

**T.C.**  
**FIRAT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL KOLOREKTAL KANSER MODELİNDE**  
**EUGENOL VE GLİSİRİZİK ASİTİN**  
**KORUYUCU ETKİLERİ**

**(DOKTORA TEZİ)**

**Mustafa Selim DOĞRU**

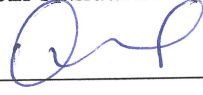
**ELAZIĞ-2017**

## ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

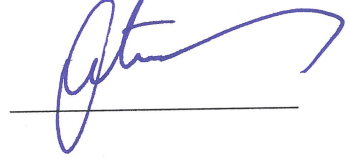


Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN



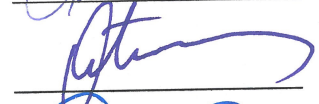
Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Songül SONAL



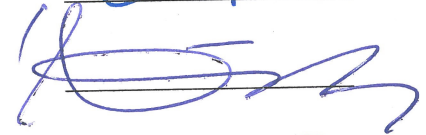
Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN



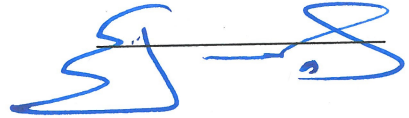
Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU



Prof. Dr. İzzet KARAHAN



Prof. Dr. Engin ŞAHNA



*Cennet kokulu Annem*

*Mevlûde İBİŞ'e*



## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında benden desteğini ve yardımını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca bana sağladıkları desteklerden dolayı F.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Kadir SERVİ, Prof. Dr. Sadettin TANYILDIZI, Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU, Prof. Dr. İzzet KARAHAN ve F.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Engin ŞAHNA'ya teşekkür ederim.

Doktora tez projesinin hazırlanması sırasında yardımını esirgemeyen F.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Burhan ÇETİNKAYA'ya, laboratuvar çalışmalarım sırasındaki büyük destek, katkı ve samimiyetlerinden dolayı F.Ü. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ali Osman ÇERİBAŞI'na, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü öğretim üyesi Arş. Gör. Dr. Serdar KARAKURT'a, ve F.Ü. Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalarım sırasında desteklerini hiç esirgemeyen F.Ü. Deneysel Araştırmalar Merkezi personelleri Vet. Hek. Özgür BULMUŞ, Lütfi DEMİREL ve Veysel ÇAK'a, ayrıca manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili aileme yürekten teşekkür ederim.

Bu çalışma TÜBİTAK – ARDEB – Destek Programları - 1002 Hızlı Destek Programı tarafından desteklenmiştir. Verdikleri desteklerden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>II</b>	<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>ii</b>
<b>IV</b>	<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iv</b>
<b>V</b>	<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>v</b>
<b>VI</b>	<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>viii</b>
<b>VII</b>	<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>ix</b>
<b>VIII</b>	<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	<b>xii</b>
<b>1.</b>	<b>ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>GİRİŞ</b>	<b>5</b>
3.1.	Kanser	5
3.1.1.	Kanserin Tarihçesi	5
3.1.2.	Kanserin Morbiditesi ve Mortalitesi	7
3.2.	Kolorektal Kanser	9
3.2.1.	Kolorektal Kanserin Etiyolojisi	9
3.2.2.	Kolorektal Kanserin Morbiditesi ve Mortalitesi	9
3.2.3.	Kolorektal Kanserde Meydana Gelen Moleküler ve Biyokimyasal Değişiklikler	11
3.3.	Kanser Kemoterapisinin Tarihsel Gelişimi	13
3.4.	Kanser Kemoterapisinde Kullanılan Geleneksel Antineoplastiklerin Yan Etkileri	13
3.5.	Kolorektal Kanserde Korunma ve Tedavide Fitoterapinin Yeri	14
3.6.	Deneysel Kolorektal Kanser Modeli	15
3.7.	Eugenol	15

3.8.	Glisirizik asit	17
3.9.	Kanser Tedavisinde Kombine Kemoterapinin Önemi	19
<b>4.</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>21</b>
4.1.	Gereç	21
4.1.1.	Alet ve Cihazlar	21
4.1.2.	Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler	22
4.1.3.	Hayvan Materyali	25
4.2.	Yöntem	25
4.2.1.	Deneysel Model	25
4.2.2.	Örneklerin Alınması ve Hazırlanması	27
4.2.2.1.	Kan Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması	27
4.2.2.2.	Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması	28
4.2.3.	Histopatolojik Yöntemler	28
4.2.3.1.	ACF Belirleme Yöntemi	28
4.2.3.2.	Klasik Histopatoloji	29
4.2.4.	Biyokimyasal Analizler	29
4.2.4.1.	Örneklerin Hazırlanması	29
4.2.4.2.	Doku ve Plazmada MDA Düzeylerinin Ölçümü	30
4.2.4.3.	Doku ve Hemolizatta GSH Düzeylerinin Ölçümü	30
4.2.4.4.	Doku ve Hemolizatta SOD Aktivitelerinin Ölçümü	30
4.2.4.5.	Doku ve Hemolizatta CAT Aktivitelerinin Ölçümü	31
4.2.4.6.	Dokuda Protein Düzeylerinin Ölçümü	31
4.2.4.7.	Hemoglobin Düzeylerinin Ölçümü	31
4.2.5.	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-	

PAGE) ve Western Blotlama Tekniği ile Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi	32
4.2.5.1. Total Protein İzolasyonu ve Protein Miktarlarının Belirlenmesi	32
4.2.5.2. SDS-PAGE	33
4.2.5.3. Western Blotlama Tekniği ile Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi	35
4.2.6. İstatistiksel Analizler	37
<b>5. BULGULAR</b>	<b>38</b>
5.1. Histopatolojik Bulgular	38
5.1.1. Makroskobik Bulgular	38
5.1.2. ACF Bulguları	39
5.1.3. Mikroskobik Bulgular	43
5.2. Oksidatif Stres Bulguları	50
5.3. Kolon Dokusu Bax, Bcl-2, COX-2, NF-kB ve p53 Protein Ekspresyonları	57
<b>6. TARTIŞMA</b>	<b>63</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>74</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>85</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b>	Kanser gruplarında kolon dokusu ACF ve içerdikleri anormal kript sayıları	39
<b>Tablo 2.</b>	Kanser gruplarında içerdği kript sayısına göre ACF skorlaması (hayvan başına düşen ortalama kript sayısı)	42
<b>Tablo 3.</b>	Histopatolojik lezyonların gruplara göre dağılımları ve yüzde oranları	44
<b>Tablo 4.</b>	Tüm gruplarda kolon dokusu MDA ve GSH düzeyleri ile SOD ve CAT aktiviteleri	50
<b>Tablo 5.</b>	Tüm gruplarda plazma MDA ve eritrosit GSH düzeyleri ile SOD ve CAT aktiviteleri	51
<b>Tablo 6.</b>	Tüm gruplarda kolon dokusu Bax, Bcl-2, COX-2, NF-kB, p53 protein ekspresyon düzeyleri	57
<b>Tablo 7.</b>	Tüm gruplarda kolon dokusu Bcl-2/Bax oranları	59



## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b>	Türkiye’de 2010-2014 yılları arasında tüm kanser türleri için yaşa standardize insidens hızlarının (100.000 Kişide) cinsiyete göre dağılımı	8
<b>Şekil 2.</b>	Türkiye’de 2015 yılına ait ölüm nedeni istatistikleri	8
<b>Şekil 3.</b>	Türkiye’de 2014 yılında tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün dağılımı	10
<b>Şekil 4.</b>	Türkiye’de 2014 yılında tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün dağılımı	11
<b>Şekil 5.</b>	Eugenol’ün kimyasal yapısı	16
<b>Şekil 6.</b>	Glisirizik asitin kimyasal yapısı	17
<b>Şekil 7.</b>	Wistar ratların kolon dokusunda DMH ile indüklenen preneoplastik lezyonlara ve hasarlara karşı GA’in etki noktaları	19
<b>Şekil 8.</b>	Çalışmada kullanılan deneysel modelin şematik gösterimi	27
<b>Şekil 9.</b>	Distal kolon mukozasındaki kitlenin makroskobik görünümü	38
<b>Şekil 10.</b>	Tüm gruplarda kolon dokusunda ortalama ACF sayıları	40
<b>Şekil 11.</b>	Kanser grupları kolon dokusunda ACF’lerin içerdiği ortalama kript sayıları	40
<b>Şekil 12.</b>	Kanser grupları kolon mukozasında ACF'lerin görünümü	41
<b>Şekil 13.</b>	Kanser grupları kolon dokusunda içerdiği kript sayısına göre ACF skoruması	43
<b>Şekil 14.</b>	Kontrol grubunda kolon histolojisinin görünümü	45
<b>Şekil 15.</b>	AOM grubunda kolon epitelinde hafif şiddette displazinin görünümü	45

<b>Şekil 16.</b>	AOM grubunda şiddetli displazinin görünümü	46
<b>Şekil 17.</b>	AOM+EU grubunda şiddetli displazinin görünümü	46
<b>Şekil 18.</b>	AOM+EU+GA grubunda şiddetli displazinin görünümü	47
<b>Şekil 19.</b>	AOM+EU grubunda diferensiyel adenokarsinomun görünümü	47
<b>Şekil 20.</b>	AOM grubunda submukozaya invazyon yapmış adenokarsinomun görünümü	48
<b>Şekil 21.</b>	AOM+GA grubunda submukoza ve tunika muskularise invazyon yapmış adenokarsinomun görünümü	48
<b>Şekil 22.</b>	AOM+EU grubunda diferensiyel adenokarsinom; hiperkromatik çekirdeğe sahip atipik epitel ile dökümlü glandüler yapıların görünümü	49
<b>Şekil 23.</b>	Kolon dokusu MDA düzeyleri	52
<b>Şekil 24.</b>	Plazma MDA düzeyleri	52
<b>Şekil 25.</b>	Kolon dokusu GSH düzeyleri	53
<b>Şekil 26.</b>	Eritrosit GSH düzeyleri	54
<b>Şekil 27.</b>	Kolon dokusu SOD aktiviteleri	55
<b>Şekil 28.</b>	Eritrosit SOD aktiviteleri	55
<b>Şekil 29.</b>	Kolon dokusu CAT aktiviteleri	56
<b>Şekil 30.</b>	Eritrosit CAT aktiviteleri	56
<b>Şekil 31.</b>	Tüm gruplarda kolon dokusu Bax ekspresyon düzeyleri	58
<b>Şekil 32.</b>	Tüm gruplarda kolon dokusu Bcl-2 ekspresyon düzeyleri	59
<b>Şekil 33.</b>	Tüm gruplarda kolon dokusu COX-2 ekspresyon düzeyleri	60

**Şekil 34.** Tüm gruplarda kolon dokusu NF-kB ekspresyon düzeyleri 61

**Şekil 35.** Tüm gruplarda kolon dokusu p53 ekspresyon düzeyleri 62



## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ACF</b>	: Anormal kript odakları
<b>AOM</b>	: Azoksimetan
<b>APS</b>	: Amonyum persülfat
<b>Bax</b>	: Bcl-associated X protein
<b>BCA</b>	: Bisinkoninik asit
<b>Bcl-2</b>	: B cell leukemia 2 protein
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>COX-1</b>	: Siklooksijenaz-1
<b>COX-2</b>	: Siklooksijenaz-2
<b>DMBA</b>	: Dimetilbenzantrasen
<b>DMH</b>	: 1,2-Dimetilhidrazin
<b>DTNB</b>	: 5,5-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit]
<b>EU</b>	: Eugenol
<b>GA</b>	: Glisirizik asit
<b>GSH</b>	: İndirgenmiş glutatyon
<b>Hb</b>	: Hemoglobin
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>HE</b>	: Hematoksilen-Eozin
<b>I<math>\kappa</math>B-<math>\alpha</math></b>	: İnhibitör kappa B-alfa
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>MB</b>	: Methylene blue (Metilen mavisi)
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür

<b>NBT</b>	: Nitroblue tetrazolium
<b>NF-kB</b>	: Nükleer faktör kappa B
<b>PVDF</b>	: Poliviniliden diflorit
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
<b>SF</b>	: Serum fizyolojik
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>TBA</b>	: Tiyobarbitürik asit
<b>TBS</b>	: Tris tamponu (Tris buffered saline)
<b>TBST</b>	: Tris tamponu+Tween 20 (Tris buffered saline+Tween 20)
<b>TEMED</b>	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
<b>TÜİK</b>	: Türkiye İstatistik Kurumu

## 1. ÖZET

Kanser, dünyada ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Kolorektal kanser (KRK) ise dünya genelinde hem erkek hem de kadınlarda dördüncü en yaygın kanser tipi olup kanser nedeni ölümde üçüncü sırada yer almakta ve her yıl yaklaşık 1 milyon yeni vaka meydana gelmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan konvansiyonel antineoplastiklerin birçok olumsuz yan etkisi bulunmaktadır. Çalışmanın amacı deneysel olarak azoksimetan (AOM) ile kolorektal kanser modeli oluşturulan ratlarda bitkisel kaynaklı eugenol (EU) ve glisirizik asit (GA)'in muhtemel koruyucu etkilerinin araştırılmasıdır.

Çalışmada 80 adet Sprague Dawley ırkı erkek rat kullanıldı. Ratlar, her grupta 10 hayvan olacak şekilde; kontrol, AOM (15 mg/kg, deri altı yolla, haftada bir kez olmak üzere iki kez), EU (100 mg/kg, gavaj), GA (15 mg/kg, gavaj), EU+GA, AOM+EU, AOM+GA, AOM+EU+GA olarak 8 gruba ayrıldı. EU ve GA, AOM ve kontrol grubu dışındaki gruplara çalışmanın başlangıcından itibaren 16 hafta boyunca günlük olarak uygulandı.

Çalışmanın sonunda alınan kolon doku örneklerinde histopatolojik olarak anormal kript odakları (ACF) tayini ve klasik histopatoloji yapıldı. Biyokimyasal olarak malondialdehit (MDA) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri ile süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ölçüldü. Kan örneklerinde ise MDA, GSH, SOD ve CAT analizleri yapıldı. Kolon dokusunda Western blot tekniğiyle Bax, Bcl-2, COX-2, NF-kB ve p53 protein ekspresyonları belirlendi.

AOM uygulamasının kolon dokusu MDA düzeyleri ve CAT aktivitelerini artırdığı buna karşın GSH düzeyleri ile SOD aktivitelerini azalttığı; kanda ise oksidatif stres parametreleri üzerine önemli bir değişikliğe yol açmadığı tespit

edildi. AOM uygulamalarının kolon dokusunda Bcl-2/Bax oranlarını artırdığı buna karşın NF-kB, COX-2, p53 ve Bax oranlarını ise azalttığı; histopatolojik incelemelerde ise ACF ve kötü huylu tümöral lezyon sayısını artırdığı tespit edildi. Tedavi gruplarından sadece AOM+EU ve AOM+EU+GA gruplarında oksidatif stres parametrelerinin iyileştiği, ACF sayılarının azaldığı, apoptozun indüklendiği ve tümör süpresör protein olan p53 ekspresyonlarının arttığı görüldü. Sonuç olarak, tedavi grupları içerisinde EU ve EU+GA uygulamalarının kolorektal kansere karşı koruyucu etkileri olduğu kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Rat, eugenol, glisirizik asit, azoksimetan, ACF, oksidatif stres.

## **2. ABSTRACT**

### **Protective Effect of Eugenol and Glycyrrhizic Acid on Experimental Colorectal Cancer Model**

Cancer is the leading cause of death in humans. Colorectal cancer (CRC), the 4th most common cancer type among all cancers both in men and women, ranks as the 3rd among all cancer deaths. It is estimated that nearly one million people are diagnosed with CRC worldwide annually. The antineoplastics used for the treatment of cancer have severe side effects. The aim of this study was to investigate the potential chemopreventive effects of eugenol (EU) and glycyrrhizic acid (GA) on azoxymethane (AOM)-induced colorectal cancer in rats.

In the study, 80 Sprague Dawley male rats were used. The rats were randomly divided into eight groups as follows: Control, AOM (15mg/kg bw., sc, once a week for two weeks), EU (EU 100 mg/kg bw., gavage), GA (GA 15 mg/kg bw., gavage), EU+GA, AOM+EU, AOM+GA, and AOM+EU+GA. All the rats except those in the control and AOM groups were treated with EU and GA for 16 weeks.

At the end of the study, the colon tissues were examined in terms of Aberrant Crypt Foci (ACF) and histopathology. Malondialdehyde (MDA) and reduced glutathion (GSH) levels as well as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were evaluated biochemically in both tissue and blood samples. In addition, Bax, Bcl-2, COX-2, NF-kB and p53 protein expressions in colon samples were determined by Western blotting.

In the colon tissues of rats treated with AOM, MDA levels and CAT activities were found out to increase, whereas GSH levels and SOD activities decreased. On the other hand, no significant changes were observed in the



oxidative stress parameters of blood samples. AOM treatment increased Bcl-2/Bax ratio but downregulated NF- $\kappa$ B, COX-2, p53 and Bax expressions. In the histopathological examination, an increase was detected in ACF numbers and malignant tumoral lesions. The use of EU and EU+GA decreased oxidative stress and ACF numbers, induced apoptosis, and upregulated p53 expression in azoxymethane-treated rats. In conclusion, EU and EU+GA were determined to be effective against colorectal cancer when compared with the other treatment groups.

**Keywords:** Rat, eugenol, glycyrrhizic acid, azoxymethane, ACF, oxidative stress.

## 3. GİRİŞ

### 3.1. Kanser

Kanser; hücre canlılığını, proliferasyonu ve farklılaşmayı yöneten kontrol mekanizmalarındaki noksanlıklar ile tanımlanan bir hastalıktır. Spesifik kanser türlerinin karakteri, sıklığı ve coğrafik dağılımı cinsiyet, yaş, ırk, genetik yatkınlık ve çevresel karsinojenlere maruz kalma gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (1). Karsinogenez çok basamaklı, karmaşık bir süreç olup genellikle birden fazla genetik değişiklikle ortaya çıkar. Bunun yanısıra epigenetik faktörler de (hormonlar, ko-karsinojenler, tümör promotör etkiler vs.) kanser gelişiminde rol oynar. Kendileri doğrudan kansere yol açmayan bu faktörler kansere olan yatkınlığı artırır veya oluşan genetik mutasyonlar kanser ile sonuçlanabilir (2).

#### 3.1.1. Kanserin Tarihi

Kanser ile ilgili en eski kanıtlara Eski Mısır'daki mumyalarda, fosilleşmiş kemik tümörlerinde ve eski yazıtlarda rastlanmıştır. Mumyalarda, günümüzde osteosarkom olarak bilinen kemik kanserlerini düşündüren büyümeler ile baş ve boyun tümörlerinde görülen kafatası kemik tahribatına rastlanmıştır (3). Kanseri olarak tanımlanabilecek en eski kanıtlar, o zaman bilindiği şekliyle bazı tıbbi bilgileri özetleyen Ebers Papirusları'nda da bulunmaktadır. Bu yazıtlar yaklaşık olarak M.Ö. 1500'lü yıllarda Mısır'da kaleme alınmıştır (4).

Kanseri en eski tanımına ise M.Ö. 3000'li yıllarda Eski Mısır'da, Edwin Smith Papiruslarında rastlanmıştır. Bu yazıtlar, Mısır'da travma cerrahisi üzerine yazılmış kitapta yer alan bir bölümün kopyasıdır. Bu bölümde ateş matkabı olarak nitelenen bir alet yardımıyla koterizasyon yapılarak uzaklaştırılan 8 adet meme

ülseri ya da tümör vakası tanımlanmıştır. Bu yazıtlarda hastalıkla ilgili olarak “*tedavisi yoktur*” ifadesi yer almaktadır (3).

Kanser kelimesi “Tıbbın Babası” olarak nitelenen Yunanlı hekim Hipokrat tarafından tanımlanmıştır. Hipokrat, ülserli ya da ülsersiz tümörleri tanımlamak için “*carcinosa ve carcinoma*” ifadelerini kullanmıştır. Kanser, parmak benzeri yayılım gösterdiği için büyük olasılıkla şeklinden dolayı yengece benzetilmiş ve Yunanca’da bu kelimeler *crab* yani *yengeç* kelimesinde karşılık bulmuştur. Daha sonra Romalı hekim Celcus Yunanca *crab* kelimesine karşılık olarak Latince olan “*cancer*” kelimesini kullanmıştır. Bir diğer Yunanlı hekim Galen ise tümörleri tanımlamak için “*oncos*” kelimesini kullanmıştır. Ancak malignant tümörleri tanımlamak için hala Hipokrat ve Celcus’un yengeç (*crab*) benzetmesi yani *cancer* kelimesi kullanılmaktadır. Galen’in terimi ise günümüzde kanser uzmanları için kullanılan onkolog ünvanının bir parçası olmuştur (3, 4).

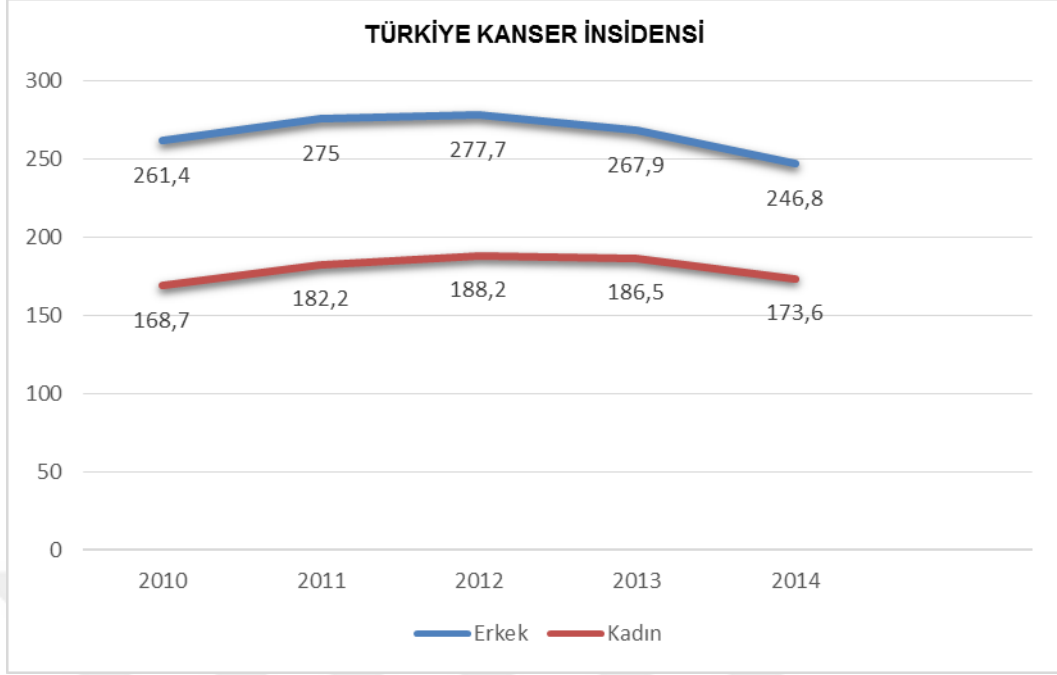
19. Yüzyıl, hastalıklı dokularda yapılan çalışmalarda modern mikroskopun kullanılmaya başlanmasıyla bilimsel onkolojinin doğuşuna sahne olmuştur. Hücre patolojisinin kurucusu olarak bilinen Rudolf Virchow modern patolojik kanser çalışmalarının bilimsel temelini kurmuştur. Morgagni’nin hastalığın klinik süreciyle otopsi bulgularını bağdaştırdığı gibi Virchow da hastalıkla mikroskopik patoloji arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Bu metot kanserin neden olduğu hasarın daha iyi anlaşılmasını sağlamakla beraber kanser cerrahisinin gelişmesine de katkıda bulunmuştur. Alınan dokular incelenerek kesin tanı yapılabilmekte ve patolojik incelemeler sonucu cerrahi müdahale ile kanserin tamamen uzaklaştırılıp uzaklaştırılamayacağı hakkında öngörü yapılabilmektedir (3).

### 3.1.2. Kanserin Morbidite ve Mortalitesi

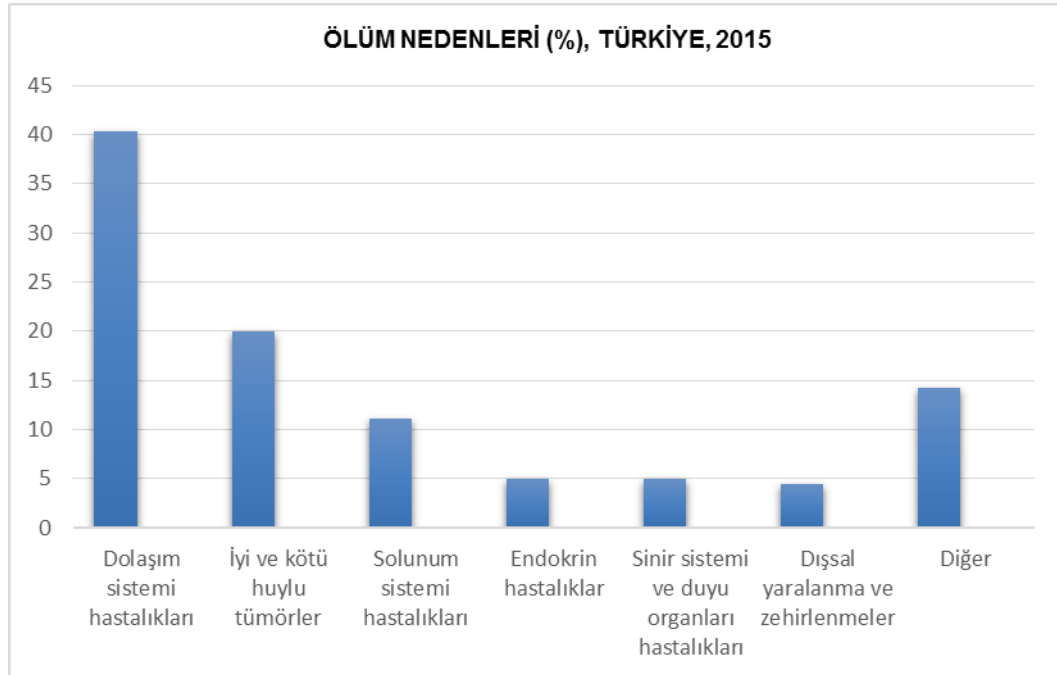
Dünyada ölüm nedenlerinin başında gelen kanser gelişmiş ülkelerde kalp damar hastalıklarından sonra ikinci sıklıkta görülen ölüm nedenidir ve üç kişiden biri yaşamları boyunca kanser tanısı almaktadır (2).

Küresel kanser yükü geçtiğimiz 30 yıl zarfında iki kattan daha fazla artmıştır. 2008’de 12 milyon yeni kanser vakasının teşhis edildiği ve kanserden kaynaklanan 7 milyon ölümün gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Dünya nüfusunun süregelen artışı ve yaşlanması kanser yükü üzerinde de büyük değişikliklere yol açacaktır. 2030’a gelindiğinde 27 milyon kanser vakası, kanserden kaynaklanan yıllık 17 milyon ölüm ve son beş yıl içinde kanser tanısı konulmuş 75 milyon kişi rakamlarına ulaşılması beklenmektedir (5).

Şekil 1’de Türkiye’de 2014 yılı itibariyle yaşa standardize edilmiş kanser insidensi hızının (100.000 kişide) erkeklerde 246,8 kadınlarda ise 173,6 olduğu görülmektedir. Ayrıca 2014 yılı istatistiklerine göre Türkiye’de 163.417 kişiye yeni kanser teşhisi konulmuştur. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre Türkiye’de 2015 yılı itibariyle iyi ve kötü huylu tümörlerden kaynaklanan ölümler, ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almakta olup toplam ölümlerin %20’sini oluşturmaktadır (Şekil 2). Bu verilere göre kanserin hem dünyada hem de Türkiye’de ölüm nedenleri arasında ilk sırayı alabileceği tahmin edilmektedir (6-8).



**Şekil 1.** Türkiye’de 2010-2014 yılları arasında tüm kanser türleri için yaşa standardize insidens hızlarının (100.000 kişide) cinsiyete göre dağılımı (6).



**Şekil 2.** Türkiye’de 2015 yılındaki ölüm nedeni istatistikleri (7).

## **3.2. Kolorektal Kanser**

Kolon ya da rektumda başlayan kansere kolorektal kanser (KRK) adı verilir. Bu kanserler ayrıca başlangıç yerine göre kolon kanseri ve rektum kanseri olarak da isimlendirilebilir. Kolon kanseri ve rektum kanseri birçok benzer özellik taşıdığı için sıklıkla birlikte anılır (3). KRK normal kolon epitel hücrelerinin adenokarsinom hücrelerine dönüşmesine neden olan bir dizi genetik ve epigenetik değişikliklerin ilerleyici bir şekilde birikimi sonucu ortaya çıkar. Polip karsinom dizisi olarak tanımlanan kolondaki bu karsinogenez sürecinin tipik olarak 10-15 yıl içerisinde gerçekleştiği ve bu süreçte histolojik ve moleküler değişikliklerin birlikte seyrettiği düşünülmektedir (9).

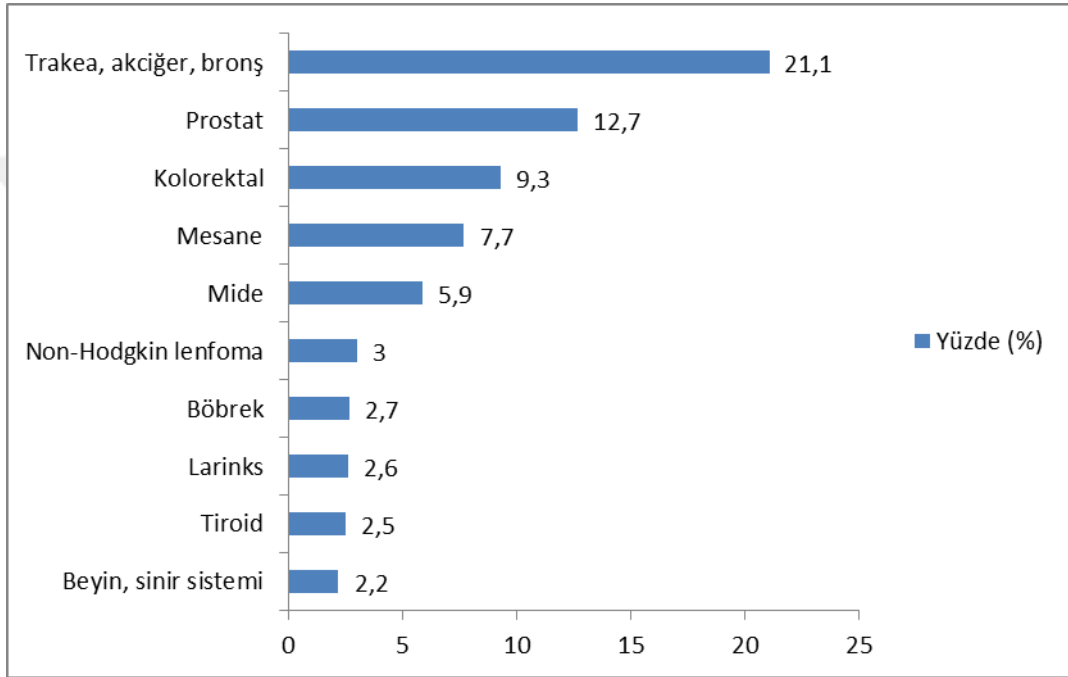
### **3.2.1. Kolorektal Kanserin Etiyolojisi**

KRK'lerin temel sebebinin çevresel faktörler olduğu ve bu vakaların yalnızca %20'sinin kalıtsal genetik değişikliklerle ilişkili olduğu belirlenmiştir (10). Kolorektal tümörlerin gelişmesindeki risk faktörleri arasında kronik bağırsak yangıları, çevresel ve gıda kaynaklı mutajenler, bağırsaktaki faydalı ve patojen mikroorganizmalar sayılabilir (11, 12). Alkol ve sigara kullanımı, obezite, fiziksel aktivite yetersizliği, yüksek yağlı ve kırmızı ete dayalı diyetler; yetersiz meyve, sebze, tahıl ve lifli gıdaların tüketimi diğer faktörler arasında sayılabilir (13, 14). Sanayileşmiş ülkelerdeki batılı yaşam tarzı ve diyet alışkanlığının KRK insidensini artırdığı belirtilmiştir (14).

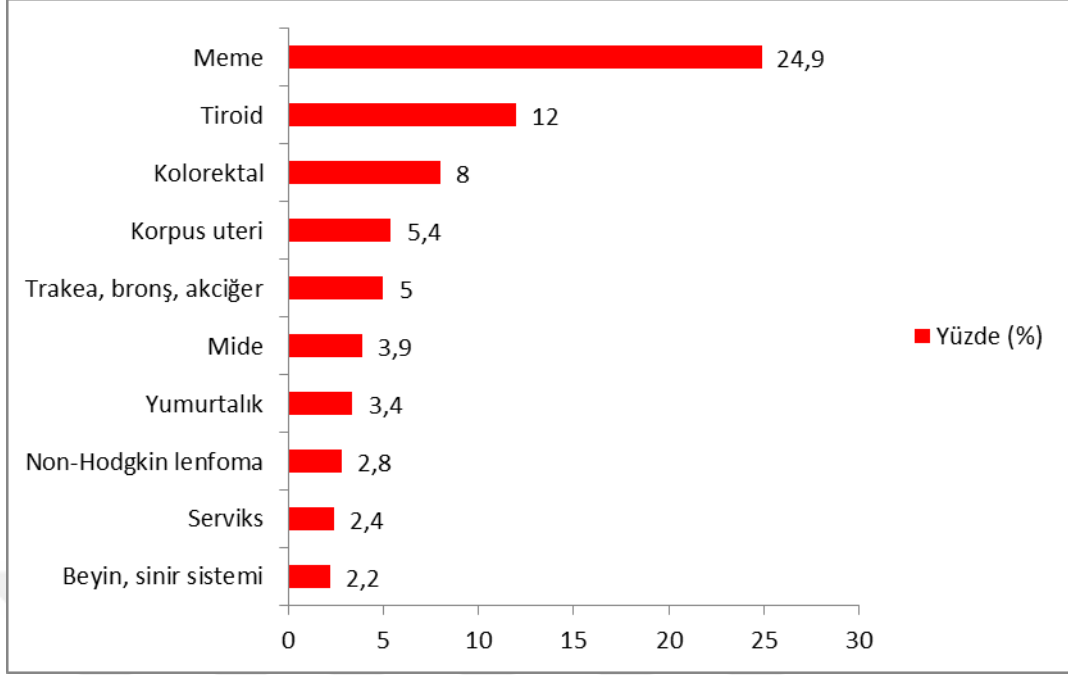
### **3.2.2. Kolorektal Kanserin Morbiditesi ve Mortalitesi**

Dünyada KRK erkeklerde en yaygın üçüncü, kadınlarda ise en yaygın ikinci kanser türü olup, şekil 3 ve 4'te görüldüğü gibi Türkiye'de hem erkek hem de kadınlarda en yaygın kanser türleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır (7).

KRK'in yaşıa göre standardize edilmiş insidens hızı (100.000 kişide) dünya genelinde erkeklerde 204,9 kadınlarda 165,2 olup bu rakam Tükiye'de erkekler için 220,3 kadınlar için ise 156,8 düzeyindedir (6). KRK, dünya genelinde kanser nedenli ölümlerde üçüncü sırada yer almakta ve tahmini olarak her yıl 1 milyon yeni vaka meydana gelmektedir (15).



**Şekil 3.** Türkiye'de 2014 yılında tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün dağılımı (7).



**Şekil 4.** Türkiye’de 2014 yılında tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün dağılımı (7).

### 3.2.3. Kolorektal Kanserde Meydana Gelen Moleküler ve Biyokimyasal Değişiklikler

Ratlarda sistemik azoksimetan (AOM) uygulanması kolon dokusunda, karsinogenik süreçte önemli bir yeri olduğu düşünülen ve bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-kappa B (NF-kB) düzeyini artırmaktadır. NF-kB, p50 ve p65 olmak üzere iki alt üniteden oluşur ve normal hücrede I $\kappa$ B- $\alpha$  (inhibitör kappa B-alpha) ile bir kompleks halinde sitoplazmada bulunmaktadır. Bir dizi hücre içi ve hücre dışı uyarının etkisiyle heterodimer yapısından ayrılan NF-kB hücre çekirdeğine bağlanarak bazı genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedir. NF-kB’nin aktivasyonu kanser hücrelerinde güçlü bir çoğalma ve antiapoptotik etkinlikle sonuçlanmaktadır (16). NF-kB sinyal yolağının inhibe edilmesi kanserden korunma ve tedavi noktasında önemli bir yaklaşım sunmaktadır (17).



Bax, proapoptotik protein olarak bilinir ve ekspresyonu arttığında apoptoz indüklenmektedir. Bcl-2 ise antiapoptotik protein olarak bilinir ve ekspresyonu arttığında apoptoz baskılanmaktadır (18). Birçok antineoplastik ilaç kanser hücreleri üzerine antiproliferatif etki gösterirler. Bu ilaçların birçoğu da bu etkiyi DNA hasarı oluşturarak yapar ve sonuçta apoptoz indüklenir (2). AOM ile indüklenen bir KKK modelinde AOM grubunda Bcl-2/Bax oranı 1'den büyük ( $>1$ ), tedavi grubunda ise 1'den küçük ( $<1$ ) bulunmuş ve tedavi gruplarında kanserli hücrelerde apoptozun uyarıldığı bildirilmiştir (19).

Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybına uğraması karsinogenez gelişimi için en kritik olay olarak değerlendirilebilir (2). Normal hücreler malignan değişimi baskılayan genler içerirler ve bu genler "tümör baskılayıcı/süpresör genler" olarak bilinirler (2). p53 geni bugüne kadar tanımlanmış en iyi tümör baskılayıcı gendir ve bu genin doğal türü (wild-type) hücrede neoplastik dönüşümün baskılanmasında önemli rol oynar. Tüm insan karaciğer, meme, kolon, akciğer, serviks, idrar kesesi, prostat ve solid cilt tümörlerinin %50'sinde p53 geni mutasyona uğramıştır (1).

COX-2 enzimi proinflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri, onkojenler, kanserojenler ve tümör promotörleri gibi birçok faktör tarafından indüklenmekte olup yangı ve hücre çoğalmasının kontrolünde rol almaktadır (20). Preklinik etkinlik çalışmalarında antiinflamatuvar etkinlik gösteren birçok bitkisel kaynaklı maddenin kolon karsinogenezini geciktirdiği, engellediği ya da geriye döndürdüğü kanıtlanmıştır (21). Dolayısıyla COX-2 etkinliğinin engellenmesi yangı ve karsinogenezin önlenmesi bakımından iyi bir strateji olarak görünmektedir (20).

Oksidatif stres indirgenmiş glutatyon, antioksidan enzimler (glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz), diyetle alınan antioksidanlar (vitamin

C, selenyum,  $\beta$ -karoten, ve vitamin E) ile serbest oksijen radikalleri arasındaki dengenin bozulmasına bağlı olarak gelişir. Karsinojenik patogeneizde oksidatif stres de rol oynar (22).

### **3.3. Kanser Kemoterapisinin Tarihsel Gelişimi**

İkinci dünya savaşında hardal gazına maruz kalan askerlerin kemik iliği hücrelerinde toksik değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Bu dönemde Amerikan ordusu tarafından savaşta kullanılmak üzere hardal gazına benzer ama daha etkin bileşikler ve koruyucu önlemlerin geliştirilmesi üzerinde yapılan çalışmalarda lenfomaya karşı etkili olduğu belirlenen *nitrogen mustard* adında bir bileşik geliştirilmiştir. Bu bileşik hızlı büyüyen kanserli hücrelerde DNA hasarı oluşturarak onları öldüren ve kendisinden daha etkili (alkilleyici ajanlar) bir dizi benzer maddenin geliştirilmesinde model olmuştur (3).

### **3.4. Kanser Kemoterapisinde Kullanılan Geleneksel Antineoplastiklerin Ortak Yan Etkileri**

Antineoplastik kemoterapinin ana ilkesi hastanın veya konakçının sağlıklı hücrelerine zarar vermeksizin veya en az zararla kanserli hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya mümkünse onları yok etmektir. Ancak, sağlıklı doku ve tümör dokusu arasındaki benzerlikler antineoplastik ilaçların seçiciliğini olumsuz yönde etkiler. Bugün kanser kemoterapisinde kullanılan antineoplastik ilaçların çoğu bir yandan kanserli dokulara etki ederken diğer yandan barsak epiteli, kıl folikülleri, kemik iliği kök hücreleri gibi proliferatif indeksi yüksek olan sağlıklı dokuları da etkiler. Hücre proliferasyonunun belirgin olmadığı karaciğer, böbrek ve sinir dokusunda da toksisiteye yol açabilen

kemoterapötiklerin varlığı bilinmektedir. Geleneksel antineoplastiklerin ortak yan etkileri;

- Kemik iliği süpresyonu
- İmmünoşüpresyon
- Hızlı çoğalan hücrelere (sindirim kanalı epitel hücreleri, kıl folikülleri, üreme hücreleri) olan toksisite
- Embriyotoksisite ve teratojenite
- Mutajenite ve karsinojenite
- Bulantı ve kusma
- Lokal reaksiyonlar
- Tümör lizis sendrom (tümör hücrelerinin hızlı bir şekilde yıkımlanması sonucu gelişen üremi, hiperkalemi, hiperfosfatemi, akut böbrek yetmezliği gibi)
- Alerjik reaksiyonlar
- Diğer toksik etkiler olarak sıralanabilir (23).

### **3.5. Kolorektal Kanserde Korunma ve Tedavide Fitoterapinin Yeri**

Preklinik ve epidemiyolojik çalışmalarda çok sayıda kemoterapötik ilaç KRK'e karşı etkili bulunmasına rağmen, bu maddelerin etkinliklerindeki yetersizlikler ve ciddi yan etkilerinden dolayı klinik kullanımları sınırlı kalmaktadır (24). Son zamanlarda, bazı hastalıklarda tamamlayıcı tedavi olarak bitkisel ilaçlar popüler hale gelmiş ve kanser hastalarında bitkisel ilaçların kullanımlarının arttığı ortaya konmuştur (25). Doğal yolla elde edilen antikanser ajanlar ve bunların deriveleri karsinogenezi kanserli hücrelerin göçü, invazyonu, büyümesi, canlılığı ve metastazı üzerine etki eden genleri baskılamak suretiyle inhibe etmektedir (26). Ayrıca çok sayıda epidemiyolojik çalışma, özellikle KRK

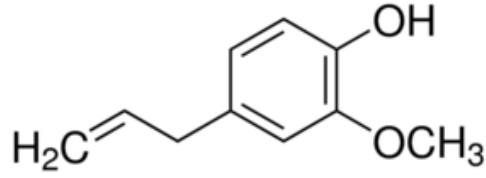
olmak üzere belirli tipteki kanser riskinin azaltılmasında, doğal antioksidanlardan zengin diyetlerin etkili olduğunu göstermektedir (27).

### **3.6. Deneysel Kolorektal Kanser Modeli**

KRK modeli oluşturulmasında, kimyasal olarak indüklenen hayvan modelleri arasında en sık kullanılanlar azoksimetan (AOM) ve 1,2-Dimetilhidrazin (DMH) ile oluşturulan modellerdir (28). AOM ve DMH ile oluşturulan deneysel KRK modeli, insan kolon kanserini moleküler, histolojik ve klinik özellikler bakımından iyi temsil etmektedir (29, 30). Rodentlerde sistemik AOM uygulanması, kolonda Anormal Kript Odakları (ACF) diye tanımlanan ve ileride kansere dönüşen preneoplastik lezyonların oluşumuna yol açmaktadır (31). AOM uygulanan ratlarda ACF'lerin en erken 2 hafta sonra olmak üzere genellikle 4-6. haftalarda olduğu bildirilmiştir (32, 33). Shwter ve ark. (25) ACF'nin ilk kez AOM enjekte edilen ratlarda rapor edildiğini ve daha sonra KRK'li insanlarda da buna benzer lezyonların ortaya koyulduğunu bildirmiştir. Bu süreçten sonra AOM ile indüklenen KRK modeli sıklıkla kullanılmış ve halen kullanılmaya devam etmektedir.

### **3.7. Eugenol**

Karanfil yağının temel bileşeni olan eugenol (2-metoksifenol) tarçın, defne yaprağı ve birçok aromatik baharat içerisinde de belirli düzeylerde bulunan doğal fenolik bir bileşiktir. Sindirim sistemi hastalıkları ve deri enfeksiyonlarının yanı sıra iyi bir lokal antiseptik ve lokal anestezi olmasından dolayı diş hekimliğinde de kullanılmaktadır. Birçok biyolojik aktiviteye sahip olan bu bileşiğin karsinogenik ve mutajenik etkilerinin olmadığı belirlenmiştir (34, 35).



**Şekil 5.** Eugenol'ün kimyasal yapısı (36).

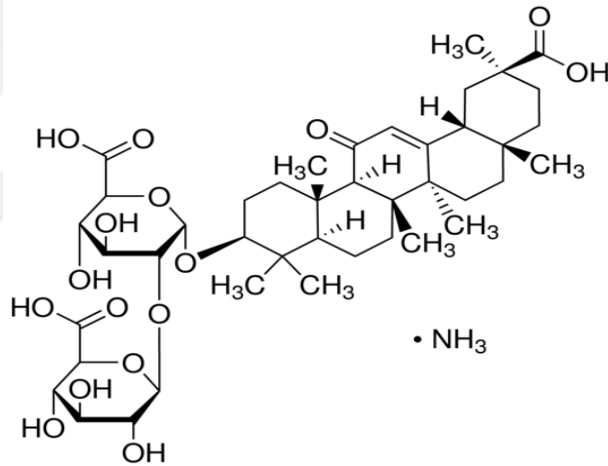
EU'ün koruyucu etkisini süperoksit ve lipit peroksidasyon ürünlerinin oluşumunu, yangıyı ve hücre çoğalmasını engelleyerek ve apoptozu indükleyerek meydana getirdiği gösterilmiştir. Moleküler çalışmalar EU'ün NF-kB'yı inhibe ettiğini, COX-2 ve Bcl2 ekspresyonunu azalttığını, p53 ve Bax ekspresyonunu artırdığını ortaya koymuştur (37).

İnsan lökemi hücrelerinde yapılan bir *in vitro* çalışmada EU'ün kanser hücrelerinde antiapoptotik bir protein olan Bcl-2'nin ekspresyonunu azalttığı, proapoptotik bir protein olan Bax'ın sitozolden mitokondriye doğru olan translokasyonunu artırdığı ve böylece apoptozu indüklediği belirtilmiştir (38). Deneysel olarak oluşturulan mide kanseri modellerinde EU etkisiyle NF-kB (p50 ve p65) ve Bcl-2 ekspresyonunun azaldığı, p53 ve Bax ekspresyonunun arttığı ortaya konmuştur (16, 39). Farelerde dimetilbenzantrasen (DMBA) ile indüklenen deri kanseri modelinde EU etkisiyle Bcl-2 ekspresyonunun azaldığı, p53 ekspresyonunun ise arttığı ortaya konmuştur. Aynı çalışmada EU etkisiyle COX-2 ekspresyonunun inhibe edildiği, proinflatuar sitokinler ile NF-kB düzeylerinin azaldığı saptanmıştır (40). İnsan osteosarkom hücrelerinde yapılan bir *in vitro* çalışmada ise EU etkisiyle p53 ekspresyonunun arttığı ve apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (41). HT29 insan kolon kanser hücreleri ve lipopolisakkarid (LPS) ile stimüle edilmiş fare makrofaj hücrelerinde yapılan bir *in vitro* çalışmada

EU'nun COX-2 protein ve gen ekspresyonu ile COX-2 enzim aktivitesini seçici olarak azalttığı ve kanser hücre çoğalmasını yavaşlattığı ortaya konmuştur (20).

### 3.8. Glisirizik asit

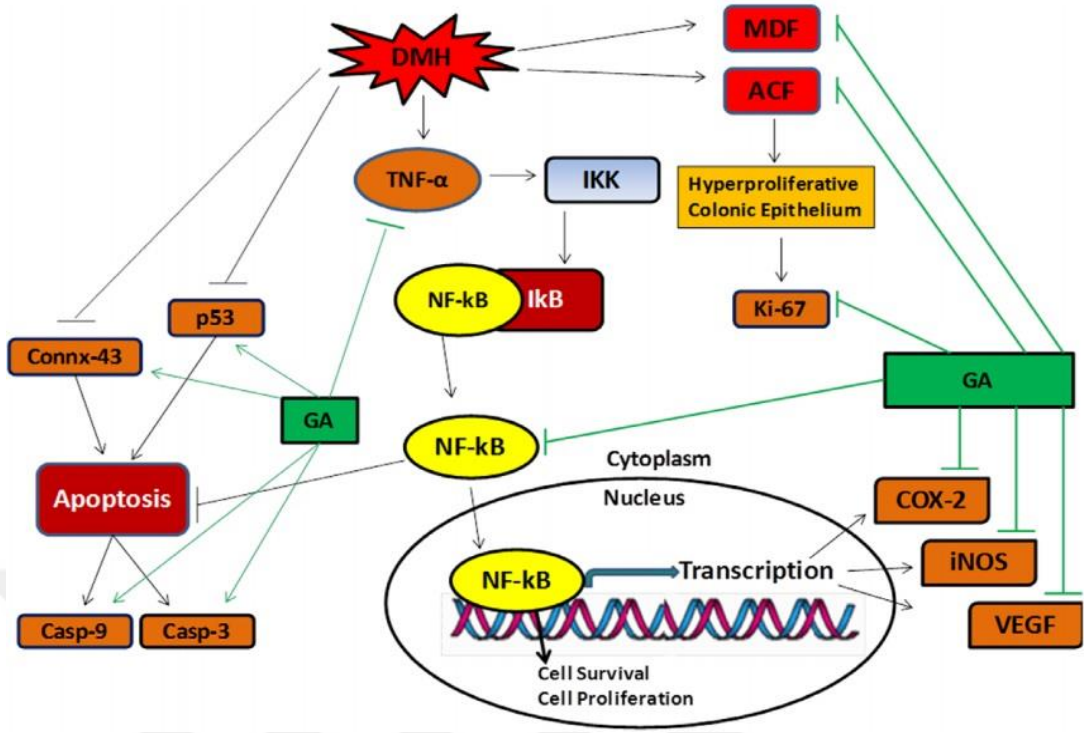
Glisirizik asit (GA), meyan kökünün temel bileşenlerinden biri olup pentasiklik triterpenoid glikozit yapısındadır ve *Glycyrrhiza glabra* bitkisinin kurutulmuş kökünden elde edilir. GA'nın tuzları tatlılarda, ilaçlar, içecekler, sakızlar ve diğ macunlarında tatlandırıcı ve aroma verici olarak yaygın şekilde kullanılır. GA antiinflamatuar, nöroprotektif, antiviral, antioksidan ve antitümör etkinlik gibi birçok farmakolojik etkiye sahiptir (42, 43).



Şekil 6. Glisirizik asitin kimyasal yapısı (44).

Ratlarda kalp kası iskemi/reperfüzyon modelinin oluşturulduğu bir çalışmada ferulik asit, peoniflorin, sinamik asit ve GA'nın etkileri araştırılmıştır. Diğer maddelerle kıyaslandığında GA uygulanan ratların miyokard dokusunda SOD aktivitesinin belirgin bir artış gösterdiği gözlenmiştir. Aynı şekilde GA'nın diğer maddeler kadar olmasa da MDA düzeylerinde bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Bu bulguların ışığında GA'nın oksidatif hasarlanmayı azalttığı ileri sürülmüştür (45).

Ratlarda bir KKK modelinde GA uygulanan deneme gruplarında kontrol grubuyla kıyaslandığında ACF sayısı ile NF-kB ve COX-2 ekspresyonunda azalma; p53 ekspresyonunda ise artış gözlenmiştir (Şekil 7) (46). Prostat kanser hücrelerinde (LNCaP) yapılan bir *in vitro* çalışmada GA'in aktif aglikonu olan glisiretinik asitin kanserli hücrelerin çoğalmasını azalttığı tespit edilmiştir (47). İnsan mide kanseri (KATO III) ve promyelotik lökemi (HL-60) hücrelerinde yapılan bir *in vitro* çalışmada ise GA'in kanser hücrelerinde apoptotik etki gösterdiği ortaya konmuştur (48). Farelerde deri altı yolla tümör inokülasyonunun yapıldığı bir *in vivo* çalışmada GA periton içi yolla uygulanmış ve alınan tümör dokuları kütleli yönden değerlendirilmiş ve GA uygulanan grupta tümör kütlelerinin azaldığı gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada GA'in anjiyogenezi yavaşlatmak suretiyle tümör progresyonunu baskıladığı saptanmıştır (49).



**Şekil 7.** Wistar ratların kolon dokusunda DMH ile indüklenen preneoplastik lezyonlara ve hasarlara karşı GA'nin etki noktaları [GA, DMH ile indüklenen ACF'yi azaltır. DMH uygulaması yangı ile beraber kolon submukozasında mast hücre infiltrasyonunda bir artışa sebep olur ve NF-κB ile COX-2 gibi proinflatuar belirteçlerin ekspresyonu artar. GA ise bu belirteçlerin ekspresyonunu ve submukozal mast hücre infiltrasyonunu azaltır. DMH uygulaması p53 ekspresyonunu azaltır, GA ise artırır. (DMH: 1,2-Dimetilhidrazin, NF-κB: Nükleer Faktör-kappaB, COX-2: Siklooksijenaz-2, iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz, GA: Glisirizik asit, ACF: Anormal Kript Odakları, Cell Survival: Hücre Canlılığı, Cell Proliferation: Hücre Çoğalması, Transcription: Transkripsiyon, Cytoplasm: Sitoplazma)] (46).

### 3.9. Kanser Tedavisinde Kombine Kemoterapinin Önemi

Kombine kemoterapi birçok nedenden dolayı önemlidir. Birincisi, her bir ilaç için dozajlama riski taşımadığı sürece hastanın tolere ettiği toksisite aralığında en yüksek oranda hücre ölümü sağlar. İkincisi, heterojen tümör popülasyonunda farklı genetik anormallığı olan hücreler ile ilaçlar arasında daha geniş yelpazede



etkileşim sağlar. Son olarak, oluşacak hücrel ilaç direnci gelişimini önleyebilir veya azaltabilir (2).

KRK tedavisinde kullanılan antineoplastiklerin etkinliklerindeki yetersizlikler ve ciddi yan etkileri nedeniyle bitkisel kaynaklı alternatif tedavi yaklaşımları önem arz etmektedir. Karanfil yağının temel bir bileşeni olan EU ve meyan kökünün temel bileşenlerinden GA'nın KRK'ler üzerindeki etkilerine yönelik sınırlı sayıda *in vivo* çalışma bulunmakla birlikte bu iki bitkisel maddenin eşzamanlı kullanımı üzerine araştırmalara literatürde rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada deneysel olarak KRK oluşturulan ratlarda bitkisel kaynaklı EU ve GA'nın muhtemel koruyucu etkileri klasik histopatoloji ve biyokimyasal parametrelere ilave olarak Western blot tekniği kullanılarak modern kanser belirteçlerinin ortaya konmasıyla araştırılmış ve bu iki koruyucu maddenin eş zamanlı kullanımlarının potansiyel etkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1. Gereç

#### 4.1.1 Alet ve Cihazlar

Analitik hassas terazi	AND HR-250AZ
Buzdolabı (+4 °C)	Samsung
Buz makinası	Scotsman AF20
Derin dondurucu (-20 °C)	Uğur UDF 75L
Derin dondurucu (-80 °C)	VWR symphony
Çalkalayıcı	Lab.Companion SK-300
Çeker ocak	TEZ-SAN Uzay Serisi
Çok kanallı mikropipet (30-300 µl)	Eppendorf
Distile su cihazı	GLF 2104
Mikropleyt spektrofotometre	Thermo Fisher Multiscan GO
Elektroforez sistemi	Bio-Rad Mini Protean Tetra Cell
Etüv	Memmert INB 400
Güç kaynağı	Bio-Rad Power Pac
Homojenizatör	QIAGEN Tissue Lyser LT
Kemilüminesan görüntüleme cihazı	VILBER LOURMAT Fusion FX
Manyetik karıştırıcı	IKA RCT Classic
Mikropipet (0.5-10, 10-100, 100-1000)	Eppendorf
Makropipet (0.5-5 ml)	Thermo Scientific
Mikrosantrifüj	VWR Mini Star
pH metre	VWR pHenomenal pH 100 L
Soğutmalı santrifüj	Hettich UNIVERSAL 320 R
Spektrofotometre	Techcomp UV 7500

Su banyosu	Nüve nb20
Thermal Cycler	BIORAD T100
Ultra saf su cihazı	Merck Millipore Direct Q-3UV
Vorteks	VELP Scientifica APX-153

#### 4.1.2. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

Akrilamid %30	Sigma A3574
Amonyum persülfat	Sigma A3678
Azoksimetan	Sigma A5486
Bakır-2-klorür	Aldrich 222011
Bakır-2-sülfat	Merck 1.02790.1000
BCA protein tayin kiti	Thermo Fisher 23225
Boncuk parafin	MOSLAB B0083
5,5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)	Sigma D8130
Etanol absolut	Sigma-Aldrich 32221
Etilendiamin tetra asetik asit	Sigma E5134
Eugenol	Aldrich E51791
Folin-fenol ayırıcı	Merck 1.09001.0100
Filtre kağıdı	Bio-Rad 1703932
Glisin	Sigma G8898
Glisirik asit	Aldrich G2137
Hidrojen peroksit %30	Sigma-Aldrich 18312
Hidroklorik asit %37	Merck 1.00314.2500
İndirgenmiş glutatyon	Appllichem A2084
Jel yükleme ucu (100 µl)	Bio-Rad Prot/Elec Pipet Tips

Kloroform	Carlo Erba Reagents 438603
Ksantin	Alfa Aesar A11077
Ksantin oksidaz	Sigma X4875
Ksilen	MOSLAB PB1065
Lamel 24x24 mm	Isolab 075.00.004
Lam kutusu	Isolab 075.02.001
Lam-traşlı	Isolab 075.05.003
2X Laemmli sample buffer	Bio-Rad 1610737
Mayer's hemotoksilin solüsyonu	Sigma MHS16
Metanol	Sigma-Aldrich 34885
Metilen mavisi	Sigma-Aldrich 50484
2-Merkaptoetanol	Aldrich 6250
Mikrosantrifüj tüpü 1,5 ml	Isolab 078.03.002
Mikrotom bıçağı	Isolab
Nitroblue tetrazolyum	Fisher Scientific BP1081
N,N,N',N'-Tetrametilendiamin	Sigma T9281
Parafin kasedi	Isolab 074.03.001
Pastör pipeti 3 ml	Isolab 084.02.001
Potasyum fosfat monobazik	Riedel-de Haen 04243
Potasyum hekzasiyanoferrat	Merck Milipore 104973
Potasyum klorür	Sigma-Aldrich 12636
Potasyum siyanür	Merck 104967
Precision Plus Protein Western C	Bio-Rad 1610376
Primer antikor (Bax)	Santa Cruz sc-70407
Primer antikor (Beta actin)	Santa Cruz sc-47778

Primer antikor (Bcl-2)	Santa Cruz sc-7382
Primer antikor (COX-2)	Santa Cruz sc-23984
Primer antikor (NF-kB p65)	Santa Cruz sc-8008
Primer antikor (p53)	Santa Cruz sc-98
1-Propanol	Sigma-Aldrich 34871
PVDF membran	Sigma P2688
Ripa lizis buffer sistem	Sanat Cruz sc 24948A
Sekonder antikor (IgG-HRP)	Santa Cruz sc-2006
Sığır serum albümini	Sigma A2153
Sodyum dodesil sülfat	Sigma L3771
Sodyum fosfat dibazik dodekahidrat	Sigma-Aldrich 71650
Sodyum hidrojen karbonat	Merck 1.06329.1000
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich 13418
Sodyum klorür	Merck 1.06404.1000
Sodyum potasyum tartarat tetrahidrat	Sigma-Aldrich S2377
Strep Tactin-HRP konjugat	Bio-Rad 1610381
1,1,3,3-Tetrametoksiopropan	Aldrich 108383
Tiyobarbitürik asit	Sigma-Aldrich T5500
Trikloroasetik asit	Sigma-Aldrich 27242
Trizma base	Sigma T1503
Tween 20	Sigma P9416
Western ECL substrat	Bio-Rad 1705060
Yağsız süt tozu (blotting grade)	Bio-Rad 1706404

### 4.1.3. Hayvan Materyali

Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM)'nden temin edilen 5-7 haftalık Sprague Dawley ırkı 80 adet erkek rat kullanıldı. Ratlar standart koşullar altında (sabit ısı ve havalandırılmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olmak üzere) barındırıldı. Su ve yem (standart ticari pellet yem) *ad libitum* olarak verildi.

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 24.06.2015 tarih ve 2015/11-122 sayılı onay kararı alınarak gerçekleştirildi.

## 4.2. Yöntem

### 4.2.1. Deneysel Model

Ratlar her grupta 10 hayvan olacak şekilde 8 gruba ayrıldı. Çalışmada kullanılacak maddelerden azoksimetanın dozu Shwter ve ark. (25), eugenolün dozu Manikandan ve ark. (16) ve glisirizik asitin dozu Khan ve ark. (46) tarafından önerilen dozlara göre belirlendi. Azoksimetan ve glisirizik asit serum fizyolojik içerisinde, eugenol ise mısır yağında çözdürülerek seyreltildi. Çalışma grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

**Grup 1. Kontrol grubu:** Bu gruptaki ratlara çalışmanın başlangıcından itibaren 16 hafta boyunca her gün gavaj yoluyla serum fizyolojik (SF) uygulandı.

**Grup 2. Azoksimetan grubu (AOM):** AOM, çalışmanın 3 ve 4. haftalarında birer kez 15 mg/kg dozunda deri altı yolla; SF ise çalışmanın başlangıcından itibaren 16 hafta boyunca her gün gavaj yoluyla uygulandı

**Grup 3. Eugenol grubu (EU):** EU çalışmanın başlangıcından (0. gün) itibaren 16 hafta boyunca her gün 100 mg/kg dozunda gavaj yoluyla uygulandı.

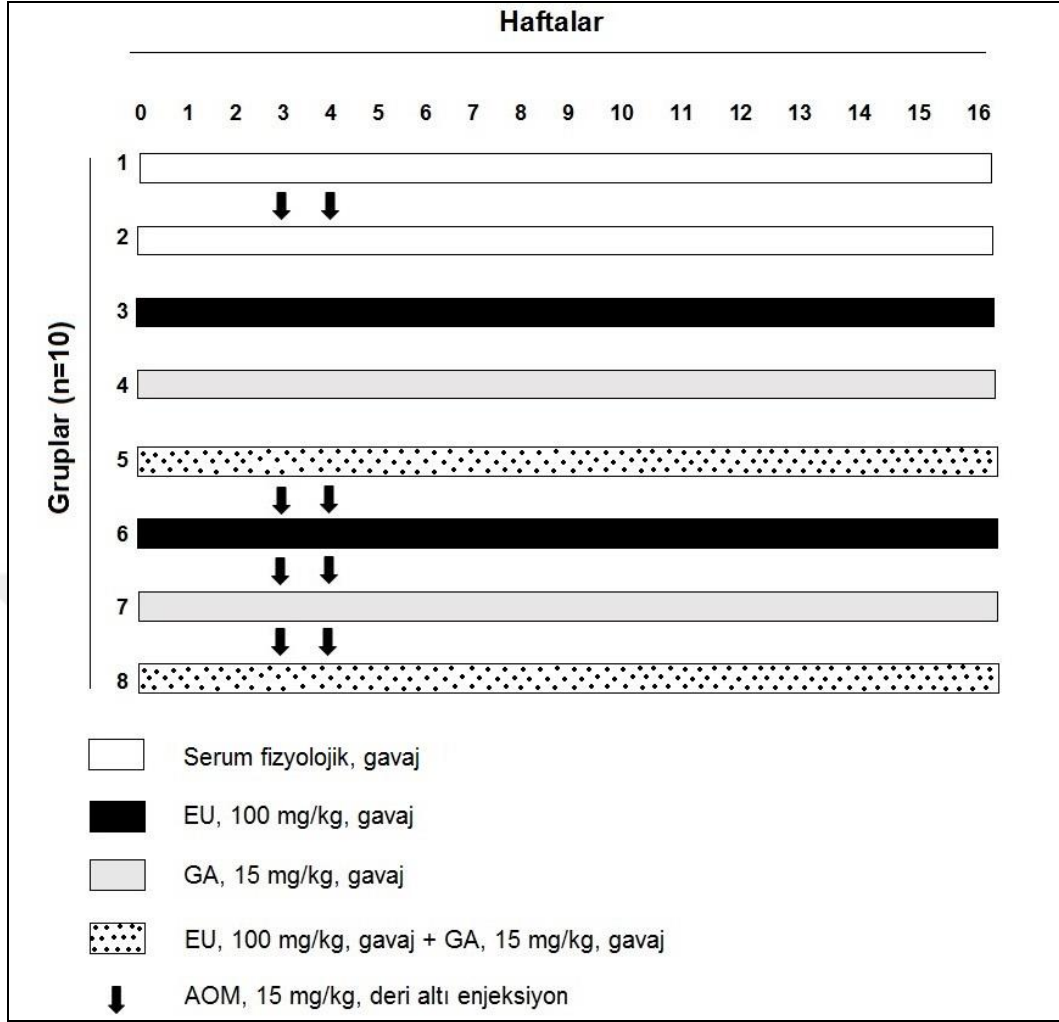
**Grup 4. Glisirizik asit (GA):** GA çalışmanın başlangıcından (0. gün) itibaren 16 hafta boyunca her gün 15 mg/kg dozunda gavaj yoluyla uygulandı.

**Grup 5. Eugenol+glisirizik asit (EU+GA):** EU ve GA çalışmanın başlangıcından itibaren (0. gün) 16 hafta boyunca her gün sırasıyla 100 mg/kg ve 15 mg/kg dozunda eş zamanlı olarak gavaj yoluyla uygulandı.

**Grup 6. Azoksimetan+eugenol grubu (AOM+EU):** EU çalışmanın başlangıcından (0. gün) itibaren 16 hafta boyunca her gün 100 mg/kg dozunda gavaj yoluyla; AOM 3 ve 4. haftalarda birer kez 15 mg/kg dozunda deri altı yolla uygulandı.

**Grup 7. Azoksimetan+glisirizik asit grubu (AOM+GA):** GA çalışmanın başlangıcından (0. gün) itibaren 16 hafta boyunca her gün 15 mg/kg dozunda gavaj yoluyla; AOM 3 ve 4. haftalarda birer kez 15 mg/kg dozunda deri altı yolla uygulandı.

**Grup 8. Azoksimetan+eugenol+glisirizik asit (AOM+EU+GA):** EU ve GA çalışmanın başlangıcından itibaren (0. gün) 16 hafta boyunca her gün sırasıyla 100 mg/kg ve 15 mg/kg dozunda eş zamanlı olarak gavaj yoluyla; AOM 3 ve 4. haftalarda birer kez 15 mg/kg dozunda deri altı yolla uygulandı.



**Şekil 8.** Çalışmada kullanılan deneysel modelin şematik gösterimi.

#### 4.2.2. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Çalışmanın sonunda son ilaç uygulamasından 24 saat sonra ratlar hafif eter anestezisine alınarak kalpten kan alındı ve ratlar sakrifiye edildikten sonra doku örnekleri alındı.

##### 4.2.2.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması

Kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra plazmaları ayrıldı. Plazma kısmı ayrılan kan örnekleri serum



fizyolojik ile 3 defa yıkanarak eritrosit paketleri oluşturuldu. Plazma ve eritrosit paketleri daha sonra çalışılmak üzere -80 °C’de muhafaza edildi.

#### **4.2.2.2. Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması**

Sakrifiye edilen ratlardan distal kolon dokusu (yaklaşık 10 cm) alındı. Serum fizyolojik içerisinde yıkanan kolon dokusu dikey olarak ikiye bölündü. Yarısı histopatolojik incelemeler yapılmak üzere %10’luk formole alındı. Kalan yarısı ise biyokimyasal analizler ve Western blot analizleri yapılincaya kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

#### **4.2.3. Histopatolojik Yöntemler**

##### **4.2.3.1. ACF Belirleme Yöntemi**

Sakrifiye edilerek karın boşluğu açılan ratlarda, rektum sınırından başlayarak 10 cm’lik distal kolon bölümünden 2’ şer cm uzunluğunda alınan doku örnekleri % 0,9 serum fizyolojik ile yıkanıp kurutma kağıdı içerisine alınarak 24 saat % 10’luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Anormal kript odakları (ACF) tespiti amacıyla kolon mukoza yüzeyi metilen mavisi (MB) ile 6 dakika boyandıktan sonra ışık mikroskopunda 20x büyütmede incelendi. Etrafındaki normal kriptlere göre; lümende genişleme, yoğun boyanma özelliği, büyüklük (normal kript büyüklüğünün 3-4 katı) ve perikriptal zonda artış gözlenen kriptler ACF olarak değerlendirildi (50). ACF skorlaması Kristiansen (51)’in kullandığı metod modifiye edilerek yapıldı. Değerlendirmede 1-3 arası kript içeren ACF’ler değerlendirilme dışı bırakıldı. Diğerleri ise içerdikleri kript sayısına göre küçük (4-6), orta (7-9) ve büyük ( $\geq 10$ ) ACF şeklinde sınıflandırıldı.

#### **4.2.3.2. Klasik Histopatoloji**

% 0,9 serum fizyolojik ile yıkamanın ardından kolon örnekleri % 10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda 48 saat tespit edildi. Daha sonra bilinen klasik doku takip işlemlerinden geçirilen örneklerden parafin bloklar hazırlandı. Bloklardan 5 µm kalınlığında ve 300 µm'lik aralıklarla alınan seri kesitler Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi (52).

#### **4.2.4. Biyokimyasal Analizler**

##### **4.2.4.1. Örneklerin Hazırlanması**

Kolon örnekleri tartılıp cam tüplere konulduktan sonra üzerlerine 1/10 (g/v) oranında sulandırma olacak şekilde %1,15'lik KCl ilave edildi ve +4°C'de homojenize edildi. Elde edilen homojenatın bir kısmı malondialdehit (MDA) tayininde kullanıldı. Geri kalan homojenat ise +4°C'de 45 dk süreyle 3500 rpm'de santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantın bir kısmı indirgenmiş glutatyon (GSH), katalaz (CAT) ve protein ölçümlerinde kullanıldı. Bu süpernatantın geri kalan kısmına ise 3/5 (v/v) oranında kloroform/etanol karışımından oluşan ayraç 1/1 (v/v) oranında ilave edilerek vorteksle karıştırıldı. Daha sonra 45 dk 3500 rpm'de santrifüj edildi ve üstte kalan kloroform/etanol fazında süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçüldü (53).

Eritrosit paketleri 1/5 oranında distile su ile sulandırılarak hemolizat hazırlandı (54). Elde edilen hemolizatlarda hemoglobin (Hb) ve GSH düzeyleri ile SOD ve CAT enzim aktiviteleri ölçüldü. Plazmada ise lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA düzeyleri ölçüldü (54, 55).

#### 4.2.4.2. Doku ve Plazma MDA Düzeylerinin Ölçümü

Kolon dokusunda ve plazmada MDA düzeylerinin tayini spektrofotometrik olarak Ohkawa ve ark. (56) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı.

**Prensip:** Aerobik şartlar altında ve pH 3,5'te, doku homojenatının 95°C'de 1 saat inkübasyonu sonucu, lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır.

#### 4.2.4.3. Doku ve Hemolizatta GSH Düzeylerinin Ölçümü

Kolon dokusunda ve hemolizatta GSH düzeylerinin tayini Ellman (57) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı.

**Prensip:** 5,5-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit] (DTNB)'in, sülfidril bileşikleri tarafından indirgenerek bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks oluşturulması ve daha sonra bu renkli bileşiğin optik dansitesinin 412 nm dalga boyunda ölçülerek GSH düzeylerinin belirlenmesi esasına dayanmaktadır.

#### 4.2.4.4. Doku ve Hemolizatta SOD Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

Kolon dokusunda ve hemolizatta SOD aktivitelerinin ölçümü Sun ve ark. (58) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı.

**Prensip:** Ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazolium (NBT)'u indirgemesi esasına dayanmaktadır. Oluşan süperoksit radikallerinin NBT'ü indirgemesi ile oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamlarda ise indirgenme olmayıp mavi-mor renk oluşmaz ve enzim aktivitesine bağlı olarak daha açık bir renk oluşur. SOD

aktivitesinin tayini bu renk değişimden kaynaklanan optik dansitenin 560 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

#### **4.2.4.5. Doku ve Hemolizatta CAT Enzim Aktivitelerinin Ölçümü**

Kolon dokusunda ve hemolizatta CAT aktivitelerinin ölçümü Aebi (59) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı.

**Prensip:** 240 nm dalga boyunda maksimum absorbanans gösteren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deney ortamına ilave edildiğinde CAT tarafından parçalanır ve absorbansta bir düşüş gözlenir. Absorbanstaki azalma enzim aktivitesiyle doğru orantılıdır. Analiz, absorbanstaki bu düşüşün izlenmesi esasına dayanır.

#### **4.2.4.6. Dokuda Protein Düzeylerinin Ölçümü**

Kolon dokusunda protein miktarı tayini Lowry ve ark. (60) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı.

**Prensip:** Alkali bakır ayracındaki Cu<sup>++</sup> peptid bağları ile kompleks yapmaktadır. Her 7 veya 8 aminoasit artığı 1 atom bakır bağlamaktadır. Folin-Fenol ayracı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mavi-mor renk oluşur. Protein miktarı tayini, oluşan bu rengin spektrofotometrede 650 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

#### **4.2.4.7. Hemoglobin Düzeylerinin Ölçümü**

Hemoglobin miktarları Drabkin yöntemine (61) göre ölçüldü.

**Prensip:** Bu yöntemde ferrisiyanür Hb'deki demiri oksitlemek suretiyle iki değerlikli demiri üç değerlikli demire çevirerek methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanür ile kararlı bir pigment olan

siyanmethemoglobin meydana gelir. Hb miktar tayini oluşan bu bileşiğin absorbansının 564 nm’de okunması esasına dayanmaktadır.

#### **4.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blotlama Tekniği ile Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi**

İlk olarak kolon dokusunda total protein izolasyonu yapıldı. Daha sonra bu örneklerde BCA metoduyla protein miktarları belirlendi. Her kuyuya eşit miktarda protein yüklenerek SDS-PAGE yapıldı. NF-kB, p53 ve beta aktin ekspresyonlarının belirlenmesinde %8; Bax, Bcl ve COX-2 ekspresyonlarının belirlenmesinde ise %15’lik poliakrilamid jel kullanıldı. SDS-PAGE’in ardından bu proteinler Western blotlama tekniği ile poliviniliden diflorit (PVDF) membranlara aktarıldı. Bloklamanın ardından primer ve sekonder antikorlarla muamele edilen membranlarda kemilüminesan konjugat kullanılarak elde edilen bantlar özel görüntüleme sisteminde (Fusion FX) görüntülendi. Elde edilen görüntülerdeki bant yoğunlukları uygun analiz sistemi ile ölçüldü (İmage J; National İnstitutue of Health, Bethesda, USA).

##### **4.2.5.1. Total Protein İzolasyonu ve Protein Miktarlarının Belirlenmesi**

Kolon dokusundan protein izolasyonu için 0,1 g kolon dokusu düztabanlı polipropilen tüplerin içerisine alınarak üzerine metal bilye yerleştirildi ve sonra 1 ml soğuk Ripa Lizis Buffer eklendi. Tüpler önceden -20°C’de bekletilmiş olan Tissue Lyser’in rötörüne yerleştirildi ve 50 devirde 5 dk homojenize edildi. Daha sonra +4 °C’de 14000 g’de 10 dk santifüj edildi. Üstte kalan süpernatant protein kaynağını oluşturdu. Bu süpernatantların bir kısmı protein analizinde kullanıldı ve kalan kısmı da analizleri yapılmıyaya kadar -80°C’de muhafaza edildi.

Homojenizasyon sonrası süpernatantlardaki protein miktarları Pierce BCA Protein Assay Kit kullanılarak firmanın tarif ettiği prosedüre göre belirlendi.

#### **4.2.5.2. SDS-PAGE**

SDS-PAGE, Biorad mini-protean tetra cell jel elektroforez sistemi kullanılarak yükleme ve ayırma jellerinden oluşan iki gradientli poliakrilamid jellerle yapıldı. NF-kB, p53 ve beta aktin ekspresyonlarının belirlenmesinde %8'lik; Bax, Bcl ve COX-2 ekspresyonlarının belirlenmesinde ise %15'lik poliakrilamid jel kullanıldı. Jeller hazırlandıktan sonra kasetler tankın içerisine yerleştirdi ve kasetlerin içi kuyucukların üzerini örtecek şekilde 1X yürütme tamponu ile dolduruldu. Kuyucuklar, içerisindeki polimerleşmemiş jel kalıntılarını uzaklaştırmak için yürütme tamponu ile yıkandı. Örnekler %0,5 oranında 2-merkaptolanol içeren 2X örnek tamponu ile 1/1 oranında karıştırılarak 95°C'de 5 dk inkübe edildikten sonra eşit hacimde kuyucuklara yüklendi. Birinci kuyucuğa protein markır yüklendi (Precision Protein Western C Standards, Biorad). Yükleme tamamlandıktan sonra tank 1X yürütme tamponu ile dolduruldu. Proteinler yükleme jeli içerisinde jel başına 10mA, ayırma jeli içerisinde jel başına 20 mA akımla yürütüldü. Proteinlerin jel içerisindeki hareketi örnek tamponu içerisinde bulunan bromofenol mavisinin oluşturduğu mavi bant ile takip edildi (62, 63).

#### **Stok Solüsyonlar, Tamponlar**

##### **1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (150 ml)**

Tris baz 27,23 g

Distile su 80 ml

6 N HCl ile pH 8,8'e ayarlandı.

Son hacim 150 ml olacak şekilde distile su eklendi.

**0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (100 ml)**

Tris baz 6,00 g

Distile su 60 ml

6 N HCl ile pH 6,8'e ayarlandı.

Son hacim 100 ml olacak şekilde distile su eklendi.

**%10 SDS (100 ml)**

SDS 10,00 g

Son hacim 100 ml olacak şekilde distile su eklendi.

**%10 (w/v) APS**

Amonyum persülfat 0,10 g

Distile su 1 ml

Günlük taze olarak hazırlandı.

**10X Yürütme Tamponu**

(250 mM Tris, 1,92 M glisin, %1 SDS, pH ~8,3)

Tris baz 30,30 g

Glisin 144,10 g

SDS 10 g

Son hacim 1 L olacak şekilde distile su eklendi (pH'sını ayarlamaya gerek yoktur).

**Poliakrilamid Jeller**

**Ayrırma Jeli (%15, 10 ml)**

Bidistile su 2,3 ml

%30 Akrilamid 5 ml

1.5 M Tris, pH 8,8 2,5 ml

%10 SDS 100 µl

% 10 APS 100 µl

TEMED 10 µl

**Ayrırma Jeli (%8, 10 ml)**

Bidistile su 4,6 ml

%30 Akrilamid 2,67 ml

1,5 M Tris, pH 8,8 2,5 ml

% 10 SDS 100 µl

% 10 APS 100 µl

TEMED 10 µl

**Yükleme jeli (%4, 5 ml)**

Bidistile su 3 ml

%30 Akrilamid 0,67 ml

0,5 M Tris, pH 6,8 1,25 ml

% 10 SDS 50 µl

% 10 APS 50 µl

TEMED 5 µl

**4.2.5.3. Western Blot Tekniği ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi**

Western blot yöntemi Biorad mini-protean tetra cell jel elektroforez sistemi kullanılarak yapıldı. SDS-PAGE'in ardından jeller 5 dk transfer tamponunda bekletilerek transfere hazırlandı. PVDF membranlar 5 dk metanolla aktive edildi. Transfer kaseti içerisine katottan anota doğru sıralanacak şekilde filtre kağıdı, jel, PVDF membran ve tekrar filtre kağıdı üst üste yerleştirildi. Jel ile membran arasında hava boşluğu kalmamasına özen gösterildi. Kasetin kapağı



kapatılarak transfer tankının içerisine yerleştirildi ve tank soğuk (+4°C) transfer tamponu ile dolduruldu. Transfer tankı güç kaynağına bağlanarak +4°C'de 90 dk süre ve 90V akım ile transfer gerçekleştirildi. Blotlama sonrası membranlar transfer tamponunu uzaklaştırmak için 5 dk TBS ile yıkandı. Bu işlemin ardından çalkalayıcı üzerine alınan membranlar %5'lik yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat bloklamaya alındı. Daha sonra 1/500 oranında seyreltilmiş primer antikor ile +4°C'de bir gece inkübe edildi. Bu inkübasyonun ardından 5'er dk 3 kez TBST ile çalkalıyıcı üzerinde yıkandı. Ardından 1/5000 oranında seyreltilmiş sekonder antikorla oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı (Antikor sulandırma oranları firmanın önerdiği sulandırma oranları optimize edilerek yapıldı). Membranlar tekrar 5'er dk 3 kez TBST ile çalkalıyıcı üzerinde yıkandı. TBST içerisindeki Tween 20'yi uzaklaştırmak için TBS ile 5 dk'lık son bir yıkama yapıldı. ECL solüsyonu ile inkübe edilen membranlar kemilüminesan görüntüleme sisteminde (Fusion FX) görüntülendi (62, 63, 64). Elde edilen görüntülerdeki bant yoğunlukları uygun analiz sistemi ile ölçüldü (İmage J; National İnstitutue of Health, Bethesda, USA). Protein ekspresyon düzeyleri internal kontrol olarak kullanılan beta aktine göre normalize edildi (65).

## **Stok Solüsyonlar ve Tamponlar**

### **1X Transfer Tamponu**

(25 mM Tris, 192 mM glisin, %20 (v:v) metanol, pH 8,3)

Tris	3,03 g
Glycine	14,4 g
diH <sub>2</sub> O	500 ml
Methanol	200 ml

Son hacim 1 L olacak şekilde distile su eklendi (pH'sını ayarlamaya gerek yoktur).

### **10X TBS**

20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5

Tris 24,2 g

NaCl 292,4 g

diH<sub>2</sub>O 750 ml

pH 7,5'e ayarlandı (6N HCl ile) ve distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

### **Bloklama solüsyonu (%5 yağsız süt tozu-TBS)**

2.5 g yağsız süt tozu 50 ml 1X TBS içerisinde çözdürüldü.

### **TBST**

20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, %0,05 Tween 20, pH 7,5

1L 1X TBS'e 0,5 ml Tween 20 eklendi.

### **Antikor sulandırma solüsyonu (%5 yağsız süt tozu-TBS)**

2,4 g yağsız süt tozu 50 ml 1X TBS içerisinde çözdürüldü.

#### **4.2.6. İstatistiksel Analizler**

İstatistiksel değerlendirmeler "IBM SPSS Statistics 15" paket programı kullanılarak yapıldı. ACF ve kript sayıları ile diğer verilerin değerlendirmelerinde gruplar arası farklılığın karşılaştırılması için ANOVA ve grup içi karşılaştırmalar için Tukey testi kullanıldı. ACF skorlamaları için ise Kruskal Wallis testi kullanıldı. ACF skorlamasında değerler ortalama olarak, diğer veriler için ise ortalama±standart hata ( $\bar{x}\pm SE$ ) olarak verildi. 0,05'ten küçük olan *p* değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

## 5. BULGULAR

### 5.1. Histopatolojik Bulgular

#### 5.1.1. Makroskopik Bulgular

Makroskopik olarak kolon mukozasında kitle oluşumu AOM+EU+GA grubu hariç diğer deneme gruplarında tespit edildi. Kitle formasyonları AOM grubunda 2, AOM+EU grubunda 4 ve AOM+GA grubunda 1 hayvanda tespit edildi. Çıkarılan kalın bağırsağın tümü makroskopik olarak incelendiğinde, lezyonların sadece distal kolona yerleştiği ve daha çok polip tarzında olduğu gözlemlendi (Şekil 9).



**Şekil 9.** Distal kolon mukozasındaki kitlenin makroskopik görünümü (ok başı).

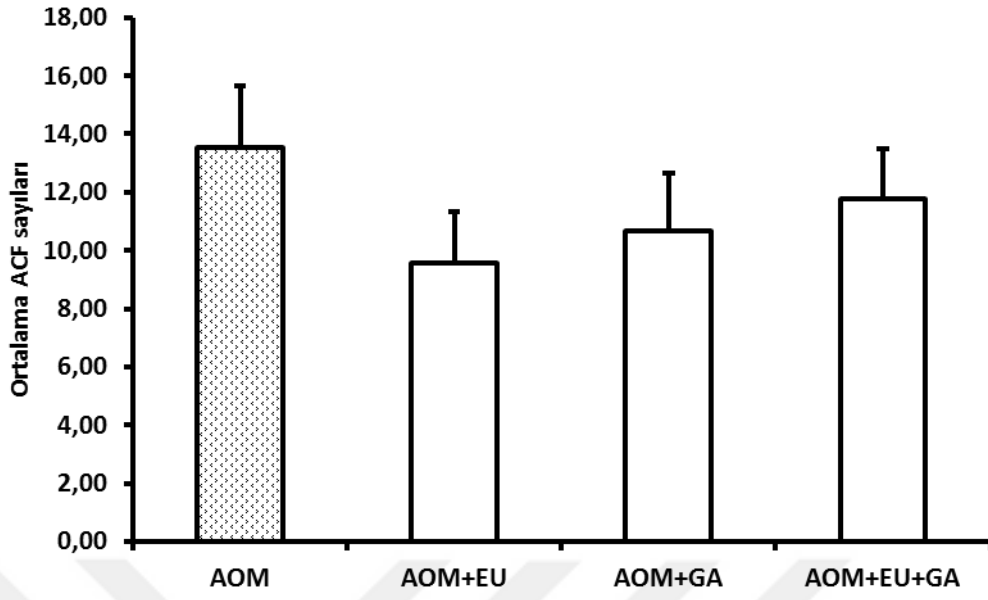
### 5.1.2. ACF Bulguları

Gruplara göre ortalama ACF ve içerdiği kript sayıları Tablo 1, Şekil 10 ve Şekil 11’de sunulmuştur. ACF oluşumları sadece AOM ile tedavi edilen gruplarda (Grup 2, 6, 7 ve 8) tespit edilmiştir (Şekil 12). Tablo 1 incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamasına rağmen AOM grubuyla kıyaslandığında tedavi gruplarında ACF sayılarında bir azalma olduğu gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). ACF sayılarındaki azalmaların en fazla AOM+EU ile tedavi edilen grupta olduğu daha sonra AOM+EU+GA ile kombine tedavi uygulanan grupta olduğu görülmüştür. Aynı şekilde anormal kript sayıları bakımından AOM grubu ile kıyaslandığında tedavi gruplarında bu sayılarda bir azalma olduğu tespit edilmesine rağmen istatistiksel bir farklılık görülmemiştir ( $p>0,05$ ).

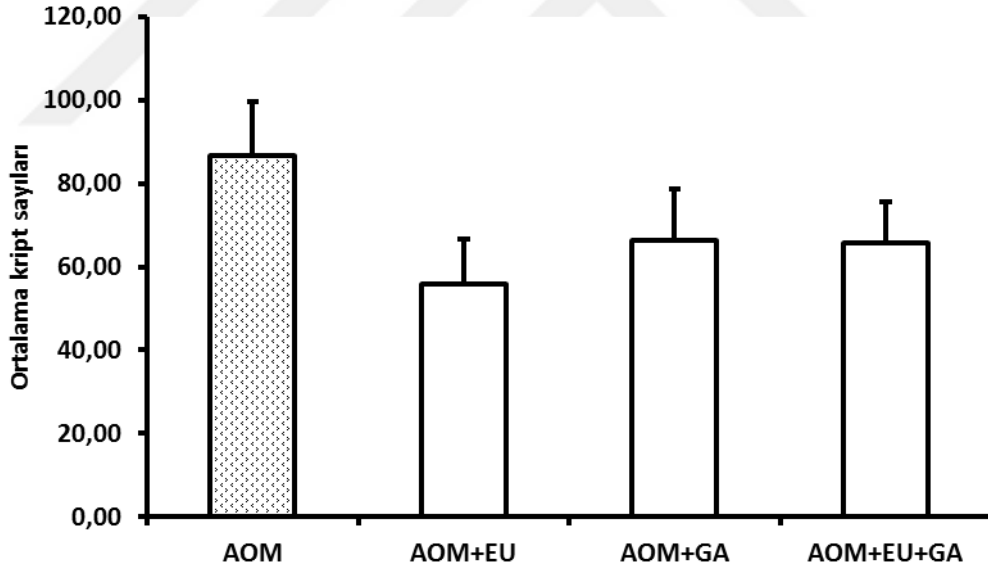
**Tablo 1.** Kanser gruplarında kolon dokusu ACF ve içerdikleri anormal kript sayıları.

Gruplar	ACF ( $\bar{x}\pm SE$ )	Anormal Kript Sayıları ( $\bar{x}\pm SE$ )
Grup 2 (AOM)	13,56 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	86,67 $\pm$ 13,0 <sup>a</sup>
Grup 6 (AOM+EU)	9,56 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	55,78 $\pm$ 10,9 <sup>a</sup>
Grup 7 (AOM+GA)	10,67 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	66,44 $\pm$ 12,3 <sup>a</sup>
Grup 8 (AOM+EU+GA)	11,78 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	65,78 $\pm$ 9,8 <sup>a</sup>
<i>p</i>	0,497	0,307

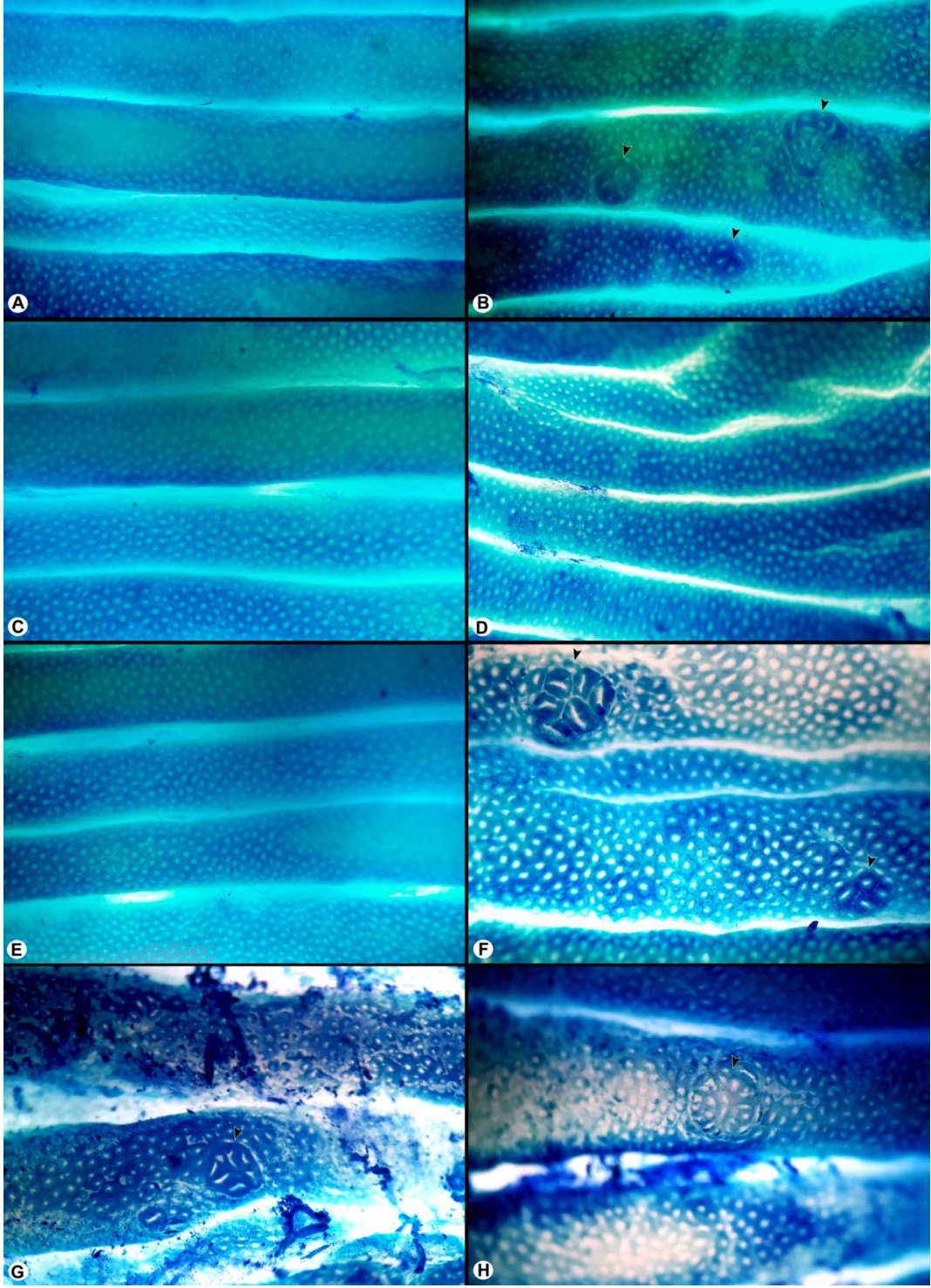
<sup>a</sup>: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0,05$ ).



Şekil 10. Kanser gruplarında ortalama ACF sayıları.



Şekil 11. Kanser grupları kolon dokusunda ACF'lerin içerdiği ortalama kript sayıları.



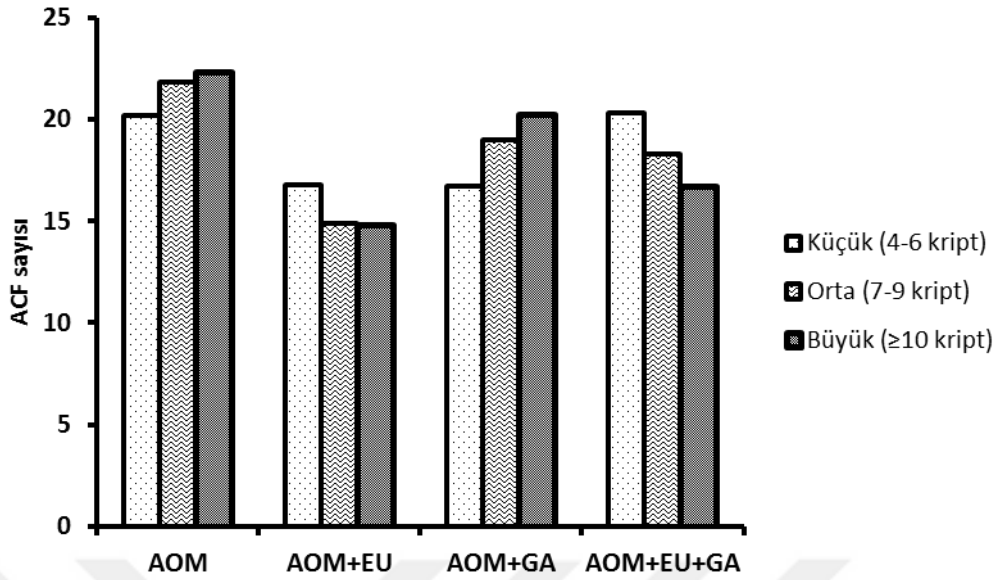
**Şekil 12.** Kanser grupları kolon mukozasında ACF'lerin görünümü (ok başları), MBx20. **A.**Kontrol, **B.** AOM, **C.** EU, **D.** GA, **E.** EU+GA, **F.** AOM+EU **G.** AOM+GA, **H.** AOM+EU+GA.

Tablo 2 ve Şekil 13 incelendiğinde küçük kript sayıları bakımından AOM grubu ile AOM+EU+GA grubu arasında farklılık olmadığı, AOM+EU ve AOM+GA gruplarında ise bu sayıların azaldığı görülmüştür ( $p>0,05$ ). Büyük kript sayılarının ise en fazla AOM grubunda olduğu; tedavi gruplarında bu sayının azaldığı ve en fazla azalmanın da AOM+EU ile tedavi edilen grupta olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 2.** Kanser gruplarında içerdiği kript sayısına göre ACF skorlaması (hayvan başına düşen ortalama kript sayısı).

Gruplar	Küçük (4-6 kript)	Orta (7-9 kript)	Büyük (≥10 kript)
Grup 2 (AOM)	20,2	21,8	22,3
Grup 6 (AOM+EU)	16,8	14,9	14,8
Grup 7 (AOM+GA)	16,7	19,0	20,2
Grup 8 (AOM+EU+GA)	20,3	18,3	16,7
<i>p</i>	-	-	-

-:  $p>0,05$



Şekil 13. Kanser gruplarında içerdiği kript sayısına göre ACF skorlaması.

### 5.1.3. Mikroskopik Bulgular

Yapılan histopatolojik incelemede lezyonlar hafif displazi, şiddetli displazi ve adenokarsinom olmak üzere üç gruba ayrıldı ve Tablo 3'te özetlendi. Mikroskopik olarak kontrol, eugenol (EU), glisirizik asit (GA), eugenol+glisirizik asit (EU+GA) grubu ratlarda herhangi bir lezyon gözlenmezken (Şekil 14); AOM, AOM+EU, AOM+GA, AOM+EU+GA grubundaki ratlarda sırasıyla %76,6 %66,7, % 66,7, %85,7 hafif displazi (Şekil 15), %11,8, %20, %11,1 ve %14,3 oranında şiddetli displazi (Şekil 16, 17, 18) ile %11,8, %13,3, %22,2, %0 oranında adenokarsinom geliştiği tespit edildi (Şekil 19). AOM, AOM+EU ve AOM+GA grubunda tespit edilen adenokarsinomlar, invazyon durumuna göre noninvaziv karsinom ve invaziv karsinom olarak değerlendirildi. Sadece AOM ve AOM+GA grubunda invaziv tipte adenokarsinom tespit edildi (Şekil 20, 21).

Lezyonlar histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, displastik lezyonlarda çekirdeklerde karyomegali ve hiperkromazi olduğu gözlemlendi. Hücreler artmış ve



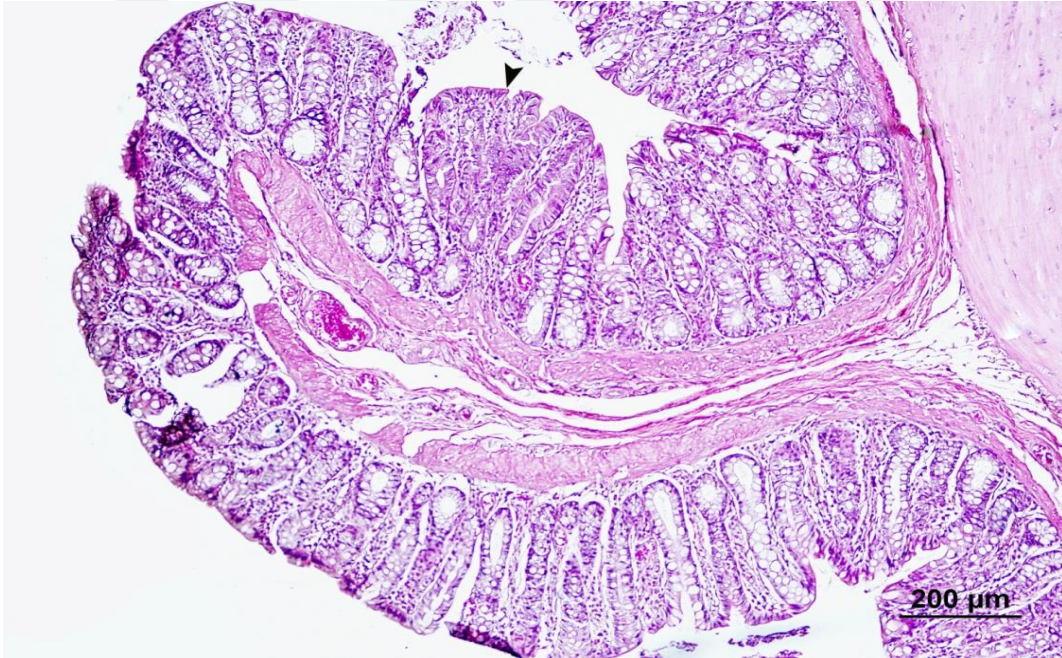
sigara şeklindeydi. Ayrıca çekirdek sitoplazma oranının arttığı tespit edildi. Bezlerde de yapısal düzensizlik ve şekilsizlik mevcuttu. Karsinomlarda ise neoplastik hücrelerde pleomorfizm ve hücre çekirdeklerinde şiddetli hiperkromazi ve karyomegali dikkati çekti. Çekirdek sitoplazma oranlarının neredeyse eşit olduğu tespit edildi. Bazı alanlarda mitotik aktivitenin fazla sayıda ve atipik özellikte olduğu gözlemlendi (Şekil 22).

**Tablo 3.** Histopatolojik lezyonların gruplara göre dağılımları ve yüzde oranları.

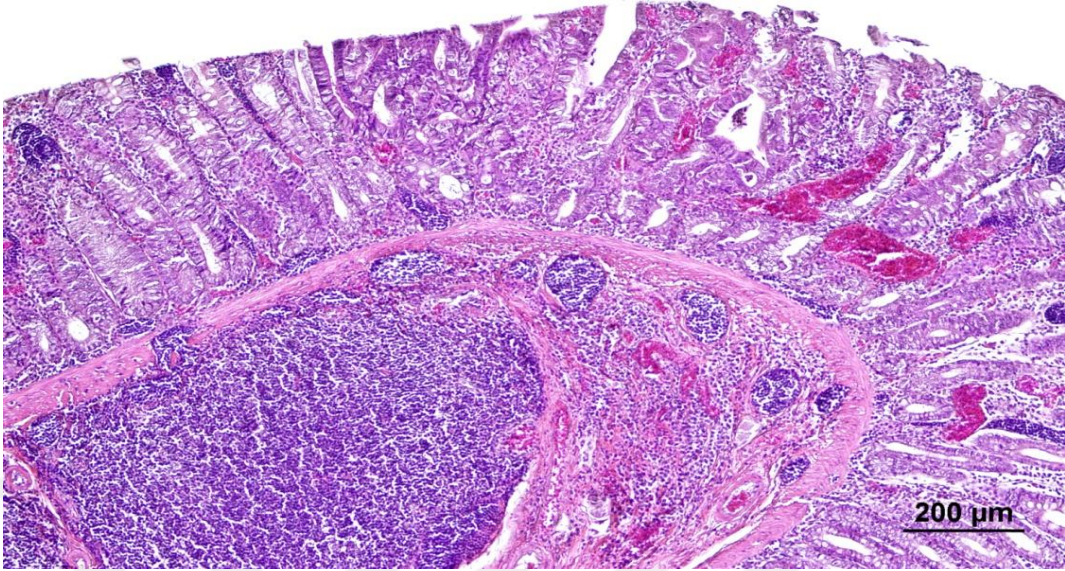
Gruplar	Hafif displazi	Şiddetli displazi	Kötü huylu tümöral lezyon	Toplam lezyon
Grup 1 (Kontrol)	-	-	-	-
Grup 2 (AOM)	13 (%76,6)	2 (%11,8)	2 (%11,8)	17
Grup 3 (EU)	-	-	-	-
Grup 4 (GA)	-	-	-	-
Grup 5 (EU+GA)	-	-	-	-
Grup 6 (AOM+EU)	10 (%66,7)	3 (%20)	2 (%13,3)	15
Grup 7 (AOM+GA)	6 (%66,7)	1 (%11,1)	2 (%22,2)	9
Grup 8 (AOM+EU+GA)	6 (%85,7)	1 (%14,3)	-	7



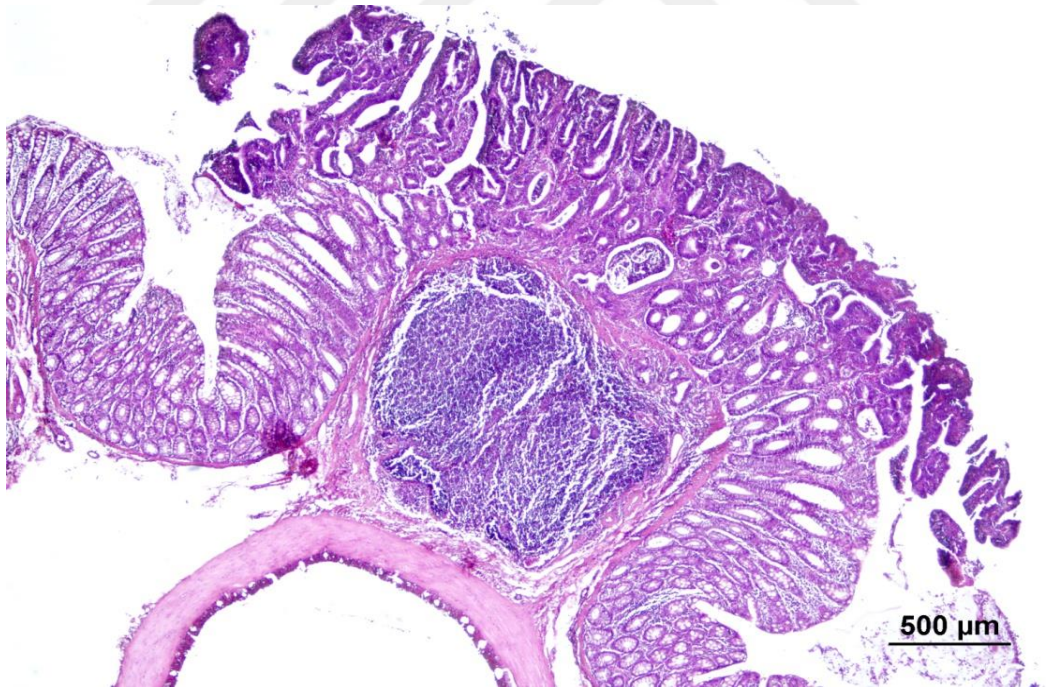
Şekil 14. Kontrol grubunda kolon histolojisinin görünümü, HEx50.



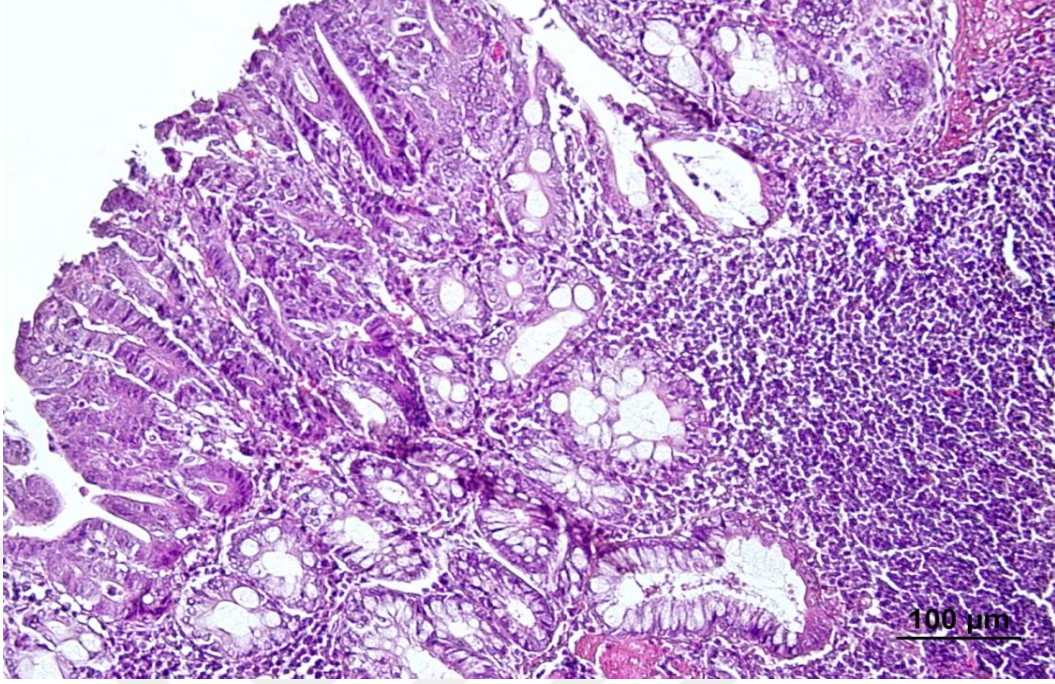
Şekil 15. AOM grubunda kolon epitelinde hafif şiddette displazinin görünümü (ok başı), HEx50.



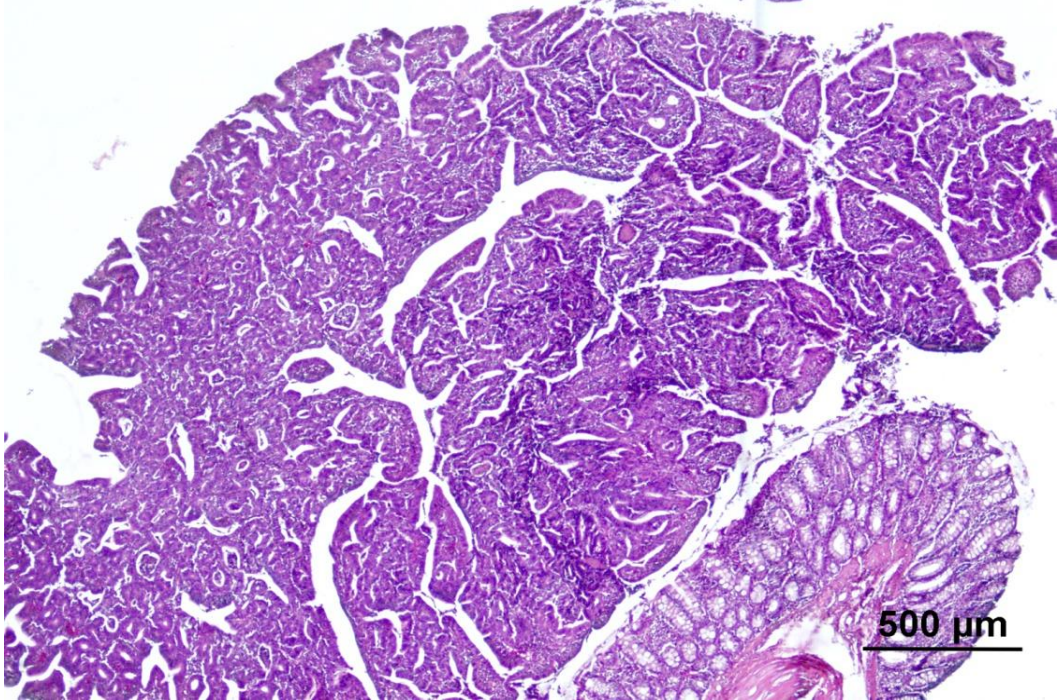
Şekil 16. AOM grubunda şiddetli displazinin görünümü, HEx50.



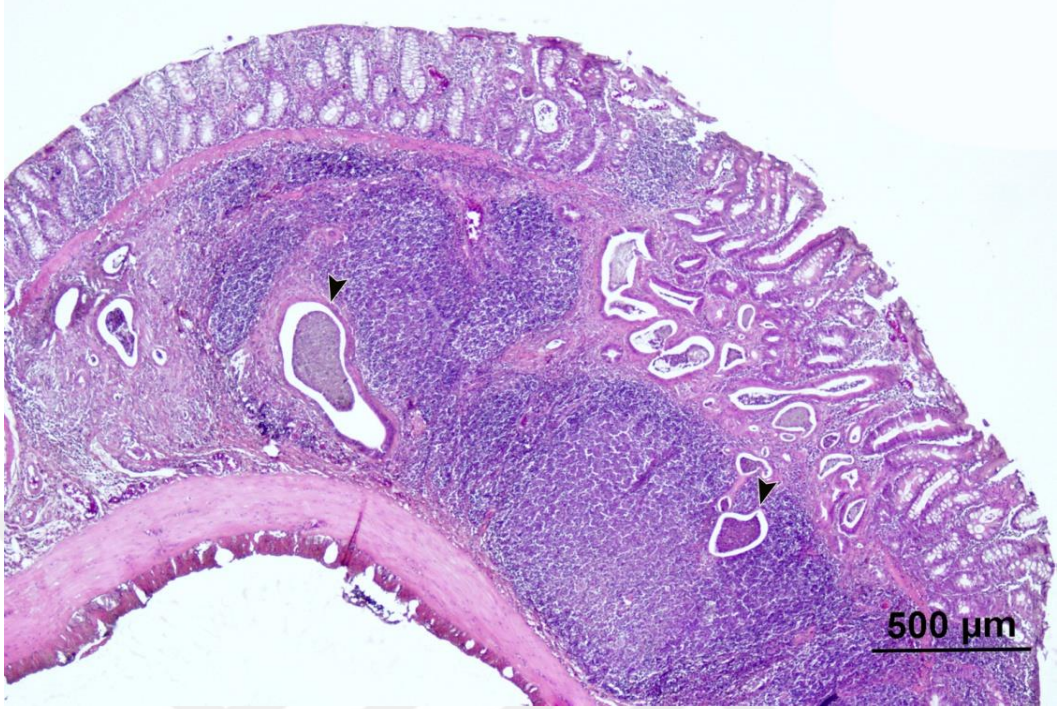
Şekil 17. AOM+EU grubunda şiddetli displazinin görünümü, HEx20.



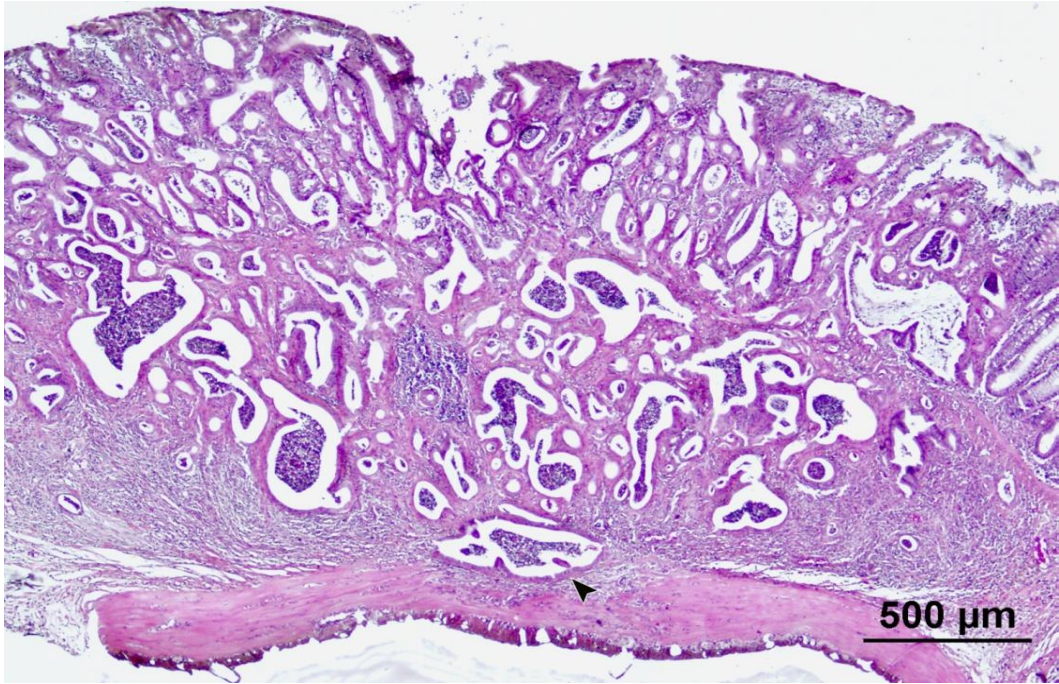
**Şekil 18.** AOM+EU+GA grubunda şiddetli displazinin görünümü, HEx100.



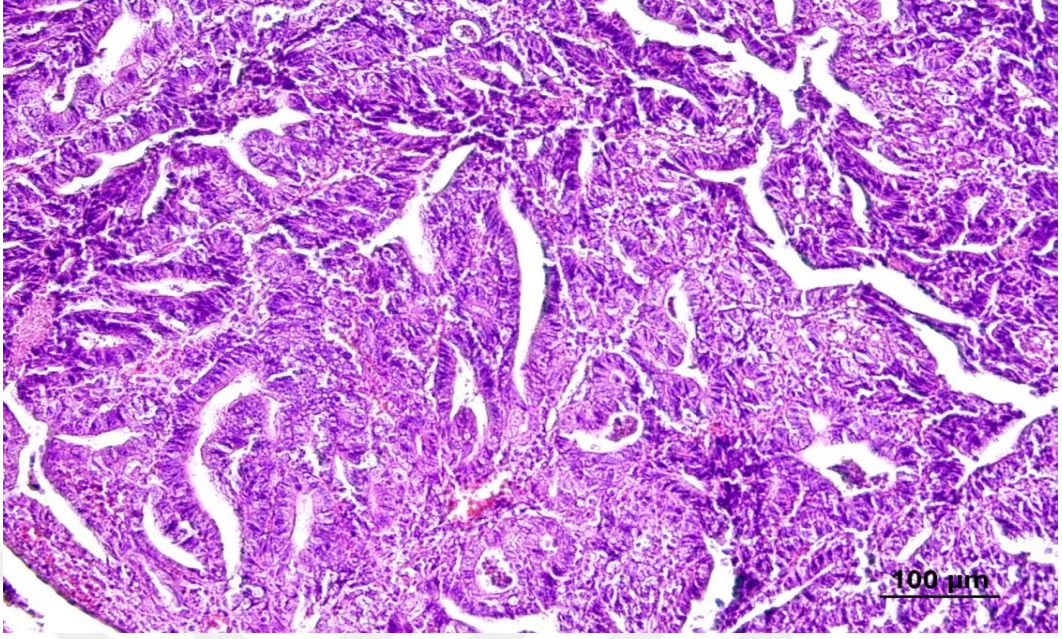
**Şekil 19.** AOM+EU grubunda diferansiye adenokarsinomun görünümü, HEx20.



**Şekil 20.** AOM grubunda submukozaya invazyon (ok başları) yapmış adenokarsinomun görünümü, HEx20.



**Şekil 21.** AOM+GA grubunda submukoza ve tunika muskularise invazyon (ok başı) yapmış adenokarsinomun görünümü, HEx20.



**Şekil 22.** AOM+EU grubunda diferensiyel adenokarsinom; hiperkromatik çekirdeğe sahip atipik epitel ile döşeli glandüler yapıların görünümü, HEx100.

## 5.2. Oksidatif Stres Bulguları

Deney gruplarına ait kolon dokusu MDA ve GSH düzeyleri ile SOD ve CAT aktiviteleri Tablo 4’te ve sırasıyla şekil 23, 25, 27 ve 29’da; plazma MDA ve eritrosit GSH düzeyleri ile eritrosit SOD ve CAT aktiviteleri Tablo 5 ve sırasıyla şekil 24, 26, 28 ve 30’da sunulmuştur.

**Tablo 4.** Tüm gruplarda kolon dokusu MDA ve GSH düzeyleri ile SOD ve CAT aktiviteleri.

Gruplar	MDA (nmol/g doku) ( $\bar{x}$ ±SE)	GSH (nmol/mg protein) ( $\bar{x}$ ±SE)	SOD (U/g protein) ( $\bar{x}$ ±SE)	CAT (k/g protein) ( $\bar{x}$ ±SE)
Grup 1 (Kontrol)	18,23±1,15 <sup>bcd</sup>	5,10±0,49 <sup>c</sup>	222,59±31,72 <sup>ab</sup>	0,17±0,02 <sup>b</sup>
Grup 2 (AOM)	21,16±1,73 <sup>abc</sup>	1,84±0,63 <sup>d</sup>	109,27±10,49 <sup>c</sup>	0,22±0,02 <sup>b</sup>
Grup 3 (EU)	16,78±1,00 <sup>cd</sup>	14,71±0,75 <sup>a</sup>	238,65±26,99 <sup>ab</sup>	0,43±0,02 <sup>a</sup>
Grup 4 (GA)	22,77±1,22 <sup>ab</sup>	3,01±0,40 <sup>cd</sup>	138,53±7,32 <sup>bc</sup>	0,16±0,03 <sup>b</sup>
Grup 5 (EU+GA)	15,31±1,20 <sup>d</sup>	9,05±0,94 <sup>b</sup>	186,87±25,71 <sup>abc</sup>	0,25±0,03 <sup>b</sup>
Grup 6 (AOM+EU)	13,60±1,37 <sup>d</sup>	4,02±0,53 <sup>cd</sup>	218,34±19,40 <sup>ab</sup>	0,22±0,02 <sup>b</sup>
Grup 7 (AOM+GA)	25,84±0,87 <sup>a</sup>	2,63±0,69 <sup>cd</sup>	262,18±40,15 <sup>a</sup>	0,49±0,05 <sup>a</sup>
Grup 8 (AOM+EU+GA)	14,48±0,86 <sup>d</sup>	1,32±0,23 <sup>d</sup>	170,85±17,68 <sup>abc</sup>	0,25±0,03 <sup>b</sup>
<i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,003

a, b, c, d: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0,05$ ).

**Tablo 5.** Tüm gruplarda plazma MDA ve eritrosit GSH düzeyleri ile SOD ve CAT aktiviteleri.

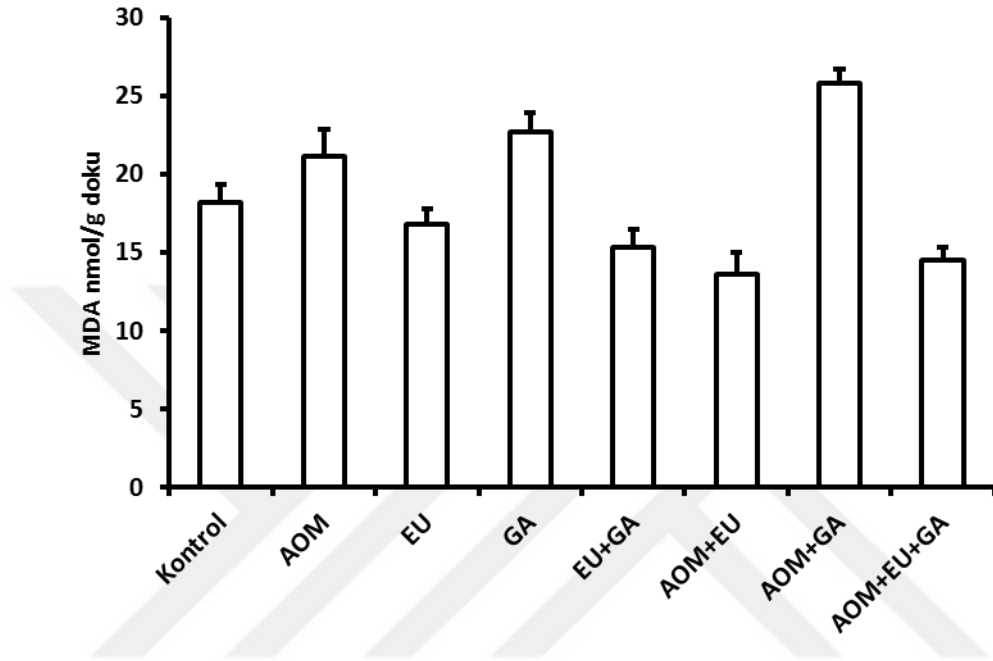
Gruplar	MDA (nmol/ml) ( $\bar{x}\pm$ SE)	GSH (nmol/mg Hb) ( $\bar{x}\pm$ SE)	SOD (U/g Hb) ( $\bar{x}\pm$ SE)	CAT (k/g Hb) ( $\bar{x}\pm$ SE)
Grup 1 (Kontrol)	2,17 $\pm$ 0,14 <sup>abc</sup>	3,00 $\pm$ 0,29 <sup>abc</sup>	23,82 $\pm$ 4,10 <sup>d</sup>	3,36 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup>
Grup 2 (AOM)	2,36 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	1,85 $\pm$ 0,22 <sup>de</sup>	34,77 $\pm$ 2,08 <sup>bcd</sup>	3,98 $\pm$ 0,24 <sup>ab</sup>
Grup 3 (EU)	2,21 $\pm$ 0,14 <sup>ab</sup>	2,83 $\pm$ 0,18 <sup>bcd</sup>	45,76 $\pm$ 3,10 <sup>ab</sup>	3,93 $\pm$ 0,50 <sup>ab</sup>
Grup 4 (GA)	2,21 $\pm$ 0,11 <sup>ab</sup>	3,94 $\pm$ 0,24 <sup>ab</sup>	40,37 $\pm$ 1,68 <sup>b</sup>	4,60 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>
Grup 5 (EU+GA)	1,95 $\pm$ 0,10 <sup>abc</sup>	4,12 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	27,56 $\pm$ 1,42 <sup>cd</sup>	5,75 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>
Grup 6 (AOM+EU)	1,78 $\pm$ 0,08 <sup>bc</sup>	2,23 $\pm$ 0,14 <sup>cde</sup>	38,07 $\pm$ 2,41 <sup>bc</sup>	5,09 $\pm$ 0,31 <sup>ab</sup>
Grup 7 (AOM+GA)	2,16 $\pm$ 0,07 <sup>abc</sup>	2,13 $\pm$ 0,20 <sup>cde</sup>	55,66 $\pm$ 2,78 <sup>a</sup>	5,21 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>
Grup 8 (AOM+EU+GA)	1,72 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	1,30 $\pm$ 0,08 <sup>e</sup>	57,07 $\pm$ 4,50 <sup>a</sup>	5,24 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>
<i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,002

a, b, c, d, e: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0,05$ ).

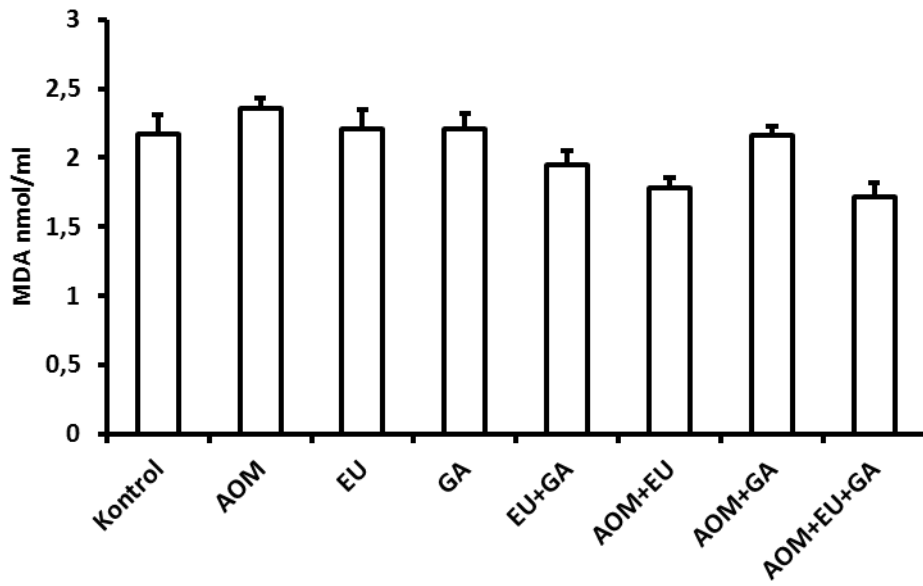
Tablo 4 ve Şekil 23 incelendiğinde kontrol grubu kolon dokusu MDA düzeylerinin 18,23 nmol/g doku olduğu, AOM grubunda ise 21,16 nmol/g doku düzeylerine yükseldiği ancak istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). Tedavi gruplarından AOM+EU grubunda bu değer 13,60 nmol/g doku, AOM+EU+GA grubunda ise 14,48 nmol/g doku düzeylerine düştüğü görülmektedir ( $p<0,01$ ). Tablo 5 ve Şekil 24 incelendiğinde kontrol grubu plazma MDA düzeylerinin 2,17 nmol/ml olduğu, AOM grubunda ise 2,36 nmol/ml düzeylerine yükseldiği ancak anlamlı bir artışın olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ).



Tedavi gruplarından AOM+EU grubunda bu değerin 1,78 nmol/ml, AOM+EU+GA grubunda ise 1,72 nmol/ml düzeylerine düştüğü görülmektedir ( $p<0,01$ ).

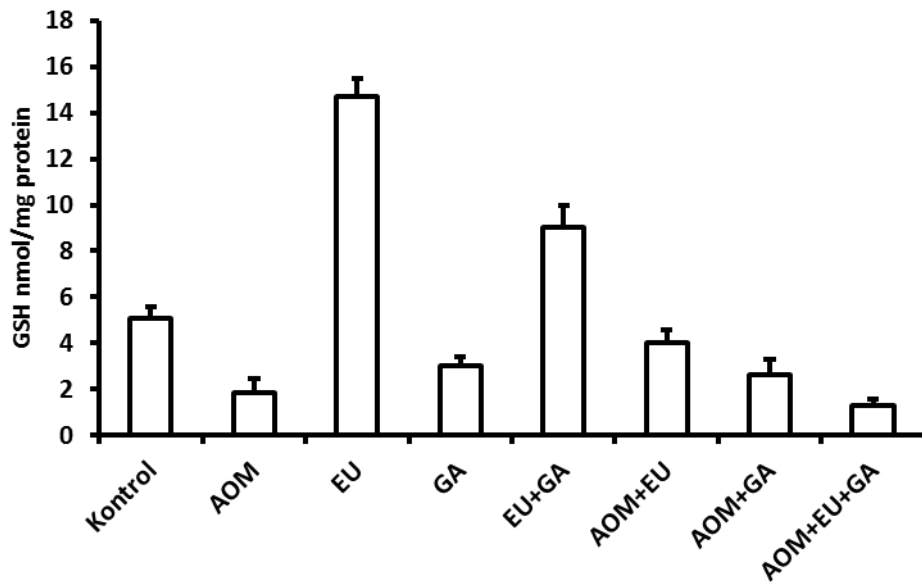


Şekil 23. Kolon dokusu MDA düzeyleri.

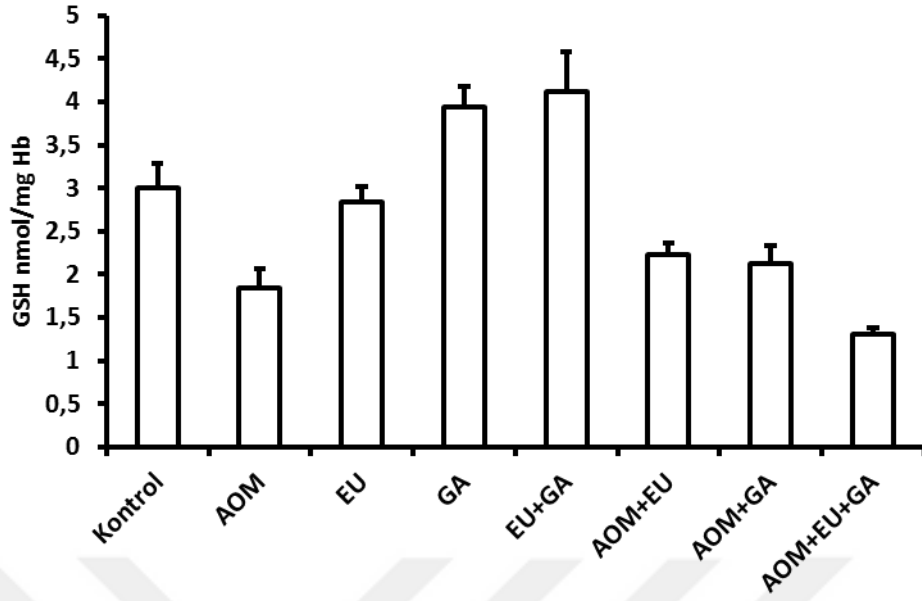


Şekil 24. Plazma MDA düzeyleri.

Kontrol grubu kolon dokusu GSH düzeylerinin 5,10 nmol/mg protein düzeylerinde olduğu, AOM grubunda ise 1,84 nmol/mg protein düzeylerine düştüğü gözlenmiştir ( $p<0,01$ ). AOM grubu ile karşılaştırıldığında tedavi gruplarından AOM+EU grubunda GSH düzeylerinin 4,02 nmol/mg protein, AOM+GA grubunda ise 2,63 nmol/mg protein düzeylerinde olduğu gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). Tek başına EU uygulanan grupta GSH düzeylerinin 14,71 nmol/mg protein değerleriyle kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ( $p<0,01$ ) (Tablo 4 ve Şekil 25). Kontrol grubu eritrosit GSH düzeylerinin 3,00 nmol/mg Hb olduğu, AOM grubunda ise bu düzeylerin anlamlı şekilde azalarak 1,85 nmol/mg Hb düzeylerine düştüğü gözlenmiştir ( $p<0,01$ ). AOM grubu ile karşılaştırıldığında AOM+EU ve AOM+GA gruplarında bu düzeylerin sırasıyla 2,23 nmol/mg Hb ve 2,13 nmol/mg Hb düzeylerine yükseldiği ancak bu artışların anlamlı olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo 5 ve Şekil 26).



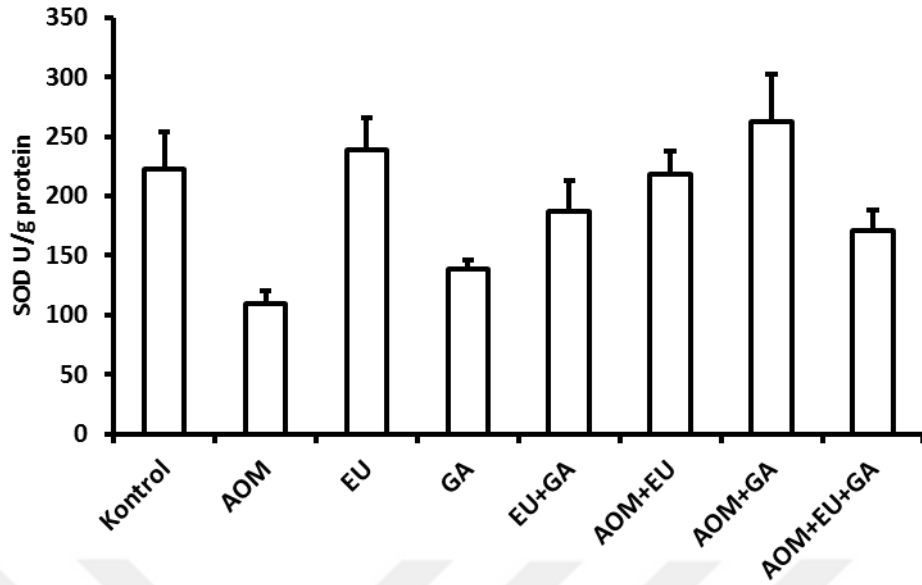
Şekil 25. Kolon dokusu GSH düzeyleri.



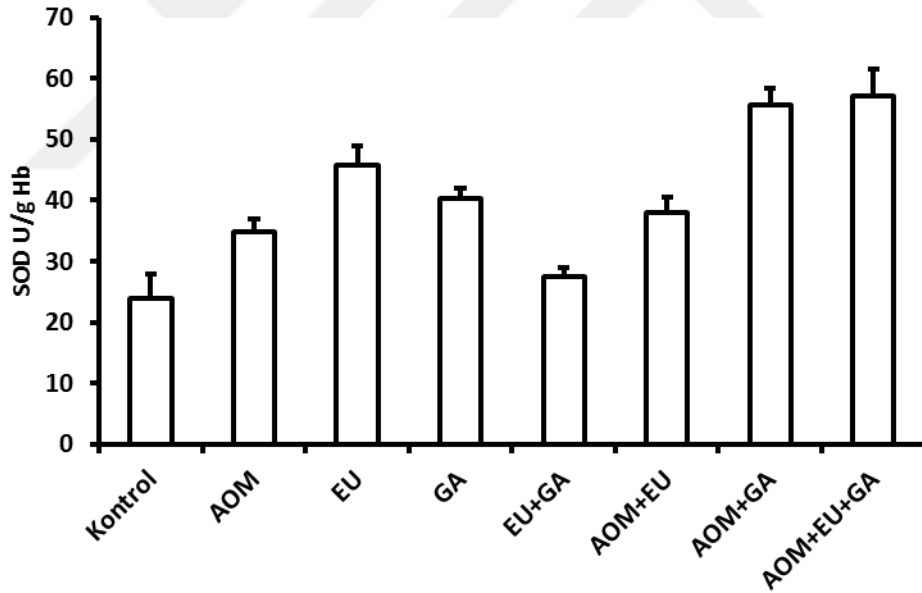
**Şekil 26.** Eritrosit GSH düzeyleri.

Tablo 4 ve Şekil 27 incelendiğinde kontrol grubu kolon dokusu SOD aktivitesinin 222,59 U/g protein düzeyinde olduğu, AOM grubunda ise 109,27 U/g protein düzeylerine düştüğü gözlenmiştir ( $p<0,01$ ). Tedavi gruplarından AOM+EU grubunda bu değer 218,34 U/g protein, AOM+GA grubunda ise 262,18 U/g protein düzeylerine yükseldiği gözlenmiştir ( $p<0,01$ ). AOM+EU+GA grubu SOD aktivitesi 170,85 U/g protein olup, AOM grubuna göre bir artış olduğu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir ( $p>0,05$ ).

Tablo 5 ve Şekil 28 incelendiğinde ise AOM ile kanser oluşturulan grupta eritrosit SOD aktivitelerinde kontrol grubuna kıyasla bir artışın olduğu (sırasıyla  $23,82\pm 4,10$ ;  $34,77\pm 2,08$ ), GA uygulamalarının (grup 7 ve 8) eritrosit SOD aktivitelerinde daha anlamlı artışlar sağladığı gözlenmiştir ( $p<0,01$ ).



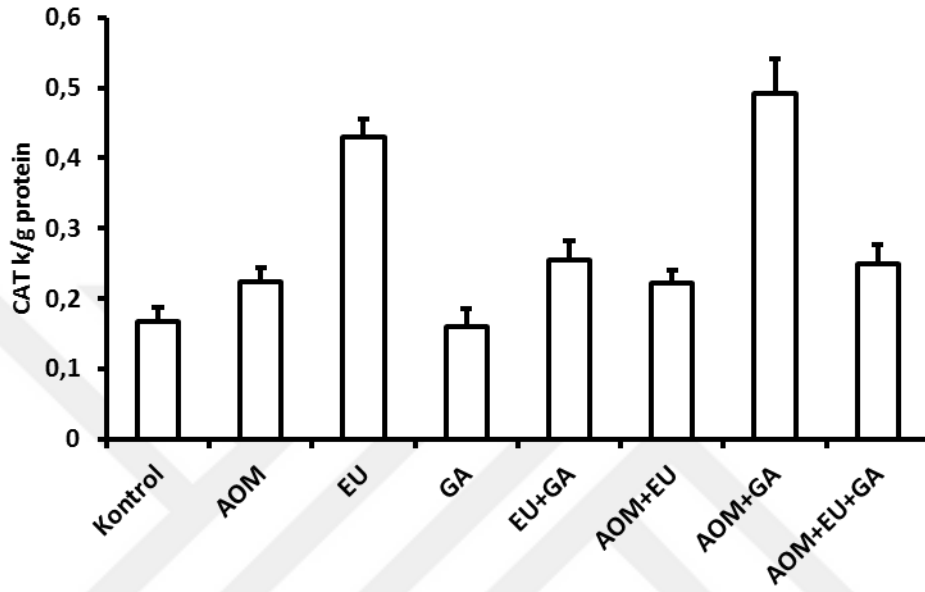
Şekil 27. Kolon dokusu SOD aktiviteleri.



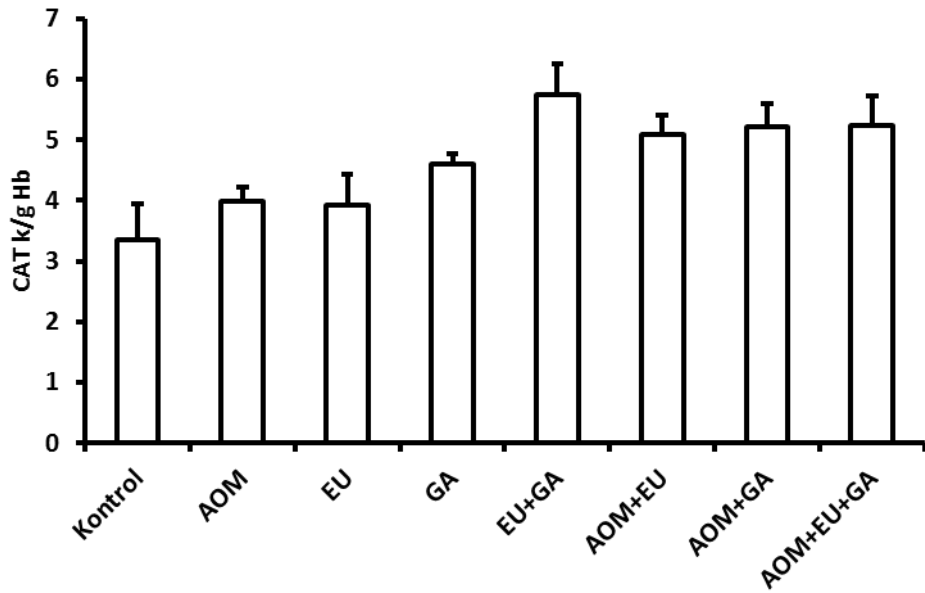
Şekil 28. Eritrosit SOD aktiviteleri.

Kontrol grubu CAT aktivitelerinin 0,17 k/g protein düzeyinde olduğu, AOM grubunda ise 0,22 k/g protein düzeyine yükseldiği ancak iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). Tedavi gruplarında CAT aktivitesi AOM+GA grubunda 0,49 k/g protein ile en yüksek

düzeylelerde tespit edilmiştir (Tablo 4 ve Şekil 29). Eritrosit CAT aktiviteleri yönünden kontrol ve AOM grubu arasında istatistiksel bir farkın olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo 5 ve Şekil 30).



Şekil 29. Kolon dokusu CAT aktiviteleri.



Şekil 30. Eritrosit CAT aktiviteleri.

### 5.3. Kolon Dokusu Bax, Bcl-2, COX-2, NF-kB ve p53 Protein Ekspresyonları

Kolon dokusu Bax, Bcl-2, COX-2, NF-kB ve p53 protein ekspresyon düzeyleri Tablo 6 ve Şekil 31, 32, 33, 34 ve 35'te; Bcl-2/Bax oranları ise Tablo 7'de gösterilmiştir.

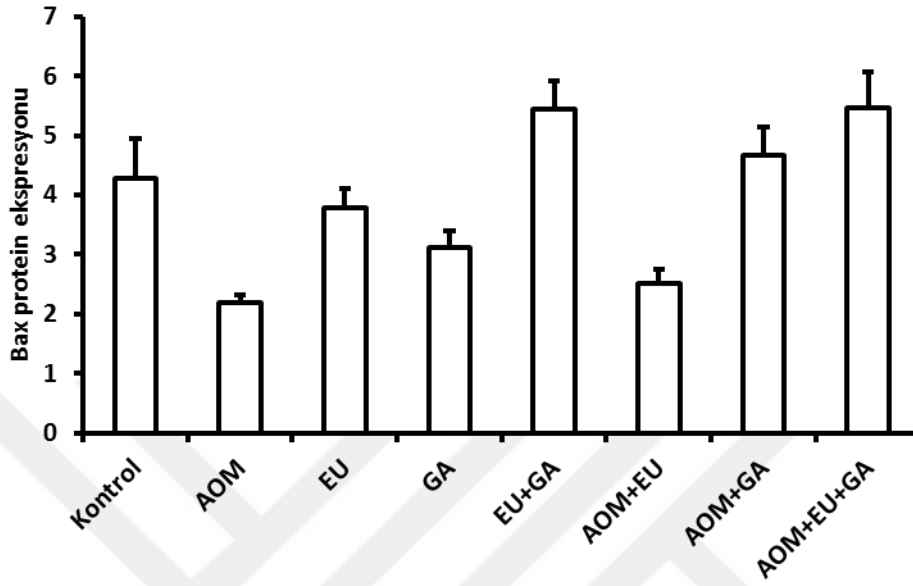
**Tablo 6.** Tüm gruplarda kolon dokusu Bax, Bcl-2, COX-2, NF-kB, p53 protein ekspresyon düzeyleri.

Gruplar	Bax ( $\bar{X}\pm SE$ )	Bcl-2 ( $\bar{X}\pm SE$ )	COX-2 ( $\bar{X}\pm SE$ )	NF-kB ( $\bar{X}\pm SE$ )	p53 ( $\bar{X}\pm SE$ )
Grup 1 (Kontrol)	4,28±0,67 <sup>abc</sup>	4,06±0,41 <sup>abcd</sup>	2,74±0,46 <sup>cd</sup>	2,48±0,24 <sup>ab</sup>	1,02±0,15 <sup>b</sup>
Grup 2 (AOM)	2,18±0,13 <sup>d</sup>	3,34±0,38 <sup>bcde</sup>	0,59±0,09 <sup>e</sup>	1,54±0,17 <sup>cd</sup>	0,69±0,05 <sup>bc</sup>
Grup 3 (EU)	3,79±0,31 <sup>abcd</sup>	3,07±0,21 <sup>cde</sup>	3,28±0,44 <sup>bc</sup>	2,37±0,30 <sup>bc</sup>	0,93±0,05 <sup>bc</sup>
Grup 4 (GA)	3,13±0,28 <sup>bcd</sup>	2,26±0,23 <sup>e</sup>	1,34±0,22 <sup>de</sup>	0,81±0,06 <sup>d</sup>	0,56±0,05 <sup>cd</sup>
Grup 5 (EU+GA)	5,45±0,47 <sup>a</sup>	4,91±0,39 <sup>ab</sup>	4,55±0,37 <sup>ab</sup>	1,58±0,09 <sup>cd</sup>	0,75±0,05 <sup>bc</sup>
Grup 6 (AOM+EU)	2,52±0,23 <sup>cd</sup>	2,38±0,33 <sup>de</sup>	2,44±0,32 <sup>cd</sup>	0,90±0,10 <sup>d</sup>	0,51±0,04 <sup>e</sup>
Grup 7 (AOM+GA)	4,67±0,46 <sup>ab</sup>	4,76±0,48 <sup>abc</sup>	5,68±0,54 <sup>a</sup>	2,72±0,28 <sup>ab</sup>	1,93±0,14 <sup>a</sup>
Grup 8 (AOM+EU+GA)	5,46±0,60 <sup>a</sup>	5,44±0,56 <sup>a</sup>	5,11±0,56 <sup>a</sup>	3,26±0,22 <sup>a</sup>	2,15±0,15 <sup>a</sup>
<i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

a, b, c, d, e: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0,05$ ).

Tablo 6 ve Şekil 31 incelendiğinde AOM grubunda Bax ekspresyonunun kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığı görülmektedir ( $p<0,01$ ). Tedavi grupları AOM grubu ile karşılaştırıldığında AOM+EU grubunda Bax ekspresyon düzeyinin arttığı ancak bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). AOM+GA ve AOM+EU+GA gruplarında ise ekspresyon

düzeylerinde önemli artışların bulunduğu, en büyük artışın ise AOM+EU+GA grubunda olduğu görülmektedir ( $p<0,01$ ).



**Şekil 31.** Tüm gruplarda kolon dokusu Bax ekspresyon düzeyleri.

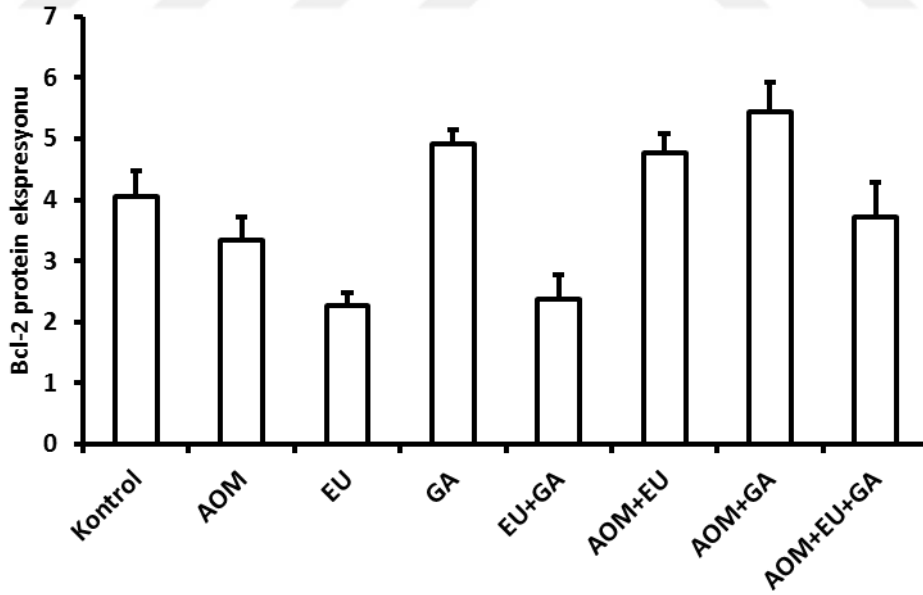
Tablo 6 ve Şekil 32 incelendiğinde AOM grubu ile kontrol grubu arasında Bcl-2 ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel bir farklılık olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ). Tedavi grupları AOM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel bir farklılık olmadığı ( $p>0,05$ ) ancak AOM+EU+GA grubunda ekspresyon düzeylerinin arttığı gözlenmiştir ( $p<0,01$ ).

Tablo 7 incelendiğinde Bcl-2/Bax oranlarının AOM grubunda kontrol grubuna göre önemli oranda yüksek olduğu (sırasıyla;  $0,90\pm0,12$ ,  $1,56\pm0,18$ ), tedavi gruplarında ise kontrol değerlerine yakın düzeylerde olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 7.** Tüm gruplarda kolon dokusu Bcl-2/Bax oranları.

Gruplar	Bcl-2/ Bax ( $\bar{X} \pm SE$ )
Grup 1 (Kontrol)	0,90 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>
Grup 2 (AOM)	1,56 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>
Grup 3 (EU)	0,83 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
Grup 4 (GA)	0,73 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
Grup 5 (EU+GA)	0,93 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
Grup 6 (AOM+EU)	0,91 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>
Grup 7 (AOM+GA)	0,94 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>
Grup 8 (AOM+EU+GA)	0,91 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
<i>p</i>	0,000

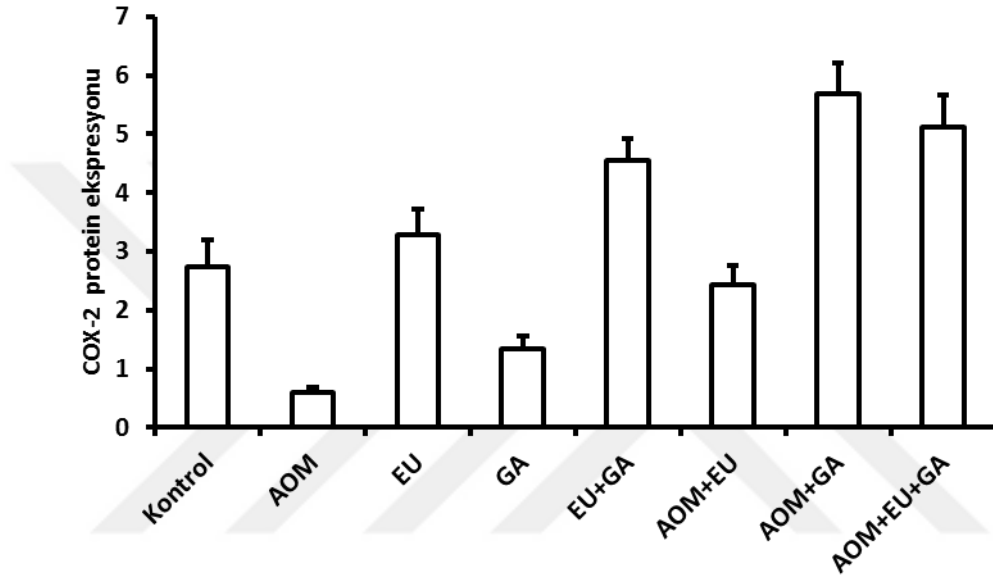
a, b: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 32.** Tüm gruplarda kolon dokusu Bcl-2 ekspresyon düzeyleri ( $\bar{X} \pm SE$ ).

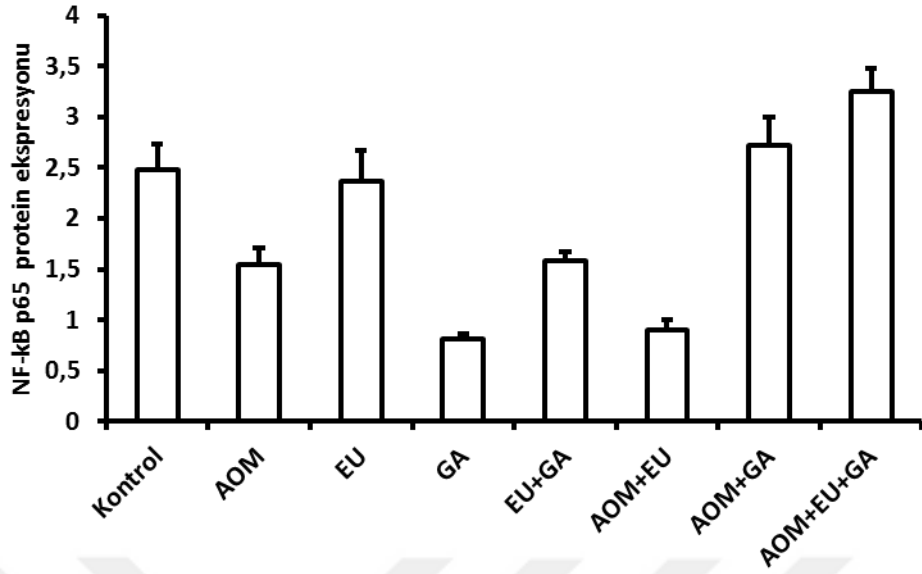


Tablo 6 ve Şekil 33 incelendiğinde AOM grubunda COX-2 ekspresyonunun kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,01$ ). Tedavi grupları AOM grubu ile karşılaştırıldığında bütün tedavi gruplarında (grup 6, 7, 8) ekspresyon düzeylerinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir ( $p<0,01$ ).



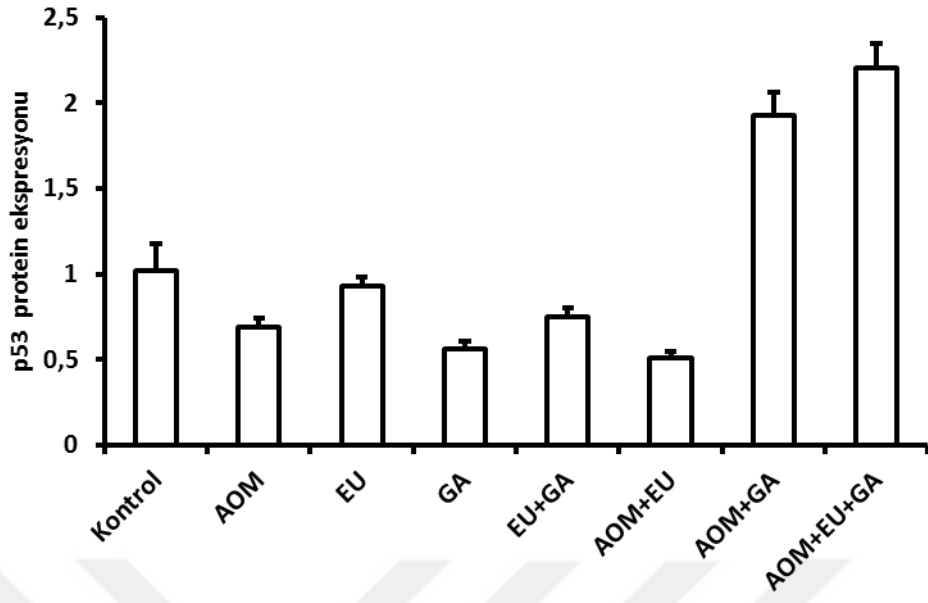
Şekil 33. Tüm gruplarda kolon dokusu COX-2 ekspresyon düzeyleri.

Tablo 6 ve Şekil 34 incelendiğinde AOM grubunda NF-kB ekspresyonunun kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,01$ ). Tedavi grupları AOM grubu ile karşılaştırıldığında AOM+EU grubunda istatistiksel bir fark bulunmadığı ( $p>0,05$ ), AOM+GA ve AOM+EU+GA gruplarında ise ekspresyon düzeylerinin arttığı gözlenmiştir ( $p<0,01$ ).



**Şekil 34.** Tüm gruplarda kolon dokusu NF-kB ekspresyon düzeyleri.

Tablo 6 ve Şekil 35 incelendiğinde AOM grubunda p53 ekspresyonunun azaldığı ancak bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). Tedavi grupları AOM grubu ile karşılaştırıldığında AOM+EU grubunda ekspresyon düzeyinde bir azalma olduğu ( $p<0,01$ ), AOM+GA ve AOM+EU+GA gruplarında ise önemli artışlar olduğu ( $p<0,01$ ), en büyük artışın ise AOM+EU+GA grubunda olduğu gözlenmiştir.



Şekil 35. Tüm gruplarda kolon dokusu p53 ekspresyon düzeyleri.

## 6. TARTIŞMA

Kolorektal tümörlerin kolondaki yerleşimi üzerine yapılan çalışmalarda kök hücre lokalizasyonu ve kolonosit göçünün proksimal ve distal kolonda farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Kolonun diğer kısımlarıyla kıyaslandığında distal kolon, en geniş kök hücre popülasyonuna sahiptir. Distal kolondaki kök hücrelerin malignleşmesi kanser gelişimine öncülük eder. Dolayısıyla kolonun distal kısmı tümörlerin en yaygın olarak görüldüğü bölge olarak bildirilmiştir (66-68). Sunulan bu çalışmada da yukarıdaki açıklamalar ile örtüşen şekilde kitle formasyonlarına yalnız distal kolonda rastlanmıştır. Kitle oluşumu bakımından AOM ve tedavi grupları arasında ise anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0.05$ )

Kolona spesifik bir karsinojen olan azoksimetan (AOM), duyarlı rodentlerde kolon kanser modelinde kullanılmaktadır (69). Rodentlerde sistemik AOM uygulamasının, adenokarsinomların erken pre-neoplastik lezyonları olan anormal kript odakları (ACF)'nin oluşumuna yol açtığı bilinmektedir (31, 70). Haftada bir kez olmak üzere derialtı yolla 15 mg/kg dozunda 2 hafta AOM uygulanan ratlarda 8. hafta itibariyle bütün ratlarda (%100 insidens) ACF oluştuğu bildirilmiştir (71). Khan ve ark. (46) tarafından 1,2-dimetilhidrazin ile kolorektal kanser oluşturulan ratlarda; GA ile tedavi edilen gruplarda ACF sayılarında azalma olduğu bildirilmiş, bu durum GA'in kolon kanserini erken dönemde baskılaması ve anti-inflamatuar özellikleri ile ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada hayvanlara 15mg/kg dozunda bir hafta arayla iki kez AOM deri altı yolla verilerek kolon kanser modeli oluşturulmuştur. ACF sayıları bakımından gruplar karşılaştırıldığında; istatistiksel bir farklılık olmamakla birlikte AOM grubuna göre AOM+EU grubunda %28.33, AOM+GA grubunda %20,

AOM+EU+GA grubunda ise %11.67 oranında bir azalma tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığında EU'ün ACF oluşumunu engellemek bakımından daha etkili olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, Kristiansen (51) tarafından önerilen ACF skorlaması modifiye edilerek yapılan skorlamada 4-6 kript içeren ACF'ler küçük, 7-9 kript içeren ACF'ler orta,  $\geq 10$  kript içeren ACF'ler büyük kriptler olarak sınıflandırılmıştır. Büyük ACF'ler displazi görüntüsü sergiler ve bu yüzden mikroadenom olarak adlandırılır (72). Gözlemlenen büyük ACF skorlaması sonuçlarına göre tek başına AOM grubu ile karşılaştırıldığında AOM+EU ve AOM+EU+GA gruplarında sırasıyla %66.7 ve %50 düzeyinde azalmalar gözlenmiştir. Selenyum ve yeşil çayın tedavi amacıyla kullanıldığı bir çalışmada, AOM grubu ile kıyaslandığında yeşil çay ve selenyumun birlikte kullanıldığı grupta büyük ACF sayılarında %70 düzeyinde bir azalma bildirilmiştir (73). Tedavi amacıyla apigenin ve naringenin kullanılan bir başka çalışmada ise, yüksek skorlu ACF'lerin kanser grubu ile kıyaslandığında %51 ve %57 oranlarında azaldığı gösterilmiştir (74). Ayrıca EU'ün kolon kanser hücrelerinde apoptozu uyarak kanser hücrelerinin gelişimlerini durdurduğu ileri sürülmüştür (75). Bu bulguların ışığında AOM grubu ile karşılaştırıldığında AOM+EU grubunda büyük ACF sayılarının çok daha olumlu sonuçlar gösterdiği görülmekte olup yukarıdaki araştırmaların sonuçlarıyla uyum göstermektedir.

Kolorektal kanser modelinin 1,2-dimetilhidrazinle oluşturulduğu bir çalışmada, 4.5 ay sonra sakrifiye edilen hayvanlardan elde edilen dokular histopatolojik yönden değerlendirildiğinde hafif displazi ve karsinom insidensinin %100, şiddetli displazi insidensinin ise %85 düzeyinde olduğu; şiddetli displazi ve karsinom görülme sıklığının zamana bağlı olarak artış gösterdiği bildirilmiştir

(76). Kolorektal kanserlerde histolojik değişikliklerin zamana bağlı olarak değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (77). Tarafımızdan yapılan bu çalışmada; son AOM uygulamasından 12 hafta sonra AOM grubu ve tedavi grupları kolon dokusunda ağırlıklı olarak hafif displazi şekillendiği ve tedavi gruplarında bu lezyonların sayısının AOM grubuna kıyasla azaldığı gözlenmiştir. AOM+EU ve AOM+GA gruplarında kötü huylu tümöral lezyonlara rastlanmasına rağmen, AOM+EU+GA grubunda kötü huylu tümöral lezyon belirlenememiştir. Bu bulgular değerlendirildiğinde; EU+GA kombine tedavi uygulamalarının kötü huylu tümöral lezyonların gelişimini engellemede daha etkili olabileceği kanaatine varılmıştır.

İndometazin ile ülser oluşturulan ratlarda 100 mg/kg dozda oral yolla uygulanan EU'ün mide mukozasında MDA düzeylerini önemli şekilde azalttığı bildirilmiştir (78). Venkadeswaran ve ark. (79) tarafından yapılan bir çalışmada ise aterosklerotik diyetle beslenen ratlara gavaj yoluyla EU uygulanmış ve aterosklerotik ratlara göre EU uygulanan ratların karaciğer dokusu MDA düzeylerinde önemli azalmalar ortaya konmuştur. Mevcut çalışmada AOM grubu kolon dokusu MDA düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). Tedavi gruplarından AOM+EU ve AOM+EU+GA gruplarında da tek başına AOM grubu ile kıyaslandığında MDA düzeylerinde anlamlı azalmalar gözlenmiştir ( $p<0,01$ ). Aynı şekilde plazma MDA düzeylerinin de EU ile tedavi edilen gruplarda (grup 6 ve 8) daha düşük seviyelerde olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,01$ ). Bu çalışmada da, yukardaki çalışmalara paralel olarak doku MDA düzeylerinin kanser grubuyla karşılaştırıldığında EU gruplarında azaldığı, GA uygulamalarının ise MDA düzeyleri üzerine önemli etkilerinin olmadığını göstermiştir ve EU'ün bu

etkilerini antioksidan özelliklerinden dolayı lipid peroksidasyonun önemli göstergesi olan MDA düzeylerini düşürerek gösterebileceği kanaatine varılmıştır.

Prasad ve ark. (80)'nin yaptığı bir çalışmada EU'ün GSH düzeylerini yükselterek oksidatif stresi azalttığı ortaya konulmuştur. Bir başka çalışmada serebral iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlarda EU'ün GSH düzeylerini artırarak oksidatif hasarlanmayı azalttığı bildirilmiştir (81). Rasool ve ark. (82)'nin yaptığı bir çalışmada hepatotoksisite oluşturulan ratlarda silimarin ve GA'in GSH düzeylerini önemli şekilde artırdığı gözlenmiştir. Haleagrahara ve ark. (83)'nin yaptığı bir çalışmada myokardiyal iskemi oluşturulan ratlarda GA'in GSH düzeylerini önemli ölçüde artırdığı gözlenmiştir. Rahman ve Sultana (84)'nin yaptığı bir çalışmada hepatotoksisite oluşturulan ratlara GA asit uygulanmış ve GSH düzeylerinde önemli bir artış gözlenmiştir. GSH, yabancı bileşiklerin detoksifiye edilmesi ve hücrelerin oksidatif hasarlara karşı korunmasında önemli role sahip majör bir antioksidandır (85, 86). Kontrol grubuyla kıyaslandığında AOM grubu GSH düzeylerinde önemli bir düşüş gözlenmiştir ( $p < 0.01$ ). Tedavi gruplarından AOM+EU ve AOM+GA grupları AOM grubu ile kıyaslandığında GSH düzeylerinde bir yükseliş olduğu ancak bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ( $p > 0,05$ ). Hücreler glutatyon taşınımı, tiyol gruplarını ve alfatokoferol gibi diğer membran bileşiklerini koruyarak hücre membranının oksidan hasara karşı korunmasını sağlar. GSH, serbest radikallerle doğrudan reaksiyonu ve glutatyon peroksidazlar ile glutatyon-S-transferazlara substrat olmasıyla bir antioksidan olarak davranır (54). Antioksidan maddelerle tedavi edilen KKK'li ratlarda artmış GSH düzeylerinin serbest radikal birikimini azaltarak olumlu etki gösterdiği ortaya konmuştur (87). Sunulan bu çalışmada da antioksidan uygulamalarına bağlı olarak

doku GSH düzeylerinde artışların olduğu ve yukarıdaki araştırmacıların sonuçlarıyla paralellik gösterdiği görülmektedir.

Süperoksit dismutaz (SOD), aerobik şartlarda yaşamın sürdürülmesi için gerekli bir enzim olup reaktif oksijen radikallerine karşı ilk savunma hattını oluşturur ve iki molekül süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene dönüşmesini katalizler (54). Bu enzim tam anlamıyla detoksifiye edici bir enzim olmadığından ürünü olan  $H_2O_2$  hücreler için zehirli bir bileşiktir. Ama süperoksit radikalinin etkisizleştirilmesini sağlayan enzimatik yolun ilk basamağıdır. İkinci basamak ise CAT'a dayanır ve bu enzim de  $H_2O_2$ 'in suya ( $H_2O$ ) dönüşümünü katalize eder (88). KRK oluşturulan ratlarda uygulanan antioksidan maddelerin SOD aktivitesini artırarak tümör insidensini ve ACF sayısını azalttığı ortaya konmuştur (89). AOM ile kolorektal kanser oluşturulan ratlarda *Andrographis paniculata* bitkisinin muhtemel antioksidan etkisiyle SOD aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (90). Kontrol grubu ile kıyaslandığında AOM grubu SOD aktivitesinde önemli bir düşüş olduğu gözlenmiştir ( $p<0,01$ ). Genel olarak tedavi gruplarında SOD aktivitelerinin kontrol değerlerine yakın düzeylere yükseldiği ve kullanılan antioksidanların olumlu etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Haleagrahara ve ark. (83)'nin yaptığı bir çalışmada myokardiyal iskemi oluşturulan ratlara GA asit uygulanmış ve GA'in SOD aktivitesini önemli ölçüde artırdığı gözlenmiştir. Akman ve ark. (91) lokal serebral iskemi oluşturulan ratlara GA uygulamış ve GA'in SOD aktivitesini artırdığını gözlemlemişlerdir. Khorsandi ve ark. (92)'nin yaptığı bir çalışmada ise GA'in karaciğer SOD aktivitesini artırarak oksidatif stresi önlediği gözlenmiştir. EU ve GA gibi antioksidan madde uygulamalarına bağlı olarak kolon dokusu SOD aktivitelerinde



artışların olduğu ve bu etkileri antioksidan özellikleri ile gösterebildikleri düşünülmektedir.

Katalaz (CAT), temel olarak peroksizomlarda yerleşen ve yapısında 4 hem grubu bulunduran bir hemoproteindir. Oksidazların aktivitesi ile oluşan  $H_2O_2$ 'yi doğrudan suya çevirir. Böylece toksik hidroksil radikallerinin sentezlenmesi ve  $H_2O_2$ 'nin vücutta birikmesi engellenmiş olur (93). KRK oluşturulan ratlarda uygulanan antioksidan maddelerin CAT aktivitesini artırarak tümör insidensini ve ACF sayısını azalttığı ortaya konmuştur (89). *Strobilanthes crispus* isimli bir bitkinin ekstraktı ile tedavi edilen KRK'li ratlarda kolon CAT aktivitesinin arttığı ve ACF sayılarının azaldığı bildirilmiştir (94). Sunulan çalışmada kontrol grubu ile kıyaslandığında AOM grubu CAT aktivitesinde bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0,05$ ), tek başına EU uygulamalarının CAT aktivitesinde önemli artışlara neden olduğu tespit edilmiştir. Tao ve ark. (81)'nin yaptığı bir çalışmada EU'ün CAT aktivitesini artırarak oksidatif hasarlanmayı azalttığı bildirilmiştir. Rasool ve ark. (82)'nin yaptığı bir çalışmada ise hepatotoksisite oluşturulan ratlarda silimarin ve GA'in CAT aktivitesini artırarak oksidatif hasarlanmayı azalttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde sunulan bu çalışmada EU ve GA'in antioksidan etkileriyle doku CAT aktivitelerinde artışlara neden olduğu ve yukardaki araştırmacıların sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmektedir.

Bcl-2 protein ailesi apoptotik hücre ölümünde temel düzenleyici role sahiptir. Bu aile birbiriyle etkileşen birçok pro- ve anti-apoptotik üyeye sahiptir. Bu proteinler hücrenin nihai kaderini belirlemek için bir dizi canlılık ve stres sinyallerini birleştirirler. Bu ailenin üyeleri arasında Bax ve Bcl-2'nin anahtar role sahip olduğu düşünülmektedir (95). Pro-apoptotik protein olan Bax'ın

ekspresyonu ile hücre ölümünün uyarıldığı gösterilmiştir (96). Deneysel olarak kolorektal kanser oluşturulan bir çalışmada tedavi grubundaki ratlarda kanser grubuna kıyasla kolon dokusu Bax ekspresyonlarının önemli düzeyde arttığı ortaya konmuştur (97). EU'ün kanserli hücrelerde Bax proteininin ekspresyonunu artırarak apoptozu uyardığı gösterilmiştir (98). İnsan mide kanseri hücreleri ve fare lökemi hücreleriyle yapılan iki ayrı çalışmada ise GA'in kanserli hücrelerde apoptozu uyardığı gösterilmiştir (48, 99). Mevcut bu çalışmada tedavi grupları AOM grubu ile karşılaştırıldığında AOM+GA ve AOM+EU+GA grupları Bax ekspresyon düzeylerinde önemli artışlar belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). AOM+EU grubunda da ekspresyon düzeylerinde bir artış olmasına karşın istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir. Bu bulguların ışığında kombine tedavi grubu (AOM+EU+GA) başta olmak üzere tüm tedavi gruplarında kullanılan koruyucu maddelerin kanserli hücrelerde Bax ekspresyonlarını artarak apoptozu uyardıkları ve sonuçta kanser prognozu üzerine olumlu etkiler gösterebileceği düşünülmektedir.

Bcl-2 genindeki değişimin bir takım kanserin gelişimine neden olduğu gösterilmiş ve anti-apoptik etkiye sahip olan Bcl-2 onkojen olarak sınıflandırılmıştır. Son yıllardaki çalışmalar Bcl-2'deki bozulmanın hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca Bcl-2'nin kemoterapötik ajanlara karşı gelişen dirençle ilişkili olduğu ve kanser tedavisinde Bcl-2 geninin hedeflenmesi vurgulanmaktadır (100). EU ile tedavi edilen prostat kanser hücrelerinde Bcl-2 ekspresyon düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir (101). Deri tümörü oluşturulan bir hayvan modelinde hastalık gruplarıyla kıyaslandığında EU ile tedavi edilen grupta Bcl-2 ekspresyon düzeylerinde bir düşüş olduğu gösterilmiştir (40). İnsan serviks ve uterus kanser hücre hattı üzerinde yapılan bir

çalışmada ise 18 $\beta$ -glisirretinik asidin tümör hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (102). İnsanlarda kolorektal neoplazilerde ve hayvan modellerinde Bcl-2 ekspresyonlarının değiştiğine dair birçok araştırma bildirilmiştir. Ancak bu çalışmaların sonuçları tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar tümörlerde Bcl-2 ekspresyonlarının arttığını, bazıları ise azaldığını bildirmişlerdir. Bu tutarsızlığın nedeni belirsizdir ancak, olası bir açıklama olarak adenokarsinom sekansının erken döneminde Bcl-2 ekspresyonunun artabileceği, progresyon döneminde ise azalabileceği belirtilmektedir (18). Bir başka çalışmada ise AOM uygulanan ratlarda Bcl-2/Bax ekspresyon oranının 1'den büyük ( $>1$ ), tedavi gruplarında ise bu oranın 1'den küçük ( $<1$ ) olduğu bildirilmiştir (19). Mevcut bu çalışmada kontrol grubu ile AOM grubu arasında Bcl-2 ekspresyon düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir. Tedavi grupları AOM grubu ile karşılaştırıldığında ise AOM grubu ile AOM+EU ve AOM+GA grupları arasında istatistiksel farklılığın olmadığı ancak AOM+EU+GA grubunda anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Apoptotik etkinliğin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olan Bcl-2/Bax oranı açısından AOM grubunun ve tedavi gruplarının yukardaki araştırmacıların görüşleriyle paralellik gösterdiği ve EU ile GA'nin kanserli dokularda apoptozu uyarak olumlu etkiler gösterdiği düşünülmektedir.

Siklooksijenazlar (COX-1 ve COX-2), prostanoidler olarak bilinen prostaglandinler (PG) ve tromboksanların biyosentezinde görev alan hız sınırlayıcı bir enzim kompleksidir (103). COX-1 trombosit ve mide mukozasında bulunurken, COX-2 özellikle yangı, neoplaziler ve çeşitli patolojik olaylarda rol alırlar (104). Birçok çalışmada kolorektal kanserlerde, kolon dokusu COX-2 proteini ve mRNA ekspresyonunda artış olduğu bildirilmiştir (105-108). COX-2

ile indüklenen tümör dokusunda proapoptotik protein olan Bax ekspresyonu azalırken anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonunun arttığı ve bu durumun memeli hücrelerinde kanserleşmeye katkıda bulunduğu bildirilmiştir (106). Kolondaki kronik yangısal sürecin kolorektal kanser gelişimi ile ilişkili olduğu, iNOS ve COX-2 gibi yangısal belirteçlere yönelik geliştirilen tedavi stratejilerinin kolon kanseri riskini azalttığı da belirlenmiştir (109). Antienflematuar etkinliğe sahip olan antioksidan maddelerin COX-2 ekspresyonunu azaltarak kolorektal kanserlerin tedavisinde olumlu etkiler sağladığı gösterilmiştir (110). Birçok çalışmada EU'ün COX-2 ekspresyonunu azaltarak kolon kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünün insidensini azalttığı bildirilmiştir (111-113). Aynı şekilde, GA ile tedavi edilen kanserlerde ve kolorektal kanserlerde COX-2 ekspresyon düzeylerinde bir düşüşün meydana geldiği gösterilmiştir (46,114). Yapılan bu çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AOM ile kanser oluşturulan grupta COX-2 ekspresyon düzeylerinin azaldığı, tedavi gruplarında ise arttığı, ancak bu değişikliklerin yukardaki araştırmacıların sonuçlarıyla benzer olmadığı görülmektedir. Nükleer faktör-kappa B (NF-kB) birçok dokuda bulunan ve bir dizi fizyolojik olayda yer alan transkripsiyon faktörüdür. Memelilerde 5 tane NF-kB aile üyesi [NF-kB1 (p50), NF-kB2 (p52), RelA (p65), RelB, cRel] tanımlanmıştır. Bunların tamamı yüksek oranda korunmuş Rel homolojisine sahiptir ve bu özellik DNA ve I $\kappa$ B'ye (NF-kB inhibitörü) bağlanmalarını sağlar. NF-kB genellikle yukarıda belirtilen alt birimlerin homodimeri ya da heterodimeri şeklinde bulunur. Bunların içerisinde p50-p65 dimerleri en fazla bulunanlar olup, çoğunlukla NF-kB'yi temsil ederler (115). Normal hücrede I $\kappa$ B- $\alpha$  (inhibitör kappaB-alpha) ile bir kompleks halinde sitoplazmada bulunan NF-kB bir dizi hücre içi ve hücre dışı uyarının etkisiyle heterodimer yapısından ayrılıp hücre

çekirdeğine bağlanarak bir dizi genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedir. NF-kB'nin aktivasyonu kanser hücrelerinde güçlü bir çoğalma ve antiapoptotik etkinlikle sonuçlanmaktadır. Bu faktörün etkisiyle COX-2 gibi yangısal yanıt faktörlerinin gen ekspresyonu indüklenirken p53 ekspresyonu baskılanmaktadır (16). Kolorektal kanser de dahil olmak üzere birçok kanser türünde NF-kB ekspresyon düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (115, 116). Birçok moleküler çalışmada ve kanser modelinde EU'nun NF-kB'yi inhibe ettiği ortaya konmuştur (16, 37, 39). Aynı şekilde, GA ile tedavi edilen kolorektal kanserli ratların kolon dokusunda NF-kB ekspresyon düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. (46). Mevcut bu çalışmada NF-kB ekspresyon düzeylerinin AOM grubunda kontrol grubuna göre hafif olarak azaldığı; tedavi gruplarında ise heterojen bir dağılım gösterdiği görülmektedir.

p53 proteini TP53 geni tarafından kodlanan, DNA hasarının tamiri, hücre siklusunun düzenlenmesi, apoptoz, hücre yaşlanma gibi biyolojik olaylarda görev alan bir tümör süpresör proteindir (46, 117). Tümör gelişimi ve devamlılığı için p53 yolağının inhibe edilmesinin gerekli olduğuna dair güçlü kanıtlar ortaya konmuştur (118). Adenomların karsinomlara dönüşmesindeki en önemli olaylardan birisi TP53 inaktivasyonudur. p53, genom stabilitesinin korunması bakımından kritik öneme sahiptir. DNA hasarlandığı zaman, p53 aktive olarak hücrelerin hasarlı DNA'yı tamir edebilmesi için hücresel siklusu geçici olarak durdurur. Eğer hasarlanma tamir edilemeyecek ölçüde büyük ise p53 aktivasyonu hücreleri apoptoza sürükler (117). Tümörleşen hücrelerde de p53'ün aktive olarak seçici şekilde apoptozu indüklediği bildirilmiştir (119). AOM ile indüklenen KKK modellerinde p53 ekspresyonunun azaldığı (46) ve bu çalışmada da aynı şekilde AOM grubu p53 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Diğer

yandan EU ile tedavi edilen kolon kanseri hücrelerinde p53 ekspresyon düzeylerinin önemli şekilde arttığı bildirilmiştir (75). Farelerde deri kanseri üzerine yapılan bir başka çalışmada ise EU'ün p53 düzeylerini artırdığı ortaya konmuştur (40). Kolorektal kanser oluşturulan ratlarda GA uygulamalarının kolon dokusunda p53 düzeyini artırdığı ortaya konmuştur (46). Önceki çalışmalara benzer şekilde, sunulan çalışmada tek başına AOM grubuna kıyasla AOM+GA ve AOM+EU+GA gruplarında p53 ekspresyon düzeylerinin önemli artışlar gösterdiği ve GA'in p53 ekspresyon düzeylerini artırarak malignleşmeyi öneleyebilmede daha etkili olduğu kanaatine varılmıştır.

Mevcut çalışmadaki bu KRK modelinde AOM uygulamalarının MDA düzeylerini artırıp, GSH düzeyleri ile SOD aktivitelerini azaltarak oksidatif strese yol açtığı, Bcl-2/Bax oranlarını artırarak antiapoptotik etki ile kanser oluşumunu artırabileceği, NF-kB ve COX-2 ekspresyonlarını azaltarak yangıyı azaltabileceği, histopatolojik olarak ise preneoplastik lezyonlar olarak tanımlanan ACF ile kötü huylu tümöral lezyon sayılarını artırdığı, tümör süpresör protein olarak bilinen p53 ekspresyonlarını baskıladığı ve bunun da kanser gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülebilir.

Tedavi gruplarından EU ve EU+GA gruplarında bu maddelerin antioksidan etkinlik göstererek oksidatif stres parametrelerini iyileştirdiği, ACF sayısını azalttığı, Bcl-2/Bax oranlarını azaltarak kanserli hücrelerde apoptozu indükleyebildiği, tümör süpresör protein olan p53 ekspresyonlarını artırarak hücrelerin malignleşmesini önleyebildiği ve böylece antikanser etkinlik gösterebildiği görülmüştür.

Sonuç olarak, elde edilen bu verilerden hem EU'ün hem de GA'in kanserin erken dönemlerinde önlenmesi bakımından olumlu etkiler

sergileyebileceği gösterilmiş olup, bu mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesi için ilgili proteinlerle ilişkili genlerin ekspresyon düzeyelerinin belirlenmesine ve daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



## 7. KAYNAKLAR

1. Chu E, Sartorelli AC. Cancer Chemotherapy. In: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. (Editors). Basic&Clinical Pharmacology (12<sup>th</sup> Edition), The McGraw-Hill Companies, The United States of America, 2012.
2. Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Drugs used for the treatment of infections and cancer. In: Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. (Editors) Rang&Dale's Pharmacology (8<sup>th</sup> Edition), Elsevier Churchill Livingstone, China, 2016.
3. Anonymus. "The History of Cancer" <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer.html>/ 17.03.2017
4. Braun AC. The Story of Cancer. Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts, 1977.
5. Anonim. "Dünya Kanser Raporu 2008" <http://kanser.gov.tr/bilgidokumanlar/kitaplar/114-dunya-kanser-raporu-2008.html>/ 13.03.2017.
6. Anonim. "Türkiye Kanser İstatistikleri 2017" <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-kayitciligi/2107-2014-yili-turkiye-kanser-istatistikleri.html> 13.03.2017.
7. Anonim. "Türkiye İstatistik Kurumu, Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2015" <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21526> 13.03.2017.
8. Anonim. "Türkiye'de Kanser Kayıtçılığı" <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-kayitciligi/108-turkiyede-kanserkayitcigi.html>/ 13.03.2017.
9. Leonard BS. Colorectal Cancer. Humana Press, New Jersey, 2007.
10. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. Genes&Development 2007; 21: 2525-2538
11. Yang L, Pei Z. Bacteria, inflammation and colon cancer. World Journal of Gastroenterology 2006; 12(42): 6741-6746.
12. Kraus S, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. Current Opinion in Pharmacology 2009; 9: 405-410.
13. Martinez ME. Primary prevention of colorectal cancer: Lifestyle, nutrition, exercis. Recent Results in Cancer Research 2005; 166: 177-211.



14. Durko L, Malecka-Panas E. Lifestyle modifications and colorectal cancer. *Current Colorectal Cancer Reports* 2014; 10: 45-54.
15. Umeselma S, Nagendraprabhu P, Sudhandiran G. Antiproliferative and apoptotic-inducing potential of ellagic acid against 1,2-dimethyl hydrazine-induced colon tumorigenesis in Wistar rats. *Mol Cell Biochem* 2014; 388: 157-172.
16. Manikandan P, Vinothini G, Priyadarsini RV, Prathiba D, Nagini S. Eugenol inhibits cell proliferation via NF- $\kappa$ B suppression in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. *Investigational New Drugs* 2011; 29: 110-117.
17. Velmurugan B, Singh RP, Agarwal R, Agarwal C. Dietary-feeding of grape seed extract prevents azoxymethane induced colonic aberrant crypt foci formation in fischer 344 rats. *Molecular Carcinogenesis* 2010; 49: 641-652.
18. Hirose Y, Yoshimi N, Suzui M, Kawabata K, Tanaka T, Mori H. Expression of bcl-2, bax, and bcl-xl proteins in azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas. *Molecular Carcinogenesis* 1997; 19: 25-30.
19. Bousserouel S, Lamy V, Gossé F, Lobstein A, Marescaux J, Raul F. Early modulation of gene expression used as biomarker for chemoprevention in a practical model of colon carcinogenesis. *Pathology International* 2011; 61: 80-87.
20. Kim SS, Oh OJ, Min HY, et al. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Life Sciences* 2003; 73: 337-348.
21. Reddy BS, Rao CV. Novel approaches for colon cancer prevention by cyclooxygenase-2 inhibitors. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 2002; 21(2): 155-164.
22. Waly MI, Al-Rawahi AS, Riyami, M.A, et al. Amelioration of azoxymethane induced-carcinogenesis by reducing oxidative stress in rat colonby natural extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014; 14 (60): 1-10.
23. Kayaalp O, Türker A. Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar. In: Kayaalp O. (Editör). *Akılclı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* (13. Baskı), Pelikan Yayıncılık, Ankara, 2012; 332-362.

24. Roy HK, Kunte DP, Koetsier JL, et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by polyethylene glycol: suppression of epithelial proliferation via modulation of SNAIL/B-catenin signaling. *Molecular Cancer Therapeutics* 2006; 5 (8): 2060-2069.
25. Shwter AN, Abdullah NA, Alshawsh MA, et al. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by *Gynura procumbens* in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2014; 151: 1194-1201.
26. Safe S, Kasiappan R. Natural products as mechanism-based anticancer agents: Sp transcription factors as target. *Phytotherapy Research* 2016; 30: 1723-1732.
27. Tache S, Ladam A, Corpet DE. Chemoprevention of aberrant crypt foci in the colon of rats by dietary onion. *European Journal of Cancer* 2007; 43: 454-458.
28. Perse M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1, 2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011; 2011: 1-14.
29. Hajrezaie M, Hassandarvish P, Moghadamtousi SZ, et al. Chemopreventive evaluation of a schiff base derived copper (II) complex against azoxymethane induced colorectal cancer in rats. *Plos One* 2014; 9 (3): 1-9.
30. Sadik NAH. Chemopreventive efficacy of green tea drinking against 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Cell Biochemistry and Function* 2013; 31: 196-207.
31. Rodriguez-Ramiro I, Ramos S, Lopez-Oliva E, et al. Cocoa-rich diet prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by restraining oxidative stress and cell proliferation and inducing apoptosis. *Molecular Nutrition & Food Research* 2011; 55: 1895-1899.
32. Kobaek-Larsen M, Thorup I, Diederichsen A, Fenger C., Hoitinga MR. Review of colorectal cancer and its metastases in rodent model: Comparative aspects with those human. *Comparative Medicine* 2000; 50(1): 16-26.
33. Lindzon GM, Medline A, Sohn KJ, Depeint F, Croxford R, Kim YI. Effect of folic acid supplementation on the progression of colorectal aberrant crypt foci. *Carcinogenesis* 2009; 30(9): 1536-1543.
34. Nam H, Kim MM. Eugenol with antioxidant activity inhibits MMP-9 related to metastasis in human fibrosarcoma cells. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 55: 106-112.

35. Pisano M, Pagnan G, Loi M, et al. Antiproliferative and pro-apoptotic activity of eugenol related biphenyls on malignant melanoma cells. *Molecular Cancer* 2007; 6 (8): 1-12.
36. Anonymus. "Eugenol" [www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/e51791?lang=en&region=TR&gclid=CK6437LS69ACFRASGwodGXsLNA/](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/e51791?lang=en&region=TR&gclid=CK6437LS69ACFRASGwodGXsLNA/) 27.02.2017.
37. Baliga MS. *Ocimum sanctum L* (Holy Basil or Tulsi) and its phytochemicals in the prevention and treatment of cancer. *Nutrition and Cancer* 2013; 65 (S1): 26-35.
38. Yoo CB, Han KT, Cho KS, et al. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters* 2005; 225(1): 41-52.
39. Manikandan P, Murugan RS, Priyadarsini RV, Vinothini G, Nagini S. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. *Life Sciences* 2010; 86: 936-941.
40. Pal D, Banerjee S, Mukherjee S, Roy A, Panda CK, Das S. Eugenol restricts DMBA croton oil induced skin carcinogenesis in mice: Downregulation of c-Myc and H-ras, and activation of p53 dependent apoptotic pathway. *Journal of Dermatological Science* 2010; 59: 31-39.
41. Shin SH, Park JH, Kim G.C, Park BS, Gil YG, Kim CH. The mechanism of apoptosis induced by eugenol in human osteosarcoma cells. *J Kor Oral Maxillofac Surg* 2007; 33(1): 20-27.
42. Li S, Zhu JH, Cao LP, et al. Growth inhibitory in vitro effects of glycyrrhizic acid in U251 glioblastoma cell line. *Neurological Science* 2014; 35: 1115-1120.
43. Orazizadeh M, Fakhredini F, Mansouri E, Khorsandi L. Effect of glycyrrhizic acid on titanium dioxide nanoparticles-induced hepatotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions* 2014; 220: 214-221.
44. Anonymus. "Glycyrrhizic acid ammonium salt from glycyrrhiza root (licorice)" [www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/50531?lang=en&region=TR&gclid=CK6B75Pf6dACFUoW0wodXI0Kfw/](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/50531?lang=en&region=TR&gclid=CK6B75Pf6dACFUoW0wodXI0Kfw/) 27.02.2017.
45. Gao Y, Hao J, Zhang H, et al. Protective effect of the combinations of glycyrrhizic, ferulic and cinnamic acid pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2015; 9: 435-445.

46. Khan R, Khan AQ, Lateef A, et al. Glycyrrhizic acid suppresses the development of precancerous lesions via regulating the hyperproliferation, inflammation, angiogenesis and apoptosis in the colon of wistar rats. *PloS One* 2013; 8 (2): 1-22.
47. Hawthorne S, Gallagher S. Effects of glycyrrhetic acid and liquorice extract on cell proliferation and prostate-specific antigen secretion in LNCaP prostate cancer cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2008; 60: 661-666.
48. Hibasami H, Iwase H, Yoshioka K, Takahashi H. Glycyrrhizin induces apoptosis in human stomach cancer KATO III and human promyelotic leukemia HL-60 cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2005; 16: 233-236.
49. Kim KJ, Choi JS, Kim KW, Jeong JW. The anti-angiogenic activities of glycyrrhizic acid in tumor progression. *Phytotherapy Research* 2013; 27: 841-846.
50. Bird RP, Good CK. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicology Letters* 2000; 37: 147-151.
51. Kristiansen E. The role of aberrant crypt foci induced by two heterocyclic amines 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in the development of colon cancer in mice. *Cancer Letters* 1996; 110: 187-192.
52. Bancroft JD, Stevens A. Theory and practise of histological techniques. Churchill Livingstone Company, London, 1990.
53. Sakin F. Farklı dozlarda 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*dioksin tarafından ratlarda beyin, karaciğer, böbrek ve kalp gibi dokularda oluşturulan oksidatif stres üzerine likopenin koruyuculuğu. Doktora tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2008.
54. Seyran A. Aroclor 1253'e maruz kalan gebe ratlar ile yavrularında oksidatif stresin ve bu strese karşı vitamin E'nin koruyucu etkisinin araştırılması. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2010.
55. Gülcü Bulmuş F. Kronik hiperhomosisteinemi oluşturulan ratlarda alfa-lipoik asidin plazma ve çeşitli dokularda oksidan antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006.
56. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979; 95: 351-358.

57. Ellman G. Tissue sulphhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics 1959; 82: 70-77.
58. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clinical Chemistry 1988; 34: 497-500.
59. Aebi H. Catalase in vitro assay methods. Methods Enzymol 1984; 105: 121-126.
60. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with pholin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 1951; 193: 265-275.
61. Fairbank VF, Farias RN. Biochemical Aspects of Hematology. Tietz NW. (Editor). Textbook of Clinical Chemistry. Saunders Company, Philadelphia, 1986.
62. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Expressing Cloned Genes for Protein Production, Purification and Analysis. In: Green MR, Sambrook J. (Editors) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4<sup>th</sup> Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2012: 1599-1625.
63. Bass JJ, et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. Scand J Med Sci Sports 2017; 27: 4-25.
64. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76(9): 4350-4354.
65. Aslan A. Ratlarda azoksimetan uygulanarak oluşturulan kolorektal kanserde likopenin siklooksijenaz-2 (cox-2), kaspaz-3, kaspaz-9, bax, bcl-2, p53 proteinlerinin ekspresyonu ve DNA hasarı üzerine etkisi. Doktora tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.
66. Thurnherr N, Deschner EE, Stonehill EH, et al. Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine. Cancer Research 1973; 33: 940-945.
67. Barthold SW, Jonas AM. Morphogenesis of early 1,2-dimethylhydrazine-induced lesions and latent period reduction of colon carcinogenesis in mice by a variant of *Citrobacter freundii*. Cancer Research 1977; 37: 4352-4360.
68. Ma QY, Williamson KE, Rowlands B. Ethylene diamine tetraacetic acid induced colonic crypt cell hyperproliferation in rats. World Journal of Gastroenterology 2004; 10(2): 218-222.

69. Lahouar L, Ghrairi F, El Arem A, et al. Attenuation of histopathological alterations of colon, liver and lung by dietary fibre of barley Rihane in azoxymethane-treated rats. *Food Chemistry* 2014; 149: 271-276.
70. Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Letters* 1995; 93: 55-71.
71. Xiao H, Hao X, Simi B, et al. Green tea polyphenols inhibit colorectal aberrant crypt foci (ACF) formation and prevent oncogenic changes in dysplastic ACF in azoxymethane-treated F344 rats. *Carcinogenesis* 2008; 29(1): 113-119.
72. Suzui M, Morioka T, Yoshimi N. Colon preneoplastic lesions in animal models. *Journal of Toxicologic Pathology* 2013; 26: 335-341.
73. Hu Y, McIntosh GH, Leu RKL, Nyskohus LS, Woodman RJ, Young GP. Combination of selenium and green tea improves the efficacy of chemoprevention in a rat colorectal cancer model by modulating genetic and epigenetic biomarkers. *PLoS ONE* 2013; 8(5): 1-12.
74. Leonardi T, Vanamala J, Taddeo SS, et al. Apigenin and naringenin suppress colon carcinogenesis through the aberrant crypt stage in azoxymethane-treated rats. *Experimental Biology and Medicine* 2010; 235: 710-717.
75. Jaganathan SK, Mazumdar A, Mondhe D, Mandal M. Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell line. *Cell Biology International* 2011; 35: 607-615.
76. Ertekin T. Farelerde deneysel olarak oluşturulan kolon kanseri üzerine angiostatinin etkileri. Doktora Tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2008.
77. Jucá MJ, Bandira BC, Carvalho DS, Leal AT. Comparative study of 1,2-dimethylhydrazine and azoximethane on the induction of colorectal cancer in rats. *Journal of Coloproctology* 2014; 34(3): 167-173.
78. Morsy M, Fouad AA. Mechanisms of gastroprotective effect of eugenol in indomethacin-induced ulcer in rats. *Phytotherapy Research* 2008; 22: 1361-1366.
79. Venkadeswaran K, Thomas PA, Geraldine P. An experimental evaluation of the anti-atherogenic potential of the plant, *Piper betle*, and its active constituent, eugenol, in rats fed an atherogenic diet. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016; 80: 276-288.

80. Prasad SN, Bharath MMS, Muralidhara. Neurorestorative effects of eugenol, a spice bioactive: Evidence in cell model and its efficacy as an intervention molecule to abrogate brain oxidative dysfunctions in the streptozotocin diabetic rat. *Neurochemistry International* 2016; 95: 24-36.
81. Tao L, Wang YL, Wu SC, et al. Neuroprotective effects of eugenol on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Chinese Pharmacological Bulletin* 2013; 29(8): 1146-1150.
82. Rasool M, Iqbal J, Malik A, et al. Hepatoprotective effects of *Silybum marianum* (Silimarin) and *Glycyrrhizia glabra* (Glycyrrhizin) in combination: A possible synergy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014; 2014: 1-9.
83. Haleagrahara N, Varkkey J, Chakravarthi S. Cardioprotective effects of glycyrrhizic acid against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *International Journal of molecular Sciences* 2011; 12: 7100-7113.
84. Rahman S, Sultana S. Chemopreventive activity of glycyrrhizin on lead acetate mediated hepatic oxidative stress and its hyperproliferative activity in Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160: 61-69.
85. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology & Medicine* 1999; 27 (9-10): 922-935.
86. Estrela JM, Ortega E, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2006; 43: 143-181.
87. Arigevasan K, Sudhandiran G. Carvacrol exhibits anti-oxidant and anti-inflammatory effects against 1,2-dimethyl hydrazine plus dextran sodium sulfate induced inflammation associated carcinogenicity in the colon of Fischer 344 rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; 461: 314-320.
88. Banudevi S, Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Vignesh C, Aruldas MM, Arunakaran, J. Role of alfa-tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCB exposed male albino rats. *Food and Chemical Toxicology* 2006; 44: 2040-2046.
89. Sivaranjani A, Sivagami G, Nalini N. Chemopreventive effect of carvacrol on 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 2016; 12(2): 755-762.
90. Al-Henhena NA, Ying RPY, Ismail S, et al. Chemopreventive efficacy of *Andrographis paniculata* on azoxymethane-induced aberrant colon crypt foci *in vivo*. *PLoS ONE* 2014; 9 (11): 1-12.

91. Akman T, Guven M, Aras AB, et al. The neuroprotective effect of glycyrrhizic acid on an experimental model of focal cerebral ischemia in rats. *Inflammation* 2015; 38(4): 1581-1588.
92. Khorsandi L, Orazizadeh M, Mansori E, Fakhredini F. Glycyrrhizic acid attenuated lipid peroxidation induced by titanium dioxide nanoparticles in rat liver. *Bratislava Medical Journal* 2015; 116(6): 383-388.
93. Birben E, Sahiner Um, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal* 2012; 5:9-19.
94. Al-Henhena NA, Khalifa SAM, Ying RPY, et al. Evaluation of chemoprotective potential of *Strobilanthes crispus* against colon cancer formation *in vitro* and *in vivo*. *BMC Complementary & Alternative Medicine* 2015; 15:419-429.
95. Alam S, Pal A, Kumar R, Mir SS, Ansari KM. Nexrutin inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rat colon and induced apoptotic cell death in colon adenocarcinoma cells. *Molecular Carcinogenesis* 2016; 55: 1262-1274.
96. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *The EMBO Journal* 1998; 17(14): 3878-3885.
97. Gamallat Y, Meyiah A, Kuugbe ED, et al. Lactobacillus rhamnosus induced epithelial cell apoptosis, ameliorates inflammation and prevents colon cancer development in an animal model. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016; 83: 536-541.
98. Júnior PLDS, Câmara DAD, Costa AS, et al. Apoptotic effect of eugenol involves G2/M phase abrogation accompanied by mitochondrial damage and clastogenic effect on cancer cell *in vitro*. *Phytomedicine* 2016; 23: 725-735.
99. Chueh FS, Hsiao YT, Chang SJ, et al. Glycyrrhizic acid induces apoptosis in WEHI-3 mouse leukemia cells through the caspase- and mitochondria-dependent pathways. *Oncology Reports* 2012; 28: 2069-2076.
100. Ebrahim AS, Sabbagh H, Liddane A, Raufi A, Kandouz M, Al-Katib A. Hematologic malignancies: newer strategies to counter the Bcl-2 protein", *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2016; 142: 2013-2022.
101. Ghosh R, Ganapathy M, Alworth WL, Chan DC, Kumar AP. Combination of 2-methoxyestradiol (2-ME<sub>2</sub>) and eugenol for apoptosis induction synergistically in androgen



- independent prostate cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2009; 113: 25-35.
- 102.Lee CS, Kim YJ, Lee MS, Han ES, Lee SJ. 18 $\beta$  -Glycyrrhetic acid induces apoptotic cell death in SiHa cells and exhibits a synergistic effect against antibiotic anti-cancer drug toxicity 2008; 83: 481-489.
- 103.Liu CH, Chang SH, Narko K, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(21): 18563-18569.
- 104.Pereg D, Lishner M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention and treatment of cancer. *Journal of Internal Medicine* 2005; 258:115-123.
- 105.Asting AG, Carén H, Andersson M, Lönröth C, Lagerstedt K, Lundholm K. COX-2 gen expression in colon cancer tissue related to regulating factors and promoter mathylation status. *BMC Cancer* 2011; 11(238): 1-10.
- 106.Rahman M, Selvarajan K, Hasan MR, et al. Inhibition of COX-2 in colon cancer modulates tumor growth and MDR-1 expression to enhance tumor regression in therapy-refractory cancers *in vivo*. *Neoplasia* 2012; 14(7): 624-633.
- 107.Roelofs HMJ, Morsche RHM, Heumen BWH, Nagengast FM, Peters WHM. Over-expression of COX-2 mRNA in Colorectal cancer. *BMC Gastroenterology* 2014; 14(1): 1-6.
- 108.Wu QB ve Sun GP. Expression of COX-2 and HER-2 in colorectal cancer and their correlation. *World Journal of Gastroenterology* 2015; 21(20): 6206-6214.
- 109.Paul S, DeCastro AJ, Lee HJ, et al. Dietary intake of pterostilbene, a constituent of blueberries, inhibits the b-catenin/p65 downstream signaling pathway and colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 2010; 31(7): 1272-1278.
- 110.Tan BL, Esa NM, Rahman HS, Hamzah H, Karim R. Brewers' rice induces apoptosis in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats via suppression of cell proliferation and the Wnt signaling pathway. *BMC Complementary&Alternative Medicine* 2014; 14(304): 1-11.
- 111.Yarla NS, Bishayee A, Sethi G, et al. Targeting arachidonic acid pathway by natural products for cancer prevention and therapy. *Seminars in Cancer Biology* 2016; 40-41: 48-81.

112. Kaur G, Athar M, Alam MS. Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by including apoptosis. *Molecular Carcinogenesis* 2010; 49: 290-301.
113. Hussain A, Priyani A, Sadrieh L, Brahmabhatt K, Ahmed M, Sharma C. Concurrent sulphoraphane and eugenol induces differential effects on human cervical cancer cells. *Integrative Cancer Therapies* 2012; 11(2): 154-165.
114. Shanmugam MK, Nguyen AH, Kumar AP, Tan BKH, Sethi G. Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. *Cancer Letters* 2012; 320: 158-170.
115. Sethi G, Tergaonkar V. Potential pharmacological control of the NF- $\kappa$ B pathway. *Cell Press* 2009; 30(6): 313-321.
116. Zhang XF, Sun R, Jia Y, et al. Synthesis and mechanisms of action of novel harmine derivatives as potential antitumor agents. *Scientific Reports* 2016; 6: 1-16.
117. Sarasqueta AF, Forte GI, Corver WED, et al. Integral analysis of p53 and its value as prognostic factor in sporadic colon cancer. *BMC Cancer* 2013; 13(277): 1-11.
118. Soares J, Raimundo L, Pereira NAL, et al. Reactivation of wild-type and mutant p53 by tryptophan-derived oxazoloisoindolinone SLMP53-1, a novel anticancer small-molecule. *Oncotarget* 2015; 7(4): 4326-4343.
119. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: The growing complexity of p53. *Cell* 2009; 137: 413-431.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Yozgat'ta dünyaya geldim. İlk, orta ve lise eğitimimi Konya'da tamamladım. 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde başladığım lisans eğitimimi 2011 yılında dönem ikincisi olarak tamamladım. 2011-2012 yılları arasında Ankara'da özel bir hayvan hastanesinde Veteriner Hekim olarak görev yaptım. 2012 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım ve halen aynı anabilim dalında çalışmaktayım. Bekarım.