsyon hazırlama prosedürü	81
Şekil 3.12. IL-10'un seri dilüsyon hazırlama prosedürü.....	82
Şekil 4.1. Toplam fenolik madde miktarı ölçümü için gallik asit standart eğrisi grafiği	84

Şekil 4.2. Toplam flavonoit madde miktarı ölçümü için kersetin standart eğrisi grafiği.....	85
Şekil 4.3a. <i>L.orientalis</i> yaprak metanol ekstresine ait negatif mod LC-ESI-QTOF-MS analizi kromotogram sonucu (0-23. dakika)	86
Şekil 4.3b. <i>L.orientalis</i> yaprak metanol ekstresine ait negatif mod LC-ESI-QTOF-MS analizi kromotogram sonucu (0-8. dakika)	87
Şekil 4.4a. <i>L.orientalis</i> yaprak metanol ekstresine ait pozitif mod LC-ESI-QTOF-MS analizi kromotogram sonucu (0-23. dakika)	88
Şekil 4.4b. <i>L.orientalis</i> yaprak metanol ekstresine ait pozitif mod LC-ESI-QTOF-MS analizi kromotogram sonucu (0-8. dakika)	89
Şekil 4.5. L-askorbik asit standart eğrisi grafiği.....	92
Şekil 4.6. HCT-116 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> meyve <i>n</i> -hekzan ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	95
Şekil 4.7. HCT-116 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> meyve etil asetat ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	96
Şekil 4.8. HCT-116 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> meyve metanol ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	97
Şekil 4.9. HCT-116 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> yaprak <i>n</i> -hekzan ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	98
Şekil 4.10. HCT-116 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> yaprak etil asetat ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	99
Şekil 4.11. HCT-116 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> yaprak metanol ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	100
Şekil 4.12. HCT-116 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> balsam kloroform ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	101
Şekil 4.13. HCT-116 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> balsam metanol ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	102
Şekil 4.14. HT-29 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> meyve <i>n</i> -hekzan ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	103
Şekil 4.15. HT-29 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> meyve etil asetat ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	104
Şekil 4.16. HT-29 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> meyve metanol ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	105

Şekil 4.17. HT-29 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> yaprak n-hekzan ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	106
Şekil 4.18. HT-29 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> yaprak etil asetat ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	107
Şekil 4.19. HT-29 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> yaprak metanol ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	108
Şekil 4.20. HT-29 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> balsam kloroform ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	109
Şekil 4.21. HT-29 hücrelerinin <i>L.orientalis</i> balsam metanol ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları.....	110
Şekil 4.22. 48 saat doz uygulanan HCT-116 hücresinin kolorimetrik TUNEL analizi görüntüsü. A) Kontrol hücresi B) Doz uygulanan hücre	117
Şekil 4.23. 48 saat doz uygulanan HT-29 hücresinin kolorimetrik TUNEL analizi görüntüsü. A) Kontrol hücresi B) Doz uygulanan hücre	117
Şekil 4.24. Kontrol ve ekstreye ait ortalama apoptotik hücre yüzdeleri.....	118
Şekil 4.25. HCT-116 hücre hattında kontrol ve ekstreye ait apoptotik ve nekrotik hücrelerin akış sitometri sonuçları	119
Şekil 4.26. HT-29 hücre hattında kontrol ve ekstreye ait apoptotik ve nekrotik hücrelerin akış sitometri sonuçları	120
Şekil 4.27. HCT-116 hücrelerinin kontrol grubunun (A) ve ekstrenin (B) matrijel invazyon testi sonrası mikroskop görüntüleri	121
Şekil 4.28. HT-29 doz grubu hücrelerinin kontrol grubunun (A) ve ekstrenin (B) matrijel invazyon testi sonrası mikroskop görüntüleri.....	121
Şekil 4.29. Kontrol ve ekstreye ait invazyon yüzdeleri	122
Şekil 4.30. TNF- α ile indüklenen hücrelerde IL-6 protein salınımı üzerine <i>L.orientalis</i> yaprak metanol ekstresinin etkisi	124
Şekil 4.31. TNF- α ile indüklenen hücrelerde IL-8 protein salınımı üzerine <i>L.orientalis</i> yaprak metanol ekstresinin etkisi	125
Şekil 4.32. TNF- α ile indüklenen hücrelerde IL-10 protein salınımı üzerine <i>L.orientalis</i> yaprak metanol ekstresinin etkisi	125
Şekil 4.33. <i>L.orientalis</i> yaprak metanol ekstresinin kolon kanser hücre hatlarında NF- κ Byolağı aracılı anti-proliferatif ve apoptotik etki mekanizması	137

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Kalıtsal sendroma yatkınlık sağlayan genler	18
Tablo 3.1. Laboratuvarı kullarılan cihaz ve ekipman listesi	49
Tablo 3.2. Laboratuvarı kullarılan sarf malzeme listesi.....	50
Tablo 3.3. Laboratuvarı kullarılan kimyasalların listesi	51
Tablo 3.4. Laboratuvarı kullarılan kitler	52
Tablo 3.5. Gradient koşulları.....	55
Tablo 3.6. DNaz uygulaması.....	66
Tablo 3.7. cDNA sentez reaksiyonu.....	66
Tablo 3.8. NF-κB sinyal yolağı ile ilişkili genler.....	67
Tablo 3.9. Apoptozla ilişkili genlere ait primer dizileri	70
Tablo 3.10. RT-PZR reaksiyon karışımının hazırlanması.....	71
Tablo 3.11. RT-PZR dōngü profili.....	71
Tablo 3.12. TUNEL testi komponentleri.....	73
Tablo 3.13. İnvazyon testi solüsyon hacimleri.....	75
Tablo 4.1. % Verim	83
Tablo 4.2. <i>L. orientalis</i> 'e ait ekstrelerin gallik asit eşdeğeri cinsinden toplam fenolik madde miktarı.....	84
Tablo 4.3. <i>L. orientalis</i> 'e ait ekstrelerin kersetin eşdeğeri cinsinden toplam flavonoid madde miktarı.....	85
Tablo 4.4. <i>L.orientalis</i> yaprak metanol ekstresine ait iēerik analizi.....	90
Tablo 4.5. Antioksidan aktivite IC ₅₀ değerleri	92
Tablo 4.6. <i>L.orientalis</i> ekstrelerine ait HCT-116 hücre hattının IC ₅₀ değerleri.....	93
Tablo 4.7. <i>L.orientalis</i> ekstrelerine ait HT-29 hücre hattının IC ₅₀ değerleri	94
Tablo 4.8a. HCT-116 hücrelerine ait kontrol ve doz grubunda anlamlı düzeyde artış gösteren genler	112
Tablo 4.8b. HCT-116 hücrelerine ait kontrol ve doz grubunda anlamlı düzeyde azalış gösteren genler	113
Tablo 4.9a. HT-29 hücrelerine ait kontrol ve doz grubunda anlamlı düzeyde artış görölen genler.....	114
Tablo 4.9b. HT-29 hücrelerine ait kontrol ve doz grubunda anlamlı düzeyde azalış görölen genler.....	115
Tablo 4.10. HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde apoptotik genlere ait ekspresyon değişimleri.....	116

ÖZET

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Liquidambar Orientalis Mill. var. *Orientalis*'in Antioksidan, Anti-karsinojenik, Anti-İnflamatuvar ve Apoptotik Etkilerinin Hücresel ve Moleküler Düzeyde Araştırılması

Sümeyra ÇETİNKAYA

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi/ KONYA-2018

L.orientalis'in balsam, yaprak ve meyvelerinden farklı polariteye sahip ekstratler hazırlanarak, bu ekstratlerin insan kolon kanser hücre hatları olan HCT-116 ve HT-29 hücreleri üzerindeki antioksidan, anti-proliferatif, apoptotik ve anti-inflamatuvar etkileri araştırılmıştır.

Sitotoksikite testi XTT metodu ile gerçekleştirilmiş ve HCT-116 hücre hattında 27.80 µM, HT-29 hücre hattında ise 43.13 µM IC₅₀ dozu ile *L.orientalis*'in yapraklarından hazırlanan metanollü ekstratın en etkili ekstrat olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar biyolojik aktivite analizlerini de desteklemektedir. Diğer deneyler bu IC₅₀ dozları üzerinden gerçekleştirilmiştir.

L. orientalis yaprak metanol ekstratının kromatografik analizinde; gallik asit, kersetin, epigallokateşin, 3,4-dihidroksibenzoik asit, klorojenik asit, ferulik asit, mirisetin, kemferol, luteolin başta olmak üzere çeşitli biyoaktif maddelere rastlanmıştır. Pek çok hücresel sürecin sıkı bir şekilde düzenlenmesinde rol alan ve birçok kanser türünde aberant olarak ekspresyona edilen, NF-κB sinyal yolağı ile ilişkili 88 gen ve apoptozla ilişkili 9 genin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı PZR ile araştırılmıştır. Her iki hücre hattında da NF-κB sinyali ile ilişkili olan ve ekspresyon artışı gözlenen genlerin IL-10, kaspaz 1 (*CASP1*), kaspaz 8 (*CASP8*), TNFAIP3, TNFRSF10A ve TNFRSF10B; ekspresyon azalışı gözlenen genlerin ise IL-6, IL-8, NFKB1, TNF, TLR2 ve IKBKB olduğu saptanmıştır. Ayrıca apoptozla ilişkili p53, Bax, kaspaz -3, -7, -8, -9, Fas, sitokrom c (*Cycs*) genlerinin ekspresyonlarında kontrol göre artış ve anti-apoptotik Bcl-2 geninde ise azalış gözlenmiştir (p<0.05). Bu genlerin dışında hücreye özgü artış ve azalış gösteren genler de incelenerek NF-κB yolağı aracılı anti-proliferatif ve apoptotik etki mekanizması açıklanmıştır.

Apoptozun morfolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi TUNEL testi ve akış sitometrisi ile gerçekleştirilmiş ve ekstratın apoptozu uyardığı gösterilmiştir. Ekstratın invazyon karşıtı etkisinin olup olmadığı matrisel invazyon testi ile değerlendirilmiş ve kontrole göre ekstratın her iki hücre hattında da invazyonu önemli ölçüde baskılayarak anti-invaziv özellik sergilediği belirlenmiştir.

Her iki hücre hattında ekstratın anti-inflamatuvar aktivitesinin belirlenmesi için hücreler TNF-α ile uyarılmış, ortama salınan sitokinlerin (IL-6, IL-8, IL-10) seviyeleri ELISA testi ile ölçülmüştür. Hücrelerin sitokinlere verdiği cevapların farklı olduğu ve IL-6 ve IL-8 seviyesinin HT-29 hücre hattında, IL-10 seviyesinin ise HCT-116 hücre hattında daha iyi baskılandığı gözlenmiştir. Bu durum ekstratın her iki hücre hattında da etkili olduğunu göstermektedir. Metastazla ilişkili bir sitokin olan IL-8'in HT-29 hücre hattında daha fazla baskılanması, ekstratın hücreyi duyarlı hale getirerek TNF-α'nın sitotoksik etkisini artırmış olabileceğini düşündürmüştür.

Elde edilen sonuçlara göre *L.orientalis* yaprak metanol ekstratının HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin çoğalmasını hücresel ve moleküler seviyede inhibe ederek NF-κB aracılı anti-proliferatif ve apoptotik etki gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, inflamasyon, kolorektal kanser, *L.orientalis*, NF-κB.

ABSTRACT

NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Assessment of Anti-oxidant, Anti-carcinogenic, Anti-Inflammatory and Apoptotic Effects
of *Liquidambar Orientalis* Mill. var. *Orientalis* in Cellular and Molecular Levels

Sümevra ÇETİNKAYA

Department of Medical Biology

Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy/ KONYA-2018

For the assessment of antioxidant, anti-proliferative, apoptotic and anti-inflammatory effects on HCT-116 and HT-29 cells, extracts in different polarities from balsam, leaves and fruits of *L. orientalis* were prepared.

The cytotoxic activity of the extracts of *L. orientalis* was investigated through XTT assay. The methanol leaf extract showed the highest effect (IC₅₀ values for HCT-116 and HT-29 cell lines were determined to be 43.13 µM and 27.80 µM, respectively). These results also supported biological activity analyzes. Next steps of the study were performed at these IC₅₀ doses.

Chromatographic analysis on *L. orientalis* methanol leaf extract revealed the presence of various bioactive substances, especially gallic acid, quercetin, epigallocatechin, 3,4-dihydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, myristine, kaempferol and luteolin. Expression levels of 88 genes associated with the NF-κB signaling pathway and 9 genes associated with apoptosis, which involved in regulation of many cellular processes and aberrantly expressed in many cancers, were investigated by real time PCR. Results showed a marked increase in the expression of IL-10, Caspase 1, Caspase 8, TNFAIP3, TNFRSF10A and TNFRSF10B and decreased in the expression of IL-6, IL-8, NF-κB, TNF, TLR2 and IGF1BP, in both cell lines. Additionally, there was also an increase in expression of apoptosis-associated p53, Bax, Caspase-3, -7, -8, -9, Fas and Ccnc genes and a decrease in anti-apoptotic Bcl-2 gene (p<0.05). There were also genes that showed an expression increase and decrease in the cell-specific manner (only in HCT-116 or only in HT-29 cell line).

The NF-κB pathway mediated anti-proliferative and apoptotic mechanism of the action has been described, including all these genes. TUNEL assay and Flow Cytometry were used for morphologically and biochemically detection of apoptosis. The results of both methods have shown that *L. orientalis* leaf methanol extract stimulates apoptosis in the both cell lines. The effect of the extracts on invasion determined via Matrigel Invasion assay, in which *L. orientalis* leaf methanol extract significantly suppressed invasion in the both cell lines compared to the untreated cells (p<0.05).

For the evaluation of anti-inflammatory effect of *L. orientalis* extracts in both cell lines, first the cells were stimulated with TNF-α, then levels of cytokines (IL-6, IL-8, IL-10) released to media were measured by the ELISA assay. It was observed that the responses of the cells to the cytokines were different, i.e. IL-6 and IL-8 were better suppressed in the HT-29 cell line and IL-10 was better suppressed in the HCT-116 cell line. This suggests that the extract is effective on both HCT-116 cells and HT-29 cells. Further suppression of the metastasis-associated cytokine, IL-8, in the HT-29 cell line has been suggested that the extract could probably enhance the sensitivity of the cells and increase the cytotoxic effect of TNF-α.

In conclusion, *L. orientalis* leaf methanol extract inhibits the proliferation of HCT-116 and HT-29 cells at cellular and molecular levels and exerts NF-κB mediated anti-proliferative and apoptotic effects.

Key words: Apoptosis, inflammation, colorectal cancer, *L. orientalis*, NF-κB.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde başlıca kanser tedavi şekilleri olan kemoterapi, radyoterapi, cerrahi, gen terapi, moleküler hedefli tedavi ve immun terapinin (Xia ve ark., 2018) yan etkilerinden dolayı, tıbbi bitkilerden hazırlanan ekstraların modern tıbbın tamamlayıcısı olarak kullanımı her geçen gün artmaktadır.

Antik çağlardan beri çeşitli kronik hastalıkları tedavi etmek için tıbbi bitkiler kullanılmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerdeki nüfusun % 80 kadarı, birçok hastalığın tedavisinde modern tıp yöntemlerine erişemediklerinden, alternatif tıp yöntemlerine başvurmaktadır (Pandey ve ark., 2013; Ekor, 2014).

Kanserin ortaya çıkışı, normal hücrelerin aşamalı olarak tümör hücresine dönüşmesine yol açan karmaşık ve çok adımlı bir süreçtir. Kanser başlama ve ilerlemesindeki olayların rolü ve ilgili moleküler mekanizmalar yaygın şekilde incelenmiştir. Araştırmalar tümör mikroçevresi de dahil olmak üzere kanser tedavisi için çoklu hedeflerin bir arada düşünülmesi gerektiğini önermektedir (Kolenda ve ark., 2018; Belli ve ark., 2018). Bu durumda karsinogenez mekanizmasının altında yatan temel nedenlere odaklanan yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Kronik inflamasyon; malign transformasyon, tümör gelişimi, invazyon ve metastatik yayılımı destekleyerek kanser riskini artırmaktadır (Multhoff ve ark., 2012). İnflamasyonun aracıları ve hücrel efektörleri, tümör mikroçevresinin önemli bileşenleridir. İnflamasyon, doku hasarına ve enfeksiyona yanıt olarak başlatılan, sitokinlerin ve diğer mediatörlerin salınmasına bunun yanı sıra bağışıklık hücrelerinin aktivasyonuna ve göçüne yol açan birçok patofizyolojik koşulun birlikteliği olarak düşünülebilir (Mantovani ve ark., 2008).

Kanser ve inflamasyon arasındaki bağlantıda rol alan anahtar transkripsiyon faktör ailesi NF- κ B'dır. Anti-tümör immun yanıtları baskılayabilen NF- κ B; tümörle ilişkili inflamasyon, tümör büyümesi, ilerlemesi ve metastatik yayılımında rol alan 500'den fazla genin ekspresyonunu düzenler (Gupta ve ark., 2010; Multhoff ve ark., 2012). Bu sebeple NF- κ B'yı hedefleyen tedavi stratejilerinin geliştirilmesi kanserin önlenmesinde potansiyel bir hedeftir.

Doğal kökenli kanser önleyici ajanların hem kanserin tedavi edilmesine, hem de anti-inflamatuvar aktivite yoluyla önlenmesine katkı sağladığı bilinmektedir. Taksol, vinblastin, vinkristin, kamptotesin türevleri, topotekan, irinotekan ve etoposid gibi tüm dünyada klinik olarak kullanılan anti-kanser ajanlar bitkisel kökenli bileşiklerden elde edilmiştir (Sisodiya, 2013). Bu nedenle çalışmamızda, ülkemize endemik bir bitki olan ve halk arasında “Sığla, günlük vb.” isimleriyle bilinen, Hamamelidaceae familyasına ait *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis* (*L. orientalis*)’in etnobotanik kayıtları dikkate alınarak anti-karsinojenik, anti-inflamatuvar, antioksidan, apoptotik etkilerinin *in-vitro* olarak belirlenmesi ve en etkili ekstrenin içerik analizinin yapılarak kolorektal kanserde muhtemel etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

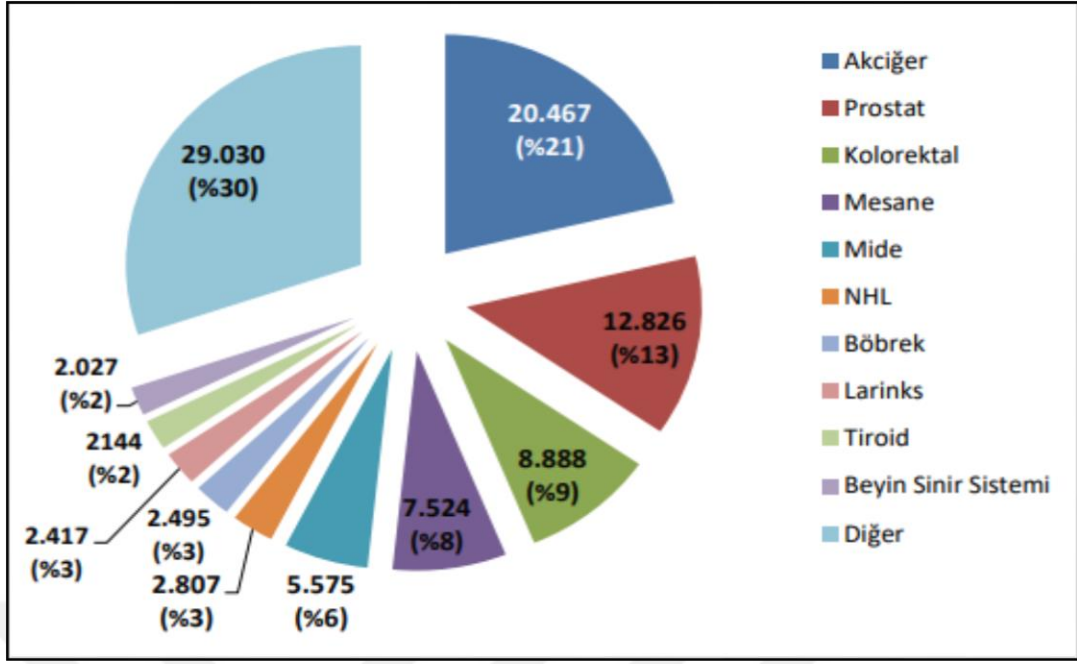
2. GENEL BİLGİLER

Kanser; vücudun herhangi bir bölümünü etkileyebilen, normal hücrelere kıyasla daha hızlı büyüme ve yüksek sağkalım potansiyeline sahip olan, diğer dokulara/organlara da yayılabilme özelliği gösteren anormal hücrelerin yol açtığı bir hastalık grubudur. Malign tümör ya da neoplazi olarak da bilinen bu hastalık grubu mortaliteye neden olur (Klug ve ark., 2014).

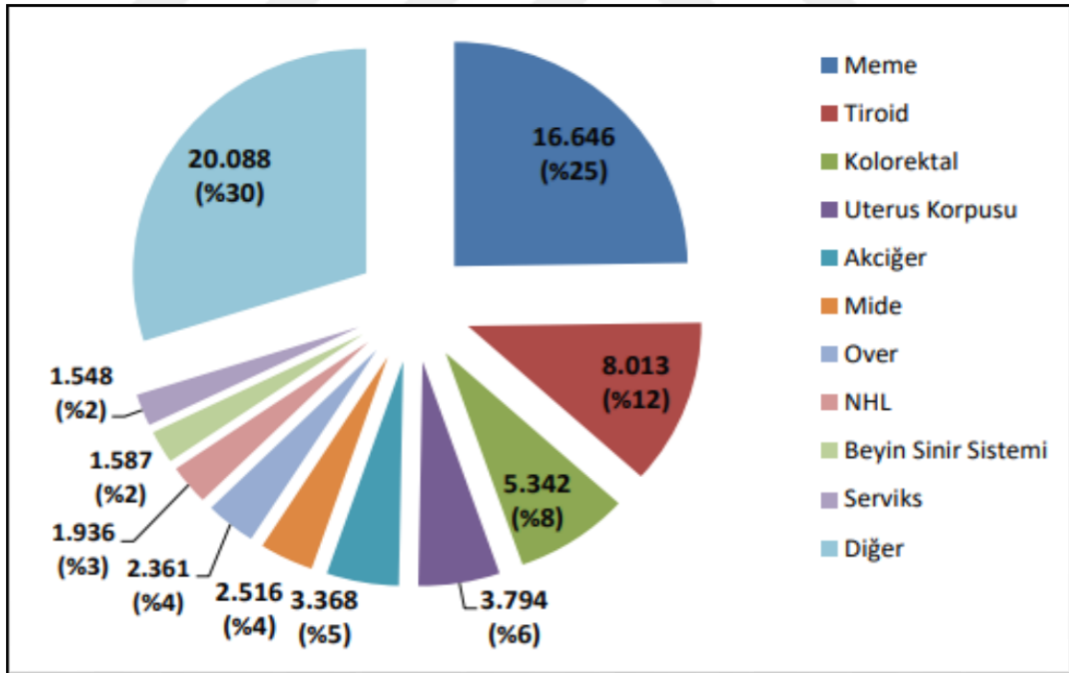
2015 yılında dünya genelinde 14.1 milyon yeni kanser vakasının meydana geldiği, 8.8 milyonunun ise ölüme sonuçlandığı bildirilmiştir. Dünyada, 6 ölümden yaklaşık 1’i kanser nedeniyledir (WHO). Kanserden ölümlerin artmaya devam edeceği ve 2030 yılına kadar yıllık 23.6 milyon yeni vakanın ortaya çıkacağı tahmin edilmektedir (Ferlay ve ark., 2015).

Uluslararası Kanser Ajansı 2012 yılı kanser tahminlerine göre Dünya’da en çok tanı konulan kanserler arasında akciğer kanseri % 13.0 ile ilk sırada olup sonrasında ise, % 11.9 ile meme kanseri 2. sırada ve % 9.7 ile kolon kanseri 3. sırada yer almaktadır. Ölüm oranı ise en çoktan aza doğru sırası ile % 19.4 ile akciğer, % 9.1 ile karaciğer ve % 8.8 ile mide kanseri olduğu belirtilmiştir (Ferlay ve ark., 2015).

Ülkemizde de kardiyovasküler hastalıklardan sonra sebebi bilinen ölümler sıralamasında en sık görülen ikinci ölüm sebebi kanserdir (TUİK 2017).



Şekil 2.1. T.C. Sağlık Bakanlığı 2014 Yılı Türkiye kanser istatistikleri (erkeklerde en sık görülen kanserlerin toplam sayısı ve yüzde dağılımları).

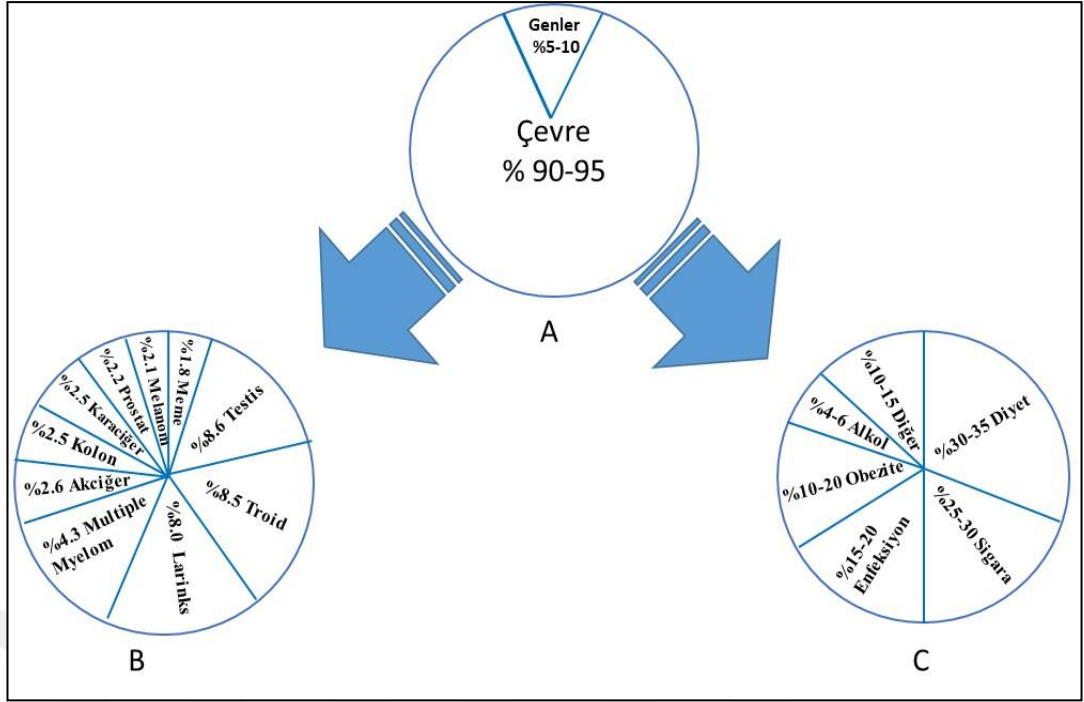


Şekil 2.2. T.C. Sağlık Bakanlığı 2014 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri (Kadınlarda en sık görülen kanserlerin toplam sayısı ve yüzde dağılımları).

Türkiye Sağlık Bakanlığı 2014 Kanser İstatistiklerine göre, Türkiye'de erkeklerde en sık görülen kanser sıralamasında akciğer, prostat ve kolorektal kanseri; kadınlarda ise meme, troid ve kolorektal kanser ilk üç sırayı oluşturmaktadır (Şekil 2.1 ve 2.2). Kanser ülkemizde 2015 yılı içerisinde 49.946 erkek, 27.022 kadının ölümüne neden olmuştur (TÜİK Ölüm Nedeni İstatistikleri 2016, <http://www.tuik.gov.tr>).

Çeşitli ülkelerde spesifik kanser oranlarındaki büyük farklılık, diyet ve kanser arasındaki bağlantıyı göstermekte ve göçün etkisi kanser insidansında gözlemlenen değişikliklerle ortaya çıkmaktadır. Örneğin; Asyalıların, Batı ülkelerinde yaşayanlardan 25 kat daha düşük prostat kanseri insidansına ve on kat daha düşük meme kanseri insidansına sahip olduğu fakat bu oranın Asyalıların Batı'ya göç etmesinden sonra önemli derecede arttığı gösterilmiştir (Jain ve ark., 2014). Aynı şekilde kolorektal kanser insidansı, mortalitesi ve klinik eğilimleri arasında ırk ve etnik farklılıklar bulunmaktadır (Baquet ve Commiskey, 1999).

Kanser; genetik hasar, hormonlar veya hücre içerisindeki besin metabolizması gibi iç faktörlerden veya tütün, kimyasallar ve güneş ışığına aşırı maruz kalma gibi çevresel/edinsel faktörlerden kaynaklanabilir (Şekil 2.3). Kanseri tetikleyen en önemli faktör, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki genetik anormalliklerdir. Tümör baskılayıcı genler; apoptozu ve hücre bölünmesini düzenlerken, tümör onkogenleri mutasyonlarla aktive olarak hücre proliferasyonunu ve transformasyonunu artırır (Anand ve ark., 2008).



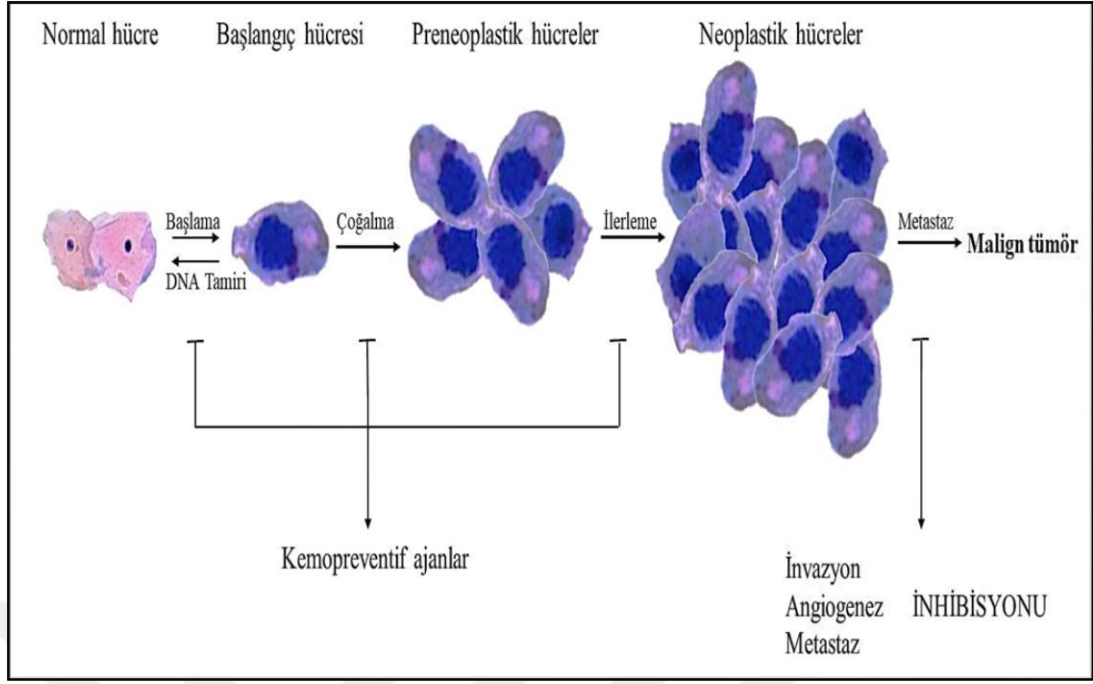
Şekil 2.3. Kanser gelişiminde genlerin ve çevrenin rolü. A) Kansere genetik ve çevresel faktörlerin katkısı B) Seçilen kanserler için aile riski oranları C) Her çevresel faktörün yüzde katkısı (Anand ve ark., 2008).

Hücre çoğalmasını ve bölünmesini kontrol eden genlerde işlev bozukluğu tüm kanserlerin nedenidir. Bunların yaklaşık % 5'i kalıtsaldır ve aslında kalıtsal genetik değişiklik bir veya daha fazla spesifik kanser türü geliştirme riski taşır. Bununla birlikte çoğu kanser kalıtsal genlerden değil, yaşam boyunca genlerde meydana gelen hasarlardan kaynaklanır (Anand ve ark., 2008).

Kolorektal kanser için; ailesel adenomatöz polipozis kolon kanseri, kalıtsal polipoz olmayan kolon kanseri gibi genetik sendromlar, inflamatuvar bağırsak hastalığı, ailede kolorektal kanser öyküsü iyi tanımlanmış risk faktörleridir (Feagins ve ark., 2009).

2.1. *Karsinogenez Süreci*

Karsinogenez yani kanser oluşumu; kanser gelişiminde kullanılan genel bir terimdir ve bazı iyi bilinen kanser modelleri, tümör oluşumunun, başlama, çoğalma, ilerleme ve metastaz olmak üzere farklı aşamalardan oluşan bir süreç olduğunu göstermektedir (Şekil 2.4) (Siddigui ve ark., 2015).



Şekil 2.4. Karsinogenezin basamakları (Siddigui ve ark., 2015).

Başlama, karsinogenezin ilk aşamasıdır; malign ve ölümsüz hale gelmeye duyarlı normal hücreler geri dönüşü olmayan genetik değişikliklere yol açabilir. Bununla birlikte, kanser başlangıcının etkinliği hücrel replikatif DNA sentezine ve hücre bölünmesine bağlıdır. Başlangıçtaki durumun devamlılığı ve geri döndürülemezliği için DNA sentezi birincil önceliktir (McCreery ve Balmain, 2017).

Genetik değişiklikler veya DNA hasarı; X-ışınlarından, kimyasal karsinojenlerden ve papilloma virüsü ile Epstein-Barr virüsü gibi virüslerden kaynaklanabilir. Mutajenlere maruz kalma, hücrel fenotipte gözlemlenebilir değişikliklere neden olmasa da kanser oluşumunun duyarlılığını artırır. HRAS ve NRAS onkogenlerinin mutasyonları benign papillomların gelişiminden sorumludur ve az sayıdaki papillom, malign skuamöz hücreli karsinom (SCC) haline gelmektedir. p53'ün bir tümör baskılayıcı gen olarak hareket ettiğine ve UV-B radyasyonuna bağlı mutasyonlarının fare modellerinde ve insanlarda tümörlerin başlamasına yol açtığına dair yeterli kanıt mevcuttur (Weihrauch ve ark., 2002).

Başlama için önerilen görüşlerden biri, mutator fenotiptir ve normal bir mutasyon oranının kanser hücrelerinde gözlenen mutasyon sayısı ile korele olmadığını önermektedir. Söz konusu genlerin mutasyonlarının DNA sentezi, DNA tamiri, hücre döngüsü ve apoptozu içeren genlerin mutasyon oranını artıracığı ve çok

hücreli karsinogenez modelinde tümörün başlatılması ve artışından sorumlu olacağı düşünülmektedir (Loeb, 2001).

Tümörün çoğalması, karsinogenezin ikinci evresidir; burada mutasyona uğramış bir başlangıç hücresi, klonal olarak genişler ve çeşitli sinyal yolları da karsinogenezin ilerlemesine neden olacak şekilde bu sürece katılır. Mitotik sinyal yollarının direkt aktivitesiyle hiperplazi ve sürekli proliferasyonu, dolaylı olarak kronik yaralanma ve inflamasyon yanıtı, terminal farklılaşma ve apoptoza dirençli bir bloktan dolayı tümör oluşumunun uyarılması için mutasyona uğramış başlangıç hücresinin klonal gelişimi gereklidir. Karsinogenezdeki fare modellerinde tümörün gelişimi, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ve Ras/Raf/Mitojen ile aktifleştirilmiş protein kinaz (MAPK) sinyalizasyonunun aktivasyonu gibi mitotik yolları içerir. Kronik inflamasyon; büyüme faktörlerinin ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interlökinler (IL) gibi sitokinlerin hücre salınımına ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine neden olur ve tümü hücre proliferasyonunu uyarabilir. Bu yolların sürekli aktivasyonu; örneğin, tümör hücresi stromal etkileşimleri, anjiyogenez, oksijenlenme ve diğer pek çok faktör tümör gelişimine yol açabilir (Rundhaug ve Fischer, 2010).

Kanserin başlangıç süresi boyunca, DNA hasarı kontrol noktaları ve apoptoz yolları aktive edilebilir. İnsan kanserlerinin % 50'sinden fazlasında proapoptozu düzenleyen p53 ve retinoblastoma (Rb) gibi tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlara bağlı hasar mevcuttur (Sarasin, 2003).

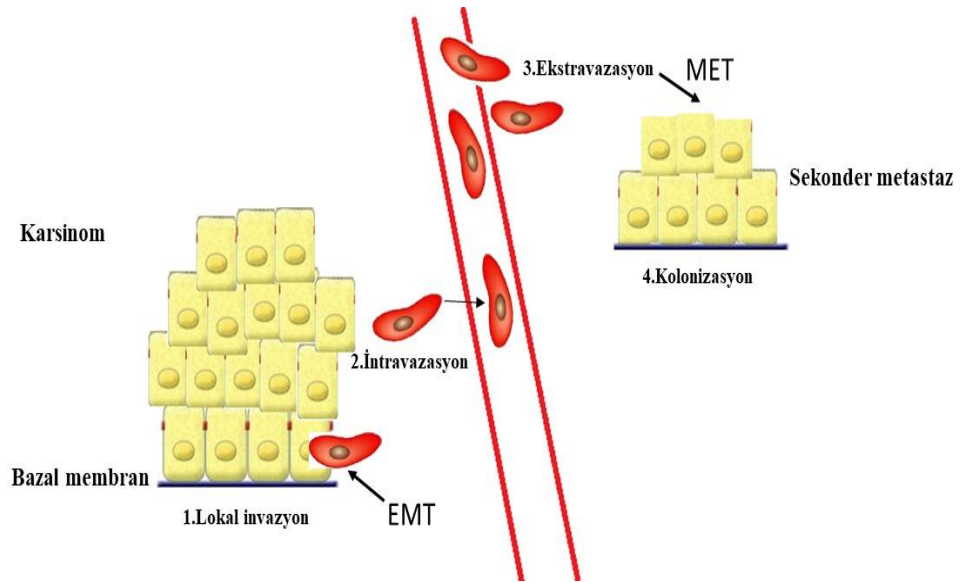
Tümör ilerlemesi; malign lezyonlara, benign neoplazik ve/veya preneoplastik hücrelere dönüşebilen karsinogenezin üçüncü evresidir. Tümör ilerlemesinin başlama ve çoğalmadan farkı, anöploid oluşuma neden olan kromozomal instabilite ve geri dönüşümsüz olarak çoğalma ile karakterize edilen malign neoplazilerdir (McClelland, 2017).

Neoplastik hücrelerdeki bu genomik değişiklikler, hücre büyümesinin artması, invaziv olma, metastatik instabilite ve hücrelerin biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik özelliklerindeki değişikliklerle doğrudan ilişkilidir (Dixon ve Kopras, 2004). Anjiyogenez, neoplastik progresyon için gereklidir ve maligniteye katkıda bulunur (Hawighorst ve ark., 2001).

Kolorektal kanser ilerlemesinde ardışık klonal seleksiyon dalgalarını içeren klasik bir tümör ilerleme modeline göre (Fearon ve Vogelstein, 1990), genetik değişiklikler, pre-neoplastik hücreleri neoplastik hücelere dönüştüren morfolojik ve karyotipik değişikliklerle yol açarak yüksek kromozomal veya baz modifikasyonu oranı ile kalıcı genetik istikrarsızlığa neden olur (Hanahan ve Weinberg, 2000).

Karsinogenezin dördüncü evresi invazyon ve metastazdır. Kanserden ölümlerin ana nedeni birincil neoplazilerden değil, diğer bölgelere metastaz yapan sekonder tümörler nedeniyledir. Normal bir hücre; fenotipik ve biyokimyasal değişiklikler, büyüme faktörü sinyali, hücre hücre adezyonu, gen ekspresyonu, motilite veya hücre şekli değişikliklerine bağlı olarak invaziv bir kanser hücresine dönüşebilir (Leber ve Efferth, 2009).

İnvaziv kanser hücreleri, konakçı hücrelerdeki bazal membranlar gibi bariyerlerin yapısını bozan proteazları salgılayabilir ve bu nedenle tümör hücrelerinin uzak bölgelere göçünü ve bu bölgelerdeki anjiyogenezi kolaylaştırır. Epitelyal orijinli kanser hücreleri, mezenkimal benzeri bir fenotipi benimseyebilir ve sıklıkla metastatik fenotipe katkıda bulunan bu fenotip dönüşümü epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) olarak adlandırılır (Şekil 2.5) (Reed, 2015).



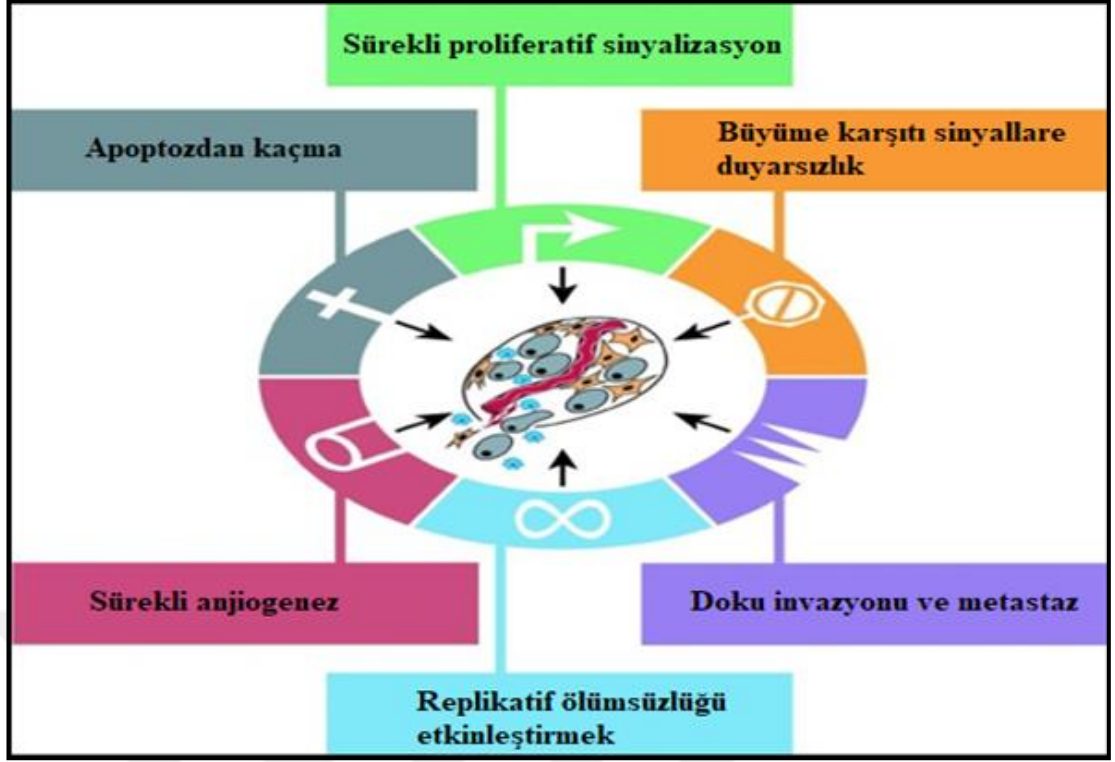
Şekil 2.5. Kanserde epitelyal-mezenkimal geçişin mekanizması ve düzenlenmesi (Reed, 2015).

Çeşitli onkogenler, tümör baskılayıcı genler invazyon kapasitesini ve tümör hücrelerinin metastatik potansiyelini etkileyebilir. Doku yapısının bozulması sonrası, hücre adezyon moleküllerinin (CAM) kaybı ve integrin ekspresyonundaki değişiklikler gibi hücre iskeletindeki değişiklikler nedeniyle epitel hücreleri mezenkimal bir karakterde olabilir. Kaderin ailesinin regülasyonunda düzensizlik, özellikle E-kaderin kaybı ve N-kaderinin regülasyon artışı, invaziv kanser hücrelerinde yaygın olarak görülmektedir (Herzig ve ark., 2007). E-kaderin geni CDH-1, metastaz baskılayıcı gen olarak da adlandırılır ve CDH1 kaybı, immortal hücrelerde invaziv bir fenotip oluşturur (Guilford, 1999).

Doğal ve adaptif bağışıklık sisteminin hücreleri, stromal hücrelerin yanı sıra kemokinler ve reseptörleri, kanser hücresi metastazında önemli bir rol oynar ve tümör mikroçevresindeki vaskülarizasyon ve sitokinlerin varlığı EMT'yi de etkiler. Son zamanlarda, tümörlerin rastgele çoğalan hücreler ve kanser kök hücreleri olmak üzere iki tip hücreden oluştuğu önerilmiştir. Sadece kanserli kök hücreler süresiz olarak çoğalabilir ve bu hücreler, tümör metastazında kritik ve önemli bir rol oynayabilir (Gupta ve ark., 2010).

2.2. *Kanserin Moleküler Biyolojisi*

Sürekli proliferatif sinyal, büyüme inhibitörlerinden kaçınma, apoptoza direnç, replikatif ölümsüzlük, sürekli anjiyogenez ve doku invazyonu ve metastaz kanserin karakteristik belirteçleridir (Şekil 2.6) (Hanahan ve Weinberg, 2000).



Şekil 2.6. Kanserın karakteristik özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2000).

2.2.1. Kanserın Karakteristik Özellikleri

2.2.1.1. Sürekli Proliferatif Sinyalizasyon

Kanser hücrelerinin en önemli özelliği, bir dizi farklı yolla sürekli proliferatif sinyal verme yeteneğidir. Aynı tip reseptörlere sahip aynı tip hücreler, otokrin uyarım yoluyla proliferasyonu teşvik edecek büyüme faktörü ligandları üretebilirler. Kanser hücreleri aynı zamanda tümör hücrelerini teşvik eden, stroma içindeki normal hücreleri uyarmak için de sinyaller gönderebilir, bu da kanser hücrelerinin çeşitli büyüme faktörleri salgılamasına yol açar (Cheng ve ark., 2008). Membran büyüme faktörü reseptörlerinin aşırı ekspresyonu, hücre proliferasyonunun ilerlemesine neden olabilir; örneğin EGFR tirozin kinaz, birçok kanserde aşırı eksprese edilir ve bu reseptör, otokrin olarak ve/veya diğer kinaz sinyal zincirleri ile etkileşerek kaskat reaksiyonlarını tetikleyebilir (Drake ve ark., 2012).

Somatik mutasyonlar, genellikle büyüme faktörü reseptörleri tarafından aktive edilen sinyal yollarının aktivasyonuna katkıda bulunurlar. Örneğin; MAPK ve PI3K (Fosfoinositid 3-kinaz) yolağı, sırasıyla B-Raf'daki aktive edici mutasyonlar ve PI3K'nın katalitik altbirimi nedeniyle, birçok tümör tipinde aktive edilir (Jiang ve Liu, 2009).

2.2.1.2. Büyüme Karşıtı Sinyallere Duyarsızlık

Kanser hücreleri, hücre proliferasyonunu kontrol eden güçlü mekanizmaları da önleyebilir ve bu mekanizmaların çoğu tümör baskılayıcı genleri kapsar. İki prototipik tümör baskılayıcı gen olan Rb ve p53, iki temel hücrel düzenleyici ağı kontrol ederek; apoptozun ve hücrelerin yaşlanma mekanizmalarının etkinleştirilmesi kararlarını yönetirler (Sherr ve McCormick, 2002).

2.2.1.3. Apoptozdan Kaçınmak

Kanser hücreleri, apoptozu önlemek için birçok strateji geliştirir ve bunların arasında en yaygın olanı, DNA hasar sensörünün apoptozu uyarmasını ortadan kaldıran p53 tümör baskılayıcı proteinin fonksiyon kaybıdır. Buna ek olarak, anti-apoptotik düzenleyiciler olan Bcl-2 (B-hücre CLL/Lenfoma 2), Bcl-xL (B-hücre lenfoma-xL), sağkalım sinyallerinin (survivin, IGF1/2) ekspresyonunu artırırken proapoptotik faktörlerin (Bax, Bim, Bad, Bcl-X_s) ise ekspresyonunu azaltarak apoptozu inhibe eder (Klug, 2014).

2.2.1.4. Replikatif Ölümsüzlüğü Etkinleştirmek

Belirli sayıda bölünmeden sonra hücreler bölünmeyi durdurarak, proliferatif olmayan yaşlanma durumuna (senesens) ve sonrasında apoptoza girerler. Çevresel ve genetik faktörlerin etkisiyle hücreler sınırsız çoğalma potansiyeli sergileyebilirler. Çeşitli çalışmalar, kromozomların sonunda tekrar dizileri olan telomerlerin hücre replikasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Her türlü habis hücre ve insan kanserlerinin % 90'ında telomeraz aktivitesinin ve hekzanükleotit tekrarlarının arttığı görülmektedir (Blasco, 2005).

2.2.1.5. Sürekli Anjiyogenez

Anjiyogenez; yara iyileşmesi ve kadınlarda üreme döngüsü gibi fizyolojik süreçler için geçici olarak gereklidir. Ancak, tümör gelişimi sırasında tümör hücreleri anjiyogenezi aktive ederek neoplastik büyümeyi kolaylaştıran yeni kan damarları üretmeye devam eder (Hanahan ve Folkman, 1996).

Anjiyogenez, vasküler endotel hücrelerinde uyarıcı veya inhibe edici hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanan sinyal proteinleri tarafından düzenlenir. Örneğin;

VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktörü), FGF (Fibroblast büyüme faktörü) ve VEGFR1 (VEGF reseptör 1) başta olmak üzere bir dizi angiyojenik faktör hücre yüzeyine bağlanarak anjiyogenezi düzenler. Bazı tümörlerde, Ras ve Myc gibi baskın onkogenler, anjiyogenik faktörlerin ekspresyonunu artırırken; diğer tümörlerde inflamatuvar hücreler anjiyogenezi uyarabilir (Shinkaruk ve ark., 2003).

2.2.1.6. İnvazyon ve Metastazi Aktive Etmek

Birçok insan kanserinde kanser ölümlerinin % 90'ı invazyon ve metastaz ile ilişkilidir ve bu faz hücre adezyon kaybı, motilite ve stromal proteoliz ile karakterize edilen EMT aracılığıyla (Klymkowsky ve Savagner 2009). E-kaderinin kaybı ve N-kaderinin aktivasyonu, EMT'nin belirgin bir özelliğidir ve metastatik tümörlerin çoğunda görülür. TNF- α , TGF- β (Tümör büyüme faktörü- β), EGF (Epidermal büyüme faktörü), HGF (Hepatosit büyüme faktörü), IGF-1 (İnsulin benzeri büyüme faktörü 1), Snail, Slug ve Twist gibi birçok faktörün EMT'yi uyardığı bilinmektedir (Rosivatz ve ark., 2002). Matrix metalloproteazlar (MMP) hem *in vitro* hem de *in vivo* tümör invazyonunu kolaylaştıran stromal proteazlardır (Johnsen ve ark., 1998).

Genomik kararsızlık ve tümörü artıran inflamasyon, malign ve metastatik hale gelmeye başlayan premalign hücrelerin popülasyonunun gelişmesini kolaylaştıran nedenlerdir. Son yıllardaki kavramsal ilerlemelerle, yukarıda bahsedilen karakteristiklerin dışında kanser progresyonu için önemli belirleyiciler olarak enerji metabolizmasını yeniden programlama ve bağışıklık hücrelerinden kaçma olmak üzere iki ayrı özellik daha kabul görmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.3. Tümör Mikroçevresi ve Hipoksisi

Solid tümörlerde görülen yaygın özellikler; düşük oksijen alanları olarak bilinen hipoksik alanlar, düzensiz vaskülarizasyon ve besin yetersizliğidir (Ackerman ve Simon, 2014). Çünkü kanser hücreleri çoğalabilmek için yeni kan desteğine ihtiyaç duyarlar (Sutherland ve ark., 1996). Tümörde mevcut oksijen seviyesi 0.01–3.9 % O₂ (0.08–30 mmHg) iken, normal dokuda bu oran 3.1–8.7 % O₂ (24–66 mmHg) şeklindedir (Kizaka-Kondoh ve ark., 2003). Tümörlerdeki bu hipoksik ve anoksik dalgalanma sağkalım ve tedaviye yanıtta malign hücreler için derin sonuçlar doğurmaktadır (Höckel ve Vaupel, 2001). Dolayısıyla, uygun olmayan hipoksik

koşullara adaptasyon için tümör hücrelerine fırsat veren süreçleri aydınlatmak, daha etkili anti-tümör yaklaşım geliştirmek ve malign süreci daha iyi kavramak kritik öneme sahiptir.

2.3.1. Tümör Hipoksisine Hücresel Adaptasyon Mekanizmaları

Bir tümör hücresinin düşük oksijen koşullarına adaptasyonu iki yolla gerçekleşebilir. Bu yollardan biri HIF gen ailesi tarafından düzenlenir (Ratcliffe ve ark., 1998; Semenza, 2003). Bu gen ailesinden olan HIF-1; anjiyogenez, anaerobik glikoliz ve hücre sağkalımını içeren, ayrıca tümör hücre migrasyonunu destekleyen çeşitli genlerin ekspresyonunu uyarmak için nukleusta sürekli eksprese olan HIF1 β ile heterodimer yapan anahtar bir transkripsiyon faktörüdür (Semenza, 2003).

HIF transkripsiyon faktör ailesinin hücre sağkalımındaki rolleri tümör mikroçevresine bağlıdır. Bu mekanizma oldukça karmaşık olup, HIF-1 transkripsiyon faktöründen yoksun olan hücrelerin hipoksik koşullar altında sağkalımlarını azalttığı veya çeşitli proapoptotik uyarılara karşı daha duyarlı oldukları gösterilmiştir (Maxwell ve ark., 1997; Ryan ve ark., 2000).

Hipoksik bölgelerin gelişimi ve tümör büyüme karakteristikleri, radyoterapi ve/veya kemoterapiye yanıtta derin sonuçlar doğurur. Normoksik tümörler, hipoksik fonksiyonlu tümörlerle karşılaştırıldığında ilacın difüzyonunun sınırlı olmasından dolayı hipoksik tümör hücrelerinin kemoterapiye daha fazla direnç gösterdiği görülmüştür (Teicher, 1995).

DeneySEL hayvan modelleri ve insan tümörlerindeki oksijenasyonu direkt ölçen çalışmalar, tümör hücrelerinin hipoksi ve hipoksi-reoksijenasyon döngülerinin metastatik potansiyelin artışına yol açtığını güçlü bir şekilde önermektedir (Hill ve ark., 2001; Cairns ve Hill, 2004).

İkinci yol ise oksijen ve enerji tüketimini içeren genel bir durdurma sürecidir ve bunların çoğu HIF-bağımsız süreçler aracılığıyla olmaktadır. Bu süreçlerin birbirinden bağımsız olarak gen ekspresyonunu etkileyen ve tümör hücre davranışı için oldukça önemli olan oksijene duyarlı iki yolak aracılığıyla olduğu kanıtlanmıştır. Bunlardan biri olan mTOR (FRAP1 olarak da bilinir) protein sentezi, otofaji ve apoptoz ile ilişkili çok önemli bir yolaktır (Wouters ve Koritzinsky, 2008).

En az 3 mekanizma tümördeki düşük oksijen gelişim bölgesine katkı sağlayabilir: i) Tümör büyümesi ile orantılı olarak yeni kan desteğinin sağlanması, ii) anormal yapılanma ve yeni oluşan kan damarlarının kan akış dinamiği, iii) spontan olarak damar büzülmesi ve tümör kan damarlarının vazodilatasyonu (Sutherland ve ark., 1996; Brown ve Giaccia, 1998). Bu fizyolojik parametreler hem kronik hem de akut hipoksi bölgelerinin oluşmasına neden olur (Koumenis ve Wouters, 2006).

2.4. Kolorektal Kanser ve Epidemiyolojisi

Kolorektal kanser kolon ve rektumun iç astarındaki hücrelerin anormal büyümesi sonucunda ortaya çıkan ve yavaş ilerleyen bir kanserdir. Bu anormal büyüme başlangıçta benign olan ve polip olarak bilinen oluşumlardır, zamanla gerçekleşen kanserleşme süreci sonunda bu polipler kan/lenf damarlarına veya diğer anatomik bölgelere metastaz yapma potansiyeli kazanmış malign tümörlere dönüşür (Valastyan ve Weinberg, 2011).

Kolorektal bölgede başlayan kanserlerin büyük çoğunluğu (% 95'in üzerinde) adenokarsinom olarak sınıflandırılır. Bunlar, kolon ve rektumun üzerini örten mukus bezlerinde başlar. Daha az yaygın olarak görülenler ise; karsinoid tümörler (hormon üreten bağırsak hücrelerinde başlar), gastrointestinal stromal tümörler, lenfomalar (kolonda veya rektumda oluşan immün sistem kanserleri) ve sarkomlardır (tipik olarak kan damarlarında başlar ancak bazen kolorektal duvarlarda oluşur) (Klug, 2014).

Kolorektal kanser insidansı ve mortalite oranları dünyada belirgin şekilde değişiklik göstermektedir. Geçmiş profil ve demografik yansımalar göz önüne alındığında, kolorektal kanserin küresel yükünün, 2030 yılına kadar % 60 oranında artarak 2.2 milyon yeni vakaya ve 1.1 milyon kansere bağlı ölüme yol açması beklenmektedir. Genel olarak, erkeklerde üçüncü, kadınlarda ikinci olarak en yaygın görülen malignitedir (Arnold ve ark., 2016; Fitzmaurice ve ark., 2017).

2.4.1. Türkiye'de Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi

Kalıtımsal özellikler, inflamatuvar bağırsak hastalığı, diyet (kırmızı ve işlenmiş et tüketimi, meyve ve sebze açısından düşük diyet) ve yaşam tarzı faktörleri (fiziksel aktivite, alkol alışkanlığı ve sigara), yaş, obezite, diyabet, aile öyküsü

kolorektal kanser riski ile pozitif yönde ilişkilidir (Amersi ve ark., 2005; Hill ve ark., 2006; Benson, 2007; Yee ve ark., 2009; Watson ve Collins, 2011).

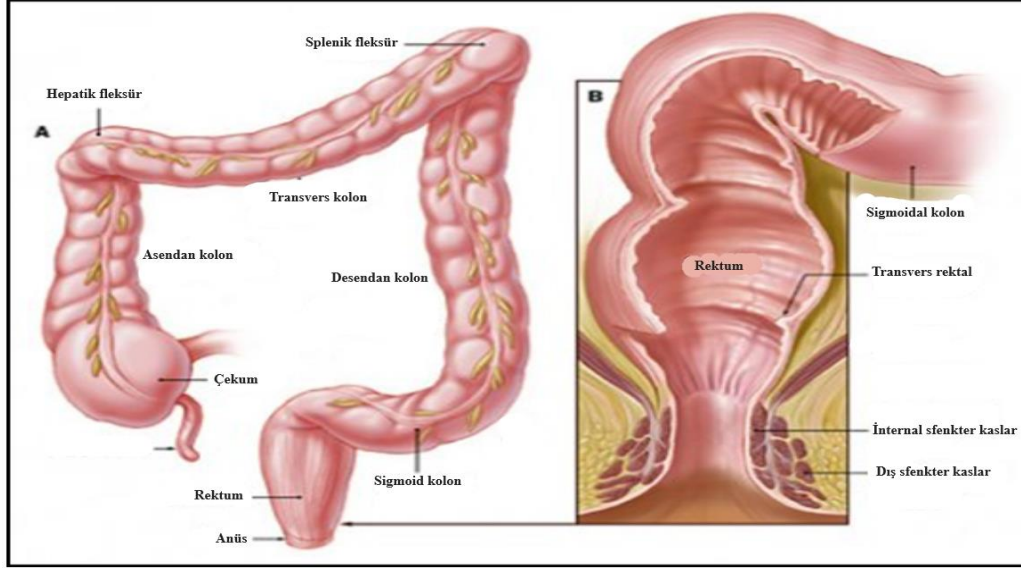
Aneminin, sağ kolon tümörlü olan hastalarda en sık görülen bulgulardan biri olduğu bilinmektedir (Compton ve Greene, 2004). Ayrıca, uzun süreli ülseratif kolit ve Crohn hastalığının kolorektal kanser gelişme riskini arttırdığı bildirilmiştir (Loftus, 2006; Triantafillidis ve ark., 2009).

Türkiye’de kolorektal kanser insidansı yüksek olmasına rağmen, tek merkezli hasta verilerini gösteren sadece birkaç epidemiyoloji çalışması bulunmaktadır (Yılmazlar ve ark., 1995; Aykan ve ark., 2015).

Türkiye’de kolorektal kanserli hastaların genel profilini belirleyen 2015 yılında yapılan prospektif çalışmada; 7 coğrafi bölgedeki 21 merkezden alınan 968 kolorektal kanserli hastanın verileri analiz edilmiştir. 662 hastada (% 68.4) kolon kanseri ve 306 hastada (% 31.6) rektum kanseri görülmüştür. Toplamda hastaların % 60.9’u erkek ve ortalama yaşları 58.9 ± 12.6 ’dır. Hastaların % 15.0’inde alkol, % 17.5’unda sigara, % 1.5’inde ailesel poliploid öyküsü, % 15.0’inde şeker hastalığı ve % 1.0’inde inflamatuvar bağırsak hastalığı mevcuttur. Bölge olarak distal rektum (% 61.3) ve sigmoid kolon (% 36.8) görülmüştür. Preoperatif tedavi alan rektum kanseri hastalarının çoğunluğunda (% 89.8) geleneksel kemo/radyoterapi uygulanmıştır. pTNM evrelendirmesinde hastaların çoğunluğunda evre III ve IV (sırasıyla % 35.9 ve % 29.7) görülmüştür (Aykan ve ark., 2015).

2.5. Kolon ve Rektumun Morfolojisi ve Histolojisi

Kolon kanseri insidansının yüksek olduğu ülkelerde vakaların yaklaşık % 60’ında tümörün kolon distalinde (splenik fleksür, desendan (inen) kolon, sigmoid ve rektosigmoid kolon ve rektum dahil) yerleşim gösterdiği; buna karşılık düşük insidansı olan ülkelerde ise baskın olarak proksimalde (çekum, asendan (çıkan) kolon, hepatik fleksür ve transvers kolon) ortaya çıktığı görülmüştür (Schottenfeld ve Winawer, 1996). Kolon ve rektumun anatomisi Şekil 2.7a ve 2.7b’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. İnsanlarda kolon (a) ve rektum (b) anatomisi (Johns Hopkins Medicine Gastroenterology&Hepatology-halstedurgery.org).

Normal bir kolonun proksimal ve distal kısmı arasında çeşitli fizyolojik ve histolojik farklılıklar vardır ve bu da bu bölgelerden kaynaklanan tümörlerin farklı yollarla boyunca gelişmesine neden olabilir. Kolonun başlıca fonksiyonları, suyun toplanması ve katı dışkının atılımına başlamadan önce rektuma itilmesidir. Bağırsağın luminal yüzeyi parmak benzeri çıkıntılar (villus) ve glandüler invajinasyonlar (kriptler) ile birlikte kolumnar epitel mukozasından oluşur. Mukoza esas olarak iki hücre tipinden oluşur: suyu geri kazanan absorptif hücreler ve ince bağırsak içeriğinin sıvı kalıntılarından bazı tuzlar ve mukus salgılayan kadeh/kalsiform hücrelerdir. Goblet hücreleri villusların tabanında baskın iken, luminal yüzey neredeyse tamamen kolumnar emici hücreler tarafından çevrilmiştir. Rektum, kolonun kısa ve genişlemiş terminal kısmıdır ve rektal mukozada goblet hücresinin haricinde daha çok kolona benzerdir (Beck ve ark., 2016).

Kolon epitelinde terminalde tüm farklılaşmış hücreler, kolon epitel kriptlerinin terminalinde bulunan az sayıda multipotent kök hücre tarafından üretilir (Barker ve ark. 2008). Farklılaşmış kolon epitel hücrelerinin kısa ömrü nedeniyle, bağırsak kök hücre sistemi, bir bireyin ömrü boyunca 6×10^{14} kolonositten daha fazlasını üretmelidir (Ricci-Vitiani ve ark., 2009).

Adenom-karsinom ilerlemesi ile ilişkili keşfin üzerinden 28 yıl geçmiştir (Fearon ve ark. 1990). O zamandan bu yana yapılan çalışmalar, kolorektal kanser hastalarında tümör heterojenitesinin yeni belirteçlerinin de keşfiyle kanser tedavisinin bireysel tedavilere doğru kayması gerektiğini göstermektedir (De Sousa E

Melo ve ark., 2013). Bağırsak kök hücrelerinin keşfi; olgunlaşmamış hücre belirteçleri tarafından karakterize edilen tümör hücrelerinin varlığı, kendini yenileme yeteneği, kemoterapi direnci ve sekonder tümör büyümesini teşvik etmesiyle intratümöral heterojenitenin bir başka yönünü ortaya çıkarmıştır (O'Brien ve ark., 2007; Todaro ve ark., 2014).

Kriptin tepesine doğru olan hücrelerde proliferasyon aktivitesi yüksektir. Bununla birlikte, kanıtların büyük bir kısmı, gastrointestinal kök hücrelerin kript tabanında yer aldığını; kript tabanı içindeki bir kök hücrede meydana gelen bir mutasyonun neoplaziye neden olduğunu göstermektedir (Wright, 2000; Shih ve ark., 2001).

2.5.1. Kolon ve Rektumda Poliplerin Morfolojisi ve Histolojisi

Normal mukozadan kolorektal kansere kadar giden farklı biyolojik sinyal yolları vardır, ancak hepsi polip olarak adlandırılan prekürsör lezyonlara neden olur. Modern histoloji bu lezyonları büyüme paternine göre tırtıklı ya da adenomatöz polipler olarak; daha sonra adenomları da tübüler, villöz, tubulo-villöz ve hiperplastik polip olarak sınıflandırır (Jass, 2007). Adenomatöz polipler, tanımı gereği bazı displazileri sergileyen benign neoplazilerdir. Displazi derecesi, sitolojik ve yapısal özelliklere dayanarak hafif, orta ve şiddetli olarak derecelendirilebilir. Adenomatöz poliplerin genellikle çoğunun kolorektal adenokarsinomun öncüsü olduğu epidemiyolojik, genetik ve patolojik çalışmalarla desteklenmiştir. Kolorektal kanserlerin büyük çoğunluğu poliplerden gelişmesine rağmen, çoğu polipin kolorektal kansere dönüşmeyeceğini vurgulamak gerekir (Loberg ve ark., 2014).

Neoplastik polipler ise; histolojik olarak üç alt gruba ayrılır: tübüler adenomlar, villöz adenomlar ve karışık veya tubulo-villöz adenomlar. Bir polipin malign transformasyon öncesinde 10-15 yıl kadar varlığını koruyabildiği gösterilmiştir (Bretthauer ve ark., 2016).

Kanser metastazına yol açan karmaşık mekanizmalar tam olarak anlaşılabilmiştir ve metastatik bölgede hangi hücre alt kümesinin yaşayabildiği, büyüebildiği ve göç ettiği hala belirsizdir (Chaffer ve Weinberg, 2011).

2.6. Risk Faktörleri

Kolorektal kanser, hem genetik hem de çevresel risk faktörlerinin bir sonucu olarak gelişen karmaşık bir hastalıktır. Güçlü aile öyküsü ve nadir görülen genetik sendromları bulunan kişiler yüksek risk grubu içerisinde olmasına rağmen, kolorektal kanserin % 85'i bilinen bir risk faktörü taşımayan bireylerden oluşur. Kolorektal kanser baskın bir şekilde, kalıtsal sendromu olmayan bireylerde gelişen, geç başlangıçlı "sporadik" bir hastalıktır (Chan ve Giovannucci, 2010; Peters ve ark., 2015). Kalıtsal sendromlara yol açan genler ve ilişkili olduğu sinyal yolları başlıca tablo 2.1'de görüldüğü gibidir (Peters ve ark., 2015).

Tablo 2.1. Kalıtsal sendroma yatkınlık sağlayan genler.

Gen	Kalıtsal sendrom	Sinyal yolağı
APC	FAP	Wnt sinyal yolağı
MUTYH	MAP	
MLH1, MSH2,MSH6	Lynch Sendromu	Yanlış eşleşme tamiri
PTEN	Cowden Sendromu	Metabolik sinyalin negatif regülatörü
STK11	Peutz-Jeghers Sendromu (PJS)	Hücrel enerji dengesindeki değişikliklere yanıt veren tümör baskılayıcı
GREM1,15q13 lokusu	Hereditary poliposis Sendromu	TGF- β /BMP sinyal yolağı
BMPR1A	Hereditary poliposis Sendromu (juvenile)	TGF- β /BMP sinyal yolağı
MADH4/SMAD4	Juvenile poliposis Sendromu	TGF- β /BMP sinyal yolağı
POLE, POLD1	Oligopoliposis	DNA Tamiri

2.6.1. Kalıtsal Kolorektal Kanser Sendromları

Hem sporadik hem de kalıtsal kolorektal kanserin moleküler patogenezi anlamamıza yardımcı olan araştırmalar hızla gelişmektedir. Bu çalışmaların bulguları, kolorektal kanser gelişme riski yüksekliği ile ilişkili olan çoğu otozomal dominant olarak kalıtılan çeşitli genetik hastalıkların saptanmasına yol açmıştır. Ailesel adenomatöz poliposis (FAP) ve Lynch sendromu (kalıtsal poliposis olmayan kolorektal kanser (HNPCC)) kolon kanseri sendromlarının en sık görülenleri olmakla

birlikte, bu iki durum kolorektal kanser vakalarının yalnızca yüzde 5'ini oluşturmaktadır.

Ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP); FAP ve onun varyantları (Gardner sendromu, Turcot sendromu ve adenomatöz polipozis koli (APC)) kolorektal kanserlerin % 1'den daha azını oluşturmaktadır. FAP'in gelişimi, kromozom 5'te yer alan APC geninde germline mutasyonlarından kaynaklanır ve yaşamın ilk on yılından sonra kolonun tüm uzunluğu boyunca küçük adenomatöz poliplerin başlangıcı ile karakterize edilir. Tedavi edilmezse, 40 yaşına kadar CRC riski neredeyse % 100'dür. APC, hücre iskeleti bütünlüğünde yer alan β -kateninin sitoplazmik seviyelerini düzenleyen Wnt sinyal yolağının bir parçasıdır (Carethers ve Jung, 2015). APC fonksiyonunun azalmasının, Wnt yolağındaki hücrelerarası β -kateninin anormal regülasyonu yoluyla kolorektal tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığı anlaşılmaktadır. Bu yolak hücre bölünmesi, adezyon ve migrasyonu kontrol eder ve özellikle her 4-5 günde bir yenilenen intestinal epitel gibi hücreler için önemlidir (van der Flier ve Clevers, 2009; Yamulla ve ark., 2014).

MUTYH-İlişkili Polipozis; DNA yanlış eşleşme onarımı (MMR) genlerinin (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) insan homologları, Lynch Sendromu olarak adlandırılan polipozis olmayan ailesel durumla ilişkilendirilmiştir (Vasen, 2000). Kolorektal adenomlu hastaların bir kısmında, baz eksizyon tamir geni MUTY homologunda (MYH veya MUTYH) bialelik germline mutasyonu mevcuttur. Bu mutasyonlar çoğunlukla MUTYH-ilişkili polipozis (MAP) olarak adlandırılan fenotipi ile ortaya çıkabilir (Jasperson ve ark. 2010). MAP karsinojenik yolu sıklıkla yüksek oranda somatik olarak edinilmiş APC mutasyonlarını içerir (Lipton ve ark., 2003).

Lynch Sendromu; Lynch sendromu, FAP'dan daha yaygın olan ve tüm kolonik adenokarsinomların yaklaşık % 3-5'ini oluşturan bir otozomal dominant sendromdur. Lynch sendromu terimi, genelde hMLH1, hMSH2, hMSH6 veya PMS2 yanlış eşleşme tamir genlerinden (MMR) birinde hastalığa neden olan bir bozukluğa sahip ailelerde yaygındır. Genel bir kural olarak Lynch sendromlu hastalar MMR geninin bir alelinde germline mutasyona sahiptir ve ikinci alel kolorektal kanserlerde somatik mutasyon, heterozigozite kaybı veya promotor hipermetilasyon veya epigenetik susturma ile inaktive edilir (Chan ve ark., 2006).

2.6.2. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı

Son yıllarda genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, 40 genetik bölgenin sporadik kolorektal kanser üzerindeki zayıf etkilerle ilişkili olduğunu keşfetmiş ve giderek artan genom taramalarının birçok yeni genetik bölgeyi tanımlayacağı tahmin edilmiştir (Peters ve ark., 2015).

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı, inflamatuvar bağırsak hastalığının (İBH) iki temel alt tipidir (Cohn ve ark., 2017). İBH, çoğunlukla ergenlik ve genç erişkinlik döneminde başlayan gastrointestinal sistemin kronik inflamatuvar bozukluğudur (Rosen ve ark., 2015). İnflamatuvar bağırsak hastalarında genetik, çevresel ve mikrobiyal etkiler birleşerek bağırsak mikrobiyotasına karşı düzensiz bir mukozal immün yanıt oluşmasına yol açar (Khor ve ark., 2011).

Ülseratif kolit; proksimal olarak rektumdan uzanan kolonun sürekli inflamasyonu ile karakterizedir. Ülseratif kolitli hastaların % 40 ila % 70'i üst gastrointestinal sistemde hafif inflamasyon sergiler (Bousvaros ve ark., 2007).

Crohn hastalığı; en yaygın olarak terminal ileum ve kolonda görülmekle birlikte, gastrointestinal sistemde ağızdan anüse kadar herhangi bir alanda gelişebilir. Crohn hastalığını ülseratif kolitten ayıran endoskopik özellikler, kesintili inflamasyon ve birinci derece ülserasyondur (Bousvaros ve ark., 2007).

2.6.3. Diğer Risk Faktörleri

Alkol; alkol tüketimi ile kolorektal kanser riski arasında bir ilişki olduğu görülmektedir (Ye ve ark. 2003).

Obezite; iki büyük prospektif kohort çalışması obezitenin, normal vücut kitle indeksi 18.5 ila 24.9 kg/m² olan bireylere göre kolorektal kanser gelişme riskini yaklaşık 1.5 kat artırdığını göstermiştir. Dahası, obezite kolorektal kanser'den ölüm riskini de artırmaktadır (Giovannucci ve ark., 1995; Sinicrope ve ark., 2010).

Koroner kalp hastalığının varlığı; kolorektal kanser ve ileri adenom riski artışı ile ilişkilendirilmiştir (Chan ve ark., 2007).

Sigara kullanımı; kolorektal kanserin insidansı ve mortalitenin artması ile ilişkilendirilmiştir. 106 gözlemsel çalışmanın meta-analizi sonucunda, hiç sigara içmeyenler ile sigara içenler karşılaştırıldığında, sigara içenlerde kolorektal kanser gelişme riskinin arttığı bildirilmiştir (Tavani ve ark., 1998). Sigara aslında tüm kolonik polip türleri için bir risk faktörüdür. Ayrıca aşırı kırmızı et veya işlenmiş etlerin uzun süreli tüketilmesi, özellikle sol taraflı tümörler nedeniyle kolorektal kanser riskinde artışa neden olabilir (Norat ve ark., 2005).

2.7. Kolorektal Kanserin Moleküler Patogenezi

Kolorektal kanser; kromozomal instabilite, yanlış eşleşme tamiri ve metilatör fenotipi içeren en az 3 majör yolaktan gelişir. Bu yollar tek bir kolorektal kanserde bir arada bulunabilir ve farklı genotip ve fenotipli neoplazilere yol açabilir. Tümörögenезin bu majör yolları, hem sporadik hem de kalıtsal kolorektal kanserde mevcut olabilir (Wright ve ark., 2017).

Displazi yoluyla normal dokunun tümör dokusuna dönüşmesi için pek çok adım gerekir. Tipik bir kolorektal tümörün en az 11.000 genomik değişiklik içerdiği tahmin edilmektedir. Kolorektal karsinogenezinde kromozom 5q (APC), 12p (ras), 17p (p53) ve 18q (DCC/SMAD4) bölgelerinde allelik kayıplar ile karakterize kromozom instabilitesi ve mikrosatellit instabilitesi (MSI) mevcuttur (Şekil 2.8) (Klug, 2014).

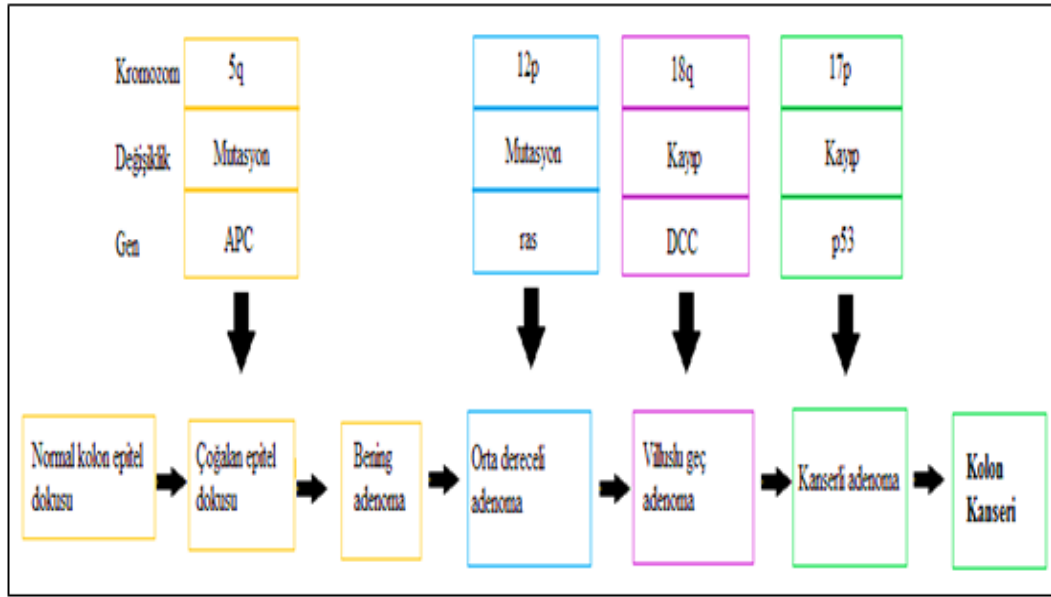
Özellikle hepatik metastazlı ileri kanserlerde, kolorektal tümörlerin % 70'inde aday genler olan SMAD4/SMAD2 ve DCC taşıyan 18q allelik kromozom kaybı görülür (Takayama ve ark., 2006). Onkogenlerin ve kromozom 18q üzerindeki KRAS, p53 ve SMAD/DCC gibi tümör baskılayıcıların değişimleri, sırasıyla adenoma, karsinoma ve metastazı teşvik eder.

Kromozomal instabilite; Bu geçiş neoplazinin önlenmesini düzenleyen 5q21 lokusundaki tümör baskılayıcı bir gen olan APC geninin mutasyonu ile başlayan aşamalı bir süreç olarak tarif edilir. APC mutasyonları aynı zamanda, kromozomal instabilite sürecinde en sık görülen mutasyon olup, sporadik kolorektal kanserli hastaların % 85'ini etkilemektedir (Carethers ve Jung, 2015).

Kromozomal instabilite sürecinde bir sonraki en yaygın mutasyon, MAPK yolağının bir parçası olan KRAS'tır (Grellety ve ark., 2016). KRAS mutasyonlarının onkojenik aktivasyonu, tümör ilerlemesi sırasında sürekli olarak APC inaktivasyonunu takip etmektedir (Carethers ve Jung, 2015). Üçüncü en yaygın mutasyon olan p53 mutasyonu, benign hücrelerden malign hücelere dönüşüme yol açan kolorektal kanserin patogenezinde kilit bir olaydır. Adenomlarda nadiren bulunurken (% 5) malign poliplerde (% 50) ve invaziv kolorektal kanserde (% 75) daha yaygındır (Bahnassy ve ark., 2014).

Yanlış eşleşme tamiri (MMR); MMR genleri, DNA mutasyonlarını tamir etmek için gereken bir grup protein kodlar. MMR genlerinin genetik ve epigenetik inaktivasyonu çoklu mutasyonlar ve kanser gelişimine yol açar. Bu yolak Lynch sendromu ve mikrosatellit instabilitesi ile ilişkilidir. Mikrosatellit instabilite, Lynch sendrom tanısı almış hastalarda tarama belirteci olarak kullanılır. Sporadik ve kolorektal kanserde kemoterapi etkinliğinin de bir belirtecidir (Imai ve Yamamoto, 2008).

Metilatör fenotip; GC zengin bölgeler olarak bilinen CpG adaları neoplastik olmayan hücrelerde genellikle metillenmiştir, metilasyon bu genlerin aktivitelerini susturur. CpG adaları metilatör fenotipin birden çok kanser türünde bulunduğu bilinmektedir. Bu kanser hücreleri genel bir metilasyon kaybına, belirli CpG adalarının promotorlarında ise metilasyon kazancına sahiptir. Bu durum her kanser hücresinin, mutasyona uğramış genlerinin (örn; tümör baskılayıcı genler) yüzlercesinin sessizleşmesine neden olur (Rashid ve Issa, 2004).



Şekil 2.8. Kolorektal kanserin çok adımlı gelişim süreci (Klug, 2014).

2.8. İnflamasyon ve Kanser Bağlantısı

Bağışıklık yanıtı, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sisteminin araçları tarafından patojenler veya doku hasarının tanınmasını tetikleyen bir dizi olayı içerir. Bu inflamatuvar cevabın temel amacı, doku homeostazını bozan yabancı ajanı uzaklaştırmaktır (Medzhitov, 2008). Normal fizyolojik bağlamda, doku onarımı veya patojen eliminasyonundan sonra inflamasyon giderilir ve homeostatik duruma geri dönlür (Norling ve Serhan, 2010).

Tümörün çoğalma sürecinde immun hücreler, malign hücrelerin sağkalım ve çoğalma faktörleri olarak hareket eden sitokin ve kemokinleri salgılar. Tümör invazyonu ve metastazı süresince de, hem tümör hem de immun hücreler hücre sağkalımı, motilite ve invazyonunda artışa neden olarak sitokin ve kemokinleri üretir (Multhoff ve ark., 2012). İnflamatuvar tümör çevresi nihayetinde tümör ilerlemesi ve metastazına yol açar (Grivennikov ve ark., 2010). Örn; epitel hücre yaşlanması ile ilişkili inflamatuvar yanıtta, p53 tümör baskılayıcı genin yokluğu karsinogenez ve transformasyona önemli ölçüde katkıda bulunur (Pribluda ve ark., 2013). Tümörle ilişkili inflamasyon tümör başlangıcını tetikleyen mutajenik faktörler (örn; ROS) üretir. Tümörle ilişkili inflamasyon; sağkalım, büyüme, pro-anjiyogenik faktörler ve aynı zamanda da anjiyogenez, invazyon ve metastazı kolaylaştıran ECM modifiye edici enzimlerin kaynağıdır (Coussens ve ark., 2013).

Yakın geçmişte Colotta ve arkadaşları, Hanahan ve Weinberg modeline ek olarak hücrenin serbestleştirilmesini ve tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminden kurtulmasını içeren yeni özellikler önermişlerdir (Colotta ve ark., 2009). Temelde akut inflamatuvar yanıt, enfeksiyona neden olan faktörleri veya diğer stres faktörlerini kontrol altına almayı amaçlar ve doku tahribatı; proliferasyon sinyallerinin aktivasyonu, makrofajların ve diğer immün hücrelerin bölgeye göçü ve anjiyogenezi içeren hem kanser hem de inflamatuvar süreçlere aracılık eden (sitokinler, kemokinler, interlökinler (IL), siklooksijenaz (COX-2), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS/NOS2), matris metalloproteinazlar (MMP) gibi geniş bir protein grubunun aktivasyonu ile karakterizedir (Aggarwal ve ark., 2006; Mantovani ve ark., 2008).

Genom instabilitesi, enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve bağışıklıktan kaçınma dışında; inflamasyon, sitokinler, büyüme faktörleri, kemokinler, hücre canlılık sinyalleri, pro-anjiyogenik faktörler, EMT'yi artıran metalloproteinazlar gibi hücre dışı matris değiştirici enzimler tarafından tümör mikroçevresine salgılanan moleküller aracılığıyla kanser riski artabilir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanserle yakından bağlantılı olan uyarılardan biri olan tümörü teşvik edici inflamasyonun, doğal ve adaptif bağışıklık sistem hücreleri (örn; Tümör ile ilişkili makrofajlar (TAM) ve T hücreleri) tarafından infiltre edildiği doğrulanmıştır (Grivennikov, 2010).

Doğal bağışıklık yanıtını düzenlemek için anahtar faktör, transkripsiyon faktörü NF- κ B'dir. Bakteriyal ürünlerin salınımı veya doku hasarı, TLR, IL-1 β ve TNF- α ile ilişkili yollar aracılığıyla NF- κ B sinyal yolağı aktive olur. Daha sonra, sitokinler, adezyon molekülleri, COX-2, NOS2, VEGF gibi hedef genler uyarılır. Ekzojen veya endojen uyarılar, NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu yoluyla ve tümör gelişimini artıran, kronik bir inflamatuvar yanıtı tetikleyebilir (Xia ve ark., 2018; Kaltschmidt ve ark., 2018).

Homeostazın korunmasını amaçlayan inflamatuvar yanıt, süreklilik halinde doku hasarına ve kanser gelişimine de yol açabilir. Bu inflamasyonun enfeksiyöz (örn; *Helicobacter pylori* ve gastrik kanser, papillomavirus ve serviks kanseri),

kimyasal (tütün içilmesi ve akciğer kanseri) ve endojen faktörler (kolit ve kolon kanseri) gibi kanser gelişimiyle bağlantılı birçok tetikleyicisi vardır (Aggarwal ve ark., 2006; Mantovani ve ark., 2008). Endometriozis, kronik prostatit, *Helicobacter pylori*'ye bağlı gelişen kronik gastrit, İBH ve primer sklerozan kolanjit (PSC) gibi çeşitli patolojiler bu bağlantıyı göstermektedir (Landskron ve ark., 2014).

Kolon kanser gelişimine oldukça yatkın olan ülseratif kolit veya Crohn hastalığından şikayetçi bireylerde; transforme epitel hücrelerinin sağkalım sinyalleri veya pro-inflamatuvar faktörleri salan submukozal immün hücrelerinin aktivasyonu ve TLR'nin uyarılması, NF-κB aracılı tümör gelişimine katkı sağlamaktadır (Vagefi ve Longo, 2005). Tüm kronik inflamatuvar hastalıklar kanser riskini artırmaz, hatta bazıları (örneğin sedef hastalığı) aksine bu riski azaltabilir (Nickoloff ve ark., 2005).

2.8.1. Tümör Gelişiminde Rol Oynayan Sitokinler

Tümörögenizde, inflamatuvar genlerin rol aldıklarına dair giderek artan deliller, hem inflamatuvar genlerin hem de klasik kanser genleri arasındaki kompleks ilişkinin, tümör mikroçevresi yanı sıra tümör anjiyogenezinde de rol oynadığını göstermektedir (Zong ve Thompson, 2006).

Sitokinler, hücre-hücre iletişimine aracılık eden düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir. Fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi bağışıklık hücreleri ve stromal hücreler sitokinleri sentezleyerek; proliferasyon, hücre sağkalımı, farklılaşma, immün hücre aktivasyonu, hücre migrasyonu ve ölümünü düzenler. Tümör mikroçevresine bağlı olarak sitokinler, anti-tümöral bir yanıtı modüle edebilir, ancak kronik inflamasyon boyunca, pro- ve anti-inflamatuvar sitokinlerin dengesi, nispi konsantrasyonları, sitokin reseptörü ekspresyon içeriği ve çevreleyen hücrelerin aktivasyon durumuna bağlı olarak hücre transformasyonu ve maligniteyi de indükleyebilirler (Popa ve ark., 2007).

2.8.1.1. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6; inflamatuvar, otoimmün ve karsinojenik başta olmak üzere geniş çaplı biyolojik etkiye sahip bir sitokindir (Malicki ve ark., 2009). Sistemik kanserli hastalarda sağlıklı kontrollerle veya benign hastalarla karşılaştırıldığında serum IL-6 düzeylerinde artış tespit edilmiştir. IL-6; malignite belirteci olarak önerilmiştir,

duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 60-70 ve % 58-90'dır. IL-6, reseptörüne (IL-6R α) bağlanarak çoğalmayı teşvik ve apoptozu inhibe etmede önemli bir rol oynamaktadır. Kolorektal kanser hücrelerinde Bcl-X_L ekspresyonunun aktivasyonu yoluyla apoptozu önlediği bulunmuştur (Yuan ve ark., 2004). İnflamatuvar sitokinler kısmen tümörün uyarılmasından sorumlu olduklarından, anti-inflamatuvar sitokinlerin artışı kanser riskini sınırlayabilirler ve sinyal yollarının aktivasyonunu azaltabilirler (Heikkil ve ark., 2008).

İnflamasyonu tetikleyen immün hücreler, tümör mikroçevresindeki sitokinleri (örneğin interlökin (IL)-1 β ve IL-6) ve reaktif oksijen veya azot türleri (RONS) salgılayarak hasarlı dokulara yönlendirir. Bu durum, NF- κ B'nin aktivasyonuna yol açarak hücre çoğalması, sağkalım, transformasyon ve daha sonra tümör anjiyogenezine yol açar. Ayrıca, RONS'a hücrel maruziyet, tümör baskılayıcı genler veya DNA tamir genlerinde hücrenin büyümesini daha da uyaran DNA hasarına ve mutasyonlara neden olabilir (Grivennikov ve ark., 2010).

2.8.1.2. İnterlökin-8 (IL-8)

IL-6 gibi IL-8 de proinflamatuvar bir sitokindir. IL-8 anjiyogenik faktör olarak fonksiyon göstererek kanserin ilerlemesine katkı sağlar. Kolorektal kanserli bireylerin serum ve kanserli dokularında IL-8 seviyelerinin arttığı bilinmektedir (Konturek ve ark., 2006). Kolon kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda çoğalma, migrasyon ve anjiyogenezin artışı IL-8'in aşırı eksprese olması ile ilişkilendirilmiştir. IL-8, TNF- α aracılığıyla EMT sürecini hızlandırmaktadır (Bates ve Mercurio, 2003; Ning ve ark., 2011).

2.8.1.3. İnterlökin-10 (IL-10)

IL-10 güçlü bir anti-inflamatuvar sitokin olarak bilinir. T ve B hücreleri, monositler, makrofajlar, mast hücreleri, granüositler, dendritik hücreler ve keratinositleri içeren neredeyse tüm immün hücreler IL-10 üretir (Sabat ve ark., 2010). Tümör hücreleri de makrofajlar gibi IL-10 salgılayabilir (Costa ve ark., 2013).

2.8.1.4. Tümör Nekroz Faktörü (TNF- α)

TNF (TNF- α olarak da adlandırılır); doku homeostazını sağlayan sitokin ağlarının ve inflamasyonun esas düzenleyicisi olarak hareket eden en önemli

sitokinlerden biridir (Balkwill, 2009). Uzun süreli inflamasyon maligniteye yol açabilir ve kronik inflamatuvar hastalıklarda önemli fonksiyona sahip olan TNF- α , karsinogenezde de rol oynayan önemli bir inflamatuvar mediatördür (Popa ve ark., 2007).

Yakın geçmişte yapılan birçok çalışma tümörün başlatılması ve ilerlemesi konusundaki bilgilerimizi büyük ölçüde artırmış olmasına rağmen, tümör büyümesi sırasında tümör immün yanıtının giderek etkisiz hale gelmesi ile ilgili hala yanıt bekleyen pekçok soru vardır (Frey ve Monu, 2008). Kanserin ilerleme sürecinde, kolorektal tümör hücreleri immünolojik denetimden kaçmalarına izin veren çeşitli özellikler kazanırlar (Lankiewicz ve ark., 2008; Veenendaal ve ark., 2008).

Bağışıklık sisteminin terapötik modülasyonu ile ilgili olarak özellikle, bağışıklık sisteminin uyarılması veya susturulmasına yol açan tümöre spesifik immünolojik cevapların ve mekanizmaların anlaşılması gereklidir.

TNF- α , prototipik bir pro-inflamatuvar sitokin iken, karsinogenezde iki yönlü bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu sitokin, TNF- α Reseptör-1 (TNF- α R-1) ve TNF- α Reseptör-2 (TNF- α R-2) olmak üzere iki reseptör tarafından tanınmaktadır (Vandenabeele ve ark., 1995; Chen ve Goeddel, 2002). TNF- α R-1 (p60) tüm hücre tiplerinde eksprese edilirken, TNF- α R-2 (p80) ekspresyonu ağırlıklı olarak bağışıklık hücreleri ile sınırlıdır (Aggarwal, 2003).

TNF- α R-2'ye olan afinite, TNF- α R-1'e göre beş kat daha fazla olmasına rağmen, TNF- α 'nın biyolojik aktivitelerinin çoğunu başlatan TNF- α R-1'dir (Tartaglia ve Goeddel, 1992). İki reseptör arasındaki en büyük fark, TNF- α R-1'de bulunan ölüm alanı (DD)'dir. Bu nedenle, TNF- α R-1 apoptotik hücre ölümünü indüklemeye yeteneğine sahip ölüm reseptör ailesinin önemli bir üyesidir (Ashkenazi ve Dixit, 1998).

Trimerizasyon TNF- α 'nın TNF- α R'lerine bağlanması üzerine oluşur ve en az dört sinyal yolağının aktivasyonuna yol açar. Bunlar;

1. Fas ilişkili ölüm bölgesi (FADD)'nin kaspaz-8 etkileşimi ile indüklenen bir pro-apoptotik yolak,

2. Hüresel inhibitör apoptoz proteini-1 (cIAP-1) tarafından aktive edilen anti-apoptotik bir yolak,

3. TNF- α reseptör ilişkili faktör 2 (TRAF2) ile etkileşen anti-apoptotik bir yolak,

4. Reseptör ile etkileşen protein (RIP) ile indüklenen NF- κ B aktivasyon yolağı (Chen ve Goeddel, 2002).

Kanser biyolojisi ile ilgili yapılan ilk araştırmalar, TNF- α 'nın tümör gerilemesini uyarma potansiyeline sahip biyoaktif bir peptid olarak tanımlanmasına yol açmıştır (Roberts ve ark., 2011). Daha sonrasında ise TNF- α 'nın, hem hücre ölümü hem de hücre sağkalımında iki yönlü role sahip bir sitokin olduğu bunun yanı sıra sistemik olarak uygulanan ilacın sitotoksosite profilini etkileyen inflamasyon rolünün olduğu ortaya çıkmıştır. TNF- α hem bağışıklık hücreleri hem de tümör hücreleri tarafından üretilmektedir, bu nedenle TNF- α sentezi birçok kanserin ortak bir özelliğidir (Balkwill, 2009). Tümör mikroçevresindeki TNF- α varlığı, kolon kanseri hücrelerinde hem hücre ölüm yolaklarını aktive etme (Park ve ark., 2014; Engstrom ve ark., 2014), hem de DNA hasarı ile ilişkili olabilen reaktif oksijen türlerini (ROS) indükleme potansiyeline sahiptir (Wheelhouse ve ark., 2003). NF- κ B indüksiyonu ile aktive edilen sitokinlerin IL-6, IL-8 ve TNF- α olduğu belirlenmiştir (Festjens ve ark., 2007).

Araştırmalar sonucunda TNF- α hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak özellikle kolorektal ve akciğer kanserlerine karşı yüksek oranda aktivitesi olan spesifik bir anti-kanser ilacı olarak vurgulanmıştır; ancak bu potansiyel, rekombinant TNF- α 'nın klinik deneylerinde gerçekleştirilememiştir (Suematsu ve ark., 2003; Roberts ve ark., 2011).

2.9. Kolorektal Kanser Patogeneğinde İnflamasyon ve NF- κ B Sinyal Yolağı

Mantovani ve ark. (2008)'na göre, tümöröenez ve inflamasyon arasındaki bağlantı iç ve dış yolaklar aracılığıylaadır. İç yolak, inflamasyon ve neoplaziye neden olan genetik değişiklikler nedeniyle aktive edilir. Bu değişiklikler, mutasyona bağılı proto-onkogen aktivasyonunu, kromozomal düzensizliği ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunu içerir. Transforme hücreler inflamatuvar mediatörler salgılar ve bundan dolayı inflamatuvar bir mikroçevre oluşur. Dış yolak; prostat, pankreas, kolon, akciğer ve deri gibi organlarda kanser gelişim riskini artıran enfeksiyon veya inflamasyon nedeniyledir. Her iki yolak da kemokin ve sitokinler

dahil olmak üzere pro-inflamatuvar faktörlerin transkripsiyonuna yol açan NF-κB ailesinin aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşir. Bu faktörler; tümör mikroçevresine stromal ve endotelial hücreler gibi makrofajlar, mast hücreleri, eozinofiller ve nötrofillerin yerleşmelerini ve aktive olmalarını sağlar (Multhoff ve ark., 2012).

Kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %1-5'inde kolit ile ilişkili olarak bağırsakta devam eden kronik inflamasyon tümör oluşumunu başlatabilir (Vagefi ve ark., 2005). Epidemiyolojik araştırmalar uzun süre steroidal olmayan anti-inflamatuvar ilaç (NSAID) kullanımının hem kalıtsal sendromlarda hem de sporadik vakalarda intestinal tümör oluşumunu önleyebildiğini ortaya koyması, kronik inflamasyonun kolorektal kanserdeki önemini göstermektedir (Huls ve ark., 2003; Rothwell ve ark., 2011).

NF-κB, transkripsiyonel kontrolü altındaki önemli pro- ve anti-inflamatuvar faktörlerin çokluğu sebebiyle inflamasyonda ana düzenleyici faktördür. Romatoid artrit, diyabet, astım, felç, viral enfeksiyonlar, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve otoimmünite gibi inflamatuvar hastalıkların yanı sıra kanser ve ateroskleroz gibi hastalıklarda da merkezi bir role sahiptir (Gupta ve ark., 2010; Mitchell ve ark., 2018).

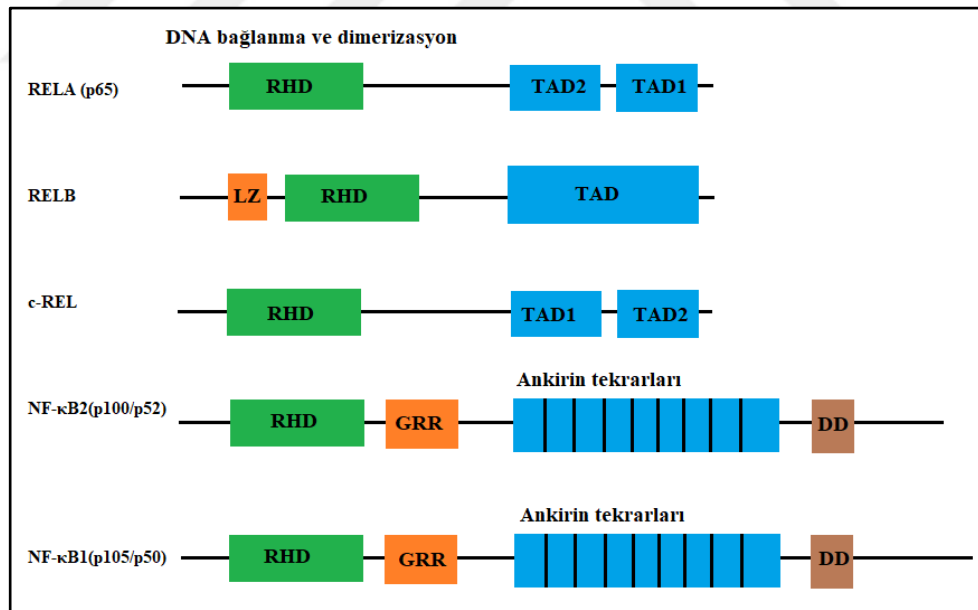
NF-κB aktivasyonu, kolorektal kanserde yaygın olarak görülür ve aynı zamanda da kemoterapiye direnç ile ilişkilidir. Tümör teşvik edici pek çok sitokin, tümöral bağışıklık hücrelerinde veya tümör hücrelerinde NF-κB yoluyla aktive edilir. Sekresyonun ardından, bu sitokinler epitel hücrelerindeki reseptörlere bağlanırlar ve bu reseptörleri etkinleştirirler. Böylece hücre proliferasyonunu, apoptoz inhibisyonunu, anjiyogenezi, tümör oluşumunu, metastazı ve aynı zamanda inflamatuvar yanıtın artışını teşvik eden onkogenik veya inflamatuvar sinyal yollarını düzenler (Naugler ve Karin, 2008).

Doğuştan ve edinilmiş bağışıklıkta NF-κB'nin oynadığı rol göz önüne alındığında, NF-κB yolağının inflamasyon ile kanser arasında güçlü bir bağlantı sağladığı anlaşılmaktadır. NF-κB yolağının inhibisyonu veya modülasyonu potansiyel kanser tedavi stratejisi olarak önerilmektedir (Kaltschmidt ve ark., 2018).

2.9.1. NF- κ B Transkripsiyon Faktörü Ailesi

Ranjan Sen (1986), B lenfositlerinde immünglobulin-kappa hafif zincirine bağlanarak genin aktivitesini düzenleyen bir protein tanımladı. Daha sonra İnflamasyon ve immün homeostazın esas düzenleyicisi olan bu proteine “Nükleer faktör-kappa B (NF- κ B)” adını verdiler (Sen ve Baltimore, 1986). Bu proteinin bakteriyel kökenli lipopolisakkaritler (LPS) ile uyarılabildiği ve yalnızca B hücrelerine özgü olmadığı sonraki çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Pek çok araştırmaya konu olan NF- κ B hakkında bugüne kadar 60.000’e yakın makale ve derleme yayınlanmıştır.

Her ne kadar tek bir transkripsiyon faktörü olarak adlandırılrsa da memelilerde NF- κ B aslında, hem pozitif hem de negatif olarak gen transkripsiyonunu düzenleyebilen dimerler oluşturmak için bir araya gelen ilişkili beş proteinden oluşan bir ailedir. Memeli hücrelerindeki NF- κ B ailesi: RELA olarak da bilinen p65, RELB (Relb), c-REL, NF- κ B1 (p50; p105) ve NF- κ B2 (p52; p100)’dir (Şekil 2.9) (Hayden ve Ghosh, 2014).



Şekil 2.9. NF- κ B protein ailesi (Mowla ve ark., 2013).

NF- κ B ailesi üyelerinin tümü, REL bölgesi adı verilen ve yapısal olarak korunmuş 300 amino asit dizisine sahiptir. Bu bölgenin C-terminal bölgesi, dimerizasyon ve I κ B'nin bağlanmasından sorumlu iken, N-terminal bölgesi esas olarak DNA bağlama özgülüğünden sorumludur (Kaltschmidt ve ark., 2018). NF- κ B

ailesinin 5 alt birimi, çeşitli transkripsiyonel ve DNA bağlanma özelliklerine sahip 15 olası alt birim kombinasyonu ile homo- ve heterodimer yapılar oluşturabilirler. RELA, RELB ve c-REL alt birimleri doğrudan transkripsiyonu teşvik etmesini sağlayan bir C-terminal transaktivasyon alanına (TAD) sahip iken; p50 ve p52 alt ünitelerinin TAD'ı yoktur ve homodimerler intrinsik transaktivasyon özelliğinden yoksundurlar. Ancak heterodimerin bir parçası olarak TAD içeren bir alt üniteye bağlandığında, p50 ve p52 alt birimleri transkripsiyonu olumlu bir şekilde düzenleyebilir (Hayden ve Ghosh, 2014; Kaltschmidt ve ark., 2018). C-terminal transkripsiyonel aktivasyon alanlarını içeren RELA, RELB ve c-REL proteinlerinde ise inhibitör ankirin tekrarları eksiktir (Karin ve ark., 2002).

NF- κ B1 ve NF- κ B2 olmak üzere REL homoloji alanına sahip alt üniteler olan p105 ve p100 büyük prekürsörleri, birden fazla ankirin tekrar kopyalarını (ANK) içeren ve uzun C-terminal alanlarına sahip olan polipeptid dizileri ubiquitin/proteazom yoluyla işleme tabi tutularak sırası ile p50 ve p52 olarak adlandırılan olgun NF- κ B alt birimlerini üretirler (Escarcega ve ark., 2007). p100'den p52'nin ve p105'ten p50 üretimi sıkı şekilde düzenlenen bir işlemdir (Gongxian ve Shaocong, 2003).

NF- κ B aktivasyonunu kontrol eden mekanizma onun inhibitörü ile etkileşmesidir. Dimerize REL/NF- κ B transkripsiyon faktörleri 9-10 baz çiftlik DNA bölgelerine bağlanırlar ve bunlara κ B bölgeleri denir (Fan ve ark., 2013). RELA ve p50 alt birimlerinin heterodimeri çoğu hücredeki ana Rel/NF- κ B kompleksidir. Dolayısıyla NF- κ B terimi genellikle spesifik olarak bir p50-RELA (p65) heterodimerine işaret eder. p50 ve p52'nin homodimerleri genel olarak κ B bölgesi transkripsiyonunun baskılayıcısı olmasına rağmen; hem p50 hem de p52; RELA, RELB veya c-REL ile heterodimerler oluşturarak hedef gen transaktivasyonuna katılırlar (Li ve Verma, 2002).

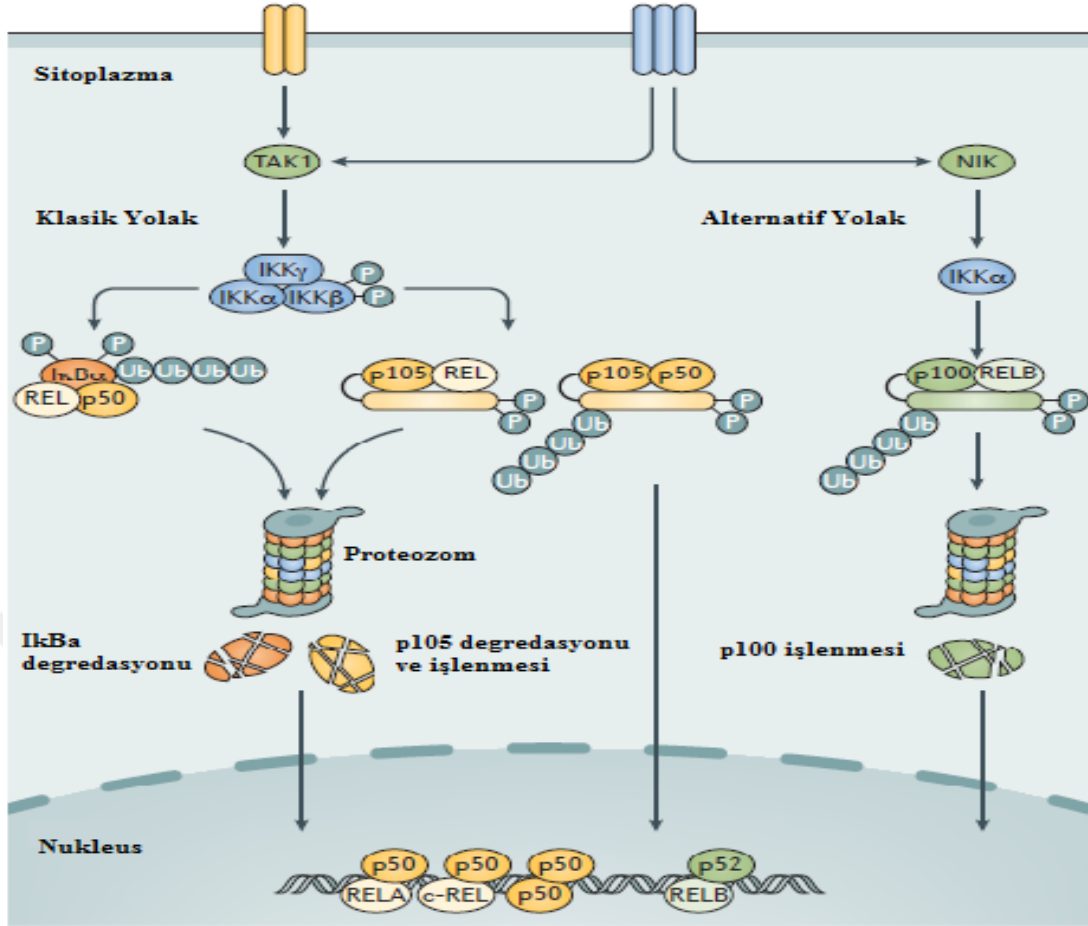
2.9.2. NF- κ B Sinyal İletim Yolağının Aktivasyonu

Dinlenme durumunda NF- κ B dimerleri, NF- κ B inhibitörleri (I κ B) olarak bilinen I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ ve NF- κ B prekürsörleri p100 ve p105 dahil I κ B ailesi üyeleri tarafından inaktif bir durumda sitoplazmada tutulur. Tüm I κ B proteinleri NF- κ B dimerleri ile etkileşen merkez bir ANK bölgesine sahiptir (Hayden ve Ghosh, 2014).

Aktive edici bir sinyal aldıktan sonra, I κ B proteinleri I κ B kinaz kompleksi (IKK) tarafından fosforile edilir. Böylece gen transkripsiyonunu düzenlemek için, DNA'daki spesifik bölgelere bağlanabilecekleri nukleusa geçebilen NF- κ B dimerleri serbest bırakılır (Şekil 2.10). NF- κ B ile uyarılan ekspresyon ve I κ B α 'nın yeniden sentezi, NF- κ B transkripsiyon aktivitesini sonlandıran birincil araçtır ve kritik bir negatif geribesleme döngüsü oluşturur (Mowla ve ark., 2013; Hayden ve Ghosh, 2014).

İlginç bir şekilde, NF- κ B ayrıca kendi baskılayıcısı olan I κ B α 'nın ekspresyonuna da yol açar. Yeni sentezlenen I κ B α , daha sonra NF- κ B'yi yeniden inhibe eder ve böylece bir oto-negatif-geri besleme döngüsü oluşturur (Nelson ve ark., 2004). "Hızlı etkili" primer transkripsiyon faktörlerinin bir aile üyesi olarak NF- κ B, normalde hücrelerde inaktif bir durumda bulunur ve aktivasyonu için yeni protein sentezi gerektirmez. Bu durum, NF- κ B'nin tehlikeli hücrel uyarılara ilk yanıt verici olmasını sağlar. NF- κ B, inflamatuvar sitokinler (TNF- α ve IL-1), T-hücresi aktivasyon sinyalleri, büyüme faktörleri, forbol esterler (TPA) ve stres indükleyiciler gibi çeşitli uyarılarla dakikalar içinde aktive edilir. Ayrıca NF- κ B, kemoterapötik ilaçlar, oksidatif stres, UV ışığı ve iyonize radyasyon gibi kimyasal ve fiziksel sitotoksik ajanlar tarafından da aktive edilir (Gilmore, 2006).

NF- κ B'nin aktivasyonu klasik ve alternatif olmak üzere iki yolak aracılığıyla gerçekleşir. Bu yolların her ikisinde de anahtar adım I κ B proteinlerinin posttranslasyonel modifikasyonudur. Her iki yolak da IKK kompleksleri aracılığıyla kontrol edilir. IKK kompleksi; IKK α ve IKK β kinazlarından ve ayrıca IKK γ olarak da bilinen düzenleyici alt birim NEMO'dan oluşmaktadır (Mowla ve ark., 2013).



Şekil 2.10. Klasik ve alternatif NF-κB yolağı (Sun 2017). Uyarılmamış hücrelerde, NF-κB p50 ve p65 olmak üzere iki alt üniteden oluşan heterodimer yapıları sitoplazmada bulunur. Heterodimer, inhibitör protein IκBα ile kompleks oluşturarak çekirdeğe geçişini önler. Bazı inflamatuvar ajanlarla aktive olduğunda ise spesifik protein kinazlar IκBα proteinini fosforilleyerek degradasyonuna neden olur ve NF-κB IκBα'dan ayrılır. Fosforillenen IκBα daha sonra proteozomlar tarafından rastgele degrade edilir, bu durum NF-κB'nin nukleusa geçişine yol açar ve çeşitli hedef genlerin promotorunda bulunan spesifik DNA dizilerine bağlanır (Ghosh ve Karin, 2002; Kaltschmidt ve ark., 2018; Mitchell ve Carmody, 2018).

2.9.2.1. Klasik Yolak

Klasik yolda pek çok pro-inflamatuvar uyarıcı örneğin; TNF-α, IL-1α/β, LPS ve çeşitli ilaçlar NF-κB'yi aktive edebilirler. Yolak; T-hücresi reseptörleri (TCR), B-hücresi reseptörleri (BCR), TLR, LPS veya IL-1R süper aile üyelerine TNF-α ligandının bağlanması aracılığıyla tetiklenir. Reseptörlerden gelen aktive edici sinyal, esas olarak IKK bağımlı fosforilasyon ve IκB proteinlerinin degradasyonu yoluyla iletilir. Sinyal iki katalitik alt ünite (IKKα ve IKKβ) içeren ve esas düzenleyici modülatör IKKγ'dan oluşan IKK kompleksini harekete geçirir. Tipik olarak IKK aktivasyonu öncelikle β alt ünitesinin fosforilasyonu ve aktivasyonu ile gerçekleşir. IκBα, N terminalinde bulunan 2 serin rezidüsündeki (Ser32 ve Ser36) IKKβ tarafından fosforile edilir (Ravi ve Bedi, 2004). Fosforilasyon, IκBα'nın Lys21 ve

Lys22 bölgesinde poliübikütinasyonu tetikler ve 26S proteozom aracılığıyla degrade edilir ve serbest NF- κ B (RelA/p50) dimeri çekirdeğe transloke olur (Karin ve Ben-Neriah, 2000; Hymowitz ve Wertz, 2010).

Klasik yolda çeşitli apoptotik sinyal inhibitörlerinin üretimi; inflamasyon, hücre proliferasyonu ve hücre sağkalımı artırmakla birlikte anjiyogenez, tümör ilerlemesi ve metastazına da katkı sağlar (Patel ve ark., 2018).

2.9.2.2. Alternatif Yolak

Bu yolağın aktivasyonu, B-hücre aktive edici faktör ve lenfotoksin β (LT β) gibi TNF aile üyeleri aracılığıyla tetiklenir. Bu yolak, RELB ve p52 alt birimlerinden oluşan NF- κ B dimerlerinin aktivasyonuna yol açar ve IKK α 'ya bağımlı, IKK β ve NEMO'dan ise bağımsızdır. NF- κ B/p100, alternatif yolağın anahtar negatif düzenleyicisidir ve dinlenme halindeki hücrelerde RELB'nin çekirdeğe translokasyonunu önler (Sakamoto ve Maeda, 2010).

Alternatif yolak, esas olarak IKK α homodimerlerine dayanmaktadır. Yolağın aktivasyonu IKK α 'yı fosforile ve aktive eden NF- κ B indükleyici kinazın (NIK) stabilizasyonuna yol açar. Aktive edilmiş IKK α daha sonra, C-terminalindeki (S176 ve S180) iki serin rezidüsünden p100'ü fosforile eder. Bu durumda, p100'ün ubiquitinasyonu, NF- κ B/p52 alt birimini ve serbest RELB:p52 dimerlerini oluşturmak için kısmi proteozomal degradasyonu tetikler (Sun, 2017). p52/p100 proteini, amino-terminali bölgesi aracılığıyla RELB proteinine bağlanır ve karboksi-terminal I κ B-benzeri domaini sayesinde sitoplazmada dimerize olur. IKK α dimerlerinin aktivasyonu, p52:RELB dimerlerinin nukleusa girişi ile sonuçlanır (Sakamoto ve Maeda, 2010).

NF- κ B'nin kanserle ilişkili inflamasyonu düzenlediği yolak; p50/RELA, c-REL veya RELB'nin heterodimerlerinin transkripsiyonel aktive edici kompleksleri oluşturduğu klasik NF- κ B yolağıdır (Heissmeyer ve ark., 2001).

2.9.3. NF-κB Sinyal İletim Yolunun Aktivatörleri ve Hedef Genler

NF-κB fizyolojik ve patolojik koşullar altında vücutta hücre sinyalini kontrol etmedeki merkezi rolü ile, kompleks olayların düzenlenmesinden sorumlu iyi tanımlanmış bir protein ailesidir. Fonksiyonları arasında; pro-inflamatuvar sitokinleri (örn; IL-1, IL-2, IL-6, TNF-α, TGF-β, EGF gibi), proanjyogenik faktörleri (IL-8, VEGF), kemokinleri (örn; IL-8, CCL2, CCL20 gibi), anti-apoptotik faktörleri (Bcl-X_L, FLIP), invazyonu artıran molekülleri (MMP-2, MMP-7, MMP-9), inflamatuvar enzimleri (PGHS-2, LOX), adezyon moleküllerini (örn; ICAM, VCAM, E-selektin), uyarılabilir enzimleri (COX-2 ve iNOS), hücre döngüsü mediatörleri (siklin D, c-Myc), büyüme faktörleri, bazı akut faz proteinleri, ve immun reseptörleri kodlayan genlerin ekspresyonunu kontrol eder. NF-κB, tüm bu faktörler ve bunun gibi 500 kadar genin ekspresyonunu düzenleyen inflamasyonun anahtar transkripsiyon faktörüdür (Aggarwal ve Gehlot, 2009; Gupta ve ark., 2010).

2.10. Hücre Ölümü (Apoptoz)

2.10.1. Apoptozun Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Morfolojik olarak apoptoz, plazma zarının patlaması, hücre gövdesinin küçülmesi (piknoz), nüklear yoğunlaşma ve fragmentasyon ve membrana bağlı hücre parçalarının (apoptotik cisimler) oluşumu ile karakterizedir (Brown ve ark., 2002).

Apoptozun morfolojik ve biyokimyasal özellikleri arasında; mitokondriyal iç transmembran potansiyelinde bir azalma, 400'den fazla proteinin kısıtlayıcı hidrolizine yol açan seçici proteazların aktivasyonu, kromozomal DNA'nın internükleozomal fragmanlara parçalanması, çeşitli hücre proteinlerinin seçici olarak degradasyonu ve plazma membranının içinden dışarıya fosfatidilserinin translokasyonu yer alır (Strasser ve ark., 2014). Bu geniş hidrolizle ilgili temel proteazlar kaspaz ailesinin üyeleridir. Kaspazların yanı sıra lizozomal katepsinler, kalpainler ve granzimler gibi diğer proteazlar da apoptotik sürece dahildir (Lord ve ark., 2003).

2.10.2. Apoptoz Mediatörlerinin Büyük Bir Sınıfı Olarak Kaspazlar

Kaspazlar çeşitli hücre tipleri ve dokularda eksprese olan sistein-bağımlı aspartat proteaz ailesinin üyesidirler. Kaspazların aktivasyonu; aktive edici

komplekslerin içeri alınması veya diğer kaspazlar tarafından parçalanmasıyla meydana gelen bir mekanizmadır (Szegezdi ve ark., 2006). Kaspazlar sağlıklı hücrelerde öncü protein (prokaspaz) olarak inaktif formda bulunurlar, apoptoz uyarıldıktan sonra aktif enzim formuna dönüşürler. Kaspaz ailesi iki gruba ayrılır; başlatıcı kaspazlar (kaspaz -8, -9 ve -12) ve efektör kaspazlar (kaspaz -3, -6 ve -7). Spesifik başlatıcı kaspazlar tarafından tetiklenen 3 major apoptotik kaskad vardır: ölüm reseptör yolağı, mitokondriyal yolak ve Endoplazmik Retikulum (ER) yolağı (Morishima ve ark., 2004).

İki major yolak apoptotik hücre ölümünü uyarır. Bunlardan biri ölüm ligandları tarafından ölüm reseptörlerinin bağlanmasıyla ekstrinsik yolaktaki apoptotik moleküllerin içeri alınmasına yol açar ve kaspaz-8 veya -10'u aktive eder. Mitokondriden sitokrom c'nin salınımına yol açan intrinsik yolak, Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1), prokaspaz-9, dATP ve sitokrom c'den oluşan apoptozomun oluşumunu tetikler ve bu apoptozom oluşumu kaspaz 3, 6 ve 7'nin aktivasyonuna neden olur (Shiraishi ve ark., 2006).

TNF- α gibi ekstrinsik faktörler tarafından ölüm reseptörlerinin aktivasyonu üzerine apoptozu başlatmada kaspaz-8 merkezi bir rol oynamaktadır (Degterev, 2003). Son yıllardaki çalışmalar, kaspaz-8'in gen mutasyonları, epigenetik modifikasyonlar ve posttranslasyonel değişiklikler de dahil olmak üzere çoklu mekanizmalar yoluyla insan kanserlerinde sıklıkla inaktive edildiğini ortaya koymuştur (Fulda, 2010). Kanser hücrelerinde kaspaz-8'in inaktivasyonu, mevcut kanser tedavilerine direncin önemli bir mekanizmasını olan apoptozdan kaçmaya neden olabilir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.10.3. İntrensik (Mitokondri Aracılı) Yolak

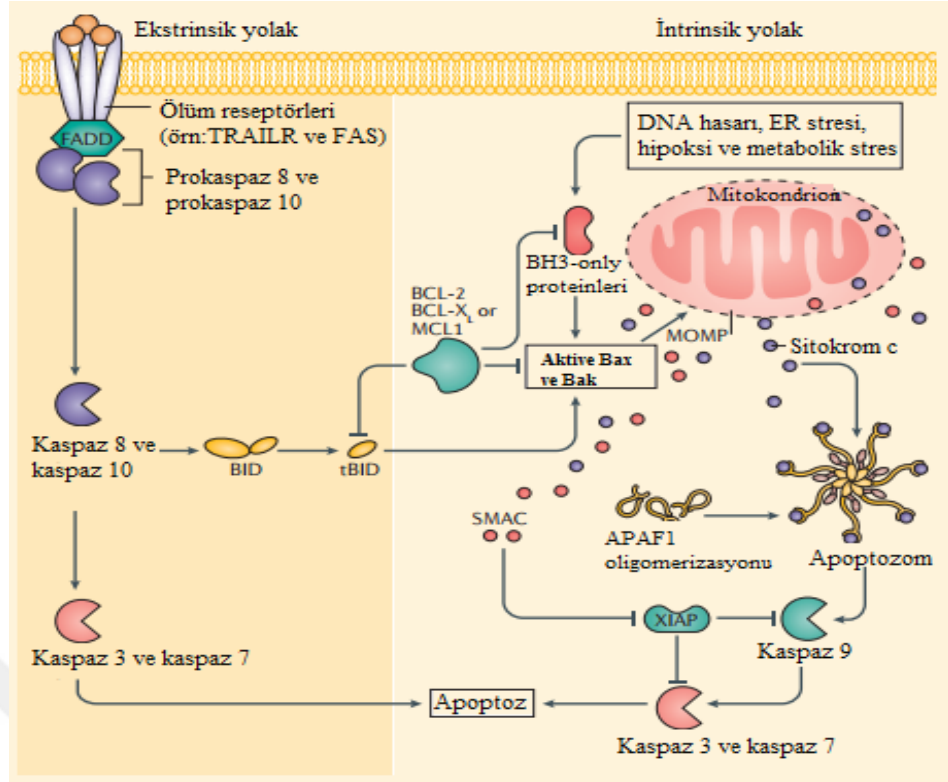
İntrensik veya mitokondriyal apoptotik yolak, DNA hasarı veya sitotoksik ilaçlar da dahil olmak üzere birçok uyarı ile tetiklenir. Sitokrom c (sit c), sitozole salınır ve Apaf-1'e bağlanır. dATP/ATP'nin varlığında, Apaf-1/sit c kompleksi oluşur. Bu kompleksin oluşumu, prokaspaz-9'un Apaf-1 ile etkileşimine neden olur. Apoptozda kaspaz-9 etkin bir başlatıcı kaspazdır ve efektör kaspazları (kaspaz-3 ve -7) aktive eder (Şekil 2.11) (Li ve Yuan, 2008).

2.10.3.1. Bcl-2 Ailesi Üyeleri

Bcl-2 protein ailesi, fonksiyonlarına ve Bcl-2 homoloji (BH) alanlarının sayısına göre üç gruba ayrılır. Anti-apoptotik üyeler (Bcl-2, Bcl-X_L) dış mitokondriyal zar ile ilişkilidir ve çeşitli apoptotik uyarılara karşı hücreyi korurlar ve dörde kadar BH domaini (BH1-BH4) içerirler. Pro-apoptotik üyeler; Bax-benzeri domaine sahip (BH1-BH3) apoptotik proteinler (Bax, Bak) ve yalnızca BH3 proteinleri (Bik, Bid, Bad, Puma, Noxa, Bim, Hrk, Bmf) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Genellikle Bcl-2 ailesindeki proteinlerin homo ve heterodimerler oluşturduğu ve pro- ve anti-apoptotik üyeler arasındaki etkileşimlerin birbirlerinin aktivitesini nötralize ettiği düşünülmektedir (van Delft ve Huang, 2006). Son olarak, pro-apoptotik ile anti-apoptotik Bcl-2 aile üyeleri arasındaki oran, hücre apoptozunu belirlemek açısından kritik önem taşımaktadır.

2.10.4. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik apoptotik yolak, hücre yüzeyi ölüm reseptörlerinin ligandları ile bağlanması yoluyla aktive edilir. Ölüm reseptörleri, TNFR süper ailesine aittir. Bu ailenin üyeleri tip I transmembran proteinleridir ve ligand bağlanmasını tanımlayan benzer sistince zengin hücre dışı alanlarla karakterizedirler. Ölüm reseptörleri, "ölüm alanı" (DD) adı verilen, apoptotik sinyalin transdüksiyonu için gerekli olan, hücre içi 80 amino asit uzunluğundaki bölgeyi içerir. En çok çalışılan ölüm reseptörleri Fas (CD95/Apo-1), TNFR1, TRAIL-R1 (DR4) ve TRAIL-R2 (DR5)'dir. Ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar (FasL, TNF- α ve TRAIL), TNF ailesine ait olan yapısal olarak ilişkili proteinlerdir (Şekil 2.11). Bu ölüm ligandları esas olarak tip II transmembran proteinleri olarak ifade edilir. Bazı durumlarda, çözünür ligandların apoptozu indükleyen kapasitesi, membrana bağlı ligandlardan önemli derecede düşük olmasına rağmen, bu proteinler proteolitik olarak parçalanabilir ve salınabilir (Guicciardi ve Gores, 2009).



Şekil 2.11. İntrensik ve ekstrinsik apoptoz sinyal yolakları (Ichim ve Tait, 2016).

2.11. Bitkisel Kaynaklı Tedavi

Son yıllarda kanser tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmesine karşın, yeni keşfedilen sentetik bileşiklerin anti-kanser amaçla kullanımlarının genellikle toksik etkileri nedeniyle sınırlı olduğu görülmektedir. Dahası, dünyada çok sayıda kişinin kanser tedavisine ulaşma imkanı sınırlıdır veya hiç yoktur. Bu yüzden, kanseri önleme ve kontrol etmede doğal kaynakların kullanımı hem tolere edilebilirlik açısından hem de kolay ulaşım açısından önem arz etmektedir (Javadi ve ark., 2015).

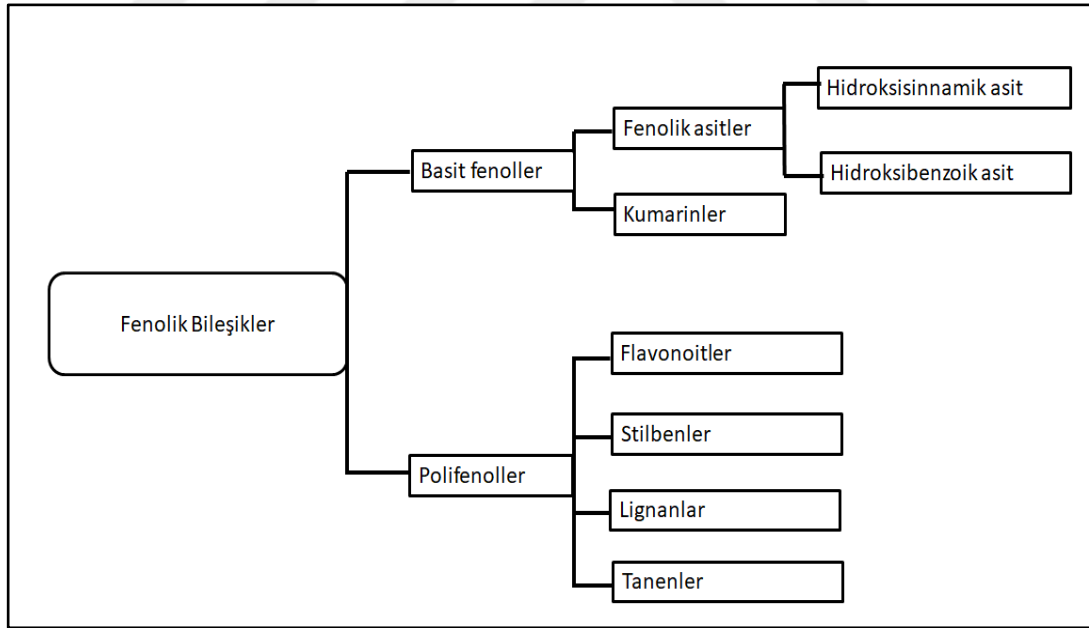
Bitkilerin düşük yan etki ile tedavi etme özellikleri üzerine yapılan çalışmaların hız kazanmasıyla, bitkilerden elde edilen droglar geleneksel kullanılan tedavi araçları olmakla kalmayıp, stabilize ve standardize edilmiş, etkinliği ve güvenilirliği ortaya konmuş, modern farmasötik formlarda rasyonel tedavi araçları olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bitkisel kaynaklı anti-kanser maddelerin araştırılması; vinka alkaloidleri, vinblastin ve vinkristinin keşfi ve geliştirilmesi ile 1950'lerin başında hız kazanmıştır. Daha sonra, birçok sitotoksik aktivite gösteren

yeni kemotipler olarak taksanlar ve kamptotesinler keşfedilmiştir (Cragg ve Newman, 2005).

Çoğu bitki sekonder metabolitlerinin; doğrudan ya da dolaylı olarak çeşitli inflamatuvar mediatörlerle (araşidonik asit metabolitleri, peptidler, sitokinler, uyarıcı amino asitler vb.), ikincil habercilerle (cGMP, cAMP, çeşitli protein kinazlar, kalsiyum vb.), AP-1, NF- κ B ve protoonkogenlerle (c-jun, c-fos ve c-myc), anahtar pro-inflamatuvar moleküllerle (induklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) vb.), COX-2, IL-1 β , TNF- α gibi sitokinlerle, nöropeptidler ve proteazlarla etkileşimleri bilinmektedir (Calixto ve ark., 2003; Hoesel ve Schmid, 2013).

2.11.1. Karsinogenezde Fenolik Bileşiklerin Rolü

Fenolik bileşikler, bitkilerdeki sekonder metabolitlerin en geniş sınıflarındandır. Genel olarak; basit fenoller (fenolik asitler ve kumarinler) ve polifenoller (flavonoitler, stilbenler, lignanlar ve tanenler) olmak üzere sınıflandırılabilir (Şekil 2.12) (Soto ve ark., 2015).

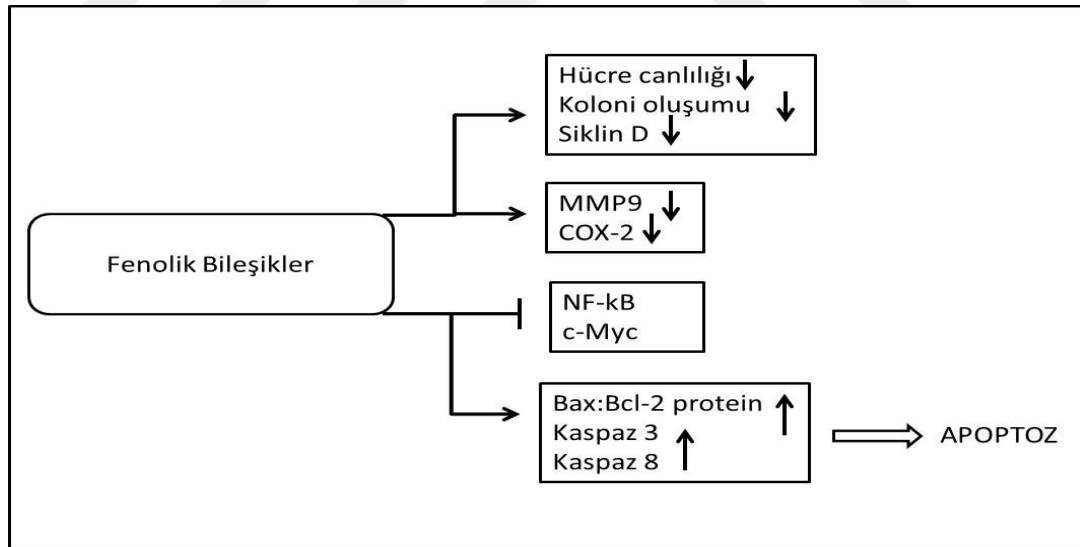


Şekil 2.12. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması (Soto ve ark., 2015).

Tıbbi bitkilerin çok çeşitli biyolojik etkilerinin, içerdikleri farklı yapılarıdaki fenolik bileşiklerle bağlantılı olduğu yapılan pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Kolon kanserinde fenolik bileşiklerin anti-karsinojenik etki mekanizmaları Şekil 2.13'de verilmiştir.

Diyetteki fenoliklerin sağlığa yararları emilimlerine ve metabolizmalarına bağlıdır. Bu durum, ince bağırsak duvarından dolaşım sistemine doğru geçiş boyunca ve ardından portal venden karaciğere geçiş sırasında meydana gelir. Polifenollerin metabolitleri plazmadan hızla elimine edilir, bu nedenle kanda yüksek metabolit konsantrasyonları sağlamada bitkisel ürünlerin günlük olarak tüketimi esastır (Crozier ve ark., 2009).

Epidemiyolojik bulgular fenolik bileşiklerin; patojenlerin inhibe edilmesinde, kardiyovasküler, diyabet, kanser ve felç gibi rahatsızlıkların önlenmesinde etkili olarak anti-inflamatuar ve anti-alerjik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Graf ve ark., 2005). Fenolik bileşikler, serbest radikallere karşı DNA'nın korunması, ksenobiyotik metabolizmasına katılan enzimlerin indüksiyonu, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, DNA hasarının onarımı, hücre proliferasyonu, apoptoz ve invazyonun dahil olduğu hücresel sinyal yollarının modülasyonunu sağlayarak etki göstermektedir. Fenolik asitler, hidrolize edilebilen tanenler ve flavonoidler; karsinogenleri inaktive, ksenobiyotik detoksifikasyon enzimlerini ise aktive etmek suretiyle anti-karsinogenik ve anti-mutajenik etkilere sahiptir.



Şekil 2.13. Kolon kanserinde fenolik bileşiklerin anti-karsinogenik etki mekanizmaları (Rosa ve ark., 2016).

Araşidonik asitin prostaglandinlere dönüştürülmesinde kritik bir adımı katalize eden ve pro-inflamatuar uyarılar tarafından indüklenen, COX-2'nin aşırı ekspresyonu; kolon, akciğer, meme ve prostat karsinogenezi ile ilişkilidir (Dai ve Mumper, 2010). Fenolik bileşiklerin, inflamasyon ile ilişkili pro-inflamatuar

sitokinleri, COX-2'yi, lipoksijenazlar (LOX)'ı ve iNOS ile bağlantılı transkripsiyon faktörlerini inhibe ettiği bildirilmiştir (Rosa ve ark., 2016).

2.12. *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*

2.12.1. *L. orientalis*'in Taksonomik Sınıflandırılması

Alem: Plantae

Alt alem: Tracheobionta

Şube: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Alt sınıf: Hamamelidae

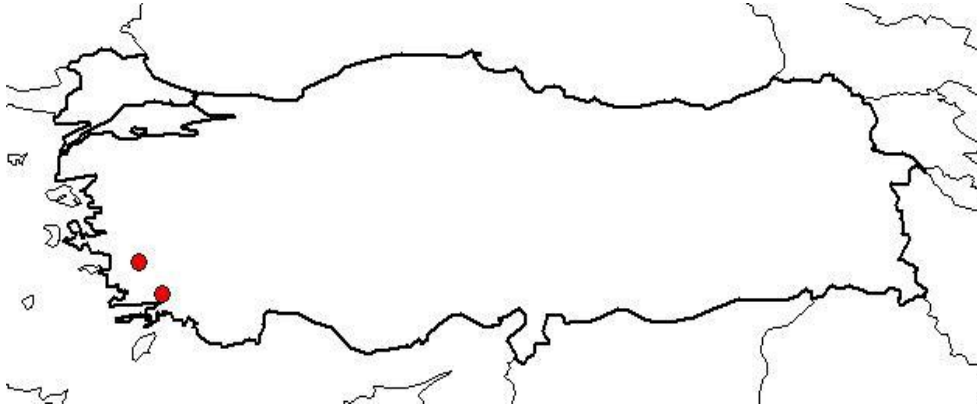
Aile: Hamamelidaceae

Cins: *Liquidambar*

Tür: *Liquidambar orientalis*

2.12.2. *L. orientalis*'in Yayılışı

Hamamelidaceae familyasına ait sığla ağacı veya günlük ağacı (*Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*), Türkiye'de yetişen paleoendemik bir türdür (Davis, 1982). *L. orientalis*, Türkiye'nin güneybatı kıyı bölgelerinde, özellikle Köyceğiz, Fethiye, Marmaris ve Ula bölgelerinde yerel bir dağılım göstermektedir (Şekil 2.14) (Hafizoğlu, 1982).



Şekil 2.14. Taksonun Türkiye üzerindeki dağılımı (http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=4043).



Şekil 2.15. *L.orientalis* meyve ve yaprağının görünümü
(<http://www.epharmacognosy.com/2012/07/storax>).

2.12.3. *L. orientalis*'in Halk Arasında Kullanılışı ve Üzerinde Yapılan Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Liquidambar'ın; *Liquidambar formosana*, *Liquidambar acalycina*, *Liquidambar orientalis* ve *Liquidambar styraciflua* olmak üzere 4 türü vardır (İckert-Bond ve ark., 2005). Yapılan literatür çalışmaları, bu türler içerisinde halk arasında sıklıkla kullanımı olan ve üzerinde en fazla çalışma bulunan türün *Liquidambar orientalis* olduğunu göstermiştir.

L. orientalis, Akdeniz bölgesinde tıbbi ve kozmetik amaçlarla yaygın olarak kullanılan odunsu bir bitkidir (Şekil 2.15). Ağacın kabuğundan yaz başlarında mekanik olarak kazınarak elde edilen balsamın halk arasındaki kullanımı oldukça yaygındır. Gövdeden akan balsam kaynatıldıktan sonra preslenerek ham balsam elde edilir. Ham balsam daha sonra alkol içinde çözülür, filtrelenir ve saflaştırılmış balsam elde edilmek üzere toplanır (Jianming ve ark., 2011).

L. orientalis ile ilgili yapılan çalışmalar daha çok bitkinin balsamı üzerinedir. Yaprak ve meyve ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bugüne kadar yapılan pek çok araştırmada balsamın birçok bakteri türü, fitopatojen mantar ve nematodlar üzerinde koruyucu aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Oskay ve Sarı, 2007; Kim ve ark., 2008; Lee ve ark., 2009).

Balsamın *n*-hekzan, diklorometan ve metanol ekstralarının *Klebsiella pnömoni*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*,

Pseudomonas aeruginosa, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans*, *Pseudomonas marina*, *Pseudomonas. haloplanktis*, *Alteromonas alvinella*, *Alteromonas genoviensis*, *Vibrio splendidus*, *Exiguobacterium homiense* ve *Vibrio lentus* bakterilerine karşı anti-mikrobiyal etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmada MeOH ekstresinin, diklorometan ve *n*-hekzan ekstresinden daha etkili olduğu belirlenmiştir (Avunduk ve Kacar, 2013).

L. orientalis balsamının % 10'luk etanol konsantrasyonunda *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Staphylococcus aureus*'un büyümesini engellediği görülmüştür (Sagdiç ve ark., 2005).

L.orientalis'in farklı konsantrasyondaki anti-bakteriyel aktivitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada, *Xanthomonas axonopodis*, *Pseudomonas syringae pv.tomato*, *Rhizobium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, *Rhizobium vitis*, *Erwinia amylovora* ve *Xanthomonas campestris pv. campestris* için önemli bir anti-bakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur (Basim ve ark., 2012).

L. orientalis yaprak ekstrelerinin gıda patojenlerine karşı *in vitro* anti-mikrobiyal ve antioksidan aktivitesi disk difüzyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. *L. orientalis* yapraklarından hazırlanan aseton, etanol ve metanol ekstrelerinin, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı 4 ila 34 mm arasında değişen inhibisyon zonları oluşturarak geniş spektrumlu anti-mikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca, en güçlü antioksidan aktiviteyi metanol ekstresinin sergilediği ortaya konulmuştur. Bulgular bitkinin halk arasındaki kullanımını desteklemektedir (Oskay ve Sarı, 2007).

L.orientalis yaprakları detoksifikasyon, hemostaz ve ağrı giderme etkisine sahiptir. Akut gastroenterit, dizanteri, infantil tetanoz tedavisinde kullanılabilir. Yaprak etanol ekstresinin *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter faecalis* gibi mikroorganizmalara karşı değişen inhibisyon zonlarına sahip geniş spektrumlu anti-bakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ve yeni ilaçların araştırılmasında anti-mikrobiyal ajanlar

olarak kullanılabilir iyi anti-bakteriyel özelliklere sahip bileşikler içerdiği önerilmektedir (Oskay ve ark., 2009).

L. orientalis'in Japon termiti (*Reticulitermes speratus*) üzerine fumigant toksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada, balsama ait uçucu yağlar ve bileşenlerden hidrosinnamil alkol ve trans-sinnamil alkolün fumigant anti-termitik toksisiteye major katkı sağladığı bulunmuştur (Park, 2014). Başka bir çalışmada ise balsamdan elde edilen uçucu yağın *Phytophthora cactorum*, *Cryphonectria parasitica* ve *Fusarium circinatum*'a karşı anti-fungal etkinliği olduğu belirlenmiştir (Lee ve ark., 2009).

Balsamın literatürdeki bilgiler ışığında boğmaca, astım, kolesistit, bronşit, sedef hastalığı, hemoroit, ülser, mide ağrısı, yanık, kesik, ağız, deri ve akciğer hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı ve topikal parazit öldürücü, anti-septik olduğu bilinmektedir (Fernandez, 2005; Lee ve ark., 2009; Gürdal ve Kültür, 2013). Balsamın oral ve burun içi uygulamalardan sonra sedatif ve anti-konvülsan aktivitesi olduğu da belirlenmiştir (Guo ve Duan, 2011).

Geleneksel Çin tıbbında bu bitki, korku ve huzursuzluk durumlarında sakinleştirici özelliklere sahip resüsitasyona neden olan aromatik bitkiler grubundadır. Son yıllarda, birincil madde olarak stiren içeren çeşitli ilaçlar Çin'de klinik olarak kullanılmak üzere onaylanmıştır. Örneğin, stiren içeren 15 bitkiden oluşan Storax Pill reçetesi (Çin ismi SuHeXiang Wan), felç, infantil kasılma ve benzeri hastalıkların tedavisinde oral olarak kullanılmaktadır (Koo ve ark., 2004).

Balsamın halk arasında peptik ülser tedavisi için etnobotanik kullanımı bilinmekle birlikte bu kullanımının deneysel olarak gösterilmesi için, sıçanlarda *in vivo* deneysel bir gastrik ülser modeli oluşturulmuştur. Bu çalışmada farmakolojik deneyler 150 ve 300 mg/kg dozlarında mide ülseri modeline karşı bitkinin önemli bir koruma sağladığını ve ülser inhibisyon oranının sırasıyla % 83.3 ($p<0.001$) ve % 66.7 ($p<0.01$) olduğunu bildirmiştir (Gurbuz ve ark., 2013).

Balsamın felç parametreleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, sistolik ve diyastolik kan basıncını düşürdüğü, yüksek dozunun ise fibrin kan pıhtılarını erittiği gözlenmiştir (Bayazit, 2009). İran halk tıbbında katı aşamadaki uterus inflamasyonunu iyileştirmede balsamın kullanıldığına dair kanıtlar mevcuttur.

L. orientalis'ten elde edilen ekstrenin, felç modeli oluşturulmuş tavşanlarda fibrin kan pıhtılarının parçalanmasına, sistolik ve diyastolik basıncın ise azaltılmasında rolü olduğu gösterilmiştir (Sahebkar ve Emami, 2013).

Balsamdan elde edilen uçucu yağın fare deney modelinde karbon tetra klorür toksisitesine karşı antioksidan kapasitesi ve karaciğer koruyucu etkisi tespit edilmiştir (Suzek ve ark., 2015).

L. orientalis'in yara iyileştirici etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, eksizyonel yara oluşturulan domuz modelinde yeniden epitelizasyon ve granülasyon doku oluşumu incelenmiş, doku hidrokspirolin içeriği ve yara daralma alanları ölçülmüştür. Çalışma sonucunda, balsamın topikal uygulanmasının, yaralarda hem yeniden epitelizasyon hem de granülasyon doku oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (Ocsel ve ark., 2012).

Balsam patojen mikroorganizmalar üzerindeki toksik etkisi, nedeniyle bakteri ve mantar hastalıklarına karşı alternatif bir ajan olarak kullanılabilir. Ancak tedavide kullanılırken, insan hücreleri üzerinde de sitotoksik ve genotoksik bir etki oluşturmaması da gerekir. Bununla ilgili olarak yapılan bir çalışmada, kardeş kromatid değişimi (SCE) testi ile balsamın genotoksik ve sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Çalışma, balsamın sahip olduğu sitotoksik ve genotoksik etkileri nedeniyle alternatif bir anti-bakteriyel ve anti-patojenik ajan olarak kullanılabileceğini; ancak insanda mide hastalıklarında kullanımının toksik etkiler doğurabileceğini ileri sürmüştür (Karadeniz ve ark., 2011).

Özellikle hücresel seviyede etkilerini ortaya koyan yalnızca iki tane çalışmaya rastlanmıştır. Bir diğer çalışmada ise balsam'a ait hekzan, diklorometan, metanol ve su ekstraktlarının anti-proliferatif etkileri HeLa (İnsan serviks adenokarsinom), A-549 (İnsan alveolar adenokarsinom), MCF-7 (İnsan meme adenokarsinoma), CaCo-2 (İnsan kolorektal adenokarsinom), mPANC96 (İnsan pankreas adenokarsinom), PC-3 (İnsan prostat adenokarsinomu), U87MG (İnsan glioblastoma-astrocitoma) hücre hatları üzerinde, sitotoksik etkileri de HEK293 (İnsan embriyonik böbrek hücre) ve Vero (Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücre) hücre hatlarında değerlendirilmiş ve diklorometan ekstresinin en güçlü sitotoksik etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. Ek olarak LPS ile indüklenen RAW 264.7

makrofajında *L. orientalis*'in iNOS önleyici aktivitesi hekzan, diklorometan, metanol ve su ekstresinde değerlendirilmiş, metanol ekstresi hariç bütün ekstrelerde Nitrik Oksit (NO) üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Son olarak, hekzan dışındaki tüm ekstrelerin, güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Nalbantsoy ve ark., 2016).

Ülkemize endemik *L. orientalis*'e ait içerik analizinin yapıldığı çalışmalar literatürde oldukça sınırlıdır. Yayımlanan çalışmaların çoğu *L.orientalis* balsamının uçucu yağ bileşimi üzerinedir. Anadolu sığla ağacı ortalama 200-300 yıl yaşayabilen bir tür olmakla birlikte balsamında temel olarak asit, ester, alkol, fenolik ve uçucu bileşikler ihtiva etmektedir. Uçucu yağ bileşenleri başlıca sitiren, sinnamil sinamat, fenilpropil sinamat, sinmalaldehit, sinnamil alkol, sinnamil asetat, terpinen-4-ol, α -terpineol, sabinen ve γ -terpinen, α -pinen, β -pinen, viridil oren, germakren D, vanilin, fenil propanol, benzil alkol, benzaldehit ve sitoresinin varlığı gösterilmiştir (Tanker ve Sayron, 1974; Duru ve ark., 2002; Kartal ve ark., 2012).

Balsamın anti-kanser, anti-tüberküloz, anti-malaryal, anti-fungal, anti-aterojenik ve antioksidan aktivitelerinin yanında güçlü anti-bakteriyel etkisi içerdiği sinamik asit ve türevleri nedeniyle (Guzman, 2014).

L.orientalis yapraklarının etanol ekstresinde bulunan önemli fenolik bileşenlerin; protokateşik asit (12.232 ± 0.118 mg/g), (-)-epikateşin (7.954 ± 0.493 mg/g), gallik asit (3.258 ± 0.035 mg/g), (+)-kateşin, kafeik asit, ferulik asit ve bunların yanı sıra kersetin, kemferol, linoleik asit ve apigenin gibi bazı biyoaktif metabolitler olduğu gösterilmiştir. *L.orientalis*'in yapraklarından hazırlanan etanol ekstresinde DPPH yöntemi ile radikal süpürücü aktivitesi IC_{50} 3.11 mg/ml olarak bulunmuştur. Fenolik bileşiklerin varlığının antioksidan kapasitesindeki artışa neden olduğu düşünülmektedir (Saraç ve Şen, 2014).

L. orientalis'in yapraklarının etanollü ekstresinin herhangi bir genotoksik etkiye sahip olmadığı, IC_{50} değeri 3.11 ± 0.024 mg/ml ile güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Toplam fenolik içeriğin 333.14 ± 7.96 mg/g olduğu belirlenmiştir (Saraç ve Sen, 2014).

L. orientalis yapraklarından elde edilen ekstrenin, kültür levreğinin kalitesi ve raf ömrü üzerine doğal bir koruyucu olarak etkisinin değerlendirildiği çalışmada,

özellikle oksidasyon göstergesi olan TBA açısından ekstraksiyon grupları ile kontrol grubu arasında önemli bir fark bulunurken, yaprak ekstresi uygulanan levrek balıklarının raf ömrünün duyuşsal olarak kontrol grubuna oranla 3 gün daha fazla olduğu görölmüştür (Yapıcı ve ark., 2015).

L. styraciflua yapraklarının uçucu yağlarının düşük sitotoksisite ile anti-inflamatuvar ve antioksidan etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (El-Readi ve ark., 2013).

L. formosana türünün anti-tümör, anti-koagölan ve hepatoprotektif etkinlik gösterdiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Yang ve ark. 2011; Yang ve ark. 2013). *L. formosana* yaprağına ait farklı ekstrenin antioksidan aktiviteleri ve toplam fenolik, toplam flavonoid potansiyellerinin değerlendirildiği bir çalışmada, tüm ekstrenin butile hidroksitoluen'den daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği, antioksidan aktivite, fenolik ve flavonoid içeriğinin ekstraktlar arasında benzerlik göstererek etkinlik sırasının etanol>aseton olduğu belirlenmiştir (Wang ve ark. 2010).

L. formosana ve bundan izole edilen bileşikler; anti-tümör, anti-koagölan ve hepatoprotektif etki dışında; anti-mikrobiyal, anti-viral, anti-inflamatuvar, anti-depresan gibi farmakolojik etkilere sahiptir. *L. formosana* yaprakları güçlü bir antioksidan kaynağıdır ve serbest radikallerin oluşumunu azaltabilir veya önleyebilir. Bitkinin sahip olduğu birçok farmakolojik aktivite terpenoid ve flavonoidlerden dolayı gibi görünmektedir (Yang ve ark., 2011).

L. formosana meyveleri (Lulutong, Jiukongzi, Fructus Liquidambaris olarak da bilinir) binlerce yıldır Çin'de geleneksel Çin Tıbbı olarak kullanılmaktadır. Eklem artraljisi, uyuşma, kramp, ödem, şişkinlik gibi durumları tedavi edebildiği belirlenmiştir (Ouyang ve ark., 2016). Lulutong'un diklorometan ekstresi, HT-29 hücreleri üzerinde belirgin sitotoksik etki sergilerken, metanol ekstresi sitotoksisite üzerine minimal ve ihmal edilebilir etkiler göstermiştir (Zhang ve ark., 2015).

L. formosana balsamındaki pentasiklik triterpenler arasında, 3-keto iskeletine sahip triterpenik asitlerin, MDA-MB-435S tümör hücrelerine karşı anlamlı derecede sitotoksik etki göstermesinden dolayı, bitkide yaygın olarak bulunan anti-tümör etkiye sahip bir bileşik sınıfı olduğu öne sürölmüştür (Yang ve ark., 2011).

L.formosana, yaprağı ve meyvesinden elde edilen çok sayıda uçucu yağ bileşikleri mevcuttur. Bunlar terpenler, sinnamik asitler ve α -pinen, β -pinen, 4-terpineol, α -terpineol, kamfen, juniperen, terpinen (α , β , γ -konfigürasyonu) olarak sayılabilir (Lee ve ark., 2009; Hua ve ark., 2014). Fenolik asitler ve taninler *L.formosana*'nın yapraklarının ana bileşenlerinden biridir. Yaprak fenil propanoitlerinin bileşimi başlıca galik asit, *p*-hidroksi-benzoik asit, 3-metoksi-4-hidroksi-benzoik asit, 3,5-dihidroksi-4-metoksi-benzoik asit, 3,4-dihidroksi-benzoik asit ve 3,4-dihidroksi-5-metoksi-benzoik asittir (Liao ve ark., 2014).

Gallik asit, *L.formosana*'nın yaprakları ve meyvelerinde önemli miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle, bu bileşik bitkinin, kalitesini değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır (Feng ve ark., 2015). Yaprakta tanen içeriği ise kabuğundakinden yaklaşık % 13 daha yüksektir (Zheng ve Zhang, 2004). Flavonoitlerden ise; rutin ve astragalin gibi çeşitli flavonoitler elde edilmiştir. Son yapılan çalışmalarda ise 2S-5,7,4'-trihidroksifavan-7-0- β -D-glikopiranozit, 2S-5,7,4'-üç hidroksi glikopiranozit ve diğer yeni flavan glikozitleri *L.formosana* yapraklarından izole edilmiştir (Zhong ve ark., 2013). *L.formosana* yapraklarından elde edilen uçucu yağın, TNF- α ile uyarılmış insan akciğer hücre hattı (BEAS-2B)'nda deksametazon ile birlikte uygulandığında IL-6 proteininin ekspresyonunu baskılayarak anti-inflamatuvar aktivite sergilediği gösterilmiştir (Yang ve ark., 2013).

Lulutong'dan izole edilen iki triterpenik asit olan 25-asetil-3 α -hidroksi oleanolik 12-en-28-oik asit ve 3 α , 25-dihidroksi-12-en oleanolik asidin, HT-29 ve HCT-116 hücreleri üzerinde önemli inhibe edici etkiler gösterdiği bulunmuştur (Zhang ve ark., 2015). Lulutong metanollü ekstresinden izole edilen başka bir triterpenoid asit olan 3 α -asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit ve lantanolik asitin, NFAT transkripsiyon faktörünün düzenleyicileri olarak iş gördüğü rapor edilmiştir. Aktif NFAT, kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu artırabilir. Bununla birlikte, aşırı aktive olmuş NFAT, otoimmünite ve bağışıklık reddi gibi bir dizi patolojik ve inflamatuvar reaksiyona yol açmaktadır. Bu bileşiklerin, sırasıyla 4.63 μ M ve 12.62 μ M IC₅₀ ile NFAT üzerinde güçlü bir anti-tümör aktivitesi olduğu kanıtlanmıştır (Dat ve ark., 2004).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Deneyle aşamasında kullanılan cihazlar ve ekipmanlara dair bilgiler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Laboratuvarda kullanılan cihaz ve ekipman listesi.

Cihaz/Ekipman	Marka
Soğutmalı santrifüj	Nüve (NF 200)
RT-PZR	Biorad CFX Connect
PZR	peQLab primus
Elisa plate reader	Biotek epoch
Derin dondurucu (-80 °C)	VWR
Mikro santrifüj	Hettich 200R
Santrifüj	Hettich Rotofix 32A
Manyetik karıştırıcı	Biosan
Isıtmalı karıştırıcı	Heidolph
pH metre	WTW inoLab
Nanodrop	Maestro
Hassas terazi	Kern
Elektroforez tankı	Thermo scientific
Güç kaynağı	Thermo scientific
Transiluminatör	Syngene
İnkübatör	Nüve
İnverted mikroskop	Olympus BX51
CO ₂ 'li inkübatör	Thermo
Class II biyogüvenlik kabini	Scanlaf
Binoküler mikroskop	Olympus CXX41
Otomatik mikropipet seti	Ependorf
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Vorteks	VWR
Mikrodalga fırın	Arçelik
Akış sitometrisi	Muse

Deneyley aşamasında kullanılan sarf malzemelere dair bilgiler Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Laboratuvarıda kullanılan sarf malzeme listesi.

Kullanılan sarf malzemeler	Marka
Steril kültür kapları (Petri/flask)	Nest
Hücre kültür flaskları (75 cm ²)	Nest
Hücre kültür flaskları (25 cm ²)	Orange scientific
Hücre kültür plakaları (96 kuyulu)	Nest
Hücre kültür plakaları (6 kuyulu)	Nest
Hücre kültür plakaları (24 kuyulu)	Nest
Cell scraper	Biologix
Steril filtre ucu (0,45 µm)	Sarstedt
Santrifüj tüpü (15 ml)	Isolab
Santrifüj tüpü (50 ml)	Isolab
Pipet uçları	Isolab
Kriyovial (2 ml)	Isolab
Pastör pipeti	Marienfeld
Tek kullanımlık serolojik pipet (5ml)	Sarstedt
Tek kullanımlık serolojik pipet (10ml)	Sarstedt
Tek kullanımlık serolojik pipet (25ml)	Sarstedt
Tek kullanımlık serolojik pipet (50ml)	Sarstedt
Pipetör	Labcon
Matrigel Invasion Chamber	BD Biosciences

Deneyley aşamasında kullanılan kimyasal malzemelere dair bilgiler Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Laboratuvarıda kullanılan kimyasalların listesi.

Kullanılan kimyasallar	Marka
Agaroz	Peqlab
Asetik asit	Thermo
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma
DMEM besiyeri	Thermo
DNA marker	Thermo
Metanol	Sigma
Etidyum bromür	Sigma
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Ambresco
Sıcaklık ile inaktive edilmiş FBS	Capricorn
Gliserol	Merck millipore
Hidrojen peroksit	Thermo
Hidroklorik asit (HCl)	Thermo
FBS (inaktif)	Thermo
Metanol	Thermo
Tuzlu fosfat tamponu (PBS)	Capricorn
Penisilin/streptomisin	Capricorn
Primerler	Alfa DNA
Proteinaz K	Sigma
Folin Ciocalteu	VWR
DPPH	Sigma
Trizol	VWR Amresco
Dnase I (Rnase-free)	Thermo
Tripsin-EDTA	Sigma
Tris	Ambresco
Tween 20	Thermo
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma
PRMI-1640 Medium (L-glutamine+25mM HEPES)	Sigma
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Biowest
Nuclease-free steril su	Sigma
Penisilin/streptomisin solüsyonu	Capricorn
L-Glutamin	VWR
Human TNF-α	Sigma

Deneysel aşamalarında kullanılan ticari kitlere dair bilgiler Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.4. Laboratuvarında kullanılan kitler.

Kullanılan kitler	Marka
XTT Cell proliferation kit	Biological Industries
Matrigel invazyon chamber (24 well plate)	Corning
First strand cDNA sentez kiti	Biorad
EvaGreen qPCR Master Mix	Abm
Human NF-kB ELISA kit	Elabscience
Human IL-6 ELISA kit	Elabscience
Human IL-8 ELISA kit	Elabscience
Human IL-10 ELISA kit	Elabscience
DeadEnd colorimetric tunel System	Promega
Annexin V & dead cell kit	Muse™

3.2. Bitkinin Temini ve Numunelerin Hazırlanışı

L.orientalis balsamı, yaprak ve meyvesi T.C. Orman Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü, Devlet Orman İşletmesi Muğla Müdürlüğü’nden temin edilmiştir. Örnek numuneler Gazi Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof.Dr. Zeki AYTAÇ tarafından teşhis edilmiş ve Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü herbaryumunda kayıt altına alınmıştır.

L.orientalis meyve ve yaprakları güneş görmeyen serin bir yerde kurutulmuş ve toz edilmiştir.

3.3. Ekstraksiyon

3.3.1. Balsam

Ayrıma hunisi içerisine 166.56 g *L.orientalis* balsamı üzerine 500 ml metanol konularak 1 gece bekletilmiştir. Üzerine (1:1 h/h) oranında dH₂O eklenerek ekstre edilmiş ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Daha sonra bu karışım üzerine 10 kez 300 ml kloroform ilave edilerek ekstre edilmiştir. Kloroform ekstresi alçak basınç altında ve düşük sıcaklıkta (40°C) rotavapor kullanılarak kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. Kalan sulu metanollü faz da yine rotavapor kullanılarak yoğunlaştırılmıştır. Balsam

ve balsamdan elde edilen ekstreler *in vitro* aktivite deneylerinde kullanılıncaya kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.3.2. Yaprak

184.56 g’lık yaprak ve 145.18 g’lık meyve örnekleri 3 farklı polariteye sahip çözücü (*n*-hekzan, etil asetat ve metanol) kullanılarak ekstre edilmiştir. İlk olarak kurutulmuş ve toz edilmiş yapraklar tartıldıktan sonra sırasıyla, *n*-hekzan (2.5 L x 6); etil asetat (2.5 L x 6) ve metanol (2.5 L x 6) ile ekstre edilmiştir. Ekstreler süzildükten sonra, rotavapor kullanılarak düşük sıcaklıkta (40°C) yoğunlaştırılmıştır.

3.3.3. Meyve

145.18 g meyve tartılarak sırasıyla, *n*-hekzan (2.5 L x 6); etil asetat (2.5 L x 6) ve metanol (2.5 L x 6) ile ekstre edilmiştir. Ekstreler süzildükten sonra, rotavapor kullanılarak düşük sıcaklıkta (40°C) yoğunlaştırılmıştır.

3.3.4. Sabit Tartım

Rotavaporda distillenen ekstreler darası alınmış flakon içerisine alınarak kurumaya bırakılmıştır. Tamamen kurutulan ekstreler 50 °C’de etüv içerisine konulmuştur. Etüvde 1 saat ara ile kurutulan ekstreler tahta maşa ile alınarak desikatörde soğutulduktan sonra tartılmıştır. Sabit tartıma gelinceye kadar işleme devam edilmiştir.

3.4. Ekstreler Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Analizler

3.4.1. *L.orientalis*’in Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

L.orientalis’in 8 farklı ekstresine ait fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edilmiştir (Singleton ve ark., 1999). Yöntemin temeli fosfotungstik ve fosfomolibdik asitlerden oluşan FCR’nin fenolik bileşikler ile sadece bazik ortamda reaksiyon vererek mavi renkli kompleksler oluşturmasına dayanmaktadır (Ainsworth ve Gillespie, 2007). Reaksiyon sonucunda oluşan bu renkli bileşik fenolik madde miktarıyla doğru orantılıdır.

L.orientalis’e ait *n*-hekzan, etil asetat, metanol ve kloroform ekstrelerinden 10 mg/ml konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden 100 µl

alınarak üzerine 250 µl FCR reaktifi (2.0 N) eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Üzerine 750 µl % 20'lik Na₂CO₃ (Sigma) çözeltisi ilave edilerek hacmi 10 ml'ye dH₂O ile tamamlanmıştır. 25 °C'de su banyosunda 2 saat bekletilmiştir. Sürenin sonunda UV spektrofotometrede 760 nm dalga boyundaki absorbansları kontrole karşı okunmuştur. Analizler üç tekrarlı olarak yürütülmüş ve sonuçlar ortalama±standart sapma değerleri olarak ifade edilmiştir.

Gallik asit için ise; 5 mg/ml'lik stok çözeltisi hazırlanarak 50-500 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlar için seyreltmeler yapılmıştır. Sonrasındaki işlemler örneklerde olduğu gibidir. Toplam fenolik madde sonuçları gallik asit standart grafiğinden elde edilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Toplam fenolik içerik formülü: mg GAE (Gallik asit eşdeğeri)/g kuru ekstre ağırlık = [(Abs (örnek) - Abs (örnek kör)) - Abs (kör)]/eğim X DF

3.4.2. *L.orientalis*'in Toplam Flavonoit İçeriğinin Belirlenmesi

L.orientalis'e ait tüm ekstrelerin toplam flavonoit içeriği; Moreno ve ark. (2000)'nin yapmış olduğu alüminyum klorür (AlCl₃) kolorimetrik metoduna göre belirlenmiştir. Yöntemin prensibi, AlCl₃, C-4 keto grupları ve flavonlar ve flavonollerin ya C-3 ya da C-5 hidroksil grupları ile asit stabil kompleksler oluşturması ve ek olarak, flavonoidlerin A veya B halkasında ortodihidroksil gruplarıyla asit kararsız kompleksler oluşturmasıdır (Bag ve ark., 2015).

10 mg ekstre tartılarak 5 ml metanolde çözdürülmüştür. Ayrı bir tüpün içerisinde 2.8 ml dH₂O, 0.1 ml potasyum asetat (CH₃CO₂K), 0.1 ml AlCl₃ ve 1.5 ml metanol ilave edilerek hacmi metanollü ekstre ile 5 ml'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında en az 30 dakika bekletildikten sonra absorbansı, UV spektrofotometre kullanılarak 415 nm'de köre karşı ölçülmüştür. Sonuçlar, kersetin standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Analizler üç tekrarlı olarak yürütülmüş ve sonuçlar ortalama±standart sapma değerleri şeklinde verilmiştir.

Toplam flavonoit içerik formülü: mg QE/g kuru ekstre ağırlık = [(Abs (örnek) - Abs (örnek kör)) - Abs (kör)]/eğim X DF

3.4.3. Kromatografik Analiz

Kromatografik ayırım; Agilent Dual Jet Stream elektrosprey iyonizasyon (Dual AJS ESI) arayüzü ile donatılmış bir Agilent 6550 iFunnel yüksek çözünürlüklü Kesin Kütle QTOF-MS kullanılarak yürütülmüştür. Poroshell 120 EC-C18 (3.0X50 mm, parçacık boyutu 2.7 µM) (Agilent) kolonu bileşikleri ayırmak için tercih edilmiştir. Mobil fazlar Tablo 3.5’de verilen basamaklara dayanan gradient kullanılarak, su ve % 0.1 formik asit karışımı mobil faz A ve asetone nitril mobil faz B olarak uygulanmıştır. Kolon 30 °C’de tutulmuş, enjekte edilen örnek hacmi 2 µl ve kullanılan akış oranı 0.5 ml/dak olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.5. Gradient koşulları.

Süre (dakika)	Mobil faz
0	% 5 B
5	% 62 B
10	% 68 B
19	% 80 B
34	% 95 B
37	% 5 B
5	Şartlanma döngüsü

MS analizi, kurutucu gaz akışı 14.0 L/dk; nebulözör gaz basıncı 35 psi; kurutucu gaz sıcaklığı 290 °C; sheath gaz sıcaklığı 400 °C; sheath gaz akışı 12 L/dak azotta pozitif iyonda çalışılmıştır. Kütle spektrumları, 50-1700 m/z’lik bir kütle aralığında negatif iyonizasyon modunda kaydedilmiştir.

Entegrasyon ve veri detaylandırma “MassHunter Workstation” yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Agilent METLIN Metabolomiks veritabanı ve kütüphanesi ve tam kütle kişisel bileşik veri tabanı ve kütüphanesi (METLIN_AM_PCDL) analitleri tanımlamada kullanılmıştır.

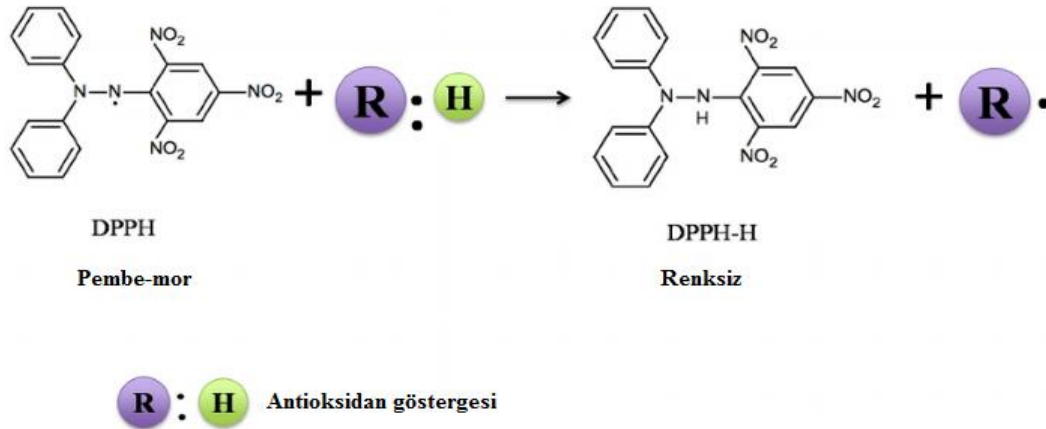
3.5. Biyolojik Aktivite Tayinleri

3.5.1. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

L.orientalis’e ait tüm ekstraların antioksidan aktivitesi; 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi ile belirlenmiştir. DPPH’in süpürücü aktivitesi, Blois ve ark. (1958) tarafından ortaya konulan yöntem baz alınarak saptanmıştır (Şekil 3.1). Azot köprüsünde eşleşmemiş bir elektron taşınması nedeniyle, DPPH kararlı bir

serbest radikalidir. Yöntemin prensibi mor renkli DPPH çözeltisinin bir H⁺ alıcısı ile karıştırıldığında, radikal olmayan soluk renkli indirgenmiş forma dönüşmesi ve bu renk dönüşümünün de 517 nm dalga boyunda UV spektrofotometre ile ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Chen ve ark., 2013).

DPPH radikali 5 mg tartılarak 100 ml metanolde çözülmüş ve etrafi alüminyum folyo ile sarılmıştır. Solüsyon her defasında günlük olarak hazırlanmıştır. 0.01 gr ekstre tartılarak 10 ml metanolde çözülmüştür. Hazırlanan bu 1 mg/ml stok çözeltiden 6 farklı konsantrasyonda (50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml, 250 µg/ml ve 300 µg/ml) dilüsyonlar hazırlanmıştır. Tüplere önce 100 µl istenilen konsantrasyondaki ekstreler konulmuş ve üzeri 3 ml'ye DPPH çözeltisi ile tamamlanmıştır. Hazırlanan tüpler 30 dk boyunca karanlık bir yerde ve oda sıcaklığında bırakılmıştır. Süre sonunda örneklerin absorbansları 517 nm'de ölçülmüştür. Kontrol kuyusu olarak metanol kullanılmıştır ve diğer şartlar aynı olacak şekilde üzerine DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. Standart madde olarak ise aynı konsantrasyon ve şartlarda L-askorbik asit hazırlanmış ve absorbansı ölçülerek regresyon grafiği çizdirilmiştir. Örneklerin antioksidan aktiviteleri L-askorbik asit'e eşdeğer olarak hesaplanmıştır (Wang ve ark., 2010).



Şekil 3.1. DPPH reaksiyon mekanizması (R:H; antioksidan radikal süpürücü, R; antioksidan radikali) (Liang ve Kitts, 2014).

Antioksidan aktivite, DPPH radikalinin süpürücü etkisinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir:

$$\text{Süpürücü aktivite yüzdesi \%} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

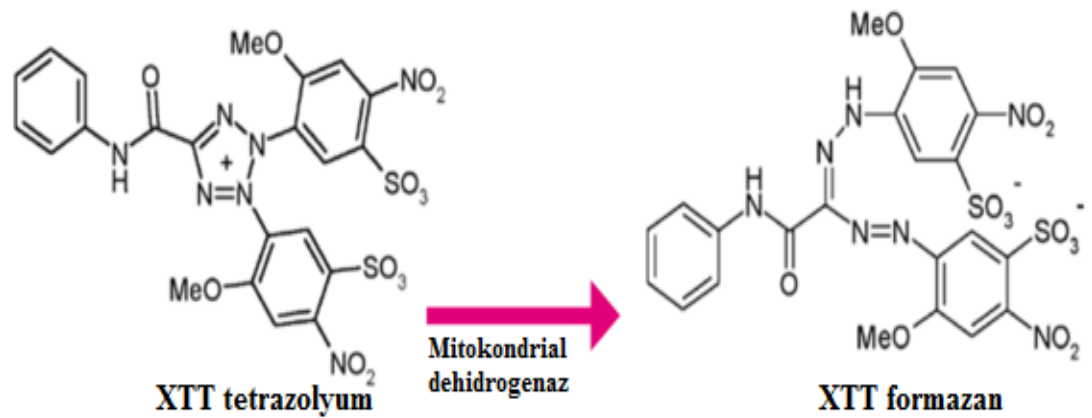
A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı (Test edilmeyen DPPH solüsyonu)

$A_{\text{örnek}}$ = Deney numunesinin absorbansı (DPPH solüsyonu + ekstre)

3.5.2. Anti-proliferatif Etkinin Belirlenmesi

HT-29 ve HCT-116 hücrelerinde *L.orientalis* ekstralarının anti-proliferatif etkileri, üretici firmanın talimatlarına göre “Hücre Proliferasyon XTT Kiti” (Cell Proliferation XTT Kit Biological Industries) kullanılarak araştırılmıştır.

Hücre proliferasyonu, metabolik olarak aktif olan hücrelerde mitokondrial süksinat tetrazolyum redüktaz sisteminin, sarı renkli XTT tetrazolyum tuzunu turuncu renkli formazan bileşiklerine indirgenme özelliğine dayanır (Şekil 3.5). Test toksik maruziyet sonrası sağkalım hücrelerini gösterir. Canlı hücreler tarafından üretilen çözünür formazanın absorbansı 450 nm’de ELISA okuyucu kullanılarak kolaylıkla nicelleştirilebilir. Referans dalga boyu olarak 630 nm kullanılmıştır. Her bir doz 3 tekrarlı çalışılmıştır (Sukhramani ve ark., 2011).



Şekil 3.2. XTT tetrazolyumun XTT formazana indirgenmesi

(https://www.applichem.com/fileadmin/Service/Downloads_en/Proliferation_e_Applications_No12_150dpi_Webversion.pdf).

1. 96 kuyulu plakalara her kuyuda 5000 hücre olacak şekilde 100'er µl HT-29 ve HCT-116 hücresi ekilmiştir.

2. Hücrelerin yapışması için 37 °C’de CO₂ inkübatöründe 24 saat inkübe edilmiştir.

Süre sonunda hücrelerin yapışıp yapışmadıkları mikroskop altında incelenmiştir.

3. Uygun doluluğa ulaştıklarından emin olduktan sonra kuyulardaki besiyerleri aspire edilmiş, 100 µl taze besiyeri ile hazırlanmış ekstraların tüm konsantrasyonları her bir kuyuya eklenmiştir.

4. Hücreler ekstrelerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çalışma solüsyonları ile ayrı ayrı muamele edilmiştir (Şekil 3.6).

5. İşlemlerden sonra, hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübasyon için bırakılmıştır.

6. İnkübasyondan sonra, 96 kuyulu plakada kullanılacak kuyu sayısı başına; 100 µl besiyeri, 50 µl XTT reaktifi ve toplamda gereken XTT reaktif miktarının 1:100'ü kadar aktivasyon solüsyonu eklenmiştir.

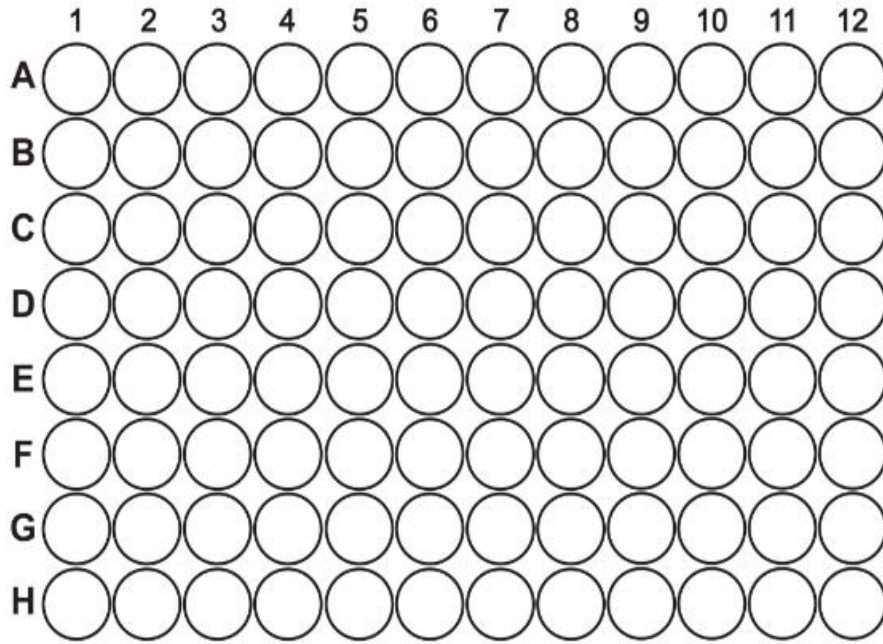
7. Her kuyuya 150 µl solüsyon karışımından ilave edildikten sonra plakalar 37 °C'de CO₂ inkübatöründe 4 saat süreyle inkübe edilmiştir.

8. ELISA plaka okuyucu ile 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında numunelerin emilimi ölçülmüştür.

9. Hücre canlılığı yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

% Hücre canlılığı = [Abs (ekstre uygulanan hücre) – Abs (hücresiz besiyeri)]/[Abs (ekstre uygulanmayan hücre) – Abs (hücresiz besiyeri)] x 100

10. Elde edilen sonuçlara göre, IC₅₀ (canlılığı % 50 azaltmak için gereken konsantrasyon) değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. XTT testlerinin 96 kuyulu plaklardaki düzeninin gösterimi (B2-D2;1.doz, B3-D3;2.doz, B4-D4; 3.doz, B5-D5;4.doz, B6-D6; 5.doz, B7-D7; 6.doz; B8-D8; 7.doz, B10-D10;blank; B11-D11;negatif kontrol.

3.5.3. Hücre Kültürü

3.5.3.1. HCT-116 ve HT-29 Hücre Hattı Temini

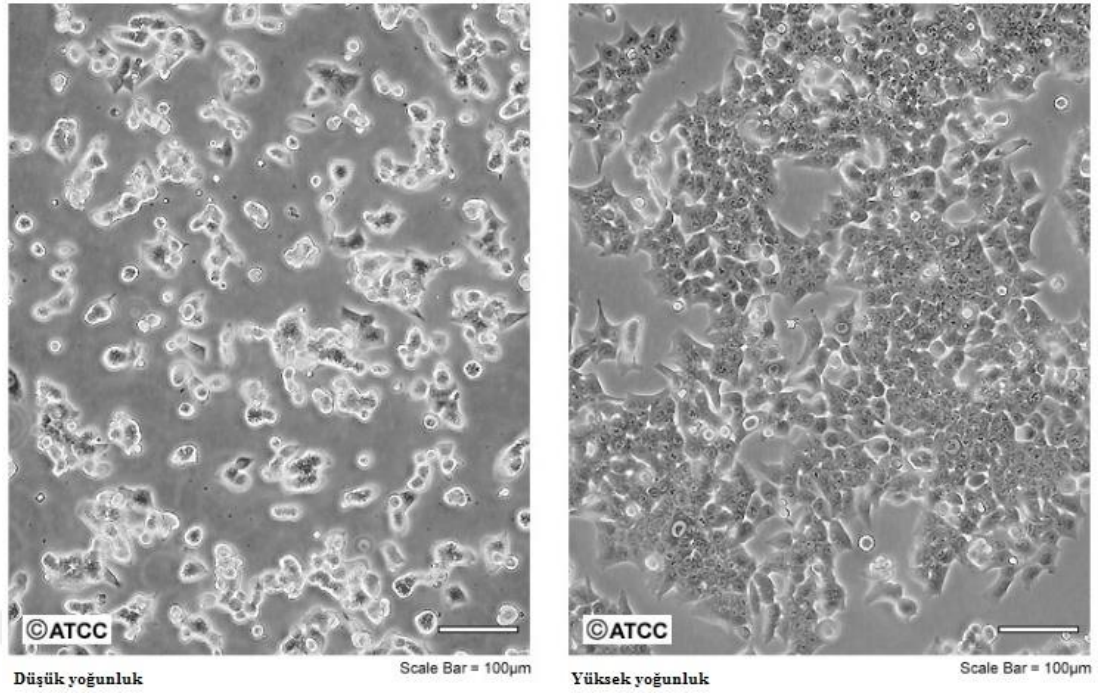
Çalışmamızda, insan kolon karsinoma hücre hatları olan HCT-116 hücreleri Doç. Dr. Abdullah YALÇIN'ın, HT-29 hücreleri ise Prof. Dr. Engin ULUKAYA'nın laboatuvarlarından sağlanmıştır (Şekil 3.2 ve 3.3).

3.5.3.2. Hücre İnkübasyon Koşulları

HCT-116 hücreleri % 10 fetal sığır serumu (FBS), 100 UI/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin içeren yüksek glukozlu DMEM besiyeri içinde, HT-29 hücreleri ise % 10 fetal sığır serumu (FBS), 100 UI/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde kültüre alınmıştır. Kültürler 37 °C'de, % 5 karbondioksit (CO₂) ve % 95 nem içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları Sınıf II Güvenlik Kabini'nde yapılmıştır. Her gün inverted mikroskop altında büyümeleri kontrol edilerek 2-3 gün süre ile besiyerleri yenilenmiştir.

3.5.3.3. HCT-116 Hücre Morfolojisi ve Özellikleri

HCT-116 hücre hattı, 1981 yılında Brattain ve ark. tarafından kolorektal adenokarsinoma olan bir erkekte alınmış ve üretilmiştir (Amerikan Doku Kültürü Koleksiyonu-ATCC 2014). Epitel benzeri küçük hücre morfolojisine sahip olan bu hücre hattı, transforme edici büyüme faktörü beta-1 (TGFβ-1) ve transforme edici büyüme faktörü beta-2 (TGFβ-2) genlerini yüksek düzeyde eksprese etmesinin yanında ras geninde de mutasyon taşımaktadırlar (Brattain ve ark., 1982).

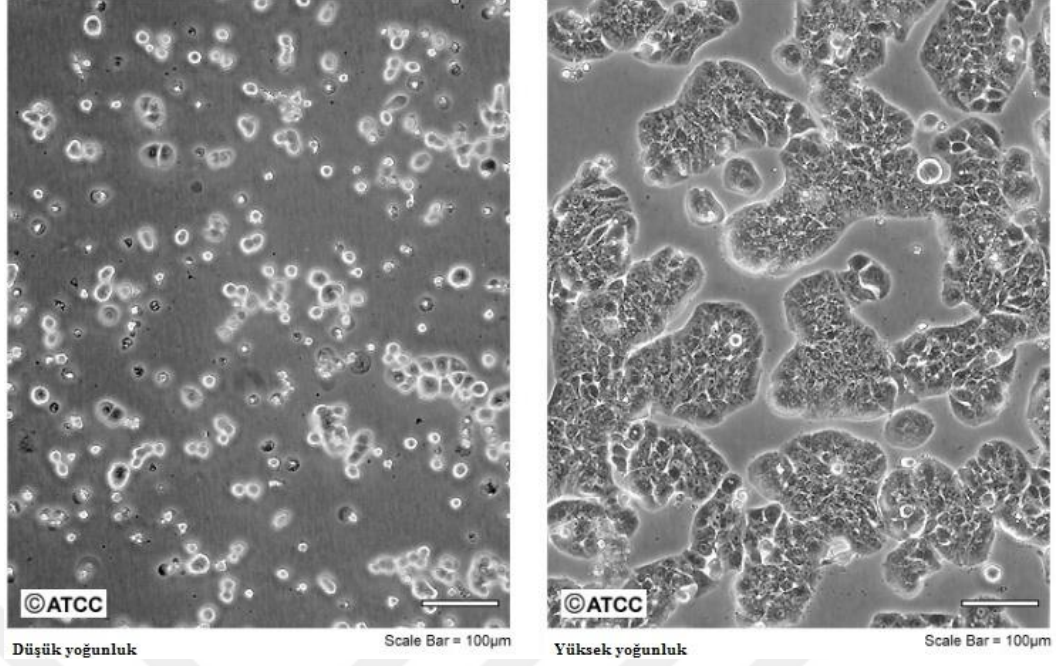


Şekil 3.4. HCT-116 Hücre Hattı Morfolojisi (ATCC).

3.5.3.4. HT-29 Hücre Morfolojisi ve Özellikleri

HT-29 hücreleri; kolorektal adenokarsinomlu 44 yaşında Kafkas bir kadından izole edilmiştir (Amerikan Doku Kültürü Koleksiyonu-ATCC 2014). HT-29 hücreleri, diğer kolorektal kanser hücre hatlarına göre genellikle daha az metastatik olarak kabul edilir (Haier, 1999). HT-29 hücreleri kendiliğinden enterositik farklılaşmaya uğramazlar induksiyon için glukoz içermeyen bir besiyeri gerekir (Zweibaum ve ark., 1985).

Bu hücreler epitel benzeri bir morfolojiye sahip olup; tümör baskılayıcı olarak bilinen p53 geninde mutasyon taşıdıkları için mutant p53 proteini üretirler. Ayrıca abl, ros ve src genlerini içermezler ve cmyc, KRAS, HRAS, NRAS, myb ve fos gibi çeşitli onkogenleri ise eksprese ederler (Trainer ve ark., 1988; He ve ark., 2015).



Şekil 3.5. HT-29 Hücre Hattı Morfolojisi (ATCC).

3.5.3.5. Hücrenin Çözdürülmesi

1. -80 °C'den çıkartılan kriyovialler içerisindeki hücreler hemen 37 °C su banyosunda çözülmüştür.

2. Dondurulma esnasında kullanılan DMSO'nun hücreler üzerindeki canlılığı azaltıcı etkisini azaltmak için kriyoviallere hemen besiyeri eklenmiştir. Besiyeri ile hücreler nazikce pipetlenmiş ve hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır.

3. Hücrelerin üzerine yaklaşık 10 ml besiyeri ilave edilmiş ve 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiştir.

4. Hücrelerin üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 6.5 ml taze besiyeri ilave edilerek hücre ve besiyeri iyice pipetajlanmıştır.

5. Hücreler T25 hücre kültür flaskına aktarılmıştır. Kültüre edilen hücreler 37 °C'de CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

6. Hücrelerin flask yüzeyinde kapladıkları alan mikroskop ile kontrol edilmiştir.

3.5.3.6. Hücrenin Dondurulması

1. Hücreler % 80-90 konfluent olduğunda, T25 flask içindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler, 1 ml Tripsin-EDTA kullanılarak yüzeyden kaldırılmışlardır.

2. Hücreler 1500 rpm'de 4 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Üstte kalan kısım atılarak, pelleti 1 ml besiyeri ile sulandırılmıştır.

3. Kriyovial tüplere 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO) ve 900 µl hücre medyumu ile süspanse edilen hücre solüsyonu eklenmiş ve hemen -20 °C'ye konulmuştur

4. 1 gün sonra -80 °C'ye kaldırılmıştır.

3.5.3.7. Hücrenin Pasajlanması

1. T25 flasklara 6.5 ml besiyeri ilave edilmiş olan HT-29 ve HCT-116 hücreleri, 37 °C'de % 95 nem içeren % 5 CO₂'li inkübatörde 2-3 gün süre ile mikroskopta çoğalmaları kontrol edildikten sonra taze besiyeri ilave edilerek pasajlanması için hazır hale getirilmiştir.

2. Hücreler % 80-90 konfluent oldukları kontrol edildikten sonra, T25 flask içindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler, 3 ml fosfat tamponlu tuz (PBS) ile yıkanmıştır.

3. Flaskın her tarafında PBS'in temas etmesi sağlandıktan sonra, yapışan hücrelere zarar vermeden PBS pastör pipeti ile aspire edilmiştir. Her iki hücre hattı için de tripsin flaska eklenerek 1-2 dakika boyunca 37 °C'de CO₂ inkübatörüne konulmuştur.

4. Süre sonunda hücrelerin flask tabanından kalkma durumları kontrol edilmiştir. Tamamen kalktıklarından emin olunduktan sonra tripsinin inaktivasyonu için flaska 4 ml taze besiyeri ilave edilmiştir.

5. Serolojik pipet yardımıyla tüm flask içeriği dikkatlice 15 ml'lik falkon tüpe konulmuştur. 1500 rpm'de 4 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.

6. Süre sonunda süpernatant uzaklaştırılmış, üzerinde taze besiyeri eklenerek hücre pelleti çözdürülmüştür.

7. İstenilen hücre yoğunluğuna göre taze besiyeri ile homojen hale getirilen hücreler T25 flaska ekilmiştir.

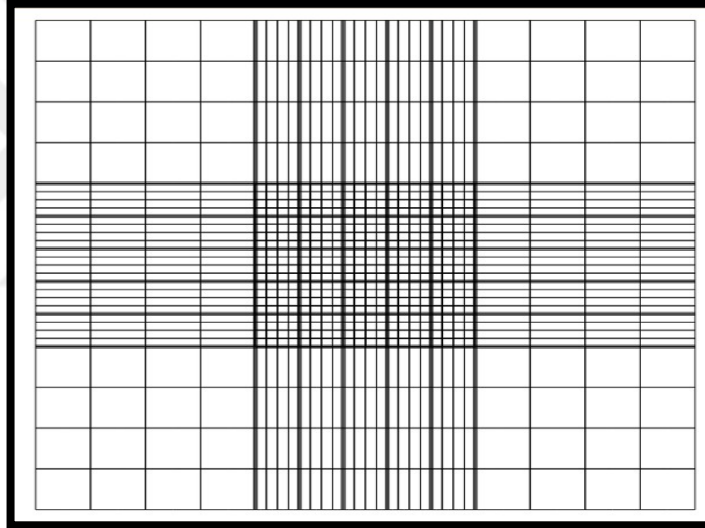
3.5.3.8. Hücre Sayımı

T25 flasklarındaki hücreler tripsinize edildikten sonra, hücrelerin iyice homojenize olmaları sağlanmıştır. 50 µl hücre süspansiyonu 50 µl tripan mavisi ile karıştırılmıştır. Hücre sayımı, ışık mikroskobu altında hemositometre lamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Hemositometre laminın her iki tarafına 13'er µl hücre ve tripan mavisi karışımı enjekte edilmiştir. Hücreler sayıldıktan sonra, iki odacık ortalaması alınmış ve ml başına hücre sayısı aşağıdaki gibi hesaplanmıştır;

$$\text{Hücre sayısı/ml} = \text{İki odacığın ortalama hücre sayısı} \times \text{DF} \times 10^4$$

(DF = Trypan mavisi ile yapılan dilüsyon faktörü)

(10^4 = Hemositometre boyutlarından hesaplanan faktör)



Şekil 3.6. Hemositometre lamına ait bir odacık.

3.6. Ekstrelerin Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

L.orientalis'e ait tüm ekstrelerin HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarının proliferasyonu üzerine sitotoksik etkisi XTT metodu ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, *L.orientalis* balsam kloroform ekstresi 4 mg tartılarak, 50 µl % 0.1 DMSO içerisinde çözdürülmüş ve ardından hacmi besiyeri ile 5 ml'ye tamamlanmıştır. Stok çalışma solüsyonundan 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml ve 750 µg/ml olacak şekilde farklı konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Diğer ekstreler için ise 50 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml,

750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1250 µg/ml ve 1500 µg/ml arasındaki konsantrasyonlar stok çalışma solüsyonu seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.7. Gen Ekspresyon Analizi

XTT testi ve kromatografik analiz sonrası *L.orientalis*'ten elde edilen 8 farklı ekstre içerisinde hem HCT-116 hem de HT-29 hücre hatlarında en toksik etkili olan yaprak metanol ekstresi seçilerek morfolojik, transkripsiyonel ve translasyonel seviyede detaylı olarak mekanizması araştırılmıştır. Gen ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin analizi için RT-PZR (Biorad CFX Connect) kullanılmıştır.

3.7.1. HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinden Trizol İle Total RNA İzolasyonu

1. 6 kuyulu plakalara her bir kuyuda 5×10^5 hücre olacak şekilde hücreler ekilmiştir. 24 saatin sonunda hücreler mikroskop altında kontrol edilmiştir.

2. Kontrol kuyusundaki besiyeri aspire edilerek taze besiyeri eklenmiş, doz uygulanan kuyu için ise mevcut besiyeri uzaklaştırılarak madde içeren besiyeri ile yenilenmiştir. Hücreler 37 °C'de CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3. Süre sonunda her bir kuyucuğa 500 µl trizol konularak 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra kuyucuklar hücre kazıyıcı ile kazınmıştır. Pipet yardımıyla kuyuların içeriği ependorf tüplerine aktarılmıştır.

4. Ependorfların üzerine 100 µl kloroform ilave edildikten sonra birkaç defa alt üst yapılarak 15 saniye vortekslenmiş ardından 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

5. Sonrasında 4 °C'de 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

6. Dikkatlice pipet yardımıyla en üstteki faz yüzeyden alınmış yeni bir ependorf tüpüne aktararak yavaş yavaş 500 µl izopropanol ilave edilerek alt üst yapılmıştır.

7. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra ependorfun dip kısmında pellet oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir. Pelletin üzerine 500 µl %70 EtOH ilave edilerek pelletin kalkması sağlanmıştır.

8. 4 °C'de 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak kalan etanol ependorf tüpünden uzaklaştırılmıştır.

9. 50 µl nukleaz içermeyen steril su (nuclease free water) eklenerek pellet çözdürülmüştür.

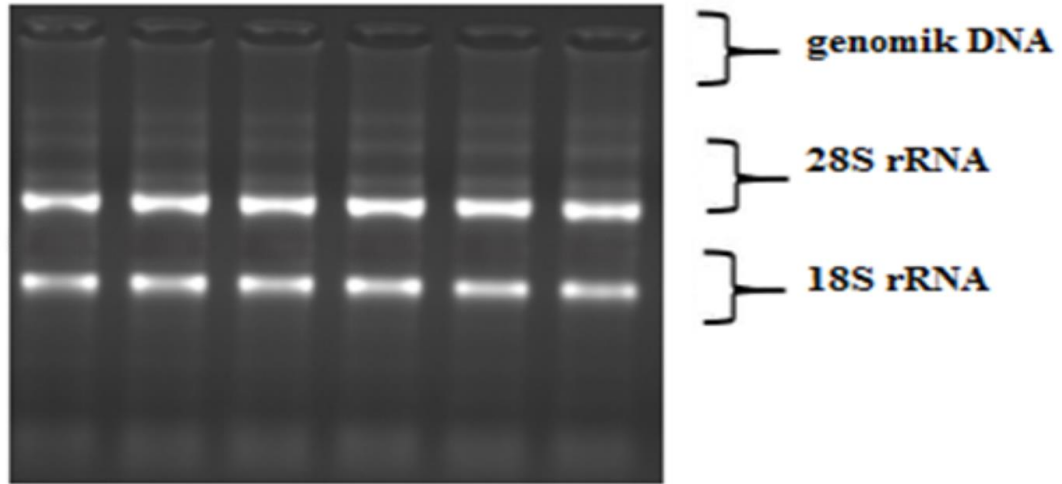
10. Tüm RNA'lar sonraki deneylerde kullanılmak üzere ağızları parafilmlelenerek -80 °C'de saklanmıştır.

3.7.2. RNA Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen RNA'ların fenol, protein ve genomik DNA kontaminasyonları hakkında bilgi edinmek için, 1 µl RNA numunesinin ng/µl cinsinden RNA konsantrasyonu (230, 260, 280 nm) nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür. A260/A280 için 2±0.1 arasında olan RNA örnekleri cDNA elde etmede kullanılmıştır.

3.7.3. İzole Edilen RNA'ların Jelde Yürütülerek Kalitesinin Belirlenmesi

Tüm izole edilen RNA'lar 0.1 µg/5µl alınarak, 1 µl jel yükleme boyası ile karıştırılmış ve % 1'lik agaroz jele yüklenerek 120 V'ta 40 dakika boyunca elektroforez yardımıyla yürütülmüştür. Süre sonunda 18S ve 28S rRNA'nın varlığı ve DNA kontaminasyonu olup olmadığı transilüminatör yardımıyla gözlenmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. İzole edilen RNA'ların kalitesini gösteren örnek jel görüntüsü.

3.7.4. DNaz Muamelesi ile Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması

DNA kontaminasyonundan emin olunmayan tüm örnekler için DNaz uygulaması üretici firmanın (Thermo Scientific, DNase, RNase-Free, Lot: 00297845) protokolüne göre yapılmıştır (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. DNaz uygulaması.

DNaz Uygulaması	Miktar
RNA	1 µg
10X Buffer (MgCl ₂)	1 µl
DNaz I	1 µl
DEPC Su	x µl
TOPLAM	10 µl

Tablo 3.6'da verilen miktarları içeren karışım vortekslenir. Kısa bir süre sonra 37 °C'de 30 dakika yarı kantitatif PZR'da inkübe edilmiştir. Süre sonunda üzerinde enzimatik reaksiyonu durdurmak için 1 µl 50 mM EDTA ilave edilerek, 65 °C'de 10 dakika daha yarı kantitatif PZR'da inkübasyona bırakılmıştır.

3.7.5. cDNA Sentezi

cDNA sentezine geçilmeden önce izole edilen tüm RNA'lar genomik DNA uzaklaştırılmasının ardından 1 µg olarak sabit bir miktara eşitlenmiştir. cDNA sentezi, iScript™ cDNA Sentez Kiti (BIORAD) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır (Tablo 3.7). Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra yarı kantitatif PZR'da (Peqlab); +25°C'de 5 dakika, +42°C'de 30 dakika, +85°C'de 5 dakika bekletilerek reaksiyon sonlandırılmıştır.

Tablo 3.7. cDNA sentez reaksiyonu.

Komponentler	Herbir reaksiyon hacmi
5X iScript reaksiyon mix	4 µl
iScript reverse transkriptaz	1 µl
Nukleaz free water	x µl
RNA tamplate	1µg
Toplam hacim	20 µl

3.7.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

3.7.6.1. NF-κB Yolağı Gen Ekspresyon Analizi

Gen ekspresyonlarının kantitatif analizinde, NF-κB sinyal yolağında bulunan ve sinyal ile ilişkili 88 gen ve 8 housekeeping gene özgü primer setlerini (Real Time Primers, LLC, Elkins Park, PA) içeren PZR paneli kullanılmıştır. 96 kuyulu plakalarda bulunan NF-κB sinyal yolağı genlerinin ve housekeeping genlerin listesi Tablo 3.8’de verilmiştir.

Çift iplikli DNA’ya bağlanabilen SyberGreen, interkalasyon ajanı olarak kullanılmıştır. Analiz sonucu değerler C_t olarak kaydedilmiştir. Negatif kontrol olarak cDNA içermeyen onun yerine aynı miktarda ddH₂O içeren karışım kullanılmıştır. Reaksiyon steril 8’li RT-PZR stripleri içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.8. NF-κB sinyal yolağı ile ilişkili genler.

Kuyu no	Gen	Tanımı
A1	AGT	Angiotensinogen
A2	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
A3	ATF1	Activating transcription factor 1
A4	BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10
A5	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
A6	BCL2L1	BCL2-like 1
A7	BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3
A8	BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2
A9	BIRC4	Baculoviral IAP repeat-containing 4
A10	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase
A11	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
A12	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
B1	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
B2	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
B3	CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
B4	CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
B5	CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte- macrophage)
B6	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
B7	EDARADD	EDAR-associated death domain
B8	EDG2	Lysophosphatidic acid receptor 1
B9	EGR1	Early growth response 1
B10	ELK1	ELK1, member of ETS oncogene family
B11	F2R	Coagulation factor II (thrombin) receptor
B12	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
C1	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
C2	FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene
C3	GJA1	Gap junction protein, alpha 1, 43kDa

C4	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1
C5	HTR2B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B
C6	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54)
C7	IFNA1	Interferon, alpha 1
C8	IFNAB1	Interferon, beta 1
C9	IFNG	Interferon, gamma
C10	IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta
C11	IKBKE	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon
C12	IKBKG	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma
D1	IL10	Interleukin 10
D2	IL12A	Interleukin 12A
D3	IL12B	Interleukin 12B
D4	IL1A	Interleukin 1, alpha
D5	IL1B	Interleukin 1, beta
D6	IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I
D7	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
D8	IL8	Interleukin 8
D9	IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
D10	IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2
D11	JUN	Jun oncogene
D12	LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
E1	LTB	Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
E2	LTBR	Lymphotoxin beta receptor
E3	MALT1	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
E4	MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
E5	MMP7	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)
E6	MMP9	Matrix metalloproteinase 9
E7	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)
E8	NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
E9	NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
E10	NLRP12	NLR family, pyrin domain containing 12
E11	NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
E12	PPM1A	Protein phosphatase 1A (formerly 2C), alpha isoform
F1	RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
F2	REL	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
F3	RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
F4	RELB	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
F5	RHOA	Ras homolog gene family, member A
F6	RIPK1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
F7	SELL	Selectin L
F8	SELP	Selectin P
F9	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1

F10	TBK1	TANK binding kinase 1
F11	TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1
F12	TICAM2	Toll-like receptor adaptor molecule 2
G1	TLR1	Toll-like receptor 1
G2	TLR2	Toll-like receptor 2
G3	TLR3	Toll-like receptor 3
G4	TLR4	Toll-like receptor 4
G5	TLR7	Toll-like receptor 7
G6	TLR8	Toll-like receptor 8
G7	TLR9	Toll-like receptor 9
G8	TMED4	Transmembran emp24 protein transport domain containing4
G9	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
G10	TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
G11	TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
G12	TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
H1	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
H2	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
H3	TNFSF15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15
H4	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
H5	ACTB	Actin, beta
H6	B2M	Beta-2-microglobulin
H7	GAPD	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
H8	GUSB	Glucuronidase, beta
H9	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H10	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
H11	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
H12	RPL13A	Ribosomal protein L13a

3.7.6.2. Apoptotik Gen Ekspresyonlarının Analizi

Apoptotik yolak ile ilişkili olan p53, Bcl-2, Bax, kaspaz 3, kaspaz 7, kaspaz 8, kaspaz 9, Cysc (sitokrom c) genlerinin kontrol ve doz grupları arasındaki ekspresyon farkları RT-PZR (BioRad CFX Connect) cihazında analiz edilmiştir. Hedef genlere ait primer dizileri Tablo 3.9'da görüldüğü gibidir.

Tablo 3.9. Apoptozla ilişkili genlere ait primer dizileri.

Gen	Kod	Baz uzunluğu (bp)	Dizisi (5'→3')	TM	% GC	Amplikon büyüklüğü
p53	F	22	GAGATGTTCCGAGAGCTGAATG	62	50	129
	R	20	TTTATGGCGGGAGGTAGACT	62	50	
Bcl-2	F	22	GTGGATGACTGAGTACCTGAAC	62	50	125
	R	21	GAGACAGCCAGGAGAAATCAA	62	47.6	
BAX	F	20	GGAGCTGCAGAGGATGATTG	62	55	151
	R	18	GGCCTTGAGCACCAGTTT	62	55.6	
CASP3	F	22	GAGCCATGGTGAAGAAGGAATA	62	45.5	162
	R	20	TCAATGCCACAGTCCAGTTC	62	50	
CASP7	F	22	CGAAACGGAACAGACAAAGATG	62	45.5	169
	R	20	TTAAGAGGATGCAGGCGAAG	62	50	
CASP8	F	21	GCCCAAACCTTCACAGCATTAG	62	47.6	160
	R	22	GTGGTCCATGAGTTGGTAGATT	62	45.5	
CASP9	F	19	CGACCTGACTGCCAAGAAA	62	52.6	153
	R	20	CATCCATCTGTGCCGTAGAC	62	55	
CYCS	F	23	GGAGAGGATACTGATGGAGTA	62	47.8	102
	R	21	GTCTGCCCTTCTTCTTCTTCTT	62	47.6	

3.7.6.3. RT-PZR Koşulları

Tablo 3.10’da görüldüğü gibi hazırlanan karışım 96 kuyulu mikroplakada hazır bulunan primerlerden reaksiyon başına gereken miktar mikroplakadan alınarak reaksiyon karışımına pipetlenmiştir. Genlerin ekspresyon seviyelerinin kantitatif analizi için RT-PZR cihazına konulmuştur.

Tablo 3.10. RT-PZR reaksiyon karışımının hazırlanması.

Komponentler	Hacim	Son konsantrasyon
EvaGreen 2X qPCR mastermix	5µl	1X
Primer	0.3µl	300 nM
Dilue cDNA	1 µl	
ddH ₂ O	3.7µl	
Toplam	10µl	

RT-PZR’da gerçekleştirilen denatürasyon, amplifikasyon ve soğuma aşamalarını içeren döngü profili Tablo 3.11’de gösterildiği gibidir.

Tablo 3.11. RT-PZR döngü profili.

	Sıcaklık (°C)		Süre	Döngü
Başlangıç denatürasyonu	95		4.00 dakika	1
Amplifikasyon	Denatürasyon	95	0.30 saniye	40
	Anneling	61.5	0.40 saniye	
	Extension	72	0.15 saniye	
Melting	72		10.00 dakika	1
	95		0.10 saniye	
	65		0.05 saniye	
	95		0.5 saniye	

3.8. Apoptozun Belirlenmesi

3.8.1. TUNEL Yöntemi

HücreSEL apoptozun belirlenmesi için TUNEL testi (DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System-Promega) üretici firmanın talimatlarına uyularak gerçekleştirilmiştir. Kromatin kondensasyonu, nuklear fragmentasyon ve apoptotik cisim oluşumu TUNEL testinde apoptozun belirlenmesinde kullanılan karakteristiklerdir. Apoptotik süreçte genomik DNA fragmentleri, çift zincirli DNA parçacıkları meydana getirir. Bu esnada genomik DNA'da oluşan tek zincir kırıkları (çentik) rekombinant bir terminal deoksinükleotidil transferaz (rTdT) enzimi aracılığıyla serbest haldeki 3-OH ucundaki işaretli dUTP'ye katalitik olarak eklenir ve apoptotik hücreleri saptar (Thani ve ark., 2014).

% 4 Metanolsüz Formaldehit Hazırlama: 100 ml formaldehit, 250 ml dH₂O'da çözdürülmüştür.

% 0.2 Triton X-100 Hazırlama: 10 ml Triton X-100, 90 ml PBS'de çözdürülmüştür. Bu stok solüsyondan 5 ml alınarak 245 ml PBS ile tamamlanmıştır.

% 0.3 H₂O₂ Hazırlama: % 30'luk 2.5 ml H₂O₂, 247.5 ml PBS içerisinde çözdürülmüştür.

Protokol

Deneye ait komponentler Tablo 3.12'de gösterildiği gibidir. Aşağıdaki protokolda verilen basamaklar sırayla uygulanmıştır.

1. Ependorf tüpün içinde 1.5×10^6 hücre olacak şekilde ekilen eksre uygulanmış hücre ve kontrol hücresi plakalardan kaldırılarak santrifüj edilmiştir.

2. 2 kez PBS ile yıkanarak resüspanse edilmiştir. Ardından Poly-L-Lysine kaplı lamlara damlatılmıştır.

3. Fiksasyon öncesi yaklaşık 15 dakika laminar kabin içinde kurutulmuştur.

4. Lamlar % 10 tamponlu formalin ya da % 4 metanolsüz formaldehit solüsyonuna daldırılarak 25 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.

5. Lamlar oda sıcaklığında 5 dakika boyunca PBS içerisinde hazırlanmış % 0.2 Triton X-100 solüsyonuna daldırılmıştır.

6. Her biri 5'er dakika olmak üzere 2 kez PBS ile yıkanmıştır.

7. Hücreler 100 µl equilibration buffer ile kaplandıktan sonra, oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletilmiştir.

8. Negatif kontrol için, 98 µl equilibration buffer tamponu, 1 µl biotinlenmiş nükleotid miksi ve 1 µl otoklavlanmış distile su karıştırılarak enzimsiz bir kontrol buffer'ı hazırlanmıştır.

9. Equilibrated alanların etrafı kurutma kağıdı ile kurulanmış, lam üzerindeki alanlara 100 µl rTdT reaksiyon miksi eklenmiştir.

Tablo 3.12. TUNEL testi komponentleri.

rTdT reaksiyon miksi	Reaksiyon sayısı* miktar
Equilibration buffer	98 µl
Biotinlenmiş nükleotid miksi	1 µl
rTdT enzim	1 µl

10. Reaktifin eşit dağılımını sağlamak için lamel ile alan kapatılmıştır. Slaytlar nemlendirilmiş bir bölme içinde 60 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir.

11. 20X SSC distile su ile 1:10 oranında dilüe edilmiştir. Lamel şaleye daldırılarak reaksiyon sonlandırılmıştır.

12. Lamaların her biri 5 dakika olmak üzere 3'er kez PBS içine batırılarak yıkanmıştır.

13. Endojen peroksidazları bloke etmek için PBS'li % 0.3'lük hidrojen peroksit içine lamalar daldırılmıştır.

14. PBS ile streptavidin HRP solüsyonu 1:500 oranında dilüe edilerek, her bir slayta 100 µl eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

16. Lamalar oda sıcaklığında 5'er dakika PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Deoksiaminobenzidin (DAB) komponentleri kullanımdan hemen önce hazırlanmıştır. Bunun için; 950 µl dH₂O içerisine 50 µl DAB substrat 20X tamponu ilave edilmiştir. Üzerine 50 µl DAB 20X kromojen ve 50 µl H₂O₂ eklenmiştir

17. Her bir lama 100 µl DAB solüsyonu eklenerek açık kahverengi bir zemin oluşana kadar beklenmiştir.

18. % 100 gliserol kullanarak preparat haline getirilmiştir.

19. Işık mikroskopunda görüntülenmiştir.

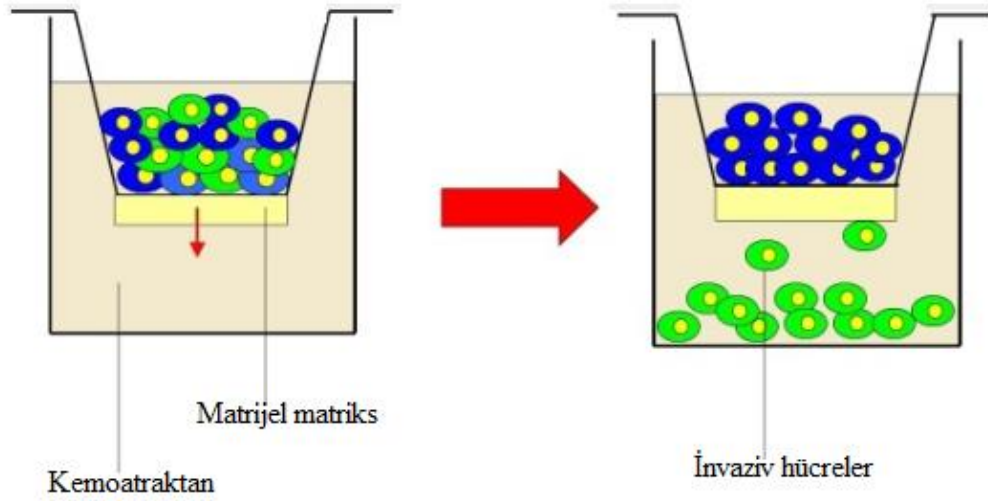
3.8.2. Akış Sitometrisi

Bir hücre popülasyonundaki apoptoz derecesi, hücre sağkalımının önemli bir parametresidir ve farklı morfolojik değişiklikler ile karakterize edilir. Apoptozu doğrulamak için Muse™ Annexin V & Dead Cell reagent kiti üretici firmanın talimatlarına göre Muse Cell Analyzer (Merck, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Testin prensibi; apoptotik yolağın başlangıcında hücre membranının dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserin (PS) moleküllerinin, Annexin V ile tanınarak erken ve geç apoptotik hücrelerin tespit edilmesi esasına dayanmaktadır (Khan ve ark., 2012). Ölü hücre belirteci olarak 7-ADD boyası ikinci bir boya olarak kullanılmıştır.

1. Muse™ Annexin V & Dead Cell reagent kiti kullanımdan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.
2. Her tüpe 100 µl hücre süspansiyonu eklenmiştir.
3. Her tüpe Muse™ Annexin V & Dead Cell reagent'tan 100 µl eklenmiştir.
4. 3-5 sn'ye besiyerli karışım pipetajlanmıştır.
5. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika boyanmıştır.

3.9. Hücre İnvazyonunun Belirlenmesi

in vitro ortamda invaziv özelliklerin değerlendirilmesini sağlayan test (Corning Biocoat™ Matrigel İnvasyon Chamber) üretici firmanın talimatlarına uyularak gerçekleştirilmiştir. 24 well plaka içerisindeki her bir kuyu, önceden kaplanmış 8.0 mikron çaplı gözenekler içeren bir membran ve bazal membran görevi gören matrijel matriks ile kaplıdır. Her bir kuyudaki matrijelin olduğu odacık içerisine serum içermeyen besiyerinde çözülmüş ekstre, kuyucuğun alt kısmına ise kemoatraktan olarak % 10 FBS içeren serumlu besiyeri ilave edilmiştir. Bu sayede invaziv karakterli hücreler matrijel matriks ve membran gözeneklerinden geçer. İnvaziv olmayan hücreler ise membrandan geçemez (Şekil 3.8) (Kramer ve ark., 2013). Deney basamakları maddeler halinde aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.8. İnvazyon deneyi için kullanılan odacıklar (Soncın ve ark., 2009).

1. Rehidrasyon

- 1.1. Ürün -20 °C'den çıkarılıp oda sıcaklığına getirilmiştir.
- 1.2. Odacıkların iç kısmına ve kuyuların tabanına 500'er µl 37 °C'de bikarbonatlı besiyeri eklenmiştir.
- 1.3. 2 saat 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde rehidrate edilmiştir.
- 1.4. Rehidrasyondan sonra, zar üzerindeki matriks tabakasını bozmadan besiyeri dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

Tablo 3.13. İnvazyon testi solüsyon hacimleri.

Solüsyon Hacimleri	24 kuyu
Rehidrasyon insert & kuyu	500 µl & 500 µl
Kuyu (Kemoatraktan)	750 µl
Hücre	500 µl
Boya	500 µl
Durulama	150 µl

2. İnvazyon

- 2.1. Plakanın boş kuyularına steril pens yardımı ile eşit sayıda kontrol odacıkları konulmuştur.
- 2.2. Hücre süspansiyonları 2.5x10⁵ hücre/ml (24 kuyu için) içecek şekilde hazırlanmıştır.
- 2.3. % 5 FBS içeren besiyeri yardımcı plakanın kuyularına eklenmiştir.
- 2.4. Chamber ve kontrol kuyuları, kemoatraktan içeren kuyulara steril pens yardımı ile aktarılmıştır.

2.5. Membran altında herhangi bir hava kabarcığı kalmadığına emin olunduktan sonra 500 µl hücre süspansiyonu 24'lük kuyulara eklenmiştir.

2.6. 37 °C'de % 5 CO₂'de 22 saat inkübe edilmiştir.

3. Hücre İnvazyonunun Ölçümü

3.1. İnvaze olmayan hücreler uzaklaştırılmıştır.

3.2. Hücrelerin boyanması: Fiksasyon için kuyulara % 100 metanol eklenerek 2 dakika beklenmiştir. Membranın alt yüzeyindeki hücreler hematoksilen boyası ile 2 dakika boyanmıştır. Boya fazlalığını uzaklaştırmak için 2 kez distile sudan geçirilmiş ve kuyular kurumaya bırakılmıştır (Tablo 3.13).

3.3. İnvaze hücrelerin sayılması: Membran bistüri ile kesilerek dikkatlice çıkarılmıştır. Lamın üzerinde 1 damla immersiyon yağı damlatılarak üzerinde membran konulmuş, lamel ile kapatılmıştır. İnvaze olan hücreler mikroskop altında fotoğraflanarak ZEN (ZEISS, Germany) programında sayılmıştır. Formüle göre invazyon yüzdesi hesaplanmıştır.

4. Data

Mikroskop altında görüntülenen ve fotoğraflanan 3 farklı alan ekstre ve kontrol membranları için sayılmıştır. İnvazyon yüzdesi aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

$$\text{İnvazyon Yüzdesi} = \frac{\text{İnvaze olan matriks membran hücre sayısı}}{\text{Kontrol membran hücre sayısı}} \times 100$$

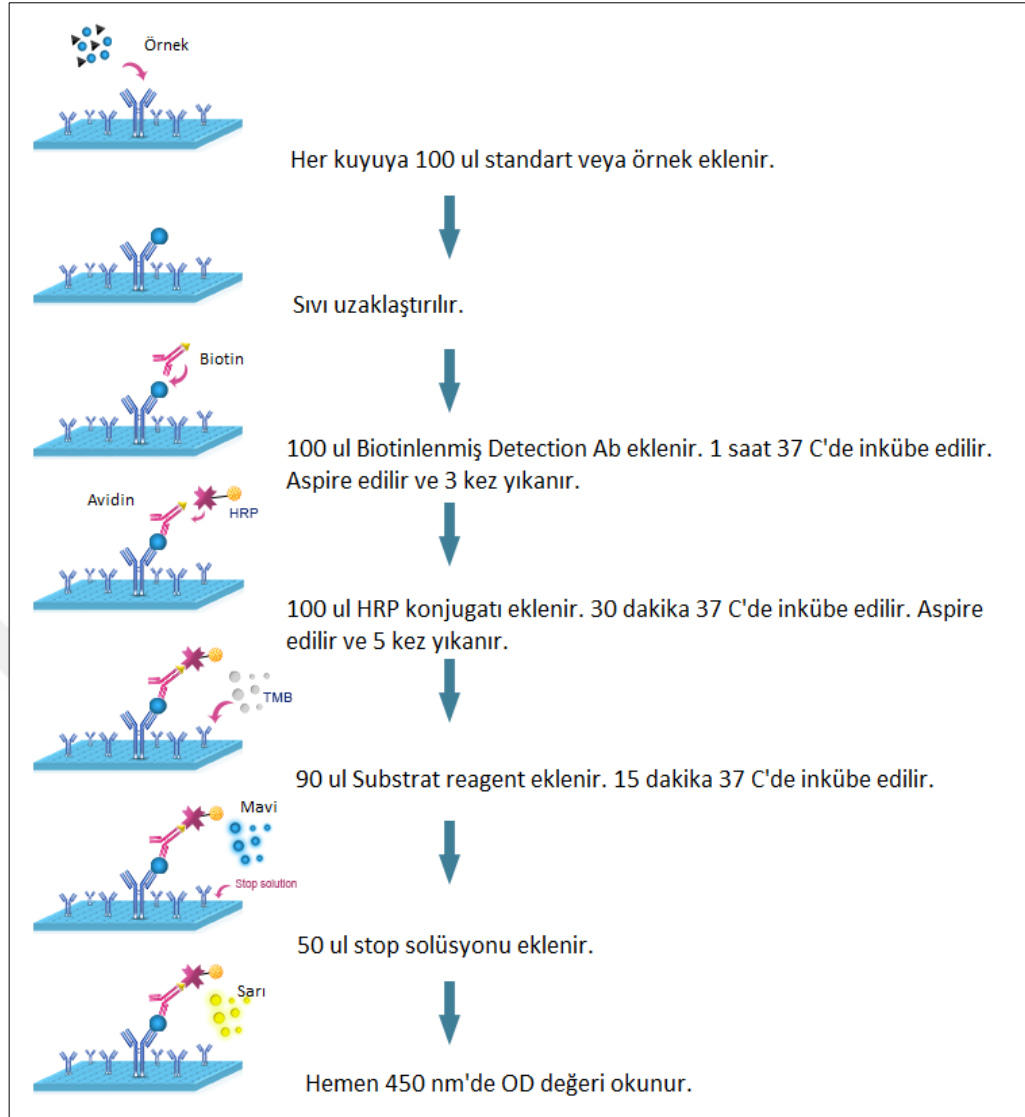
3.10. Protein Analizi

L.orientalis yaprak metanol ekstresinin anti-inflamatuvar etkinliğinin olup olmadığını değerlendirmek için HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarına TNF- α ile birlikte kontrol ve ekstrenin etkili dozu uygulanmış ve inflamatuvar sitokinlerin seviyeleri ELISA testi ile ölçülmüştür.

3.10.1. Enzim Bağlı İmmuno Sorbent Testi (ELISA)

Deneylerde kullanılan ELISA testleri 96'lı plakaların her bir kuyusuna teste zđ olan antikor ile önceden üretici firma tarafından kaplanmıştır. Standart ve numunelerin kuyulara eklenmesi ile antijen-antikor reaksiyonu gerçekleşir. Ardından enzime bağlı spesifik bir antikor her kuyuya ilave edilir ve son aşamada enzim ile sinyal haline dönüşebilen bir substrat eklenir. Sonlandırma solüsyonu eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır (Kumar ve ark., 2018). Optik yoğunluk (OD) ELISA plaka okuyucuda ölçülür (şekil 3.9).

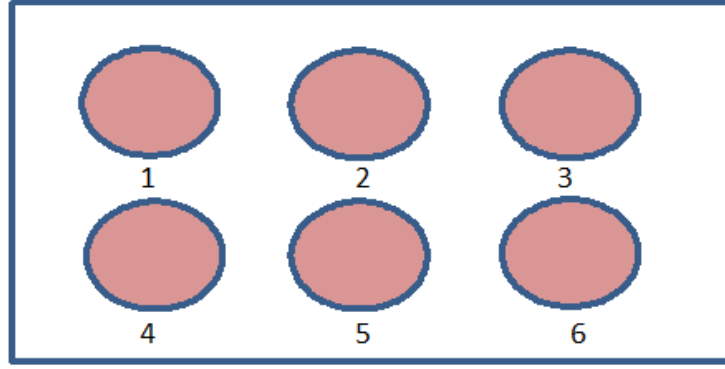
IL-6, IL-8 ve IL-10'un konsantrasyonlarını belirlemek için ticari ELISA kitleri (Elabscience) kullanılmıştır. Bunun için hücre hatları büyüme ortamlarından toplanan süpernatantlar deneylerde kullanılmışca kadar -80 ⁰C'de saklanmıştır. Deney sonrasında standart proteinin kalibrasyon eğrisi grafiği çizilerek hesaplanan formüle göre IL-6, IL-8 ve IL-10'un konsantrasyonları hesaplanmıştır.



Şekil 3.9. ELISA testi basamakları.

3.10.2. Anti-inflamatuvar Etkinin Belirlenmesi

1. Hücreler 6 kuyulu plakalara 1×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde kültüre edilmiştir.
2. 24 saat sonra hücrelerin çoğalma durumları kontrol edilmiştir.
3. Şekilde görüldüğü gibi uygulanan kuyulardaki hücreler 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.



1. ve 4. kuyular kontrol, 2. ve 5. kuyular TNF- α (20 ng/ml) ile birlikte madde eklenmiş, 3. ve 6. kuyu yalnızca madde eklenmiş kuyudur.
4. Süre sonunda hücre süpernatantları ependorfa alınmıştır.
5. Örnekler 3000 rpm'de (4 °C) 5 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Süpernatantlar ELISA testi için kullanılmaya kadar – 80 °C'ye kaldırılmıştır.

Stok TNF- α Solüsyonunun Hazırlanışı: 0.1 mg/ml'lık TNF- α (Sigma T6674) konsantrasyonu hazırlamak için, TNF- α üzerine 0.2 μ M'lık filtreden geçirilmiş 100 μ l dH₂O eklenir. Kullanımdan önce 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Stok solüsyon hazırlanması sonrasında küçük hacimlere bölünerek kısa süreli kullanım için – 20 °C'de saklanır.

3.10.2.1. IL-6 ELISA Kit Protokolü

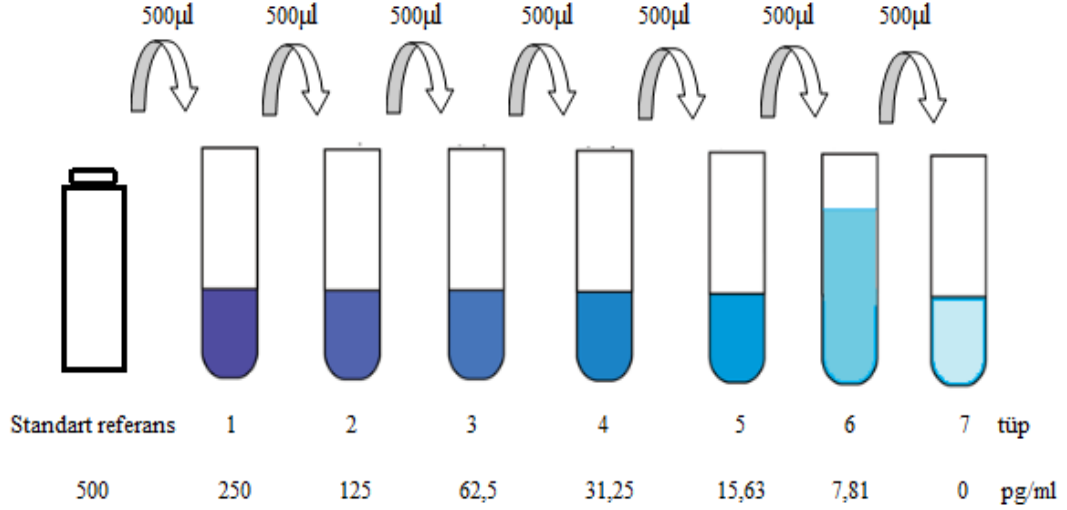
1. Wash Buffer Hazırlanışı: 240 ml distile su içerisinde 10 mL konsantre wash buffer'dan eklenmiştir. Kristal oluşumu gözlenmesi durumunda 40 °C su banyosunda ısıtılmıştır.

2. Biotinlenmiş Deteksiyon Ab Hazırlanışı: Deney öncesi gereken miktar kuyu başına 100 μ l olacak şekilde hesaplanmıştır. Kullanımdan önce stok tüpü santrifüj edilmiş, ardından dilüsyon tüpünün 1:100'ü kadar konsantre biotinlenmiş deteksiyon Ab eklenmiştir.

3. Konsantre HRP Konjugatı: Deney öncesi gereken miktar kuyu başına 100 μ l olacak şekilde hesaplanmıştır. HRP konjuge dilüsyon tüpünün 1:100'ü kadar konsantre HRP konjugatı eklenmiştir.

4. Substrat Reagent: Her kuyuya 90 μ l solüsyondan eklenmiştir.

5. IL-6 Standardı Hazırlanışı: Standart reagent'ı kullanımdan 15 dakika önce hazırlanmıştır. 10000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiş, referans standart&örnek dilüent'in 1 mL'si alınarak IL-6 standardına eklenmiştir. 10 dakika beklenerek birkaç kez alt üst yapılmıştır. Tamamen çözüldükten sonra, bir pipet yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Böylece 500 pg/ml'lik stok solüsyon hazırlanmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. IL-6'nın seri dilüsyon hazırlama prosedürü.

3.10.2.2. IL-8 ELISA Kit Protokolü

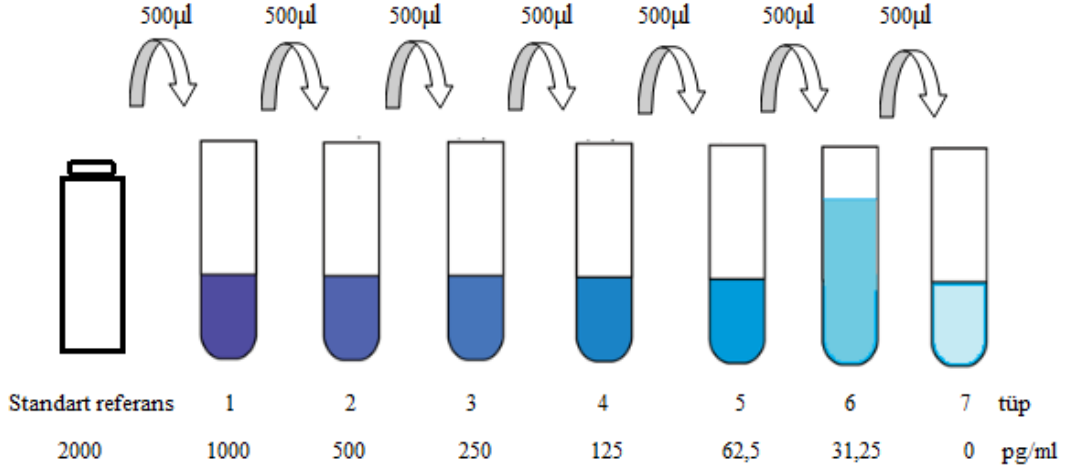
1. Wash Buffer Hazırlanışı: 240 ml distile su içerisinde 10 ml konsantre wash buffer'dan eklenmiştir. Kristal oluşumu gözlenmesi durumunda 40 °C su banyosunda ısıtılmıştır.

2. Biotinlenmiş Deteksiyon Ab Hazırlanışı: Deney öncesi gereken miktar kuyu başına 100 µl olacak şekilde hesaplanmıştır. Kullanımdan önce stok tüpü santrifüj edilmiş, ardından dilüsyon tüpünün 1:100'ü kadar konsantre biotinlenmiş deteksiyon Ab eklenmiştir.

3. Konsantre HRP Konjugatı: Deney öncesi gereken miktar kuyu başına 100 µl olacak şekilde hesaplanmıştır. HRP konjuge dilüsyon tüpünün 1:100'ü kadar konsantre HRP konjugatı eklenmiştir.

4. Substrat Reagent: Her kuyuya 90 µl solüsyondan eklenmiştir.

5. IL-8 Standardı Hazırlanışı: Standart reagentı kullanımdan 15 dakika önce hazırlanmıştır. 10000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra referans standart&örnek dilüent'in 1 ml'si alınarak IL-8 standardına eklenmiştir. 10 dakika beklenerek birkaç kez alt üst yapılmış, tamamen çözüldükten sonra, bir pipet yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Böylece 200 pg/ml'lik stok solüsyon hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. IL-8'in seri dilüsyon hazırlama prosedürü.

3.10.2.3. IL-10 ELISA Kit Protokolü

1. Wash Buffer Hazırlanışı: 240 ml distile su içerisinde 10 ml konsantre wash buffer'dan eklenmiştir. Kristal oluşumu gözlenmesi durumunda 40 °C su banyosunda ısıtılmıştır.

2. Biotinlenmiş Deteksiyon Ab Hazırlanışı: Deney öncesi gereken miktar kuyu başına 100 µl olacak şekilde hesaplanmıştır. Kullanımdan önce stok tüpü santrifüj edilmiştir. Dilüsyon tüpünün 1:100'ü kadar konsantre biotinlenmiş deteksiyon Ab eklenmiştir.

3. Konsantre HRP Konjugatı: Deney öncesi gereken miktar kuyu başına 100 µl olacak şekilde hesaplanmıştır. HRP konjuge dilüsyon tüpünün 1:100'ü kadar konsantre HRP konjugatı eklenmiştir.

4. Substrat Reagent: Her kuyuya 90 µl solüsyondan eklenmiştir.

5. IL-10 Standardı Hazırlama: Standart reagent'ı kullanımdan 15 dakika önce hazırlanmalıdır. 10000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Referans

4. BULGULAR

4.1. *L.orientalis*'e Ait Ekstrelerin Verimleri

Türkiye'ye özgü endemik *L. orientalis*'e ait 8 farklı ekstre rotavoporda yoğunlaştırıldıktan sonra darası alınan flakonlara aktarılmıştır. İyiye kurutulan örnekler sabit tartım öncesi ve sonrasındaki değerler alınarak % verimleri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmış ve sonuçları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

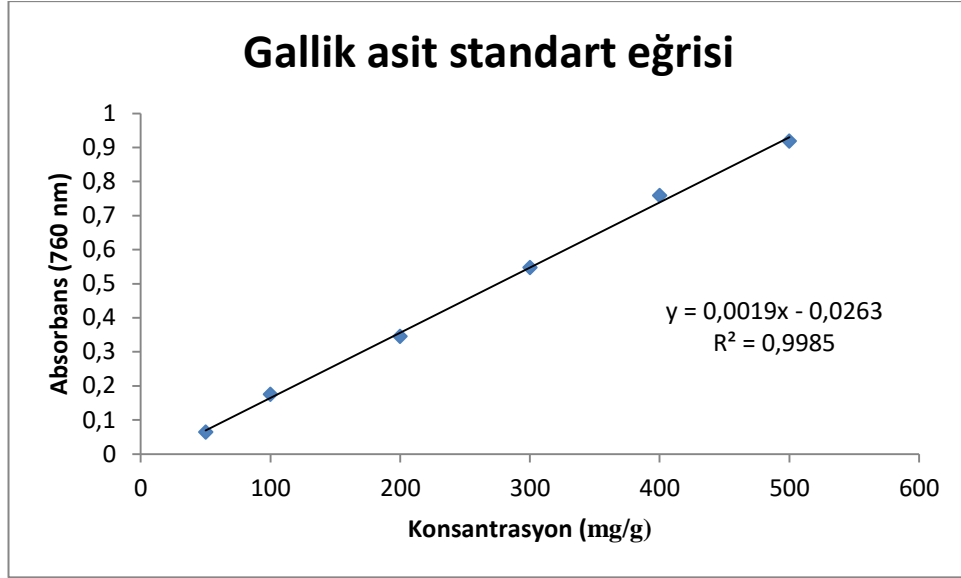
$$\% \text{ Verim} = \frac{(\text{Ekstre miktarı (g)} \times 100)}{\text{Bitki miktarı (g)}}$$

Tablo 4.1. % Verim.

	Meyve % Verim	Yaprak % Verim
<i>n</i>-hekzan	2.83	1.93
Etil asetat	0.47	2.09
Metanol	10.33	36.05
	Balsam % Verim	
Metanol	0.39	
Kloroform	44.42	

4.2. *L.orientalis*'in Toplam Fenolik İçerik Bulguları

L.orientalis'e ait tüm ekstrelerin toplam fenolik içeriği gallik asit standart eğrisi (Şekil 4.1) kullanılarak, GAE olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, Tablo 4.2'de mg kuru ağırlık başına g gallik asit eşdeğerleri olarak verilmiştir. Standart grafik denkleminde hesaplanan sonuçlar gallik asit eşleniği cinsinden balsam kloroform ekstresinin 68.27±0.30 GAE mg/g ile en yüksek fenolik içeriğe, yaprak *n*-hekzan ekstresinin ise en düşük fenolik içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir.



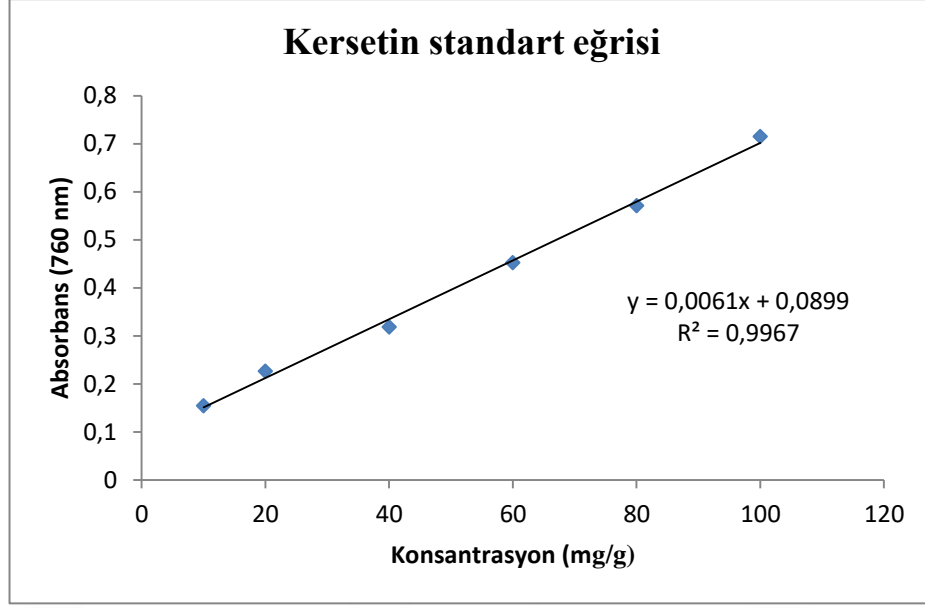
Şekil 4.1. Toplam fenolik asit ölçümü için gallik asit standart eğrisi grafiği.

Tablo 4.2. *L. orientalis*'e ait ekstrelerin gallik asit eşdeğeri cinsinden toplam fenolik madde miktarı.

Ekstreler	GAE (mg/g)
Yaprak <i>n</i> -hekzan	25.08±0.08
Yaprak etil asetat	47.46±0.11
Yaprak metanol	42.30±0.04
Meyve <i>n</i> -hekzan	27.71±0.05
Meyve etil asetat	62.41±0.15
Meyve metanol	36.82±0.01
Balsam kloroform	68.27±0.30
Balsam metanol	43.37±0.10

4.3. *L.orientalis*'in Toplam Flavonoit İçerik Bulguları

L.orientalis'e ait tüm ekstrelerin toplam flavonoit içeriği, kersetin standart eğrisi (Şekil 4.2) kullanılarak, kersetin eşdeğeri (QE) olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, Tablo 4.3'de mg kuru ağırlık başına g kersetin eşdeğerleri olarak verilmiştir. Standart grafik denkleminde hesaplanan sonuçlar kersetin eşleniği cinsinden balsam kloroform ekstresinin 34.10 ± 1.73 QE mg/g ile en yüksek flavonoit içeriğine sahip olduğunu göstermiştir.



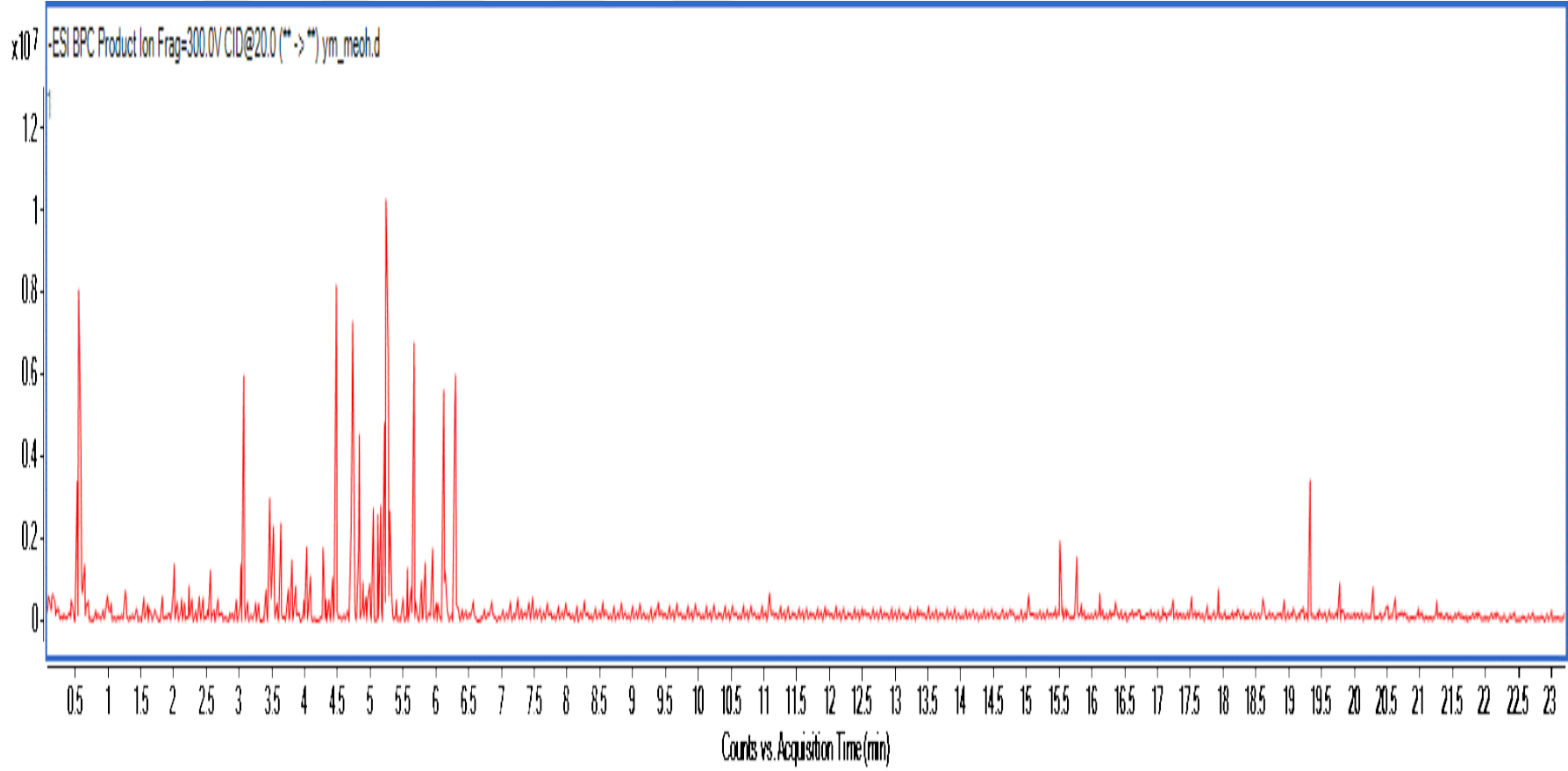
Şekil 4.2. Toplam flavonoit madde miktarı ölçümü için kersetin standart eğrisi grafiği.

Tablo 4.3. *L. orientalis*'e ait ekstrelerin kersetin eşdeğeri cinsinden toplam flavonoit madde miktarı.

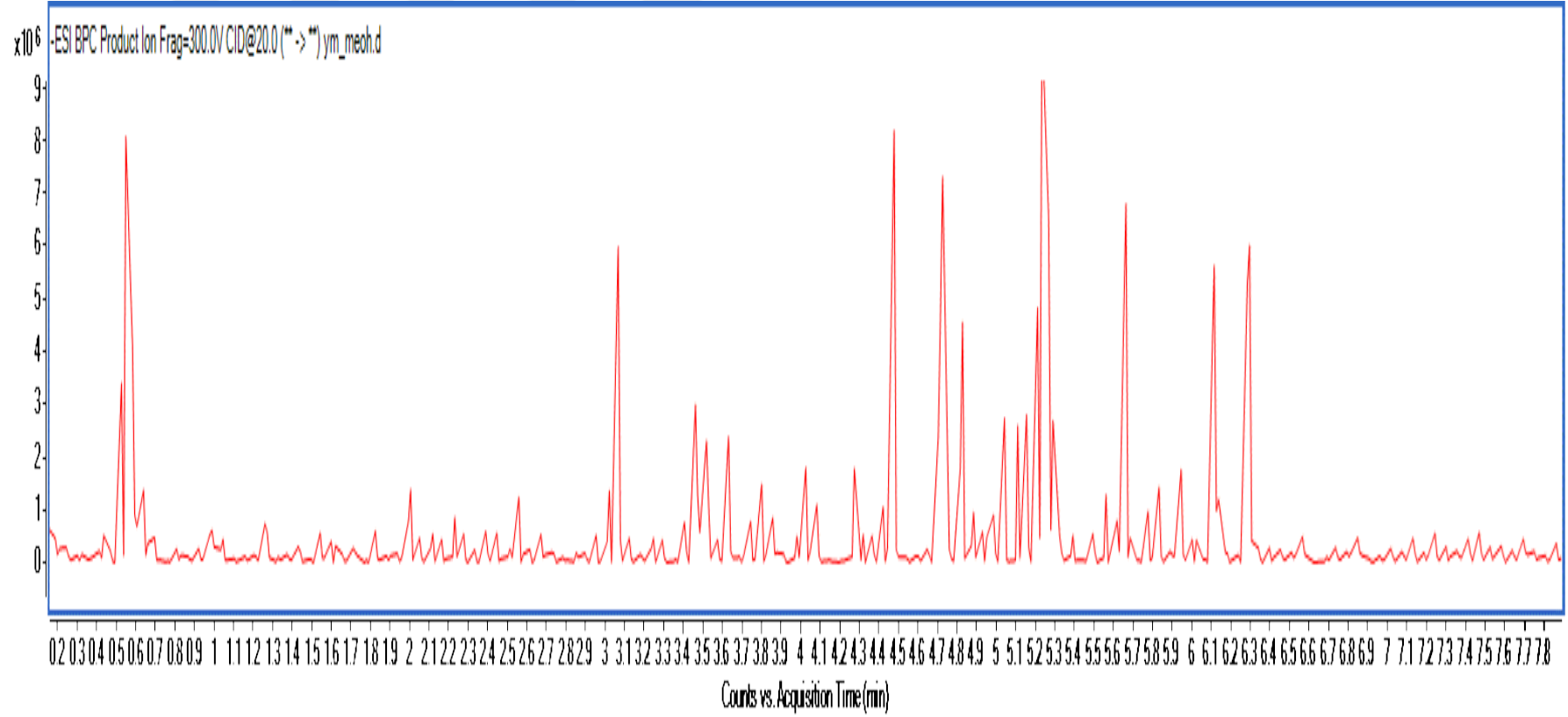
Ekstreler	QE (mg/g)
Yaprak <i>n</i> -hekzan	5.50±1.71
Yaprak etil asetat	10.06±0.3
Yaprak metanol	25.02±0.66
Meyve <i>n</i> -hekzan	9.46±0.7
Meyve etil asetat	9.73±0.57
Meyve metanol	8.20±1.92
Balsam kloroform	34.10±1.73
Balsam metanol	8.60±0.66

4.4. Kromatografik Analiz Bulguları

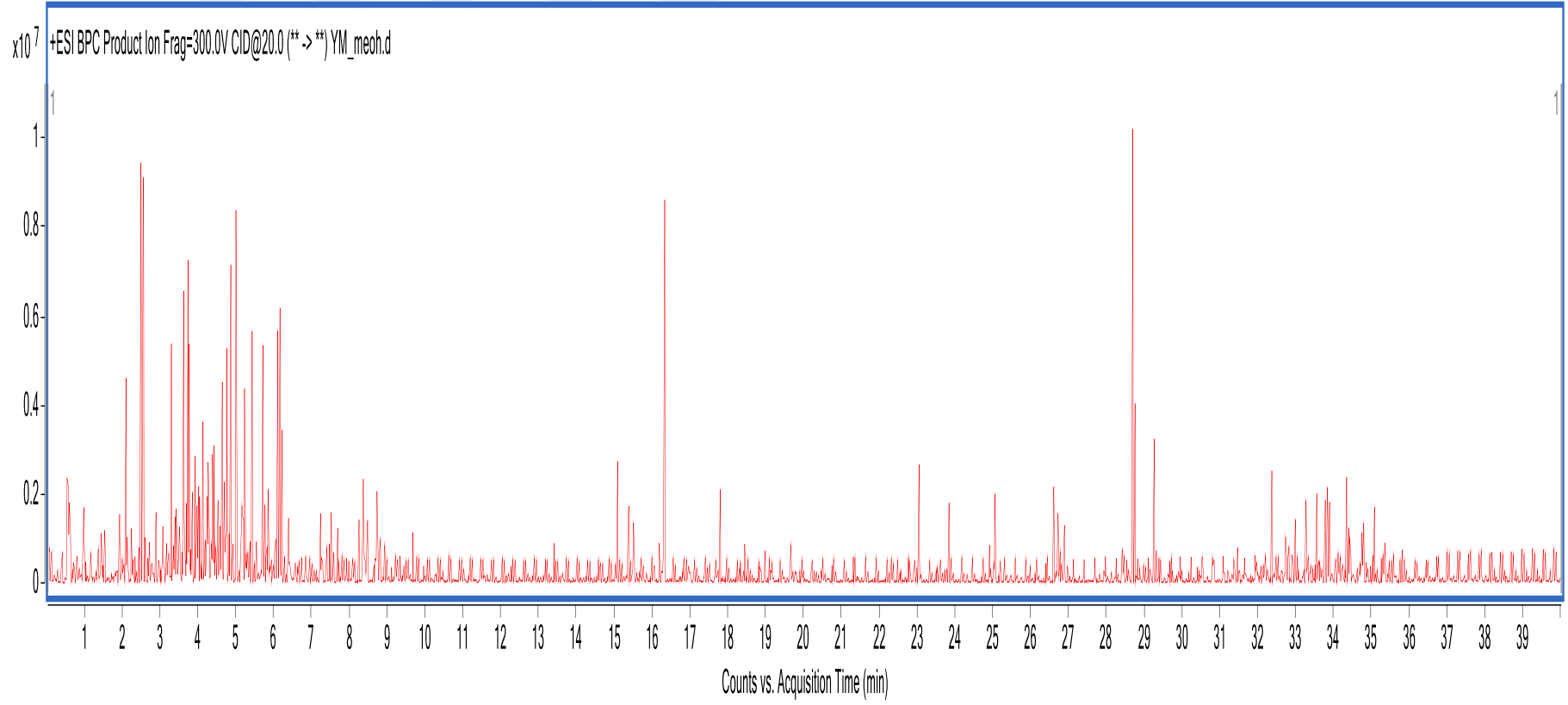
L.orientalis yaprak metanol ekstresi biyoaktif madde içeriğine dair verilerin elde edilmesi için Agilent LC-ESI-QTOF-MS cihazı kullanılmıştır. Analize ait kromatogramlar Şekil 4.20a, 4.20b, 4.21a ve 4.21b'de görüldüğü gibidir. Elde edilen sonuçlarına dair detaylı bilgi Tablo 4.7'de verilmiştir.



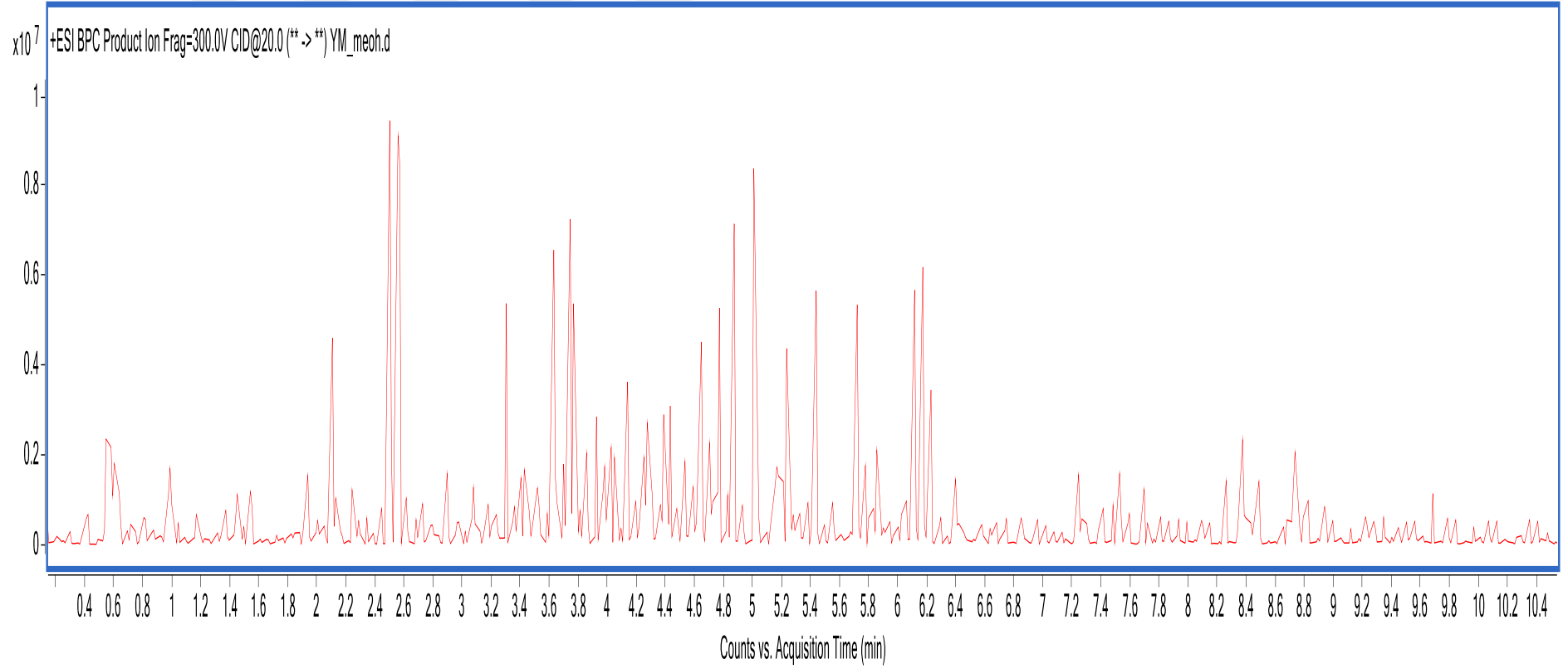
Şekil 4.3a. *L. orientalis* yaprak metanol ekstreğine ait negatif mod LC-ESI-QTOF-MS analiz kromotogram sonucu (0-23. dakika).



Şekil 4.3b. *L. orientalis* yaprak metanol ekstresine ait negatif mod LC-ESI-QTOF-MS analiz kromatogram sonucu (0-8. dakika).



Şekil 4.4a. *L. orientalis* yaprak metanol ekstreğine ait pozitif mod LC-ESI-QTOF-MS analiz kromotogram sonucu (0-40. dakika).



Şekil 4.4b. *L. orientalis* yaprak metanol ekstreğine ait pozitif mod LC-ESI-QTOF-MS analiz kromotogram sonucu (0-10. dakika).

Tablo 4.4. *L.orientalis* yaprak metanol ekstresine ait içerik analizi.

Pik No	Rt (dak)	Gözlenen m/z	Hesaplanan m/z	Ampirik formül	Majör MS/MS fragmentleri	Tanımlama
Negatif İyon Modu						
1	0.604	173.0481	174.0554	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	155.0342;165.0400	<u>Sikimik asit</u>
2	0.643	191.0592	192.0665	C ₇ H ₁₂ O ₆	85.0297;165.0412;173.0461	<u>Kinik asit</u>
3	1.225	125.0258	126.0331	C ₆ H ₆ O ₃	112.9856	<u>Pirogallol</u>
4	1.259	169.0167	170.024	C ₇ H ₆ O ₅	125.0242;146.9613;152.9789	<u>Gallik asit</u>
5	1.993	305.0689	306.0762	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	125.0240;174.9562;288.9360	<u>Epigallokatesin</u>
6	2.23	153.0212	154.0285	C ₇ H ₆ O ₂	109.0289;130.9662	<u>3,4-Dihidroksibenzoik asit</u>
7	2.242	109.0312	110.0384	C ₆ H ₆ O ₂	96.9601	<u>Pirokatekol</u>
8	2.558	353.0906	354.0979	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	136.0481;174.9560;180.0381;191.0558	<u>Klorojenik asit</u>
9	2.919	339.0753	340.0826	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	174.9556;177.0184	<u>Eskulin</u>
10	3.066	183.0327	184.04	C ₈ H ₈ O ₅	124.0166;160.9765;174.9559	<u>4-O-Metil-gallat</u>
11	3.258	167.0371	168.0444	C ₈ H ₈ O ₄	123.0451;146.9608;152.9783;160.9766	<u>Florasetofenon</u>
12	4.871	271.0642	272.0715	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	151.0031	<u>(±)-Naringenin</u>
13	4.885	433.1173	434.1246	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	174.9551;271.0610	<u>Naringenin-7-O-glukozit</u>
14	5.054	193.0527	194.06	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	134.0351;174.9542	<u>Ferulik asid</u>
15	5.178	273.0791	274.0864	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	167.0329;174.9541	<u>Piloretin</u>
16	5.209	317.0344	318.0416	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	137.0228;151.0023;178.9972	<u>Mirisetin</u>
17	5.28	271.0277	272.035	C ₁₄ H ₈ O ₆	249.0799;255.0296	<u>Kuinalizarin</u>

Tablo 4.4. *L.orientalis* yaprak metanol ekstresine ait içerik analizi (devamı).

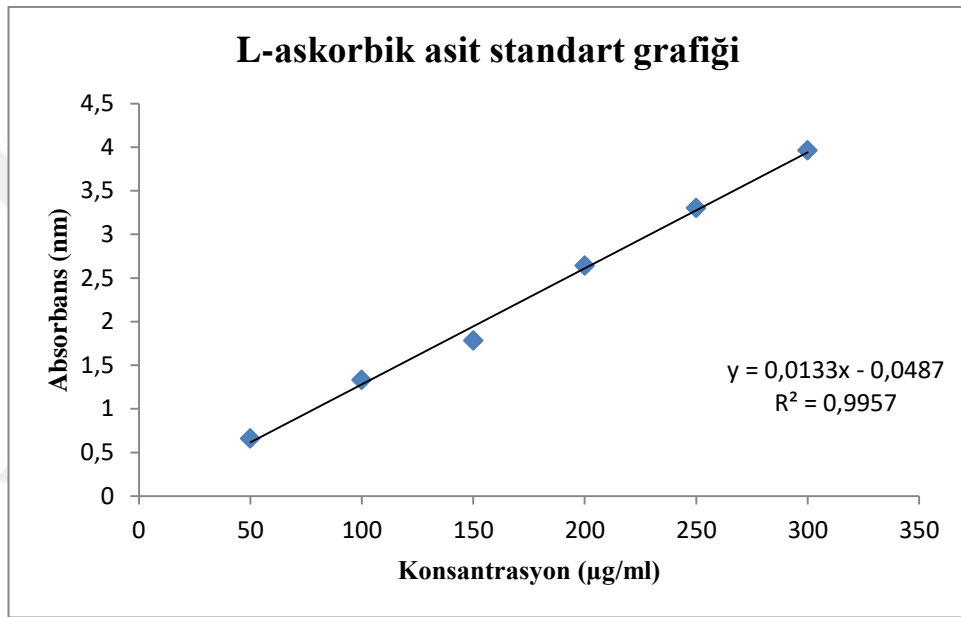
18	5.506	435.1322	436.1395	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	174.9541;273.0744	<u>Pilorizin</u>
19	6.342	285.0428	286.05	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	151.0017	<u>Kemferol</u>
20	17.094	471.3509	472.3581	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	174.9502;277.2098;446.8982	<u>Korozolik asit</u>
21	21.432	277.22	278.2273	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	104.9642;174.9536;180.9714;270.9664	<u>Linolenik asid</u>
22	23.905	453.3398	454.3471	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	112.9823;174.9522;434.8675;440.8841	<u>Betulonik asid</u>
23	26.006	281.2514	282.2587	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	108.9857;130.9645;152.9770	<u>Elaidik asid</u>

Pozitifiyon modu

24	4.491	318.038	319.0453	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	153.0178;305.0991	<u>Irigenol</u>
25	5.236	302.0427	303.05	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	137.023;214.9177	<u>Kersetin</u>
26	5.677	286.0477	287.055	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	84.9596;261.1465	<u>Luteolin</u>

4.5. *L. orientalis*'in Antioksidan Aktivite Bulguları

L. orientalis'e ait tüm ekstrelerin ve L-askorbik asidin konsantrasyon inhibisyon grafiği çizilerek grafik denkleminde DPPH'in yarısını süpürebildiği değer (IC₅₀) hesaplanmıştır (şekil 4.3). IC₅₀ değerine ile antioksidan kapasite arasında ters orantı vardır. IC₅₀ değerine ne kadar düşükse antioksidan kapasite de o kadar güçlüdür. Genel olarak ekstrelerin antioksidan aktiviteleri birbirine yakın olmakla birlikte balsam kloroform ekstrisinin en yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu görülmüştür (Tablo 4.4).



şekil 4.5. L-askorbik asit standart eğrisi grafiği.

Tablo 4.5. Antioksidan aktivite IC₅₀ değerleri.

Ekstreler	IC ₅₀ (µg/ml)
Yaprak <i>n</i> -hekzan	50.92±0.62
Yaprak etil asetat	33.54±2.41
Yaprak metanol	43.634±1.12
Meyve <i>n</i> -hekzan	134.394±1.17
Meyve etil asetat	53.394±3.11
Meyve metanol	55.264±0.56
Balsam kloroform	29.644±1.43
Balsam metanol	56.404±2.19

4.6. *L.orientalis*'e Ait Ekstrelerin IC₅₀ Dozlarına Ait Bulgular

L.orientalis'in anti-proliferatif etkinlikleri, kolon adenokarsinom HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında XTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak incelenmiştir. Ekstrelerin IC₅₀ değerlerine ait veriler Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da görüldüğü gibidir.

IC₅₀, bir maddenin belirli bir biyokimyasal veya biyolojik fonksiyonu inhibe etme özelliğini tahmin etmek için kullanılan bir değerdir. FDA'ya göre IC₅₀, bir ilacın *in vitro* % 50 inhibisyonu için gereken konsantrasyonunu temsil eder.

Elde edilen sonuçlara göre, *L.orientalis* yaprak metanol ekstresi uygulanan HT-29 ve HCT-116 hücrelerindeki IC₅₀ değerinin, diğer ekstrelerle karşılaştırıldığında en düşük olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara bağlı olarak, daha ileri deneyler için hem HT-29 hem de HCT-116 hücre dizisinde *L.orientalis*'in yaprağından elde edilen metanol ekstresinin kullanılmasına karar verilmiştir.

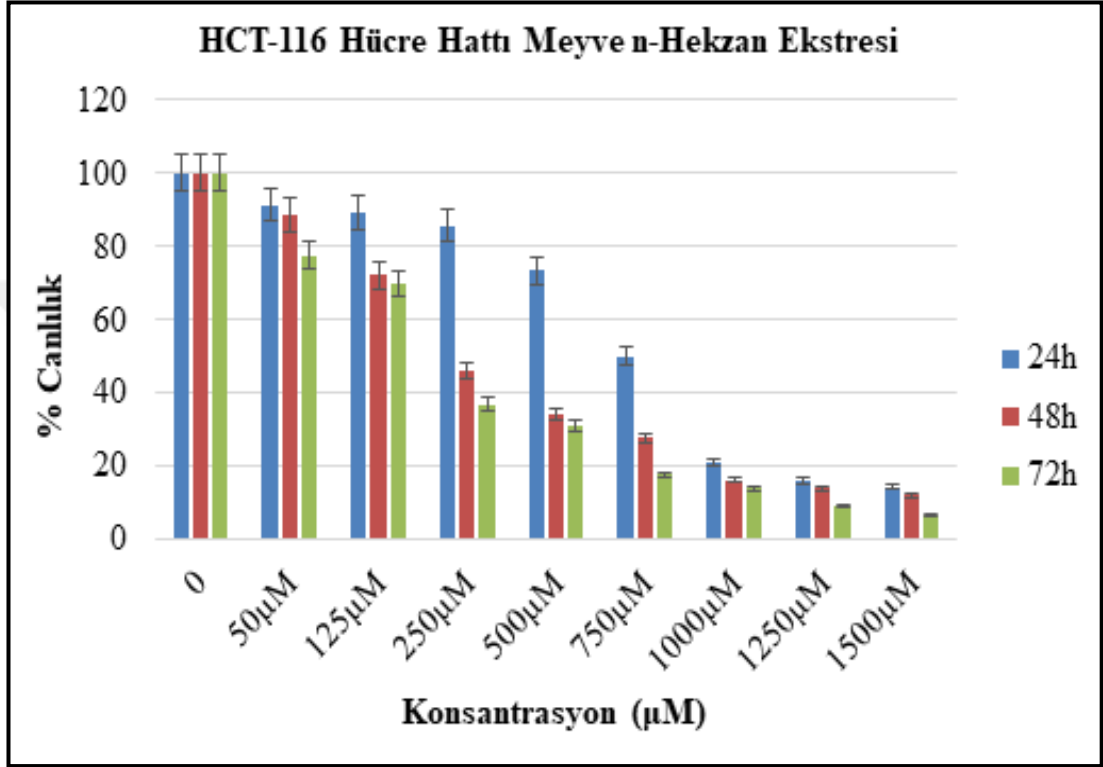
Tablo 4.6. *L.orientalis* ekstrelerine ait HCT-116 hücre hattının IC₅₀ değerleri.

HCT-116		
No	Ekstreler	IC ₅₀ (µM)
1	Meyve <i>n</i> -hekzan	192.184±0.87
2	Meyve etil asetat	59.154±3.10
3	Meyve metanol	69.424±0.012
4	Yaprak <i>n</i> -hekzan	504.674±8.28
5	Yaprak etil asetat	50.864±0.70
6	Yaprak metanol	27.804±0.30
7	Balsam kloroform	82.0144±2.18
8	Balsam metanol	112.024±1.73

Tablo 4.7. *L.orientalis* ekstrelerine ait HT-29 hücre hattının IC₅₀ değerleri.

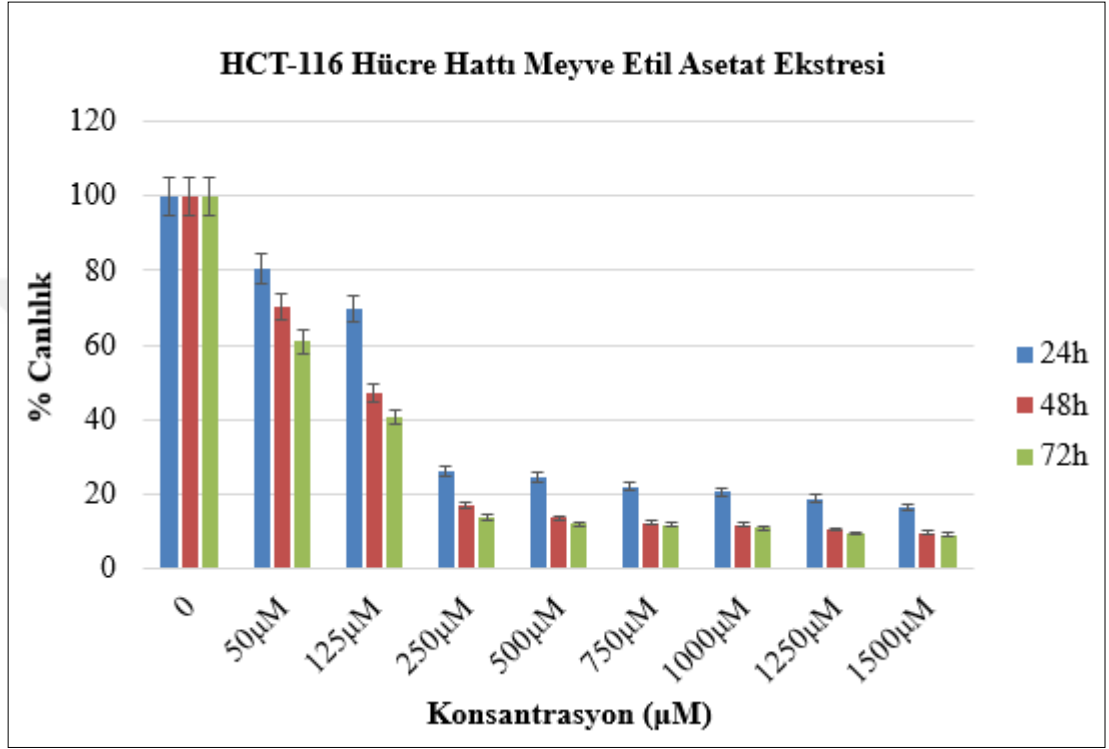
HT-29		
No	Ekstreler	IC₅₀ (μM)
1	Meyve <i>n</i> -hekzan	52.234±0.08
2	Meyve etil asetat	56.244±3.14
3	Meyve metanol	60.914±1.68
4	Yaprak <i>n</i> -hekzan	169.504±0.03
5	Yaprak etil asetat	72.824±5.67
6	Yaprak metanol	43.134±0.74
7	Balsam kloroform	24.434±0.03
8	Balsam metanol	75.404±3.23

HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* meyve *n*-hekzan ekstresinin 50 µM, 125 µM, 250 µM, 750 µM, 1000 µM, 1250 µM ve 1500 µM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.4). HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* meyve *n*-hekzan ekstresinin etkili IC₅₀ dozu 48 saatlik inkübasyonda 192.18 µM olarak belirlenmiştir.



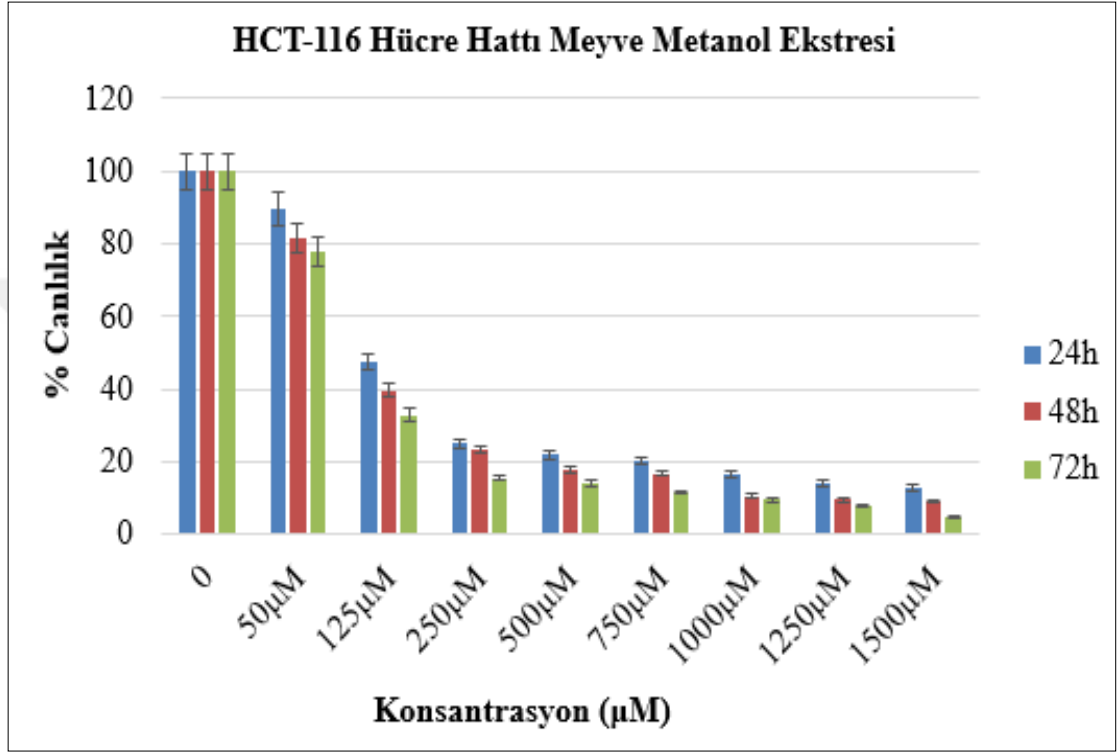
Şekil 4.6. HCT-116 hücrelerinin *L.orientalis* meyve *n*-hekzan ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* meyve etil asetat ekstresinin 50 µM, 125 µM, 250 µM, 750 µM, 1000 µM, 1250 µM ve 1500 µM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.5). HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* meyve etil asetat ekstresinin etkili IC₅₀ dozu 48 saatlik inkübasyonda 59.15 µM olarak belirlenmiştir.



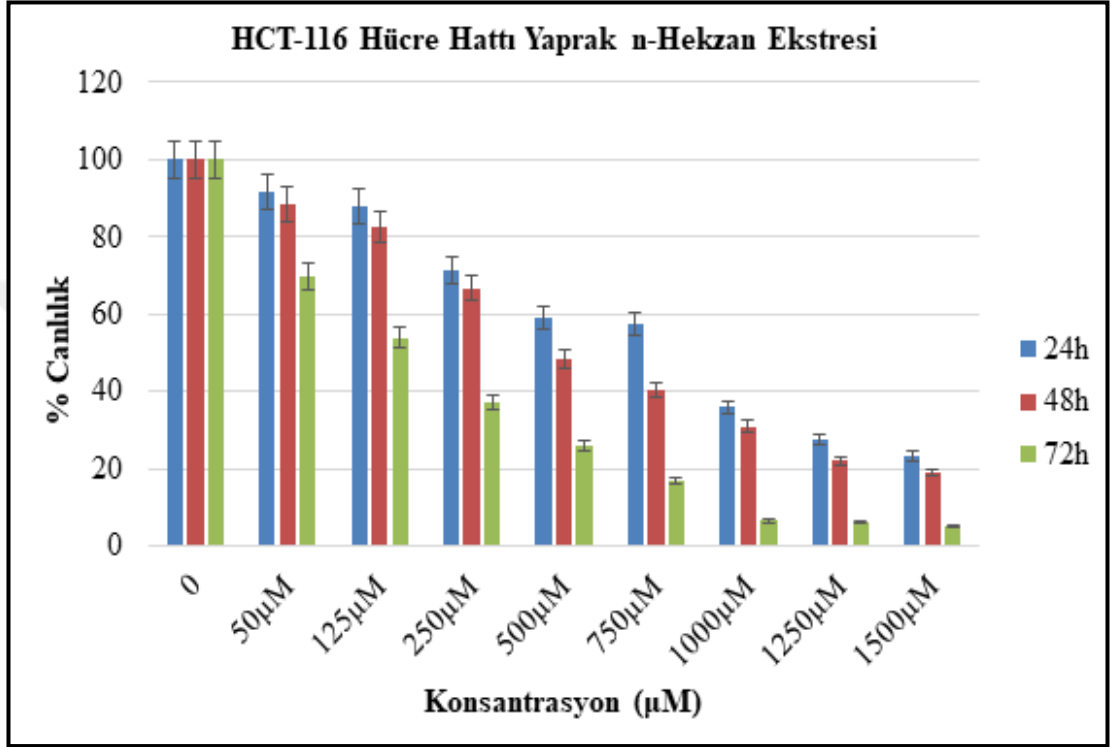
Şekil 4.7. HCT-116 hücrelerinin *L.orientalis* meyve etil asetat ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* meyve metanol ekstresinin 50 µM, 125 µM, 250 µM, 750 µM, 1000 µM, 1250 µM ve 1500 µM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.6). HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* meyve metanol ekstresinin etkili IC₅₀ dozu 48 saatlik inkübasyonda 69.42 µM olarak belirlenmiştir.



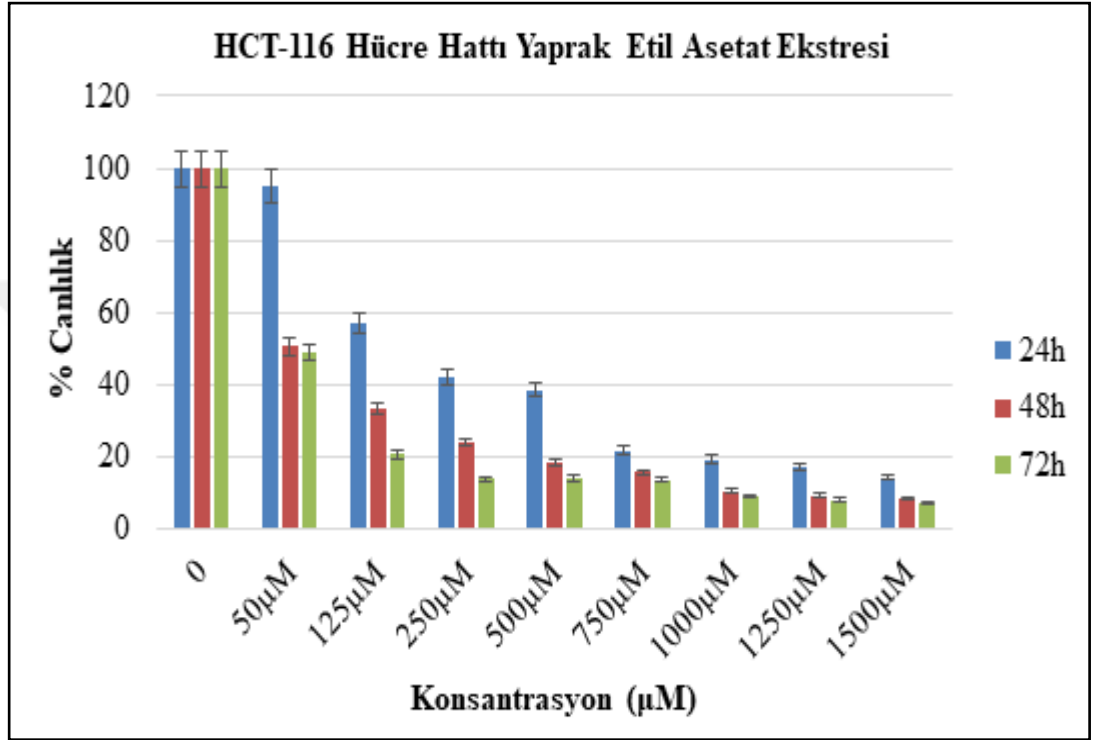
Şekil 4.8. HCT-116 hücrelerinin *L.orientalis* meyve metanol ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* yaprak *n*-hekzan ekstresinin 50 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 750 μ M, 1000 μ M, 1250 μ M ve 1500 μ M doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.7). HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* yaprak *n*-hekzan ekstresinin etkili IC₅₀ dozu 48 saatlik inkübasyonda 504.67 μ M olarak belirlenmiştir.



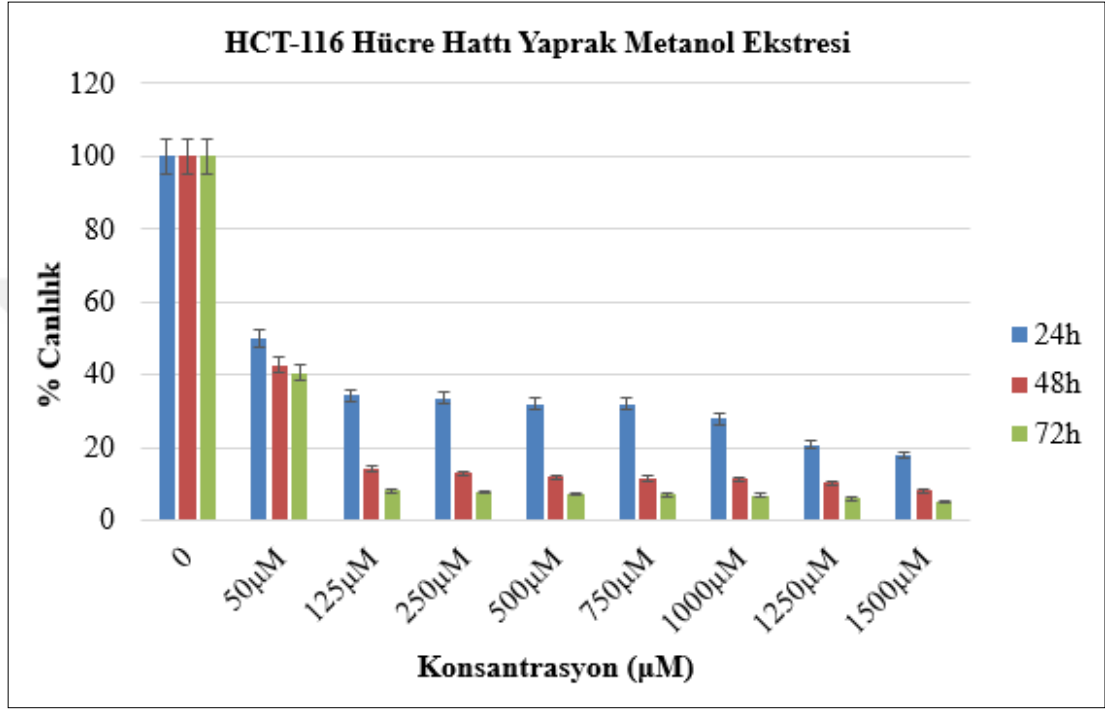
Şekil 4.9. HCT-116 hücrelerinin *L.orientalis* yaprak *n*-hekzan ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* yaprak etil asetat ekstresinin 50 μM , 125 μM , 250 μM , 750 μM , 1000 μM , 1250 μM ve 1500 μM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.8). HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* yaprak etil asetat ekstresinin etkili IC_{50} dozu 48 saatlik inkübasyonda 50.86 μM olarak belirlenmiştir.



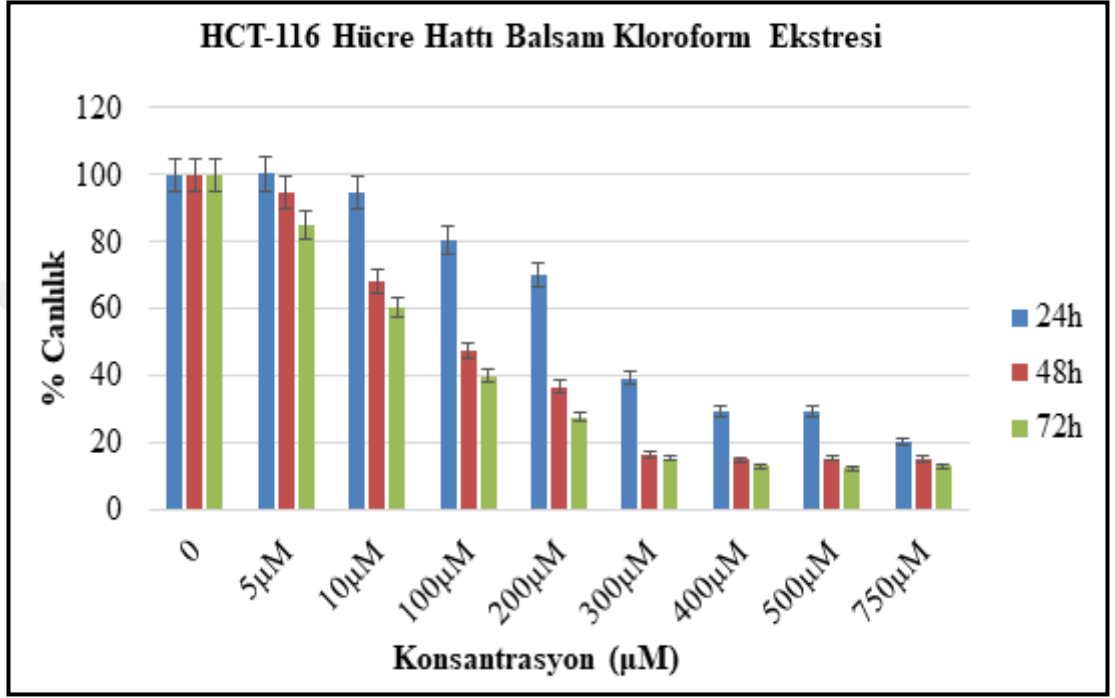
Şekil 4.10. HCT-116 hücrelerinin *L.orientalis* yaprak etil asetat ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin 50 µM, 125 µM, 250 µM, 750 µM, 1000 µM, 1250 µM ve 1500 µM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.9). HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin etkili IC₅₀ dozu 48 saatlik inkübasyonda 27.80 µM olarak belirlenmiştir.



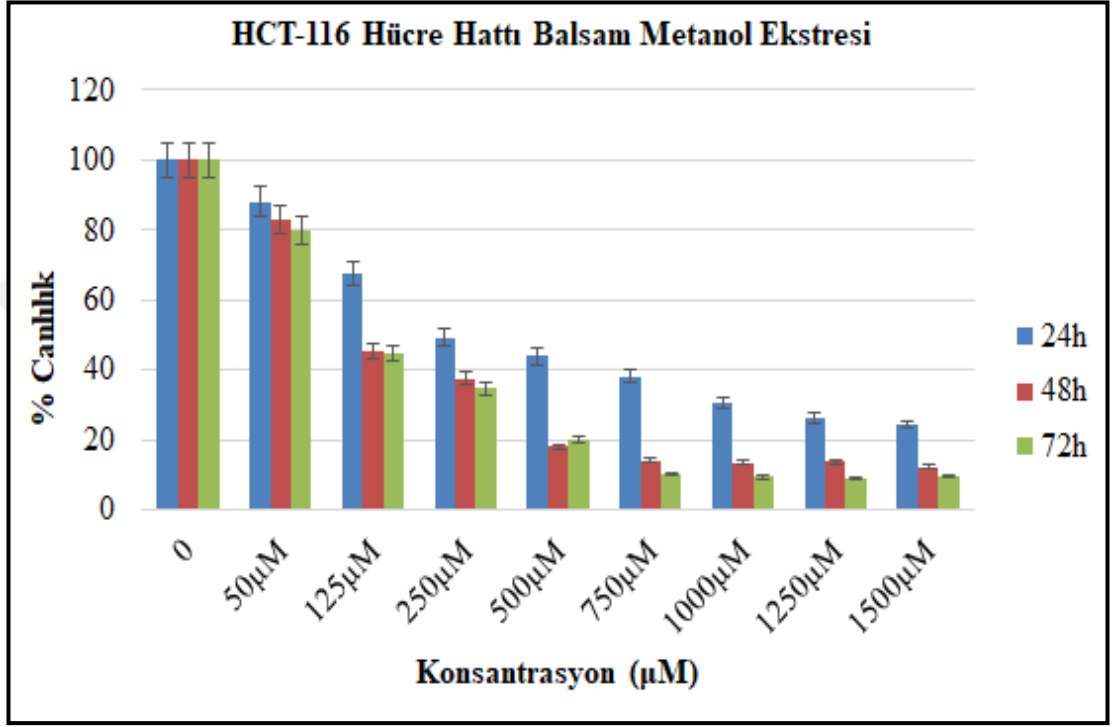
Şekil 4.11. HCT-116 hücrelerinin *L.orientalis* yaprak metanol ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* balsam kloroform ekstresinin 5 µM, 10 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM, 400 µM, 500 µM ve 750 µM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.10). HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* balsam kloroform ekstresinin etkili IC₅₀ dozu 48 saatlik inkubasyonda 82.01 µM olarak belirlenmiştir.



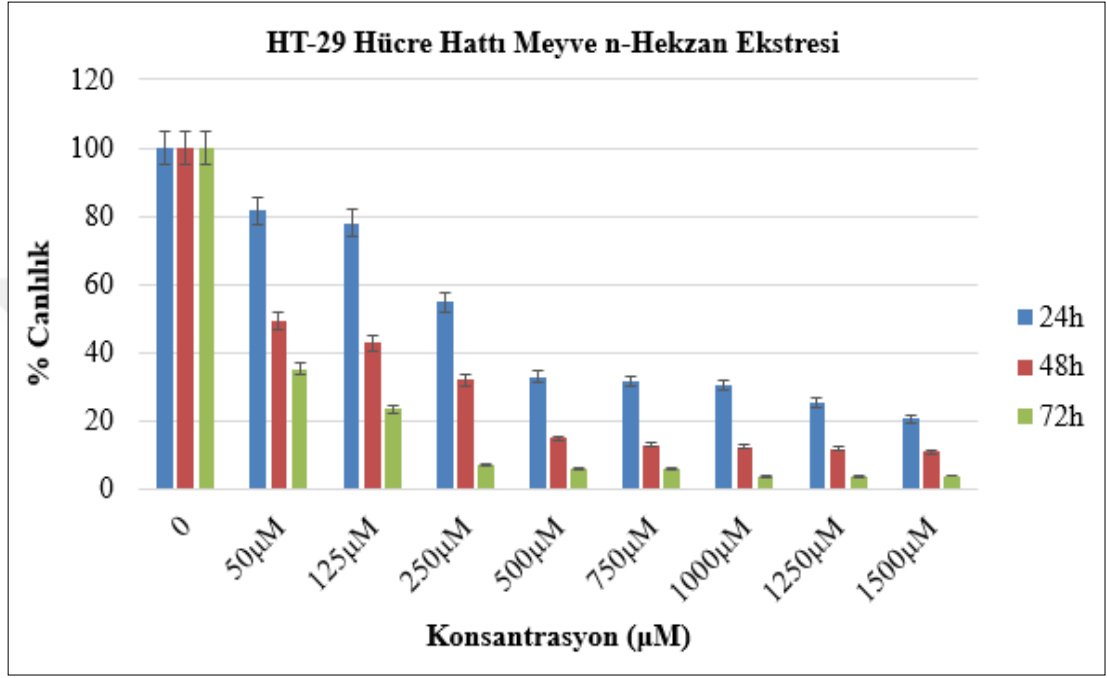
Şekil 4.12. HCT-116 hücrelerinin *L.orientalis* balsam kloroform ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* balsam metanol ekstresinin 50 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 750 μ M, 1000 μ M, 1250 μ M ve 1500 μ M doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.11). HCT-116 hücre hattında *L.orientalis* balsam metanol ekstresinin etkili IC₅₀ dozu 48 saatlik inkübasyonda 112.02 μ M olarak belirlenmiştir.



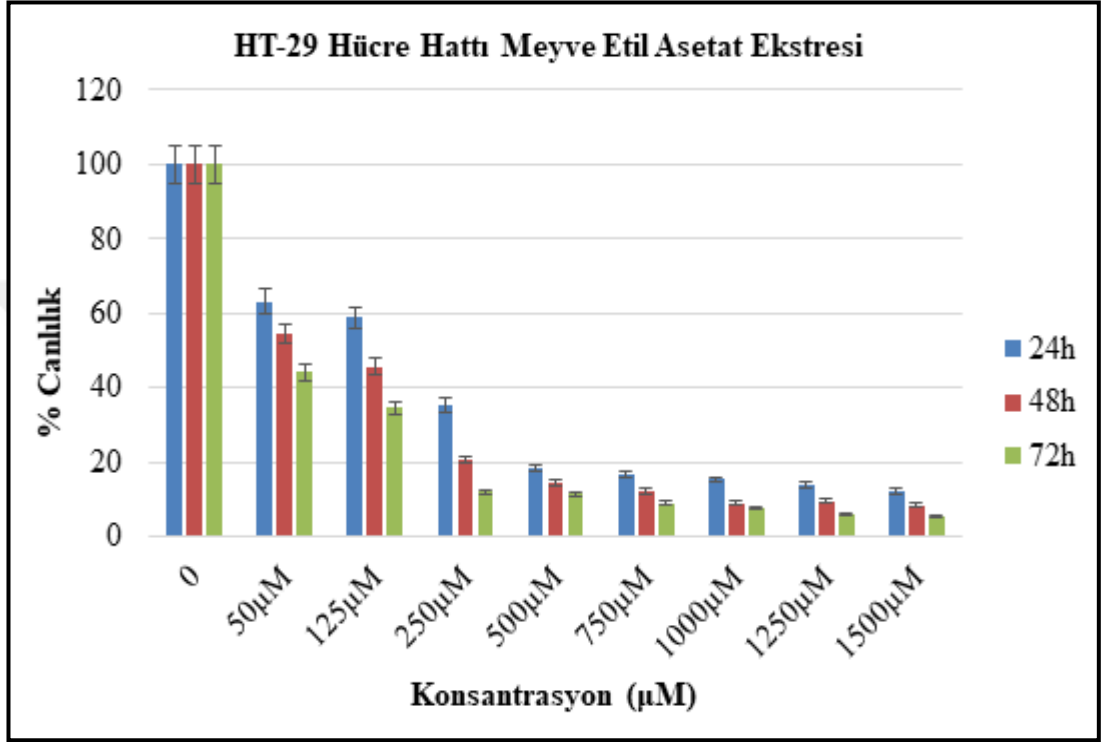
Şekil 4.13. HCT-116 hücrelerinin *L.orientalis* balsam metanol ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HT-29 hücre hattında *L.orientalis* meyve *n*-hekzan ekstresinin 50 µM, 125 µM, 250 µM, 750 µM, 1000 µM, 1250 µM ve 1500 µM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.12). HT-29 hücre hattında *L.orientalis* meyve *n*-hekzan ekstresinin etkili IC₅₀ dozu 48 saatlik inkubasyonda 52.23 µM olarak belirlenmiştir.



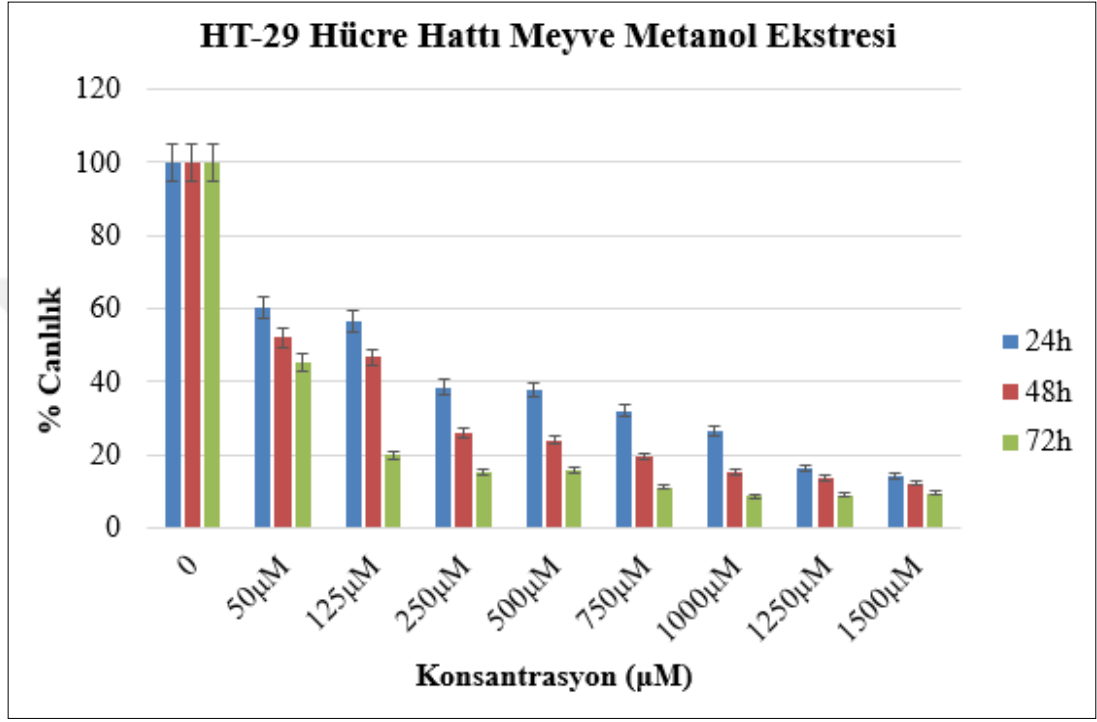
Şekil 4.14. HT-29 hücrelerinin *L.orientalis* meyve *n*-hekzan ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HT-29 hücre hattında *L.orientalis* meyve etil asetat ekstresinin 50 µM, 125 µM, 250 µM, 750 µM, 1000 µM, 1250 µM ve 1500 µM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.13). HT-29 hücre hattında *L.orientalis* meyve etil asetat ekstresinin etkili IC₅₀ dozu 48 saatlik inkübasyonda 56.24 µM olarak belirlenmiştir.



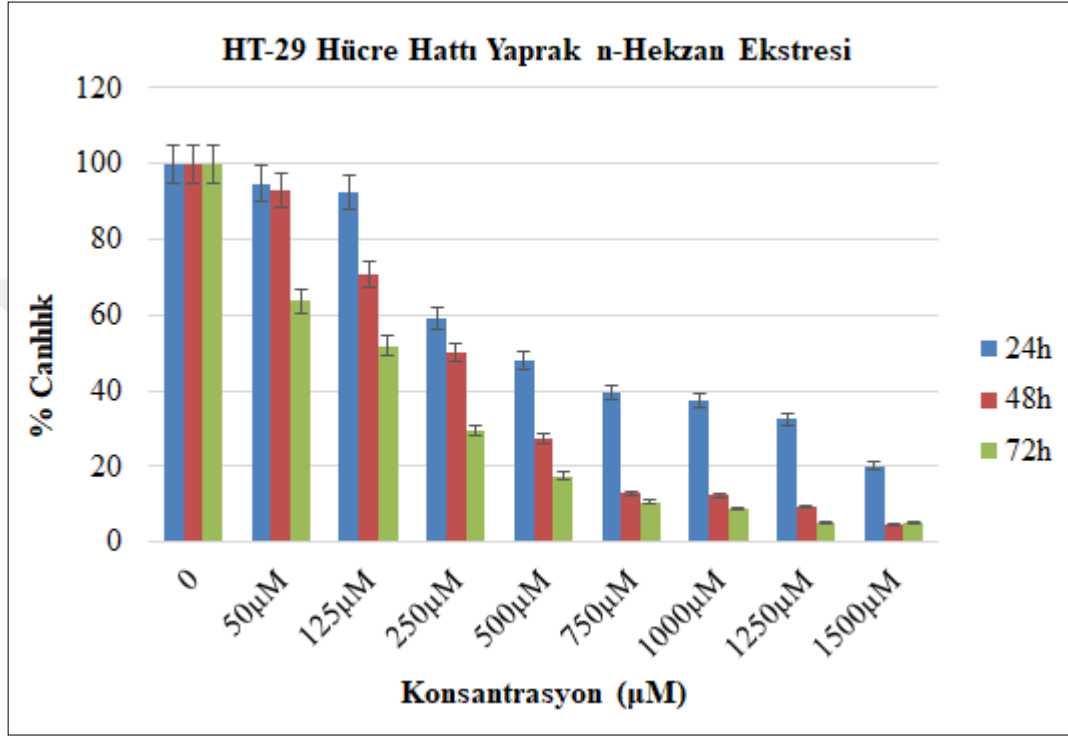
Şekil 4.15. HT-29 hücrelerinin *L.orientalis* meyve etil asetat ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HT-29 hücre hattında *L.orientalis* meyve metanol ekstresinin 50 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 750 μ M, 1000 μ M, 1250 μ M ve 1500 μ M doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.14). HT-29 hücre hattında *L.orientalis* meyve metanol ekstresinin etkili IC₅₀ dozu 48 saatlik inkübasyonda 60.91 μ M olarak belirlenmiştir.



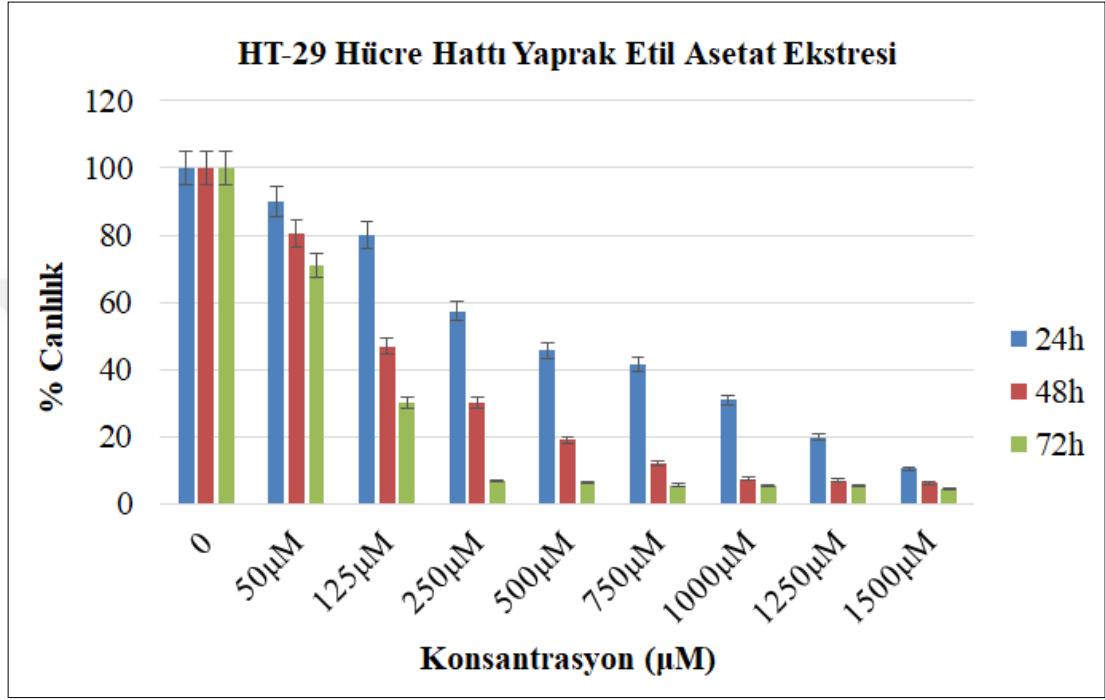
Şekil 4.16. HT-29 hücrelerinin *L.orientalis* meyve metanol ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HT-29 hücre hattında *L.orientalis* yaprak *n*-hekzan ekstresinin 50 µM, 125 µM, 250 µM, 750 µM, 1000 µM, 1250 µM ve 1500 µM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.15). HT-29 hücre hattında *L.orientalis* yaprak *n*-hekzan ekstresinin etkili IC₅₀ dozu 48 saatlik inkübasyonda 169.50 µM olarak belirlenmiştir.



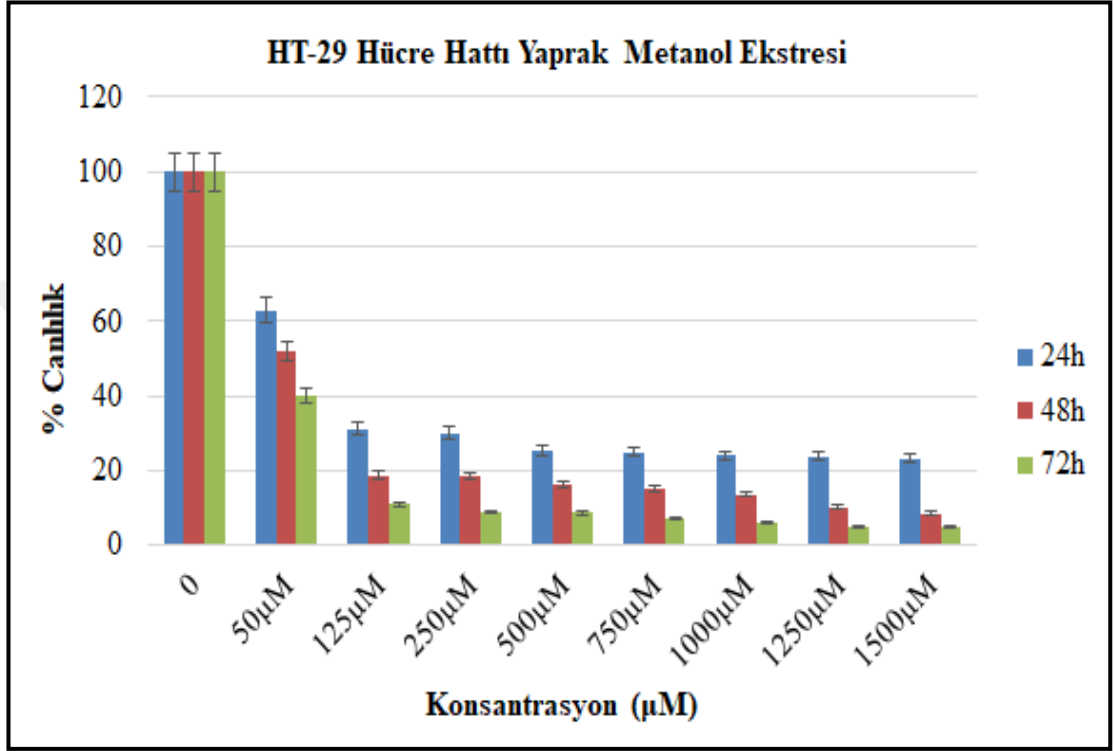
Şekil 4.17. HT-29 hücrelerinin *L.orientalis* yaprak *n*-hekzan ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HT-29 hücre hattında *L.orientalis* yaprak etil asetat ekstresinin 50 μM , 125 μM , 250 μM , 750 μM , 1000 μM , 1250 μM ve 1500 μM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.16). HT-29 hücre hattında *L.orientalis* yaprak etil asetat ekstresinin etkili IC_{50} dozu 48 saatlik inkübasyonda 72.82 μM olarak belirlenmiştir.



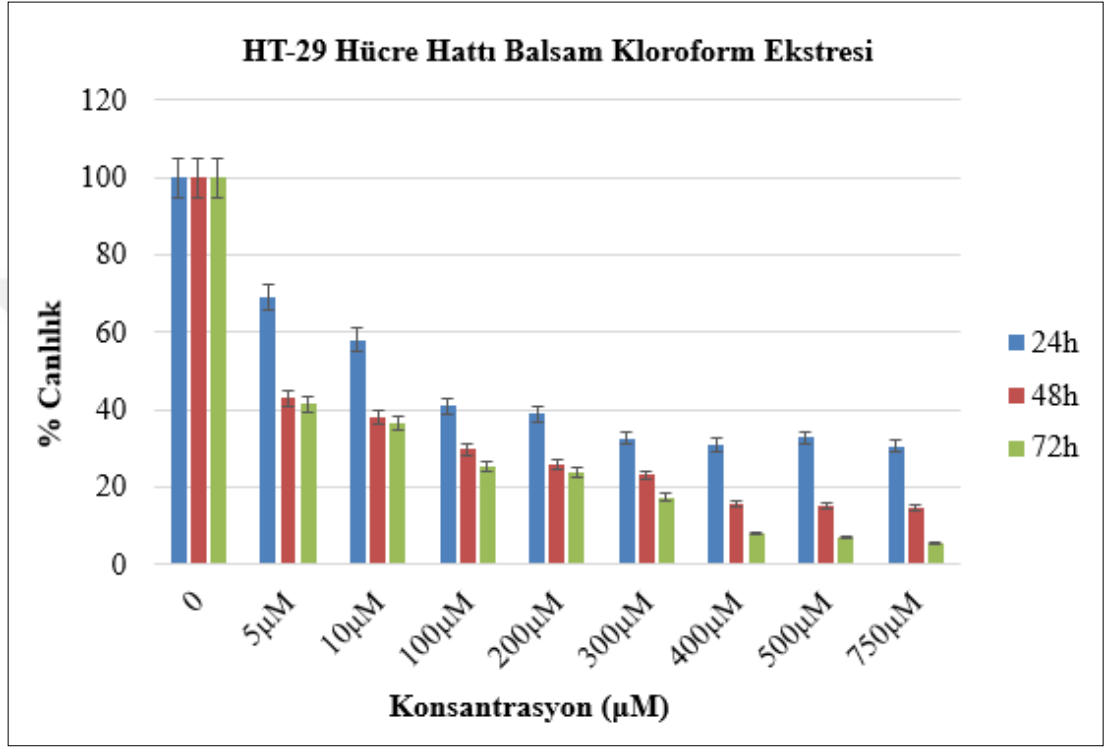
Şekil 4.18. HT-29 hücrelerinin *L.orientalis* yaprak etil asetat ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HT-29 hücre hattında *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin 50 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 750 μ M, 1000 μ M, 1250 μ M ve 1500 μ M doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.17). HT-29 hücre hattında *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin etkili IC₅₀ dozu 48 saatlik inkubasyonda 43.13 μ M olarak belirlenmiştir.



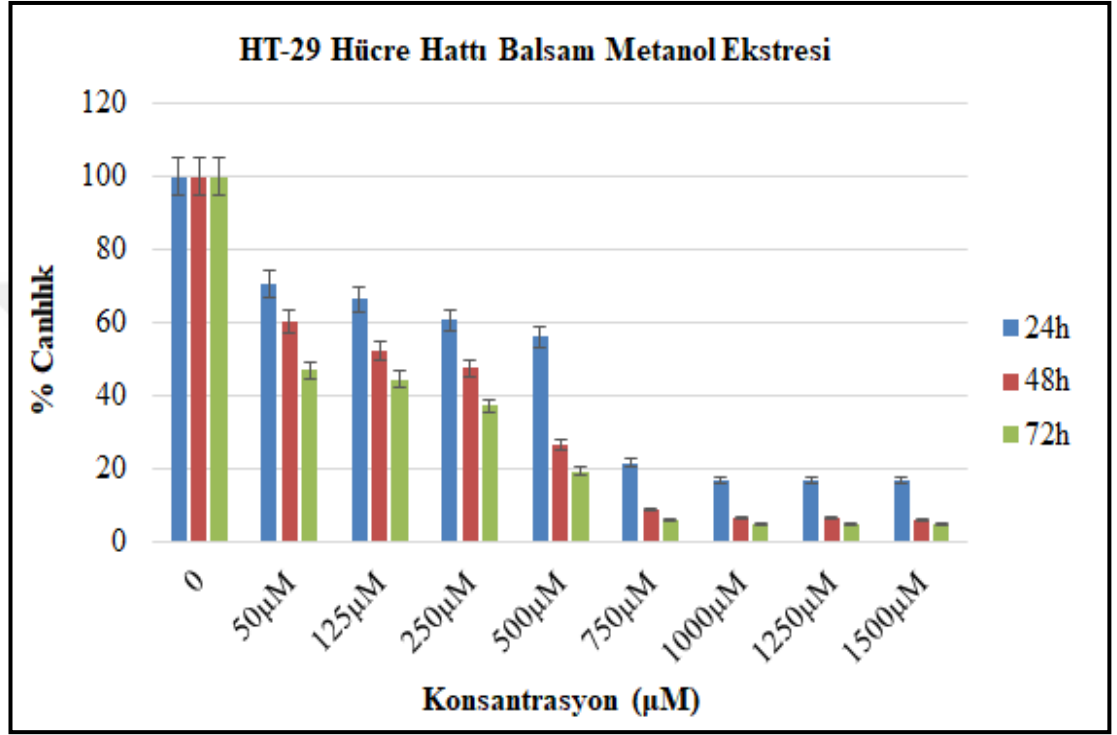
Şekil 4.19. HT-29 hücrelerinin *L.orientalis* yaprak metanol ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HT-29 hücre hattında *L.orientalis* balsam kloroform ekstresinin 5 μM , 10 μM , 100 μM , 200 μM , 300 μM , 400 μM , 500 μM ve 750 μM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.18). HT-29 hücre hattında *L.orientalis* balsam kloroform ekstresinin etkili IC_{50} dozu 48 saatlik inkübasyonda 24.43 μM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.20. HT-29 hücrelerinin *L.orientalis* balsam kloroform ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

HT-29 hücre hattında *L.orientalis* balsam metanol ekstresinin 50 µM, 125 µM, 250 µM, 750 µM, 1000 µM, 1250 µM ve 1500 µM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıkları XTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.19). HT-29 hücre hattında *L.orientalis* balsam metanol ekstresinin etkili IC₅₀ dozu 48 saatlik inkubasyonda 75.40 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.21. HT-29 hücrelerinin *L.orientalis* balsam metanol ekstresi ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen hücre canlılık yüzdeleri.

4.7. RT-PZR Bulguları

4.7.1. NF-κB Yolağı Gen Ekspresyon Analizi Bulguları

NF-κB'nin hedef gen grupları arasında; sitokinler/kemokinler ve modülatörleri, immun reseptörler, hücre adezyon molekülleri, akut faz proteinleri, stres yanıt genleri, apoptoz düzenleyiciler, büyüme faktörleri, ligandlar ve modülatörleri, erken yanıt genleri, transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicileri yer almaktadır. Kullanılan panelde ise 8 fonksiyonel gruba ait genler mevcuttur: Rel/NF-κB/IκB ailesi, NF-κB'ye duyarlı genler, ligandlar&transmembran reseptörleri, adaptör proteinler, sinyal iletim kinazları, transkripsiyon faktörleri, hücre ölüm/sağkalım ilişkili moleküller ve diğer faktörler (Aravindan ve ark., 2013).

Her iki hücre hattında kontrol ve doz uygulanmış örneklerin gen ekspresyon seviyelerini belirlemek için kullanılan insan NF-κB gen panelinde bulunan (Realtimer.com, Elkins Park, PA); ACTB (Actin, beta), B2M (Beta-2-microglobulin), GAPD (Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase), GUSB (Glucuronidase, beta), HPRT1 (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1), PGK1 (Phosphoglycerate kinase 1), PPIA (Peptidylprolyl isomerase A), RPL13A (Ribosomal protein L13a) housekeeping genlerinden hangilerinin uygun olduğu Bestkeeper programında yapılan analizlerle belirlenmiştir. Bu analizler sonucunda GUSB, RPL13A, ACTB ve B2M'nin en stabil genler olduğu görülmüştür. Aritmetik ortalama değerleri alınarak, örnekler normalize edilmiştir.

Her bir deneye dört housekeeping gen ve PZR kontrolü dahil edilmiştir. Analiz edilen genlerin ekspresyonu, relatif ekspresyon karşılaştırması için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak her bir housekeeping gene göre normalize edilmiştir.

RT-PZR verilerinin analizi, web üzerinden “Qiagen RT2 Profiler™ PCR Array Data Analysis v3.4” programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnflamasyonla ilişkili 88 adet genin HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında kontrol ve ekstre uygulaması sonrası mRNA düzeylerinde meydana gelen değişimlere ait sonuçlar Tablo 4.8a, 4.8b, 4.9a ve 4.9b'de görülmektedir.

Tablo 4.8a. HCT-116 hücrelerine ait kontrol ve doz grubunda anlamlı düzeyde artış görülen genler.

Gen adı	Artış	p değeri
IL10	20.46	0.01905
CASP1	53.82	0.01389
CASP8	2.06	0.04146
CHUK	2.21	0.01389
HMOX1	3.84	0.04362
TNFAIP3	2.13	0.00319
TNFRSF10A	55.72	0.00557
TNFRSF10B	27.47	0.02854
NLRP12	2.20	0.01224

HCT-116 hücrelerine 48 saat boyunca doz muamelesinin, IL-10 genini 20.46 ± 0.019 kat, CASP1 genini 53.82 ± 0.013 kat, CASP8 genini 2.06 ± 0.04 kat, CHUK genini 2.21 ± 0.01 kat, HMOX1 genini 3.84 ± 0.04 kat, TNFAIP3 genini 2.13 ± 0.003 kat, TNFRSF10A genini 55.72 ± 0.005 kat, TNFRSF10B genini 27.47 ± 0.028 kat, NLRP12 genini 2.20 ± 0.012 kat arttırdığı görülmüştür ($p < 0.05$) (Tablo 4.8a). Diğer genlere ait ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığından dolayı ($p > 0.05$) gösterilmemiştir.

Tablo 4.8b. HCT-116 hücrelerine ait kontrol ve doz grubunda anlamlı düzeyde azalış görülen genler.

Gen adı	Azalış	p değeri
ATF 1	2.83	0.01344
BCL3	25.53	0.01368
BIRC2	2.04	0.00435
IL8	2.65	0.01228
ICAM1	3.93	0.00536
IKBKB	4.7	0.03537
NFKB1	25.99	0.02075
TLR1	5.05	0.00807
TLR2	3.43	0.04916
TNF	9.32	0.00612
IL-6	3.11	0.03451
RelA	18.37	0.02564

HCT-116 hücrelerine 48 saat boyunca doz muamelesinin, TF1 genini 2.83 ± 0.134 kat, BCL3 genini 25.53 ± 0.013 kat kat, BIRC2 genini 2.04 ± 0.004 kat, IL-8 genini 2.65 ± 0.122 kat, ICAM1 genini 3.93 ± 0.005 kat, IKBKB genini 4.74 ± 0.010 kat, NFKB1 genini 25.99 ± 0.020 kat, TLR1 genini 5.05 ± 0.0080 kat, TLR2 genini 3.43 ± 0.049 kat, TNF genini 9.32 ± 0.0061 kat, IL-6 genini 3.11 ± 0.0345 kat, RelA genini 18.37 ± 0.0256 kat azalttığı görülmüştür ($p < 0.05$) (Tablo 4.8b). Diğer genlere ait ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığından dolayı ($p > 0.05$) gösterilmemiştir.

Tablo 4.9a. HT-29 hücrelerine ait kontrol ve doz grubunda anlamlı düzeyde artış görülen genler.

Gen adı	Artış	p değeri
IL10	15.30	0.04977
CASP1	3.42	0.01019
CASP8	2.53	0.00929
IL1A	2.01	0.02688
IL1B	3.06	0.02380
TNFAIP3	12.46	0.04024
TNFRSF10A	9.58	0.01410
TNFRSF10B	3.93	0.01073
NFKBIA	5.18	0.00464

HT-29 hücrelerine 48 saat boyunca doz muamelesinin, IL-10 genini 15.30 ± 0.049 kat, CASP1 genini 3.42 ± 0.010 kat, CASP8 genini 2.53 ± 0.009 kat, IL1A genini 2.01 ± 0.0268 3.06 ± 0.0238 kat, TNFAIP3 genini 12.46 ± 0.040 kat, TNFRSF10A genini 9.58 ± 0.014 kat, TNFRSF10B genini 3.93 ± 0.010 kat, NFKBIA genini ise 5.18 ± 0.0046 kat arttırdığı görülmüştür ($p < 0.05$) (Tablo 4.9a). Diğer genlere ait ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığından dolayı ($p > 0.05$) gösterilmemiştir.

Tablo 4.9b. HT-29 hücrelerine ait kontrol ve doz grubunda anlamlı düzeyde azalış görülen genler.

Gen adı	Azalış	p değeri
IKBKB	2.50	0.00650
IL6	2.26	0.02111
IL8	2.35	0.00204
NFKB1	8.90	0.00615
TNF	2.40	0.04350
TLR1	3.08	0.01878
TLR2	2.60	0.00791
RelA	2.47	0.01585

HT-29 hücrelerine 48 saat doz muamelesinin, IKBKB genini 2.50 ± 0.006 kat, IL-6 genini 2.26 ± 0.0211 kat, IL-8 genini 2.35 ± 0.002 kat, NFKB1 genini 8.90 ± 0.0061 kat, TNF genini 2.40 ± 0.043 kat, TLR1 genini 3.08 ± 0.018 kat, TLR2 genini 2.60 ± 0.007 kat, RelA genini 2.47 ± 0.0158 kat azalttığı görülmüştür ($p < 0.05$) (Tablo 4.9b). Diğer genlere ait ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığından dolayı ($p > 0.05$) gösterilmemiştir.

4.7.2. Apoptotik Genlerin Ekspresyon Seviyelerine Ait Bulgular

Apoptotik yolak ile bağlantılı artış/azalış gösteren genlere ait kat değişimleri ve p değerleri ($p < 0.05$) Tablo 4.10'da verildiği gibidir.

Tablo 4.10. HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde apoptotik genlere ait ekspresyon değişimleri.

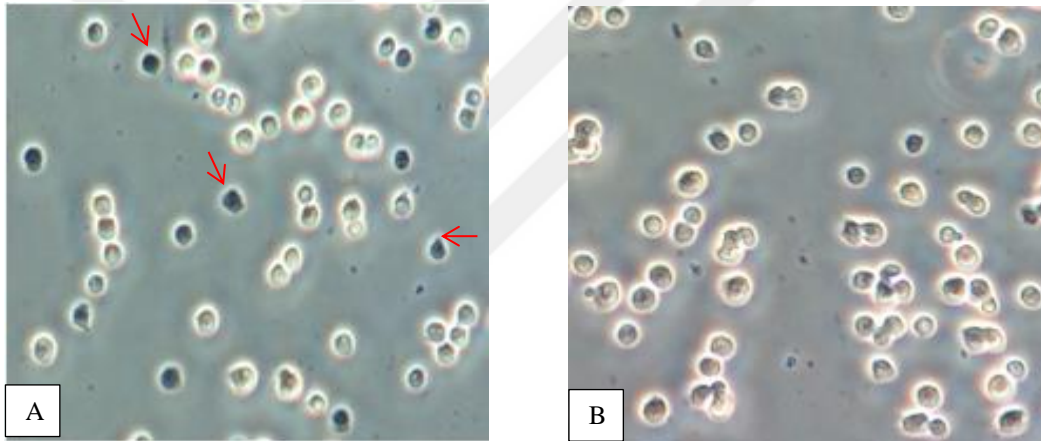
Sütun1	HCT116	p değeri	HT-29	p değeri
Artış				
p53	13.54	0.0016	2.06	0.0001
Bax	26.44	0.0012	3.24	0.0015
Kaspaz 3	16.50	0.0002	2.84	0.0469
Kaspaz 7	20.53	0.0021	41.79	0.0016
Kaspaz 8	17.51	0.0013	20.18	0.0116
Kaspaz 9	21.18	0.0032	26.08	0.0001
Fas	34.17	0.0002	33.47	0.0218
Cyts	23.02	0.0387	1.65	0.0143
Azalış				
Bcl-2	11.63	0.0001	2.25	0.0003

Ekstrenin IC_{50} dozunun her iki hücre hattına da 48 saat boyunca uygulanması sonrasında; HCT116 hücre hattında artış gösteren p53 geni 13.54 ± 0.0016 kat, Bax geni 26.44 ± 0.0012 kat, kaspaz 3 geni 16.50 ± 0.0002 kat, kaspaz 7 geni 20.53 ± 0.0021 kat, kaspaz 8 geni 17.51 ± 0.0013 kat, kaspaz 9 geni 21.18 ± 0.0032 kat, Fas geni 34.17 ± 0.0002 kat, Cyts geni 23.02 ± 0.0387 kat; HT-29 hücre hattında artış gösteren p53 geni 2.06 ± 0.0001 kat, Bax geni 3.24 ± 0.0015 kat, kaspaz 3 geni 2.84 ± 0.0469 kat, kaspaz 7 geni 41.79 ± 0.0016 kat, kaspaz 8 geni 20.18 ± 0.0116 kat, kaspaz 9 geni 26.08 ± 0.0001 kat, Fas geni 33.47 ± 0.218 kat, Cyts geni 1.65 ± 0.0143 kat artış göstermiştir ($p < 0.05$). Bcl-2 geni ise HCT116 hücre hattında 11.63 ± 0.0001 ve HT-29 hücre hattında 2.25 ± 0.0003 kat azalış göstermiştir.

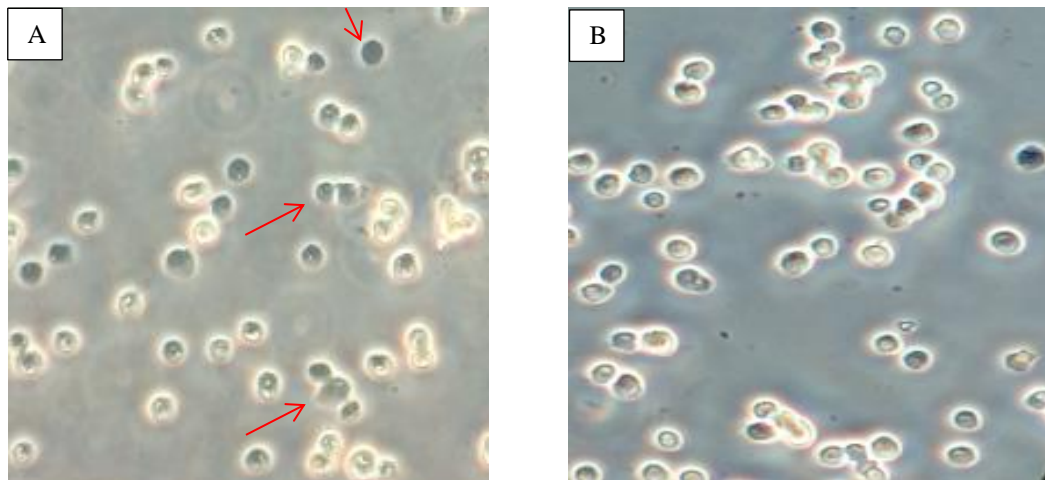
4.8. Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

4.8.1. TUNEL Bulguları

Apoptotik çekirdekleri görüntülemek için DeadEnd Colorimetric TUNEL Sistemi (Promega) üretici firmanın talimatlarına uyularak kullanılmıştır. Poly-L-lysine kaplı lamlara süspansiyon edilen hücreler damlatılmıştır. Pozitif kontrol, negatif kontrol ve doz grupları her biri 3'er lam olacak şekilde hazırlanmıştır. Görüntüleme inverted mikroskopta 20X büyütmede yapılmış ve Zen programına aktararak fotoğraflanmıştır. İstatistiksel analiz yapmak için her slayttan rastgele 4 alan seçilerek ortalama apoptoz yüzdesi (%); (apoptotik hücre sayısı/toplam hücre sayısı)×100 şeklinde hesaplanmıştır. Apoptotik hücreler kahverengi bir ürün veren peroksidaz raportör molekülü diaminobenzidin kullanılarak mikroskop altında görüntülenmiştir (Şekil 4.22, Şekil 4.23).

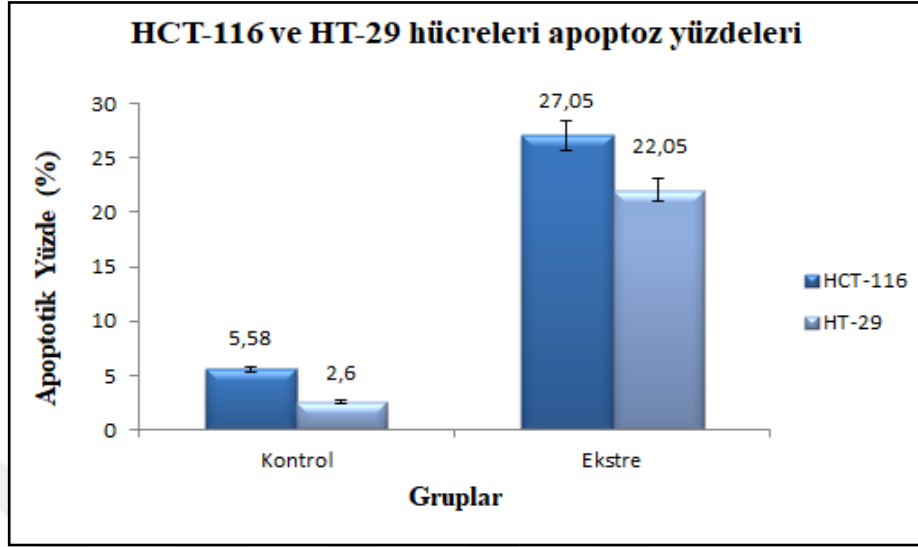


Şekil 4.22. 48 saat doz uygulanan HCT-116 hüresinin kolorimetrik TUNEL analizi görüntüsü.
A) Doz uygulanan hücre B) Kontrol hüresi



Şekil 4.23. 48 saat doz uygulanan HT-29 hüresinin kolorimetrik TUNEL analizi görüntüsü
A) Doz uygulanan hücre B) Kontrol hüresi.

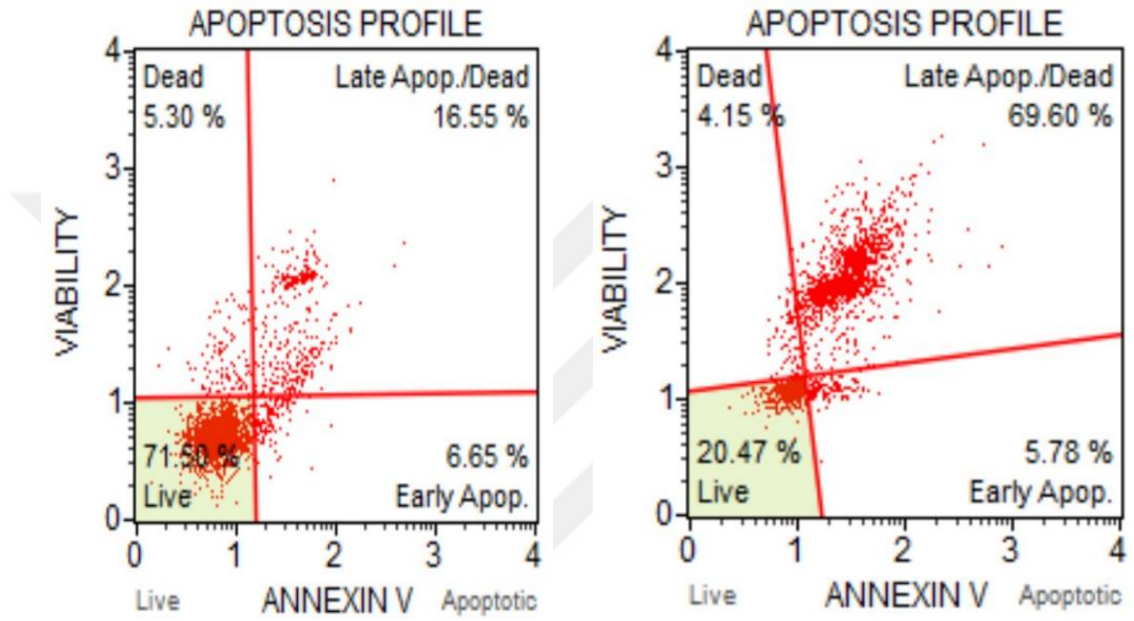
Kolorimetrik TUNEL testi sonucu HCT-116 hücresinde kontrol grubu 5.58 ± 3.51 , ekstre ise 27.05 ± 2.52 apoptotik yüzdeye sahip iken; HT-29 hücresinde kontrol grubu 2.26 ± 0.67 , ekstre ise 22.05 ± 1.53 olarak bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4.24).



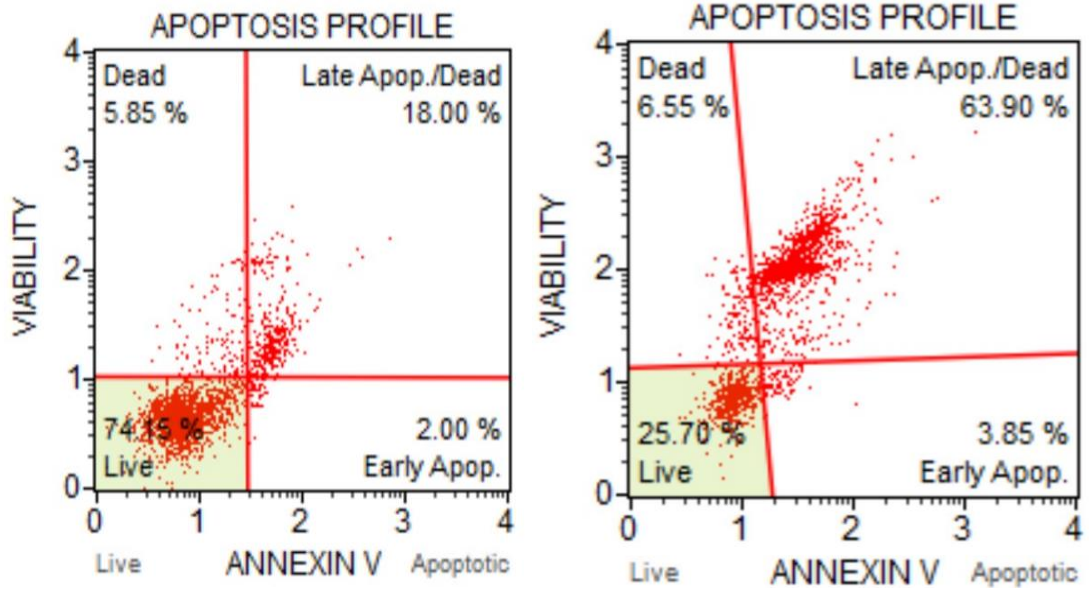
Şekil 4.24. Kontrol ve ekstreya ait ortalama apoptotik hücre yüzdeleri.

4.8.2. Akış Sitometrisi Bulguları

L. orientalis yaprak metanol ekstresinin HCT-116 hücrelerine 27.80 μ M ve HT-29 hücrelerine 43.13 μ M dozlarda uygulanması sonrasında canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücrelerinin kantitatif olarak analizine izin veren Muse™ Cell Analyzer cihazı ile akış sitometrisi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Deneysel 6 kuyulu plakalara her bir kuyuda 5×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir.



Şekil 4.25. HCT-116 hücre hattında kontrol (solda) ve ekstreye ait (sağda) apoptotik hücrelerin akış sitometri sonuçları.

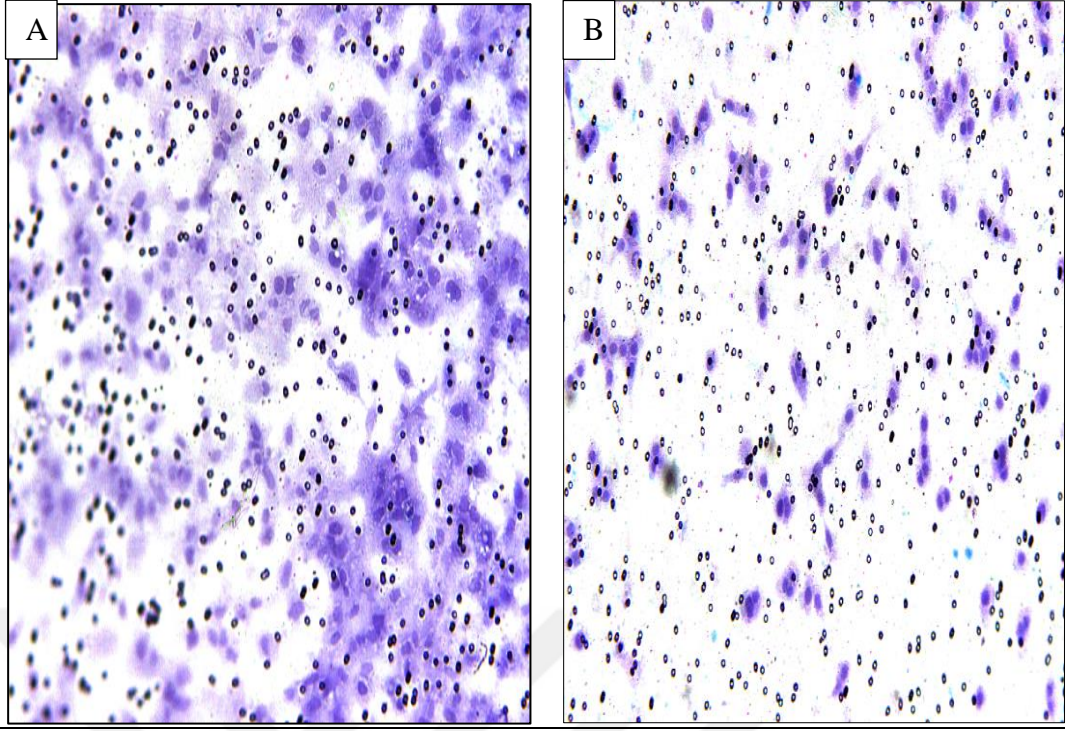


Şekil 4.26. HT-29 hücre hattında kontrol (solda) ve ekstreye ait (sağda) apoptotik hücrelerin akış sitometri sonuçları.

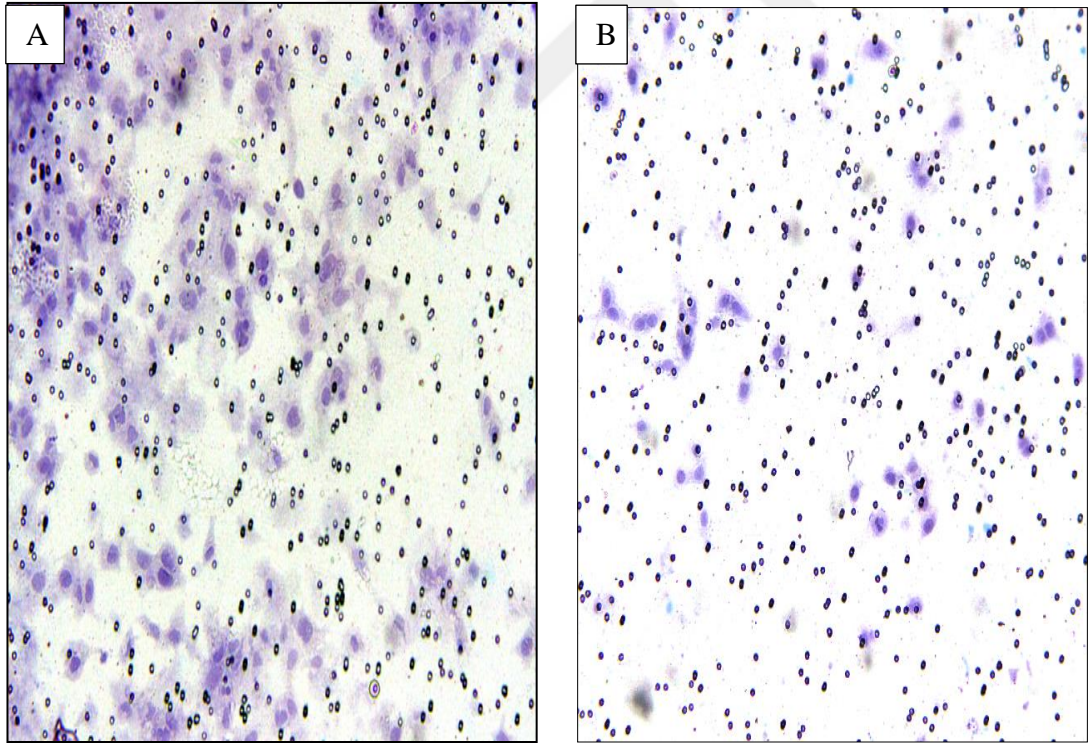
HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında 48 saat süre ile ekstre uygulanmasının Muse Annexin V testi ile ölçülmesi sonucu apoptozu uyardığı görülmüştür. Bu uyarım canlı, erken/geç apoptotik ve ölü hücrelerin kantitatif analizine izin veren akım sitometre ile AnneksinV-FITC Boyama yapılarak sitofluorometrik olarak analizlenmiştir. Buna göre HCT-116 hücrelerinin toplam apoptotik yüzdesi % 75.38, HT-29 hücrelerinin toplam apoptotik yüzdesi ise % 67.75 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.25, Şekil 4.26).

4.9. Hücre İnvazyonunun Belirlenmesi

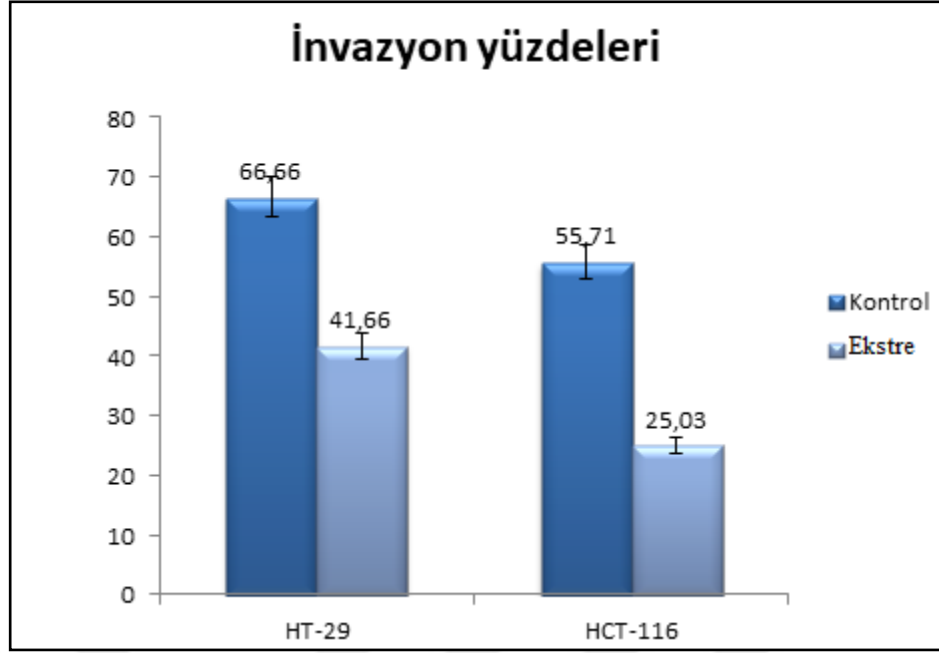
L.orientalis yaprak metanol ekstresinin HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde uygulanması sonucu invazyon davranışlarında ortaya çıkacak farklılıkların belirlenmesi İnvazyon Göç Testi ile gerçekleştirilmiştir. İnvaze olan hücreler mikroskop altında fotoğraflanarak ZEN programında sayılmıştır. Formüle göre invazyon yüzdesi hesaplanmıştır.



Şekil 4.27. HCT-116 hücresi kontrol grubunun (A) ve ekstreinin (B) matrijel invazyon testi sonrası mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.28. HT-29 hücresi doz grubunun (A) ve ekstreinin (B) matrijel invazyon testi sonrası mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.29. Kontrol ve ekstreye ait invazyon yüzdeleri.

Hem HT-29 hem de HCT-116 hücreleri metastatik potansiyele sahip invaziv kanser hücreleridir (Botchkina ve ark., 2009; Lavilla ve ark., 2011). *L.orientalis* yaprak metanol ekstresi ile 48 saat muamele sonrası invaze olan hücreler Zen programı yardımı ile sayılmıştır. Her iki hücre hattının invazyon görüntüleri Şekil 4.27 ve Şekil 4.28’de gösterildiği gibidir. HT-29 hücre hattının kontrol grubundaki invazyon oranı % 66.66 ± 0.8 ekstrenin uygulandığı grupta ise % 41.66 ± 2.3 olarak belirlenmiştir. HCT-116 hücre hattının kontrol grubundaki invazyon oranı % 55.71 ± 1.2 ekstrenin uygulandığı grupta ise % 25.03 ± 1.7 olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.29).

4.10. *L. orientalis*'in Anti-inflamatuvar Etkisinin in vitro Olarak Belirlenmesi

Besiyerine salgılanan sitokin miktarlarını ölçmek için kültür sıvıları her bir deney grubundan üçer tekrarlı olacak şekilde alınarak -80°C 'de saklanmıştır.

Ölçüm öncesinde bütün sıvılar ve kitlerin içerikleri oda sıcaklığına getirildikten sonra her bir standart ve örnekten üretici firmanın klavuzunda belirtilen miktarlarda ELISA kuyucuklarına eklenmiş, sonrasında kitlerin içeriğinde bulunan biotin konjugat $100 \mu\text{l}$ kuyucuklara eklenip belirtilen sürelerde inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında kuyucuklar yıkama solüsyonu ile yıkanarak ve Streptavidin-HRP çalışma solüsyonundan 100 µl eklenerek belirtilen süre kadar inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda yıkama işlemi tekrarlanmış ve ardından ortama 100 µl kromojen solüsyonu eklenmiştir. Yaklaşık 30 dk inkübasyon sonrasında reaksiyon 100 µl durdurma solüsyonu (Stop Solution) ile durdurularak spektrofotometrede (VersaMax, Molecular Device, USA) 450 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Ölçümler her örnek için üç kez tekrarlanmıştır.

4.10.1. *L. orientalis*'e Ait Yaprak Metanol Ekstresinin IL-6, IL-8 ve IL-10 Salınımı Üzerine Etkisi

L. orientalis yaprak metanol ekstresinin HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde TNF- α ile indüklenen pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını baskılayıp baskılamadığı araştırılmıştır.

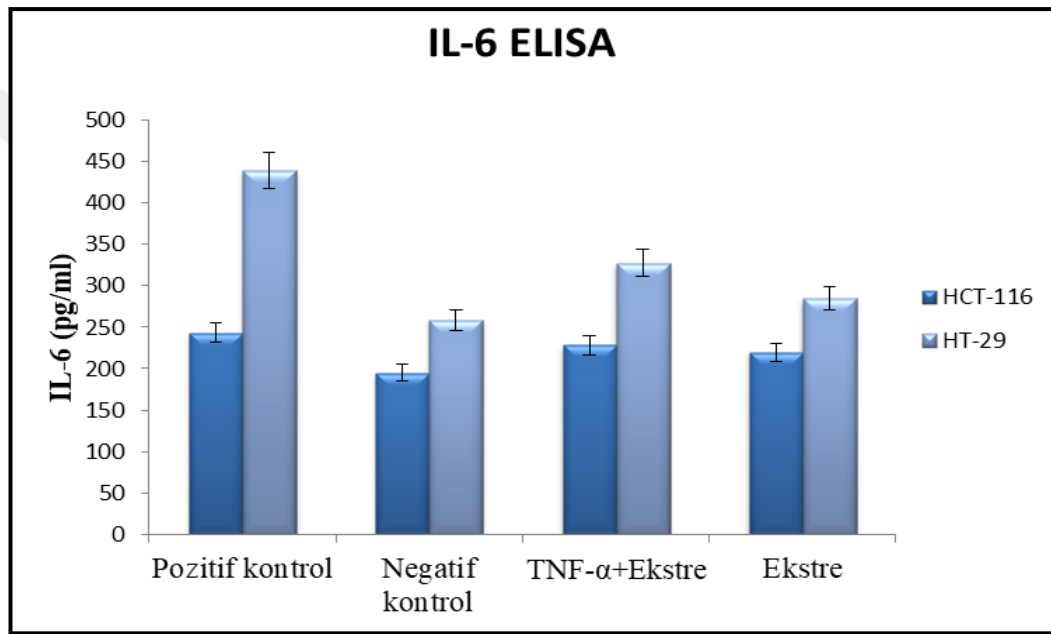
Çalışmamızda hücrelerde inflamasyon ortamı oluşturmak için human TNF- α (SigmaT6674) kullanılmıştır. HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin TNF- α 'ya verdikleri yanıt oldukça farklıdır. HCT-116 hücresi TNF- α 'ya duyarlı iken, HT-29 hücresi oldukça dirençlidir. TNF- α 'ya dirençli hücrelerin toksik etkili maddeler ile muamele edildiğinde, hücre ölümü ve DNA hasarını uyararak duyarlı hale geldikleri gösterilmiştir (Cabal-Hierro ve O'Dwyer, 2017).

Hücreler, 6 kuyulu plakalara (3 ml/kuyu) 3×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiş ve 37 °C'de CO₂ inkübatöründe 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, 24 saat süre ile *L. orientalis* yaprak metanol ekstresi HCT-116 ve HT-29 hücresi IC₅₀ dozları, TNF- α (20 ng/ml) ve doz ile TNF- α (20 ng/ml)'nin kombinasyonu ile muamele edilmiştir (Kim ve ark. 2005; Shi ve ark. 2017).

Doz uygulandıktan 24 saat sonra süpernatant toplanmış ve IL-10, IL-8 ve IL-6 seviyeleri üretici firmanın (Elabscience) önerdiği şekilde ELISA testi ile ölçülmüştür. Absorbansa karşı çizilen IL-10, IL-8 ve IL-6 konsantrasyon grafiğinde gözlenen noktaların en iyi uyum gösterdiği 3. dereceden polinom formülünde örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır. IL-10, IL-8 ve IL-6 seviyesindeki artış ya da azalış kontrole göre % değer üzerinden kıyaslanmıştır (Matsui ve ark., 2009).

4.10.1.1. IL-6 ELISA Bulguları

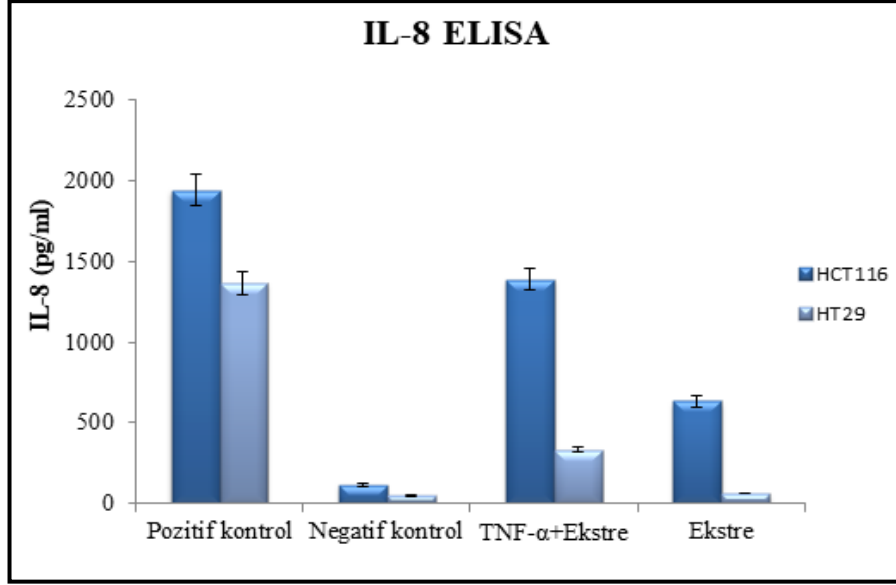
HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin IL-6 protein salınımı üzerine etkisi ELISA testi ile değerlendirilmiştir. Deney 3 tekrarlı olarak yapılmış ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. TNF- α ile ekstre birlikte uygulandığında kontrole göre IL-6 salınımının, HCT-116 hücrelerinde 6.35 ± 1.24 ; HT-29 hücrelerinde ise 25.54 ± 2.56 oranında azaldığı belirlenmiştir. *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin tek başına IL-6 salınımı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. TNF- α ile indüklenen hücrelerde IL-6 protein salınımı üzerine *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin etkisi.

4.10.1.2. IL-8 ELISA Bulguları

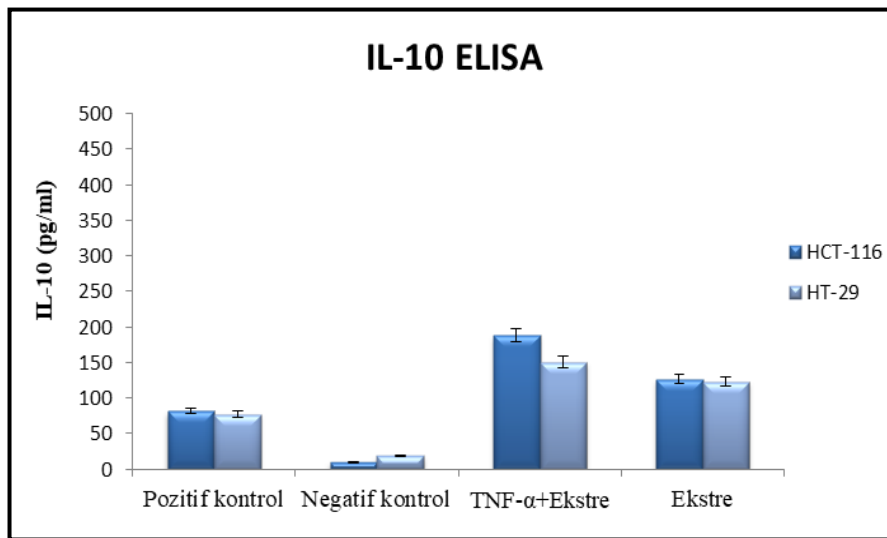
HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin IL-8 protein salınımı üzerine etkisi ELISA testi ile değerlendirilmiştir. Deney 3 tekrarlı olarak yapılmış ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. TNF- α ile ekstre birlikte uygulandığında kontrole göre IL-8 salınımının HCT-116 hücresinde 28.49 ± 0.97 ; HT-29 hücresinde ise 75.65 ± 3.12 olduğu gözlenmiştir. *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin tek başına IL-8 salınımı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. TNF- α ile indüklenen hücrelerde IL-8 protein salınımı üzerine *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin etkisi.

4.10.1.3. IL-10 ELISA Bulguları

TNF- α ile uyarılmış HT-29 ve HCT-116 hücrelerinde *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin IL-10 protein salınımı üzerine etkisi ELISA testi ile değerlendirilmiştir. Deneş 3 tekrarlı olarak yapılmış ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. TNF- α ile ekstre birlikte uygulandığında, HCT-116 hücrelerinde anti-inflamatuvar sitokin IL-10 salınımının kontrole göre 56.68 ± 2.34 , HT-29 hücrelerinde ise 48.67 ± 1.53 oranında arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. TNF- α ile indüklenen hücrelerde IL-10 protein salınımı üzerine *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin etkisi.

5. TARTIŞMA

Halk arasında ülser, gastrit gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ve yara iyileştirici amaçla kullanılan *L. orientalis*'in yaprak, meyve ve balsamından elde edilen ekstrelerin kolorektal kanser hücre hatlarında etkilerini değerlendirdiğimiz çalışmamız literatürde bu bitkinin etkilerinin hücresel ve moleküler düzeyde çalışıldığı ilk çalışmadır.

Ekstrelerin HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarında antioksidan, anti-proliferatif, anti-inflamatuvar ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi ve bu etkilerin NF- κ B yolağı üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğinin tespiti için çeşitli *in vitro* yöntemler kullanılmıştır. Anti-proliferatif etkinlik XTT testi ile, biyoaktif molekül içeriği LC-QTOF ile, gen ekspresyonu üzerindeki değişiklikler RT-PZR ile, apoptotik etkinlik TUNEL testi ve akış sitometrisi ile, hücre invazyonu üzerindeki etki invazyon testi ile, anti-inflamatuvar etki ise ELISA testi ile değerlendirilmiştir. Antioksidan ve anti-proliferatif etkinlik değerlendirmeleri bitkinin balsam, yaprak ve meyvesine ait tüm ekstreleri üzerinde gerçekleştirilmiş, XTT testi sonrasında en düşük dozda en yüksek sitotoksik etkiyi gösteren yaprak metanol ekstresi olduğu için sonraki LC-QTOF, RT-PZR, TUNEL, akış sitometri, invazyon ve ELISA analizlerine bu ekstre ile devam edilmiştir.

Çalışmamızda ilk olarak; *L. orientalis* balsam, yaprak ve meyvesi artan polaritedeki (*n*-hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol) çözücüler içerisinde ekstre edilerek her bir çözücüye farklı biyoaktif maddelerin geçmesi sağlanmıştır. Çözücü uzaklaştırıldıktan sonra kalan ekstrelerin sabit tartım sonrası verimleri hesaplanmıştır. Buna göre çalışmamızda en yüksek verime sahip ekstrelerin % 44.42 ile balsam kloroform, sonrasında ise % 36.05 ile yaprak metanol ekstresi olduğu belirlenmiştir.

Fenolik bileşikler; hidroksil grupları aracılığıyla serbest bir radikale bir hidrojen atomu bağlayabilirler. Serbest radikalın eşleşmemiş bir elektronu, fenolik bileşiklerin aromatik yapılarıyla yeniden şekillenebilir. Fenolik bileşiklerden polifenollerin; RONS'un olumsuz etkilerini nötralize ederek karsinogenezin önlenmesine yol açan güçlü antioksidanlar olduğu kanıtlanmıştır (Pandey ve Rizvi, 2009). Basit fenollerden olan fenolik asitler de serbest radikalleri süpürme

yeteneğindedir. Bu sebeple fenolik, flavonoit ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesinin, çalışılan bitkilerin hastalıkların patogenezinde etkili olma şiddeti ile paralellik gösterdiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda toplam fenolik içerik açısından en zengin ekstrenin 68.27 ± 0.30 GAE mg/g ile balsam kloroform olduğu belirlenmiştir. Daha sonra yaprak ekstresi içerisinde en yüksekten en düşüğe doğru etil asetat>metanol>*n*-hekzan, meyve ekstresi içerisinde ise en yüksekten en düşüğe etil asetat>metanol>*n*-hekzan olduğu tespit edilmiştir. Etil asetat ve metanol ekstreleri, *n*-hekzan ekstresine göre daha polar özellikte olduğundan bu ekstrelerdeki fenolik bileşiklerin miktarının yüksek olması beklenen bir sonuçtur. Diğer taraftan, *n*-hekzan ekstresinde terpenoitler ve lipitler gibi daha nonpolar yapıdaki bileşiklerin çözülmüş olabileceği düşünülmüştür.

Toplam flavonoit madde miktarlarına bakıldığında, 34.10 ± 1.73 QE mg/g ile balsam kloroform ekstresinin en yüksek içeriğe sahip olduğu, sonrasında ise yaprak ekstresi içerisinde en yüksekten en düşüğe doğru metanol>etil asetat>*n*-hekzan olarak belirlenmiştir. Meyve flavonoit miktarlarının birbirine çok yakın olmaları nedeniyle sıralama belirtilmemiştir.

ROS; karbonhidratlar, proteinler, lipidler ve DNA dahil olmak üzere biyomoleküllerde oksidatif hasarı uyaran ve pek çok redoks sürecinde üretilen serbest radikallerdir. ROS; ateroskleroz, Parkinson, Alzheimer, felç, artrit, kronik inflamatuvar, kanser ve diğer dejeneratif hastalıklar gibi birçok kronik hastalığın patogenezine aracılık eder (Halliwell ve Grootveld, 1987; McDermott, 2000).

Çalışmamızda ekstrelerin antioksidan aktiviteleri birbirine yakın olmakla birlikte, balsam kloroform ekstresinin $29.64 \mu\text{g/ml}$ IC_{50} değeri ile en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu, sonrasında ise en yüksekten en düşüğe doğru yaprak içerisinde etil asetat>metanol>*n*-hekzan; meyve içerisinde ise etil asetat>metanol>*n*-hekzan ekstrelerinin olduğu belirlenmiştir.

Biyolojik aktivite testleri sonucunda en yüksek aktiviteyi balsam kloroform ekstresinin gösterdiği ve yaprak ekstrelerinin meyve ekstrelerine göre daha yüksek aktivite sergilediği bulunmuştur.

Saraç ve Sen (2014)'in yaptığı çalışmada ise *L. orientalis* yaprak etanol ekstresinin IC₅₀ 3.11±0.024 mg/ml ile güçlü antioksidan aktivite gösterdiğini, fenolik içeriğinin ise 333.14±7.96 GAE mg/g olduğunu ortaya koymuşlardır. *L. formosana* yaprağına ait farklı ekstrelerin antioksidan aktiviteleri ve toplam fenolik, toplam flavonoid potansiyellerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, ekstrelerin butile hidroksitoluen'den daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği; antioksidan aktivite, fenolik ve flavonoid içeriğinin ekstreler arasında korelasyon göstererek etkinlik sırasının etanol>su>aseton şeklinde olduğu belirlenmiştir (Wang ve ark., 2010).

L. formosana'nın yaprak ekstresinin antioksidan aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada IC₅₀ 14.9 µg/ml ve total fenolik içeriği 147.4 mg GAE/g olarak bulunmuştur (Ho ve ark., 2012). *L.orientalis*'in antioksidan, anti-mikrobiyal ve anti-mutajenik aktivitesinin çalışıldığı diğer bir çalışmada ise, yaprak aseton, etanol ve metanol ekstrelerinden metanolün % 86 oranında serbest radikal inhibisyonuyla en yüksek aktiviteyi gösterdiği saptanmıştır (Okmen ve ark., 2014).

Ülkemize özgü bir tür olan *L. orientalis* ile ilgili olarak şimdiye kadar yapılan çalışmalar; biyolojik aktivite çalışmaları olup, daha çok bitkinin balsamı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Literatürde hücresel seviyede yapılan çalışma sayısının sadece iki tane olduğu görülmektedir. Bunlardan birincisinde insan lenfosit hücrelerine balsam uygulanmış, 48 saat süreyle 0.4 µg/ml'lik dozun hücre proliferasyonu üzerine inhibitör etkisinin olduğu bulunmuştur (Karadeniz ve ark., 2011). Diğer çalışmada ise; HeLa, A549, MCF-7, CaCo-2, mPANC96, PC-3, U87MG kanser hücre hatları ve HEK293 ve Vero normal hücre hatlarında; diklorometan ekstresinin 6.68-46.58 µg/ml IC₅₀ dozları aralığında en yüksek sitotoksik etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir (Nalbantsoy ve ark., 2016). Literatürde ülkemize özgü *L.orientalis*'in HCT-116 ve HT-29 kolon kanseri hücre hatları üzerine olan etkisi ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

L. formosana'nın yaprak ekstrelerinin S180 hücreleri üzerindeki anti-tümör aktivitesinin incelendiği bir çalışmada; kloroform, etil asetat, *n*-butanol ve su ekstrelerinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.238, 0.471, 0.844 ve 0.411 mg/ml olarak bulunmuştur. S180 hücrelerinde en düşük sitotoksik etkiyi kloroform ekstresinin gösterdiği belirlenmiştir (Zhong ve ark., 2013).

İnsan meme kanser hücre hattında yapılan bir çalışmada, *L. formosana* balsamından izole edilen 10 adet triterpen türevi bileşiğin 3.06-13.82 µg/ml aralığındaki IC₅₀ değerleri ile güçlü sitotoksik etki gösterdiği bulunmuş ve söz konusu triterpen türevi bileşiklerin anti-kanser etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür (Yang ve ark., 2011).

L. styraciflua türünde ise; yaprak ve kök esansiyel yağları servikal kanser hücrelerine (HeLa) uygulanmış ve MTT analiz sonuçlarına göre IC₅₀ değerleri sırasıyla 136.27 ve 119.78 µg/ml olarak bulunmuştur (El-Readi ve ark., 2013).

Aynı türün meyve ekstresi ile gerçekleştirilen bir diğer çalışmada özellikle PI3K/Akt/mTOR yolağını hedefleyen ve LIS-100 olarak adlandırılan organik bir fraksiyonun; pankreatik karsinom (PANC-1, BXPC3, AsPC-1), kolon karsinom (HCT-116) ve prostatik adenokarsinom (PC3, LNCaP, DU145) hücre hatlarına karşı potansiyel anti-kanser etkilerinin olduğunu belirlemiştir. LIS-100'ün 2015 yılında US 2015/0110862 A1 patent numarası ile Amerika'da patenti alınmıştır. LIS-100'ün bu hücre hatlarından prostat kanser hücrelerinde en güçlü sitotoksik etkiye (PC3 IC₅₀ 1.7 µg/ml, LNCaP IC₅₀ 2.5 µg/ml) sahip olduğu, diğer hücre hatlarında ise bu değerlerin 80-122 µg/ml arasında değiştiği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2015).

Çalışmamızda *L.orientalis* balsamından hazırlanan kloroform ve metanol ekstresi ile, yaprak ve meyvelerinden hazırlanan *n*-hekzan, etil asetat ve metanol ekstreleri, farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) hem HT-29 hem de HCT-116 hücre hatlarında çalışılmıştır. HT-29 hücre hattı XTT sonuçlarına göre, sitotoksik etkinliği en yüksek iki ekstrenin 24.43 µM ile balsam kloroform ve 43.13 µM ile yaprak metanol olduğu açığa çıkarılmıştır. HCT-116 hücre hattında ise en sitotoksik etkili iki ekstrenin 27.80 µM ile yaprak metanol ve 50.86 µM ile yaprak etil asetat olduğu bulunmuştur. Her iki hücre hattı da toplam flavonoit içerik ve antioksidan aktivite açısından sitotoksikite sonuçları ile paralellik göstermekle birlikte, bütün ekstrelerde HCT-116'nın HT-29'a göre daha çok örtüştüğü saptanmıştır.

Ek olarak, her iki hücre hattında da en düşük sitotoksik etkili ekstre yaprak *n*-hekzan ekstresidir. Bu sonuçlar % verim, toplam fenolik ve flavonoit miktar tayini sonuçları ile örtüşmektedir.

LC-ESI-QTOF-MS analizi sonucu *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinde kütüphane ile eşleşen analitler arasında; pirogallol, gallik asit, epigallokateşin, 3,4-dihidroksibenzoik asit, klorojenik asit, ferulik asit, mirisetin, kemferol, kersetin, luteolin başta olmak üzere çeşitli biyoaktif maddelerin varlığı tespit edilmiştir. *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin antioksidan, anti-kanserojenik, apoptotik ve anti-inflamatuvar etkinliğine dair elde ettiğimiz bulgular, LC-ESI-QTOF-MS analizi sonucu varlıklarını belirlediğimiz yukarıdaki biyoaktif maddelerin kolorektal kanserle ilişkileri gözönünde bulundurularak değerlendirilmiştir.

Fenolik bileşikler, şikimik asit yolağı aracılığıyla biyosentezlenen bitki sekonder metabolitleridir (Muzzalupo ve ark., 2011). Bu bileşiklerin anti-proliferatif, anti-inflamatuvar, hepatoprotektif ve diğer bazı tıbbi özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Pek çok aromatik bileşiğin biyosentez yolağı olan şikimik asit yolağında majör biyokimyasal aracı kinik asittir. Diyetle alınan kinik asit gastrointestinal sistemdeki triptofan ve nikotinamid sentezini teşvik eder. Bunların üretimindeki artışın ise NF-κB inhibisyonuna ve DNA tamirinin uyarılmasına yol açtığı bilinmektedir (Pero ve ark., 2009).

8000'den fazla farklı bileşiğe sahip olan polifenoller on farklı sınıfa ayrılabilir (Chahar ve ark., 2011). Fenolik bileşikler ve flavonoidler bu grubun bir parçasıdır ve kanserin iyileşme/televi sürecinde etkin rol oynadıkları bilinmektedir. Flavonoidler; flavonoller (örn; kateşin, epikateşin, epigallokateşin), flavonlar [flavonol (örn; luteolin, kemferol, myricetin, kersetin) ve flavononlar (örn; naringenin)], antosiyanidinler ve izoflavonoidler olarak sınıflandırılan çok geniş bir bitki sekonder metabolit grubudur (Nijeveldt ve ark., 2001; Batra ve Sharma, 2013).

Karakteristik polifenolik bileşiklerden olan kateşinler; (-)-epigallokateşin-3-gallat, (-)-epigallokateşin, (-)-epikateşin-3-gallat ve (-)-epikateşin olarak sınıflandırılabilir. Epigallokateşin metabolit ürünlerinden olan pirogallol; sert ağaç bitkilerinde yaygın olarak bulunan anti-fungal ve anti-psoriatik özellikleri ile bilinen bir bileşiktir. Pirogallol serbest radikaller özellikle, süperoksit anyonlar (O_2^- , H_2O_2 , OH^-) üretebilen bir indirgeyicidir. Bunlar hücre büyümesi, farklılaşması ve ölümü dahil çeşitli süreçlerde rol alır (Zorov ve ark., 2006). ROS'un aşırı üretimi veya antioksidan enzim kaybı nedeniyle oluşan oksidatif stres, hücre tipine bağlı olarak hücre ölümüne yol açan sinyalleşmeyi başlatır. Pirogallol'un çeşitli kanser tiplerinde

mitokondriyal membran potansiyeli ve O_2^- aracılı apoptotik hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (Park ve ark., 2008; Han ve ark., 2009).

Ekstremizde saptanan diğer bir bileşik olan gallik asit, pek çok kanserde kemopreventif potansiyele sahip olduğu bilinen bir hidroksibenzoik asittir. Gallik asitin mitokondri aracılı yolla kanser hücrelerinin apoptozunu tetiklediği, normal hücrelere zarar vermeden seçici toksisite gösterdiği, anti-invaziv ve anti-metastatik özelliklere sahip olduğu bulunmuştur (Liu ve ark., 2012; Berindan-Neagoe ve ark., 2012).

Fenolik bileşiklerden biri olan 3,4-dihidroksibenzoik asit (protokateşik asit-PCA); güçlü antioksidan etkili majör benzoik asit türevlerindedir. Ratlarda diyetle alınan günlük 100 ppm'lik miktarın karaciğer, kolon, pankreas ve gastrik karsinogeneze karşı güçlü koruma sağladığı gösterilmiştir. Bazı kanser hücrelerine PCA uygulanmasının; hücre adezyonu, IL-6 ve IL-8, VEGF ve ICAM-1 üretimini baskılayarak anjiyogenik ve metastatik etkileri azalttığı bildirilmiştir (Yi ve ark., 2009). PCA uygulanmış ratlarda, PCA'nın RhoB aktivasyonunu hedefleyerek Ras/Akt/NF- κ B yolağının inaktivasyonu yoluyla, MMP-2 ekspresyonunu inhibe ettiği böylece kanser hücre metastazını önlediği gösterilmiştir (Lin ve ark., 2011). Bir başka çalışmada, ülseratif kolit oluşturulmuş farelere PCA uygulandığında, kolon dokusunda COX-2 ve iNOS protein ekspresyonunun önemli derecede inhibe edildiği saptanmış ve PCA'nın bu kemopreventif rolü, anti-inflamatuvar özellikleriyle ilişkilendirilmiştir (Farombi ve ark., 2016).

Kolon kanseri hücre proliferasyonunu azaltan majör polifenollerden biri de klorojenik asittir. Bu bileşiğin kolon kanser hücre hatları (HCT-116 ve HT-29)'nda ROS üretimini uyararak hücre döngüsünü S-fazında durdurduğu ve ERK inaktivasyonu aracılığıyla hücre canlılığını inhibe ettiği bulunmuştur (Roy ve ark., 2017).

Ferulik asit bitkilerde oldukça bol bulunan bir fenolik asittir. EGFR'nin downregülasyonu yoluyla kolorektal kanser hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ortaya çıkarılmıştır (Roy ve ark., 2013). Ayrıca akciğer kanseri, meme kanseri ve merkezi sinir sistem tümörleri gibi çeşitli kanser türlerinde anti-neoplastik aktivite sergilemesinin yanısıra (Jayaprakasam ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2016),

Alzheimer, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve cilt hastalıklarının tedavisinde de etkili olduğu bulunmuştur (Lin ve ark., 2005; Roy ve ark., 2013; Alam ve ark., 2013; Sgarbossa ve ark., 2015).

Kolorektal kanserde anti-neoplastik özelliğe sahip olduğu bilinen bir flavonoit türü olan mirisetinin; kolon tümörlü ratlarda yalnızca tümörlü hayvan sayısında değil aynı zamanda tümör insidansında da önemli bir azalma sağladığı gösterilmiştir (Nirmala ve Ramanathan, 2011). Bir başka çalışmada, mirisetinin kolon kanseri hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranını artırdığı, mitokondriden sitozole AIF salınımını uyararak mitokondri aracılı apoptoza yol açtığı belirlenmiştir (Kim ve ark., 2014).

NF- κ B/COX-2 etkileşimi kolorektal adenokarsinom gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Mirisetinin, inflamatuvar faktörlerin (IL-6 ve IL-1 β , TNF- α ve COX-2) seviyelerini azaltarak ülseratif kolit ve kolorektal tümörögenез üzerinde inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. (Abdullah ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2018).

Flavonoit sınıfına ait olan kemferolün; HT-29 hücrelerinde siklin D1, E ve A, CDK2 ve 4'ün ekspresyonunu azalttığı, Rb'nin fosforilasyonunu baskıladığı, hem G1 hem de G2/M evresinde hücre döngüsünün inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Cho ve Park, 2013). Yine HCT-116 hücrelerinde G2/M evresinde hücre döngüsünü durdurduğu bildirilmiştir (Carmona ve ark., 2014). Bir başka çalışmada, DR5'in uyarılmasına yol açarak TRAIL reseptörlerinin upregülasyonu yoluyla apoptozu uyardığı saptanmıştır (Yoshida ve ark., 2008). Chen ve ark. (2012); kemferolün TNF- α , IL-1 β ve IL-6 dahil olmak üzere çeşitli pro-inflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimini inhibe edebildiğini ve farelerde LPS-ile uyarılan akut akciğer hasarında NF- κ B ve MAPK aktivasyonunu güçlü bir şekilde baskıladığını bildirmişlerdir. Wall ve ark. (2013); kaempferolün LPS-ile uyarılmış makrofajlarda NF- κ B'nin nukleusa translokasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. NF- κ B'nin kaempferol tarafından modülasyonu çeşitli inflamatuvar hastalık modellerinde de çalışılmıştır. Kemferolün NF- κ B-p65, p38 ve ERK 1/2 fosforilasyonunun inhibisyonu yoluyla romatoid artrit karşı koruyucu etkiye sahip olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak kemferolün NF- κ B'yi baskılayıcı etkisi anti-inflamatuvar aktivitede önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Rajendran ve ark., 2014).

Kersetinin EGFR/PI3K/Akt, NF- κ B yolağı ve MMP 2/9 sinyali yoluyla anti-proliferatif ve anti-migrasyon özellik gösterdiği bilinmektedir (Lai ve ark. 2013; Bhat ve ark., 2014). Caco-2 hücresinde yapılan bir çalışmada kersetinin, TLR4/NF- κ B yolağı aracılığıyla migrasyon ve invazyon ilişkili proteinlerin ekspresyonlarını baskıladığı gösterilmiştir (Han ve ark., 2016). Caco-2 ve SW-620 kolon kanser hücresinde yapılan başka bir çalışmada ise, kersetinin NF- κ B yolağını inhibe ettiği ve aynı zamanda Bcl-2 downregülasyonuna ve Bax upregülasyonuna yol açarak apoptozu uyardığı bulunmuştur (Zhang ve ark., 2015).

Ayrıca bitki ieriğimizde bulunan diğer bileşiklerden epigallocateşin, epikateşin, luteolin ve naringenin de anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi karsinogenez süreçlerinde anti-kanserojenik etki gösterdikleri rapor edilmiştir (Pang ve ark., 2009; Jeong ve ark., 2011; Weng ve Yen, 2012).

L.formosana yapraklarının ana bileşenlerinden biri fenolik asitler ve tanenlerdir. Yapraklar majör olarak gallik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, 3-metoksi-4-hidroksi-benzoik asit, 3,5-dihidroksi-4-metoksi-benzoik asit, 3,4-dihidroksi-benzoik asit, 3,4-dihidroksi-5-metoksi-benzoik asit içermektedir (Liao ve ark., 2014). *L.formosana*'da rutin, izokersetin, hiperin ve astragalin gibi flavonoid yapısında bileşiklerin de bulunduğu tespit edilmiştir (Ouyang ve ark., 2016). *L. formosana* yapraklarından kimyasal içerik analizinin yapıldığı bir diğer çalışmada, metanol ekstraktlarından β -sitosterol, α -amyrin, oleanolik asit olmak üzere 3 yeni bileşik izole edilmiştir (Cai ve Ruan, 2005).

L.styraciflua yaprak metanol ekstraktlarının karaciğer hasarı oluşturulan farelere oral yolla verilmesinin; fibroz şiddetini azalttığı, hepatik hücre yapısını normalize ettiği, karaciğer hasarına karşı önemli ölçüde koruma sağladığı gösterilmiştir. Yapraklarının kromatografik ayrımında gallik asit, kersetin, mirisetin, kasuartiktin, izorugosin tanımlanmıştır. Ekstrelerden izole edilen bu fenolik bileşiklerin tek başına ya da sinerjik etki yoluyla karışım halinde hepatik hücre hasarının geriye döndürülmesinden sorumlu olabileceği vurgulanmıştır. Bu nedenle *L.styraciflua* yapraklarının doğal etkili bir hepatoprotektif kaynak olabileceği düşünölmektedir (Eid ve ark., 2015).

L.styraciflua toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin biyoaktif komponentleri arasında; β -sitosterol, lupeol, oleanolik asit, ursolik asit, luteolin, kaempferol, 3-D- β -glukozit'e rastlanmıştır (Rashed ve ark., 2014). Çalışmamızın kromatografi verileri, ülkemize özgü bir tür olan *L.orientalis*'e ait ekstrenin de luteolin, kemferol, 3-D- β -glukozit içerdiğini doğrulamaktadır.

Saraç ve Sen (2014), *L. orientalis* yapraklarından hazırlanan etanollü ekstre üzerinde yaptıkları HPLC analizinde, ekstrede fenolik bileşiklerden, epikateşin (7.954 ± 0.493 mg/g ekstre), galik asit (3.258 ± 0.035 mg/g ekstre) ve protokateşik asit (12.232 ± 0.118 mg/g ekstre) varlığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızdaki yaprak metanol ekstresine ait LC-ESI-QTOF-MS sonuçları bu çalışmanın verileri ile örtüşmektedir.

L.orientalis Mill. var. *orientalis* ve *L. orientalis* var. *integriloba* yaprak uçucu yağlarının GC-MS analizi sonucunda, yüksek miktarda terpinen-4-ol, α -terpineol, sabinen, α -pinen, viridifloren and germakren D içerdiği saptanmıştır (Duru ve ark., 2002).

Kromatografik analizlerle saptadığımız pirogallol, mirisetin, eskulin, 4-O-metil-gallat, naringenin, naringenin-7-O-glukozit, piloretin, pilorizin ve kuinalizarin şimdiye kadar hiçbir *Liquidambar* türünde tanımlanmamış olan ve ilk kez çalışmamızda varlığı tespit edilen bileşenlerdir.

Fenolik bileşikler; MAPK'lar, siklin-bağımlı kinazlar, AP-1, NF- κ B ve büyüme sinyali gibi sinyal yolak bileşenlerinden bir veya daha fazlası ile etkileşerek anti-inflamatuvar etki gösterirler (Galati ve O'Brien, 2004; Soobrattee ve ark., 2006; Ho ve ark., 2010).

NF- κ B; sağkalım, inflamasyon ve immun yanıt gibi önemli fizyolojik süreçlere katılan çok geniş bir gen grubunun düzenlenmesinde rol alan transkripsiyon faktör ailesidir. NF- κ B'nın sürekli aktivasyonu çeşitli kanser tipleriyle ilişkilendirilmiştir. Bu yolağın düzenlenmesinde rolü olabilecek faktörleri tanımlayarak moleküler mekanizmasını aydınlatmak, kanser ve otoimmun hastalıkların tedavisine yönelik çözümler için önem arz etmektedir. NF- κ B'nın kanser hücreleri üzerindeki proliferatif, invaziv ve metastatik etkilerine ek olarak;

tümör gelişimini hem önleyen hem de artıran immün hücreleri de etkileyebilir (Pires ve ark., 2017).

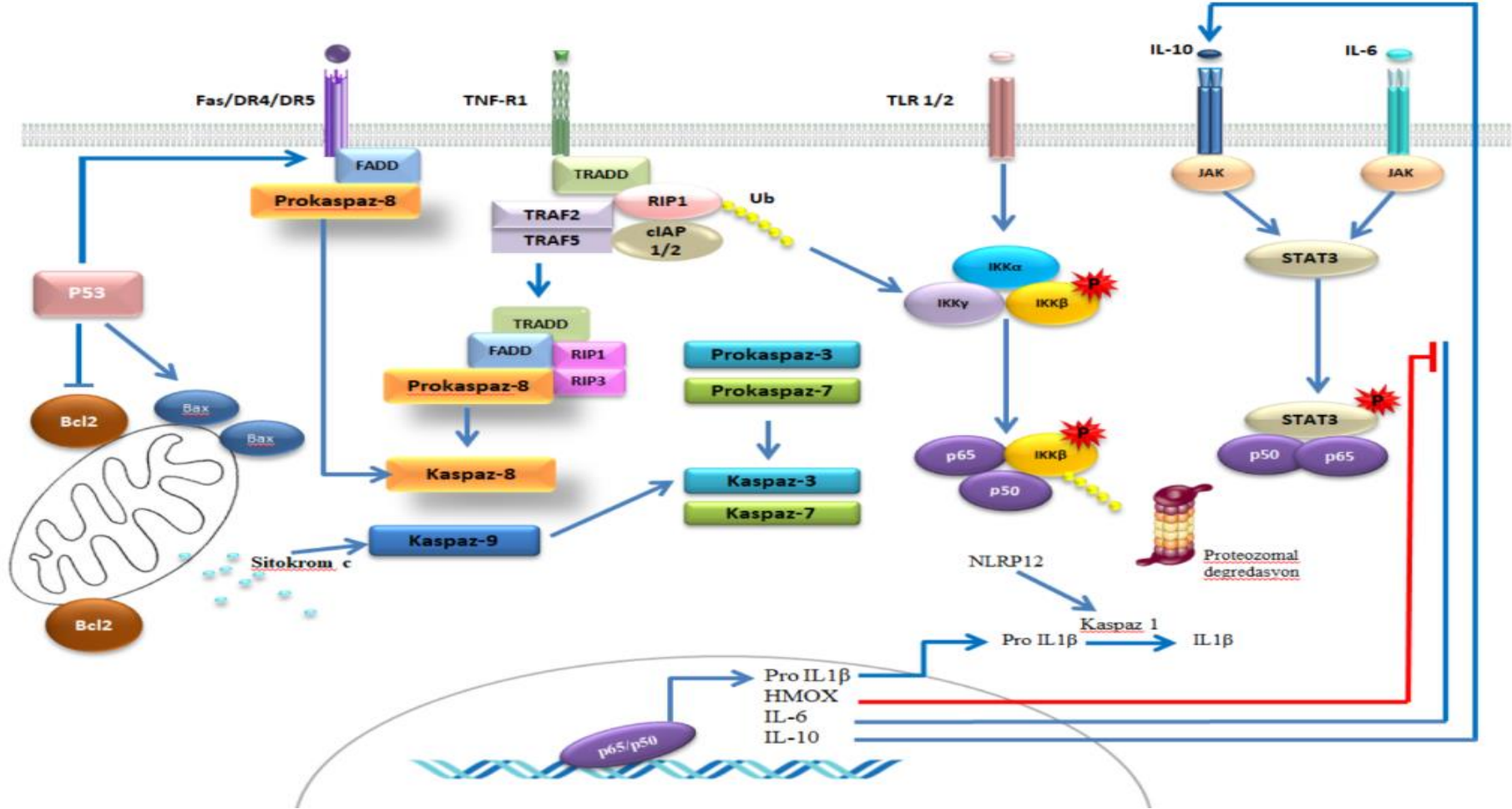
NF- κ B yolağının ayrı fakat birbiriyle etkileşen iki kolu vardır. Bunlardan biri TNF- α , TLR ve IL-1 tarafından uyarılan klasik yolak; diğeri ise LT β R, CD40L ve BAFF tarafından uyarılan alternatif yolaktır. Klasik yolda NF- κ B dimerlerinin, I κ B ailesinin inhibitör molekülleri tarafından nukleusa geçişi engellenir. Dimerlerin serbest kalması, TNFR, IL-1R, TLR, EGR gibi pro-inflamatuvar sinyaller tarafından aktive edilir. Bu reseptörler IKK α , IKK β , ve IKK γ (NEMO) kompleksini aktive edebilirler. Serbest kalan p65/p50 ve c-Rel/p50 dimerleri nukleusa transloke olur ve hedef genlerin ekspresyonlarını düzenler (Gupta ve ark., 2010). Alternatif yolda ise; IKK'lar yoktur fakat RelB/p100 kompleksi sitoplazmada inaktiftir. Bu yolak proteozomlar tarafından p100'ün p52'ye işlenmesini uyarır ve NF- κ B2/p100'ü doğrudan fosforilleyebilen IKK α 'nın aktivasyonu ile sonuçlanır. Nukleusta NF- κ B kompleksi hedef genlerin promotorlarında bulunan ve κ B bölgeleri olarak bilinen spesifik DNA dizilerine bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır (Hoesel ve Schmid, 2013).

Çalışmamızda kolon kanser hücre hatlarında *L.orientalis*'in muhtemel anti-inflamatuvar ve apoptoz mekanizmalarındaki rolünü, NF- κ B sinyal yolağı üzerinden gerçekleştirdiği hipotezimizi doğrulamayı amaçladık. Bu amaç doğrultusunda *L.orientalis* ekstresinin uygulandığı her iki hücre hattında da NF- κ B sinyal yolağı ile ilişkili 88 genin ekspresyon düzeyleri RT-PZR yöntemiyle değerlendirilmiştir. HCT-116 hücresinde kontrole göre ifade farklılıkları gösteren gen sayısının HT-29 hücresine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ekspresyon seviyesinde anlamlı derecede kat artış ve azalışı gösteren genlere ait detaylı bilgiler Tablo 4.8a, 4.8b, 4.9a ve 4.9b'de gösterildiği gibidir.

Her iki hücre hattında da ekspresyonları artış gösteren genlerin IL-10, CASP1, CASP8, TNFAIP3, TNFRSF10A ve 10B; azalış gösteren genlerin ise IL-6, IL-8, NFKB1, TNF, TLR2, IKBKB olduğu saptanmıştır. Sadece HCT-116 hücresinde ekspresyonu artan genlerin CHUK, HMOX1 ve NLRP12, azalan genlerin ise AGT, ATF1, BCL3, BIRC2 (cIAP), ICAM1, LTB, MALT1, IL1B, IL1R1 olduğu; HT-29 hücre hattında ise ekspresyonu artış gösteren genlerin IL1A, IL1B ve NFKBIA olduğu belirlenmiştir (p<0.05).

NF- κ B sinyal yolağı ilişkili reseptörlerden biri olan, Fas reseptörüne ligandının bağlanmasıyla Fas ilişkili ölüm domaini FADD ve prokaspaz 8'den oluşan DISC (death inducing signalling complex) kompleksinden, prokaspaz-8 ayrılarak aktif kaspaz 8'e dönüşür. Aktif kaspaz 8, hücrel substratları hedefleyen ve hücrenin apoptoza girmesine yol açan pro-kaspaz 3 ve pro-kaspaz 7'nin işlenerek aktif forma dönüşmesine neden olur. NF- κ B sinyal yolağı aracılı reseptörlerden bir diğeri TNF-R1'dir. Ligand reseptörüne bağlandığında TRADD, TRAF 2/5, cIAP 1/2, RIP1 kompleksi oluşur. Bu kompleks içerisinde yer alan RIP1 proteini, hücrenin sağkalım ya da ölüm kararını yönlendirir. RIP1'in, cIAP 1/2 aracılı übikütinasyonu NF- κ B aktivasyonuna yol açar. Diğer taraftan RIP1'in übikütinlenmediği durumda komplekse FADD ve pro-kaspaz 8'in eklenmesiyle apoptozun uyarılması için pro-kaspaz 8, kaspaz 8'e dönüşür. Bu da kaspaz 3 ve 7'yi aktive ederek hücre ölümünü başlatır. DNA hasarı durumunda, p53 mitokondri aracılı apoptozu uyarmak üzere Bax'ı aktive ederken, Bcl-2'yi ise inhibe eder. Mitokondriden salınan sitokrom c, kaspaz 3 ve 9'u aktifleştirir. TLR1 ve TLR2 reseptörleri, TNF-R'den farklı olarak uyarıldıklarında ise yalnızca NF- κ B sinyalizasyonu aktive olur. Bu aktivasyon ile çeşitli kinazlar tarafından IKK α (CHUK), IKK β ve IKK γ kompleksi etkin hale getirilir. Bu kompleksten fosforile olan IKK β , p65/p50 NF- κ B dimeri ile birleşir. Sonrasında fosforillenen IKK β , übikütinlenerek proteozomal yıkıma uğrar. Böylece serbest kalan p65/p50 NF- κ B dimeri nukleusa geçerek hedef genlerinin transkripsiyonunu gerçekleştirir (Pires ve ark., 2017).

NF- κ B'nın hedef genlerinden olan IL-10 ve IL-6 ligandları reseptörleriyle etkileşerek JAK/STAT yolağını aktifleştirir. STAT3'ün fosforilasyonu; sitoplazmada p50/p65 dimerleriyle kompleks oluşturarak nukleusa geçer ve yeniden IL-6 ve IL-10'un transkripsiyonunu uyarır (Hämäläinen ve ark., 2007). IL-1, IL-6 ve TNF- α ; HMOX1 tarafından inhibe edilerek reseptörleriyle yeniden bağlanmaları engellenir. Hücre içi stres durumunda, normalde inaktif formda bulunan NLRP12 ve pro-kaspaz 1 inflamazom kompleksini oluşturur. Pro-kaspaz 1, kaspaz 1'e dönüşerek NF- κ B hedef genlerinden Pro-IL-18 ve Pro-IL-1 β 'nin IL-18 ve IL-1 β formunu oluşturmasını sağlar (Tuncer ve ark., 2014). NF- κ B yolağı ile ilişkili olan ekspresyonlarını değerlendirdiğimiz ve kontrole göre anlamlı değişiklik gösteren genlerin protein ürünlerinin yolaktaki fonksiyonları Şekil 4.30'da özetlenmiştir. Ekspresyon artış ve azalışları Tablo 4.8a, 4.8b, 4.9a, 4.9b'de gösterilmiştir.



Şekil 4.33. *L.orientalis* yaprak metanol ekstresinin kolon kanser hücre hatlarında NF-κByolağı aracılı anti-proliferatif ve apoptotik etki mekanizması.

Apoptozun morfolojik olarak değerlendirilmesinde kullandığımız yöntemlerden biri olan TUNEL testi sonucuna göre; ekstrenin her iki hücre hattında da kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde apoptozu teşvik etmiştir ($p < 0.05$).

L. formosana'nın yapraklarından elde edilen kloroform ekstresinin apoptotik etkisinin belirlendiği bir çalışmada, akış sitometrisi ile çift boyama (Annexin V/propidyum iyodür) yapılmış; hücreler tipik apoptotik morfolojik değişiklikler sergilemiş ve ilaç konsantrasyonu 0.025 mg/ml olduğunda, erken apoptoz oranının % 3.88 ve geç apoptoz oranının ise % 3.86 olduğu, ilaç konsantrasyonu 0.05 mg/ml olduğunda ise, erken apoptoz oranı ve geç apoptoz oranının sırasıyla % 4.05 ve % 4.21 olduğu belirlenmiştir (Zhong ve ark., 2016).

Çalışmamızda ise *L. orientalis*'in yapraklarından elde edilen metanol ekstresinin apoptotik etkisi çift boyama yapılarak akış sitometrisi değerlendirilmiş; her iki hücre hattında da *L. orientalis* yaprak ekstresinin uygulandığı hücrelerin apoptoz oranları uygulanmamış kontrol hücrelerinin apoptoz oranlarına göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Ekstrenin uygulandığı HCT-116 hücre hattında toplam apoptotik yüzde, % 75.38 erken/geç apoptoz = % 5.78/ % 69.6) ve HT-29 hücre hattında toplam apoptotik yüzde % 67.75 (erken/geç apoptoz = % 3.89/%63.90) olarak belirlenmiştir.

L. orientalis yaprak metanol ekstresi uygulaması her iki hücrede de invazyon oranının kontrole göre önemli ölçüde azalmasına yol açmıştır. HCT-116 hücrelerinde kontrole göre invazyon oranı % 55.71 iken, ekstre uygulamasında invazyon oranı % 25.03'e; HT-29 hücrelerinde kontrolde invazyon oranı % 66.66 iken, ekstre uygulamasında invazyon oranı % 41.66'ya düşmüştür. *L. orientalis* yaprak metanol ekstresi her iki hücre hattında invazyonu baskılamakla birlikte en çok HCT-116 hücrelerinde anti-anjiyogenik etki göstermiştir.

Karsinogenez sürecinin önemli bir yönü de inflamasyon gelişimidir. Örn; prostaglandinler inflamasyon araçlarıdır ve kronik inflamasyon karsinogeneze yatkınlık kazandırır. İndüklenebilir COX-2'nin aşırı ekspresyonu; araşidonik asitin prostaglandinlere dönüşümünde kritik bir adımı katalize eder ve mitojenler, sitokinler ve bakteriyel LPS gibi pro-inflamatuvar uyarılarla uyarılarak kolon,

akciğer, meme ve prostat karsinogenezine katkıda bulunur. Fenolik asitlerin ise inflamasyonla bağlantılı transkripsiyon faktörlerini (prostoglandinler, sitokinler, COX-2, LOX, iNOS) inhibe ettiği gösterilmiştir (Rosa ve ark., 2016).

Tümör mikroçevresinde TNF- α 'nın yüksek ekspresyonu malign tümörün ortak bir özelliğidir. İnflamasyon ve kanser ile bağlantılı sitokinlerden biri olan IL-6, kanser hücre proliferasyonu ve invazyonu için gerekli bir sitokindir. Çalışmamızda TNF- α ile uyarılmış HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarından elde edilen süpernatantlarda IL-6 düzeyinin sitotoksik dozda *L.orientalis* yaprak metanol ekstresi tarafından baskılandığı bulunmuştur. Han ve ark. (2016), bizim ekstreminde de bulunan kersetin bileşimini Caco-2 hücre hattına uygulamışlar ve TNF- α , COX-2 ve IL-6 düzeylerinin doza bağımlı bir şekilde baskılandığını göstermişlerdir.

Kim ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada, HT-29 hücrelerini TNF- α uyarımından 30 dakika önce çeşitli konsantrasyonlarda luteolin ile muamele etmişlerdir. TNF- α uyarımından altı saat sonra hücre süpernatantları içerisindeki IL-8 seviyelerini ELISA ile ölçmüşler ve IL-8 seviyesinin, zamana bağlı olarak istikrarlı bir şekilde baskılandığını görmüşlerdir. Bu sonuçlar luteolinin, I κ B degradasyonu ve NF- κ B aktivasyonunu takiben MAPK'ların fosforilasyonunu bloke ederek bağırsak epitel hücrelerinde TNF- α ile indüklenen IL-8 üretimi üzerinde engelleyici etkilere sahip olduğunu göstermiştir.

IL-8 salınımı üzerine AL-PS denilen membranın etkilerinin incelendiği bir çalışmada; Caco-2 hücreleri, 2 saat boyunca farklı konsantrasyonda AL-PS (0.001, 0.01, 0.1, 0.5 ve 1 mg/ml) ile muamele edilmiş ve sonra 2 ng/ml TNF- α ile 4 saat süreyle inkübe edildiğinde IL-8 salınımının inhibe edildiğini görmüşlerdir. AL-PS'nin tek başına hücrelere uygulanmasının ise IL-8 salınımı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını belirlemişlerdir (Shi ve ark., 2014).

Setaria italica (darı) iç kabuğu polifenollerinin, LPS uyarımlı HT-29 hücrelerinde ve nude farelerde, NF- κ B p65 nükleer translokasyonunu bloke ederek, IL-10 seviyesini arttırırken; IL-1 β , IL-6 ve IL-8 seviyelerini azaltarak anti-inflamatuvar etki gösterebileceği ortaya konulmuştur (Shi ve ark., 2017).

Ma ve ark. (2017)'nin yapmış olduğu *in vivo* çalışmada *L. formosana* ile muameleden sonra serumdaki TNF- α , IL-6 ve IL-1 β düzeylerinin azaldığı, IL-10

düzeyinin ise arttığı ELISA testi ile gösterilmiş ve *L. formosana*'nın inflamatuvar mediyatörlerin salınımını düzenleyebileceği ileri sürülmüştür.

El-Readi ve ark. (2013), *L. styraciflua*'nın anti-inflamatuvar etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarında, HepG2 hücrelerini bitkinin yaprak yağı, kök yağı ve indometasini (bir prostaglandin sentaz inhibitörü) LPS ile birlikte uyarmışlar ve kök yağının yaprak yağından daha fazla 5-lipoksijenazın (5-LOX) ve prostaglandinin E2 (PGE2) üretimini inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarının TNF- α 'ya duyarlılıkları arasında farklılık olduğu belirlenmiştir. HCT-116 hücre hattı, HT-29 hücre hattına göre TNF- α uyarımına daha duyarlıdır. Ancak hücre hatları tek başlarına TNF- α 'nın etkisine dirençli olsa bile, 30 ng/ml TNF- α ve ekstre birlikte uygulandığında, sitotoksitenin artışına yol açtığı gözlenmiştir. Bu bulgumuz Cabal Hiero ve O'Dwyer (2017)'nin çalışmaları ile uyumludur. TNF- α ile ekstre birlikte uygulandığında HCT-116 hücre hattında kontrole göre IL-6 salınımının % 6.35 ± 1.24 , IL-8 salınımının % 28.49 ± 0.97 azaldığı, IL-10 salınımının ise 56.68 ± 2.34 arttığı; yine TNF- α ile ekstre birlikte uygulandığında HT-29 hücre hattında IL-6 salınımının % 25.54 ± 2.56 ve IL-8 salınımının % 75.65 ± 3.12 azaldığı, IL-10 salınımının ise % 48.67 ± 1.53 arttığı saptanmıştır. Bu bulgular, bitkinin anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışma bulgularımıza göre *L. orientalis* ekstrelerinden en düşük dozda en yüksek sitotoksik etkiye sahip ekstrenin yaprak metanol ekstresi olduğu saptanmıştır. Biyolojik aktivite tayinlerine ait verilerimiz fitokimyasal analiz sonuçlarını destekler niteliktedir. Yaprak metanol ekstresinin her iki kolon kanser hücre hattında da IC₅₀ dozları uygulandığında, anti-proliferatif ve apoptotik etki gösterdiği ve bu etkiyi NF-kB yolağını baskılayarak gerçekleştirdiği gözlenmiştir.

Literatür incelendiğinde ekstrenin kromatografik analizinde gözlenen aktif bileşiklerin birçoğunun, tek başlarına uygulandıklarında anti-proliferatif ve apoptotik etkiye sahip oldukları görülmektedir. Dolayısıyla ekstremiz de total olarak hücre hatlarına uygulandığında benzer etkiler göstermiştir. Ancak ekstremizde saptadığımız bu bileşiklerin tek başına mı yoksa birbirleriyle etkileşim göstermek suretiyle sinerjik olarak mı etkili olduğunun anlaşılabilmesi için ileri fitokimyasal analizlerin yapılması gerekmektedir. İzolasyon ve miktar tayini çalışmaları ile ana bileşenlerin yapılarının ve ekstredeki miktarının belirlenmesi, *L. orientalis*'in anti-kanser etkisinin realize edilmesi, bitkinin terapötik amaçlarla kullanımının yönlendirilmesi ve muhtemel tedavi kombinasyonlarının oluşturulması konusunda katkıda bulunacaktır. Ayrıca çalışmanın bundan sonraki safhasını ekstrenin terapötik etkinliğini değerlendirmek üzere *in vivo* çalışmalar oluşturacaktır.

7. KAYNAKLAR

Abdullah M, Rani AA, Sudoyo AW, Makmun D, Handjari DR, Hernowo BS. Expression of NF- κ B and COX2 in colorectal cancer among native Indonesians: the role of inflammation in colorectal carcinogenesis. *Acta Med. Indones.* 2013; 45: 187–192.

Ackerman D, Simon MC. Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment. *Trends Cell Biol.* 2014; 24(8):472-8.

Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci.* 2001; 26: 61-66.

Aggarwal BB, Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009; 9(4): 351-69.

Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol.* 2006; 72 (11):1605-21.

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3(9), 745–756.

Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2007; Vol.2 No.4.

Alam MA, Sernia C, Brown L. Ferulic acid improves cardiovascular and kidney structure and function in hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2013; 61: 240-249.

Amersi F, Agustin M, Ko CY. Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and health services. *Clin Colon Rectal Surg.* 2005; 18: 133-40.

Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceut. Res.* 2008; 25, 9.

Aravindan S, Natarajan M, Herman TS, Awasthi V, Aravindan N. Molecular basis of 'hypoxic' breast cancer cell radio sensitization: phytochemicals converge on radiation induced Rel signaling. *Radiat Oncol.* 2013; 8:46.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signalling and modulation. *Science.* 1998; 281(5381): 1305–1308.

Avunduk S, Kacar A. In vitro biological activity of *Liquidambar orientalis* Mill. against pathogen and marine biofilm microorganisms. *J. Pure App. Microbiol.* 2013; 7(4):28852889.

Aykan NF, Yalçın S, Turhal NS, Özdoğan M, Demir G, Özkan M, Yaren A, Camcı C, Akbulut H, Artaç M, Meydan N, Uygun K, Işıkdöğün A, Ünsal D, Özyılkan Ö, Arıcan A, Seyrek E, Tekin SB, Manavoğlu O, Özet A, Elkıran T, Dişçi R. Epidemiology of colorectal cancer in Turkey: A cross-sectional disease registry study. *Turk J Gastroenterol.* 2015; 26: 145-53.

Bag GC, Devi PG, Bhaigyabati Th. Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three *Hedychium* Species of Manipur Valley. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2015; 28: 154-159.

Bahnassy AA, Zekri AR, Salem SE. Differential expression of p53 family proteins in colorectal adenomas and carcinomas: prognostic and predictive values. *Histol Histopathol.* 2014; 29(2): 207–16.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science.* 1989; 244 (4901): 217-21.

- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357(9255): 539-45.
- Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(5): 361-71.
- Baquet CR, Commiskey P. Colorectal cancer epidemiology in minorities: A review. *J Assoc Acad Minor Phys*. 1999; 10: 51-8.
- Barker N, van de Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. *Genes Dev*. 2008; 22, 1856-1864.
- Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NFkappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999; 18, 6910-24.
- Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor – kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997; 336: 1066-71.
- Basim E, Basim H, Özkan G, Sağdıç O. Antibacterial activity of the methanol extracts of two endemic *Sideritis* species of Turkey against plant pathogenic bacteria. *Sci. Res. Essays*. 2012; 7(48): 4146 - 4150.
- Bates RC, Mercurio AM. “Tumor necrosis factor- α stimulates the epithelial to mesenchymal transition of human colonic organoids.” *Molecular Biology of the Cell*. 2003; 14 (5): 1790– 1800.
- Batra P, Sharma AK. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*. 2013; 3: 439-459.
- Bayazit V. Effects of Sweet Gum (*Liquidambar orientalis*), Mulberryleaves (*Morus alba*) and the larval ganglion extracts of Silk worm (*Bombyx mori*) on stroke parameters (hemoglobin, strokin, cortexin, frontalin, temporalin, parietalin, occipitalin, brain ventriculin, hemorrhagicclot) in rabbits (*Lepus capensis*). *J Anim Vet Adv*. 2009; 8, 2164-2170.
- Beck DE, Roberts PL, Saclarides TJ, Senagore AJ, Stamos MJ, Nasser Y. *The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery*. 2016, 3rd Edition, New York, USA, p:417-418.
- Belli C, Trapani D, Viale G, D'Amico P, Duso BA, Della Vigna P, Orsi F, Curigliano G. Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2018; 65: 22-32.
- Benson AB. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J Manag Care Pharm*. 2007; 3rd, 13(6 Suppl C): S5-18.
- Berindan-Neagoe I, Braicu C, Tudoran O, Balacescu O, Irimie A. Early apoptosis signals induced by a low dose of epigallocatechin 3-gallate interfere with apoptotic and cell death pathways. *J Nanosci Nanotechnol*. 2012; 12(3): 2113-9.
- Bhat FA, Sharmila G, Balakrishnan S, Arunkumar R, Elumalai P, Suganya S. Quercetin reverses EGF-induced epithelial to mesenchymal transition and invasiveness in prostate cancer (PC-3) cell line via EGFR/PI3K/Akt pathway. *J Nutr Biochem*. 2014; 25: 1132-9.
- Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005; 6(8): 611-622.
- Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 1958; 181: 1199-1200.
- Bond JH. Update on the detection, management and follow-up of colorectal polyps. *Practical Gastroenterol*. 1997; 21, 15-29.
- Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2004; 25: 280-8.

Botchkina IL, Rowehl RA, Rivadeneira DE, Karpeh MS Jr, Crawford H, Dufour A, Ju J, Wang Y, Leyfman Y, Botchkina GI. Phenotypic subpopulations of metastatic colon cancer stem cells: genomic analysis. *Cancer Genomics Proteomics*. 2009; 6(1): 19-29.

Botteri E, Iodice S, Bagnardi V. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*. 2008; 300:2765.

Bousvaros A, Antonioli DA, Colletti RB. North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition; Colitis Foundation of America. Differentiating ulcerative colitis from Crohn disease in children and young adults: report of a working group of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the Crohn's and Colitis Foundation of America. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007; 44(5): 653-674.

Brattain MG, Brattain DE, Sarrif AM, McRae LJ, Fine WD, Hawkins JG. Enhancement of growth of human colon tumor cell lines by feeder layers of murine fibroblasts. *J Natl Cancer Inst*. 1982; 69: 767771.

Brethauer M, Kalager M, Adami HO. Do's and don'ts in evaluation of endoscopic screening for gastrointestinal cancers. *Endoscopy*. 2016; 48 (1): 75-80.

Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res*. 1998; 58, 1408- 1416.

Brown S, Heinisch I, Ross E, Shaw K, Buckley CD, Savill J. Apoptosis disables CD31 mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature*. 2002; 418: 200-203.

Cabal-Hierro L, O'Dwyer PJ. TNF Signaling through RIP1 Kinase Enhances SN38-Induced Death in Colon Adenocarcinoma. *Mol Cancer Res*. 2017; 15(4): 395-404.

Cairns RA, Hill RP. Acute hypoxia enhances spontaneous lymph node metastasis in an orthotopic murine model of human cervical carcinoma. *Cancer Res*. 2004; 64, 2054-2061.

Cai Y, Ruan J. Studies on the chemical constituents from the leaf of *Liquidambar formosana* Hance. *Zhong Yao Cai*. 2005; 28(4):294-5.

Calixto JB1, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). *Planta Med*. 2003; 69(11): 973-83.

Carethers JM, Jung BH. Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2015; 149(5): 1177-90.

Carmona SJ, Lopez S, Abia R, Rodriguez-Arcos R, Jimenez A, Guillen G, Muriana FJG. Combination of Quercetin and Kaempferol enhances in vitro Cytotoxicity on Human Colon Cancer (HCT-116) Cells. *Rec. Nat. Prod*. 2014; 8(3): 262-271.

Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011; 331, 1559-1564.

Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, Joshi YC. Flavonoids: a versatile source of anticancer drugs. *Phcog Rev*. 2011; 5:1-12.

Chan AO, Jim MH, Lam KF. Prevalence of colorectal neoplasm among patients with newly diagnosed coronary artery disease. *JAMA*. 2007; 298:1412.

Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138:2029.

Chan TL, Yuen ST, Kong CK. Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*. 2006; 38:1178.

- Chen G, Goeddel DV. "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." *Science*. 2002; 296 (5573): 1634–1635.
- Chen Z, Bertin R, Frolidi G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chem*. 2013; 138(1): 414-20.
- Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. TGF- β signaling deficient fibroblasts enhance Hepatocyte Growth Factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Can Res*. 2008; 6(10), 1521–1533.
- Cho HJ, Park JH. Kaempferol Induces Cell Cycle Arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *J Cancer Prev*. 2013; 18(3): 257-63.
- Cohn HM, Dave M, Loftus EV. Understanding The Cautions And Contraindications Of Immunomodulator And Biologic Therapies For Use In Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2017; 23(8): 1301–1315.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009; 30(7):1073-81.
- Compton CC, Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin*. 2004; 54: 295-308.
- Costa NL, Valadares MC, Souza PPC, et al. "Tumor associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma." *Oral Oncology*. 2013; 49(3): 216– 223.
- Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet. *Science*. 2013; 339: 286-291.
- Cragg G, Newman D. Plant as source of anticancer agents. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100(1-2): 72-9.
- Crozier AA, Jaganath IB, Clifford MN. "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health." *Nat Prod Rep*. 2009; 26: 1001-1043.
- Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010; 15: 7313-7352.
- Dat NT, Lee IS, Cai XF, Shen G, Kim YH. Oleanane triterpenoids with inhibitory activity against NFAT transcription factor from *Liquidambar formosana*. *Biol Pharm Bull Mar*. 2004; 27(3): 426-428.
- Davis PH. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University, Edinburgh, 1982.
- De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Fessler E, Medema JP. Cancer heterogeneity--a multifaceted view. *EMBO Rep*. 2013; 14(8): 686-95.
- Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003; 22: 8543–8567.
- Dixon K, Koprás E. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 2004; 14(6): 441–448.
- Drake JM, Graham NA, Stoyanova T, Sedghi A, Goldstein AS, Cai H, Smith DA, Zhang H, Komisopoulou E, Huang J, Graeber TG, Witte ON. Oncogene-specific activation of tyrosine kinase networks during prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci*. 2012; 109(5): 1643-8.
- Duru ME, Cakir A, Harmandar M. Composition of the volatile oils isolated from the leaves of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis* and *L. orientalis* var. *integriloba* from Turkey. *Flavour Fragr. J*. 2002; 17: 95–98.

Eida HH, Labib RM, Hamid NSA, Hamed Ma, Rossde SA. Hepatoprotective and antioxidant polyphenols from a standardized methanolic extract of the leaves of *Liquidambar styraciflua* L. Faculty of Pharmacy. 2015; 53(2): 117-127.

Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol*. 2014; 4(177): 1–10.

El-Readi MZ, Eid HH, Ashour ML, Eid SY, Labib RM, Sporer F, Wink M.-Variations of the chemical composition and bioactivity of essential oils from leaves and stems of *Liquidambar styraciflua* (Altingiaceae). *J Pharm Pharmacol*. 2013; 65(11): 1653-63.

Engstrom A, Erlandsson A, Delbro D, Wijkander J. Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2. *International journal of oncology*. 2014; 44(2): 385-92.

Escarcega RO, Fuentes-Alexandro S, Garcia-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2007; 19, 154-61.

Fan Y, Mao R, Yang J. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell*. 2013; 4(3): 176-85.

Farombi EO, Adedara IA, Awoyemi OV, Njoku CR, Micah GO, Esogwa CU, Owumi SE, Olopade JO. Dietary protocatechuic acid ameliorates dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis and hepatotoxicity in rats. *Food Funct*. 2016; 7(2): 913-21.

Feagins LA, Souza SJ, Spechler SJ. Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2009; 6(5) :297-305.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61(5): 759-67.

Feng Y, Zhang YY, Wu SM, Lu YM, Lan WQ, Ouyang XL. Extraction of gallic acid in *Fructus liquidambaris* from Guangxi by orthogonal experiment. *Central South Pharm*. 2015; 13(1): 21-23.

Fereidoon S, Naczki m. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. 2004. ISBN 0-20359485-1.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D.M, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136:359-386.

Fernandez, X. Chemical composition of the essential oils from Turkish and Honduras *Styrax*. *Flavour Fragr J*. 2005; 20: 70–73.

Festjens N, Vanden Berghe T, Cornelis S, Vandenabeele P. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ*. 2007; 14(3): 400-10.

Fitzmaurice C, Allen C, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*. 2017; 3:524.

Frey AB, Monu N. Signalling defects in anti-tumor T cells. *Immunol. Rev*. 2008; 222: 192–205.

Fulda S, Gorman MA, Hori G, Samali A. Cellular Stress Response: Cell survival and cell death. *Int J Cell Biol*. 2010

Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol*. 2010; 2010: 214074.

Fulda S. Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer Lett*. 2009; 281:128– 133.

- Galati, G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 287-303.
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappa B puzzle. *Cell.* 2002; 109 Suppl: 381-96.
- Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006; 25, 6680-4.
- Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med.* 1995; 122:327.
- Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2016; 0: 1–9.
- Gongxian L, Shaocong S. Regulation of NF-B2/p100 processing by its nuclear shuttling. *Oncogene.* 2003; 22, 4868-4874.
- Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. "Flavonols, flavones, flavanones, and human health: Epidemiological evidence." *J Med Food.* 2005; 8: 281-290.
- Grellety T, Gros A, Pedeutour F, Merlio JP, Duranton-Tanneur V, Italiano A, Soubeyran I. Challenging a dogma: co-mutations exist in MAPK pathway genes in colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2016; 469(4): 459-64.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010; 140: 883-899.
- Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J.* 2009; 23: 1625-1637.
- Guilford P. E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today.* 1999; 5(4): 172-7.
- Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF-κB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1799(10-12): 775-87.
- Gurbuz I, Yesilada E, Demirci B, Sezik E, Demirci F, Baser H. Characterization of volatiles and anti-ulcerogenic effect of Turkish sweetgum balsam (*Styrax liquidus*). *J Ethnopharmacol.* 2013; 148: 332–336.
- Guzman JD. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. *Molecules.* 2014; 19: 19292-19349.
- Gürdal B, Kültür Ş. An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). *J Ethnopharmacol.* 2013; 146, 113-126.
- Ha'ma'la'inen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF-κB Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF-κB Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. *Mediators Inflamm.* 2007; 2007: 45673.
- Hafizoglu H. Analytical Studies on the Balsam of *Liquidambar orientalis* Mill. by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Int J Biol.* 1982; 36: 311-313.
- Haier HJ, Nasralla M, Nicolson GL. Different adhesion properties of highly and poorly metastatic HT29 colon carcinoma cells with extracellular matrix components: role of integrin expression and cytoskeletal components. *Br J Cancer.* 1999; 80(12): 1867-74.
- Halliwell B, Grootveld M. The measurement of free radical reactions in humans. *FEBS Lett.* 1987; 213:9–14.

Han M, Song Y1, Zhang X. Quercetin Suppresses the Migration and Invasion in Human Colon Cancer Caco-2 Cells Through Regulating Toll-like Receptor 4/Nuclear Factor-kappa B Pathway. *Pharmacogn Mag.* 2016; 12(Suppl 2): S237-44.

Han YH, Kim SH, Kim SZ and Park WH: Pyrogallol inhibits the growth of human pulmonary adenocarcinoma A549 cells by arresting cell cycle and triggering apoptosis. *J Biochem Mol Toxicol.* 2009; 23: 36-42.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86(3):353-364.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144:646–674.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100(1), 57–70.

Hawighorst T, Velasco P, Streit M, Hong YK, Kyriakides RT, Brown FL, Bornstein P, Detmar M. Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: A novel host anti-tumor defense mechanism. *EMBO J.* 2001; 20(11): 2631-40.

Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines. *Semin. Immunol.* 2014; 26, 253–266.

He X, Liao J, Liu F, Yan J, Yan J, Shang H, Dou Q, Chang Y, Lin J, Song Y. Functional repair of p53 mutation in colorectal cancer cells using trans-splicing. *Oncotarget.* 2015; 6(4): 2034-45.

Heikkilä K, Ebrahim S, Lawlor DA. “Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer.” *European Journal of Cancer.* 2008; 44 (7) :937–945.

Heissmeyer V, Krappmann D, Hatada EN, Scheidereit C. Shared pathways of I kappaB kinase-induced SCF(betaTrCP)-mediated ubiquitination and degradation for the NF-kappaB precursor p105 and I kappaBalpha. *Mol Cell Biol.* 2001; 21(4): 1024-35.

Herzig M, Savarese F, Novatchkova M, Semb H, Christofori G. Tumor progression induced by the loss of E-cadherin independent of beta-catenin/Tcf-mediated Wnt signaling. *Oncogene.* 2007; 26(16): 2290-8.

Hill LB, O’Connell JB, Ko CY. Colorectal cancer: epidemiology and health services research. *Surg Oncol Clin N Am.* 2006; 15: 21-37.

Hill RP, De Jaeger K, Jang A, Cairns R. pH, hypoxia and metastasis. *Novartis Found. Symp.* 2001; 240, 154-165.

Ho HH, Chang CS, Ho WC, et al. Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF-κB activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(8_9): 2508_16.

Hoesel B, Schmid J. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 2013; 12: 86.

Hostmicrobe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2012; 491(7422): 119–124.

Hou N, Liu N, Han J, Yan Y, Li J. Chlorogenic acid induces reactive oxygen species generation and inhibits the viability of human colon cancer cells. *Anticancer Drugs.* 2017 Jan;28(1):59-65.

Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(4): 266-76.

Hua KF, Yang TJ, Chiu HW, Ho CL. Essential oil from leaves of *Liquidambar formosana* ameliorates inflammatory response in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. *Nat Prod Commun.* 2014; 9(6): 869-872.

Huls G, Koornstra JJ, Kleibeuker JH. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and molecular carcinogenesis of colorectal carcinomas. *Lancet.* 2003; 362(9379): 230-2.

<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18855> (16.01.2017).

http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=4043

<http://www.epharmacognosy.com/2012/07/storax>

https://www.applichem.com/fileadmin/Service/Downloads_en/Proliferation_e_Applications_No12_150dpi_Webversion.pdf

Hymowitz SG, Wertz IE. A20: from ubiquitin editing to tumour suppression. *Nature reviews. Cancer.* 2010; 10(5): p. 332-41.

Ichim G, Tait SW. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer.* 2016; 16(8): 539-48.

Ickert-Bond SM, Pigg KB, Wen J. Comparative infructescence morphology in *Liquidambar* (Altingiaceae) and its evolutionary significance. *Am. J. Bot.* 2005; 92: 1234-1255.

Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis.* 2008; 29(4): 673-80.

Jain S, Saxena S, and Kumarb A. Epidemiology of prostate cancer in India. *Meta Gene.* 2014; 2: 596-605.

Jaspersen KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138(6):2044-58.

Jass JR. Gastrointestinal polyposis: clinical, pathological and molecular features. *Gastroenterol Clin North Am.* 2007; 36 (4) :927-946.

Javadi B, Iranshahy M, Emami SA. Anticancer Plants in Islamic Traditional Medicine. *Compl Alternative Med.* 2015, 1st Edition, p111-144.

Jayaprakasam B, Vanisree M, Zhang Y, Dewitt DL and Nair MG: Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 5375-5381.

Jeong SJ, Koh W, Lee EO, Lee HJ, Lee HJ, Bae H, et al. Antiangiogenic phytochemicals and medicinal herbs. *Phytother Res.* 2011; 25(1): 110.

Jiang Bing-Hua, Liu Ling-Zhi. PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 2009; 102: 19-65.

Guo J, Duan J, Tang Y, Li Y. Sedative and anticonvulsant activities of styrax after oral and intranasal administration in mice. *Pharm Biol.* 2011; 49(10): 1034-1038.

Jijon HB, Panenka WJ, Madsen KL, Parsons HG. MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 283: C31-41.

Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholt K, Dano K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10(5):667-671.

- Kaltschmidt B, Greiner JFW, Kadhim HM, Kaltschmidt C. Subunit-Specific Role of NF- κ B in Cancer. *Biomedicines*. 2018; 17; 6(2). pii: E44.
- Karadeniz B, Ulker Z and Alpsoy L. Genotoxic and cytotoxic effects of storax in vitro. *Toxicol Ind Health*. 2011; 29(2) 181–186.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF[κ]B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18, 621-63.
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2, 301-10.
- Kartal SN, Terzi E, Yoshimura T, Arango R, Carol A, Clausen A, Green F. Preliminary Evaluation of Storax and Its Constituents: Fungal Decay, Mold and Termite Resistance. *Int Biodeter Biodegr*. 2012; 70: 47-54.
- Khan A, Gillis K, Clor J, Tyagarajan K. Simplified evaluation of apoptosis using the Muse cell analyzer. *Postepy Biochem*. 2012; 58(4): 492-6.
- Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011; 474(7351): 307–317.
- Kim J, Seo S, Lee Sg, Shin Sc, Park Ik. Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components from Coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental Sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and Valerian (*Valeriana wallichii*) Essential Oils against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *J. Agric. Food Chem*. 2008, 56, 7316–7320.
- Kim JA, Kim DK, Kang OH, Choi YA, Park HJ, Choi SC, Kim TH, Yun KJ, Nah YH, Lee YM. Inhibitory effect of luteolin on TNF- α -induced IL-8 production in human colon epithelial cells. *Int. Immunopharmacol*. 2005; 5, 209–217.
- Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, Dolznig H. *Mutat Res. In vitro cell migration and invasion assays*. 2013; 752(1): 10-24.
- Kim ME, Ha TK, Yoon JH, Lee JS. Myricetin induces cell death of human colon cancer cells via BAX/BCL2-dependent pathway. *Anticancer Res*. 2014; 34(2): 701-6.
- Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H, Hiraoka M. Tumor Hypoxia: A target for selective cancer therapy. *Cancer Sci*. 2003; 94:1021-8.
- Klug WS, Cummings MR, Spencer CA, Palladino MA. *Concepts of genetics*. Pearson Education Limited. 2014, 10th edition.
- Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol*. 2009; 174(5):1588-1593.
- Kolenda T, Przybyła W, Kapalczyńska M, Teresiak A, Zajączkowska M, Bliźniak R, Lamperska KM. Tumor microenvironment-Unknown niche with powerful therapeutic potential. *Rep Pract Oncol Radiother*. 2018; 23(3): 143-153.
- Konturek PC, Rembiesz K, Burnat G, et al. Effects of cyclooxygenase-2 inhibition on serum and tumor gastrins and expression of apoptosis-related proteins in colorectal cancer. *Dig Dis Sci*. 2006; 51: 779-787.
- Koo BS, Lee SI, Ha JH, Lee DU. Inhibitory effects of the essential oil from SuHeXiang Wan on the central nervous system after inhalation. *Biol Pharm Bull*. 2004; 27, 515–519.
- Koumenis C, Wouters BG. Translating tumor hypoxia: unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways. *Mol Cancer Res*. 2006; 4: 423–36.

- Lai WW, Hsu SC, Chueh FS, Chen YY, Yang JS, Lin JP, et al. Quercetin inhibits migration and invasion of SAS human oral cancer cells through inhibition of NF- κ B and matrix metalloproteinase-2/-9 signaling pathways. *Anticancer Res.* 2013; 33: 1941–50.
- Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014; 2014:149185.
- Lankiewicz S, Rother E, Zimmermann S, Hollmann C, Korangy F, Greten TF. Tumour associated transcripts and EGFR deletion variants in colorectal cancer in primary tumour, metastases and circulating tumour cells. *Cell. Oncol.* 2008; 30(6): 463–471.
- Lavilla-Alonso S; Abo-Ramadan U, Halavaara J, Escutenaire S, Tatlisumak T, Saksela K, Kanerva A, Hemminki A, Pesonen S. Optimized Mouse Model for the Imaging of Tumor Metastasis upon Experimental Therapy. *PLoS One.* 2011, 6, e26810.
- Leber MF, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *Int J Oncol.* 2009; 34(4): 881-95.
- Lee Y-S, Kim J, Lee S-G, Oh E, Shin S-C, Park I-K. Effects of plant essential oils and components from Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) on growth and morphogenesis of three phytopathogenic fungi. *Pestic Biochem Physiol.* 2009; 93(3): 138-143.
- Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008; 27: 6194-6206.
- Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2, 725-34.
- Liang N, Kitts DD. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules.* 2014; 19(11): 19180-208.
- Liao YY, Fu HZ, Zhou GP, Zhong RJ, Yuan H, Guo Q, et al. Chemical constituents from leaves of *Liquidambar formosana*. *J Chin Med Mater.* 2014; 37(12): 2219-2221.
- Lin FH, Lin JY, Gupta RD, Tournas JA, Burch JA, Selim MA, Monteiro-Riviere NA, Grichnik JM, Zielinski J and Pinnell SR: Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin. *J Invest Dermatol.* 2005; 125: 826-832.
- Lin HH, Chen JH, Chou FP, Wang CJ. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF- κ B pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. *Br J Pharmacol.* 2011; 162(1): 237–254.
- Lipton L, Halford SE, Johnson V, et al. Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res.* 2003; 63(22):7595–9.
- Liu Z, Li D, Yu L, Niu F. Gallic acid as a cancer-selective agent induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Chemotherapy.* 2012; 58(3): 185-94.
- Liu Z, Yang P, Newman RA. Sweet gum fruit extract as a therapeutic agent. Pub. No: US 2015/0110862 A1. 2015, Apr 23.
- Loberg M, Holme KO, Hoff G, Adami HO, Bretthauer M. Long-term colorectal-cancer mortality after adenoma removal. *N Engl J Med.* 2014; 371 (9): 799-807.
- Loeb LA. A Mutator Phenotype in Cancer. *Cancer Research.* 2001; 61, 3230–3239.
- Loftus EV Jr. Epidemiology and risk factors for colorectal dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterol Clin North Am.* 2006; 35: 517-31.
- Lord SJ, Rajotte RV, Korbitt GS, Bleackley RC. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev.* 2003; 193: 31-38.

- Ma, Fuqian Wang, Jie Jiang, Lu Cheng, Hong Zhang* and Geng Zhang. In vivo anti-inflammatory activity of *Liquidambar formosana* Hance infructescence extract. Trop J Pharm Res. 2017; 16 (10): 2403-2410.
- Malicki S, Winiarski M, Matlok M, Kostarczyk W, Guzdek A, Konturek PC. IL-6 and IL-8 responses of colorectal cancer *in vivo* and *in vitro* cancer cells subjected to simvastatin. J Phys Pharmacol. 2009; 60(4): 141-146.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. Nature. 2008; 454(7203): 436-44.
- Matsui M, Kumar-Roine S, Darius HT, Chinain M, Laurent D, Pauillac S. Characterisation of the anti-inflammatory potential of *Vitex trifolia* L. (Labiatae), a multipurpose plant of the Pacific traditional medicine. J Ethnopharmacol. 2009;126(3): 427-33.
- Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94: 8104–8109.
- McClelland SE. Role of chromosomal instability in cancer progression. Endocr Relat Cancer. 2017; 24(9): T23-T31.
- McCreery MQ, Balmain A. Chemical Carcinogenesis Models of Cancer: Back to the Future. Annu Rev Cancer Biol. 2017; 1:16.1–16.18.
- McDermott JH. Antioxidant nutrients: current dietary recommendations and research update. J Am Pharm Assoc. 2000; 40(6): 785–79.
- Medzhitov R. “Origin and physiological roles of inflammation.” Nature. 2008; 454 (7203): 428– 435.
- Rosen MJ, Dhawan A, Shehzad A. Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. Saeed JAMA Pediatr. 2015; 169(11): 1053–1060.
- Mitchell JP, Carmody RJ. NF- κ B and the Transcriptional Control of Inflammation. Int Rev Cell Mol Biol. 2018; 335: 41-84.
- Moore RJ, Owens DM, Stamp G, et al. “Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis.” Nature Medicine. 1999; 5(7): 828–831.
- Moreno MN, Mari’a I. Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radicalscavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J Ethnopharmacol. 2000; 71:109–114.
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase 12. J Biol Chem. 2002; 277(37): 34287-94.
- Morishima N, Nakanishi K, Tsuchiya K, Shibata T, Seiwa E. Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase 12 during ER stress-induced apoptosis. J Biol Chem. 2004; 279(48): 50375-81.
- Mowla SN, Perkins ND, Jat PS. Friend or foe: emerging role of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells in cell senescence. Onco Targets Ther. 2013; 6: 1221-9.
- Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. Front Immunol. 2012; 2:98.
- Muzzalupo I, Stefanizzi F, Perri E, Chiappetta AA. Transcript levels of CHL P gene, antioxidants and chlorophylls contents in olive (*Olea europaea* L.) pericarps: a comparative study on eleven olive cultivars harvested in two ripening stages. Plant Foods Hum Nutr. 2011; 66(1): 1–10.

Nalbantsoy A, Kariş M, Karakaya L, Akgül Y.- Antioxidant, cytotoxic and iNOS activity of *Liquidambar orientalis* Mill. resin extracts. *Turkish J Biochem.* 2016; 41(3): 198–205.

Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; 18(1): 19-26.

Nelson DE, Ihekwaba AE, Elliott M, Johnson JR, Gibney CA, Foreman BE, Nelson G, See V, Horton CA, Spiller DG, Edwards SW, McDowell HP, Unitt JF, Sullivan E, Grimley R, Benson N, Broomhead D, Kell DB, White MR. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science.* 2004; 306: 704-8.

Nickoloff BJ, Ben-Neriah Y, Pikarsky E. Inflammation and cancer: is the link as simple as we think? *J Invest Dermatol.* 2005; 124(6): x-xiv.

Nijevelde R, Nood EV, Hoorn DECV, Boelens PG, Norren KV, Leeuwen PAMV. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74: 418–425.

Ning Y, Manegold PC, Hong YK. “Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models.” *Int J Cancer.* 2011; 128(9): 2038–2049.

Nirmala P, Ramanathan M. Effect of myricetin on 1,2 d,methylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *J Exp Ther Oncol.* 2011; 9 (2): 101-8.

Norat T, Bingham S, Ferrari P, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97:906.

Norling LV, Serhan CN. “Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel antiinflammatory and proresolving mediators and signals for termination.” *J Int Med.* 2010; 268 (1): 15–24.

Okmen G, Turkcan O, Ceylan O, Gork G. The antimicrobial activity of *Liquidambar orientalis* mill. against food pathogens and antioxidant capacity of leaf extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2014;11(5):28-32.

O’Brien C.A, Pollett A, Gallinger S, and Dick J.E. CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell.* 2007; 14, 342–356.

Ocsel H, Teke Z, Sacar M, Kabay B, Duzcan SE, Kara IG. Effects of Oriental Sweet Gum Storax on Porcine Wound Healing. *J Invest Surg.* 2012; 25, 262– 270.

Oskay M, Oskay D, Kalyoncu F. Activity of Some Plant Extracts Against Multi-Drug Resistant Human Pathogens. *Iranian J Pharm Res.* 2009; 8 (4): 293-300.

Oskay M, Sarı D. Antimicrobial Screening of Some Turkish Medicinal Plants. *Pharm Biol.* 2007; 45 (3) :176–181.

Ouyang X.L, Yi S, Lu H.Y, Wu S.M, Zhao H.Q. *Liquidambar formosana* Hance: A Mini-review of Chemical Constituents and Pharmacology. *Eur J Med Plants.* 2016; 17(1): 1-11.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009; 2(5):270-8.

Pandey MM, Subha R, Rawat AKS. Indian traditional Ayurvedic system of medicine and nutritional supplementation. *Alternat Med.* 2013; 7: 1–12.

Pang X, Yi T, Yi Z, Cho SG, Qu W, Pinkaew D, et al. Morelloflavone, a biflavonoid, inhibits tumor angiogenesis by targeting rho GTPases and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Cancer Res.* 2009; 69(2): 51825.

- Park ES, Yoo JM, Yoo HS, Yoon DY, Yun YP, Hong J. IL-32 gamma enhances TNF-alpha induced cell death in colon cancer. *Mol Carcin.* 2014; 53 Suppl 1:E23-35.
- Park Il-K. Fumigant Toxicity of Oriental Sweetgum (*Liquidambar orientalis*) and Valerian (*Valeriana wallichii*) Essential Oils and Their Components, Including Their Acetylcholinesterase Inhibitory Activity, against Japanese Termites (*Reticulitermes speratus*). *Molecules.* 2014; 19, 1254712558.
- Park WH, Park MN, Han YH and Kim SW: Pyrogallol inhibits the growth of gastric cancer SNU-484 cells via induction of apoptosis. *Int J Mol Med.* 2008; 22: 263-268.
- Patel M, Horgan PG, McMillan DC, Edwards J. NF- κ B pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Transl Res.* 2018; pii: S1931-5244(18)30031-8.
- Pero RW, Lund H, Leanderson T. Antioxidant Metabolism Induced by Quinic Acid. Increased Urinary Excretion of Tryptophan and Nicotinamide. *Phytotherapy Res.* 2009; 23(3): 335-346.
- Peters U, Bien S, Zubair N. Genetic architecture of colorectal cancer. *Gut.* 2015; 64(10): 1623-36.
- Popa C, Netea MG, Van Riel PL, Van Der Meer JWM, Stalenhoef AFH. "The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk," *Journal of Lipid Research.* 2007; 48(4) :751–762.
- Sukhramani PS, Sukhramani PS, Tirthani SR, Desai SA, Suthar MP. Biological cytotoxicity evaluation of spiro[azetidine-2, 3'-indole]-2', 4(1'H) dione derivatives for anti-lung and anti-breast cancer activity. *Der Pharmacia Lettre.* 2011; 3 (5): 236-243.
- Pribluda A, Elyada E, Wiener Z, Hamza H, Goldstein RE, Biton M. A senescence-inflammatory switch from cancer-inhibitory to cancer-promoting mechanism. *Cancer Cell.* 2013; 24: 242-256.
- Rajendran P, Rengarajan T, Nandakumar N, Palaniswami R, Nishigaki Y, Nishigaki I. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *Eur J Med Chem.* 2014; 86: 103-12.
- Rakitina TV, Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ. Inhibition of G1/S transition potentiates oxaliplatin-induced cell death in colon cancer cell lines. *Biochemical pharmacology.* 2007; 73(11): 1715-26.
- Rashid A, Issa JP. CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field. *Gastroenterology.* 2004; 127(5): 1578-88.
- Rashed KNZ, Sucupira ACC, Ferreira PMP, Feitosa CM. Phytoconstituents And Evaluation of Acetylcholinesterase Inhibition By Methanol Extract of *Liquidambar styraciflua* (L.) Aerial Parts. *J App Pharm.* 2014; 6; Issue 2: 143-152.
- Ratcliffe PJ, O'Rourke JF, Maxwell PH, Pugh CW. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J. Exp. Biol.* 1998; 201, 1153-1162.
- Ravi R, Bedi A. NF-kappaB in cancer--a friend turned foe. *Drug Resist Updat.* 2004; 7: 53-67.
- Reed IK. Mechanism and regulation of epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Cell Health and Cytoskeleton.* 2015; 7: 155-166.
- Ricci-Vitiani L, Fabrizi E, Palio E, De Maria R. Colon cancer stem cells. *J. Mol. Med.* 2009; 87: 1097–1104.
- Pires BR, Mencialha AL, Ferreira GM, de Souza WF, Morgado-Díaz JA, Maia AM, Corrêa S, Abdelhay ES. NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169622.
- Roberts NJ, Zhou S, Diaz LA, Holdhoff M. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. *Oncotarget.* 2011; 2(10): 739-51.

Rosa LS, Silva NJA, Soares NCP, Monteiro MC and Teodoro AJ. Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer – A Review. *J Nutr Food Sci.* 2016, 6:2.

Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Luber B, Busch R, Hofler H, Becker KF. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol.* 2002; 161(5):1881-1891.

Rothwell PM, et al. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet.* 2011; 377(9759): 31-41.

Roy N, Narayanankutty A, Nazeem PA, Valsalan R, Babu TD, Mathew D, Hou N1, Liu N, Han J, Yan Y, Li J. Chlorogenic acid induces reactive oxygen species generation and inhibits the viability of human colon cancer cells. *Anticancer Drugs.* 2017; 28(1): 59-65.

Roy S, Metya SK, Sannigrahi S, Rahaman N and Ahmed F: Treatment with ferulic acid to rats with streptozotocin-induced diabetes: Effects on oxidative stress, pro-inflammatory cytokines, and apoptosis in the pancreatic β cell. *Endocrine.* 2013; 44: 369-379.

Rundhaug JE, Fischer SM. Molecular Mechanisms of Mouse Skin Tumor Promotion. *Cancers.* 2010; 2, 436-482.

Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res.* 2000; 60: 4010–4015.

Sabat R, Grütz G, Warszawska K, et al. “Biology of interleukin-10,” *Cytokine and Growth Factor Reviews.* 2010; 21(5): 331–344.

Sagdıç O, Özkan G, Özcan M, Özçelik S. A Study on Inhibitory Effects of Sığla Tree (*Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*) Storax Against Several Bacteria. *Phytother. Res.* 2005; 19: 549–551.

Sahebkar A, Emami SA. Medicinal Plants for the Treatment of Uterus Inflammation: Implications from Iranian Folk Medicine. *Journal of Acupunct Meridian Stud.* 2013; 6 (1):1.

Sakamoto K, Maeda S. Targeting NF-kappaB for colorectal cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2010; 14(6): 593-601.

Saraç N, Şen B. Antioxidant, Mutagenic, Antimutagenic Activities, and Phenolic Compounds of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*. *Industrial Crops and Products.* 2014; 53: 60-64.

Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research.* 2003; 544 99–106.

Schottenfeld D, Winawer SJ. *Cancers of the large intestine in: D.Schottenfeld, Fraumeni J.F.Jr. (Eds.), Cancer Epidemiology and Prevention, Oxford University Press, New York. 1996, pp. 813-840.*

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Rev. Cancer.* 2003; 3, 721–732.

Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa-immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa-B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986; 47(6): 921-8.

Sgarbossa A, Giacomazza D and di Carlo M: Ferulic Acid: A hope for Alzheimer's disease therapy from plants. *Nutrients.* 2015; 7: 5764-5782.

Shi J, Shan S, Li H, Song G, Li Z. Anti-inflammatory effects of millet bran derived-bound polyphenols in LPS-induced HT-29 cell via ROS/miR-149/Akt/ NF- κ B signaling pathway. *Oncotarget.* 2017; 8(43): 74582-74594.

Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2002; 2(2): 103-12.

- Shi Y, Rupa P, Jiang B, Mine Y. Hydrolysate from eggshell membrane ameliorates intestinal inflammation in mice. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(12): 22728-42.
- Shih IM, Wang TL, Traverso G, Romans K, Hamilton SR, Sasson SB, Kinzler KW, Vogelstein B. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98, 2640-2645.
- Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Deleris G. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2003; 3(2):95-117.
- Shiraishi H, Okamoto H, Yoshimura A, Yoshida H. ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J Cell Sci.* 2006; 119:3958-66.
- Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2015; 1348(1): 20-31.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventó S RM. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In *Methods in Enzymology.* 1999; 299: 152-178.
- Sinicrope FA, Foster NR, Sargent DJ, et al. Obesity is an independent prognostic variable in colon cancer survivors. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:1884.
- Sisodiya PS. Plant Derived Anticancer Agents: A Review. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences.* 2013; 2(2): 293-308.
- Soncin S, Lo Cicero V, Astori G, Soldati G, Gola M, Sürder D, Moccetti T. J Transl Med. A practical approach for the validation of sterility, endotoxin and potency testing of bone marrow mononucleated cells used in cardiac regeneration in compliance with good manufacturing practice. *J Transl Med.* 2009;7:78.
- Soobrattee MA, Bahorun T, Aruoma OI. Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. *Biofactors.* 2006; 27, 19-35.
- Soto ML, Falqué E, Domínguez H. Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. *Cosmetics.* 2015; 2(3): 259-276.
- Spirio L, Olschwang S, Groden J, et al. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell.* 1993; 75:951.
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annual review of biochemistry.* 2014; 69: 217-245.
- Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, et al. Oxidative stress mediates tumor necrosis factor- α -induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation.* 2003; 107(10): 1418-23.
- Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation-*Nat Rev Immunol.* 2017; 17(9): 545-558.
- Sutherland RM, Ausserer WA, Murphy BJ, Laderoute KR. Tumor hypoxia and heterogeneity: challenges and opportunities for the future. *Semin Radiat Oncol.* 1996; 6:59-70.
- Suzek H, Celik I, Dogan A, Yildirim S. Protective effect and antioxidant role of sweetgum (*Liquidambar orientalis*) oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Pharm Biol.* 2015; 54(3), 451-457.
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006; 7: 880-5.

- Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. "Tumour necrosis factor- α as a tumour promoter," *European Journal of Cancer*. 2006; 42(6): 745–750.
- Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol*. 2006; 41 (3): 185-92.
- Tanker M, Sayron E. *Styrax Liquidus Üzerinde Farmakognozık Araştırmalar*. J. Fac. Pharm Ankara. 1974; 4.108.
- Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol. Today*. 1992; 13(5): 151–153.
- Tavani A, Gallus S, Negri E, Franceschi S, Talamini R, La Vecchia C. Cigarette smoking and risk of cancers of the colon and rectum: a case-control study from Italy. *Eur J Epidemiol*. 1998; 14(7): 675-681.
- Teicher BA. Physiologic mechanisms of therapeutic resistance. Blood flow and hypoxia. *Hematol. Oncol. Clin*. 1995; 9, 475-506.
- Thani NA, Keshavarz S, Lwaleed BA, Cooper AJ, Rooprai HK. J Cytotoxicity of gemcitabine enhanced by polyphenolics from *Aronia melanocarpa* in pancreatic cancer cell line AsPC-1. *Clin Pathol*. 2014; 67(11): 949-54.
- Todaro M, Gaggianesi M, Catalano V, Benfante A, Iovino F, Biffoni M, Apuzzo T, Sperduti I, Volpe S, Cocorullo G, Gulotta G, Dieli F, De Maria R, Stassi G. CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell*. 2014; 14(3): 342-56.
- Trainer DL, Kline T, McCabe FL, Faucette LF, Feild J, Chaikin M, Anzano M, Rieman D, Hoffstein S, Li DJ, et al. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 1988; 41(2): 287-96.
- Triantafyllidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res* 2009; 29: 2727-37.
- Tuncer S, Fiorillo MT, Sorrentino R. *J Leukoc Biol*. The multifaceted nature of NLRP12. 2014; 96(6): 991-1000.
- Upadhyay G, Gupta SP, Prakash O and Singh MP: Pyrogallol-mediated toxicity and natural antioxidants: Triumphs and pitfalls of preclinical findings and their translational limitations. *Chem Biol Interact*. 2010; 183: 333-340.
- Kumar V, Gill KD. *Basic Concepts in Clinical Biochemistry: A Practical Guide. To Perform Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2018; pp 153-155.
- Vagefi PA, Longo WE. Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical colorectal cancer*. 2005; 4(5): 313-9.
- Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011; 147: 275-92.
- van Delft MF, Huang DC. How the bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res*. 2006; 16: 203-213.
- van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*. 2009; 71: 241–60.
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol*. 1995; 5(10): 392–399.

- Vasen HF. Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes. *J Clin Oncol*. 2000; 18(21 Suppl): 81S–92S.
- Vasilevskaya IA, Selvakumaran M, O'Dwyer PJ. Disruption of signaling through SEK1 and MKK7 yields differential responses in hypoxic colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Molecular pharmacology*. 2008; 74(1): 246-54.
- Veenendaal LM, Kranenburg O, Smakman N, Klomp A, Borel Rinkes IH, van Diest PJ. Differential Notch and TGF beta signalling in primary colorectal tumors and their corresponding metastases. *Cell. Oncol*. 2008; 30(1): 1–11.
- Wall C, Lim R, Poljak M, Lappas M. Dietary flavonoids as therapeutics for preterm birth: luteolin and kaempferol suppress inflammation in human gestational tissues in vitro, *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2013; 1e11.
- Wang K, Pan Y, Wang H, Zhang Y, Lei Q, Zhu Z, Li H, Liang M. Antioxidant activities of *Liquidambar formosana* Hance leaf extracts. *Medicinal Chemistry*. 2010; 19, Issue 2, 166–176.
- Watson AJM, Collins PD. Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis*. 2011; 29: 222-8.
- Weihrauch M, Bader M, Lehnert G, Wittekind C, Tannapfel A, Wrbitzky R. Carcinogen-specific mutation pattern in the p53 tumour suppressor gene in UV radiation-induced basal cell carcinoma. *Int Arch Occup Environ Health*. 2002; 75(4): 272-6.
- Weng CJ, Yen GC. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treat Rev*. 2012; 38(1): 7681.
- Wheelhouse NM, Chan YS, Gillies SE, Caldwell H, Ross JA, Harrison DJ, et al. TNF alpha induced DNA damage in primary murine hepatocytes. *International journal of molecular medicine* 2003; 12(6): 889-94.
- Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(11): 851–64.
- Wright M, Beaty JS, Ternent CA. Molecular Markers for Colorectal Cancer. *Surg Clin North Am*. 2017; 97(3): 683-701.
- Wright NA. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int.J.Exp.Pathol*. 2000; 81: 117-143.
- Chen X, Yang X, Liu T, Guan M, Feng X, Dong W, Chu X, Liu J, Tian X, Ci X, Li H, Wei J, Deng Y, Deng X, Chi G, Sun Z. Kaempferol regulates MAPKs and NF- κ B signaling pathways to attenuate LPS-induced acute lung injury in mice. *Int. Immunopharmacol*. 2012;14: 209-216.
- Xia L, Tan S, Zhou Y, Lin J, Wang H, Oyang L, Tian Y, Liu L, Su M, Wang H, Cao D, Liao Q. Role of the NF κ B-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther*. 2018; 11: 2063-2073.
- Yamulla RJ, Kane EG, Moody AE, et al. Testing Models of the APC Tumor Suppressor/betaCatenin Interaction Reshapes Our View of the Destruction Complex in Wnt Signaling. *Genetics*. 2014; 197(4): 1285–302.
- Yang NY, Chen JH, Zhou GS, Tang YP, Duan JA, Tian LJ, et al. Pentacyclic triterpenes from the resin of *Liquidambar formosana*. *Fitoterapia*. 2011; 82(6): 927-931.
- Yang ZJ, Zhang YH, Feng J, Yao XQ, Jin XH. Pharmacological activity and chemical composition of *Liquidambar formosana* leaves volatile oil. *Sci Technol Food Ind*. 2013; 34(4): 76-79.

Yapıcı H, Baygar T, Metin C, Alparslan Y. Günlük ağacı (*Liquidambar orientalis*) yapraklarından elde edilen ekstraktın kültür levreğinin (*Dicentrarchus labrax*) raf ömrü ve et kalitesi üzerine etkisi. *Journal of food and health science*. 2015; 1(4): 166-177.

Ye W, Romelsjö A, Augustsson K, et al. No excess risk of colorectal cancer among alcoholics followed for up to 25 years. *Br J Cancer*. 2003; 88:1044.

Yee YK, Tan VP, Chan P, Hung IF, Pang R, Wong BC. Epidemiology of colorectal cancer in Asia. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009; 24: 1810-6.

Yi JY, Jung YJ, Choi SS, Chung E. TNF-alpha Downregulates E-cadherin and Sensitizes Response to γ -irradiation in Caco-2 Cells. *Cancer Res Treat*. 2009; 41(3): 164-170.

Yilmazlar T, Zorluoğlu A, Özgüç H, Korun N, Duman H, Kaya E, Kizil A. Colorectal cancer in young adults. *Tumori* 1995; 81: 230-3. 12.

Yoshida T, Konishi M, Horinaka M, Yasuda T, Goda AE, Taniguchi H, Yano K, Wakada M, Sakai T. Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 375(1): 129-33.

Yuan H, Liddle FJ, Mahajan S, Frank DA. IL-6-induced survival of colorectal carcinoma cells is inhibited by butyrate through down-regulation of the IL-6 receptor. *Carcinogenesis*. 2004; 25: 2247-255.

Zhang J, Chou G, Liu Z, Koh GY. In vitro cytotoxicity and antioxidation of a whole fruit extract of *Liquidambar formosana* exerted by different constituents. *Eur J Med Plants*. 2015; 6(1): 34.

Zhang XA, Zhang S, Yin Q, Zhang J. Quercetin induces human colon cancer cells apoptosis by inhibiting the nuclear factor-kappa B Pathway. *Pharmacogn Mag*. 2015; 11(42): 404-409.

Zhang MJ, Su H, Yan JY, Li N, Song ZY, Wang HJ, Huo LG, Wang F, Ji WS, Qu XJ, Qu MH. Chemopreventive effect of Myricetin, a natural occurring compound, on colonic chronic inflammation and inflammation-driven tumorigenesis in mice. *Biomed Pharmacother*. 2018; 97: 1131-1137.

Zhang X, Lin D, Jiang R, Li H, Wan J, Li H. Ferulic acid exerts antitumor activity and inhibits metastasis in breast cancer cells by regulating epithelial to mesenchymal transition. *Oncol Rep*. 2016; 36(1): 271-8.

Zheng Y, Zhang Q. Extraction and complexometric titration analysis of tannin in the barks and leaves of *Liquidambar formosana* Hance. *Jiangxi Chem Ind*. 2004; 2: 99-102.

Zhong RJ, Yuan H, Fu HZ, Zhou GP, Wu X, Zhang CH, et al. Three new compounds from the leaves of *Liquidambar formosana*. *J Asian Nat Prod Res*. 2013; 15(12): 1249-1255.

Zhong YT, Wang XL, Xie QJ, Zhang YN. Effect of the extract from leaves of *Liquidambar formosana* Hance on S180 cells. *Genet Mol Res*. 2016;15(3).

Zong W, CB. Thompson. Necrotic death as a cell fate. *Genes & development*, 2006; 20(1): 1-15.

Zorov DB, Juhaszova M and Sollott SJ: Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1757: 509-517.

Zweibaum A, Pinto M, Chevalier G, Dussaulx E, Triadou N, Lacroix B, Haffen K, Brun JL, Rousset M. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *J Cell Physiol*. 1985; 122(1): 21-9.

8. ÖZGEÇMİŞ

Sümevra ÇETİNKAYA 1986 yılında Ankara'da doğdu. 2005 yılında lise eğitimini tamamlayarak, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2010 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2013 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji yüksek lisansını tamamladı. Aynı yıl doktora eğitimine başladı. 2011 yılında aynı bölümde asistan olarak çalıştı. 2013 yılında Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına biyolog olarak atandı. Kadrosu halen bakanlık bünyesinde bulunmaktadır.

e-mail: cetinkayasumeyra0@gmail.com

