



**HT-29 KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA BAZI
BİTKİ EKSTRELERİ VE BİTKİSEL ETKEN
MADDELERİN 5-FLUOROURACİL (5-FU) İLE
KOMBİNASYONUNUN APOPTOTİK YOLAKLARA VE
HÜCRE ÇOĞALMASINA ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Kadir ERDOĞAN

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Genetik Bilim Dalı

Doç. Dr. Hakan AŞKIN

2016

Her Hakkı Saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**HT-29 KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA BAZI BİTKİ
EKSTRELERİ VE BİTKİSEL ETKEN MADDELERİN
5-FLUOROURACİL (5-FU) İLE KOMBİNASYONUNUN
APOPTOTİK YOLAKLARA VE HÜCRE ÇOĞALMASINA
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Kadir ERDOĞAN

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Genetik Bilim Dalı**

**ERZURUM
2016**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**HT-29 KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA BAZI BİTKİ EKSTRELERİ VE
BİTKİSEL ETKEN MADDELERİN 5-FLUOROURACİL (5-FU) İLE
KOMBİNASYONUNUN APOPTOTİK YOLAKLARA VE HÜCRE
ÇOĞALMASINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Hakan AŞKIN danışmanlığında, Mehmet Kadir ERDOĞAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 11/11/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı - Genetik Bilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak oybirliği / oy çokluğu (5./5) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Hakan AŞKIN

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Suat ÇOLAK

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 01/12/2016 tarih ve 46/15 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: AÜBAP 2013/292

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

HT-29 KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA BAZI BİTKİ EKSTRELERİ VE BİTKİSEL ETKEN MADDELERİN 5-FLUOROURACİL (5-FU) İLE KOMBİNASYONUNUN APOPTOTİK YOLAKLARA VE HÜCRE ÇOĞALMASINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet Kadir ERDOĞAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hakan AŞKIN

Kolorektal kanser dünya genelinde kanserle ilişkili ölümlerin önemli bir nedenidir ve en sık görülen üçüncü kanser türüdür. Kolorektal kanserin klinik tedavisinde 5-Fluorouracil (5-FU) temelli uygulamalar ana basamağı oluşturmaktadır. Ancak 5-FU'nun antitümör etkisinin yanı sıra yüksek toksisite ve yan etkilere sahip olması, 5-FU temelli yeni tedavilerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır.

Bu çalışmada, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücre hattı üzerinde iki farklı bitkisel etken maddenin (kuersetin ve luteolin) ve iki bitki türünden (*Pistacia eurycarpa* ve *Achillea biebersteinii*) polaritesi farklı çözücüler kullanılarak hazırlanmış bitki ekstralarının 5-Fluorouracil ile kombinasyonlarının sinerjistik etkileri araştırıldı.

MTT testi ile hücelere ait % canlılık oranları belirlendi. Uygulanan tedavi gruplarına ait IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değerlerine göre bitkisel etken madde ve ekstralar tek başlarına ve 5-FU ile kombine olarak hücelere uygulandı. Bu kombinasyonların etkinlikleri izobologram analizi ile saptandı. Hücrelerin apoptoza yönelme oranları CDDE yöntemi ve apoptotik indekslerin hesaplanması ile belirlendi. VEGF miktarlarındaki azalma oranları Hu VEGF ELISA yöntemi ile hesaplandı. Uygulanan tedavilerin, apoptotik yollarda önemli rollere sahip olan p53, Bcl-2, Bax, mTOR, Akt, PTEN, p38 MAPK gen ve proteinleri üzerindeki etkileri RT-PCR ve Western blot yöntemi ile analiz edildi.

HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücrelerinin canlılığının azalması ve apoptoza yönelmesinde, 5-FU ile bitkisel etken madde ve ekstraların kombinasyon olarak uygulanması, 5-FU'nun tek başına uygulanmasına göre daha etkili oldu. Sonuç olarak, uygulanan kombine tedavilerde 5-FU'nun düşük dozlarda bile etkinliğinin arttığı ve böylece ilacın yüksek sitotoksik etkilerinin minimuma indirilebileceği saptandı.

2016, 141 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, 5-Fluorouracil, apoptozis, kuersetin, luteolin, *Achillea*, *Pistacia*

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF THE SOME PLANT EXTRACTS AND HERBAL ACTIVE SUBSTANCES COMBINATION WITH 5-FU ON APOPTOTIC PATHWAYS AND CELL PROLIFERATION IN HT-29 COLON CANCER CELL LINE

Mehmet Kadir ERDOĞAN

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Genetics Section

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hakan AŞKIN

Colorectal cancer is a leading cause of death world-wide associated with cancer and is the third most common type of cancer. In the clinical treatment of colorectal cancer, 5-Fluorouracil (5-FU) based applications are the main steps. However, because 5-FU has anti-tumor effect as well as high toxicity and adverse effects, the development of new therapies based on 5-FU becomes necessary.

In this study, synergistic effects of the combination with 5-Fluorouracil of two different herbal active substances (quercetin and luteolin) and two plant species (*Pistacia eurycarpa* and *Achillea biebersteinii*) of plant extracts whose polarity was prepared using different solvents over HT-29 colorectal adenocarcinoma cell line were investigated.

Percentage survival rates of cells were determined by MTT test. IC₅₀ values of the treatment groups were calculated. According to the IC₅₀ value, plant extracts and herbal active ingredients were applied to cells alone and then in combination with 5-FU. Efficacy of this combination was determined by isobologram analysis. Ratio orientation to apoptosis of cells was determined by CDDE method and calculating the apoptotic index. Proportional reduction in the amount of VEGF was calculated using Hu VEGF ELISA. The effects of the applied treatment on

p53, Bcl-2, Bax, mTOR, Akt, PTEN, p38 MAPK genes and proteins which have an important role in the apoptotic pathway were analyzed by RT-PCR and Western blot method.

In the reduction of the viability of HT-29 colorectal adenocarcinoma cells and in orientation toward apoptosis, application of the 5-FU in combination with herbal active ingredients and extracts was more effective than 5-FU therapy alone. As a result, in combined treatments, it was reached out that the efficiency of 5-FU increases even at low doses and that high cytotoxic effect of the drug can be minimized.

2016, 141 pages

Keywords: Colorectal cancer, 5-Fluorouracil, apoptosis, quercetin, luteolin, *Achillea*, *Pistacia*

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel aşamaları Bingöl Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda ve Fen Edebiyat Fakóltesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Doktora eğitimim süresince her türlü yardım ve desteği sağlayan, akademik bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hakan AŞKIN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince değerli fikirleri ile beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi üyeleri Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN ile Ziraat Fakóltesi Zootekni Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Can Ali AĐCA ile Sayın Prof. Dr. Victor Nedzvetskyi ve Yüksek lisans öğrencisi Aryan Mahmood Faraj'a, ayrıca bitkilerin toplanması ve teşhisindeki yardımlarından dolayı Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Lütfi BEHÇET ve Arř. Gör. Yakup YAPAR'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde yanımda olup maddi manevi desteklerini üzerimden eksik etmeyen canım aileme ve teşviklerinden ötürü sevgili eşime sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Mehmet Kadir ERDOĞAN

Ekim, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1. Kanser.....	4
2.2. Kolon ve Rektum.....	6
2.2.1. Kolon.....	6
2.2.2. Rektum	8
2.2.3. Kolon ve rektum histolojisi	8
2.2.4. Kolon ve rektumun kan damarları ve lenf nodları	10
2.3. Kolorektal Kanser.....	11
2.3.1. Kolorektal kanserin evreleri	12
2.3.2. Kolon ve rektumda oluşan kanserler	13
2.3.3. Kolorektal kanserdeki genetik ve epigenetik değişiklikler	13
2.3.3.a. Genetik değişiklikler.....	15
2.3.3.b. Epigenetik değişiklikler.....	19
2.3.4. Kolorektal kanserlerin genetik açıdan sınıflandırılması.....	20
2.3.4.a. Sporadik (rastlantısal) kolorektal kanser	21
2.3.4.b. Hereditör ve familyal kolorektal kanserler	21
2.3.4.c. Familyal adenomatöz polipozis (FAP).....	23
2.3.4.d. Hamartomatöz polipozis sendromları	23
2.3.5. Kolorektal kanserde risk faktörleri.....	25
2.3.5.a. Yaş	25
2.3.5.b. Adenomatöz polip hikayesi	25
2.3.5.c. İnflamatuar bağırsak hastalığı hikayesi	26

2.3.5.d. Ailesel kolorektal kanser veya adenomatöz polip hikayesi.....	26
2.3.5.e. Beslenme	26
2.3.5.f. Fiziksel aktivite ve obezite.....	27
2.3.5.g. Sigara ve alkol kullanımı.....	28
2.3.6. Kolorektal kanserde erken teşhis.....	28
2.4. Hücre Ölümü	29
2.4.1. Apoptozis.....	31
2.4.1.a. Ekstrinsik ölüm reseptörü yolağı.....	33
2.4.1.b. İntrinsik mitokondriyal yolak.....	33
2.4.2. Apoptotik yolların kontrolü.....	34
2.4.2.a. Kaspazlar	34
2.4.2.b. Bcl-2 ailesi.....	34
2.4.2.c. IAP'ler	35
2.4.3. Apoptozis ve karsinogenez.....	35
2.5. Sinyal Yolakları.....	36
2.6. 5-Fluorouracil (5-FU).....	39
2.7. Bitkisel Etken Maddeler.....	43
2.7.1. Kuersetin	43
2.7.2. Luteolin	45
2.8. Bitki Örnekleri.....	47
2.8.1. <i>Achillea biebersteinii</i> Afan.....	47
2.8.2. <i>Pistacia eurycarpa</i> Yalt.....	48
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	51
3.1. Materyal.....	51
3.1.1. Çalışmalarda kullanılan araç ve gereçler.....	51
3.1.2. Hücre hattı	56
3.2. Yöntem	57
3.2.1. 5-FU, bitkisel etken maddeler ve bitki ekstralarının hazırlanması.....	57
3.2.1.a. 5-FU'nun hazırlanması	57
3.2.1.b. Bitkisel etken maddelerin hazırlanması	57
3.2.1.c. Bitki ekstralarının hazırlanması.....	57
3.2.2. Hücre kültürü.....	59

3.2.2.a. Hücre sayımı.....	60
3.2.2.b. Canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin boyanması.....	60
3.2.3. İzoblogram analizi ile sinerjizmin belirlenmesi	61
3.2.4. Hücre canlılığının belirlenmesi	63
3.2.5. Apoptozun CDDE yöntemi ile belirlenmesi	65
3.2.5.a. CDDE kit içeriğinin hazırlanması	65
3.2.5.b. CDDE için örneklerin hazırlanması	66
3.2.5.c. CDDE protokolü.....	66
3.2.6. VEGF miktarının Human VEGF ELISA yöntemi ile belirlenmesi	68
3.2.6.a. Human VEGF ELISA kit içeriğinin hazırlanması.....	68
3.2.6.b. Human VEGF ELISA için örneklerin hazırlanması.....	68
3.2.6.c. Human VEGF ELISA protokolü	69
3.2.7. Hücre kültüründen total RNA izolasyonu	70
3.2.8. cDNA sentezi	71
3.2.9. qRT-PCR	72
3.2.9.a. Primerlerin dizaynı	73
3.2.10. Western blot yöntemi	74
3.2.10.a. Örneklerin hazırlanması	76
3.2.10.b. Örneklerdeki protein miktarlarının belirlenmesi.....	76
3.2.10.c. SDS-PAGE için jellerin hazırlanması ve yüklenmesi	77
3.2.10.d. Proteinlerin jelden membrana aktarılması.....	79
3.2.10.e. Antibody inkübasyonu.....	79
3.2.10.f. Stripping.....	81
3.2.11. İstatistiksel Analiz	81
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	82
4.1. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	82
4.2. IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi.....	84
4.3. Bitki Ekstreleri ve Bitkisel Etken Maddelerin 5-FU ile Etkileşimlerinin İzoblogram Analizi ile Belirlenmesi.....	85
4.4. Apoptoz Analizleri	88
4.4.1. Apoptozun kolorimetrik analizi (Cell death detection ELISA bulguları)	88
4.4.2. Canlı, apoptotik ve nekrotik hücre indeksleri	91

4.5. Human VEGF ELISA Bulguları	94
4.6. Gen Ekspresyonlarına Ait Bulgular	97
4.7. Protein Ekspresyonlarına Ait Bulgular.....	106
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	117
KAYNAKLAR	126
ÖZGEÇMİŞ	142



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

5-FU	: 5-Fluorouracil
β -aktin	: Beta aktin
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
μl	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
M	: Molar
ABH	: <i>Achillea biebersteinii</i> hekzan ekstresi
ABK	: <i>Achillea biebersteinii</i> kloroform ekstresi
ABM	: <i>Achillea biebersteinii</i> metanol ekstresi
ABTS	: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
AKT	: Protein kinaz B
ATF2	: Aktive edici transkripsiyon faktörü-2
Bcl-2	: B hücreli lenfoma-2
bç	: Baz çifti
BSA	: Bovin (sığır) serum albumin
CARD	: Kaspazları organize eden bölge
cDNA	: Komplementer DNA
cm^2	: Santimetrekaare
CO_2	: Karbondioksit
DED	: Ölüm efektör bölgesi
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleosid trifosfat
DTT	: Dithiothreitol
ECL	: Hassas kemilüminesans görüntüleme

EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGTA	: Etilenglisoltetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
FADD	: Fas ile ilişkili ölüm bölgesi
g	: Gram
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
IC ₅₀	: Letal doz 50
kDa	: Kilo dalton
L	: Litre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MNNG	: N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin
mRNA	: Messenger (haberci) ribonükleik asit
mTOR	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NaCl	: Sodyum klorür
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NaF	: Sodyum florür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NaN ₃	: Sodyum azit
NCBI	: National center for biotechnology information- biyoteknoloji bilgi ulusal merkezi
NP-40	: Nonidet P-40
OD	: Optik dansite
p38 MAPK	: P38 mitojenle aktifleşen protein kinaz
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	: Fosfat buffered salin
pg	: Pikogram
PHÖ	: Programlı hücre ölümü

PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PVDF	: Poliviniliden diflorid
PDK1	: Fosfoinositid bağımlı kinaz-1
PEH	: <i>Pistacia eurycarpa</i> hekzan ekstresi
PEK	: <i>Pistacia eurycarpa</i> kloroform ekstresi
PEM	: <i>Pistacia eurycarpa</i> metanol ekstresi
PI3K	: Fosfatidil inozitol-3 kinaz
PIP2	: Fosfatidil inozitol 4,5-bisfosfat
PIP3	: Fosfatidil inozitol 3,4,5-trifosfat
PMSF	: Fenil metil sülfonil florür
PTEN	: Fosfat ve tensin homologu
qRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TAE	: Tris-asetat-EDTA
tAIF	: Kesilmiş apoptoz indükleyici faktör
TBS	: Tris buffered salin
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametietilendiamin
T _m	: Ayrılma sıcaklığı
TNF	: Tümör nekroz faktör
TNFR-1	: Tümör nekroz faktör reseptörü-1
TRADD	: TNFR-1 ile ilişkili ölüm bölgesi
Tris	: Trihidroksimetil aminometan
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Organizasyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. (a) Kolon ve rektumun genel yapısı, (b) Kolon duvarı, (c) Kolon kriptleri	7
Şekil 2.2. Kolon kriptlerinin şematik görünümü	10
Şekil 2.3. Kolorektal kanserin evreleri	12
Şekil 2.4. Kolorektal kanser gelişiminin moleküler modeli	15
Şekil 2.5. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının düzenlenmesi	17
Şekil 2.6. MAPK sinyal yolağı ve RAS.....	18
Şekil 2.7. Kolorektal kanserlerin sınıflandırılması	21
Şekil 2.8. Hücre ölümü çeşitleri. PHÖ: programlı hücre ölümü. A) sağlıklı hücre, B) nekrotik hücre, C) apoptotik hücre ve D) otofajik hücre	30
Şekil 2.9. İntrinsik ve ekstrinsik apoptozis yolakları.....	32
Şekil 2.10. Apoptozisten kaçınma ve karsinogenezis mekanizması.....	36
Şekil 2.11. PTEN ile AKT/mTOR yolağı arasındaki ilişki.	38
Şekil 2.12. p38MAPK, Akt, PTEN ve p53'ün apoptozisteki rolleri.....	39
Şekil 2.13. 5-Fluorouracilin kimyasal yapısı	40
Şekil 2.14. 5-Fluorouracilin metabolizması.....	42
Şekil 2.15. p53'ün 5-fluorouracil aracılığıyla aktivasyonu	42
Şekil 2.16. Kuersetinin kimyasal yapısı.....	44
Şekil 2.17. Luteolinin kimyasal yapısı.....	46
Şekil 2.18. <i>Achillea biebersteinii</i> Afan.	48
Şekil 2.19. <i>Pistacia eurycarpa</i> Yalt.	50
Şekil 3.1. Bitki ekstraktlarının hazırlanması.....	58
Şekil 3.2. Hemositometre chamber üzerindeki kareler	60
Şekil 3.3. Doz-etki eğrisi ve sigmodite değerlerinin gösterimi	63
Şekil 3.4. MTT ve formazan ürününün kimyasal yapısı.....	63
Şekil 3.5. Mikroplaka düzeni	64
Şekil 3.6. Western blot yönteminin temel basamakları	75
Şekil 4.1. 5-FU, kuersetin ve luteolinin HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	82

Şekil 4.2. <i>P. eurycarpa</i> bitkisine ait hekzan, kloroform ve metanol ekstralarının HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	83
Şekil 4.3. <i>A. biebersteinii</i> bitkisine ait hekzan, kloroform ve metanol ekstralarının HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	84
Şekil 4.4. Bitkisel etken madde ve ekstraların IC ₅₀ dozlarının 5-FU ile kombinasyonlarına ait hücre canlılığı grafiği	85
Şekil 4.5. Örneklere ait doz-etki (a) ve medyan-etki (b) grafikleri	87
Şekil 4.6. Bitkisel etken madde ve ekstraların IC ₅₀ dozlarının 5-FU ile kombinasyonlarına ait kombinasyon indeksleri (CI)	87
Şekil 4.7. 5-FU, kuersetin, luteolin, 5-FU+K ve 5-FU+L tedavilerinin HT-29 kolorektal kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi.....	89
Şekil 4.8. <i>P.eurycarpa</i> ekstralarının ve kombinasyonların HT-29 kolorektal kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi	90
Şekil 4.9. <i>A.biebersteinii</i> ekstralarının ve kombinasyonların HT-29 kolorektal kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi.....	90
Şekil 4.10. (a) HT-29 kolorektal kanser hücreleri. (b) Apoptotik hücrelerin karakteristik özelliği olan membrandaki bleblenme (BL). (c) Canlı hücreler (C). (d) Apoptotik hücreler (A) ve geç apoptoz (GA) fazındaki hücre. (e) Nekrotik hücreler (N).....	91
Şekil 4.11. Kuersetin ve luteolinin ayrı ayrı ve 5-FU ile kombine tedavileri ile HT-29 kolorektal kanser hücrelerine ait canlı, apoptotik ve nekrotik hücre indeksleri	93
Şekil 4.12. <i>P. eurycarpa</i> hekzan, kloroform ve metanol ekstraları ile bu ekstraların 5-FU ile kombinasyonlarına ait canlı, apoptotik ve nekrotik hücre indeksleri	93
Şekil 4.13. <i>A. biebersteinii</i> hekzan, kloroform ve metanol ekstraları ile bu ekstraların 5-FU ile kombinasyonlarına ait canlı, apoptotik ve nekrotik hücre indeksleri	94
Şekil 4.14. Hu VEGF standart grafiği.....	95
Şekil 4.15. HT-29 kolorektal kanser hücrelerine uygulanan maddelere göre VEGF miktarlarında görülen değişiklikler	96
Şekil 4.16. p53 genine ait mRNA ekspresyon oranları.....	99

Şekil 4.17. Bcl-2 genine ait mRNA ekspresyon oranları.....	100
Şekil 4.18. Bax genine ait mRNA ekspresyon oranları	101
Şekil 4.19. mTOR genine ait mRNA ekspresyon oranları.....	103
Şekil 4.20. Akt genine ait mRNA ekspresyon oranları.....	104
Şekil 4.21. PTEN genine ait mRNA ekspresyon oranları.....	105
Şekil 4.22. p38 MAPK genine ait mRNA ekspresyon oranları	106
Şekil 4.23. Bradford standart grafiği.....	107
Şekil 4.24. β -aktin membran görüntüsü.....	107
Şekil 4.25. p53 proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri	109
Şekil 4.26. Bcl-2 proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri	110
Şekil 4.27. Bax proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri.....	111
Şekil 4.28. mTOR proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri	113
Şekil 4.29. Akt proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri	114
Şekil 4.30. PTEN proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri	115
Şekil 4.31. p38 MAPK proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri...	116

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kanserle ilişkili bazı genler	5
Çizelge 2.2. Kolorektal kanserde görülen mutasyonlar	14
Çizelge 2.3. Kalıtsal kolorektal kanser sendromlarında görülen genetik bozukluklar ...	22
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan alet ve cihazlar	51
Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	52
Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan kitler	53
Çizelge 3.4. Çalışmalarda kullanılan tampon ve çözeltiler.....	54
Çizelge 3.5. HT-29 kolorektal kanser hücre hattının genel özellikleri	57
Çizelge 3.6. CI değerlerine karşılık gelen etkilerin tanımı	61
Çizelge 3.7. 2X RT master mix bileşenleri ve miktarları	72
Çizelge 3.8. Termal cycler cihazı programı	72
Çizelge 3.9. RT-PCR reaksiyon karışımı.....	73
Çizelge 3.10. RT-PCR reaksiyon koşulları.....	73
Çizelge 3.11. Çalışmalarda kullanılan genlere ait primer bilgileri	74
Çizelge 3.12. SDS jel elektroforezi için kullanılacak ayırma jelinin hazırlanması	77
Çizelge 3.13. SDS jel elektroforezi için kullanılacak yükleme jelinin hazırlanması.....	78
Çizelge 3.14. Yüklenen örnekler ve miktarları	78
Çizelge 3.15. Western blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar	80
Çizelge 4.1. HT-29 kolorektal kanser hücrelerine uygulanan maddelerin IC ₅₀ değerleri	84
Çizelge 4.2. Uygulanan tedavilerin HT-29 kolorektal kanser hücrelerindeki canlı, apoptotik ve nekrotik hücre indeksleri.....	92
Çizelge 4.3. p53, Bcl-2 ve Bax genlerine ait mRNA ekspresyonu oranları	97
Çizelge 4.4. mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK genlerine ait mRNA ekspresyon oranları	102
Çizelge 4.5. p53, Bcl-2 ve Bax proteinlerinin ekspresyon düzeyleri.....	108
Çizelge 4.6. mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK proteinlerinin ekspresyon düzeyleri.....	112

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzde en tehlikeli ve hızlı yayılan hastalıklardan birisidir. Yüksek ölüm oranı gelişmiş ülkelerde önlenememektedir. Gelişmemiş ülkelerde ise bilgi eksikliği, fakirlik ve kaliteli ilaçlara ulaşamama gibi sebeplerden dolayı durum daha kötü boyutlara ulaşmaktadır (Wolff 1994). Kanser tedavisinde son 50 yılda önemli gelişmeler sağlanmış olsa da bu hastalık, önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bu yüzden yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi için büyük çaba harcanmaktadır (Shewach and Kuchta 2009). Bu çerçevede bitkisel kaynaklı bileşikler kanser tedavisinde önemli bir kaynak olarak görülmektedir. Onaylı kanser ilaçlarının yaklaşık %75'i doğal kaynaklı ajanlardan ilham alınarak geliştirilmiştir (Newman and Cragg 2012). Kanser tüm evrelerinde tedaviye destek olmaları, toksik olmamaları, çok hedefli olmaları ve genellikle ilaçlarla sinerjik etki göstermeleri, doğal terapötikleri çok önemli kılmaktadır (Wani *et al.* 2016).

Güvenilir ve kolay elde edilebilir kaynaklar olan bitkilerin aromatik ve tıbbi özelliklerinden asırlardan beri yararlanılmaktadır. Dünya nüfusunun dörtte üçünden fazlası hastalıklara karşı farmakolojik açıdan bitkilere güvenmektedir. Ancak tüm bitki türlerinin sadece %30'u şu anda tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır (Pathania *et al.* 2013).

Kanserle ilişkili ölüm oranlarının yüksek olması ve kemoterapi ile radyasyon tedavisinin ciddi yan etkilerinin olması kanser tedavisinde alternatif tamamlayıcı yöntemlerin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan 3000'den fazla bitki rapor edilmiştir (Cragg and Newman 2005). Tıbbi bitkiler kanserin de dahil olduğu pek çok hastalığın tedavisinde toksisiteye neden olmadıkları için kullanılmaktadır. Kuersetin, luteolin, betulinik asit ve kurkumin gibi bitkisel etken maddelerin çeşitli kanser türleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Xavier *et al.* 2009; Guo *et al.* 2013). Aynı zamanda irinotekan, vinorelbin, tenipozid ve dosetaksel gibi yarı sentetik bitki türevleri de potansiyel antikanser ajanları olarak kullanılmaktadır (Casciato 2009).

Fitokimyasallar bitkilerden elde edilen biyoaktif bileşiklerdir. Bunlar, insan sağlığı üzerinde antikarsinojen, antimutajen, antiproliferatif, antioksidan ve antimikrobiyal olmak üzere çeşitli etkilere sahiptirler (Surh 2003; Kwon *et al.* 2007). Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) yaklaşık 35 000 bitki türünün antikanser potansiyeline sahip olduğunu ve yenilebilir 40 bitkinin kanser önleyici özellikte olduğunu çok sayıda çalışmaya dayanarak rapor etmiştir (Aggarwal and Shishodia 2006). Ayrıca geleneksel Çin tıbbında kullanılan 400'den fazla bitkinin antikanser aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Cai *et al.* 2004). Meyve, sebze, tahıl ve diğer bitkilerden temel olarak fenolikler, karetenoidler, vitaminler, alkaloidler, nitrojen içeren bileşikler ve organosülfür bileşikler olarak sınıflandırılan 5 000'den fazla fitokimyasal tanımlandığı düşünülmektedir. Bu fitokimyasallar arasında büyük yapısal farklılıklar vardır ve özellikle fenolik bileşikler geniş ölçekli biyoaktivitelerinden dolayı oldukça ilgi çekicidir (Han *et al.* 2007; Huang *et al.* 2009).

Kolorektal kanser terimi, kolon veya rektumda başlayan kanserleri ifade eder. Kolon ve rektum, gastrointestinal sistem olarak da adlandırılan sindirim sisteminin önemli birer parçasıdır. Kolon kanserleri ile rektal kanserler pek çok ortak özelliğe sahip olduğu için birlikte değerlendirilmektedir. Birçok kanser çeşidinin etiyojisinde genetik faktörler olmasına karşın, kolorektal kanserlerin sadece %10'u genetik olarak aile üyelerinden kalıtır. Kolorektal kanserlerin büyük çoğunluğu çevresel etmenler ve genetik değişikliklerin birikimi ile ortaya çıkan sporadik sendromlardır. Bu değişiklikler kişinin yaşamı boyunca bağırsak duvarının mukozal yüzeyindeki epitel hücrelerinde meydana gelir. Kritik sayıda genetik değişiklik meydana geldiğinde kanser gelişebilir. Metastatik kolorektal kanser vakalarında hayatta kalım oranı %10'dan daha azdır. Tedavide ana basamaklar 5-Fluorouracil (5-FU) kullanımı, radyoterapi ve cerrahi müdahaledir (Siegel *et al.* 2015). Bu yüzden, 5-FU ile kombine olarak kullanılacak yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi kolorektal kanser tedavisinin önemli bir parçası olabilir.

İlaç ile birlikte başka bir ilaç veya bitkisel etken madde kombinasyonunun kullanımı, birden fazla mekanizma veya yolağı etkileyerek tedaviyi daha etkin hale getirebilmektedir. Ancak sinerjizmden bahsedebilmek için şu etkiler gözlemlenmelidir:

1. Terapötik etkinliği arttırmak,
2. Dozu azaltırken toksisiteye neden olmadan aynı etkinliği devam ettirmek veya arttırmak,
3. İlaç direncinin gelişmesini hafifletmek veya minimize etmek,
4. Hedefe karşı seçici sinerjizm sağlamak.

Bu sinerjistik etkiler, ilaç kombinasyonlarının yoğun şekilde kullanılmasını ve kanser gibi pek çok tehlikeli hastalığa karşı tedavi etkinliğinin artmasını sağlamaktadır (Chou 2006).

Bu çalışmanın amacı, 5-Fluorouracil ile bitkisel etken maddeler ve bitki ekstralarının HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücre hattında, hücre çoğalması ve apoptotik sinyal iletim yolları üzerine olan sinerjistik etkilerini araştırmaktır. Bu kapsamda, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücreleri kültüre edilerek çoğaltıldı. 5-Fluorouracil ile bitkisel etken maddeler olan kuersetin ve luteolin, ayrıca polaritesi farklı çözücüler kullanılarak hazırlanmış olan *Achillea biebersteinii* ve *Pistacia eurycarpa* bitkilerine ait bitkisel ekstralar hücrelere uygulandı. İnkübasyondan sonra yapılan çeşitli analizler ile uygulanan bu maddelerin sitotoksik, apoptotik ve anti-proliferatif etkileri belirlendi. Ayrıca, 5-Fluorouracil ile bitkisel etken maddeler ve bitkisel ekstralarının kombine dozlarının etkileşimleri de belirlendi. Apoptotik yollarda görevli olan bazı gen ve proteinlerin ekspresyon seviyeleri incelendi ve istatistiksel analizler yapıldı.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kanser

Kanser dünya genelinde büyüyen bir sağlık problemidir ve kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci en önemli ölüm sebebidir. Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) tarafından açıklanan son rapora göre, 2012 yılında dünya genelinde 14,1 milyon yeni kanser vakası meydana gelmiştir ve 8,2 milyon kanser kaynaklı ölüm gerçekleşmiştir. Yine bu verilere göre 32,6 milyon insan kanser hastası olarak yaşamaktadır. Kanseri insidansı ve mortalitesi sırasıyla 100 000'de 182 ve 102'dir. Tüm kanser vakalarının %53'ü ve kanser kaynaklı ölümlerin %57'si erkeklerde görülmektedir. Erkekler arasında en sık rastlanan kanser türleri akciğer (%16,7), prostat (%15), kolorektal (%10), mide (%8,5) ve karaciğer (%7,5) kanserleridir. Kadınlar arasında ise meme (%25,2), kolorektal (%9,2), akciğer (%8,7), servikal (%7,9) ve mide (%4,8) kanserleri en yüksek insidansa sahiptir (Stewart and Wild 2014).

Kanser, bir doku veya organdaki hücrelerin kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalması ve bu anormal hücrelerin diğer organlara yayılması ile karakterize edilen bir hastalıktır. Bu yayılma kontrol edilemezse hastalık ölümle sonuçlanabilir. Kanser neden olan pek çok iç ve dış faktör bulunmaktadır. Kanseri, DNA hasarı, kalıtsal genetik mutasyonlar, hormonlar ve bağışıklık sistemine bağlı koşullar gibi iç faktörlerden kaynaklanabilir. Bazı kanser türleri ise biyomoleküllerin (lipid, protein ve DNA) oksidatif hasarına neden olan serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi sonucu gelişir. Ultraviyole ve iyonize radyasyon, asbest ve sigara dumanı, virüs, bakteri ve parazitler (hepatit B virüsü karaciğer kanserine, insan papilloma virüsü servikal kansere, *Helicobacter pylori* gastrik kansere, *Schistosomiasis* mesane kanserine neden olur) ve gıda maddelerinin mikotoksinler ile kontamine olması (aflatoksinler karaciğer kanserine neden olur) gibi çok sayıda fizyolojik ve biyokimyasal kanserojen vardır. Bu dış etkenlere maruz kalma ile kanser teşhisi arasında genellikle on veya daha fazla yıl geçer. Bu iç ve dış faktörler birlikte veya tek başlarına kansere neden olabilirler. Kanseri tedavileri arasında cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon terapisi, bağışıklık terapisi

ve hedefe yönelik terapi gibi özellikle kanser hücrelerinin büyümesini engelleyen ilaçlar yer almaktadır (Huang *et al.* 2009).

Kanser hücrelerindeki anormallikler genellikle, hücre bölünmesini düzenleyen proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanır. Zaman içinde daha çok gen mutasyona uğrar. Bunun sebebi normalde hücre proliferasyonunu düzenleyen, apoptozu kontrol eden veya DNA hasarını tamir eden proteinleri kodlayan genlerin (Çizelge 2.1) asıl işlevlerini tam olarak yerine getirememesidir. Bu genler işlevlerine ve etkilerine bağlı olarak proto-onkogenler ve tümör supresör genler olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Proto-onkogenler proliferasyonu ve farklılaşmayı sağlayan normal hücre genleridir. Proto-onkogenlerin mutant formu onkogenler olarak adlandırılır.

Çizelge 2.1. Kanserle ilişkili bazı genler (Anonymus 2013)

Gen	Fonksiyonu	Kanserler	Gen Tipi
APC	Hedef genlerin transkripsiyonu	FAP(=Familyal Adenomatöz Polipozis)	Tümör supresör
BCL2	Apoptozis ve anjiyogenezin uyarılması	Lösemi, Lenfoma	Onkogen
BRCA1	Hücre döngüsü kontrolü	Meme, yumurtalık, prostatik ve kolonik neoplazmlar	Tümör supresör
BRCA2	DNA onarımı	Meme ve pankreatik neoplazmlar, lösemi	Tümör supresör
HER2	Tirozin kinaz, büyüme faktörü reseptörü	Meme ve yumurtalık neoplazmları	Onkogen
MYC	Çeşitli hücre faktörlerle protein-protein etkileşimi	Burkitt lenfoma	Onkogen
p16	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü	Lösemi, melanoma, pankreatik neoplazm	Tümör supresör
p21	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü		Tümör supresör
p53	Apoptozis, transkripsiyon faktörü	Kolorektal neoplazm, Li-Fraumeni sendromu	Tümör supresör
RAS	GTP-bağımlı protein, sinyal iletim yollarında önemli	Pankreatik, kolorektal, mesane, meme, böbrek ve akciğer neoplazmları, lösemi, melanoma	Onkogen
RB	Hücre döngüsünün düzenlenmesi	Retinoblastoma	Tümör supresör
SIS	Büyüme faktörü	Dermatofibrosarkoma; Meninjioma; cilt neoplazmı	Onkogen

Onkogenler kanser oluşumuna neden olurlar. Tümör supresör genleri ise hücre proliferasyonunu inhibe eden genlerdir. Hücre döngüsünün ve programlı hücre ölümünün kontrol edilmesini sağlarlar. Tümör supresör genlerindeki mutasyonlar da kanser oluşumuna neden olur.

Hücrede mutasyonların artmaya başlaması, o hücrede ve bölünme sonucunda oluşan yeni hücrelerde daha fazla anormalliğe neden olur. Bu mutasyonlar ile anormal hücreler normal hücrelere göre çok daha hızlı çoğalmaya başlar. Hızla çoğalan bu hücreler de benign veya malignant tümörleri oluştururlar. Benign tümörler nadiren yaşamı tehdit ederler. Daha yavaş gelişme eğilimindedirler ve vücudun diğer bölgelerine yayılmazlar. Sadece çok büyük boyutlara ulaştıklarında diğer organlara baskı yaparlar ve rahatsızlık oluştururlar. Malignant tümörler ise daha hızlı büyürler, diğer dokulara da yayılarak metastaz yaparlar ve onları da tahrip ederler.

2.2. Kolon ve Rektum

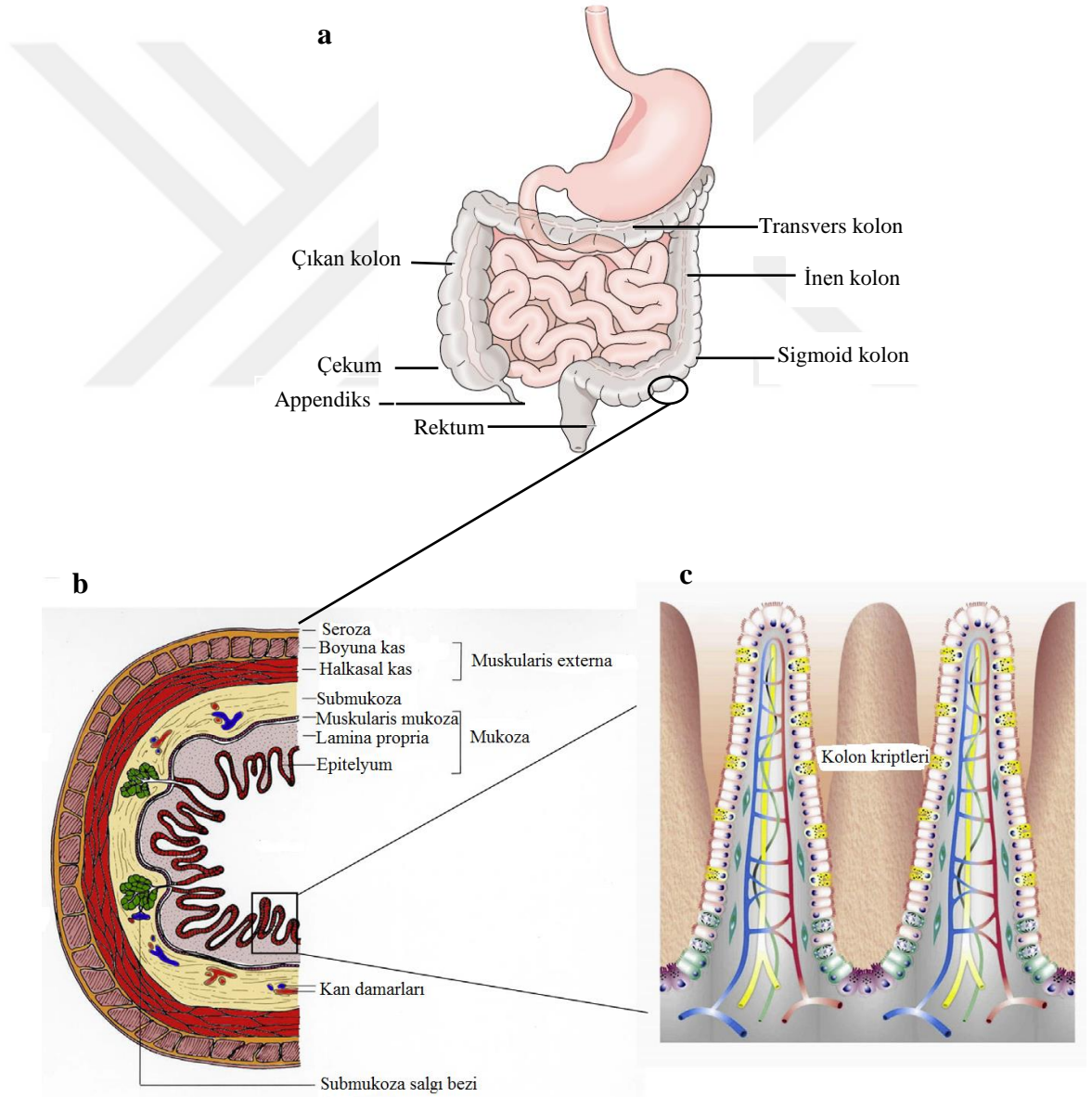
Kolon ve rektum, alt gastrointestinal sistemin kalın bağırsak olarak da adlandırılan kısmında yer alırlar. Kalın bağırsak; çekum, appendiks, kolon, rektum ve anal kanaldan oluşur. Çekum, kalın bağırsağın ilk kısmıdır ve alt kısmında appendiks yer alır. Anal kanal ise sindirim kanalının son kısmıdır. Yetişkinlerde kalın bağırsak yaklaşık 1,5 metre uzunluktadır. Kolon ve rektumun genel yapısı, şekil 2.1.a, şekil 2.1.b ve şekil 2.1.c’de gösterilmiştir.

2.2.1. Kolon

Kolon, uzun tüp şeklinde bir yapıya sahiptir ve çekum ile rektum arasında uzanır. Kolonun temel görevi dışkıyı oluşturmak, geçici olarak depolamak ve vücuttan atılması için anal kanala doğru itmektir. Fazla olan su ve dışkıdan geriye kalan besinler kolonda absorbe edilir. Kolonun içinde çok sayıda farklı enzim ve bakteri bulunur. Kolonda ve kalın bağırsağın diğer kısımlarında 400 çeşit bakterinin bulunduğu düşünülmektedir. Kolon şu kısımlardan oluşur;

Çıkan kolon; kolonun ilk segmentidir. Çekum ile transvers kolon arasında bulunur. Yetişkinlerde yaklaşık 25 cm uzunluğundadır. Anterior ve lateral yüzeyleri periton ile kaplıdır. Posterior kısmı ise retroperiton ile direkt temas halindedir.

Transvers kolon; kolonun ikinci ve en uzun kısmıdır. Sağ kolon ile sol kolon arasındaki bağlantıyı sağlar. Tamamı peritonla çevrilidir ve çıkan ve inen kolonlar arasında yatay olarak uzanır. Yetişkinlerde uzunluğu 45 cm civarındadır.



Şekil 2.1. (a) Kolon ve rektumun genel yapısı, (b) Kolon duvarı, (c) Kolon kripleri (Yeatman 2001; Kasdagly *et al.* 2014)

İnen kolon; kolonun üçüncü kısmıdır. Transvers kolonla başlar, sigmoid kolon ile son bulur. Yetişkinlerde yaklaşık 15 cm'dir. Çıkan kolon gibi anterior ve lateral yüzeyleri periton ile çevriliyken, retroperiton ile posterior yüzeyi temas eder.

Sigmoid kolon; Kolonun dördüncü segmentidir ve tamamen peritonla örtülüdür. İnen kolonla rektum arasında uzanır. İnen kolonla beraber kolonun sol tarafını oluşturur ve yetişkinlerde 40 cm kadardır (Schneider 2011).

2.2.2. Rektum

Rektum sigmoid kolonu anal kanala bağlayan boru şeklindeki kısımdır. Yetişkinlerde uzunluğu 12 cm kadardır. Rektumun fonksiyonu kolon ile aynıdır, tek fark bu bölgede dışkıının çok az besin maddesi ve su içermesidir. Tam bir absorblamadan sonra dışkı atılmak üzere anal kanala itilir (Schneider 2011).

2.2.3. Kolon ve rektum histolojisi

Kolorektal duvarın dıştan içe doğru seroza, muskularis eksterna, submukoza ve mukoza olmak üzere dört katmanı vardır (Şekil 2.1.b).

Seroza, kolorektal duvarın en dıştaki tabakasıdır. Kolon ve rektumun karnın alt kısmındaki yerleşimlerini korumalarını sağlar.

Muskularis eksterna, Kolorektal duvarın üçüncü tabakasıdır ve dışkıının kolon ve rektum boyunca itilmesini sağlayan kaslardan oluşur.

Submukoza, mukozanın üstünde bulunur ve kolorektal duvarın ikinci tabakasıdır. Kolon ve rektum boyunca uzanan arterler, venler ve sinirler ile bağlantıyı sağlar.

Mukoza, kolorektal duvarın en iç tabakasını oluşturur. Mukozal tabaka ilk olarak, kolorektumun en iç astarı olan epitel hücrelerden oluşur. Normal epitelyum hücrelerinin yaşam döngüsü kısadır ve yaklaşık 6 günde bir yenilenirler. Epitel hücrelerin sürekli büyümesi ve dışkı materyalinde bulunan kontaminantlarla devamlı temas halinde olması, bu hücreleri karsinogeneze karşı savunmasız hale getirir. Kolorektal mukoza aynı zamanda farklı tip hücreler de içerir;

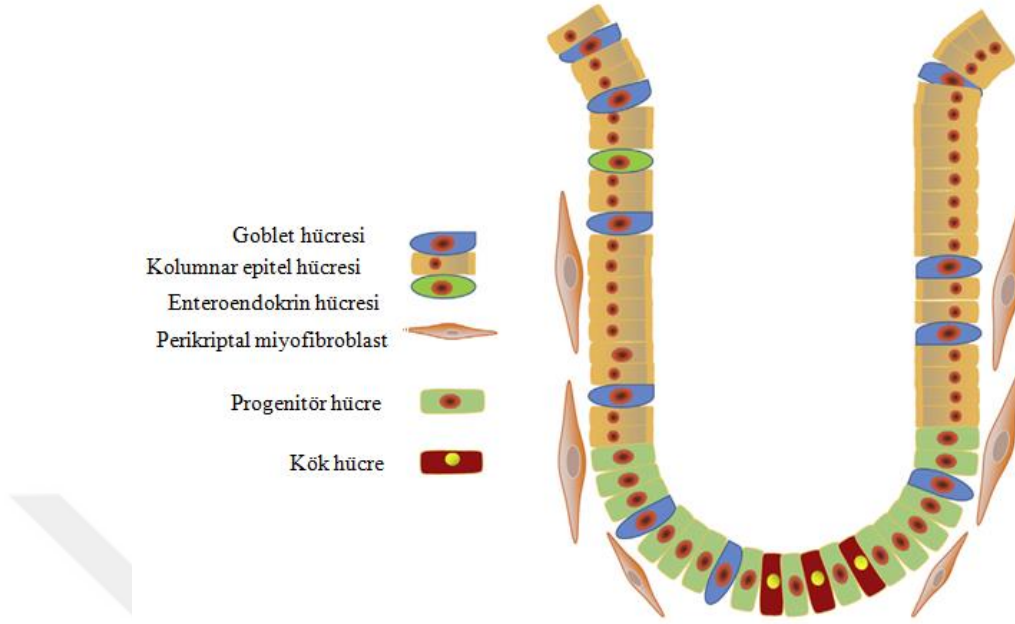
Glandüler hücreler (kript hücreleri); suyun ve besinlerin son damlasına kadar dışkı materyalinden absorblanmasını sağlayan hormonları salgılayan ve dışkının itilmesine yardımcı olan hücrelerdir.

Goblet hücreleri, bakterilerin kan dolaşımından uzak tutulmasına yardımcı olmak için mukus salgılayan hücrelerdir. Bu mukus aynı zamanda dışkının tahliyesini de kolaylaştırır.

Kollajen hücreleri (lamina propria), kriptler ve diğer mukoza hücrelerinin çevresindeki dokular için koruyucu bir katman oluştururlar.

Lenfositler ve immün sistemin diğer hücreleri, diğer hücreleri enfeksiyonlardan korumaya yardımcı olurlar (Schneider 2011).

Liberkühn kriptleri denilen kript benzeri yapılar, kolonun fonksiyonel birimini temsil eder (Şekil 2.1.c). Liberkühn kriptleri, epitel tabakanın sürekli yenilenmesini sağlarken aynı zamanda maksimum emilim için yüzey alanı oluştururlar. Normal kolon milyonlarca kriptten oluşur ve her bir kript yaklaşık 2000 hücre içerir. Bir kript genellikle farklılaşmış üç ana epitel kökenli hücreden oluşur. Bunlar; primer emici hücreler olarak adlandırılan kolumnar epitel hücreleri, mukus salgılayan goblet hücreleri ve hormon salgılayan enteroendokrin hücreleridir (Şekil 2.2). Bu hücreler normal durumlarda homeostaz ile hasar sonrasında ise hızlı bir şekilde kript alt yüzeyine yakın yerde bulunan kök hücreler tarafından sürekli olarak yenilenirler (Kasdagly *et al.* 2014).



Şekil 2.2. Kolon kriptlerinin şematik görünümü (Kasdagly *et al.* 2014)

2.2.4. Kolon ve rektumun kan damarları ve lenf nodları

Kolon ve rektumu besleyen kan damarları kalın bağırsağın etrafını tamamen kuşatır. Bu damarlar mezenter sistemin arter ve venleridir. Çıkan kolona ve transvers kolona besin sağlayan kan damarları süperior mezenterik arterden köken alırlar. İnen kolona, sigmoid kolona ve rektuma ise inferior mezenterik arterden köken alan kan damarları besin sağlarlar.

Lenfatik sistem kan damarlarından sızan sıvıları toplar ve hücreler arasında biriktirir, böylece lenf nodları ile bu sıvıları süzebilir ve daha sonra bu sıvıları dolaşım sistemine geri verir. Kolona ve rektuma yakın olan lenf nodları üç ana grupta toplanır. Bunlar;

Parakolik nodlar, kolonun dış yüzeyine yakın yerlerde bulunur.

İntermediat nodlar, kolonu besleyen ana kan damarları boyunca yerleşim gösterirler.

Merkezi nodlar, aorta ve akciğerlere yakın yerleşime sahiptirler (Schneider 2011).

2.3. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser, dünya genelinde en sık rastlanan üçüncü (%9,7) kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin dördüncü önemli nedenidir. En sık görülen kanser türleri arasında erkeklerde üçüncü (%10), kadınlarda ise ikinci (%9,2) sırada yer almaktadır (Stewart and Wild 2014).

Kolorektal kanser, kolon ve rektumda oluşan kanserleri ifade eder. Kolorektal karsinogenezinin başlangıç basamağı, çevresel karsinojenlere maruz kalınması ile hücrelerde veya mukozanın morfolojisinde küçük veya gözlemlenemeyen değişikliklerin oluşmasıdır. Sonraki evrede, mukozanın yaralanma veya inflamasyon ile yapısı bozulur ve bunun sonucunda malignant olmayan tümör (adenoma) gelişir (Tanaka 2009). Bir adenoma (veya adenomatöz polip), kript hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile oluşan epitel displazi kitlesidir. Kolon karsinogenezinde en erken görülen lezyonlar, aberran kript odağı (ACF) denen yapılardır ve bunlar kolonik bazal membran üzerinde çoğalarak ileride adenomatöz polipleri oluştururlar (Roncucci *et al.* 2000). ACF, kolondaki adenoma ve karsinomanın habercisidir. Karsinogenezin ilerleme evresinde tümörün diğer dokulara yayılması ve malignant hale dönüşmesi için herhangi bir dış uyarana ihtiyaç duyulmaz. Neoplastik hücreler muskularis mukozaya geçtikleri ve submukozaya sızdıkları zaman malignant olarak değerlendirilirler (Tanaka 2009). Sağlıklı kolonik bir epitelyumun malignant kansere dönüşümünde, bir dizi anahtar onkogen ve tümör supresör genin aşırı aktivasyonu veya fonksiyon kaybı önemli rol oynar. Adenomatöz polipozis coli (APC) ve DNA yanlış eşleşme onarım genlerindeki mutasyonlar kolorektal kanser oluşumunun tetikleyicisidirler (Fearon and Vogelstein 1990; Smith *et al.* 2002). APC veya β -katenin genindeki mutasyonlar, küçük benign bir tümörün büyümesini başlatmak için yeterlidir ancak böyle bir tümörü daha ileri formlara dönüştürmek için yeterli değildir. K-ras, TGF- β /SMAD2 yolakları gibi pek çok yolaktaki ve tümör supresör geni TP53 gibi genlerdeki değişiklikler ve

mutasyonlar, adenomanın adenokarsinomaya dönüşümünde etkin rol oynarlar (Davies *et al.* 2005; Kasdagly *et al.* 2014).

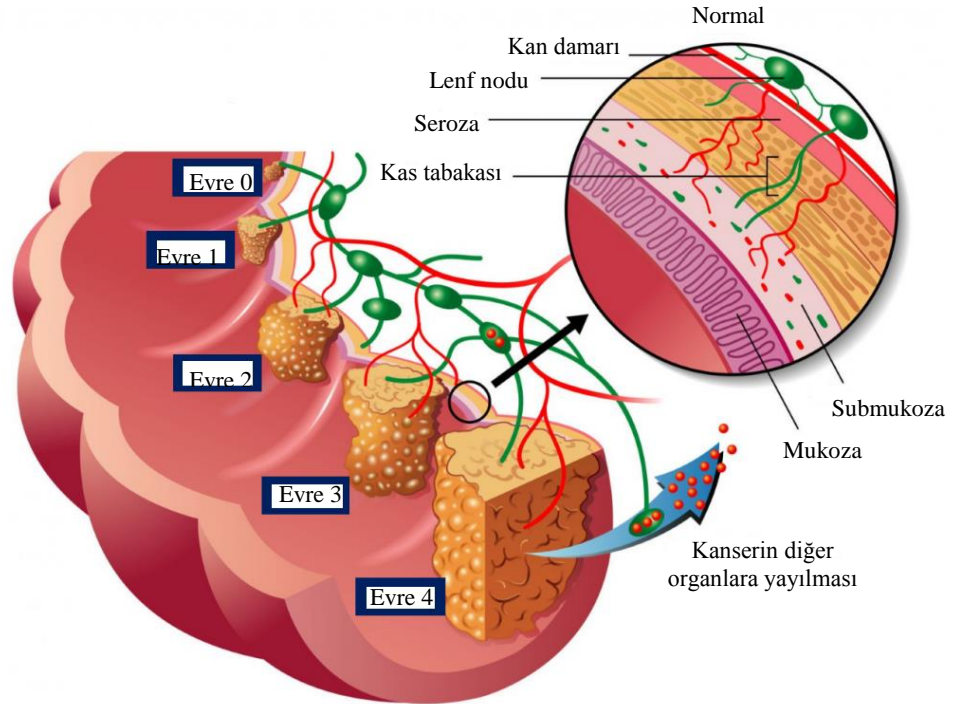
2.3.1. Kolorektal kanserin evreleri

Kolorektal kanser beş evreden oluşmaktadır (Şekil 2.3):

Evre 0- Kanser hücreleri yalnızca kolon veya rektumun iç tabakasında bulunur. Bu evre karsinoma *in situ* olarak da adlandırılır.

Evre 1- Kanser hücreleri kolon veya rektumun iç duvarına yayılır fakat duvarı geçmez.

Evre 2- Kanser, kolon veya rektum duvarı boyunca daha geniş ve derin bir yayılış gösterir ve duvarın dış yüzeyine yakın dokulara yayılır. Ancak lenfe yayılma söz konusu değildir.



Şekil 2.3. Kolorektal kanserin evreleri (Anonymus 2015)

Evre 3- Kanser kolona yakın olan lenf düğümlerine yayılır.

Evre 4- Kanser, karaciğer ya da akciğer gibi vücudun diğer uzak bölgelerine yayılır.

2.3.2. Kolon ve rektumda oluşan kanserler

Kolon ve rektumda oluşan kanserlerin çeşitli tipleri vardır. Bunlar;

Adenokarsinomalar: Kolorektal kanserlerin %95'inden fazlası adenokarsinomalardır. Bu kanserler, kolon ve rektumun içini kayganlaştırmak için mukus salgılayan bezlerdeki goblet hücrelerinde başlar.

Karsinoid tümörler: Bu tümörler bağırsakta özel hormonlar üreten enteroendokrin hücrelerinde başlar.

Gastrointestinal stromal tümörler (GISTs): Bu tümörler kolon duvarında bulunan interstisyel Cajal hücreleri denilen özelleşmiş hücrelerden başlar. Bazıları benign, bir kısmı ise malign formda bulunmaktadır. Sindirim kanalının herhangi bir yerinde gelişebilirler, ancak kolonda nadiren görülürler.

Lenfomalar: Genellikle lenf düğümlerinde başlayan bağışıklık sistemi hücrelerine ait kanserlerdir. Ancak kolon, rektum veya diğer organlarda da oluşabilirler.

Sarkomalar: Bu tümörler, kolon ve rektum duvarındaki kan damarları ile kas ve bağ dokusunda başlayabilirler. Kolon ve rektum sarkomaları nadirdir (Anonim 2015).

2.3.3. Kolorektal kanserdeki genetik ve epigenetik değişiklikler

Kolorektal kanser, normal kolonik epitelyumun kolon adenokarsinomuna dönüşmesine neden olan genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi sonucu ortaya çıkar.

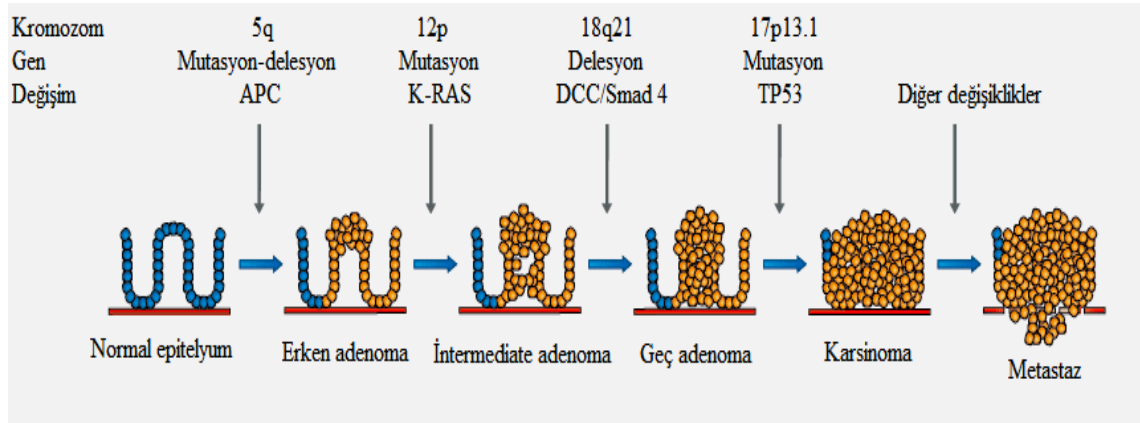
Kolorektal kanserin moleküler analizleri sonucunda kanserin patogenezi dört ana ilke üzerine kurulmuştur. Bunlardan ilki, kanser hücrelerinin ihtiyaç duyduğu klonal büyümeyi sağlayan ve kolorektal kanser oluşumunun altında yatan genetik ve epigenetik değişikliklerin kanser oluşum sürecine destek olmasıdır (Kheirelseid *et al.* 2013). İkinci ilke, kanserin moleküler ve morfolojik düzeyde pek çok basamağın gerçekleşmesi ile ortaya çıkmasıdır (Fearon and Vogelstein 1990). Üçüncüsü ise, genomik bütünlüğün (kararlılık) kaybolmasının kanser oluşumunda moleküler olarak önemli bir basamak olmasıdır (Lengauer *et al.* 1998). Dördüncüsü ailesel (kalıtsal) kanserlerde mutasyonların (Çizelge 2.2) sıklıkla gözlemlenmesidir (Vogelstein and Kinzler 1996).

Çizelge 2.2. Kolorektal kanserde görülen mutasyonlar (Fearon 2011)

Gen	Mutasyon tipi	Görülme Sıklığı
Onkogenler		
<i>KRAS</i>	Nokta mutasyonlar (kodon 12, 13, 61)	%40
<i>NRAS</i>	Nokta mutasyonlar (kodon 12, 13, 61)	< %5
<i>PIK3CA</i>	Kinaz aktivitesini arttıran nokta mutasyonlar	%15-25
<i>BRAF</i>	Kinaz aktivitesini arttıran nokta mutasyonlar	%5-10
<i>EGFR</i>	Gen amplifikasyonu	%5-15
<i>CDK8</i>	Gen amplifikasyonu	%10-15
<i>CMYC</i>	Gen amplifikasyonu	%5-10
<i>CCNE1</i>	Gen amplifikasyonu	%5
<i>CTNNB1</i>	Nokta mutasyon, delesyon	< %5
<i>NEU</i>	Gen amplifikasyonu	< %5
<i>MYB</i>	Gen amplifikasyonu	< %5
Tümör supresör genler		
<i>p53</i>	Nokta mutasyon, allel kaybı	%60-70
<i>APC</i>	Çerçeve kayması ve nokta mutasyon, delesyon, allel kaybı	%70-80
<i>FBXW7</i>	Anlamsız ve kayıp mutasyon, delesyon	%20
<i>PTEN</i>	Anlamsız mutasyon, delesyon	%10
<i>SMAD4</i>	Anlamsız ve kayıp mutasyon, allel kaybı	%10-15
<i>SMAD2</i>	Anlamsız mutasyon, delesyon, allel kaybı	%5-10
<i>SMAD3</i>	Anlamsız mutasyon, delesyon	%5
<i>TGFβIIR</i>	Çerçeve kayması ve anlamsız mutasyon	%10-15
<i>TCF7L2</i>	Çerçeve kayması ve anlamsız mutasyon	%5
<i>ACVR2</i>	Çerçeve kayması mutasyonu	%10
<i>BAX</i>	Çerçeve kayması mutasyonu	%5

2.3.3.a. Genetik değişiklikler

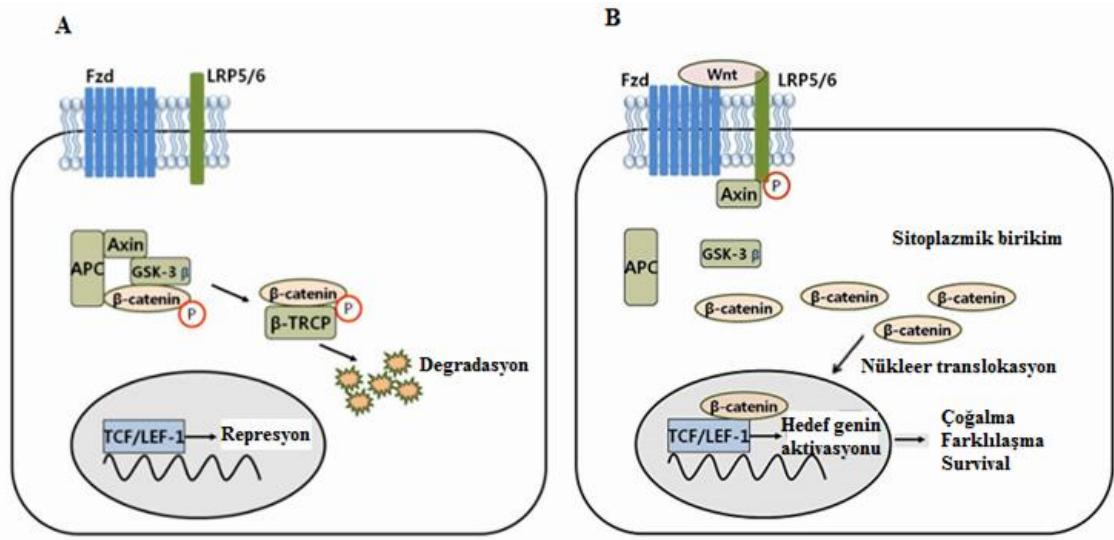
Fearon and Vogelstein (1990) tarafından kolorektal kanser için genetik bir model öne sürülmesinden bu yana (Şekil 2.4), kolorektal kanserin moleküler mekanizmasının anlaşılması noktasında çok fazla ilerleme kaydedilmiştir. Bu gelişmelerden birisi de APC, K-RAS, p53 ve DCC genlerinde meydana gelen mutasyonlar ile kolorektal kanser arasındaki yakın ilişkidir. Kolon kanseri oluşumunun erken teşhisinde tanımlanabilen ilk lezyonlar aberran kript odaklarıdır (ACF). Bu lezyonların neoplastik potansiyeli hala tam olarak belirlenememiştir, ancak bu lezyonlardan bazılarının adenokarsinoma evresine ilerlemede ve K-RAS veya APC mutasyonlarında bir liman olduğu görülmektedir. Özellikle displastik aberran kript odakları genellikle APC mutasyonu taşırlar ve kolon kanseri oluşumunda çok yüksek potansiyele sahiptirler. Bu yüzden Wnt sinyal yolağının aşırı aktivasyonuna neden olan APC genindeki değişiklikler, kolonda tümör oluşumunu başlatan önemli bir etken olarak görülmektedir. APC genindeki değişiklikleri takip eden diğer genlere ait değişiklikler ise tümör gelişiminde ve tümörün metastaz gibi malignant özellikler kazanmasında önemli rol oynarlar (Kheirelseid *et al.* 2013).



Şekil 2.4. Kolorektal kanser gelişiminin moleküler modeli (Fearon and Vogelstein 1990; Davies *et al.* 2005)

a. APC

Adenomatöz polipozis coli (APC) geni β -katenin, γ -katenin, glikojen sentaz kinaz (GSK)-3 β , aksin, tubulin, EB1 ve hDLG gibi bazı intraselüler proteinlere bağlanan ve birçok fonksiyonel bölgeye sahip olan bir proteini kodlar (Vogelstein and Kinzler 1996). APC genindeki germline mutasyonlar Familial Adenoma Polipozis, Gardner sendromu, Turcot sendromu veya Flat adenoma sendromu ile sonuçlanır (Foulkes 1995; Soravia *et al.* 1998). Yapılan çalışmalarla tüm kolorektal adenokarsinom vakalarının %70'den fazlasında APC geninin mutasyona uğramış olduğu gösterilmiştir (Miyaki *et al.* 1994; Chung 2000). Bu mutasyonlar kolon kanserinin ilk evrelerinin başlangıcından itibaren mevcuttur ve ileri evrelerde meydana gelen değişikliklere de öncülük ederler (Vogelstein *et al.* 1988; Powell *et al.* 1992). Hücre gelişiminde önemli olan genlerin ekspresyonlarının yükseltilmesi ve ardından Wnt sinyal yolağının aşırı aktivasyonu, bu mutasyonların tümör oluşumuna giden süreçte oynadıkları ana rollerden birisidir. APC mutasyonları, APC ile β -katenin arasındaki ilişkiyi bozar, bu da β -kateninin aşırı miktarda artmasına ve Wnt sinyal yolağının aşırı aktivasyonuna neden olur. Sonuç olarak, tümör oluşumunu düzenleyen genler transkripsiyona uğrar. Normalde GSK-3 β , APC, β -katenin ve aksin birlikte bir kompleks oluşturur ve bu kompleks proteinleri fosforile eder. β -kateninin fosforilasyonu ile ubiquitin-aracılı proteolitik degradasyon meydana gelir. APC mutasyonları sonucunda bu süreç önlenmiş olur ve bu da sitoplazmik β -katenin miktarının artmasına neden olur. Sitoplazmada biriken β -katenin hücre çekirdeğine girebilir ve hedef genleri (LEF-1, c-myc ve cyclin D1 gibi) aktif hale getirebilir (Şekil 2.5) (Kheirleisid *et al.* 2013).

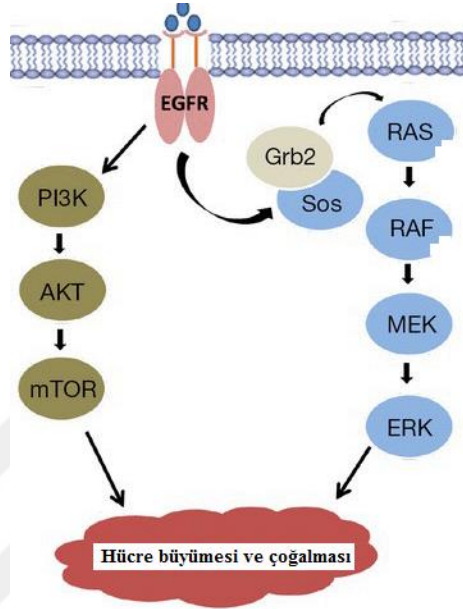


Şekil 2.5. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının düzenlenmesi (Han and Na 2011)

b. K-RAS

Kirstein rat sarkoma (K-RAS), RAS ailesi genlerinin bir üyesidir ve kolorektal karsinogenezdeki en önemli proto-onkogenlerden birisidir. RAS ailesi genleri sinyal iletimine katılan yüksek oranda korunmuş proteinleri kodlarlar. RAS protein ailesinin önemli bir fonksiyonu, Raf-mitojen aktiviteli protein (MAP) kinaz kinaz-MAP kinaz sinyal yolağına (Şekil 2.6) büyüme faktörlerini bağlamak ve bazı genlerin nükleer ekspresyonuna öncülük etmektir (Bokoch and Der 1993). K-RAS mutasyonları kolorektal kanser vakalarının %37 - %41'inde bulunmaktadır ve kanser oluşumunda nispeten erken dönemlerde görülürler (Bos *et al.* 1987; Arber *et al.* 2000). K-RAS mutasyonlarına küçük tübüler adenomaların %13'ünde, büyük adenomaların %42'sinde ve metastatik karsinomların %57'sinde rastlanmıştır. Boyutu 1 cm'den büyük olan adenomaların %58'inde, boyutu 1 cm'den küçük olan adenomaların %9'unda RAS mutasyonları gözlemlenmiştir (Vogelstein *et al.* 1988). Bu sonuçlar diğer çalışmalarda tespit edilen kolon kanserinde yaklaşık %40 olan K-RAS mutasyonu insidansını ile de desteklenmektedir (Arber *et al.* 2000). APC mutasyonu taşıyan küçük adenomaların yaklaşık %20'sinde K-RAS mutasyonu da bulunurken daha ilerlemiş adenomaların %50'sinde K-RAS mutasyonu bulunmaktadır (Tsao and Shibata 1994; Kheirelseid *et al.*

2013). Bu da K-RAS mutasyonlarının APC mutasyonları ve ilerlemiş adenomatöz lezyonlar ile ilişkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.6. MAPK sinyal yolağı ve RAS (Clarke and Kopetz 2015)

c. p53

Tümör proteini-53 (p53) başlangıçta SV40 virüsünün büyük T antijeni ile stabil kompleks oluşturan bir protein olarak tanımlanmıştır ve bir onkogen olduğu düşünülmüştür. Daha sonraki çalışmalar, p53'ün kromozomda 17p13.1 yerleşimine sahip olduğunu, gastrointestinal yol tümörleri de dahil olmak üzere insan kanserlerinin %50'sinde mutasyona uğradığını ve tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olan bir transkripsiyon faktörü olduğunu göstermiştir. Günümüzde p53'ün, hücre döngüsünün kontrolünü sağlayarak ve genotoksik strese cevap olarak hücrenin apoptoza yönelmesinde etkin rol oynayarak genomik stabilitenin korunmasına aktif olarak görev aldığı bilinmektedir (Somasundaram and El-Deiry 2000). Kolon adenomlarında p53 mutasyonu henüz gözlenmemiştir, ancak karsinoma dönüşüm sürecine aracılık ettiği görülmüştür (Vogelstein *et al.* 1988). DNA hasarını tanıma, hücre döngüsünü düzenleme, DNA onarımı ve apoptozisdeki önemli rollerinden dolayı p53 "genomun

koruyucusu” olarak adlandırılır (Lane 1993). p53 hücre döngüsünü düzenleyen ve apoptoza neden olan genlerin indüklenmesini, aynı zamanda TSP-1’i indükleyerek anjiyogenezin inhibisyonunu sağladığı için bir tümör baskılayıcı gen olarak hareket eder (Levine 1997). Mutant p53 yabancı tip TP53 ile oligomerler oluşturup DNA bağlanma özgülüğünü azaltarak bu fonksiyonları engelleyebilir (Howe and Guillem 1997; Kheirelseid *et al.* 2013).

d. DCC

1990 yılındaki bir kolorektal kanser çalışmasında (Fearon *et al.* 1990) keşfedildiğinden beri, DCC (kolorektal kanserde silinen bölge) geni pek çok çalışmanın odak noktası olmuştur. DCC bir tümör baskılayıcı gen olarak yıllardır tartışmalı bir yere sahiptir ve netrin-1’e yanıt veren bir akson rehberlik reseptörü olarak iyi bilinmektedir (Bernet and Mehlen 2007). Daha yakın zamanlarda DCC’nin epigenetik olarak susturulmuş bir ligand bağımlı tümör baskılayıcı gen olduğu ortaya konmuştur. İleri evre kolorektal kanser vakalarında en sık meydana gelen genetik anormallikler 18q21 bölgesindeki DCC geninin heterozigosite kaybıdır (LOH). DCC eliminasyonunun tümör gelişiminde anahtar bir genetik değişiklik olmadığı, ancak mevcut tümörün büyümesini ilerleten birçok değişiklikten biri olduğu düşünülmektedir (Kheirelseid *et al.* 2013).

2.3.3.b. Epigenetik değişiklikler

Kanser için en iyi bilinen ve tanımlanan epigenetik değişiklik DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu ile genom boyunca, CpG bölgelerindeki sitozin, 5-metil sitozine dönüşür (Ramsahoye *et al.* 1996). Bu epigenetik değişiklikler özellikle gen promotörlerinde bulunan ve CpG adaları olarak bilinen bölgelerde gerçekleşir. Bu bölgelerin hipometilasyonu ve hipermetilasyonu sırasıyla transkripsiyonun aktivasyonu ve inhibisyonu ile ilgilidir. Epigenetik değişiklikler embriyolojik gelişim, hücre farklılaşması ve gen sessizleşmesinde önemlidir (Monk 1995).

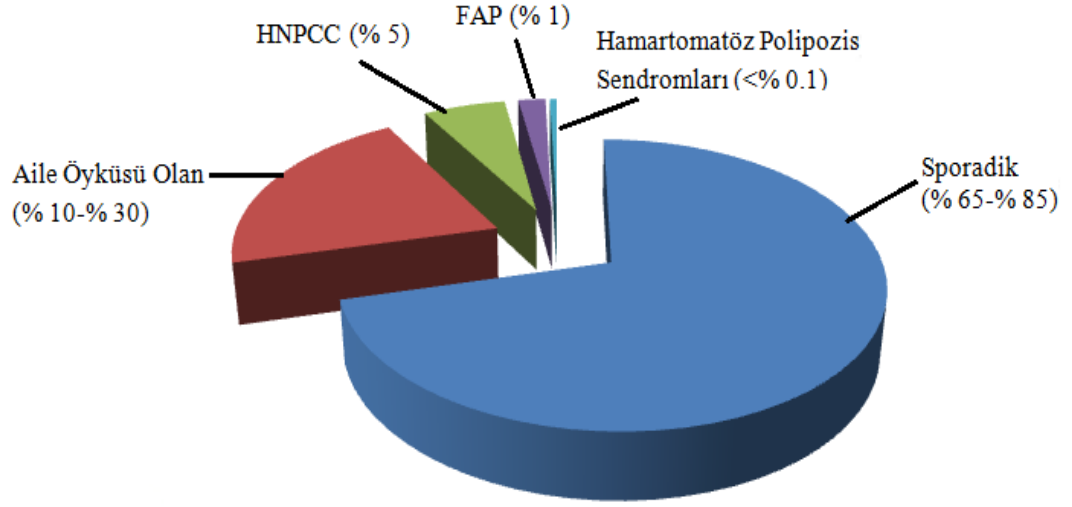
Sporadik kolon kanserinde hMLH1 genindeki promotör hipermetilasyonu, epigenetik değişikliklerin kanser oluşumundaki potansiyel rolünü göstermektedir (Jones and Laird 1999). Promotör bölgedeki bu hipermetilasyon, hMLH1 geninin sessizleşmesine neden olur. hMLH1 geni böylece inaktif hale gelir. Bu inaktivasyon da kolon kanserlerinde başlatıcı rol oynar (Herman *et al.* 1998). hMLH1'in anormal metilasyonu ile gastrointestinal karsinogenezler özellikle de kolon karsinogenezi arasında yakın bir ilişki vardır (Grady *et al.* 2000). Ayrıca CDH1, CDKN2A/p16, TSP1 ve GSTP1 gibi birçok tümör supresör genin anormal hipermetilasyon sonucunda sessizleştiği ve inaktif hale geçtiği rapor edilmiştir (Herman *et al.* 1998; Toyota *et al.* 1999; Kheirelseid *et al.* 2013). Diğer kanser türlerinde olduğu gibi, kolorektal kanser oluşumunda da epigenetik ve genetik değişiklikler birbirleriyle ilişkili olarak gerçekleşir.

2.3.4. Kolorektal kanserlerin genetik açıdan sınıflandırılması

Kolorektal kanserler genellikle üç kategoride sınıflandırılır. Bunlar;

1. Sporadik ya da rastlantısal kolorektal kanser, kayda değer bir aile öyküsü olmayan yani kanser gelişimini hızlandıracak bir genetik mutasyon tanımlanmamış bireylerde ortaya çıkar.
2. Familial kolorektal kanser, kan bağı olan en az bir yakınında kolorektal kanser veya adenoma görülmüş bireylerde rastlanır.
3. Herediter kolorektal kanser, kansere duyarlılığı fazla olan genlerdeki mutasyonların kalıtımı ile gerçekleşir.

Herediter kolorektal kanser, en düşük görülme sıklığına (Şekil 2.7) sahip olmasına rağmen, özellikle sporadik kolorektal kanserlerin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında çok önemli paya sahiptir (Kheirelseid *et al.* 2013).



Şekil 2.7. Kolorektal kanserlerin sınıflandırılması

2.3.4.a. Sporadik (rastlantısal) kolorektal kanser

Tüm kolorektal kanser vakalarının büyük bir bölümü sporadik olarak gelişir. Sporadik kolorektal kanserler, çevresel ve genetik risk faktörlerine bağlı olarak tümör supresör genlerde ve onkogenlerde gelişen genetik anormallikler (Çizelge 2.2) sonucunda meydana gelir.

2.3.4.b. Hereditör ve familial kolorektal kanserler

Hereditör ve familial kolorektal kanserler bazı genlerdeki mutasyon ve değişikliklere bağlı olarak sınıflandırılmaktadır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Kalıtsal kolorektal kanser sendromlarında görülen genetik bozukluklar (Fearon 2011)

Sendrom	Yaygın Özellikleri	Gen Bozuklukları
FAP	100'den fazla adenomatöz polip ve kolon ve rektumda karsinomalar; duodenal polipler ve karsinomalar; midede fundik gland polipleri; retinal pigment epitelinde kongenital hipertrofi	<i>APC</i> (>%90)
Gardner sendromu	FAP ile aynı; ayrıca, desmoid tümörler ve mandibular osteomalar	<i>APC</i>
Turcot's sendromu	Polipozis ve kolorektal kanser ile beyin tümörleri (medulloblastoma); kolorektal kanser ve beyin tümörleri (glioblastoma)	<i>APC</i> <i>MLH1</i> <i>PMS2</i>
Zayıflatılmış adenomatöz polipozis coli	100'den daha az polip	<i>APC</i>
Hereditör non-polipozis kolorektal kanser	Yoğun polip oluşumu olmayan kolorektal kanser; endometrial, yumurtalık ve mide kanserinin de dahil olduğu diğer kanserler ve bazen üretelyal, hepatobilier ve beyin tümörleri	<i>MSH2</i> <i>MLH1</i> <i>PMS2</i> <i>GTBP, MSH6</i>
Peutz-Jeghers sendromu	Gastrointestinal yol boyunca hamartomatöz polipler; mukokutanöz pigmentasyon; GI ve GI olmayan kanser riskinde artış	<i>LKB1, STK11</i> (%30-70)
Cowden hastalığı	Meme, tiroid, cilt, merkezi sinir sistemi, gastrointestinal yol kanserlerine neden olan çok sayıda hamartomatöz polip; meme, rahim ve tiroid kanserleri riskinde artış	<i>PTEN</i> (%85)
Juvenil polipozis sendromu	Genellikle kolon ve midede çok sayıda hamartomatöz/juvenil polipler; kolorektal ve mide kanseri riskinde artış	<i>DPC4</i> (%15) <i>BMPRIa</i> (%25) <i>PTEN</i> (%5)
MYH-ilişkili polipozis	Çok sayıda adenomatöz GI polip, otozomal resesif temelli, kolon polipleri genellikle somatik <i>KRAS</i> mutasyonları taşır	<i>MYH</i>

a. Hereditör non-polipozis kolorektal kanser (HNPCC)

Lynch sendromu olarak da bilinen HNPCC, en yaygın hereditör kolorektal kanser formudur ve tüm kolorektal kanser vakalarının %5'ini oluşturur. Hatalı eşleşme onarımı (HEO) genlerindeki germline mutasyonların sonucunda gelişir ve otozomal dominant şekilde kalıtılır. Fonksiyonel HEO proteinlerinin eksikliği genomik kararsızlığa ve

çeşitli kanserlerin gelişmesine neden olur. Ortalama 45 yaşında kanser teşhisi konmaktadır. Polipler genellikle büyüktür ve erken yaşlarda görülürler. Hastalığı taşıyan bireylerde endometrium, yumurtalık, mide, ince bağırsak, pankreas, hepatobiliyer sistem, beyin ve üst ürotelyal yol karsinomalarından bir ya da birkaçı da görülebilir (Watson and Lynch 1994; Aarnio *et al.* 1999; Kheirelseid *et al.* 2013).

2.3.4.c. Familial adenomatöz polipozis (FAP)

Familial adenomatöz polipozis (FAP), 10.000 doğumda 1 prevalans oranına sahiptir ve sayısı birkaç yüz civarına ulaşmış olan adenomatöz kolorektal polipler ile karakterize edilir. Tüm yeni kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %1'i FAP gelişimi olan hastalardır. FAP otozomal dominant kalıtılan ve 5. kromozomun uzun kolunda bulunan APC (adenomatöz polipozis coli) genindeki germline mutasyonların neden olduğu bir kanserdir (Kheirelseid *et al.* 2013). Polipler ortalama 15 yaşında oluşmaya başlar ve etkilenen bütün bireylerde 35 yaşında polipler mutlaka görülür. Tedavi edilmeyen bireylerin %7'sinde 21 yaşında ve %90'ında 45 yaşında kanser gelişir. Familial adenomatöz polipozisin tipik FAP, Gardner sendromu (GS), Turcot sendromu ve zayıflatılmış adenomatöz polipozis coli (AAPC) olmak üzere dört çeşidi vardır (Burt *et al.* 1994). Gardner sendromu, bağırsaktaki bulgulara epidermoid kistler, osteomalar, dental anormallikler ve desmoid tümörlerin eşlik etmesi ile karakterize edilir (Kheirelseid *et al.* 2013). Turcot sendromunda kolorektal polipler ile beyin tümörleri birlikte görülür. Beyin kanserleri genelde glioma şeklindedir ve 10 ila 20'li yaşlarda gelişir. AAPC, FAP'ın zayıf bir halidir. Etkilenen bireylerin kolon kanserine yakalanma riski yüksektir fakat daha az sayıda (genellikle 5-40) polip oluşumu görülür. Tipik FAP'a göre polipler kolona daha proksimal şekilde yayılır. Kanser teşhisinde ortalama yaş 54'tür (Burt *et al.* 1994).

2.3.4.d. Hamartomatöz polipozis sendromları

Hamartomatöz polipozis sendromları; Peutz-Jeghers sendromu, juvenil polipozis, Cronkhite-Canada, Cowden ve Bannayan-Riley-Ruvalcaba sendromlarının da dahil

olduğu pek çok hastalığı kapsar (Dachman *et al.* 1989; Gorlin *et al.* 1992). Hamartomatöz polipozis sendromları karakteristik olan klinikopatolojik ve radyolojik özellikleri ile ayırt edilirler. Bu sendromların tümü hamartomatöz poliplerin varlığı ile tanımlanırlar ve birçoğu gastrointestinal ve ekstraintestinal karsinom gelişme riskinin artması ile ilişkilidir (Salem and Steck 1983). En sık rastlananları Peutz-Jeghers Sendromu ve Juvenil polipozistir (Kheirleiseid *et al.* 2013).

a. Peutz-Jeghers sendromu (PJS)

Peutz-Jeghers sendromu (PJS), mideden anüse kadar herhangi bir yerde meydana gelen mukokutanöz pigmentasyon ve gastrointestinal hamartomalarla karakterize edilir. İlk kez Peutz (1921) tarafından, sonrasında ise Jeghers ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Jeghers *et al.* 1949). Otozomal dominant bir şekilde kalıtılır (Tomlinson and Houlston 1997). Prototipik bir PJS polipi muskularis mukozada gelişen bir hamartomdur. Bu yüzden, polipin çekirdeği lamina propria tarafından çevrilmiş olan düz kaslardan ve olgun bez epitelinden oluşur (Spigelman *et al.* 1995). Etkilenen ailelerin yaklaşık yarısında kromozomdaki yerleşimi 19p13.3 olan serin/tireonin kinaz genindeki (STK11/LKB1) germ-line mutasyonları Peutz-Jeghers sendromuna neden olur. Hamartomlarda ve adenokarsinomlardaki yabancı tip allellerin kaybı STK11/LKB1'in bir tümör baskılayıcı gen olduğunu göstermektedir (Kheirleiseid *et al.* 2013).

b. Juvenil polipozis sendromu (JPS)

Juvenil polipozis (JP) hastaların en az %30'unda otozomal dominant bir şekilde kalıtılır. Hastalarda irileşmiş kriptler olarak tanımlanan çok sayıda hamartomatöz kolorektal polip görülür (Aaltonen 2000). Polip sayısı FAP'ta görülenden daha azdır ve hastalık süreci daha az malignant zelliktendir. Teşhiste kullanılan farklı kriterler olmasına rağmen, juvenil polipozis sendromu teşhisi gastrointestinal yolda çok sayıda (3-10) juvenil polip bulunduğu zaman konulabilir. İlk olarak vakaların %30'unda SMAD4/MADH4 genlerinin mutasyonu tanımlanır. Hastaların %30'unda ise ilaveten

BMPR1A geninin mutasyonu da juvenil polipozise neden olabilir (Kheirleide *et al.* 2013).

2.3.5. Kolorektal kanserde risk faktörleri

2.3.5.a. Yaş

Kolorektal kanser teşhisi olasılığı, mutasyon birikimine ve dış etkenlere maruz kalmaya bağlı olarak 40 yaşından sonra giderek artar ve 50 yaşından sonra bu artış keskin bir hale gelir. Kolorektal kanser vakalarının %90'ı 50 yaş ve üzerinde görülür. 60 ila 79 yaş aralığındaki insanlarda 40 yaşından genç olanlara göre görülme sıklığı 50 kat daha fazladır (Ries *et al.* 2008). Ancak özellikle son yıllarda kolorektal kanser genç populasyon arasında da artmaktadır (O'Connell *et al.* 2004; Haggard and Boushey 2009).

2.3.5.b. Adenomatöz polip hikayesi

Kolon ve rektumdaki neoplastik polipler olan tübüler ve villoz tip adenomalar, kolorektal kanserin öncü lezyonlarıdır (Janout and Kollarova 2001). Sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %95'i bu adenomalardan gelişir. Adenoma hikayesi bulunan bireylerde bulunmayanlara göre kolorektal kanser gelişme riski daha fazladır. Adenomaların malignant hale dönüşmesi için genellikle 5 ila 10 yıl gibi uzun bir süre gereklidir (De Jong *et al.* 2005; Davies *et al.* 2005). Malignant hale dönüşmeden önce bir adenomayı belirlemek ve onu cerrahi müdahale ile çıkarmak kolorektal kanser riskini azaltabilir. Ancak, adenomatöz polipin veya lokalize haldeki karsinomun tamamen çıkarılması, kolon ve rektumun farklı bir bölgesinde ilerleyen zamanlarda metakron kanser gelişmesi olasılığını arttırır (De Jong *et al.* 2005; Haggard and Boushey 2009).

2.3.5.c. İnflamatuvar bağırsak hastalığı hikayesi

İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (IBD) ülseratif kolit ve Crohn hastalığını belirtmek için kullanılan bir terimdir. Ülseratif kolit, kolon ve rektumda mukozal inflamasyona neden olur. Crohn hastalığı ise bağırsak duvarının tüm tabakalarını kapsayacak şekilde bir inflamasyon ile sonuçlanır ve sindirim sisteminin ağızdan anüse kadar herhangi bir kısmını da etkileyebilir. Bu hastalıklardaki şartlar, bireydeki kolorektal kanser gelişme riskini yaklaşık 4 ila 20 kat arasında artırır (Janout and Kollarova 2001). Bu yüzden, IBD taşıyan bireyler yaşa bakılmaksızın daha sık bir şekilde tarama testlerinden geçirilmelidir (Haggar and Boushey 2009).

2.3.5.d. Ailesel kolorektal kanser veya adenomatöz polip hikayesi

Kolorektal kanser vakalarının çoğunluğu, ailesel kolorektal kanser hikayesi olmayan kişilerde ortaya çıkar. Bununla birlikte, kolorektal kansere yakalanan insanların yaklaşık %20'sinin diğer aile bireylerinden bir veya birkaçının da bu hastalığı taşıdığı görülmektedir (Skibber *et al.* 2001). Kolorektal kanser veya adenomatöz polip hikayesi olan bireylerin hastalığa yakalanma ihtimali daha yüksektir. Riskin yüksek olmasının nedenleri tam olarak belli değildir, fakat muhtemelen kalıtsal genler, ortak çevresel faktörler veya bunların bir kombinasyonu bu ihtimali yükselten nedenler olabilir (Haggar and Boushey 2009).

2.3.5.e. Beslenme

Beslenme ile kolorektal kanser riski arasında sıkı bir ilişki vardır. Beslenme alışkanlıklarını değiştirmek kolorektal kanser riskini %70'in üzerinde azaltabilir (Willet 2005). Özellikle hayvansal yağlar açısından zengin bir beslenme düzeni kolorektal kanser için büyük bir risk faktörüdür (Janout and Kollarova 2001). Yine Batı tarzı beslenmenin bir parçası olan işlenmiş yağlar, safra tuzlarını potansiyel kanserojen maddeler olan N-nitroz bileşiklerine parçalama yeteneğine sahip bir bakteri florasının gelişmesini destekler (Larsson and Wolk 2006). Bunlara ilaveten, aşırı et tüketimi

kolorektal kanser gelişiminde etkilidir. Et tüketimi ile kolorektal kanser gelişimi arasındaki potansiyel mekanizma kırmızı ette bulunan heme demirden kaynaklanmaktadır (Hagggar and Boushey 2009). Ayrıca, etleri yüksek ısıda pişirmek her ikisinin de karsinojenik özelliğe sahip olduğuna inanılan heterosiklik aminlerin ve polisiklik aromatik hidrokarbonların oluşmasına neden olur (Santarelli *et al.* 2008). Bazı çalışmalarda ise az miktarda meyve ve sebze tüketen kişilerin daha yüksek kolorektal kanser riski taşıdığı rapor edilmektedir (Hagggar and Boushey 2009). Son olarak, lifli gıdaların tüketilmesi ile kolorektal kanser insidansı arasında coğrafi olarak farklılıklar bulunmaktadır (Janout and Kollarova 2001).

2.3.5.f. Fiziksel aktivite ve obezite

Kolorektal kanserle yaşam tarzına bağlı olan pek çok faktör yakından ilişkilidir. Fiziksel inaktivite ve aşırı vücut ağırlığı kolorektal kanserlerin dörtte üçünde rapor edilmektedir. Yüksek fiziksel aktivite ile kolorektal kanser riskinin azaldığını gösteren pek çok kanıt bulunmaktadır (Boyle and Langman 2000; De Jong *et al.* 2005; Lee *et al.* 2007). Düzenli fiziksel aktivite ve sağlıklı bir beslenme kolorektal kanser riskini azaltabilir (Bazensky *et al.* 2007). Sürekli olarak orta seviyede yapılan fiziksel aktivite, metabolizma hızını ve maksimal oksijen alımını yükseltir (De Jong *et al.* 2005). Uzun vadede, bu tür faaliyetlerin düzenli yapılması kan basıncını ve insülin direncini düşürmenin yanı sıra vücudun metabolik etkinliğini ve kapasitesini artırır (Lee *et al.* 2007). Bunlara ilaveten, fiziksel aktivite bağırsak hareketliliğini artırır. Günlük olarak fiziksel aktivite eksikliği erkek ve kadınlarda obezite insidansının yükselmesine ve kolorektal kanserle ilgili diğer faktörlerin tetiklenmesine katkıda bulunabilir. Aşırı kilolu veya obez kişilerde, özellikle dolaşımdaki östrojen miktarının artması ve insülin duyarlılığının azalması ile kanser riskinin etkilendiği düşünülmektedir. Ancak aşırı kilo ve obezite ile artan risk sadece enerji alımını değil, metabolik etkinlikteki farklılıkları da ifade etmektedir (De Jong *et al.* 2005; Campbell *et al.* 2007). Çalışmalar, enerjilerini etkin bir şekilde kullanan bireylerin kolorektal kansere yakalanma riskinin daha düşük olduğunu göstermektedir (Boyle and Langman 2000; Hagggar and Boushey 2009).

2.3.5.g. Sigara ve alkol kullanımı

Akciğer kanseri ile sigara içmek arasındaki ilişki açık bir şekilde ortaya konmuştur fakat sigara aynı zamanda kolon ve rektum için de oldukça zararlıdır. Kolorektal kanser vakalarındaki ölümlerin %12'sinden sigaranın sorumlu olduğu gösterilmiştir (Zisman *et al.* 2006). Tütünde bulunan karsinogen maddeler kolon ve rektumda kanser gelişimi riskini arttırmaktadır. Sigara içmek kolorektal kanserin öncül lezyonlarından olan adenomatöz poliplerin oluşumu ve gelişimi arasında önemli bir ilişki vardır (Botteri *et al.* 2008). Uzun süreli sigara kullanan kişilerde kolon ve rektumda daha büyük polipler bulunmuştur. Bulgular aynı zamanda sigaraya erken yaşta başlayan erkek ve kadınlarda kolorektal kanser insidansının yüksek olduğunu göstermektedir (Zisman *et al.* 2006; Tsong *et al.* 2007).

Sigarada olduğu gibi, alkolün de sürekli tüketilmesi kolorektal kanser gelişimini hızlandırmaktadır. Genç yaşlardaki alkol tüketimi kolorektal kanserin başlamasında (Zisman *et al.* 2006; Tsong *et al.* 2007) ve distal kolondaki tümörlerin orantısız artışında (Bazensky *et al.* 2007) önemli bir faktördür. Asetaldehit gibi alkolün reaktif metabolitleri karsinogenik olabilirler. Alkol ile sigaranın birlikte kullanımı, tütünün sebep olduğu DNA'daki spesifik mutasyonların onarımını azaltmaktadır. Çözücü özelliğe sahip olduğu için alkol, diğer karsinogen maddelerin bağırsaktaki hücrelere nüfuz etme kapasitelerini de artırır. Ayrıca, alkolün etkileri lipid peroksidasyonu ve serbest radikallerin oluşumuna aracılık edebilir (Poschl and Seitz 2004; Zisman *et al.* 2006; Haggard and Boushey 2009).

2.3.6. Kolorektal kanserde erken teşhis

Kalın bağırsak karın boşluğunda derin bir yerleşime sahip olduğu için önemli semptomlar görülene kadar kanser gelişimi genellikle anlaşılabilir. Kolorektal kanserin erken evrelerinde semptomlar görülmez. Ancak genellikle ileri evrelerde rektumda kanama, dışkıda kan görme, dışkıda şekil ve renk değişimi, uzun süreli ishal, alt karın bölgesinde sürekli rahatsızlık hissi ve iştah kaybı gibi durumlar kolorektal kanserle ilgili

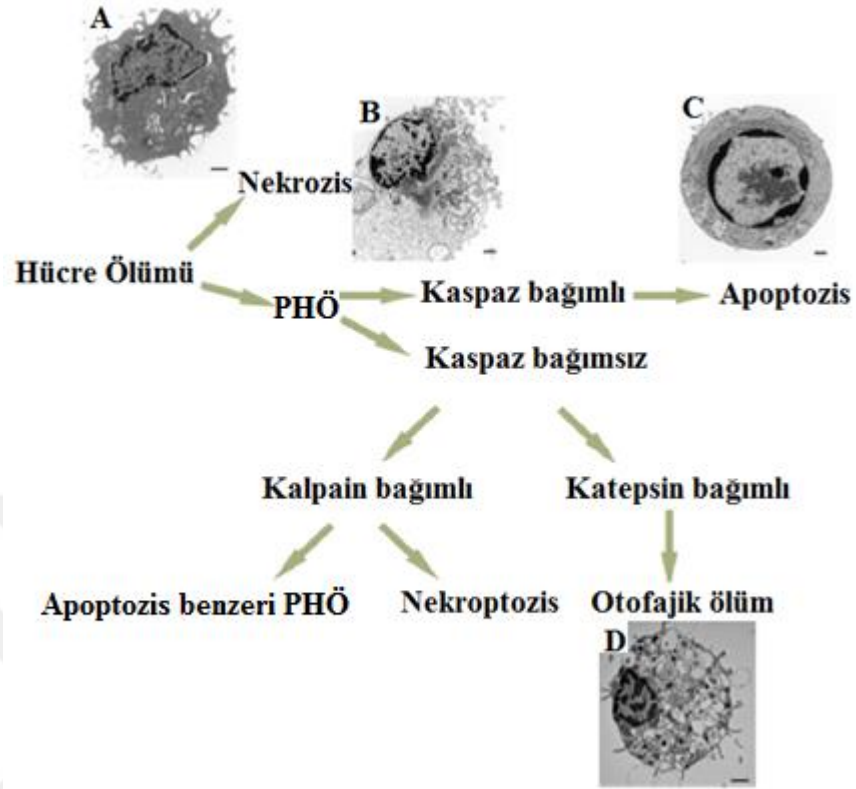
semptomlar olabilir. Fakat bu belirtiler saptandığında kanser ileri evrelere geçmiş olur. Bundan dolayı, ilk kez teşhis konan çoğu hastada tümör büyüklüğü ve hastalık evresi ileri boyutlara ulaşmış ve kanserin metastaz ile diğer organlara da yayılımı gerçekleşmiş olmaktadır. Hastalığın erken teşhisi ve kolonoskopi, sigmoidoskopi gibi tarama testleri bu noktada büyük önem taşır. Kolorektal kanser belirtisi göstermeyen bireylere de, özellikle 50 yaşından itibaren, her yıl dışkıda gizli kan testi ve sigmoidoskopi veya kolonoskopi yaptırılması tavsiye edilmektedir.

2.4. Hücre Ölümü

Canlı ve ölü hücreler arasındaki sayısal dengenin korunması metabolik olaylar açısından büyük önem taşımaktadır. Bu dengenin korunması, yeni hücreler oluşurken bir kısım hücrelerin de ölmesine bağlıdır. Hücre ölümü; morfolojik görünüşe, enzimolojik kriterlere (nükleazla veya proteazlarla gerçekleşmesi) ve fonksiyonel özelliklere göre sınıflandırılabilir (Melino 2001). Genel anlamda hücre ölümü, nekrozis ile veya programlı bir şekilde gerçekleşir (Şekil 2.8).

Nekrozis, hücre membranında hasara neden olan patolojik durumlara maruz kaldığı zaman gerçekleşir. Nekrozis, hücrenin homeostazı sürdürme yeteneğinin bozulması ile başlar. Organeller ve hücrenin tamamı şişer ve patlayarak lizise uğrar. Plazma membranı parçalandığı için lizozomal enzimleri de barındıran hücre içeriği ekstraselüler sıvıya karışır. Bu yüzden nekrotik hücre ölümü, yoğun doku hasarıyla sonuçlanan enflamatuvar yanıtla ilişkilidir.

Apoptozis, normal fizyolojik koşullar altında ve genetik kontrol dahilinde gerçekleşen programlı bir hücre ölümüdür. Genellikle normal hücre yenilenmesi ve doku homeostazı, embriyogenez, immün toleransın başlatılması ve devam ettirilmesi, sinir sisteminin gelişimi ve endokrin bağımlı doku atrofisi esnasında görülür. Apoptoziste hücre membranının bütünlüğü korunur fakat membranda bleb oluşumu gerçekleşir, hücre küçülür ve hücre içeriğini barındıran apoptotik cisimcikler oluşur, kromatin kondensasyonu ve nükleer fragmentasyon gerçekleşir.



Şekil 2.8. Hücre ölümü çeşitleri. PHÖ: programlı hücre ölümü. A) sağlıklı hücre, B) nekrotik hücre, C) apoptotik hücre ve D) otofajik hücre (Nikoletopoulou *et al.* 2013).

Apoptozis benzeri hücre ölümü terimi, morfolojik olarak nükleer kromatin yoğunlaşması gibi apoptotik özellikleri gösteren fakat kaspaz bağımsız olan hücre ölümünü ifade eder (Boujrad *et al.* 2007). Bu tip programlı hücre ölümü mitokondri tarafından kontrol edilir ve başlıca efektörü mitokondriyal AIF proteindir (Jaattela and Tschopp 2003; Lorenzo and Susin 2004). AIF mitokondrinin membranları arasına yerleşmiş olan bir flavoproteindir. AIF, mitokondriyal solunum kompleksi I'in devamlılığı için gereklidir ve NADH oksidoredüktaz ile peroksit süpürme aktivitesi gösterir (Delettre *et al.* 2006). Bu fonksiyonlarına ilaveten, AIF'nin aynı zamanda apoptozis benzeri hücre ölümünde bir indükleyici olduğu birçok deneysel modelde gösterilmiştir (Boujrad *et al.* 2007). İndükleyici aktivitesi, AIF'nin kalpain (Ca^{2+} bağımlı proteazlar) veya katepsinler (lizozomal proteazlar) aracılığı ile çözünür formu olan tAIF'e dönüşerek, mitokondriden ayrılarak serbest kalması ve nükleusa translokasyonu ile ilişkilidir. Serbest kalma sonucunda ya hücre içi Ca^{2+} seviyesi artar ya da yoğun DNA hasarı meydana gelir. Hücre içi Ca^{2+} seviyesinin artması mitokondri

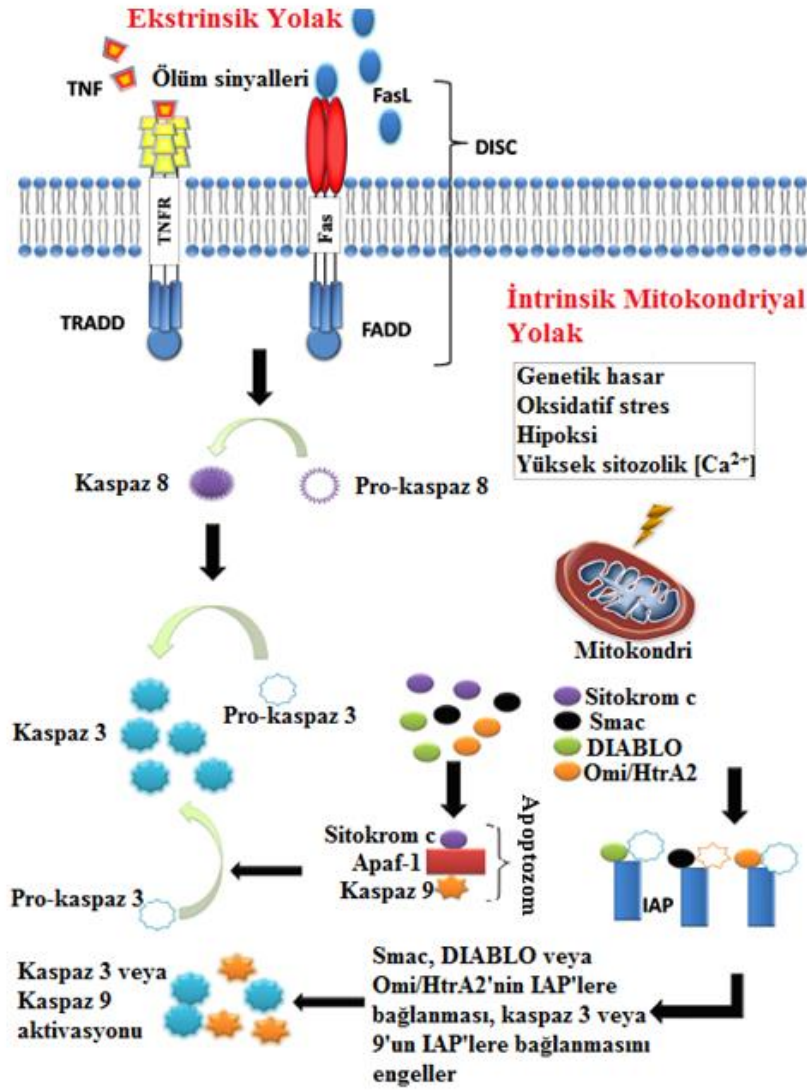
membranının depolarizasyonunu tetikler, membran potansiyeli kaybolur ve sonuçta reaktif oksijen türleri (ROT) oluşur. DNA hasarı ise MNNG (N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin) tarafından tetiklenen nekroptotik hücre ölümünü indükler. Nekroptozis, kaspaz bağımsız programlı hücre ölümüdür ve morfolojik açıdan nekroza benzer. Kalpain bağımlıdır, TNFR ve Fas ligand aktivasyonu sonucunda başlar. Kaspaz bağımsız programlı hücre ölümünün diğer bir çeşidi katepsin bağımlı olan otofajik hücre ölümüdür (Şekil 2.8.D). Sitozol içerisinde çift membranlı bir vezikül, primer lizozomla birleşerek otofagozomu oluşturur ve bu yapı gereksiz organelleri geri dönüşümlü olarak parçalar. Geri dönüştürülen organel bileşenleri hücrede metabolik reaksiyonlarda kullanılır. Otofajik hücre ölümünde apoptotik cisimciklere ve DNA kırıklarına rastlanmaz (Nikoletopoulou *et al.* 2013).

2.4.1. Apoptozis

Apoptozis terimi ilk kez, hücre ölümünün morfolojik olarak farklı bir şeklini tanımlamak için kullanılmıştır (Kerr *et al.* 1972). Apoptozis, gelişme ve yaşlanma süresince dokulardaki hücre sayısını korumak için homeostatik olarak meydana gelir. Aynı zamanda immün reaksiyonlarda veya hücreler hastalık ve zararlı ajanlarla hasara uğradığı zaman bir savunma mekanizması olarak gerçekleşir (Norbury and Hickson 2001). Apoptozisi uyaran pek çok fizyolojik ve patolojik uyaran ve durum olmasına rağmen, aynı uyaranlara cevap olarak dokudaki bütün hücrelerin ölümü gerçekleşmez. Kanser tedavisi için kullanılan radyoterapi veya ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarına neden olur ve bu hasar, p53'e bağlı bir yolakla hücreyi apoptotik ölüme yönlendirebilir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar diğer hücreleri etkilemezken, timositlerde apoptotik ölüme öncülük edebilirler (Elmore 2007).

Apoptozis, hücre yüzeyindeki TNF α (tümör nekrozis faktör- α), Fas (CD95/APO1) ve TRAIL (TNF ilişkili apoptozis indükleyici ligand) gibi ölüm reseptörleri aracılığıyla ekstrinsik bir uyaranla veya mitokondriyal sinyal yolağı aracılığıyla intrinsik bir uyaranla tetiklenir (Şekil 2.9) (Adams 2003; Kroemer *et al.* 2007). Her iki durumda da, kaspazlar olarak bilinen sistein aspartil proteazların aktivasyonu sonucunda mitokondriyal

membranın permeabilizasyonu, kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu gerçekleşir. Bu değişiklikler apoptotik hücrede, piknotik çekirdek, yoğunlaşmış kromatin, fragmentasyona uğramış nükleus, apoptotik cisimcikler, sitoplazma ve organelleri içeren vakuoller gibi farklı ve karakteristik bir morfolojiye neden olurlar (Nikoletopoulou *et al.* 2013).



Şekil 2.9. İntrinsik ve ekstrinsik apoptozis yolları (Wong 2011)

2.4.1.a. Ekstrinsik ölüm reseptörü yolağı

Ekstrinsik ölüm reseptörü yolağı, ölüm sinyalleri (TNF, FasL) ölüm reseptörlerine (TNFR1, Fas) bağlandığı zaman başlar (Hengartner 2001). Bu ölüm reseptörleri, adaptör proteinlerle ve kaspaz-8 gibi sistein proteazlarla etkileşime giren bir intraselüler ölüm bölgesine sahiptirler. Bu intraselüler ölüm bölgeleri TNFR-1 ile ilişkili ölüm bölgesi (TRADD) veya Fas ile ilişkili ölüm bölgesi (FADD) olarak bilinirler (Schneider and Tschopp 2000). Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanması, adaptör protein için bir bağlanma bölgesinin oluşmasına neden olur ve ligand-reseptör-adaptör protein kompleksinin tamamı ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) olarak adlandırılır (O'Brien and Kirby 2008). Daha sonra DISC, pro-kaspaz 8'in aktivasyonunu başlatır. Pro-kaspaz 8 enziminin aktif hali olan kaspaz-8, başlatıcı bir kaspazdır ve diğer kaspazlar ile etkileşime girerek apoptozisi başlatır (Karp 2008).

2.4.1.b. İntrinsik mitokondriyal yolak

İntrinsik yolak hücre içerisinde başlar. Genetik hasar, hipoksi, sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunun aşırı yükselmesi ve şiddetli oksidatif stres, intrinsik mitokondriyal yolağın başlamasını tetikler (Karp 2008). Bu yolak, uyarana bakılmaksızın mitokondriyal permeabilitenin artması ve sitokrom c gibi proapoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınması sonucunda aktifleşir (Danial and Korsmeyer 2004). İntrinsik mitokondriyal yolak, Bcl-2 ailesine ait olan bir grup protein tarafından düzenlenir (Tsujimoto *et al.* 1984). Bcl-2 ailesine ait olan anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki denge, apoptozisin başlama durumunu belirler (Reed 1997). Mitokondriyal intermembran boşluğundan sitoplazmaya salınan diğer apoptotik faktörler; apoptozis indükleyici faktör (AIF), mitokondri kökenli ikinci kaspaz aktivatörü (Smac), DIABLO ve Omi/HtrA2'dir. Sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması, sitokrom c, Apaf-1 ve kaspaz 9'dan oluşan ve apoptozom denen kompleksin oluşumuyla kaspaz 3'ü aktif hale getirir (Kroemer *et al.* 2007). Diğer taraftan Smac/DIABLO veya Omi/HtrA2, IAP'lere bağlanarak kaspaz aktivasyonuna destek olur. Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2 daha

sonra IAP'ler ile kaspaz 3 ve 9'un etkileşiminin bozulmasına öncülük eder (Kroemer *et al.* 2007; LaCasse *et al.* 2008).

İntrinsik ve ekstrinsik yollar kaspaz-3'te birleşirler. Kaspaz-3, nükleer apoptozisten sorumlu olan kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü aktifleştirir. Daha sonra endonükleaz aktivasyonu ile kromozomal DNA'nın degradasyonu ve proteaz aktivasyonu ile nükleer ve hücre iskeleti proteinlerinin degradasyonu ve yeniden düzenlenmesi gerçekleşir. Böylece apoptozisteki tipik morfolojik değişiklikler meydana gelir (Ghobrial *et al.* 2005; Wong 2011).

2.4.2. Apoptotik yolların kontrolü

2.4.2.a. Kaspazlar

Kaspazlar, inaktif öncül enzimler olarak sentezlenen sistein-aspartil proteazların bir sınıfıdır. Sağlıklı hücrelerde bu proteazlar dormant haldedir, ölüm uyarısına cevap olarak aktif hale geçerler. Kaspazlar, apoptotik hücre ölümünde çoğu morfolojik ve biyokimyasal özellikten sorumludur. Memeli apoptotik kaspazları, yapılarına ve fonksiyonlarına göre, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olmak üzere ikiye ayrılır. Başlatıcı kaspazlar, efektör ölüm bölgesi (DED) veya kaspaz takviye bölgesi (CARD) ile etkileşimi sağlayan uzun N-terminal bölgelerine sahip olmalarıyla efektör kaspazlardan ayrılırlar (Hunter *et al.* 2007).

2.4.2.b. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 geni ilk kez B hücreli lenfomada bir proto-onkogen olarak tanımlanmıştır. Ardından Bcl-2'nin fonksiyonel homologu olan CED-9, *C. elegans*'da bir apoptotik represör olarak bulunmuştur (Hengartner and Horvitz 1994). Memelilerde Bcl-2 ailesine ait en az 20 protein tanımlanmıştır. Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, BclB, A1 ve Mcl-1'dir. Pro-apoptotik üyeler ise Bad, Bid, Bim, Puma, Noxa, Bmf, Hrk, Bik, Bax, Bad ve Mtd'dir. Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik üyeleri

mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımını gerçekleştirirken, anti-apoptotik üyeler sitokrom c salınımını inhibe ederler. Anti-apoptotik üyeler farklı sitotoksik etkenlere cevap olarak apoptozisi inhibe ederler. Bcl-2 ailesi üyeleri pro-kaspaz/apoptozom kompleksinin oluşup oluşmamasından sorumludur (Hunter *et al.* 2007). Apoptozom oluşumunu Bcl-2 gibi anti-apoptotik üyeler engellerken, pro-apoptotik üyeler indüklerler (Adams and Cory 2002).

2.4.2.c. IAP'ler

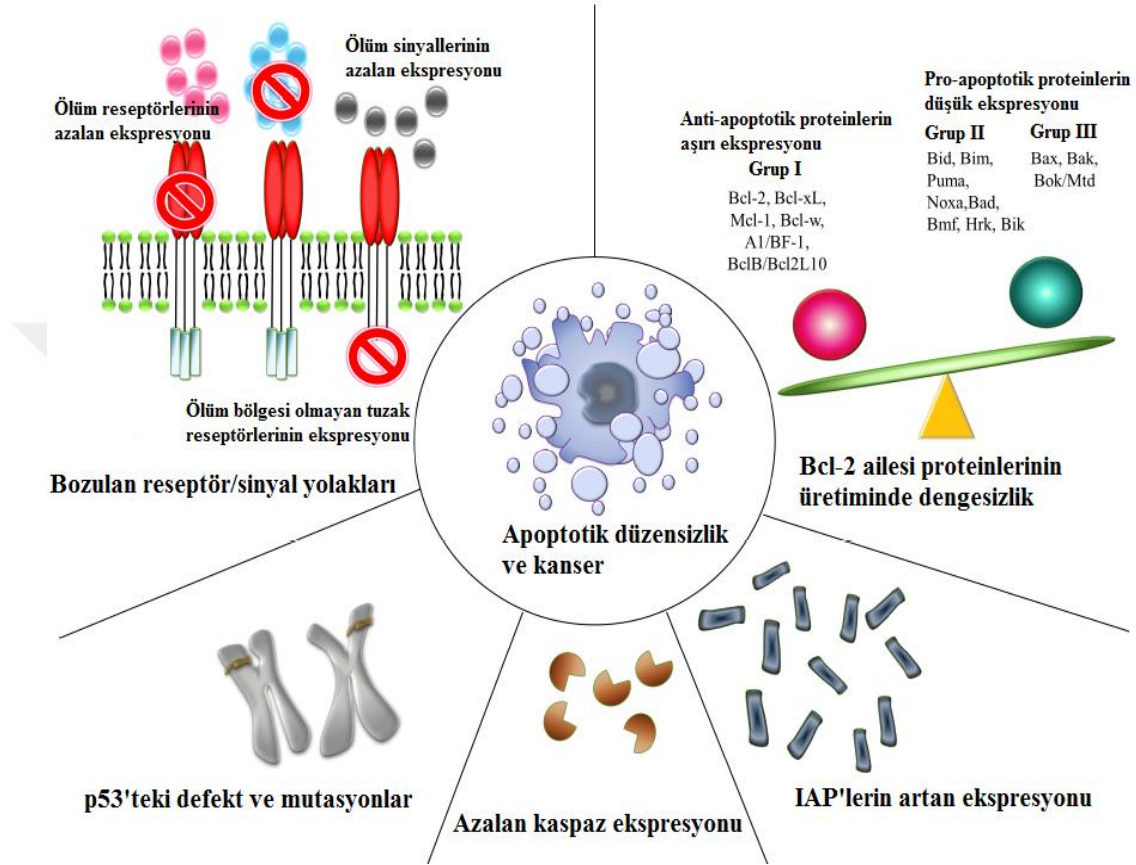
Apoptozis inhibitör proteinleri (IAP), kaspaz kaskadının intrinsik düzenleyicileridir. Hem başlatıcı hem de efektör kaspazların aktivitesini düzenlerler ve bunu yapan tek endojen proteinlerdir. IAP'lerin hücre ölümünde ve insan kanserlerinde önemli role sahip olduğu düşünülmektedir (LaCasse *et al.* 1998). Ölüm reseptörü aktivasyonu, iyonize radyasyon, viral enfeksiyon ve genotoksik hasar gibi çeşitli uyaranlar tarafından indüklenen IAP'ler etkin bir şekilde apoptozisi engeller (Hunter *et al.* 2007). Apoptotik stresin ardından mitokondriden sitozole, olgun Omi/HtrA2, DIABLO ve Smac birlikte salınır ve bunlar IAP'ler ile etkileşime girerek hücreyi apoptotik ölüme yönlendirir (Hegde *et al.* 2002; Verhagen *et al.* 2002).

2.4.3. Apoptozis ve karsinogenez

Normal bir hücrenin malignant hale dönüşümünde, hücre ölümünden kaçınma en önemli değişikliklerden birisidir (Hanahan and Weinberg 2000). Bu yüzden düşük apoptozis oranı veya apoptozise direnç karsinogenezde çok önemlidir. Malignant bir hücrenin apoptozise direnç kazanmasının pek çok yolu vardır. Apoptozisten kaçınma genel olarak şu nedenlerden kaynaklanır;

1. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki dengenin bozulması,
2. Kaspazların fonksiyonlarında azalma,
3. Bozulmuş ölüm reseptörü sinyal mekanizması.

Hücresinin apoptozisten kaçınması ve karsinogenez arasındaki ilişki Şekil 2.10'da özetlenmiştir (Wong 2011).



Şekil 2.10. Apoptozisten kaçınma ve karsinogenez mekanizması (Wong 2011)

2.5. Sinyal Yolları

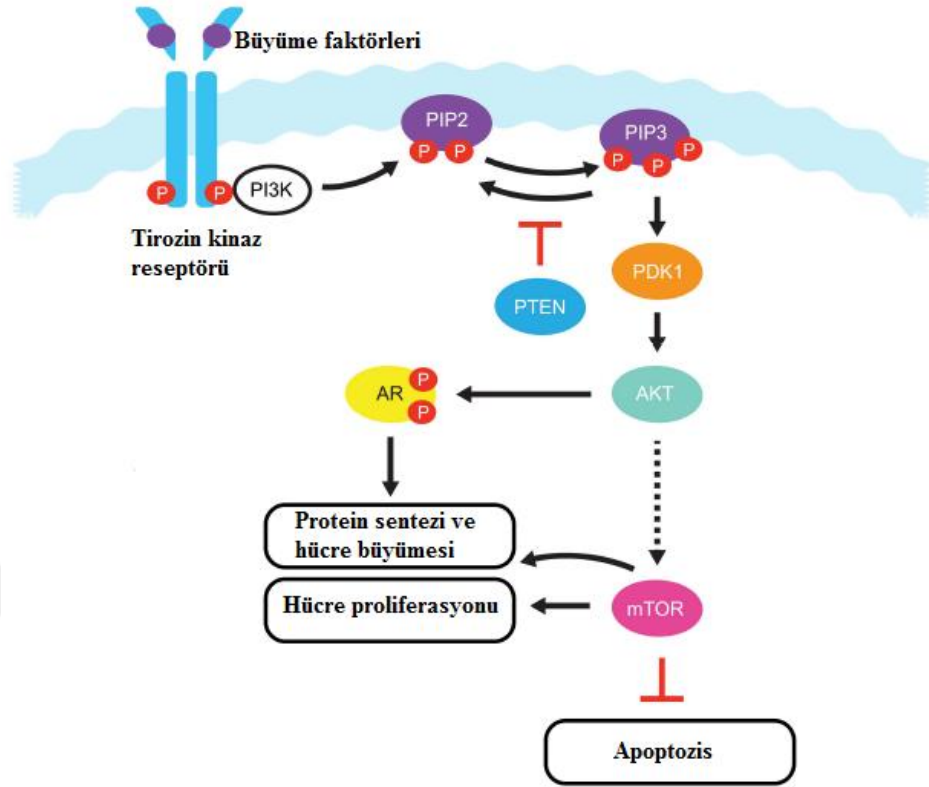
Anti-kanser ilaçlar, farklı sinyal yollarını kullanarak kanserli hücreleri apoptozis ile hücre ölümüne yönlendirirler. Apoptozisten kaçınma kanser hücrelerine ait bir özelliktir ve bu yüzden hücreleri apoptoza yönlendiren ilaç ve etken maddeler kanser tedavisi açısından büyük potansiyele sahiptir. Yeni anti-kanser teröpatiklerinin merkezinde apoptozisin olması gerektiği gösterilmiştir (Elmore 2007). Çoğu kanser türünde programlı hücre ölümünden kaçınmak için farklı yollar işlevsel olduğu için, birkaç sinyal iletim yolağının birlikte hedeflenmesi yeni anti-kanser teröpatiklerinin keşfi ve geliştirilmesinin önünü açmaktadır.

AKT/mTOR yolağı aynı zamanda tümöröenez için de önemli olan hücre proliferasyonu, hücre metabolizması, anjiyöenez, hücre döngüsü, apoptozis ve otofaji gibi birçok hücresele fonksiyonu düzenler (Hennessy *et al.* 2005, Courtney *et al.* 2010). Son yıllarda, AKT/mTOR sinyal kaskadı ile birlikte apoptozisin mitokondriyal yolağına bağlanan küçük molekül inhibitörlerinin keşfedilmesi için büyük çaba harcanmaktadır.

AKT, üç izoformu olan ve protein kinaz B olarak da bilinen bir serin/treonin kinazdır (Nelson *et al.* 2007). AKT-1 ve AKT-2 pek çok doku tipinde eksprese edilir ve hücre proliferasyonunun artması, hayatta kalım ve glukoz metabolizmasına katkıda bulunur (Tokunaga *et al.* 2008). Onkogenik ve apoptotik sinyal yolaklarına özellikle AKT-1 aktif olarak katılır. AKT-3 ise mitokondriyal biyöeneziste rol oynar (Wright *et al.* 2008) ve özellikle beyinde yoğun olarak eksprese edilir (Easton *et al.* 2005; Tschopp *et al.* 2005; Assinder *et al.* 2009).

Büyüme faktörünün tirozin kinaz reseptörüne bağlanması, PI3K-reseptör kompleksini aktive eder (Şekil 2.11). Aktifleşen PI3K, PIP2'yi PIP3'e dönüştürür. PIP3, AKT'nin PDK1 aracılığıyla fosforillenmesini sağlar. Fosforillenen AKT, birçok yolak proteinin aktifleşmesini sağlar. AKT'nin en önemli hedeflerinden birisi hücrenin büyümesi, proliferasyonu ve hayatta kalmasının da dahil olduğu pek çok hücresele fonksiyonda görevli olan mTOR'dur.

mTOR (memelilerde rapamisinin hedefi), bir serin/treonin protein kinazdır. Büyüme faktörleri, besin ve enerji durumuna bağlı olarak sinyal iletimi ile hücre büyümesi ve proliferasyonunu düzenler (Wullschleger *et al.* 2006; Tsang and Zheng 2007). mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki farklı fonksiyonel mTOR kompleksi vardır. mTORC1 rapamisine karşı hassastır, mTORC2 ise rapamisine dirençlidir (Kim *et al.* 2002; Jacinto *et al.* 2004).

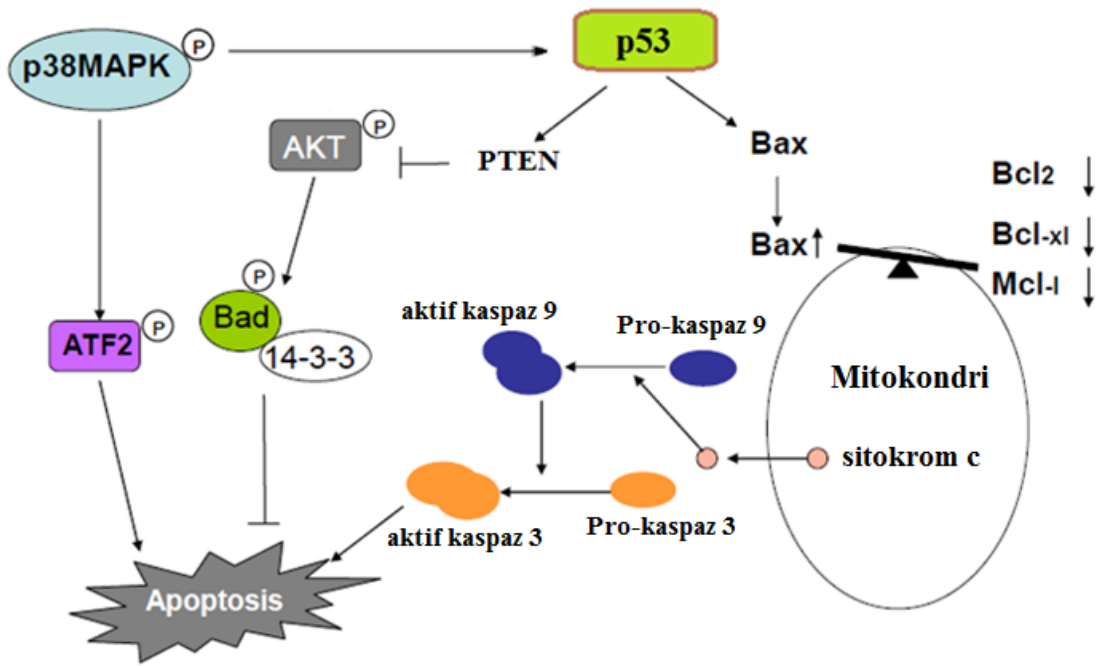


Şekil 2.11. PTEN ile AKT/mTOR yolağı arasındaki ilişki (Phin *et al.* 2013).

Aktif haldeki AKT, aynı zamanda androjen reseptörü (AR) ile etkileşerek, prostat kanserinde AR sinyal yolağının aşırı aktivasyonuna neden olur. PTEN (fosfat ve tensin homologu), insanlarda 10q23.31 kromozom yerleşimine sahip olan PTEN geni tarafından kodlanan ve hem lipid hem de protein fosfataz aktivitesine sahip olan bir proteindir. PTEN genindeki mutasyonlar, pek çok kanser türünün gelişmesinde önemli bir basamağı temsil eder. PTEN tümör supresör fonksiyona sahiptir ve yolağı negatif yönlü düzenler. PIP3'den fosfat grubunu çıkararak onu PIP2'ye geri dönüştürür. PTEN kaybı, AKT'nin aşırı aktivasyonuna neden olur ve bunun sonucunda kontrolsüz hücre çoğalması, apoptozdan kaçınma ve tümör anjiyogenezi meydana gelir (Phin *et al.* 2013).

p38 MAPK, mitojen-aktiviteli protein kinazların bir üyesidir. Apoptozisin düzenlenmesinde, hücre döngüsünün durdurulmasında, büyüme inhibisyonu ve farklılaşmada önemli rol oynar (Cuadrado and Nebreda 2010). Çoğu kemoterapötik

ajanın, apoptozisi indüklenmek için p38 aktivitesi göstermesi gereklidir (Olson and Hallahan 2004). p38MAPK, ATF2'yi fosforilleyerek aktifleştirir ve hücreyi apoptoza yönlendirir. p38MAPK ve p53 birlikte hareket eder (Şekil 2.12). p53, ya PTEN'i etkileyip AKT'yi baskılayarak ya da ölüm reseptörü ile Bax, Bcl-2, Bcl-xl ve Mcl-1 gibi mitokondriyal yolak bileşenlerini etkileyerek apoptozisin düzenlenmesinde rol alır (Brady *et al.* 2011). PTEN ekspresyon düzeyinin düşük olması, AKT'nin Bad'ı fosforillemesine ve apoptozun baskılanmasına neden olur. Mitokondriyal yolak bileşenleri ise kaspaz-3 ve -9'un aktif hale geçmesine neden olur ve apoptozu tetikler. p53 direkt olarak mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunu (MOMP) etkileyerek de apoptozise aracılık eder (Green and Kroemer 2009; Vaseva *et al.* 2012).



Şekil 2.12. p38MAPK, Akt, PTEN ve p53'ün apoptozisteki rolleri (Neoh *et al.* 2012 ve Oren 2003'den uyarlanmıştır).

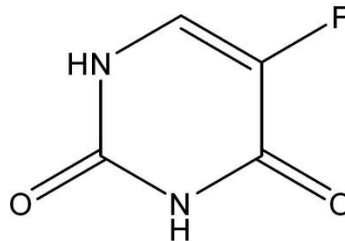
2.6. 5-Fluorouracil (5-FU)

Antimetabolit ilaçlar, temel biyosentetik süreçleri veya DNA ve RNA'nın da dahil olduğu makromoleküllerin normal fonksiyonlarını inhibe ederek etki gösterirler. 5-

Fluorouracil (5-FU) fluoropirimidin formda olan bir antimetabolit kemoterapi ilacıdır. Fluoropirimidinler, 1950'lerde rat hepatomlarının urasil primidinlerini normal dokulardan daha hızlı kullanmasının gözlemlenmesi ve bunun sonucunda urasil metabolizmasının antimetabolit kemoterapi için potansiyel bir hedef olabileceği düşüncesiyle geliştirilmiştir (Longley *et al.* 2003).

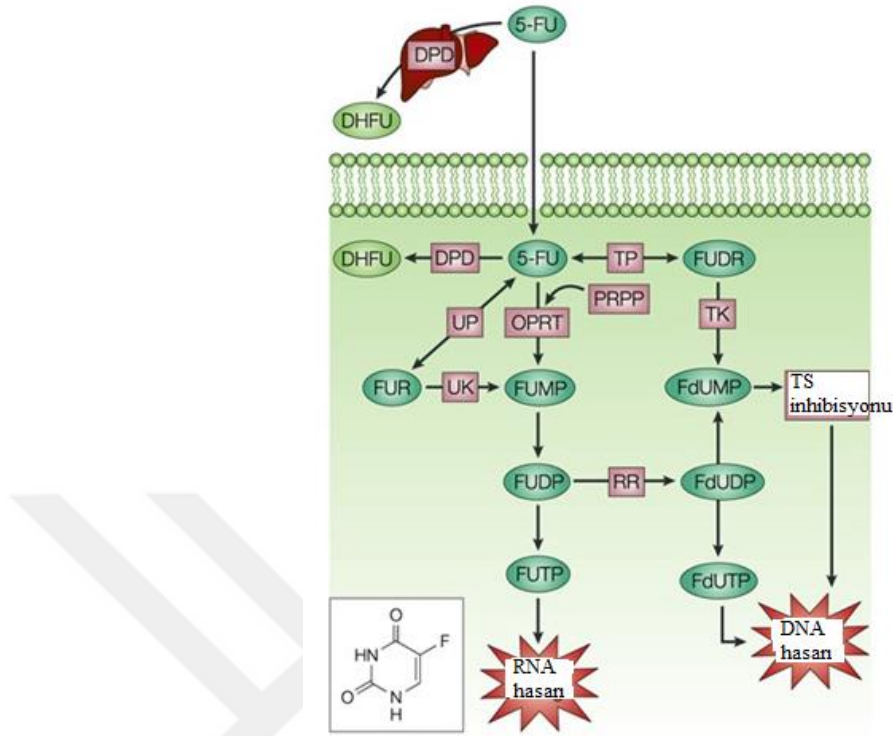
5-Fluorouracil (5-FU) geniş spektrumlu bir aktiviteye sahiptir ve tek başına veya kemoterapötik ajanlarla birlikte kombine olarak pek çok kanser türüne karşı (kolon, pankreas, yumurtalık, karaciğer, beyin, meme vb.) yaygın olarak kullanılmaktadır. 5-FU'nun sitotoksik aktivitesi, fluoronükleotidlerin DNA ve RNA'ya yanlış bağlanması ve nükleotid sentez enzimi olan timidilat sentazın (TS) inhibisyonu ile gerçekleşir.

5-FU'nun diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyonu, meme ve baş-boyun kanserlerinde kemoterapiye yanıt ve sağkalım oranlarını artırır, ancak 5-FU en iyi etkiyi kolorektal kanser üzerinde gösterir (Longley *et al.* 2003). 5-FU bazlı kemoterapi, evre III kolorektal kanserli hastalarda sağkalım oranını yükseltir. Bununla birlikte, ileri evre kolorektal kanserli hastalarda ilk basamak tedavi olarak 5-FU bazlı kemoterapiye yanıt oranları sadece %10-15 düzeyindedir (Johnston and Kaye 2001). 5-FU ile Irinotecan ve Oxaliplatinin kombinasyonu gibi daha yeni kemoterapiler, ileri evre kolorektal kanser vakalarında yanıt oranlarını %40-50 seviyelerine çıkarabilir (Giacchetti *et al.* 2000; Douillard *et al.* 2000). Ancak bu gelişmelere rağmen, yeni tedavi stratejilerine acilen ihtiyaç duyulmaktadır.



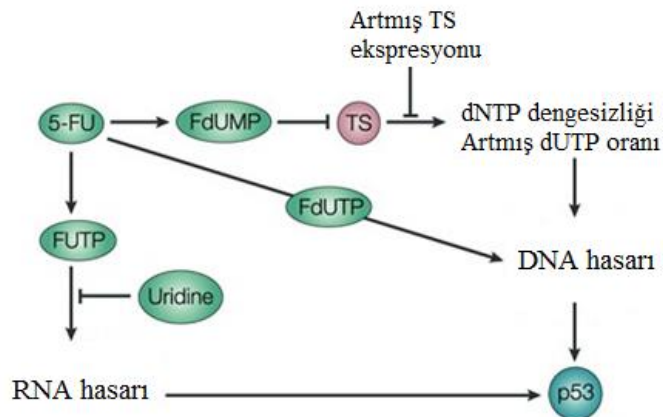
Şekil 2.13. 5-Fluorouracilin kimyasal yapısı

5-FU, C-5 pozisyonunda hidrojen yerine bir fluorin atomu bulunduran urasil analogudur (Şekil 2.13). Hücre içine urasilin kullandığı kolaylaştırılmış taşıma mekanizmasını kullanarak girer. 5-FU, hücre içinde fluorodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), fluorodeoksiüridin trifosfat (dUTP) ve fluoroüridin trifosfat (FUTP) gibi birçok aktif metabolite dönüştürülür (Şekil 2.14). Bu aktif metabolitler RNA sentezini ve TS'nin aktivitesini bozarlar. 5-FU aktivasyonunun ana mekanizması, 5-FU'nun hücre içinde fluorouridin monofosfata (FUMP) dönüşmesidir. Bu dönüşüm ya direkt olarak fosforibozil pirofosfat (PRPP) kofaktörlüğünde orotat fosforiboziltransferaz (OPRT) ile ya da dolaylı olarak sırasıyla üridin fosforilaz (UP) ve üridin kinaz (UK) aracılığıyla fluoroüridin (FUR) üzerinden gerçekleşir. Daha sonra FUMP, fluoroüridin difosfata (FUDP) fosforillenir. FUDP ise ya aktif metabolit olan fluoroüridin trifosfata (FUTP) fosforillenir ya da ribonükleotid redüktaz (RR) tarafından fluorodeoksiüridin difosfata (FdUDP) dönüştürülür. FdUDP ise sırasıyla fosforillenerek veya defosforillenerek aktif metabolitler olan FdUTP ve FdUMP'yi oluşturur. Diğer bir aktivasyon yolağı ise timidin fosforilazın (TP), 5-FU'nun fluorodeoksiüridine (FUDR) dönüşümünü katalizlemesiyle gerçekleşir. FUDR ise timidin kinaz (TK) ile FdUMP'ye fosforillenir. Dihidroprimidin dehidrogenaz (DPD) aracılığıyla 5-FU'nun dihidrofluorouracile (DHFU) dönüşmesi normal ve tümör hücrelerinde 5-FU katabolizmasının oran sınırlayıcı basamağıdır. Uygulanan 5-FU'nun %80 kadarı DPD tarafından karaciğerde parçalanır (Diasio and Harris 1989; Longley *et al.* 2003).



Şekil 2.14. 5-Fluorouracilin metabolizması (Longley *et al.* 2003)

5-FU, p53'ü fluorürüridin trifosfatın (FUTP) RNA ile birleşmesiyle, fluorodeoksiürüdin trifosfatın (FdUTP) DNA'ya katılmasıyla ve timidilat sentazın (TS) fluorodeoksiürüdin monofosfat (FdUMP) aracılığı ile inhibe edilmesi sonucu DNA hasarının oluşmasıyla aktive edebilir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. p53'ün 5-fluorouracil aracılığıyla aktivasyonu (Longley *et al.* 2003)

p53, CDKN1A ve GADD45 α gibi genleri transkripsiyonel olarak aktif hale getirerek DNA bütünlüğünü korur. CDKN1A ve GADD45 α genlerinin ürünleri, DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünün durmasını indükler (Zhan *et al.* 1998). Ancak hücre duruma ve DNA hasarının niteliğine bağlı olarak p53, FAS (CD95/APO1) ve Bax gibi pro-apoptotik genleri indükleyerek ve anti-apoptotik Bcl2 genini aşağı yönlü düzenleyerek hasarlı hücreleri apoptoza yönlendirir ve bu hücrelerin yok edilmelerini tetikler (Miyashita *et al.* 1994; Petak *et al.* 2000). *In vitro* çalışmalar p53 fonksiyon kaybının, 5-FU'ya olan hücre duyarlılığı azalttığını rapor etmektedir (Bunz *et al.* 1999). Kolon kanseri hücre hattında TP53 veya Bax'ın her iki allelinin dizilim bozukluğu olduğu durumda 5-FU tarafından indüklenen apoptoza karşı hücrelerin çarpıcı şekilde dirençli olduğu gözlenmiştir (Zhang *et al.* 2000; Longley *et al.* 2003).

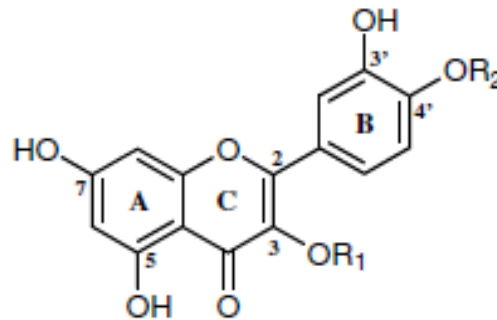
5-FU, hücre döngüsünün S fazını inhibe eder, böylece DNA sentezi engellenir ve hücre ölümü tetiklenir (Viguiet *et al.* 2005; Li *et al.* 2008). Literatür bilgileri, kolon kanseri tedavilerinde ya geleneksel kemoterapi ilaçları (Sakamoto and Maeda 2010) ya da genistein, geraniol (Du *et al.* 2005; Srimuangwong *et al.* 2012) ve curcumin (Sun *et al.* 2008) gibi toksik olmayan bitkisel kaynaklı maddeler ile kombine kullanımın bir kemoterapi ilacı olarak 5-FU'nun etkinliğini artırdığını göstermektedir (Longley *et al.* 2003). 5-FU ile birlikte farklı ilaç veya etken maddelerin kombinasyonu, toksisite ve yan etkilerin azaltılmasına ve sağkalımı arttırmaya katkıda bulunabilir.

2.7. Bitkisel Etken Maddeler

2.7.1. Kuersetin

Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) sekonder metabolit olarak bitkilerde bulunan tipik bir flavonoiddir (Şekil 2.16). Flavonoidler, difenilpropan temel iskeletini (C₆-C₃-C₆) içeren polifenolik bileşiklerdir ve bitki hücrelerinin mikroorganizmalara, böceklere ve UV ışınlarına karşı korunmasında önemli rol oynarlar (Harborne and Williams 2000). Hücre kültürü, hayvan ve insan popülasyonu çalışmalarından elde edilen veriler flavonoidlerin aynı zamanda insan ve hayvan sağlığı için yararlı olduğunu da

göstermektedir. Sebzeler, meyveler ve tıbbi bitkiler gibi besin kaynaklarında bol miktarda bulunan flavonoidler, antioksidan, östrojenik düzenleyici ve antimikrobiyal ajanlar olarak etki gösterirler (Aşkın 2009). Aynı zamanda flavonoidlerin kanser önleyici olduğuna dair kanıtlar da mevcuttur (Knekt *et al.* 1997; Neuhausser 2004). Flavonoidler, kinazları inhibe etme, transkripsiyon faktörlerini azaltma, hücre döngüsünü düzenleme ve apoptotik hücre ölümünü indüklemeye suretiyle hücre transformasyonu, invazyon, metastaz ve anjiyogenezin de dahil olduğu karsinogenezin ilerlemesini pek çok noktada engelleyebilirler (Birt *et al.* 2001). Dört binden fazla flavonoid vardır ve bunlar flavonlar, flavonoller, kateşinler, izoflavonlar, antosiyaninler ve kalkonlar gibi alt sınıflarda kategorize edilirler. Kuersetin bu alt sınıflardan flavonollerin bir üyesidir ve meyve, sebze, tohum ve çay gibi bitkisel ürünlerde bol miktarda bulunduğu için insan diyetinde önemli bir yere sahiptir (Murakami *et al.* 2008). Günlük kuersetin alım miktarı normal bir diyetle ortalama 25 mg kadardır.



Şekil 2.16. Kuersetinin kimyasal yapısı (Leela and Saraswathy 2013)

Kuersetinin kanser önleyici etkisi ve moleküler mekanizması ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Örneğin kuersetin, akut lenfoblastik lösemi ve miyeloid lösemi hücrelerinin büyümesini inhibe eder (Kang and Liang 1997). Aynı zamanda, hücre döngüsünün ilerlemesini G1-S sınırında durdurarak insan mide ve kolon kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe edici etkileri de bildirilmiştir (Suh *et al.* 2010). Kuersetin, potansiyel bir anti-kanser ajanı olarak çok ilgi çekmektedir. Kuersetin, moleküler seviyede H-ras, c-myc ve K-ras gibi onkogenlerin aşağı yönlü düzenlenmesini (Avila *et al.* 1994; Ranelletti *et al.* 2000) veya p21WAF1 ve p27KIP1

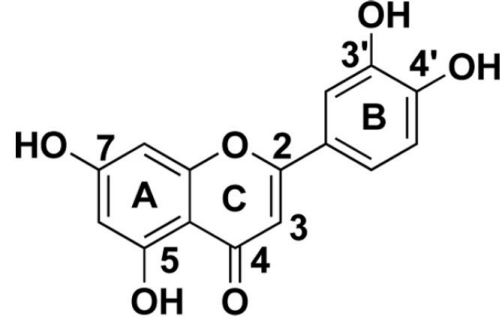
gibi hücre döngüsünü kontrol eden proteinlerin yukarı yönlü düzenlenmesini sağlayarak etki gösterir (Casagrande and Darbon 2001).

Kuersetin kemoprevantif ve anti-genotoksik etkilerini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Kanser önleyici etkisinin yanı sıra antioksidatif aktiviteye sahiptir ve ayrıca karsinogenezi aktive eden enzimlerin inhibisyonu, sinyal iletim yollarının modifikasyonu ve reseptörler ile diğer proteinlerin etkileşiminin de dahil olduğu birçok farklı mekanizmayı etkiler (Shih *et al.* 2000; Moon *et al.* 2006). Aril hidrokarbon reseptörü (AhR) (Fukuda and Ashida 2008), androjen reseptörü (Xing *et al.* 2001), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) (Kim *et al.* 2005) ve ölüm reseptörü (DR) (Chen *et al.* 2007) gibi çok sayıda hücre reseptör kuersetinin kanser önleyici aktivitesinden etkilenir. Kuersetin çok hedeflidir. Örneğin kuersetin, DNA fragmentasyonunu, Bax'ın up-regülasyonunu ve anti-apoptotik Bcl-2'nin posttranslasyonel modifikasyonunu tetikler (Duraj *et al.* 2005). Kuersetin TRAIL ile indüklenen apoptozu artırır (Psahoulia *et al.* 2007). Aynı zamanda mitokondriyal yolağın aktivasyonuna ve hayatta kalma sinyallerinin engellenmesine neden olarak apoptozu indükler (Granado-Serrano *et al.* 2006). Yapılan bir çalışma ile kuersetinin rat kolon kanseri modelinde anormal kript oluşumlarını azalttığı gösterilmiştir (Volate *et al.* 2005). Bu farklı antitümör etkileri kuersetini yeni ve etkili olan kanser önleyici ve tedavi edici ajanların geliştirilmesinde öncü bir bileşik yapmaktadır.

2.7.2. Luteolin

Luteolin, 3',4',5,7-tetrahidroksiflavon, bir flavonoiddir. Flavonoidlerin flavon grubuna ait olan luteolin, C₆-C₃-C₆ yapısındadır ve iki tane benzen halkası (A, B), bir tane oksijen içeren (C) halka ve 2-3 çift karbon bağına sahiptir. Luteolin aynı zamanda 5, 7, 3', ve 4' pozisyonlarındaki karbonlarda hidroksil grupları bulundurur (Şekil 2.17) (Ross and Kasum 2002). Hidroksil grupları ve 2-3 çift bağı, luteolinin biyokimyasal ve biyolojik aktivitesi ile ilgili olduğu için önemli yapısal özelliklerdir (Chan *et al.* 2003). Diğer flavonoidlerde olduğu gibi, luteolin de bitkilerde genellikle glikolize edilir ve glikozid absorpsiyon esnasında serbest luteoline hidrolize edilir (Hempel *et al.* 1999).

İntestinal mukozadan geçerken luteolinin bir kısmı glukuronide dönüştürülür (Shimoi *et al.* 1998). Luteolin ısıya dayanıklıdır ve pişirmeden kaynaklanan kayıplar nispeten düşüktür (Le Marchand 2002).



Şekil 2.17. Luteolinin kimyasal yapısı

Luteolinin HT-29 kolon kanseri hücrelerinde kaspaz 3'ü aktive ederek apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Attoub *et al.* 2011). Başka bir çalışmada ise kolon kanserinde luteolinin Bax, Bcl-2 ve Kaspaz 3'ün ekspresyonlarını düzenleyerek apoptotik indükleyici olduğu *in vitro* ve *in vivo* olarak belirlenmiştir (Lim *et al.* 2007). Diğer taraftan caco-2 kolon kanseri hücrelerinde luteolin DNA hasarına karşı hareket etmektedir ve DNA onarım mekanizmasını aktif hale getirmektedir (Ramos *et al.* 2010).

Kuersetin ve luteolin gibi flavonoidler meyve ve sebzelerde bulunurlar ve potansiyel antikanser ajanları oldukları için çok ilgi çekicidirler. Kanser önleyici etkileri, antioksidatif aktiviteye sahip olmalarına, karsinogenezi aktive eden enzimleri inhibe etmelerine, sinyal iletim yolları üzerinde modifiye edici etkiye sahip olmalarına ve reseptörler ve diğer proteinlerle etkileşimlerine bağlanmaktadır (Canivenc-Lavier *et al.* 1996; Shih *et al.* 2000; Moon *et al.* 2006; Murakami *et al.* 2008).

2.8. Bitki Örnekleri

2.8.1. *Achillea biebersteinii* Afan.

Achillea cinsi yaklaşık 85 tür içerir ve bu türlerin çoğu Avrupa ve Orta Doğu'ya endemiktir. Türkiye florasında 42 *Achillea* türü mevcuttur ve bunların 23'ü endemiktir (Skocibusic *et al.* 2004). Farklı *Achillea* türlerinin antimikrobiyal, antioksidan, antienflamatuvar, spazmolitik, antidiyabetik, antiülser, antitümör, antialerjik, koleretik ve hepatoprotektif aktivitesi ve sitotoksik etkileri rapor edilmiştir (Iscan *et al.* 2006; Tabanca *et al.* 2011). *Achillea* türlerinin uçucu yağları ile yapılan fitokimyasal çalışmalarda seskiterpen laktonlar, flavonoidler, alkaloidler, lignanlar, triterpenler, alkamidler ve poliasetenler tanımlanmıştır. Terpenoidler (1,8-sineol, kamfor, bomeol, pinenler, artemisia keton, santolina alkol, farnesen, karyofilen ve oksitleri, α -bisabolol ve oksitleri, kubeben, germakrenler, eudesmol, γ -gurjunen, γ -muurolen ve kamazulen) *Achillea* uçucu yağlarının temel bileşenleridir (Si *et al.* 2006; Nemeth and Bernath 2008; Tabanca *et al.* 2011).

Achillea türleri bazı ilgi çekici özelliklere sahiptir ve kozmetik ve koku sanayiinde ayrıca bitki koruma gibi özel amaçlarla tarımda kullanılırlar (Senatore *et al.* 2005). Bazı *Achillea* türleri hemoroid ve yara iyileştirici olarak halk tıbbında etnofarmakolojik amaçlarla kullanılmaktadır. Ülkemizde *Achillea* türlerinden hazırlanan bitkisel çaylardan idrar söktürücü ve emenagog etkilerinin yanı sıra ishal ve şişkinlik sebebi ile meydana gelen karın ağrılarına karşı tedavide de sıklıkla faydalanılmaktadır (Guner *et al.* 2000; Barış *et al.* 2006).

Achillea biebersteinii Afan. çok yıllık bir bitkidir (Şekil 2.18). Gövdesi tüylü, 30-60 cm boyunda, yaprakları 10 cm kadar ve çiçeklenme dönemi Nisan-Mayıs aylarıdır. *A. biebersteinii* yöresel olarak Sarıçiçek ismiyle adlandırılır ve halk tıbbında karın ve mide ağrıları, yaralanma ve kanser tedavisinde kullanılır (Sezik *et al.* 2001).

A. biebersteinii'nin taksonomisi şu şekildedir (Davis 1975);

Alem : *Plantae*

Altalem : *Tracheobionta*

Bölüm : *Magnoliophyta*

Sınıf : *Magnoliopsida*

Altsınıf : *Asteridae*

Takım : *Asterales*

Aile : *Asteraceae*

Cins : *Achillea*

Tür: *Achillea biebersteinii* Afan.



Şekil 2.18. *Achillea biebersteinii* Afan.

2.8.2. *Pistacia eurycarpa* Yalt.

Pistacia cinsi, *Anacardiaceae* familyasının küçük ağaç ve çalılardan oluşan ve en az 13 tür içeren önemli bir üyesidir. *Pistacia* türleri Akdeniz ve Kuzey Afrika ülkeleri için çok değerli bitkilerdir. Kuraklığa dayanıklı oldukları için yıllık yağış miktarı düşük olan bölgelerde yetişebilirler. Türkiye, yaklaşık 66 milyon yabani fıstık ağacını da içeren çok büyük bir *Pistacia* L. germplasm kaynağına sahiptir (Kuru ve Özşabuncuoğlu 1990).

Ülkemizde en yaygın olarak *P. terebinthus* L., *P. eurycarpa* Yalt. ve *P. atlantica* Desf. yabancı türleri bulunmaktadır. Bu yabancı türler yöresel tüketimde, yağ ve sabun yapımında kullanılmaktadır (Kafkas *et al.* 2002). *Pistacia* türlerinin menengiç meyvelerinden elde edilen uçucu yağların antibakteriyel, antifungal, antiproliferatif ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Bazı *Pistacia* türleri antiaterojenik, hipoglisemik, antienflamatuvar, antitumöjenik ve antikanser aktivitelere sahiptir (Orhan *et al.* 2006; Balan *et al.* 2007; Gardeli *et al.* 2008; Derwich *et al.* 2010; Giaginis and Theocharis 2011).

Pistacia eurycarpa (Şekil 2.19) bitkisi, ülkemizde özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Siirt ve Mardin civarlarında, ayrıca Doğu Anadolu Bölgesi'nde Bitlis ve Hakkari çevrelerinde yetişmektedir.

P. eurycarpa'nın taksonomisi (Davis 1967) şu şekildedir;

Alem : *Plantae*

Altalem : *Tracheobionta*

Bölüm : *Magnoliophyta*

Sınıf : *Magnoliopsida*

Altsınıf : *Rosidae*

Takım : *Sapindales*

Aile : *Anacardiaceae*

Cins : *Pistacia*

Tür: *Pistacia eurycarpa* Yalt.



Şekil 2.19. *Pistacia eurycarpa* Yalt.

Pistacia eurycarpa üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda bu bitkinin yağ asitleri kompozisyonu bakımından zengin olduğu rapor edilmiştir. *P. eurycarpa* uçucu yağının ana bileşenleri metil oleat (%17,7), metil palmitat (%16,7), metil stearat (%4,3), metil palmitoleat (%2,0), 11-ekosenik asit metil ester (%1,4) ve heptadekan-(8)-karbonik asit (%1,3) olarak belirlenmiştir (Kafkas *et al.* 2007). Aynı zamanda bu bitkiden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal ve antifungal aktiviteye sahip olduğu, uçucu yağında ise temel bileşenlerin α -pinen (%66) ve β -pinen (%4,9) olduğu gösterilmiştir (Demirci *et al.* 2001).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmalarda kullanılan araç ve gereçler

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan alet ve cihazlar

Cihaz	Marka / Model
İnverted mikroskop	Olympus CKX41
Karbondiyoksitli etüv	Nuaire Autoflow IR 5510-E
Biyogüvenlik kabini	Bilser
Laminar hava akımlı kabin	Biokim
Light Cycler Gerçek Zamanlı PCR	Qiagen Rotor-Gene Q
Buzdolabı, 2-8°C	Arçelik
Derin Dondurucu, -20°C	Arçelik
Derin Dondurucu, -86°C	Nuaire Glacier NU-9668GC
Hassas Terazi	Denver Instrument SI-234
Otomatik pipetler	Eppendorf
Manyetik Karıştırıcı	IKA C-MAG HS-7
pH metre	Thermo Scientific Orion-3 Star
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Universal 320R
Spin vortex	Scientific Industries Vortex Genie-2
Elektroforez cihazı	Bio-Rad PowerPac-Basic
Western blot transfer cihazı	Bio-Rad
Spektrofotometre	Jasco UV-Vis V-670
Mikroplaka ELISA okuyucu	Spectra Max-Spectra Drop
Isıtmalı su banyosu	Memmert WNB22
Vakumlu etüv	p-selecta Vaciotem-TV
Otoklav	HMC Hırayama Hiclave HV-50L
Çalkalamalı inkübatör	Lab Companion SI-600
Elektroforez tankı	BioRad Mini Protean
Görüntüleme Cihazı	Carestream Medical XRay Processor
Buz makinası	Hoshizaki Ice Maker FM-80EE
Ultra saf su cihazı	Human Power I Scholar-UV
Termal cycler	SensQuest Labcycler
Sokslet cihazı	Electrochemical
Evaporatör	IKA RV-10

Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kimyasal	Marka
5 Fluorouracil (5-FU)	Deva
Kuersetin	Sigma-Aldrich
Luteolin	Sigma-Aldrich
DMEM	Lonza
Penisilin/Streptomisin	Lonza
Fetal Bovin Serum (FBS)	Lonza
Tripsin-EDTA çözeltisi	Sigma-Aldrich
DPBS	Lonza
Tripan blue boyası	Sigma-Aldrich
Tris HCl	Sigma-Aldrich
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Primerler	İnvitrogen
Antibodyler	Cell Signaling
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
KCl	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
HCl	Sigma-Aldrich
Tween-20	Merck
Bromfenol mavisi	Merck
β -merkaptoetanol	Merck
NP-40	Merck
EDTA	Merck
EGTA	Merck
β -gliserofosfat	Merck
NaF	Sigma-Aldrich
Na_3VO_4	Sigma-Aldrich
Commasie blue (G250)	Sigma-Aldrich
NaN_3	Sigma-Aldrich
Luminol	Sigma-Aldrich
Yağsız süt tozu	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
H_3PO_4	Sigma-Aldrich
p-kumarik asit	Sigma-Aldrich
H_2O_2	Merck
NaOH	Merck
DMSO	Sigma-Aldrich

Çizelge 3.2. (devam)

Glisin	Merck
PMSF	Sigma-Aldrich
DTT	Sigma-Aldrich
Benzamidin	Sigma-Aldrich
Hekzan	Sigma-Aldrich
Kloroform	Sigma-Aldrich
Metanol	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Gliserin	Sigma-Aldrich
Gliserol	Sigma-Aldrich
Sodyum dodesil sülfat	Sigma-Aldrich
PVDF membran (0,45 µm)	Millipore
Hücre kültürü flaskları (25 ve 75 cm ²)	Sarstedt
Kriyotüp (Hücre dondurma ampülü)	Greiner
Mikrosantrifüj tüpleri	Isolab
0,2 ml'lik PCR tüpleri	Isolab
15 ve 50 ml'lik Eppendorf tüpleri	Isolab
6 ve 96 kuyucuklu mikrolakalar	Corning
5-10-25 ml steril pipetler	Costar

Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan kitler

Kit	Marka
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche
Human VEGF ELISA Kit	Invitrogen
Cell Death Detection ELISA Kit	Roche
Pure Link RNA Mini Kit	Life Technologies
2 x qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX Kit	PCR Biosystems
Yüksek Kapasite cDNA Reverse Transkriptaz Kiti	Thermo Fisher

Çizelge 3.4. Çalışmalarda kullanılan tampon ve çözeltiler

DMEM Besiyeri	500 ml yüksek glukozlu DMEM (%1 L-glutamin içeren) üzerine 50 ml FBS ve 5 ml Penisilin/Streptomisin eklenerek hafifçe aşağı yukarı yönde hareket ettirilerek karıştırıldı.
Freezing Medyum	45 ml FBS ile 5 ml DMSO karıştırıldı. Bu karışım 5 ml'lik hacimlerde alikotlanarak -20°C'de saklandı.
1X TBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl ve 3 g Tris, 800 ml dH ₂ O içerisinde çözüldü. HCl ile pH 7,4'e ayarlandı. Final hacmi 1 L olana kadar karışımın üzerine dH ₂ O ilave edildi ve otoklavla sterilite sağlandı.
10X TBS	80 g NaCl, 2 g KCl ve 30 g Tris, 800 ml dH ₂ O içerisinde çözüldü. HCl ile pH 7,4'e ayarlandı. Final hacmi 1 L olana kadar karışımın üzerine dH ₂ O ilave edildi ve otoklavla sterilite sağlandı .
TBST	50 ml 10X TBS üzerine 447,5 ml dH ₂ O eklendi. Bu karışıma 2,5 ml %20'lik Tween-20 ilave edilerek karıştırıldı ve pH 7,4'e ayarlandı.
1X Transfer tamponu	6,04 g Tris ve 28,8 g glisin, 1,6 L dH ₂ O içerisinde çözüldü. Daha sonra 200 ml metanol eklenerek iyice karıştırıldı. Toplam hacim 2 L olacak şekilde dH ₂ O ilave edildi. Veya 10X Transfer tamponundan 100 ml alınıp, 100 ml metanol ve 800 ml dH ₂ O ile karıştırıldı ve böylece 1X Transfer tampon hazırlandı.
10X Transfer tamponu	60,4 g Tris ve 288 g glisin, 1,8 L dH ₂ O içerisinde çözüldü. Final hacmi 2 L olacak şekilde dH ₂ O ilave edildi.
5X Laemmlı örnek tamponu	1 ml %1'lik bromfenol mavisi, 4 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 6,8) üzerine eklendi. 10 ml gliserol ilave edilip karıştırıldı. Karışımın üzerine 2 g SDS eklendi ve iyice karıştırılarak çözünmesi sağlandı. 5 ml β-merkaptoetanol ilave edilerek karıştırıldı. Final karışımı alikotlanarak -20°C'de saklandı.
150 mM standart lizis tamponu	20 ml 1M Tris (pH 8,0) ile 30 ml 5 M NaCl karıştırıldı. Üzerine 100 ml gliserol, 100 ml %10'luk NP-40, 10 ml 0.5 M EDTA (pH 8,0), 1 ml 0.5 M EGTA (pH 8,0), 100ml 0.5 M NaF, 4,32 g β-gliserofosfat ve 5 ml 200 mM'lık Na ₃ VO ₄ ilave edildi ve karıştırıldı. Final hacmi 1000 ml olana kadar dH ₂ O eklendi ve otoklavda sterilizasyon sağlandıktan sonra +4°C'de saklandı.

Çizelge 3.4. (devam)

Lizis tamponu	15 ml'lik falkon tüpüne 150 mM'lık standart lizis tamponunda 5 ml kondu. Üzerine proteaz inhibitörlerinin (PMSF, DTT ve Benzamidin) her birinden 5'er µl eklendi. Karışım hafifçe çalkalanarak homojenizasyon sağlandı .
SDS-PAGE 1X Running tamponu	28,8 g glisin ve 6,04 g Tris birlikte 1,8 L dH ₂ O içinde çözüldü. 2 g SDS eklenerek karıştırıldı. Final hacmi 2 L olana kadar üzerine dH ₂ O eklendi.
SDS-PAGE 10X Running tamponu	288 g glisin ve 60,4 g Tris birlikte 1,8 L dH ₂ O ile çözüldü. 20 g SDS eklenerek karıştırıldı. Son hacim 2 L olacak şekilde üzerine dH ₂ O eklendi.
%5'lik Bloklama çözeltisi	5 g yağsız süt tozunun 80 ml TBST içerisinde çözülmesi sağlandı ve toplam hacim TBST ile 100 ml'ye tamamlandı.
%1'lik Bromfenol mavisi	100 mg bromfenol mavisi, 10 ml dH ₂ O ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında saklandı.
%20'lik Tween-20	20 ml Tween-20, 80 ml dH ₂ O ile iyice karıştırıldı ve + 4°C'de saklandı.
1 M Tris-HCl (pH 7,4-8,0)	121.1 g Tris, 700 ml dH ₂ O ile iyice karıştırıldı. İstenilen pH değerini elde etmek için HCl (pH 7,4 için 70 ml, pH 7,6 için 60 ml, pH 8,0 için 42 ml) ilave edilerek ayarlama yapıldı. Final hacmi 1 L olana kadar dH ₂ O ilave edildi. Elde edilen karışım otoklavda steril edildi.
1.5 M Tris-HCl (pH 6,8)	181,5 g Tris, 700 ml dH ₂ O ile iyice karıştırıldı. İlk olarak 118 ml HCl ilave edildi ve gerekli görüldüğü takdirde ufak hacimde HCl ilavesi yapılarak pH 6,8'e ayarlandı. Final hacmi 1 L olana kadar dH ₂ O ilave edildi. Elde edilen karışım otoklavlanarak steril edildi.
Bradford Solüsyonu	100 mg Commasie blue (G250) boyası 50 ml etanol içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde 30 dk bekletilerek çözüldü. Üzerine 50 ml %85'lik H ₃ PO ₄ damlatılarak eklendi. Daha sonra 100 ml dH ₂ O yavaşça ilave edildi. Tekrar 40 ml %85'lik H ₃ PO ₄ damla damla eklendi ve son hacim 1 L olana kadar dH ₂ O ilave edildi.
Stripping tamponu	100 ml dH ₂ O içerisine 15 g glisin, 1 g SDS ve 10 ml Tween-20 eklendi. Karıştırıldı ve pH 2,2'ye ayarlandı. Final hacmi 1 L olana kadar üzerine dH ₂ O ilave edildi.
Bloklama tamponu	2,5 g yağsız süt tozu 20 ml TBST içerisinde karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Son hacim 50 ml olana kadar üzerine TBST eklendi.
%10'luk amonyum persülfat	1 g amonyum persülfat alındı ve toplam hacim 10 ml olacak şekilde üzerine dH ₂ O ilave edildi.

Çizelge 3.4. (devam)

%10'luk SDS	1 g SDS üzerine son hacim 10 ml olacak şekilde dH ₂ O konuldu ve karışması sağlandı.
%30'luk Akrilamid mix	14,6 g akrilamid ve 0,4 g N,N'-metilen-bis-akrilamid tartılarak bir kaba kondu ve üzerlerine toplam hacim 50 ml olana kadar dH ₂ O eklenerek karıştırıldı.
250 mM luminol	1,107 g luminol 25 ml DMSO içerisinde karıştırılarak çözünmesi sağlandı.
90 mM p-kumarik asit	0,37 g p-kumarik asit 25 ml DMSO içerisinde çözüldü.
%30'luk H₂O₂	30 ml H ₂ O ₂ üzerine 70 ml DMSO eklendi.
ECL stok solüsyonu 1	0,5 ml 250 mM luminol ile 0,22 ml 90 mM p-kumarik asit ve 5 ml 1 M Tris (pH 8,5) karıştırıldı ve toplam hacim 50 ml olana kadar dH ₂ O eklendi.
ECL stok solüsyonu 2	31 µl %30'luk H ₂ O ₂ ile 5 ml 1 M Tris (pH 8,5) karıştırıldı ve toplam hacim 50 ml olana kadar dH ₂ O ilave edildi. Stok solüsyonları, alüminyum folyo ile sarılmış ve ışık almayan kaplar içerisinde +4°C'de saklandı. ECL reaksiyonu için solüsyon 1 ve 2 aynı hacimde kullanıldı (1:1).
0.5 M NaF	10,5 g NaF 500 ml dH ₂ O içerisinde çözüldü.
0.5 M EDTA (pH 8,0)	146,12 g EDTA 1000 ml dH ₂ O içerisinde çözüldü ve NaOH ile pH değeri 8,0 olacak şekilde ayarlandı.
0.5 M EGTA (pH 8,0)	19,02 g EGTA 100 ml dH ₂ O içerisinde çözüldü ve NaOH ile pH değeri 8,0'e ayarlandı.
10 N NaOH	200 g NaOH 500 ml dH ₂ O içerisinde karıştırılarak çözüldü ve +4°C'de saklandı.
5 M NaCl	292,2 g NaCl, 1000 ml dH ₂ O içerisinde iyice karıştırılarak çözüldü. +4°C'de saklandı.
%10'luk NaN₃	10 g NaN ₃ , 100 ml dH ₂ O içerisinde karıştırılarak çözüldü. +4°C'ye kaldırıldı.
%10'luk NP-40	25 ml NP-40 ile 225 ml dH ₂ O ile karıştırıldı ve kullanılana kadar +4°C'de saklandı.

3.1.2. Hücre hattı

Çalışmalarda HT-29 insan kolorektal kanser hücre hattı kullanıldı. HT-29 hücre hattı Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Hücre hattının genel özellikleri Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. HT-29 kolorektal kanser hücre hattının genel özellikleri

Organizma	İnsan
Doku	Kolon
Morfoloji	Epitel
Kültür özelliği	Adherent
Hastalık	Kolorektal adenokarsinoma
Klinik veri	44 yaş, bayan, Kafkas
Onkogen	myc +; ras +; myb +; fos +; sis +; p53 +; abl -; ros -; src -

3.2. Yöntem

3.2.1. 5-FU, bitkisel etken maddeler ve bitki ekstralarının hazırlanması

3.2.1.a. 5-FU'nun hazırlanması

5-Fluorouracil bir ilaç firmasından temin edildi (1000 mg/20 ml). İlacın bu hali ana stok olarak kullanıldı ve çalışmada kullanılacak olan konsantrasyonlar ana stoktan DMSO ile seyreltilerek elde edildi.

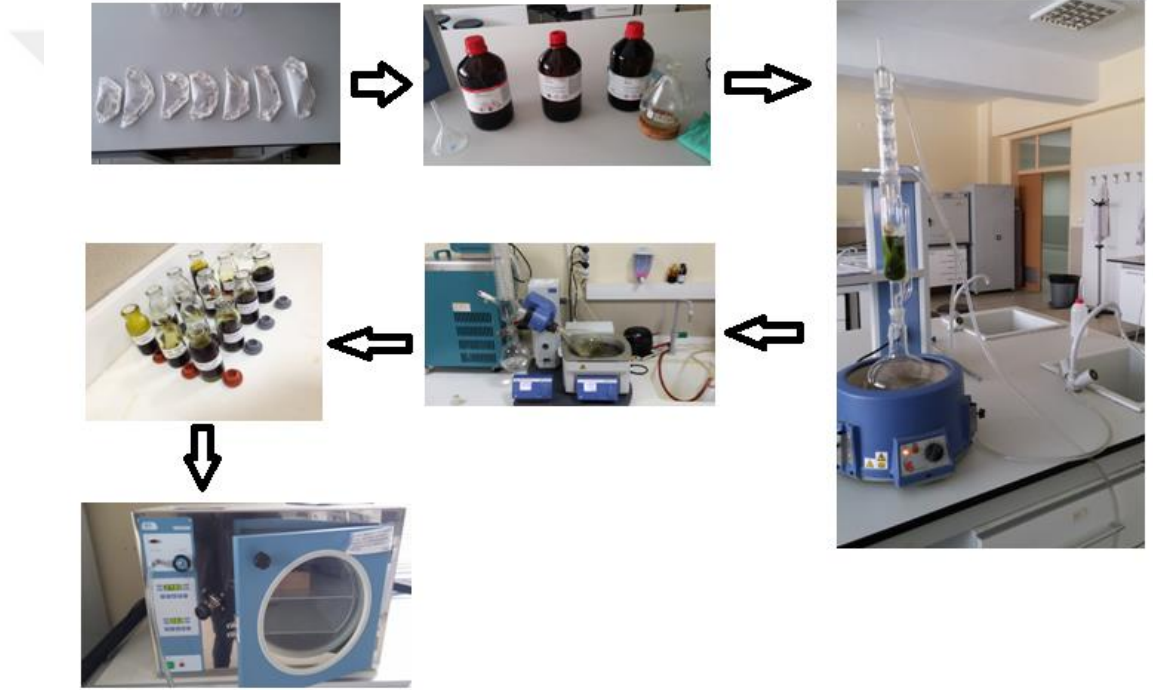
3.2.1.b. Bitkisel etken maddelerin hazırlanması

Kuersetin ve luteolin ticari olarak satın alındı ve bu etken maddelere ait DMSO ile 1mg/ml olacak şekilde stok çözeltiler hazırlandı. Elde edilen bu stok çözelti farklı oranlarda seyreltilerek çeşitli dozlarda (50-1000 µg/ml) örnekler hazırlandı.

3.2.1.c. Bitki ekstralarının hazırlanması

Achillea biebersteinii bitkisi 2014 yılı Mayıs ayında Bingöl ili merkezinin kuzeyinde 1150 metre yükseklikten, *Pistacia eurycarpa* bitkisi ise aynı yılın Temmuz ayında Bingöl ili Ilıcalar ilçesinin güneybatısında 1300 metre yükseklikten toplandı. Bitkilerin

teşhisi Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Lütfi Behçet tarafından yapıldı. Bitkilerin güneş görmeyen nemsiz bir ortamda kurumaları sağlandı. *Achillea biebersteinii* bitkisinin toprak üstü kısımları, *Pistacia eurycarpa* bitkisinin ise meyveleri kullanılarak ekstraksiyon işlemi yapıldı. Ardışık fraksiyon yöntemi ile farklı polariteye sahip çözücüler olan hekzan, kloroform ve metanol kullanılarak ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirildi (Kaneria and Chanda 2013) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bitki ekstraktlarının hazırlanması

Kuru bitki örneklerinden 20'şer gram alınarak filtre kâğıdı içerisine konuldu ve etrafı tamamen kapatıldı. Filtre kâğıdı içerisindeki bitki örnekleri Soxhlet cihazının aparatına yerleştirildi. 1000 ml'lik balon jöje içerisine ise 400 ml çözücü (sırasıyla hekzan, kloroform ve metanol) konuldu ve cihaz çalıştırıldı. Sıcaklıkla birlikte buharlaşan çözücü, bitki örneğinin bulunduğu kısımda toplanarak cihazın soğutucu kısmı sayesinde yoğunlaşır ve bu sıvılaşan çözücü cihazın aparatından balon jöje içerisine geri dökülür. Bu işlem geri dökülen çözücü berraklaşana kadar devam ettirildi ve daha sonra balon içerisinde toplanmış olan karışım alınarak evaporatörde çözücüsü uzaklaştırıldı. Kalan

bitki ekstraktı küçük tüplere alındı ve vakumlu etüvde bir gece bekletilerek tüm çözücünün tamamen uzaklaştırılması sağlandı (Aizpurua *et al.* 2015). Elde edilen ekstraktlar toz haline getirildi ve DMSO ile çözülerek çalışmalarda kullanılacak olan konsantrasyonlar (50-1000 µg/ml) hazırlandı.

3.2.2. Hücre kültürü

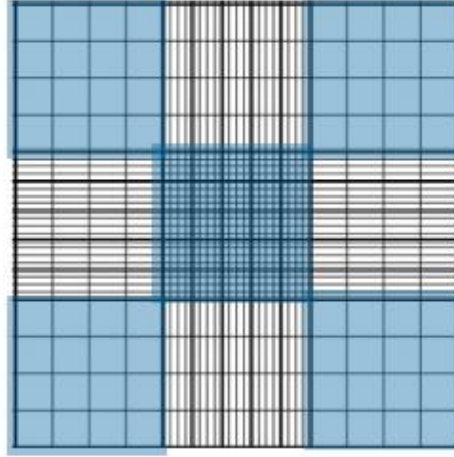
HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücreleri, %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren yüksek glukozlu DMEM besiyeri kullanılarak 37°C'de, %95 nem ve %5-6 CO₂'li ortamda kültüre edilerek çoğaltıldı. Hücreler günlük olarak kontrol edildi ve besiyerleri yenilendi. %80 oranında yoğunluğa ulaştıkları zaman hücreler tripsin uygulanarak pasajlandı. Hücre kültürü flaskları içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve kapların içerisi PBS ile iki kez yıkandı. Daha sonra Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek flasklar 3 dk inkübatörde bekletildi. Mikroskop altında, hücrelerin flask yüzeyinden tamamen ayrıldığı görüldü ve laminar flow kabini içerisinde flasklara tripsin çözeltisinin iki katı kadar besiyeri eklendi. Hücre süspansiyonu steril pipetler kullanılarak flaskların içerisinden çekildi ve içerisinde 3 ml besiyeri bulunan 15 ml'lik eppendorf tüplerine aktarıldı. Bu tüpler 2500 rpm'de 4 dk santrifüjlendi ve süpernatant kısımları uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 3 ml besiyeri eklendi ve birkaç kez pipet ile alınıp tekrar bırakılarak homojen bir karışım elde edildi. Karışımında bulunan hücrelerin sayımı yapıldı ve içinde 4 ml besiyeri bulunan flasklara eşit miktarlarda hücre süspansiyonu pipetlendi. Stok olarak saklanması için, 15 ml'lik eppendorf tüplerinden bazılarındaki hücre peletlerinin üzerine freezing medyum eklenip homojen şekilde karışması sağlandı. Karışım dondurma tüplerine konularak önce bir gece -86°C'de bekletildi ve ertesi gün sıvı azot tankına (-196°C) kaldırıldı (Tang *et al.* 2007; Jin *et al.* 2016).

Hücre kültürü çalışmalarında, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücrelerine 5-FU, bitkisel etken maddeler ve bitki ekstraktları, ayrıca 5-FU ile birlikte bitkisel etken maddelerin ve bitki ekstraktlarının kombinasyonları 24 saat boyunca uygulandı. Kontrol grubu olan hücrelere ise sadece besiyeri+DMSO karışımı uygulandı.

3.2.2.a. Hücre sayımı

1. Hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve üzerine 10 µl tripan blue boyası eklenerek karıştırıldı (tripan blue boyası canlı hücreleri boyamaz fakat ölü hücrelerin içine girerek onları maviye boyar).
2. Hemositometrenin her iki bölmesine bu karışımdan 10'ar µl pipetlendi ve mikroskop altında hücre sayımı işlemine geçildi.
3. Hemositometrenin dört köşesinde ve ortada yer alan büyük karelerin (Şekil 3.2, mavi renkli kareler) içerisine denk gelen canlı hücreler sayıldı.
4. Toplam hücre sayısı 5'e bölünerek bir karede yer alan ortalama canlı hücre sayısı bulundu.
5. Total hacim hücre süspansiyonunun hacmine bölünerek (20/10=2) dilüsyon faktörü hesaplandı. Daha sonra aşağıdaki formüle göre hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Canlı hücre sayısı/ml} = \text{Ortalama canlı hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4$$



Şekil 3.2. Hemositometre chamber üzerindeki kareler

3.2.2.b. Canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin boyanması

1. 96'lık mikroploka kuyucuklarının her birine 1×10^4 hücre ekildi. 37°C 'de %5-6 CO_2 şartlarında inkübatörde bir gece bekletildi.

2. 5-FU, bitkisel etken maddeler ve bitki ekstralarının etken dozları kuyucuklara eklendi ve sonra mikropkaya yukarıdaki şartlarda bir gece daha inkübasyona bırakıldı.
3. Daha sonra kuyucuklarda bulunan medyum ve örnek karışımları aspire edilerek uzaklaştırıldı.
4. PBS ile 100'er µg/ml konsantrasyonda hazırlanan etidyum bromid ve akridin oranj boyaları kullanılarak boyama işlemine geçildi.
5. Kuyucuklara 4 µl etidyum bromid ve 4 µl akridin oranj boyaları eklendi. Mikropkaya 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı.
6. Boyalar uzaklaştırıldı ve kuyucuklara PBS eklenerek mikroskop altında görüntüleme işlemi yapıldı. Akridin oranj canlı hücrelerin DNA'sına bağlanarak yeşil renk oluşumuna neden olurken etidyum bromid ise nekrotik hücreleri kırmızıya boyar. Akridin oranj ve etidyum bromid boyalarının karışımı ise apoptotik hücreleri sarı-turuncu bir renge boyar.

3.2.3. İzobologram analizi ile sinerjizmin belirlenmesi

İzobologram analizi, etkisi belirlenmek istenen ilaç, etken madde veya ekstraların etkin dozlarının ve birlikte uygulandığında aralarındaki sinerjizmin kantitatif olarak belirlenmesini sağlar. Uygulanan kombine dozlara ait bir kombinasyon indeksi (CI) ile veriler değerlendirilir. $CI < 1$, $= 1$ ve > 1 olması sırasıyla sinerjizm, aditif etki ve antagonizmi gösterir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. CI değerlerine karşılık gelen etkilerin tanımı (Chou and Martin 2005)

CI	Tanım
< 0,1	Çok güçlü sinerjizm
0,11 – 0,30	Güçlü sinerjizm
0,31 – 0,70	Sinerjizm
0,71 – 0,85	İlımlı sinerjizm
0,86 – 0,90	Hafif sinerjizm

Çizelge 3.6. (devam)

0,91 – 1,10	Aditif etki
1,11 – 1,20	Hafif antagonizm
1,21 – 1,45	İlımlı antagonizm
1,46 – 3,30	Antagonizm
3,31 - 10	Güçlü antagonizm
> 10	Çok güçlü antagonizm

Kombinasyon indeksi şu şekilde hesaplanır;

$$CI = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2}$$

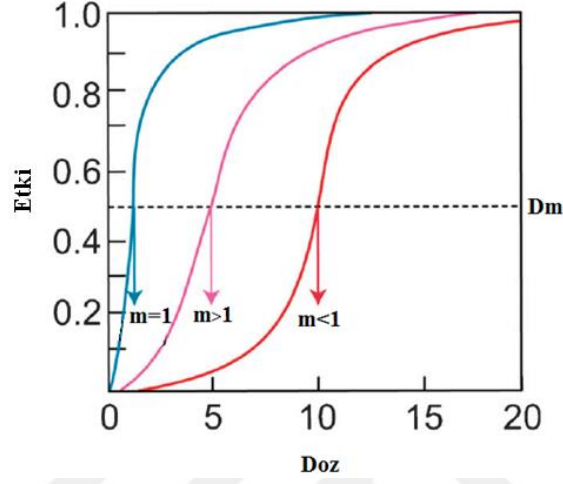
Bu formülde, $(Dx)_1$ ve $(Dx)_2$; 1 ve 2 nolu maddelerin tek başına % x etki göstermesi için gereken dozu (örneğin, % x inhibisyon), $(D)_1$ ve $(D)_2$ ise 1 ve 2 nolu maddelerin kombinasyonunun (D_1+D_2) % x'lik etki göstermesi için gerekli olan 1 ve 2 nolu maddelerin dozunu ifade eder.

Medyan-etki eşitliği bir ilaç veya maddenin dozu, etkin dozu ve sitotoksitesi arasındaki ilişkiyi belirlemenin kolay bir yoludur. Medyan-etki eşitliği şu formülle hesaplanır;

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{D_m} \right)^m$$

Bu formülde, D ; maddenin dozu veya konsantrasyonu, f_a ; D dozundan etkilenen değeri (örneğin, yüzde inhibisyon/100) ve f_u ise etkilenmeyen değeri ($f_u=1-f_a$) ifade eder. D_m ; medyan-etki dozunu (IC_{50} , ED_{50} veya LD_{50}) örneğin kanser hücrelerinin %50'sini öldürmek için gereken dozu ve m ise elde edilen doz-etki eğrisindeki (Şekil 3.3)

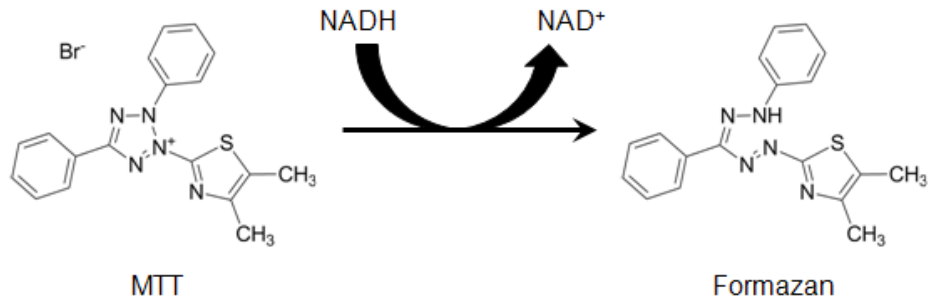
sigmodite değerlerini gösterir ($m=1$, >1 ve <1 sırasıyla hiperbolik, sigmoidal ve flat-sigmoidal olduğunu gösterir (Chou 2011).



Şekil 3.3. Doz-etki eğrisi ve sigmodite değerlerinin gösterimi (Chou 2011)

3.2.4. Hücre canlılığının belirlenmesi

Hücre canlılığının belirlenmesinde MTT yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin temeli, sarı renkli MTT boyasındaki tetrazolyum tuzlarının, canlı hücrelerde mitokondrideki aktiviteler sonucunda mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi ve bu renk değişiminin spektrofotometrik olarak değerlendirilmesine dayanır (Şekil 3.4). Reaksiyonla, bir koenzim olan NADH'ye yükseltgenir.



Şekil 3.4. MTT ve formazan ürününün kimyasal yapısı (Riss *et al.* 2015)

1. 96 kuyucuklu mikrolakanın her bir kuyucuğuna 1×10^4 hücre içeren 100'er μl hücre süspansiyonu konuldu. Mikrolaka bir gece boyunca 37°C 'de, %95 nem ve %5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı.
2. Ertesi gün mikrolaka kuyucuklarına 50-1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda 5-FU, bitkisel etken maddeler ve bitki ekstraları ilave edildi (Şekil 3.5). Mikrolaka 24 saat boyunca aynı şartlarda inkübe edildi.
3. İnkübasyon süresinin sonunda 10'ar μl MTT etiketli reaktiften her bir kuyucuğa eklendi ve mikrolaka 4 saat daha inkübe edildi.
4. Daha sonra solubilizasyon solüsyonu etiketli reaktiften 100'er μl her bir kuyucuğa ilave edildi ve 37°C , %95 nem ve %5 CO_2 ortamda bir gece inkübe edildi.
5. Oluşan renk değişiminin absorbans değerleri mikrolaka (ELISA) okuyucu ile 570 ve 670 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçüldü.
6. Absorbans değerlerine göre konsantrasyona bağlı hücre canlılığı hesaplandı. Elde edilen sonuçlar ile herbir örneğe ait IC_{50} değeri hesaplandı ve bu değerler etken dozlar olarak çalışmanın sonraki basamaklarında kullanıldı.

	5-FU	K	L	PEH	PEK	PEM	ABH	ABK	ABM
Kontrol									
50 $\mu\text{g/ml}$									
100 $\mu\text{g/ml}$									
200 $\mu\text{g/ml}$									
400 $\mu\text{g/ml}$									
600 $\mu\text{g/ml}$									
800 $\mu\text{g/ml}$									
1000 $\mu\text{g/ml}$									

Şekil 3.5. Mikrolaka düzeni

3.2.5. Apoptozun CDDE yöntemi ile belirlenmesi

Cell Death Detection ELISA (CDDE) kiti, hücre ölümüyle indüklenen DNA fragmentasyonu sonucunda açığa çıkan sitoplazmik histonun *in vitro* olarak kalitatif ve kantitatif açıdan belirlenmesini sağlar. Apoptozis, membranda bleblenme, sitoplazmik yoğunlaşma ve endonükleaz aktivitesi ile karakterize edilir. Bu endonükleaz aktivitesi DNA'da internükleozomal kırılmalara neden olur. Bu kırılmalar sonucunda mono- ve oligo-nükleozomlar oluşur. Kit içeriğindeki anti-histon antikoru H1, H2A, H2B, H3 ve H4 proteinleri ile reaksiyona girer. Anti-DNA-POD antikoru ise apoptozis sonucu oluşan ve fragmente halde sitoplazmada bulunan tek ve çift zincirli DNA'lara bağlanır. Yine kitin içinde bulunan ABTS substratı tabletleri ise Anti-DNA-POD aktivitesini tayin eder. Yöntem, her bir örnekteki mono- ve oligo-nükleozomların ve dolayısıyla apoptotik hücre ölümünün kolorimetrik olarak belirlenmesini sağlar.

3.2.5.a. CDDE kit içeriğinin hazırlanması

1. Anti-histon içeren (1 nolu) şişe 1 ml saf su ile sulandırılıp 10 dk süreyle şiddetli şekilde vorteks ile karıştırıldı.
2. Anti-DNA-POD içeren (2 nolu) şişe 1 ml saf su ile sulandırılarak kuvvetli bir şekilde 10 dk süreyle vortekslendi.
3. Coating solution içeren (3 nolu) şişeden 1 ml alınıp üzerine 9 ml saf su eklenerek karıştırıldı. Kullanılmadan hemen önce 1 ml anti-histon antibody içeren (1 nolu-sulandırılmış olan) şişe ile 9 ml coating buffer karıştırıldı.
4. Washing buffer içeren (4 nolu) şişenin 15-25°C'ye kadar ısıtılması sağlandı ve bu bufferdan 40 ml alınarak üzerine 360 ml saf su eklendi ve iyice karıştırıldı.
5. Incubation buffer içeren (5 nolu) şişeden 225 µl alındı ve bu miktar 25 µl su ile dilue edildi.
6. Conjugate solution için 1 ml anti-DNA-POD içeren (2 nolu) şişe ile 9 ml Incubation buffer karıştırıldı (Bu karışım kullanılmadan hemen önce hazırlandı).

7. Test edilecek örnek sayısına göre 1, 2 veya 3 adet ABTS substrat tabletinin 5, 10 veya 15 ml substrat buffer içerisinde çözünmesi sağlandı ve kullanılmadan hemen önce 15-25°C'ye gelmesine izin verildi (Bu çözelti substrat solution olarak kullanıldı).

3.2.5.b. CDDE için örneklerin hazırlanması

1. Hücreler kültür medyumu ile konsantrasyon 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı ve eppendorf tüplerine $500 \mu\text{l}/\text{tüp} = 5 \times 10^4$ hücre/tüp olacak şekilde aktarıldı.
2. Uygulanacak maddelerinin etken dozları tüplere eklendi.
3. Tüplerin kapakları gaz değişimini sağlayabilmek için gevşekçe kapatıldı ve karbondioksit inkübatöründe 37°C ve %5 CO₂ şartları altında 4 saat bekletildi.
4. Daha sonra tüpler inkübatörden alınarak 200xg'de 5 dk süreyle santrifüjlendi.
5. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 1 ml hücre kültürü medyumu eklendi.
6. Tüpler 1 500 x g'de 5 dk süreyle santrifüjlendi.
7. Hücre peletine 500 μl Incubation buffer eklendi ve şiddetlice karıştırıldı.
8. 30 dk süresince hücrelerin lizis olması için 15-25°C'de inkübasyona bırakıldı.
9. Lizat 20 000 x g'de 10 dk süreyle santrifüjlendi.
10. Süpernatant kısmından 400 μl dikkatlice alındı. Hücre nükleusu yüksek moleküler ağırlıklı unfragment DNA içerdiğinden, bu noktada peletin çalkalanmamasına özen gösterildi.
11. Süpernatant 1'e 10 olacak şekilde Incubation buffer ile dilue edildi (1×10^4 hücre ekivalenti/ml) (örnek solüsyonu).

3.2.5.c. CDDE protokolü

1. 96 kuyucuklu mikropılaka için her bir kuyucuğa 100 μl Coating solution pipetlendi ve mikropılaka sıkıca yapışkan kaplayıcı ile kapatıldı.
2. 1 saat süreyle 15-25°C'de inkübasyona bırakıldı.
3. Coating solution uzaklaştırıldı.

4. 200 µl Incubation buffer her bir kuyucuğa pipetlendi ve mikropkaka tekrar yapışkan kaplayıcı ile kapatıldı.
5. 30 dk 15-25°C’de inkübasyona bırakıldı.
6. Karışım uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 250-300 µl Washing solution ile üç kez yıkandı. Daha sonra Washing solution dikkatlice uzaklaştırıldı.
7. 100 µl örnek solüsyonu her bir kuyucuğa pipetlendi. Deneyin temelini kontrol amacıyla iki kuyucuğa örnek yerine 100’er µl Incubation buffer kondu. Mikropkaka yapışkan kaplayıcı ile sıkıca kapatıldı. Negatif kontrol olarak bir kuyucuğa madde uygulanmamış hücreleri içeren örnek solüsyonu pipetlendi.
8. 90 dk süresince 15-25°C’de inkübasyona bırakıldı.
9. Karışım uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 250-300 µl Washing solution ile üç kez yıkandı. Washing solution özenle uzaklaştırıldı.
10. 100 µl Conjugate solution kör kuyucuklar dışındaki her bir kuyucuğa eklendi. Yapışkan kaplayıcı ile mikropkaka sıkıca kapatıldı.
11. 90 dk süresince 15-25°C’de inkübe edildi.
12. Karışım uzaklaştırılarak kuyucuklar 250-300 µl Washing solution ile üç kez yıkandı ve Washing solution özenle uzaklaştırıldı.
13. 100 µl Substrat solution her bir kuyucuğa eklendi.
14. 250 rpm’de mikropkaka çalkalayıcı üzerinde renk değişimi fotometrik analiz için yeterli olana kadar inkübe edildi (10-20 dk).
15. Mikropkaka kenarına dikkatli bir şekilde vurularak içeriğin homojenizasyonu sağlandı. Substrat solution körüne karşı 405 ve 490 nm dalga boylarında absorbanslar okutuldu.
16. Deney üç tekrarlı yapıldı. Her bir örneğe ve negatif kontrole ait olan ortalama absorbans değerleri hesaplandı. Örneklerin ortalama absorbans değerleri sırayla negatif kontrolün ortalama absorbans değerine bölünerek, her bir örnek için zenginleştirme faktörü hesaplandı.

$$\text{Zenginleştirme faktörü} = \frac{(\text{örnek})_{\text{abs}}}{(\text{kontrol})_{\text{abs}}}$$

3.2.6. VEGF miktarının Human VEGF ELISA yöntemi ile belirlenmesi

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiyogenez ve vaskülogenezin önemli bir düzenleyicisidir. Anjiyogenez, patolojik süreçlere ilaveten dişi üreme döngüsü ile ilgili normal süreçlerde de meydana gelir. Vaskülogenez, endotel hücrelerinin farklılaşması sayesinde kan damarlarının oluşumuyla ilgilidir. Vaskülogenez embriyonik gelişim ile sınırlıdır, ancak anjiyogenez yeni vaskülarizasyon gerektiği sürece meydana gelir. Human VEGF ELISA yöntemi, insan serum ve plazmasındaki veya hücre kültüründeki VEGF miktarını in vitro kantitatif olarak belirlemek için kullanılır.

3.2.6.a. Human VEGF ELISA kit içeriğinin hazırlanması

1. 25X Wash buffer oda sıcaklığına getirildi ve iyice çalkalandı.
2. 25X Wash bufferın 1 hacmi 24 hacim saf su ile dilue edildi ve Working Wash buffer olarak etiketlendi.
3. Hu-VEGF standartını içeren şişe 10 000 pg/ml olacak şekilde standart diluent buffer ile sulandırıldı ve 10 dk süreyle şiddetle karıştırılarak tam olarak çözünme sağlandı.
4. İçinde 510 µl standart diluent buffer olan bir tüpe bu standarttan 90 µl konuldu ve bu karışım 1500 pg/ml Hu-VEGF diye etiketlendi. Hazırlanan bu karışım çeşitli oranlarda seyreltildi ve spektrofotometrik ölçümler yapılarak standart grafiği oluşturuldu.
5. Streptavidin-HRP solüsyonu kullanılmadan 15 dk önce hazırlandı. 10 µl Streptavidin-HRP (100X) solüsyonu, 990 µl HRP diluenti içeren tüpe eklendi ve şiddetlice karıştırıldı. Kullanılmayacak olan Streptavidin-HRP (100X) solüsyonu +4°C'de saklanmak üzere buzdolabına kaldırıldı.

3.2.6.b. Human VEGF ELISA için örneklerin hazırlanması

1. Mikropakanın her bir kuyucuğuna 5×10^4 hücre ekildi ve bir gece standart şartlarda inkübasyona bırakıldı.
2. 5-FU, bitkisel etken maddeler ve bitki ekstraktlarının etken dozları, ayrıca bu etken dozların 5-FU ile kombinasyonları kuyucuklara uygulandı.

3. 24 saat inkübasyon süresinin ardından hücre medyumunu uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile yıkanıp kazıyıcı ile kaldırıldı. Toplanan hücreler içerisinde 50'şer µl taze medyum bulunan tüplere aktarıldı.

3.2.6.c. Human VEGF ELISA protokolü

Tüm reagentlar, kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi ve iyice karıştırıldı. Her bir çalışma için standart eğri grafiği çizdirildi. Kullanılacak 8 kuyucuklu stripler çerçeveye yerleştirildi ve kullanılmayacak olanlar +2-8°C'de saklandı.

1. Körler hariç tüm kuyucuklara 50 µl Incubation buffer eklendi.
2. Kuyucuklara hücre kültürü medyumdan 50'şer µl yüklendi (5×10^4 hücre). Daha sonra 50 µl standart diluent buffer eklendi.
3. Mikroplaka kaplayıcı ile üzeri kaplanan stripler oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı.
4. Solüsyon uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 4 kez dilue Wash buffer ile yıkandı.
5. 100 µl HU-VEGF biotin konjugat solüsyonu körler dışındaki her bir kuyucuğa eklendi.
6. Mikroplaka kaplayıcı ile üzeri kaplanan stripler oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
7. Solüsyon uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 4'er kez dilue Wash buffer ile yıkandı.
8. 100 µl Streptavidin-HRP her bir kuyucuğa (kөрler hariç) eklendi.
9. Mikroplaka kaplayıcı ile üzeri kaplanan stripler oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
10. Kuyucuklardan solüsyonlar aspire edildi ve kuyucuklar 4'er kez 1X Washing buffer ile yıkandı.
11. 100 µl Stabilize kromojen her bir kuyucuğa eklendi. Substrat solüsyonu mavi renge dönüşmeye başladı.
12. Mikroplaka kaplayıcı ile üzeri kaplanan stripler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübasyona bırakıldı.
13. Her bir kuyucuğa 100 µl Stop solüsyon eklendi. Homojenizasyon sağlandıktan sonra kuyucuklardaki solüsyonun rengi maviden sarıya dönüştü.

14. Stop solüsyon eklendikten 2 saat sonra 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile absorbanslar ölçüldü.
15. Sonuçlar standart grafiklerle karşılaştırıldı ve her bir örnekte bulunan VEGF miktarı pg/ml cinsinden hesaplandı.

3.2.7. Hücre kültüründen total RNA izolasyonu

1. 6 kuyucuklu mikrolakaların her bir kuyucuğuna 1×10^6 hücre içeren 1 ml hücre süspansiyonu eklendi.
2. Hücrelere, 5-FU, kuersetin, luteolin, bitkisel ekstraktlar ve bunların 5-FU ile kombineleri etkin dozlarına göre uygulandı. Kontrol grubuna madde yerine kültür medyumu ilave edildi. 24 saat boyunca 37°C 'de, %95 nem ve %5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda medyumlar aspire edildi.
3. Kuyucuklara 1'er ml PBS eklendi ve mikrolaka yüzeyleri scraper ile kazınarak hücreler toplandı. Bu işlem her bir kuyucuk için ikişer kez tekrarlandı.
4. Toplanan hücreler buz üzerinde soğutulmuş olan RNase içermeyen tüplere transfer edildi.
5. Hücrelerin üzerine RNase içermeyen pipet uçları ile 0,6 ml taze lizis tamponu (lizis tamponunun her 1 ml'sine 10 μl 2-merkaptotanol eklenerek hazırlanır) eklendi ve aşağı-yukarı yönlü hareketlerle hücrelerin tüp içerisinde eşit şekilde dağılması sağlandı.
6. Lizatı içeren toplama tüpleri santrifüje kondu ve homojenizasyon için $12\,000 \times g$ 'de 2 dk santrifüjlendi.
7. Homojenat 5 dk boyunca $2\,600 \times g$ 'de santrifüjlendi ve süpernatant kısımları RNase içermeyen temiz tüplere transfer edildi.
8. Hücre homojenatının her bir hacmine eşit miktarda %70'lik etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.
9. Homojenatın en fazla 700 μl 'si alınarak spin cartridge tüplere aktarıldı.
10. Bu tüpler $12\,000 \times g$ 'de 15 sn santrifüjlendi ve filtreden geçerek tüplerin alt kısmında toplanan sıvı kısım uzaklaştırıldı ve spin cartridge tekrar aynı toplama tüpünün içerisine yerleştirildi.
11. 9 ve 10 nolu basamaklar tüm homojenatlar alınana kadar tekrarlandı.

12. Spin cartridge tüpün içine 700  l yıkama tamponu I eklendi. 12 000 x g'de 15 sn oda sıcaklığında santrifüj edildi. Akan sıvı kısımlar ve toplama tüpü atıldı. Spin cartridge temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi.
13. Spin cartridge tüpün içine 500  l yıkama tamponu II eklendi.
14. 12 000 x g'de oda sıcaklığında 15 sn santrifüjlendi. Akan sıvı kısımlar uzaklaştırıldı ve spin cartridge aynı toplama tüpünün içerisine yerleştirildi.
15. 13 ve 14 nolu basamaklar birer kez daha tekrarlandı.
16. RNA tutunmuş olan membranı kurutmak için spin cartridge 12 000 x g'de 2 dk santrifüjlendi.
17. Spin cartridge tüpünün ortasına 100  l RNase içermeyen su eklendi.
18. Oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi.
19. Spin cartridge oda sıcaklığında 14 000 x g'de 2 dk santrifüjlendi.
20. Saflaştırılmış olan RNA alikotlanarak saklandı (Kısa süreli saklama -20 C'de, uzun süreli saklama ise -86 C'de yapıldı).

3.2.8. cDNA sentezi

Elde edilen RNA'ların verimleri spektrofotometrik olarak belirlendi. Total RNA'dan cDNA sentezi, Yüksek Kapasite cDNA Revers Transkriptaz Kiti kullanılarak üreticinin protokolüne göre yapıldı. Tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

1. 2X revers transkripsiyon master mix reaksiyon başına izelge 3.7'de belirtilen bileşen oranları kullanılarak hazırlandı.
2. 2X RT master mix iyice karıştırıldı.
3. Önceden etiketlenmiş olan 0,2 ml'lik PCR tüplerine 10'ar  l 2X RT master mix pipetlendi.
4. Her bir tüpe 10'ar  l  rnek RNA'sı eklendi. Karışımın sağlanması için oluşan bileşim pipetle iki kere çekilip tüpe geri bırakıldı.
5. Oluşan baloncukları elemine etmek için tüpler yüksek devirde kısa süreli santrifüjlendi.

Çizelge 3.7. 2X RT master mix bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Hacim / Reaksiyon (µl)
10X RT Buffer	2
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random primerler	2
MultiScribe Revers Transkriptaz	1
dH ₂ O	4,2
Toplam Reaksiyon Hacmi	10

6. Tüpler termal cycler cihazına götürülmeden önce buz üzerine yerleştirildi.
7. Termal cycler cihazı Çizelge 3.8’de belirtilen şekilde programlandı.

Çizelge 3.8. Termal cycler cihazı programı

Sıcaklık/Süre	1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4. Basamak
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	∞

8. Toplam reaksiyon hacmi 20’şer µl olan tüpler termal cycler cihazına yerleştirilerek döngü başlatıldı.
9. Bu döngü sonunda 20 µl hacimden 5 µl alınarak üzerine 45 µl DNase içermeyen su eklenip toplam hacmin 50 µl olması sağlandı. Geri kalan 15 µl cDNA ana stoğu olarak -20°C’de saklandı.
12. qRT-PCR için 50 µl’lik karışımdan 5 µl kullanıldı. Kalan 45 µl’lik hacim ise daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C’ye kaldırıldı.

3.2.9. qRT-PCR

RT-PCR karışımı Çizelge 3.9’da gösterilen bileşenler ve miktarlar kullanılarak pipet yardımıyla hazırlandı.

Çizelge 3.9. RT-PCR reaksiyon karışımı

PCR Bileşeni	Kullanılan Miktar (μ l)	Son Konsantrasyon
2x qPCRBIO SyGreen Mix	10	1X
Primer F (10 μ M)	0,8	400 nM
Primer R (10 μ M)	0,8	400 nM
cDNA	5	-
dH ₂ O	3,4	-
Toplam Reaksiyon Hacmi	20 μl	

Önceden etiketlenmiş olan ve RT-PCR karışımlarını içeren 0.2 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri hafifçe sallanarak içeriklerinin karışması sağlandı. Daha sonra program koşulları Çizelge 3.10'da gösterilen RT-PCR cihazı çalıştırıldı.

Çizelge 3.10. RT-PCR reaksiyon koşulları

Aşamalar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön Denatürasyon	95°C / 2 dk / 1
Denatürasyon	95°C / 5 sn / 40
Yapışma (Annealing)	64°C / 30 sn / 40
Uzama (Extension)	72°C / 2 dk / 40
Son Uzama	72°C / 5 dk / 1
Bekleme	+4°C / ∞ / 1

3.2.9.a. Primerlerin dizaynı

Genlere ait forward ve reverse primerler elle, NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanı kullanılarak dizayn edildi ve üretici firmadan satın alındı. Çalışmalarda kullanılan genlerin forward ve reverse dizileri, T_m değerleri ve uzunlukları Çizelge 3.11'de gösterilmiştir.

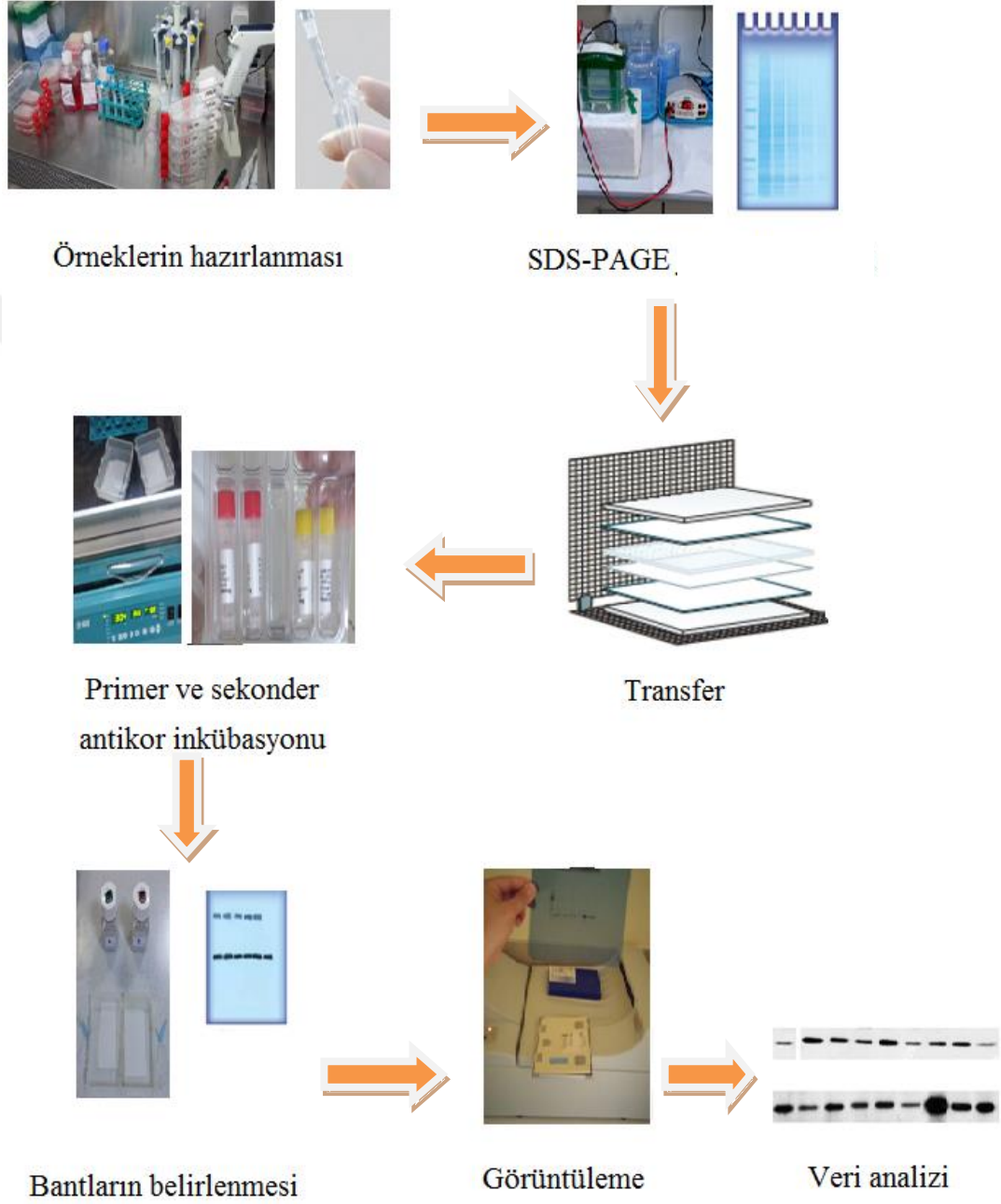
Çizelge 3.11. Çalışmalarda kullanılan genlere ait primer bilgileri

Primer	Sekans (5' → 3')	Tm (°C)	Uzunluk (bç)
p53 Forward	GTCCAACAACACCAGCTCCT	51	20
p53 Reverse	CCTCATTTCAGCTCTCGGAAC	49	20
mTOR Forward	TGTCCTGCTGGTCTGAACTG	49	20
mTOR Reverse	TTCAGCGATGTCTTGTGAGG	47	20
PTEN Forward	GGTGATGTGGCAGGACTCTT	49	20
PTEN Reverse	CAGCTTCCGAGAGGAGAGAA	49	20
AKT Forward	CACACCACCTGACCAAGATG	49	20
AKT Reverse	CTGGCCGAGTAGGAGAAGT	51	20
p38-MAPK Forward	TGGATGCATTACAACCAGACA	45	21
p38-MAPK Reverse	GTCAACAGCTCGGCCATTAT	47	20
VEGF-R2 Forward	AGGTTGCGTGTTCTTCGAGT	47	20
VEGF-R2 Reverse	ACACGTAACGGTCTGGAAGG	49	20
Bcl-2 Forward	GTGAACTGGGGGAGGATTGT	51	20
Bcl-2 Reverse	GGAGAAATCAAACAGAGGCC	50	20
Bax Forward	CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG	49	21
Bax Reverse	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT	51	21
β-aktin Forward	CTCTTCCAGCCTTCCTCCT	49	20
β-aktin Reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	49	20

3.2.10. Western blot yöntemi

Western blot, bir örnekteki proteinlerin belirlenmesi ve karakterizasyonu için hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntemde, protein örneğinin SDS-PAGE ile jel üzerine elektrotransferi gerçekleştirilir. Jeldeki görüntü daha sonra PVDF membrana aktarılır.

Membran ise spesifik primer ve sekonder antikorlar kullanılarak görüntüleme işlemine uygun hale getirilir. Veriler analiz edilerek değerlendirilir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Western blot yönteminin temel basamakları

3.2.10.a. Örneklerin hazırlanması

1. 25 cm²'lik flaskların her birisine 2x10⁶ hücre ekildi.
2. Daha sonra 5-FU, kuersetin, luteolin, bitkisel ekstraktlar ve bunların kombineleri, etkin dozlarına göre hücelere muamele edildi. Kontrol olarak bir flastaki hücelerin üzerine sadece kültür medyumu eklendi. 37°C'de, %95 nem ve %5-6 CO₂'li ortamda 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından flastlar iki kez PBS ile yıkandı.
3. Hüceleri içeren flastlar buz üzerine konuldu ve hücelerin üzerine soğuk PBS eklendi. Hüceleri flastın yüzeyinden toplamak için soğuk bir plastik kazıyıcı kullanıldı ve hücre süspansiyonları önceden soğutulmuş olan mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Tüpler 6600 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
4. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpün alt kısmında biriken hücelerin üzerine 200 µl lizis tamponu ilave edildi.
5. Tüp içerikleri birkaç kez pipet yardımıyla alınıp geri boşaltılarak homojen hale getirildi. Daha sonra tüpler 1 saat süreyle buz üzerinde bekletildi.
6. Tüpler 14 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüpler sallanmayacak bir şekilde alınarak buz üzerine kondu. Süpernatant kısımları buz üzerinde temiz tüplere alındı ve pelet kısımları atıldı.
7. Her bir örneğe ait hücre lizatının protein konsantrasyonunu belirlemek için 5'er µl lizat alındı. Kalan protein örneklerinin üzerine 60'ar µl 5X Laemmli örnek tamponu eklendi ve 98°C'de 5 dk süreyle çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Bu örnekler daha sonra kullanılacakları için degradasyonu önlemek amacıyla alikotlanarak -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.10.b. Örneklerdeki protein miktarlarının belirlenmesi

1. Örneklerdeki protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlendi (Bradford 1976). Bu yöntem, örneklerde bulunan proteinlerin Commasie blue G250 boyası ile bir kompleks oluşturmasına ve oluşan kompleksin spektrofotometrik olarak absorbans değerlerindeki farklılıklara neden olmasına dayanır. Bu yöntem için, hücre lizatlarının protein konsantrasyonunu belirlemek üzere alınan 5'er µl'lik lizatlar kullanıldı.

2. 15 ml'lik temiz bir falkon tüpüne Bradford solüsyonundan 5 ml konuldu ve üzerine 5 ml dH₂O ilave edildi.
3. Spektrofotometre küvetlerine 1'er ml bu karışımından (Bradford solüsyonu+dH₂O) kondu. K r küvete 5 µl lizis tamponu diğer küvetlere ise 5'er µl örnek eklendi.
4. 595 nm dalga boyunda köre karşı absorbanslar okutuldu. Absorbans değerleri kullanılarak standart bir grafik çizildi ve örnekler içerisindeki protein miktarları tayin edildi.

3.2.10.c. SDS-PAGE için jellerin hazırlanması ve yüklenmesi

1. Elektroforez için kullanılan iki cam levha karşılıklı olacak şekilde birleştirilip kısıkaçlı bir sistemle sabitlendi. İki cam levha arasında kalan boşluğa, üst seviyenin yaklaşık 1 cm altında olacak şekilde,  izelge 3.12'ye göre hazırlanan ayırma jeli otomatik pipet yardımıyla ilave edildi.
2. Jel yaklaşık 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Jelde polimerleşmenin olduktan sonra iki cam levhanın arasında kalan boşluğun üst kısmına tarak yerleştirildi.

Çizelge 3.12. SDS jel elektroforezi için kullanılacak ayırma jelinin hazırlanması (ml)

Jel Yüzdesi	%6	%8	%10	%12	%15
dH ₂ O	10,6	9,3	7,9	6,6	4,6
%30 Akril amid	4,0	5,3	6,7	8,0	10,0
1.5M Tris pH 8,8	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
%10 SDS	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
%10 APS	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
TEMED	0,016	0,0012	0,008	0,008	0,008
Toplam	20	20	20	20	20

3. Çizelge 3.13'e göre hazırlanan yükleme jeli, otomatik pipet ile tarak dişlerinin arasında kalan boşluğa en üst seviyeye gelecek kadar dolduruldu.

Çizelge 3.13. SDS jel elektroforezi için kullanılacak yükleme jelinin hazırlanması

Bileşen	10 ml	8 ml	6 ml	5 ml	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml
dH ₂ O	6,8	5,5	4,1	3,4	2,7	2,1	1,4	0,68
%30 Akril amid	1,7	1,3	1,0	0,83	0,67	0,5	0,33	0,17
1.5M Tris pH 8,8	1,25	1,0	0,75	0,63	0,5	0,38	0,25	0,13
% 10 SDS	0,1	0,08	0,06	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01
% 10 APS	0,1	0,08	0,06	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01
TEMED	0,01	0,008	0,006	0,005	0,004	0,003	0,002	0,001

4. 30 dk oda sıcaklığında bekletilerek yükleme jelinin polimerizasyonu sağlandı.

3.2.10.c. SDS-PAGE ile proteinlerin ayrılması

1. Bradford yöntemi sonucunda okunan absorbens değerlerine göre proteinler eşit miktarda olacak şekilde her bir kuyucuğa yüklendi (Çizelge 3.14).

Çizelge 3.14. Yüklene örnekler ve miktarları

Kuyucuk no	Örnek ismi	Absorbans Değeri (nm)	Yüklene miktar (µl)
1	Marker		5
2	Kontrol	1,347	14
3	5-FU	0,812	24
4	Kuersetin	0,843	23
5	Luteolin	0,911	22
6	5-FU+Q	0,821	23
7	5-FU+L	0,902	22
8	PEH	0,825	23
9	5-FU+PEH	0,867	23
10	AH	0,886	22
11	Marker		5
12	5-FU+ABH	0,843	23
13	PEK	0,807	24
14	5-FU+PEK	0,829	23
15	ABK	0,787	25
16	5-FU+ABK	0,820	23
17	PEM	0,871	23
18	5-FU+PEM	0,848	23
19	ABM	0,797	25
20	5-FU+ABM	0,849	23

2. Kaset sistemi elektroforez tankına yerleştirildi ve tankın içerisine yeterli miktarda SDS-PAGE 1X Running tamponu ilave edildi. Güç kaynağı çalıştırıldı.
3. Elektroforez cihazının güç kaynağı yaklaşık 30 dk süresince 50 Voltta çalıştırıldı.
4. Protein örnekleri ayırma jelini geçince yürüme hızı 100 Volta yükseltildi ve 90 dk sonra koşturma işlemi sonlandırıldı.
5. Elektroforez işlemi bittikten sonra iki cam levha birbirinden ayrılır ve aradaki jel çıkarılır. Jelin yükleme jeli kısmı kesilerek atıldı ve ayırma jeli kısmı ise 1X transfer tamponu içerisinde 15 dk bekletildi.

3.2.10.d. Proteinlerin jelden membrana aktarılması

1. PVDF membran jelin boyutlarında kesilir ve 15 saniye kadar metanolde bekletildi. 1X transfer tamponu ile durulandı.
2. Transfer kasetini oluşturmak üzere sünger üzerine hepsi 1X transfer tamponu ile ıslatılmış olan sırasıyla iki parça filtre kağıdı, PVDF membran, jel ve tekrar iki parça filtre kağıdı kondu. Bunların üstü ıslak süngerle örtüldü.
2. Transfer kaseti kapatıldı ve içinde hava kabarcığı kalmadığından emin olunduktan sonra kaset, içinde buz bloğu bulunan transfer tankına yerleştirildi.
4. 190 mA'de 2 saat süresince transfer gerçekleştirildi. Bu süre sonunda proteinlerin jelden membrana aktarıldığı görüldü.

3.2.10.e. Antibody inkübasyonu

1. Transfer kalitesini kontrol etmek için membran saf su ile durulandı ve Ponceau solüsyonu ile boyandı.
2. Ponceau solüsyonu uzaklaştırıldı ve membran üç kez TBST ile yıkandı.
3. Membran %5'lik bloklama çözeltisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
4. Daha sonra membran, dilüsyon oranları Çizelge 3.15'te gösterilen primer antikor solüsyonlarından herhangi birisinde +4°C'de bir gece bekletildi.

Çizelge 3.15. Western blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar

Primer antikor	Dilüsyon oranı	Sekonder antikor	Dilüsyon oranı
p53	1:500	Goat anti mouse IG-g HRP	1:1000
mTOR	1:1000	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:1000
PTEN	1:1000	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:1000
AKT	1:1000	Goat anti mouse IG-g HRP	1:1000
p38-MAPK	1:1000	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:1000
VEGF-R2	1:1000	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:1000
Bcl-2	1:500	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:1000
Bax	1:1000	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:1000
β -aktin	1:1000	Goat anti mouse IG-g HRP	1:1000

5. Ertesi gün membran, ilki 10 dk, sonrakiler 5'er dakika olmak üzere 5 kez TBST ile yıkandı.
6. Daha sonra HRP-konjugat sekonder antikor solüsyonunda (Çizelge 3.15) 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
7. Membran ilki 10 dk, sonrakiler 5'er dakika olmak üzere 5 kez TBST ile yıkandı.

3.2.10.e. Görüntüleme ve veri analizi

1. Membran, içinde 4'er ml ECL stok solüsyonu 1 ve ECL stok solüsyonu 2 olan kaba kondu ve 15 saniye kadar bu solüsyonların içinde çalkalandı. Bu solüsyonlar antikorun kemilüminesans sinyal oluşturmasını sağlar.
2. Membran kasete yerleştirildi ve kaset de cihaza (Carestream Medical XRay Processor) yerleştirildi.
3. Hedef proteinin bant yoğunluğunu okumak için Image J (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) görüntüleme analizi programı kullanıldı.
4. Hedef protein seviyesini normalize etmek için yüklenmiş olan kontrol proteininin seviyesi kullanıldı.

3.2.10.f. Stripping

Stripping, görüntüleme işlemi bitmiş olan bir membran tekrar kullanılmak istenirse yapılır. Stripping için uygun olan bir kap içerisinde membranın üzerine stripping tamponu eklendi. 50°C'de 45 dk boyunca çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Membran saf su ile durulandı. Daha sonra membran temiz bir kaba konularak 5 defa TBST ile yıkandı. Oda sıcaklığında 1 saat süreyle %5'lik bloklama çözeltisi içerisinde bloklama işlemi yapıldı. +4°C'de primer antikor solüsyonu içerisinde bir gece bekletildi. Bundan sonraki basamaklar yukarıda anlatıldığı şekilde uygulandı (sekonder antikor inkübasyonu, yıkama ve görüntüleme).

3.2.11. İstatistiksel Analiz

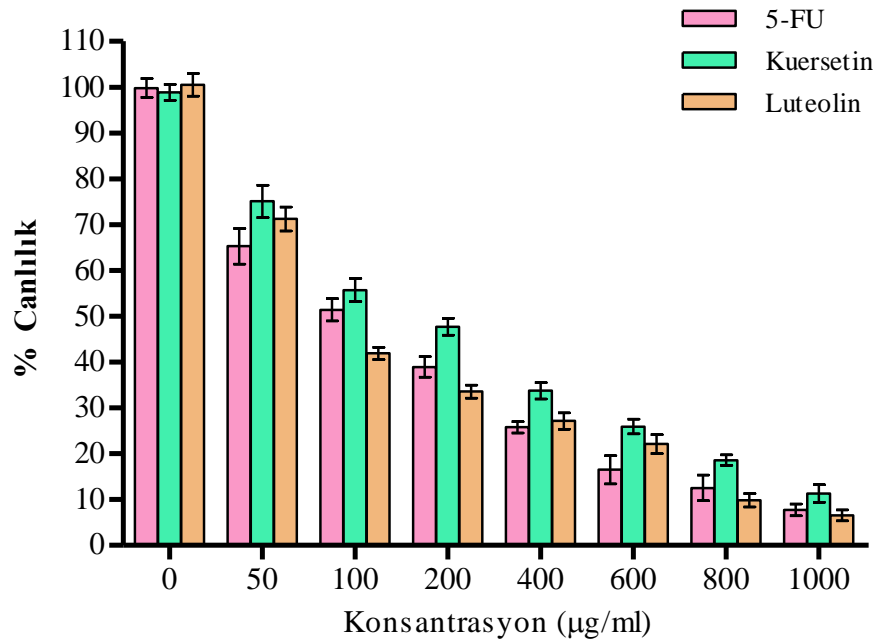
Tüm çalışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplandı. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulguların istatistiksel analizleri GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak t-testi ve One Way Anova testi ile değerlendirildi. 5-FU, bitkisel etken maddeler ve bitki ekstralarının tek tek ve kombine dozlarının izoblogram analizlerinde CompuSyn 1.0 programı (Chou and Martin 2007) kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

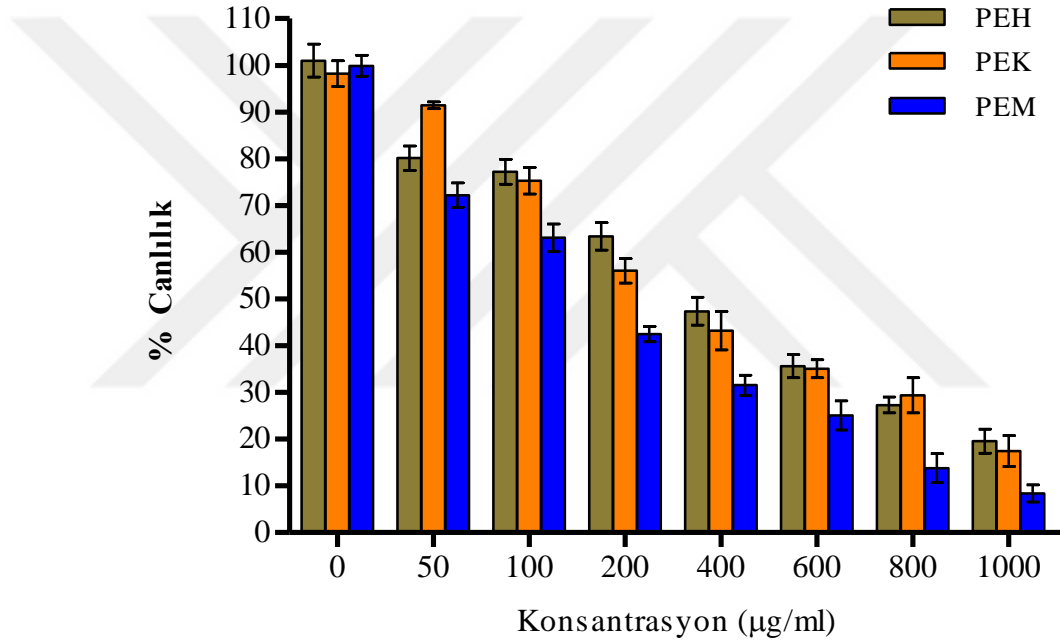
Çalışma kapsamında, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücrelerine 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde 5-Fluorouracil, kuersetin ve luteolin ile, ayrıca *Achillea biebersteinii* ve *Pistacia eurycarpa* bitkilerine ait polaritesi farklı çözücüler (hekzan, kloroform ve metanol) kullanılarak hazırlanmış olan bitkisel ekstratlar ile 24 saatlik tedavi uygulandı. 24 saatlik tedavinin ardından MTT testi ile % canlılık değerleri belirlendi. Hücre canlılığının, uygulanan tüm tedavilerde konsantrasyona bağlı olarak azaldığı görüldü.

100 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı oranı 5-FU için %51,4, kuersetin için %55,7 ve luteolin için %41,9 olarak bulundu. En yüksek konsantrasyonda ise hücre canlılığını 5-FU'nun %7,7'ye, kuersetinin %11,3'e ve luteolinin %6,6'ya düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.1).



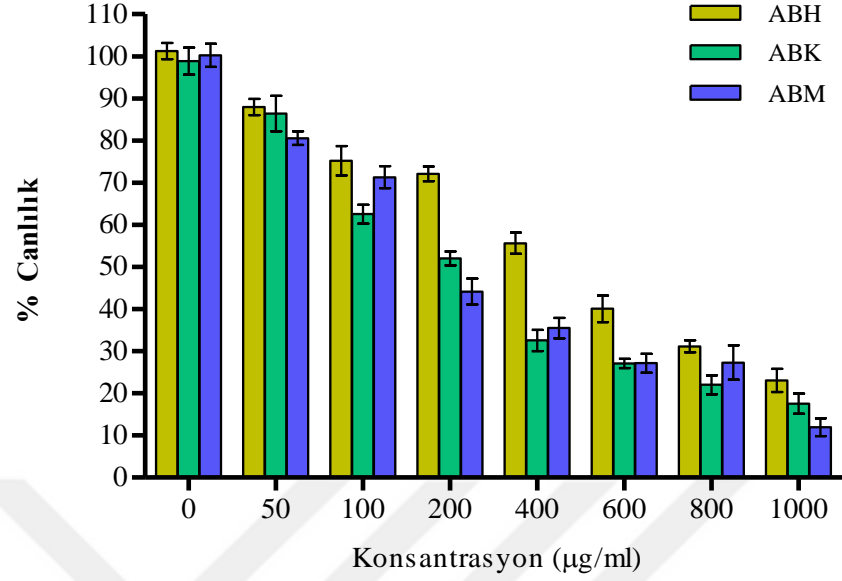
Şekil 4.1. 5-FU, kuersetin ve luteolinin HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi

P. eurycarpa bitkisine ait farklı polariteli çözücülerle hazırlanmış olan ekstrelerin özellikle yüksek dozlarda, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücrelerinin canlılığı üzerinde önemli bir antiproliferatif etkiye sahip olduğu görüldü. 200 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı oranı *P. eurycarpa* hekzan ekstresi için %63,4, kloroform ekstresi için %56 ve metanol ekstresi için %42,5 olarak bulundu. 1000 µg/ml konsantrasyonda ise hücre canlılığını, hekzan ekstresi %19,6'ya, kloroform ekstresi %17,5'e ve metanol ekstresi %8,4'e düşürdü (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *P. eurycarpa* bitkisine ait hekzan, kloroform ve metanol ekstralarının HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi

A. biebersteinii bitkisi, HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin canlılığının önemli derecede azalmasına neden oldu. Bitkiye ait hekzan, kloroform ve metanol ekstraları 200 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını sırasıyla %72,1, %52 ve %44,1'e düşürdü. 1000 µg/ml konsantrasyonda ise hücre canlılığı oranı hekzan ekstresi için %23,1, kloroform ekstresi için %17,5 ve metanol ekstresi için %12 olarak belirlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *A. biebersteinii* bitkisine ait hekzan, kloroform ve metanol ekstralarının HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi

4.2. IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

IC₅₀ değeri, hücrelerin yarısının çoğalmasını inhibe eden dozun sayısal değeridir. MTT canlılık testi sonucunda elde edilen konsantrasyona bağlı %canlılık değerleri kullanılarak uygulanan maddelerin her birine ait IC₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. HT-29 kolorektal kanser hücrelerine uygulanan maddelerin IC₅₀ değerleri (Ortalama değerler ± standart sapma)

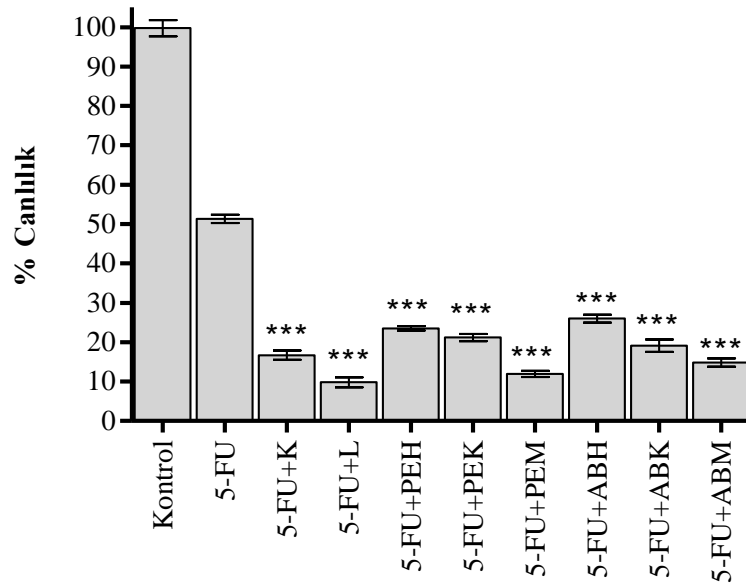
Örnek	IC ₅₀ (µg/ml)
5-FU	107,40±3,80
Kuersetin	176,60±5,10
Luteolin	83,10±2,20
PEH	362,50±6,30
PEK	314,90±5,20
PEM	158,70±3,90
ABH	473,50±7,60
ABK	211,20±4,10
ABM	184,60±3,30

En düşük IC_{50} değeri luteolin için $83,10 \pm 2,20$ $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplandı. Bu değerin 5-FU'nun IC_{50} değerine göre daha düşük olduğu görüldü. *P. eurycarpa* metanol ve *A. biebersteinii* metanol ekstrelerine ait IC_{50} değerleri sırasıyla $158,70 \pm 3,90$ $\mu\text{g/ml}$ ve $184,60 \pm 3,30$ $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi. *P. eurycarpa* metanol ekstresine ait IC_{50} değerinin kuersetine göre daha düşük olduğu görüldü. Bitki örneklerine ait diğer çözücü ekstrelerinin IC_{50} değerleri yukarıda bahsedilen değerlere göre daha yüksek bulundu.

5-FU, bitki ekstreleri ve bitki etken maddelerinin IC_{50} değerlerine karşılık gelen dozlar kullanılarak çalışmanın bundan sonraki basamakları gerçekleştirildi.

4.3. Bitki Ekstreleri ve Bitkisel Etken Maddelerin 5-FU ile Etkileşimlerinin İzobologram Analizi ile Belirlenmesi

Bitkisel etken maddelerin ve bitki ekstrelerinin IC_{50} dozları 5-FU ile kombine olarak hücrelere 24 saat süreyle uygulandı. Hücre kültürünün sonlandırılmasını takiben bu kombine gruplar için tekrar MTT testi uygulandı ve bu gruplara ait % canlılık oranları belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Bitkisel etken madde ve ekstrelerin IC_{50} dozlarının 5-FU ile kombinasyonlarına ait hücre canlılığı grafiği
***5-FU'ya göre $p < 0,0001$

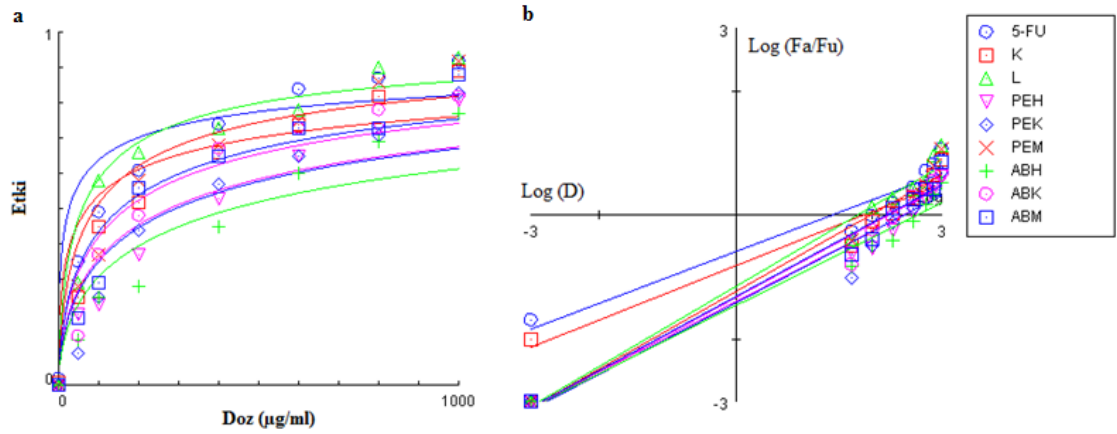
5-FU+K tedavisinde % hücre canlılığı $16,68 \pm 0,69$ olarak belirlendi. 5-FU'nun tek başına uygulanması ile 5-FU+kuersetin kombinasyonu karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,0001$).

5-FU+luteolin kombinasyonu ile tedavi edilen hücrelerde % canlılık $9,83 \pm 0,73$ olarak bulundu. Bu sonuç 5-FU uygulanan grupla karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,0001$).

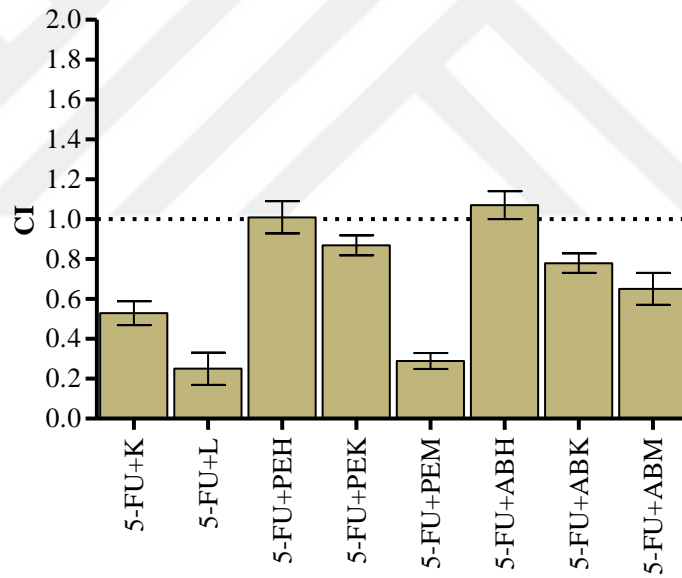
5-FU ile *P. eurycarpa* hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri kombinasyonları % hücre canlılığını sırasıyla $23,53 \pm 0,35$; $21,21 \pm 0,54$ ve $11,97 \pm 0,46$ 'ya düşürdü. Her üç sonuç, yalnız 5-FU uygulanan grupla karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,0001$).

5-FU ile *A. biebersteinii* hekzan, kloroform ve metanol ekstrelerinin kombinasyon olarak uygulanması sonucunda % hücre canlılığı sırasıyla $26,00 \pm 0,60$; $19,13 \pm 0,90$ ve $14,86 \pm 0,59$ olarak bulundu. Tüm *A. biebersteinii* ekstrelerinin 5-FU ile kombinasyonları sadece 5-FU uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,0001$).

HT-29 kolorektal kanser hücrelerine uygulanan maddelere ait konsantrasyon - %canlılık değerleri kullanılarak CompuSyn (version 1.0) programı ile doz-etki ve medyan-etki grafikleri çizildi (Şekil 4.5). Daha sonra kombine tedavilere ait %canlılık değerleri programa eklendi. Kombine tedaviler ile maddelerin tek uygulanmaları sonucu bulunan sonuçlar kıyaslanıp kombinasyon gruplarına ait kombinasyon indeksi (CI) değerleri elde edildi (Şekil 4.6). Sonuçlar medyan-etki yöntemi ile analiz edildi (Chou 2006).



Şekil 4.5. Örneklere ait doz-etki (a) ve medyan-etki (b) grafikleri



Şekil 4.6. Bitkisel etken madde ve ekstraların IC_{50} dozlarının 5-FU ile kombinasyonlarına ait kombinasyon indeksleri (CI)

5-FU+K ve 5-FU+ABM kombinasyonlarına ait CI değerleri sırasıyla $0,53\pm 0,04$ ve $0,65\pm 0,03$ olarak belirlendi. Bu değerler, 5-FU ile kuersetin veya *A. biebersteinii* metanol ekstresi kombine olarak uygulandığında HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücrelerinde sinerjistik etkilere sahip olduklarını göstermektedir.

5-FU+L ve 5-FU+PEM tedavileri için CI değerleri sırasıyla $0,25\pm0,05$ ve $0,29\pm0,02$ olarak bulundu. Bu değerlere dayanarak her iki kombinasyonun da gcl sinerjistik etkiye sahip olduğu belirlendi.

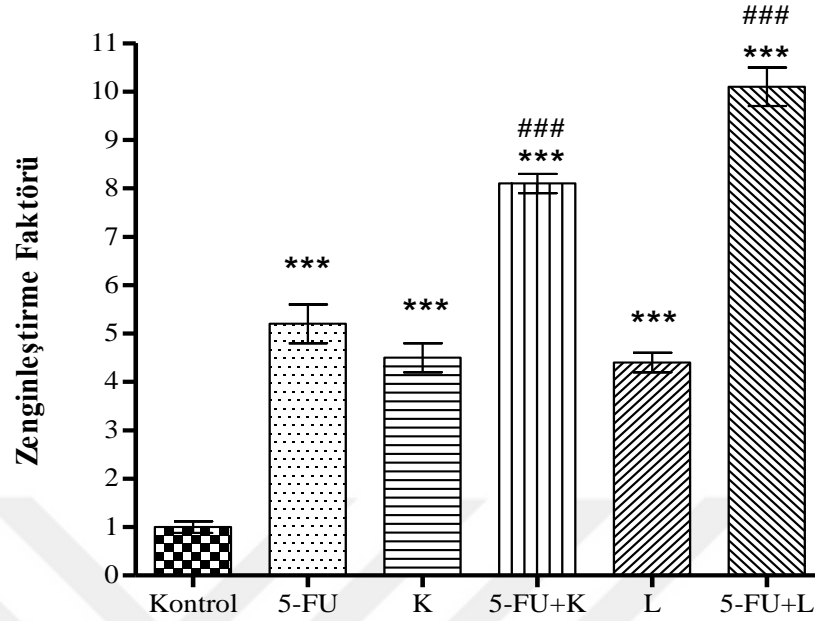
5-FU+ABK kombinasyonunun ılımlı sinerjizm ($CI=0,78\pm0,05$), 5-FU+PEK ($CI=0,87\pm0,03$) kombinasyonunun ise hafif sinerjizm etkilerine sahip oldukları belirlendi. 5-FU+PEH ($CI=1,01\pm0,05$) ve 5-FU+ABH ($CI=1,07\pm0,03$) kombinasyonlarının aditif etki gösterdikleri saptandı.

4.4. Apoptoz Analizleri

4.4.1. Apoptozun kolorimetrik analizi (Cell death detection ELISA bulguları)

Hücrede meydana gelen apoptoz sonucunda DNA'da internükleozomal kırılmalar meydana gelir. CDDE yönteminde DNA'daki bu kırılmalar sonucunda oluşan mono- ve oligo-nükleozomların oranındaki artış zenginleştirme faktörü olarak ifade edilir. Kontrol grubu için bu değer 1,0 olarak kabul edildi ve uygulanan tedaviler sonucunda hücrelerdeki apoptoz artışı kolorimetrik olarak belirlendi.

5-FU uygulanan grupta kontrole göre apoptozda 5,2 kat yükseliş görüldü ($p<0,0001$). Kuersetin ve luteolin ile tedavi edilen gruplarda ise apoptoz kontrole göre sırasıyla 4,5 ve 4,4 kat yükseldi ($p<0,0001$). Kontrole göre, 5-FU+K ile tedavi edilen hücrelerde 8,1 kat ve 5-FU+L uygulanan hücrelerde ise 10,1 kat apoptozun tetiklendiği söylenebilir ($p<0,0001$). 5-FU+K ve 5-FU+L ile tedavi edilen hücreler ile 5-FU uygulanan hücreler kıyaslandığında, aradaki apoptoz artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,0001$) (şekil 4.7).

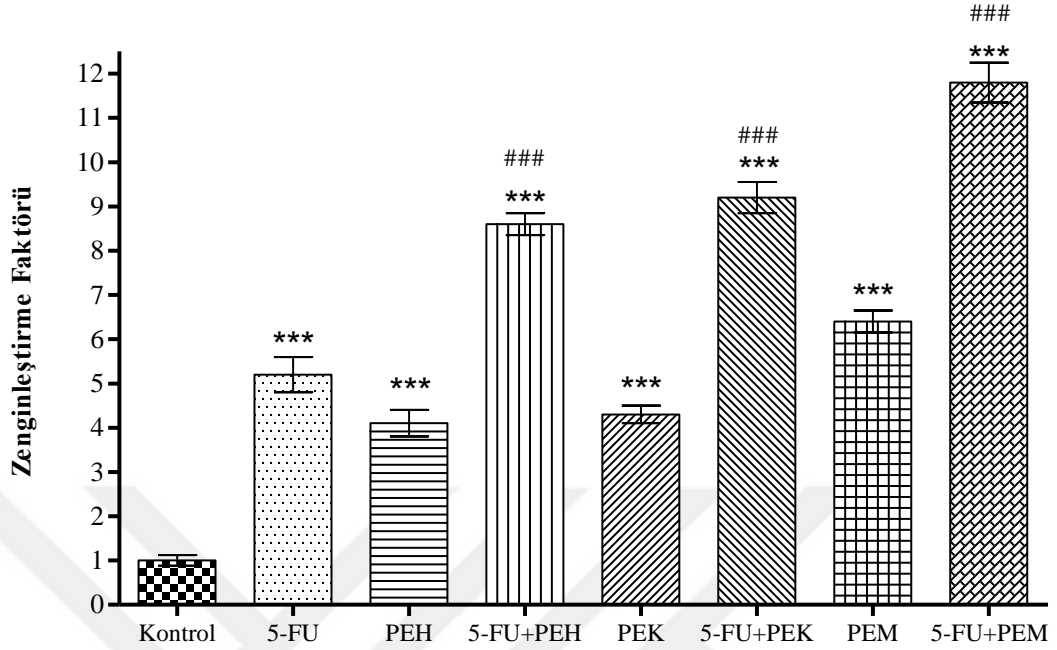


Şekil 4.7. 5-FU, kuersetin, luteolin, 5-FU+K ve 5-FU+L tedavilerinin HT-29 kolorektal kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi

***Kontrolle göre $p < 0,0001$; ### 5-FU'ya göre $p < 0,0001$

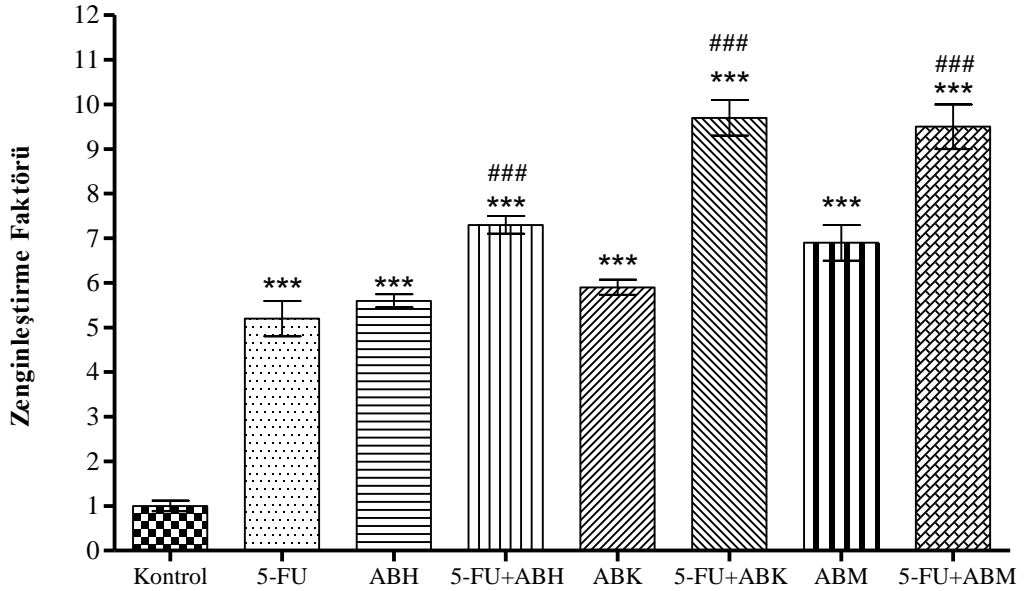
P. eurycarpa hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri ile tedavi edilen hücrelerde apoptozun kontrole göre sırasıyla 4,1; 4,3 ve 6,4 kat artış gösterdiği görüldü ($p < 0,0001$). Apoptozun 5-FU+PEH, 5-FU+PEK ve 5-FU+PEM uygulanan gruplarda ise kontrole göre 8,6; 9,2 ve 11,8 kat yükseldiği belirlendi ($p < 0,0001$). Kombine tedaviler uygulanan her üç grup sadece 5-FU ile muamele edilen hücrelerle kıyaslandığında aradaki değişim istatistiksel olarak anlamlı görüldü ($p < 0,0001$). Tüm tedavi grupları içerisinde apoptozdaki en büyük artış 5-FU+PEM uygulanan hücrelerde görüldü (Şekil 4.8).

Kontrol grubu ile kıyaslandığında *A. biebersteinii* hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri uygulanan hücrelerde apoptoz artış oranı sırasıyla 5,6; 5,9 ve 6,9 kat olarak belirlendi ($p < 0,0001$). *A. biebersteinii* kombinasyon tedavileri, hem kontrole hem de 5-FU uygulanan grupla kıyaslandığında apoptoz oranları arasındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,0001$). 5-FU ile kombine olarak uygulanan *A. biebersteinii* hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri kontrole göre apoptoz oranlarını sırasıyla 7,3; 9,7 ve 9,5 kat yükseltti (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. *P.eurycarpa* ekstralarının ve kombinasyonların HT-29 kolorektal kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi

***Kontrolle göre $p < 0,0001$; ### 5-FU'ya göre $p < 0,0001$

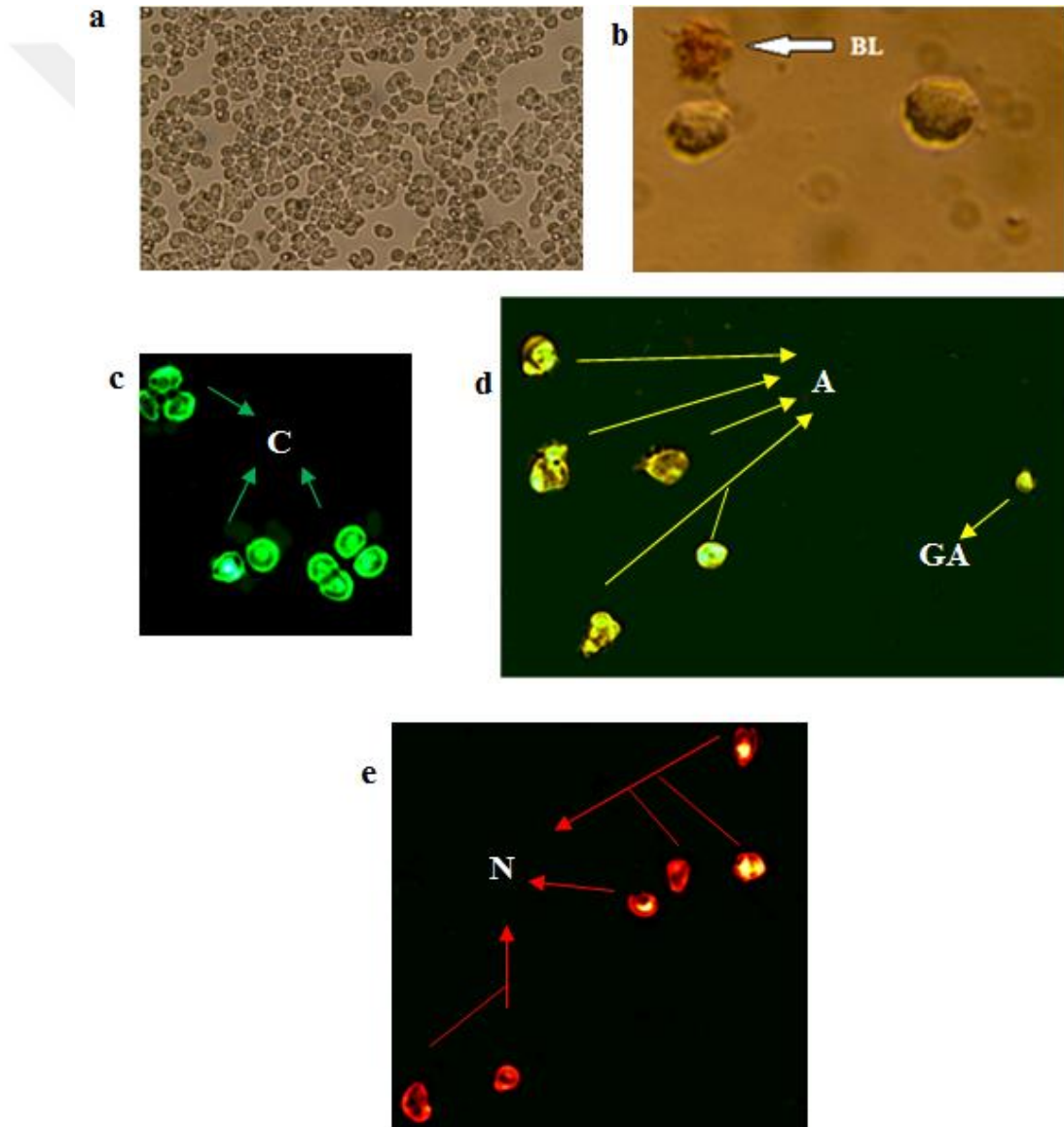


Şekil 4.9. *A.biebersteinii* ekstralarının ve kombinasyonların HT-29 kolorektal kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi

***Kontrolle göre $p < 0,0001$; ### 5-FU'ya göre $p < 0,0001$

4.4.2. Canlı, apoptotik ve nekrotik hücre indeksleri

Akridin oranj ve etidyum bromid ile boyanan tedavi uygulanmış hücrelerin canlılık, apoptoz ve nekroz oranları floresan ataçmanlı mikroskop altında değerlendirildi (Şekil 4.10). Seçilen alanlarda 100 adet hücre sayılana kadar tarama işlemine devam edildi. Bu işlem en az üç kez tekrarlandı ve canlı, apoptotik ve nekrotik hücre sayıları standart sapmalarıyla birlikte ifade edildi (Çizelge 4.2).



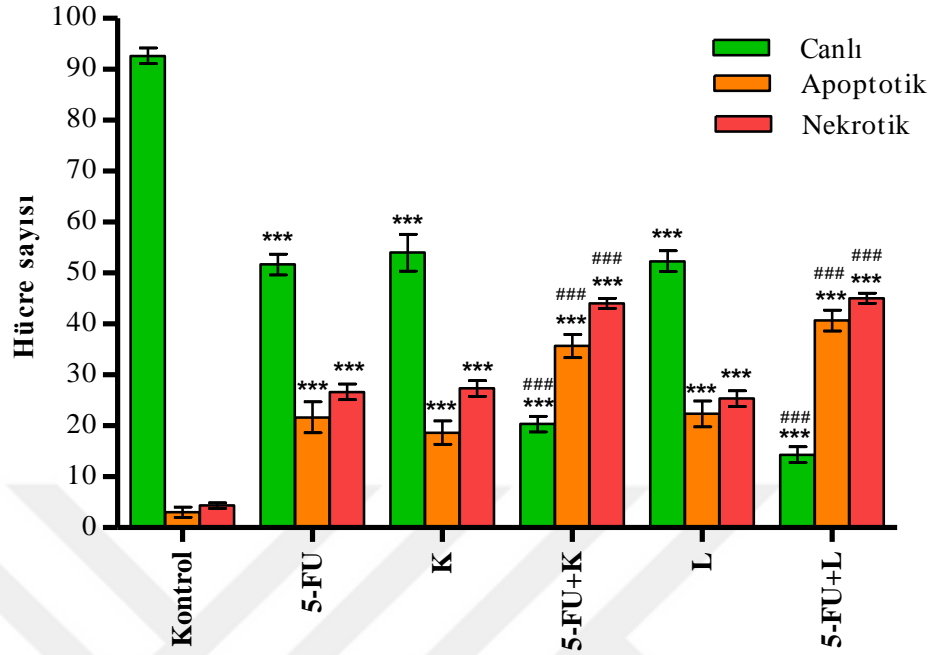
Şekil 4.10. (a) HT-29 kolorektal kanser hücreleri. (b) Apoptotik hücrelerin karakteristik özelliği olan membrandaki bleblenme (BL). (c) Canlı hücreler (C). (d) Apoptotik hücreler (A) ve geç apoptoz (GA) fazındaki hücre. (e) Nekrotik hücreler (N).

Çizelge 4.2. Uygulanan tedavilerin HT-29 kolorektal kanser hücrelerindeki canlı, apoptotik ve nekrotik hücre indeksleri (Ortalama değerler \pm standart sapma)

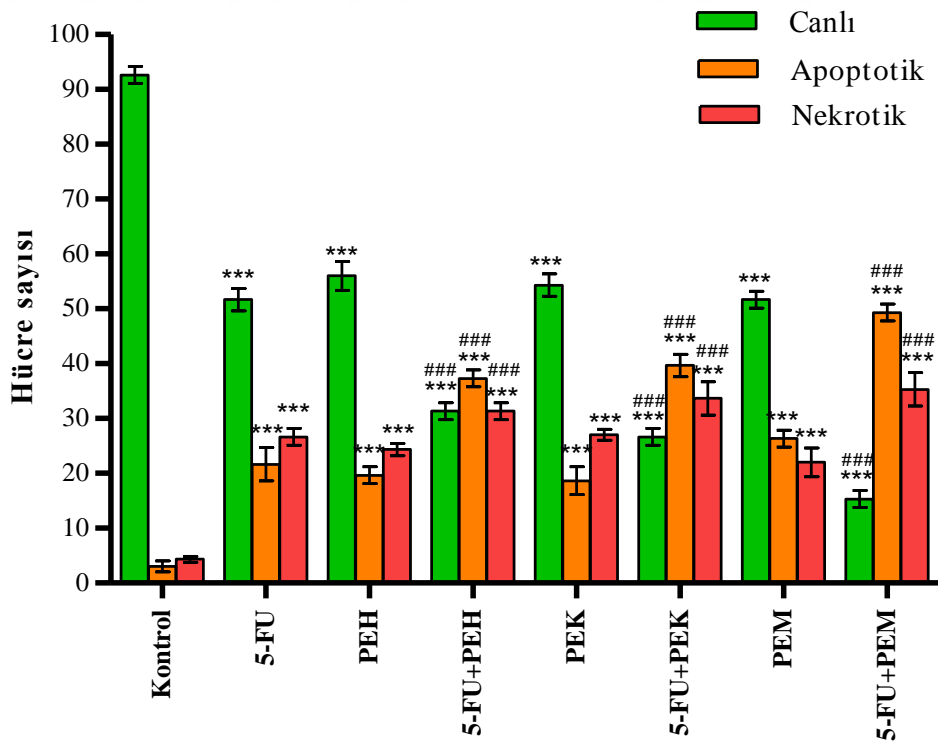
	Canlı	Apoptotik	Nekrotik
Kontrol	92,70 \pm 1,53	3,00 \pm 1,00	4,30 \pm 0,60
5-FU	51,70 \pm 2,08	21,70 \pm 3,06	26,60 \pm 1,55
K	54,00 \pm 3,60	18,70 \pm 2,31	27,30 \pm 1,53
5-FU+K	20,30 \pm 1,52	35,70 \pm 2,37	44,00 \pm 1,00
L	52,30 \pm 2,08	22,30 \pm 2,52	25,40 \pm 1,52
5-FU+L	14,30 \pm 1,53	40,70 \pm 2,10	45,00 \pm 1,00
PEH	56,00 \pm 2,65	19,70 \pm 1,53	24,30 \pm 1,16
5-FU+PEH	31,3 \pm 1,52	37,30 \pm 1,73	31,40 \pm 1,58
PEK	54,30 \pm 2,08	18,70 \pm 2,51	27,00 \pm 1,00
5-FU+PEK	26,70 \pm 1,52	39,60 \pm 2,09	33,70 \pm 3,06
PEM	51,70 \pm 1,53	26,30 \pm 1,93	22,00 \pm 2,64
5-FU+PEM	15,30 \pm 1,85	49,30 \pm 1,35	35,40 \pm 3,05
ABH	54,30 \pm 3,21	21,30 \pm 2,08	24,40 \pm 1,52
5-FU+ABH	32,30 \pm 2,01	31,40 \pm 1,58	36,30 \pm 1,69
ABK	53,70 \pm 2,51	22,70 \pm 1,16	23,60 \pm 3,51
5-FU+ABK	25,30 \pm 2,50	41,40 \pm 3,06	33,30 \pm 2,08
ABM	55,30 \pm 2,18	28,00 \pm 3,00	16,70 \pm 2,01
5-FU+ABM	23,70 \pm 1,52	42,30 \pm 2,52	34,00 \pm 4,00

5-FU, kuersetin, luteolin, 5-FU+K ve 5-FU+L uygulanan grupların tamamında kontrole göre canlı hücre sayısı anlamlı bir şekilde azalırken, apoptotik ve nekrotik hücre sayılarının anlamlı şekilde arttığı görüldü ($p<0,0001$). 5-FU+K ve 5-FU+L tedavisi uygulanan hücreler 5-FU ile muamele edilen grupla karşılaştırıldığında, canlı hücre sayılarında anlamlı azalış görülürken, apoptotik ve nekrotik hücre sayılarında anlamlı bir artış görüldü ($p<0,0001$) (Şekil 4.11).

P. eurycarpa ekstreleri ve bunların 5-FU ile kombinasyonları ile tedavi edilen tüm gruplarda kontrole göre canlı hücre sayıları azalırken, apoptotik ve nekrotik hücre sayıları arttı ($p<0,0001$). *P. eurycarpa* ekstrelerinin 5-FU ile kombinasyonlarının uygulandığı hücreler 5-FU tedavisi uygulanan grup ile karşılaştırıldığında canlı hücre sayılarının anlamlı bir şekilde düştüğü, apoptotik ve nekrotik hücre sayılarının ise anlamlı şekilde arttığı görüldü ($p<0,0001$) (Şekil 4.12).

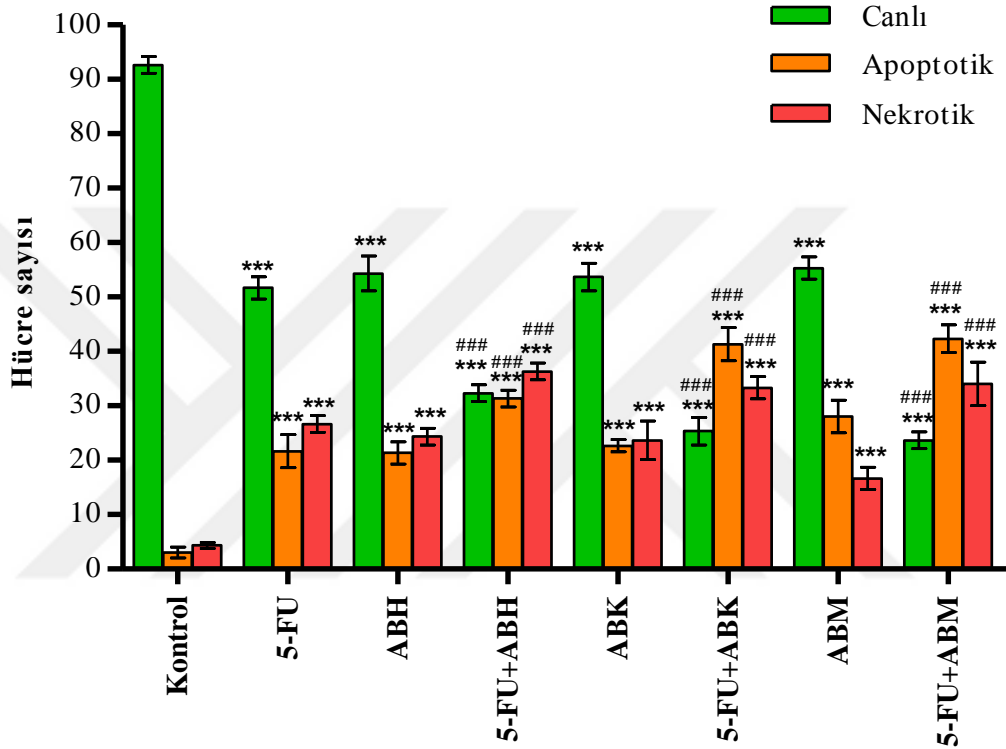


Şekil 4.11. Kuersetin ve luteolinin ayrı ayrı ve 5-FU ile kombine tedavileri ile HT-29 kolorektal kanser hücrelerine ait canlı, apoptotik ve nekrotik hücre indeksleri
***Kontrolle göre $p < 0,0001$; ###5-FU'ya göre $p < 0,0001$



Şekil 4.12. *P. eurycarpa* hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri ile bu ekstrelerin 5-FU ile kombinasyonlarına ait canlı, apoptotik ve nekrotik hücre indeksleri
***Kontrolle göre $p < 0,0001$; ###5-FU'ya göre $p < 0,0001$

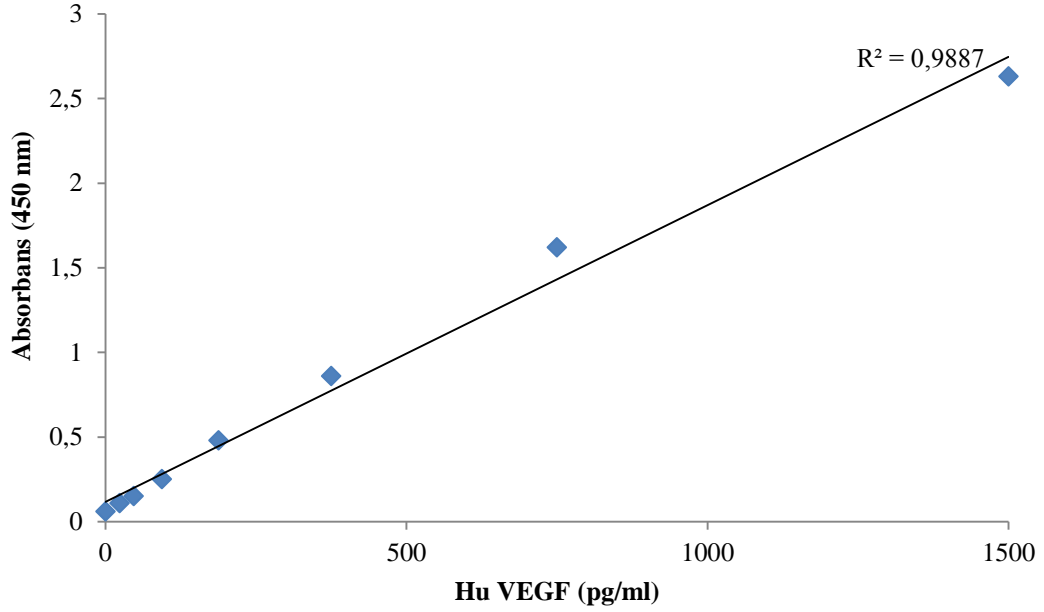
A. biebersteinii hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri kontrole göre hücre canlılığını azaltırken, apoptotik ve nekrotik hücre sayısını arttırdı ($p<0,0001$). Bu ekstrelerin 5-FU ile kombinasyonları ise 5-FU'ya göre hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azaltırken, apoptotik ve nekrotik hücre sayılarını anlamlı oranda yükseltti ($p<0,0001$) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *A. biebersteinii* hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri ile bu ekstrelerin 5-FU ile kombinasyonlarına ait canlı, apoptotik ve nekrotik hücre indeksleri
***Kontrole göre $p<0,0001$; ###5-FU'ya göre $p<0,0001$

4.5. Human VEGF ELISA Bulguları

Human VEGF ELISA kitinde bulunan Hu VEGF standartı çeşitli oranlarda seyreltildi ve 450 nm dalga boyunda absorbanslar okutularak standart grafik çizildi (Şekil 4.14). Bu grafiğe göre pg/ml cinsinden Hu VEGF miktarları belirlendi.



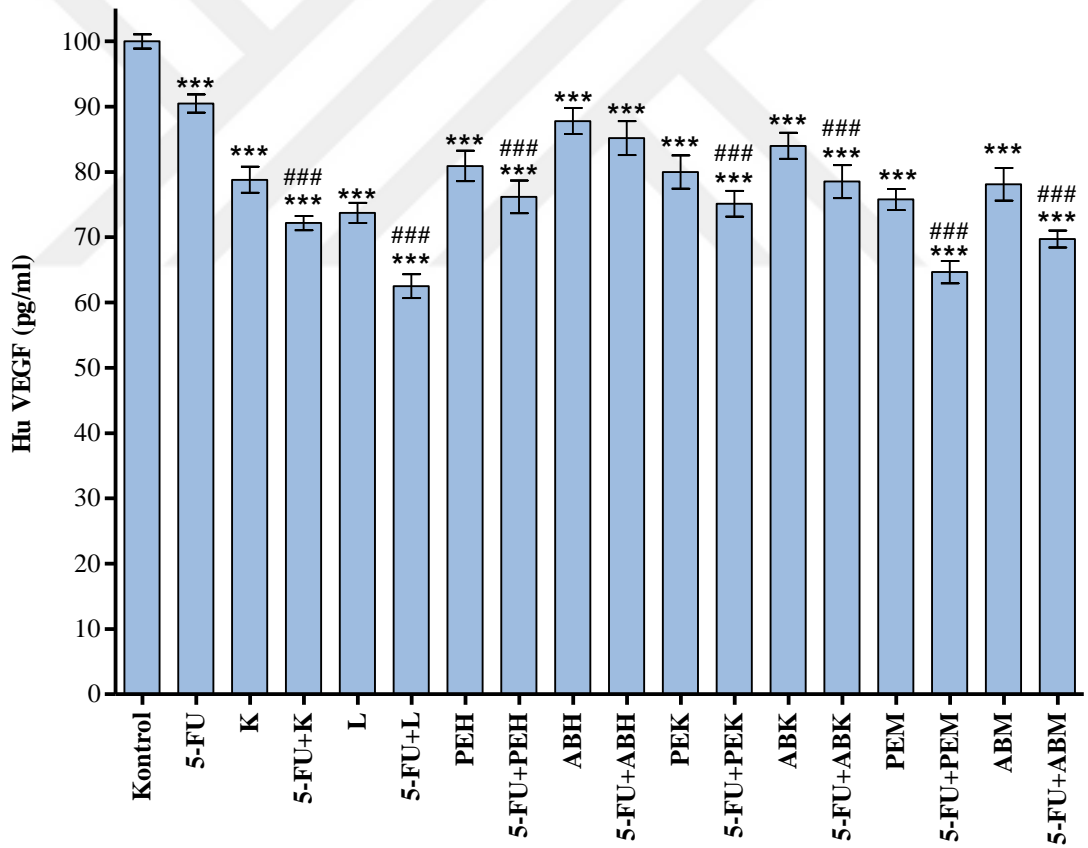
Şekil 4.14. Hu VEGF standart grafiği

Standart grafik kullanılarak Hu VEGF miktarı kontrol için $100 \pm 1,1$ pg/ml olarak normalize edildi. 5-FU uygulanan hücre grubunun VEGF miktarı $90,5 \pm 1,4$ pg/ml olarak belirlendi ve bu sonuç kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,0001$).

Kuersetinin tek başına uygulandığı hücrelerde VEGF miktarı $78,8 \pm 2$ pg/ml olarak bulundu ve kontrol grubuna göre anlamlı bir azalış görüldü ($p < 0,0001$). 5-FU+K kombinasyonu ile tedavi edilen hücrelerdeki VEGF miktarı ise $72,2 \pm 1,1$ pg/ml olarak tespit edildi ve bu kombinasyon hem kontrol hem de 5-FU ile kıyaslandığında aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.15).

Luteolin tek başına uygulandığında hücrelerde $73,7 \pm 1,6$ pg/ml VEGF, 5-FU ile kombine halde uygulandığında ise $62,5 \pm 1,8$ pg/ml VEGF değerleri elde edildi. Luteolin uygulanan grupla kontrol arasındaki ve 5-FU+L uygulanan hücrelerle 5-FU uygulanan grup arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.15).

P. eurycarpa hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri uygulanan hücrelerde VEGF miktarı sırasıyla $80,9 \pm 2,3$ pg/ml, $80 \pm 0,25$ pg/ml ve $75,8 \pm 1,6$ pg/ml olarak bulundu. Bu sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında aradaki farklar istatistiki olarak anlamlı görüldü ($p < 0,0001$). VEGF miktarı, 5-FU+PEH kombinasyonu uygulanan hücrelerde $76,2 \pm 2,5$ pg/ml, 5-FU+PEK kombinasyonu ile tedavi edilen hücrelerde $75,1 \pm 2,0$ pg/ml ve 5-FU+PEM kombinasyonu uygulanan grupta ise $64,7 \pm 1,7$ pg/ml olarak belirlendi. *P. eurycarpa* kombinasyonları ile tedavi edilen gruplar, sadece 5-FU uygulanan hücrelerle kıyaslandığında aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. HT-29 kolorektal kanser hücrelerine uygulanan maddelere göre VEGF miktarlarında görülen değişiklikler

***Kontrolle göre $p < 0,0001$; ###5-FU'ya göre $p < 0,0001$

A. biebersteinii hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri ile tedavi edilen hücrelerde VEGF miktarı sırasıyla $87,8 \pm 2,0$ pg/ml, $84 \pm 2,0$ pg/ml ve $78,1 \pm 2,5$ pg/ml olarak belirlendi. Bu sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında aradaki farklar istatistiki olarak anlamlı görüldü ($p < 0,0001$). 5-FU+ABH, 5-FU+ABK ve 5-FU+ABM kombinasyonları ile tedavi edilen hücrelerde VEGF miktarı sırasıyla $85,2 \pm 2,6$ pg/ml, $78,5 \pm 2,5$ pg/ml ve $69,7 \pm 1,3$ pg/ml olarak bulundu. 5-FU uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında, 5-FU+ABK ve 5-FU+ABM uygulanan gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı görüldü ($p < 0,0001$) (Şekil 4.15).

4.6. Gen Ekspresyonlarına Ait Bulgular

HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücrelerinde 5-FU, kuersetin, luteolin, *P. eurycarpa* ve *A. biebersteinii* ekstrelerinin yanı sıra, bu bitkisel etken maddelerin ve ekstrelerin 5-FU ile kombinasyonlarının p53, Bcl-2, Bax, mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK genlerine ait mRNA ekspresyonları üzerine olan etkileri değerlendirildi. Genlere ait mRNA ekspresyon seviyelerini hesaplamak için $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodu kullanıldı (Livak and Schmittgen 2001). Sonuçlar β -aktin mRNA ekspresyon düzeyi kullanılarak normalize edildi.

p53, Bcl-2 ve Bax genlerine ait mRNA ekspresyonlarının kontrol gruplarına göre artış ve azalış oranları hesaplandı (Çizelge 4.3).

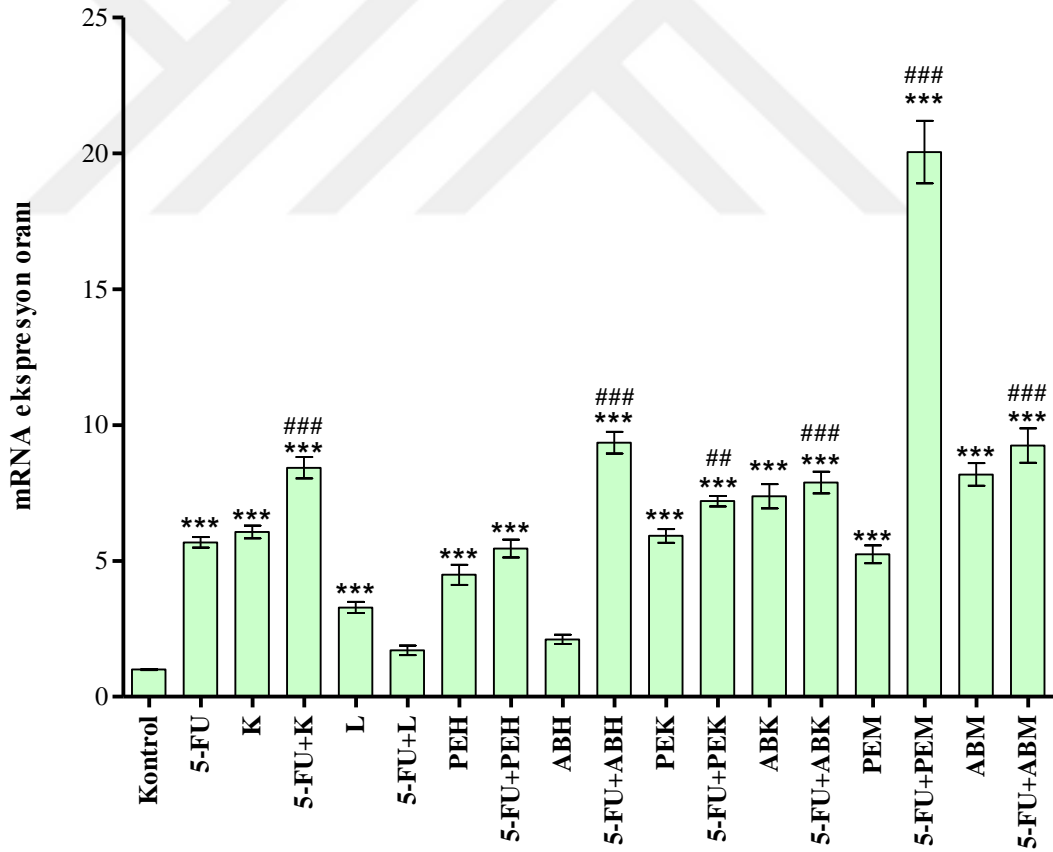
Çizelge 4.3. p53, Bcl-2 ve Bax genlerine ait mRNA ekspresyonu oranları (Ortalama değerler \pm standart sapma)

	p53	Bcl-2	Bax
Kontrol	$1,00 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,03$
5-FU	$5,68 \pm 0,19$	$0,41 \pm 0,03$	$1,35 \pm 0,03$
Kuersetin	$6,06 \pm 0,24$	$0,45 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,03$
5-FU+K	$8,43 \pm 0,39$	$0,32 \pm 0,02$	$1,65 \pm 0,04$
Luteolin	$3,29 \pm 0,21$	$0,24 \pm 0,04$	$1,07 \pm 0,05$
5-FU+L	$1,71 \pm 0,17$	$0,28 \pm 0,02$	$1,42 \pm 0,04$
PEH	$4,49 \pm 0,37$	$0,41 \pm 0,02$	$2,78 \pm 0,09$

Çizelge 4.3. (devam)

5-FU+PEH	5,45±0,33	0,47±0,04	2,39±0,07
ABH	2,11±0,17	0,33±0,04	2,09±0,09
5-FU+ABH	9,35±0,40	0,35±0,05	1,90±0,06
PEK	5,92±0,25	0,43±0,02	1,71±0,08
5-FU+PEK	7,20±0,20	0,26±0,04	1,09±0,05
ABK	7,38±0,45	0,34±0,02	1,48±0,07
5-FU+ABK	7,88±0,40	0,39±0,02	1,07±0,04
PEM	5,24±0,33	0,45±0,03	1,19±0,04
5-FU+PEM	20,05±1,15	0,47±0,03	1,79±0,12
ABM	8,18±0,42	0,27±0,02	1,31±0,05
5-FU+ABM	9,25±0,63	0,41±0,02	1,69±0,07

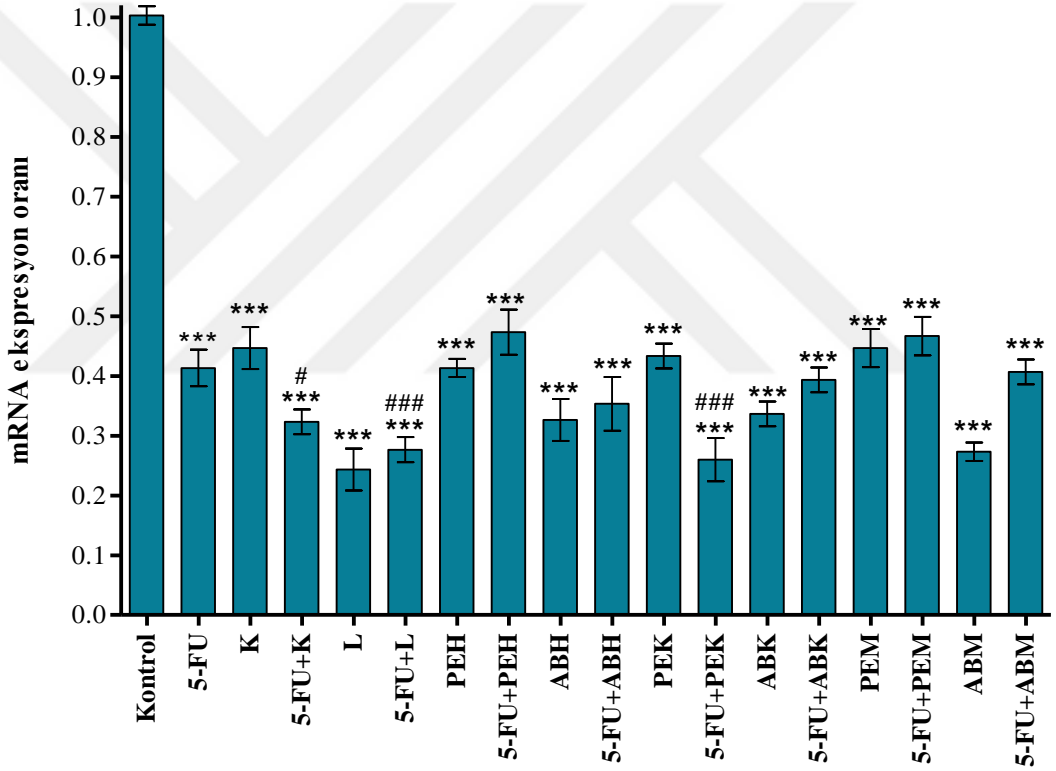
p53 mRNA seviyeleri kontrol ile karşılaştırıldığında, luteolin ve *A. biebersteinii* hekzan ekstresi dışında kalan tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p < 0,0001$). 5-FU ile kombine olarak kuersetin, *P. eurycarpa* metanol ekstresi ve *A. biebersteinii* hekzan, kloroform ve metanol ekstraları uygulanan gruplardaki p53 mRNA seviyelerindeki artışlar, 5-FU tedavisi uygulanan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı bulundu ($p < 0,0001$). p53 mRNA seviyesindeki en fazla artış, 5-FU ile *P. eurycarpa* metanol ekstresinin kombine olarak uygulandığı grupta görüldü. 5-FU uygulanan grupla karşılaştırıldığında, 5-FU+*P.eurycarpa* kloroform ekstresi kombinasyonu ile tedavi edilen hücrelerin p53 mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p < 0,01$) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. p53 genine ait mRNA ekspresyon oranları

***Kontrolle göre $p < 0,0001$; ##5-FU'ya göre $p < 0,01$; ###5-FU'ya göre $p < 0,0001$

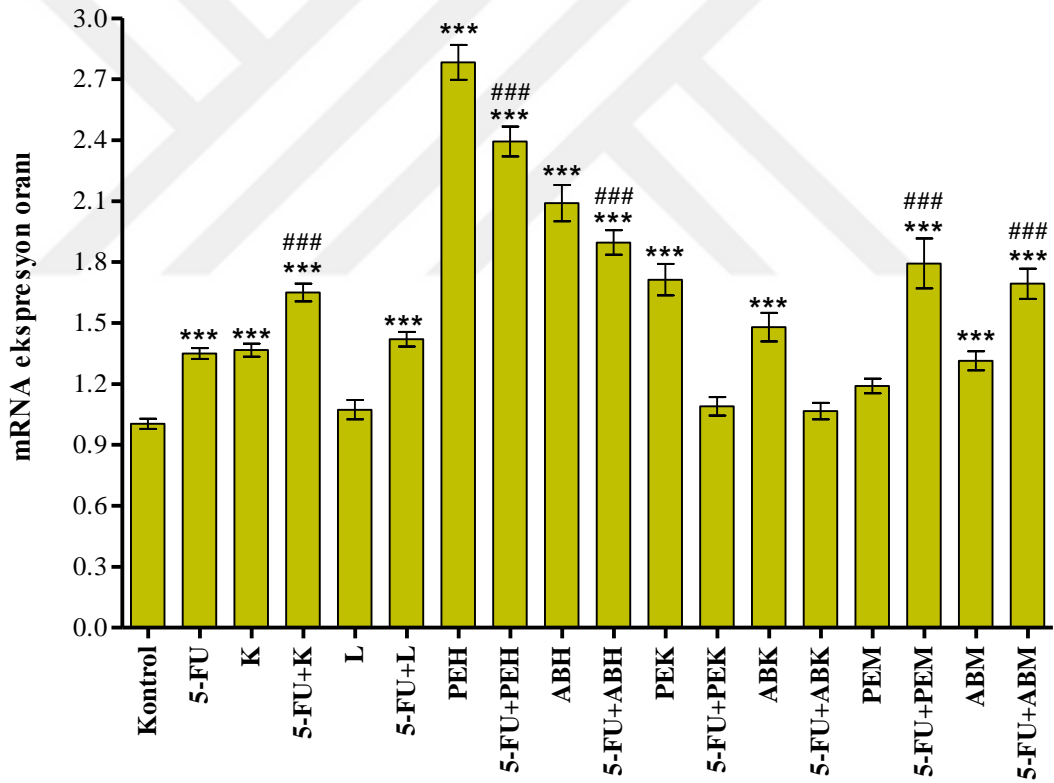
Bcl-2 mRNA ekspresyon oranları tüm tedavi gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdi ($p<0,0001$). Kombinasyonların uygulandığı gruplar 5-FU ile karşılaştırıldığında, 5-FU+K ($p<0,05$), 5-FU+L ($p<0,0001$) ve 5-FU+PEK ($p<0,0001$) uygulanan gruplarda Bcl-2 genine ait mRNA ekspresyon düzeylerindeki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, diğer kombinasyon gruplarındaki değişim anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Bcl-2 mRNA seviyesindeki en fazla azalış luteolin uygulanan grupta görüldü (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Bcl-2 genine ait mRNA ekspresyon oranları

***Kontrole göre $p<0,0001$; #5-FU'ya göre $p<0,05$; ###5-FU'ya göre $p<0,0001$

Bax genine ait mRNA ekspresyon oranlarındaki artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında L, 5-FU+PEK, PEM ve 5-FU+ABK ile tedavi edilen gruplar dışındaki tüm örneklerde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,0001$). 5-FU uygulanan grupla karşılaştırıldığında ise, 5-FU+K, 5-FU+PEH, 5-FU+ABH, 5-FU+PEM ve 5-FU+ABM tedavisi uygulanan gruplardaki Bax mRNA oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0,0001$); 5-FU+L, 5-FU+PEK ve 5-FU+ABK tedavisi uygulanan gruplardaki değişim anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Bax mRNA seviyesindeki en fazla artış *P. eurycarpa* hekzan ekstresinin uygulandığı grupta görüldü (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Bax genine ait mRNA ekspresyon oranları

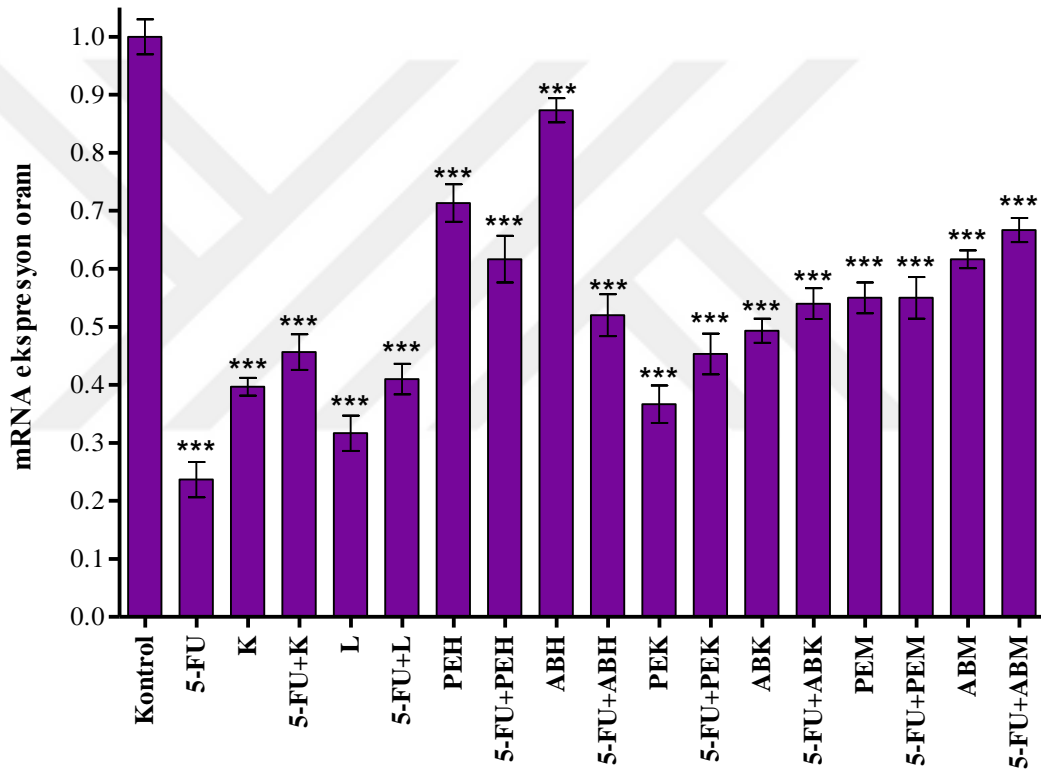
***Kontrolle göre $p<0,0001$; ###5-FU'ya göre $p<0,0001$

mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK genlerine ait mRNA ekspresyon oranlarının kontrol gruplarına göre değişimleri hesaplandı (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK genlerine ait mRNA ekspresyon oranları (Ortalama değerler \pm standart sapma)

	mTOR	Akt	PTEN	p38 MAPK
Kontrol	1,00 \pm 0,03	1,00 \pm 0,01	1,00 \pm 0,02	1,00 \pm 0,03
5-FU	0,24 \pm 0,03	0,76 \pm 0,02	1,01 \pm 0,03	1,69 \pm 0,04
Kuersetin	0,40 \pm 0,02	0,33 \pm 0,05	1,36 \pm 0,06	2,07 \pm 0,09
5-FU+K	0,46 \pm 0,03	0,39 \pm 0,04	3,54 \pm 0,08	3,55 \pm 0,06
Luteolin	0,32 \pm 0,03	0,29 \pm 0,04	3,10 \pm 0,06	2,94 \pm 0,08
5-FU+L	0,41 \pm 0,03	0,22 \pm 0,03	3,29 \pm 0,07	3,26 \pm 0,06
PEH	0,71 \pm 0,03	0,34 \pm 0,04	2,90 \pm 0,09	2,71 \pm 0,10
5-FU+PEH	0,62 \pm 0,04	0,47 \pm 0,03	3,53 \pm 0,13	3,56 \pm 0,09
ABH	0,87 \pm 0,02	0,62 \pm 0,03	2,18 \pm 0,11	1,54 \pm 0,08
5-FU+ABH	0,52 \pm 0,04	0,42 \pm 0,03	3,28 \pm 0,08	1,83 \pm 0,05
PEK	0,37 \pm 0,03	0,33 \pm 0,04	2,79 \pm 0,08	0,95 \pm 0,06
5-FU+PEK	0,45 \pm 0,04	0,48 \pm 0,05	5,03 \pm 0,10	1,62 \pm 0,06
ABK	0,49 \pm 0,02	0,28 \pm 0,02	1,55 \pm 0,09	0,88 \pm 0,06
5-FU+ABK	0,54 \pm 0,03	0,57 \pm 0,04	4,35 \pm 0,07	1,41 \pm 0,06
PEM	0,55 \pm 0,03	0,30 \pm 0,03	1,40 \pm 0,06	0,79 \pm 0,08
5-FU+PEM	0,55 \pm 0,04	0,70 \pm 0,03	4,83 \pm 0,12	5,34 \pm 0,13
ABM	0,62 \pm 0,02	0,66 \pm 0,04	5,91 \pm 0,09	2,80 \pm 0,11
5-FU+ABM	0,67 \pm 0,02	0,41 \pm 0,06	2,55 \pm 0,06	3,56 \pm 0,08

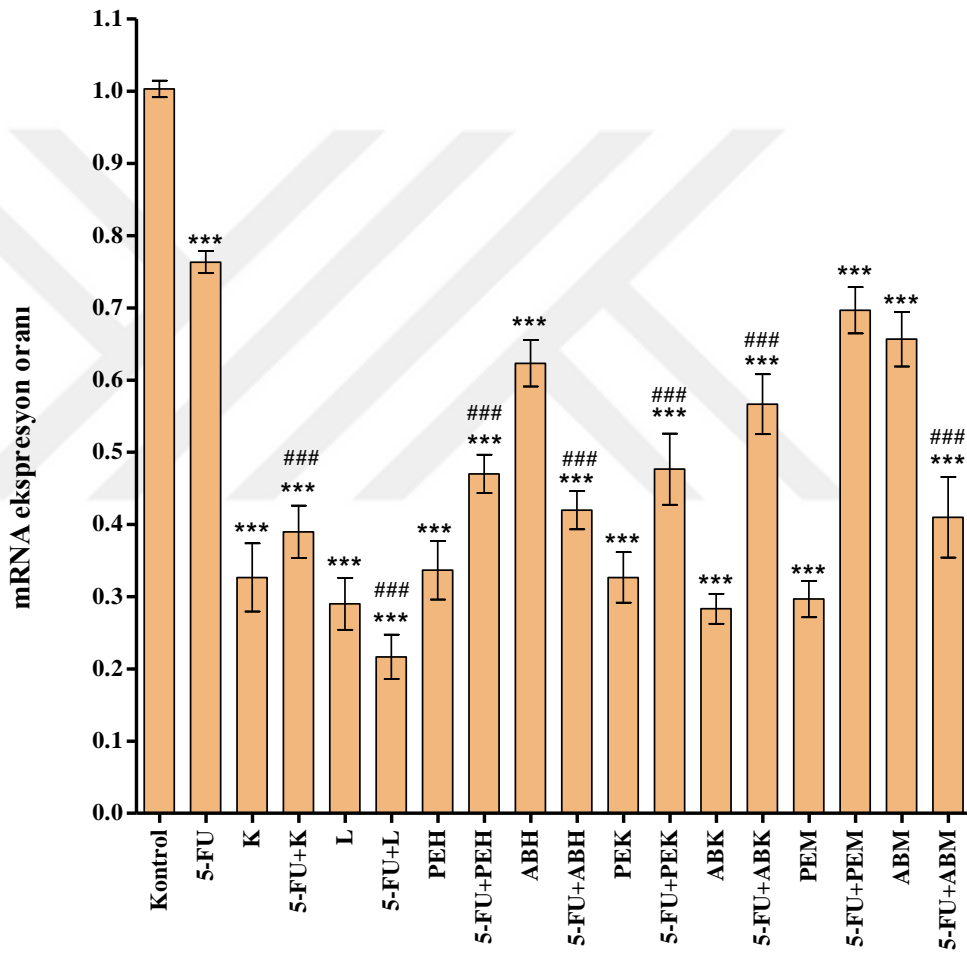
mTOR genine ait mRNA ekspresyon düzeyleri, uygulanan tüm tedavilerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdi ($p < 0,0001$). 5-FU ile kombine olarak uygulanan tedavi grupları, yalnız 5-FU uygulanan grupla karşılaştırıldığında mTOR mRNA seviyelerinde herhangi bir azalış görülmedi ($p > 0,05$). mTOR mRNA seviyesindeki en fazla düşüş, 5-FU ile tedavi edilen grupta belirlendi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. mTOR genine ait mRNA ekspresyon oranları

***Kontrolle göre $p < 0,0001$

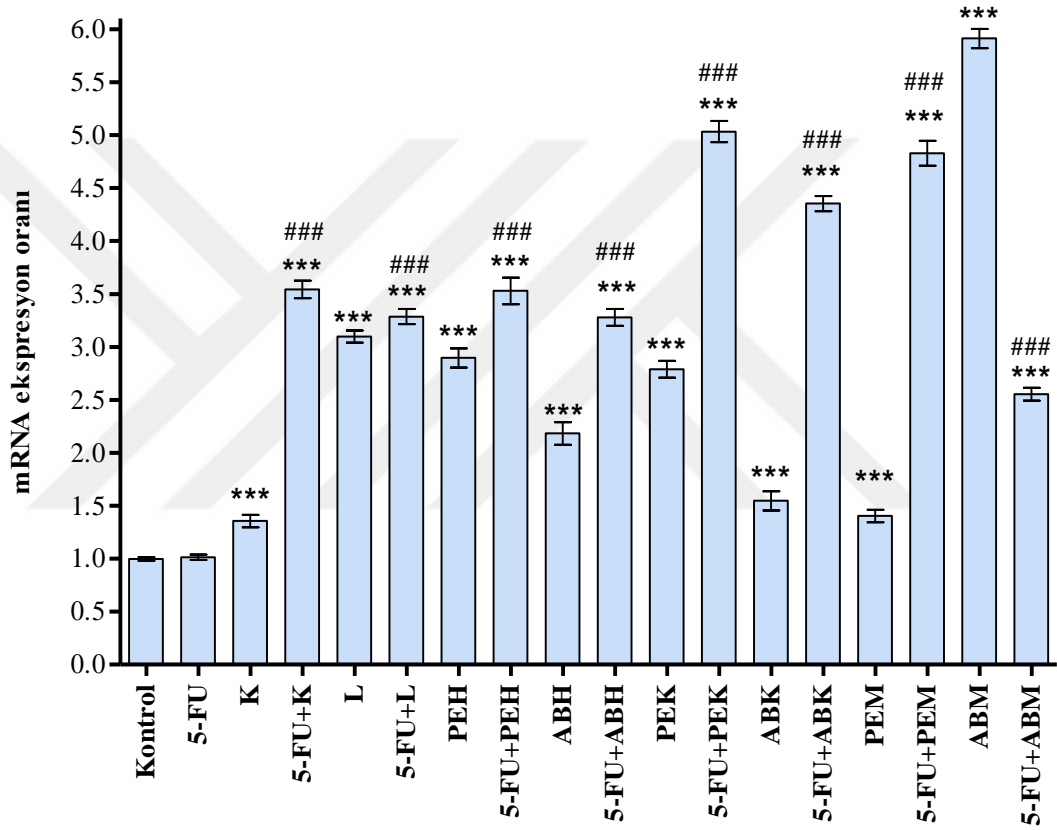
Akt mRNA seviyesi, tüm tedavi gruplarında kontrole göre anlamlı bir azalış gösterdi ($p<0,0001$). Akt mRNA seviyesindeki en fazla düşüş, 5-FU+L kombinasyonunun uygulandığı grupta görüldü. Kombinasyon grupları, yalnız 5-FU ile tedavi edilen grupla karşılaştırıldığında, 5-FU+PEM uygulanan hücreler dışındaki gruplarda Akt mRNA seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdi ($p<0,0001$) (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Akt genine ait mRNA ekspresyon oranları

***Kontrole göre $p<0,0001$; ###5-FU'ya göre $p<0,0001$

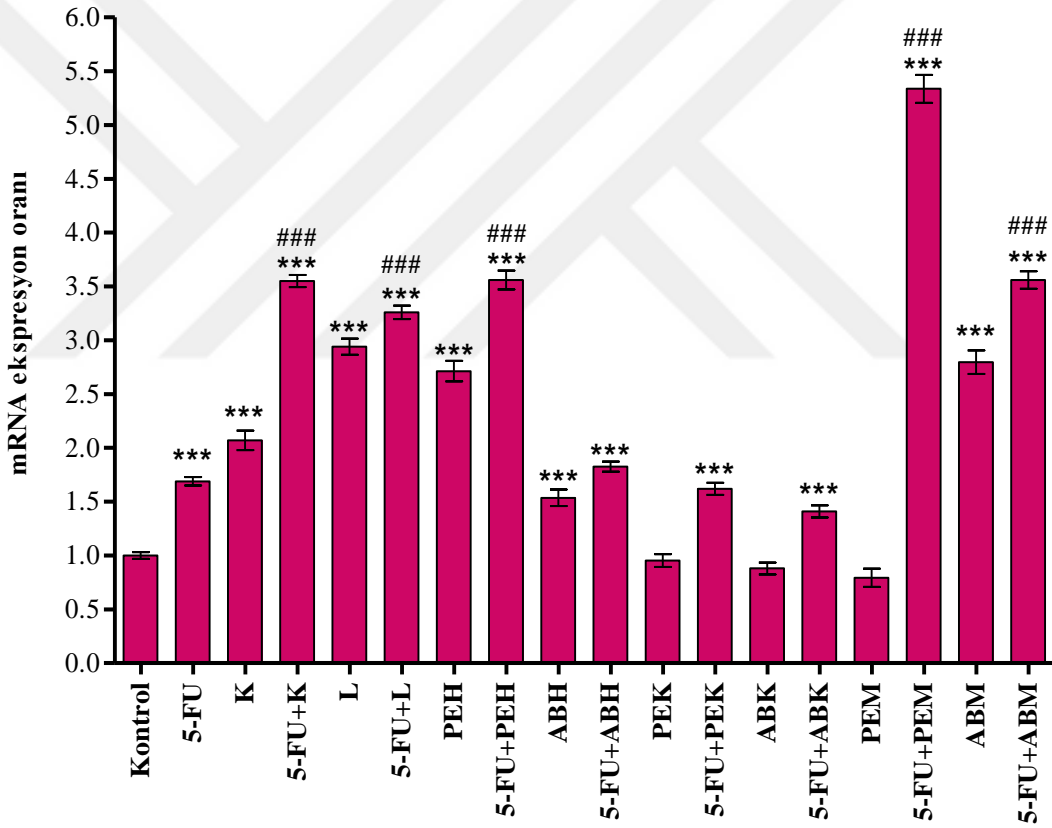
PTEN genine ait mRNA ekspresyon düzeyindeki en fazla artış ABM ile tedavi edilen hücrelerde görüldü (Şekil 4.21). Kontrole göre, 5-FU dışındaki tüm tedavi grupları PTEN mRNA seviyelerini anlamlı oranda arttırdı ($p<0,0001$). 5-FU ile kıyaslandığında, tüm kombinasyon tedavileri sonucunda PTEN mRNA seviyelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,0001$).



Şekil 4.21. PTEN genine ait mRNA ekspresyon oranları

***Kontrole göre $p<0,0001$; ###5-FU'ya göre $p<0,0001$

Tedavi grupları kontrol ile karşılaştırıldığında, PEK, ABK ve PEM uygulanan hücreler dışındaki tüm gruplarda p38 MAPK genine ait mRNA düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir artış görüldü ($p < 0,0001$). 5-FU+K, 5-FU+L, 5-FU+PEH, 5-FU+PEM ve 5-FU+ABM ile muamele edilen gruplar, yalnız 5-FU uygulanan gruba göre p38 MAPK mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken ($p < 0,0001$), diğer kombine gruplarında anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p > 0,05$). p38 MAPK mRNA seviyesindeki en yüksek artış 5-FU+PEM ile tedavi edilen hücrelerde görüldü (Şekil 4.22).

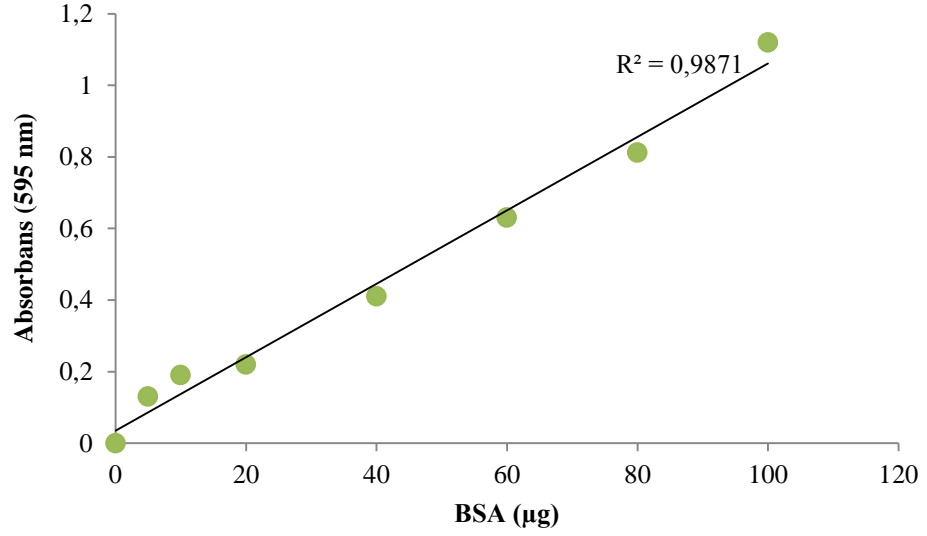


Şekil 4.22. p38 MAPK genine ait mRNA ekspresyon oranları
 ***Kontrolle göre $p < 0,0001$; ###5-FU'ya göre $p < 0,0001$

4.7. Protein Ekspresyonlarına Ait Bulgular

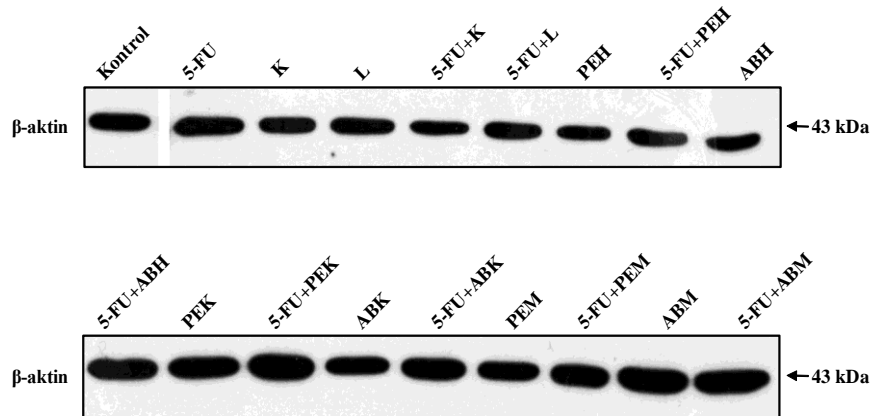
HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde 5-FU, kuersetin, luteolin, *P. eurycarpa* ve *A. biebersteinii* hekzan, kloroform ve metanol ekstraktlarının, ayrıca bu ekstraktların ve etken

maddelerin 5-FU ile kombinasyonlarının p53, Bcl-2, Bax, mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK protein ekspresyonları üzerine olan etkileri Western blot yöntemiyle değerlendirildi. Farklı miktarlarda BSA kullanılarak Bradford standart grafiği çizildi (Şekil 4.23). Bu grafik kullanılarak her bir örneğe ait protein miktarı belirlendi.



Şekil 4.23. Bradford standart grafiği

Tedavi uygulanan HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin Western blot analizleri sonucunda elde edilen membran görüntüleri Image J programı kullanılarak değerlendirildi. β -aktin protein ekspresyon düzeyi referans olarak kullanıldı (Şekil 4.24).



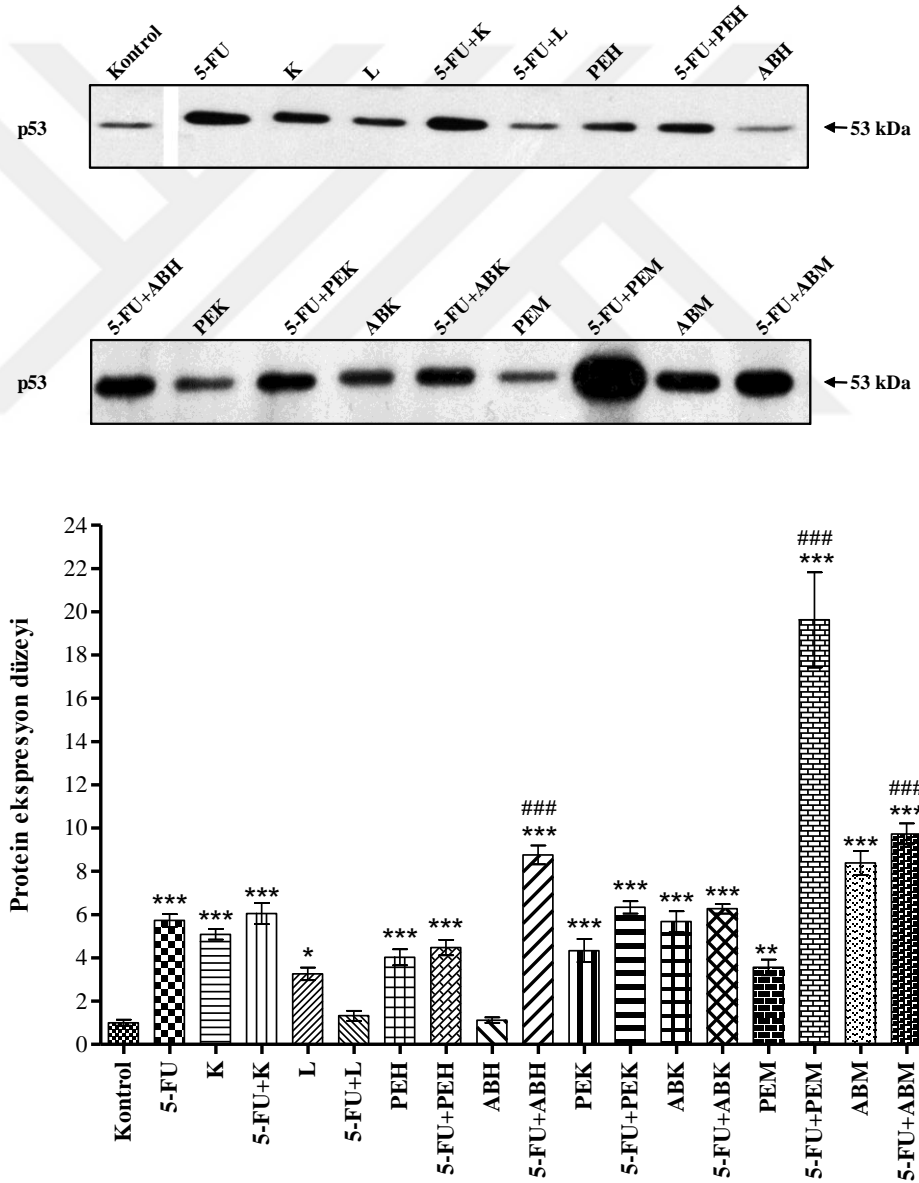
Şekil 4.24. β -aktin membran görüntüsü

p53, Bcl-2 ve Bax proteinlerinin ekspresyon düzeyleri kontrol gruplarına göre kıyaslanarak hesaplandı (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. p53, Bcl-2 ve Bax proteinlerinin ekspresyon düzeyleri (Ortalama değerler \pm standart sapma)

	p53	Bcl-2	Bax
Kontrol	1,00 \pm 0,14	1,00 \pm 0,01	1,00 \pm 0,02
5-FU	5,73 \pm 0,30	0,30 \pm 0,01	1,20 \pm 0,02
Kuersetin	5,09 \pm 0,25	0,32 \pm 0,01	1,35 \pm 0,05
5-FU+K	6,05 \pm 0,49	0,24 \pm 0,01	1,56 \pm 0,06
Luteolin	3,26 \pm 0,29	0,13 \pm 0,01	1,04 \pm 0,08
5-FU+L	1,33 \pm 0,23	0,17 \pm 0,01	1,22 \pm 0,05
PEH	4,02 \pm 0,37	0,34 \pm 0,02	2,54 \pm 0,09
5-FU+PEH	4,48 \pm 0,36	0,38 \pm 0,03	2,22 \pm 0,04
ABH	1,12 \pm 0,12	0,24 \pm 0,01	1,93 \pm 0,05
5-FU+ABH	8,76 \pm 0,43	0,26 \pm 0,01	1,53 \pm 0,03
PEK	4,34 \pm 0,53	0,30 \pm 0,03	1,28 \pm 0,03
5-FU+PEK	6,34 \pm 0,28	0,13 \pm 0,01	1,02 \pm 0,03
ABK	5,68 \pm 0,48	0,24 \pm 0,02	1,20 \pm 0,08
5-FU+ABK	6,27 \pm 0,22	0,26 \pm 0,01	1,01 \pm 0,04
PEM	3,56 \pm 0,37	0,27 \pm 0,01	1,09 \pm 0,04
5-FU+PEM	19,62 \pm 2,20	0,26 \pm 0,01	1,63 \pm 0,05
ABM	8,39 \pm 0,56	0,17 \pm 0,02	1,10 \pm 0,03
5-FU+ABM	9,73 \pm 0,49	0,29 \pm 0,02	1,48 \pm 0,07

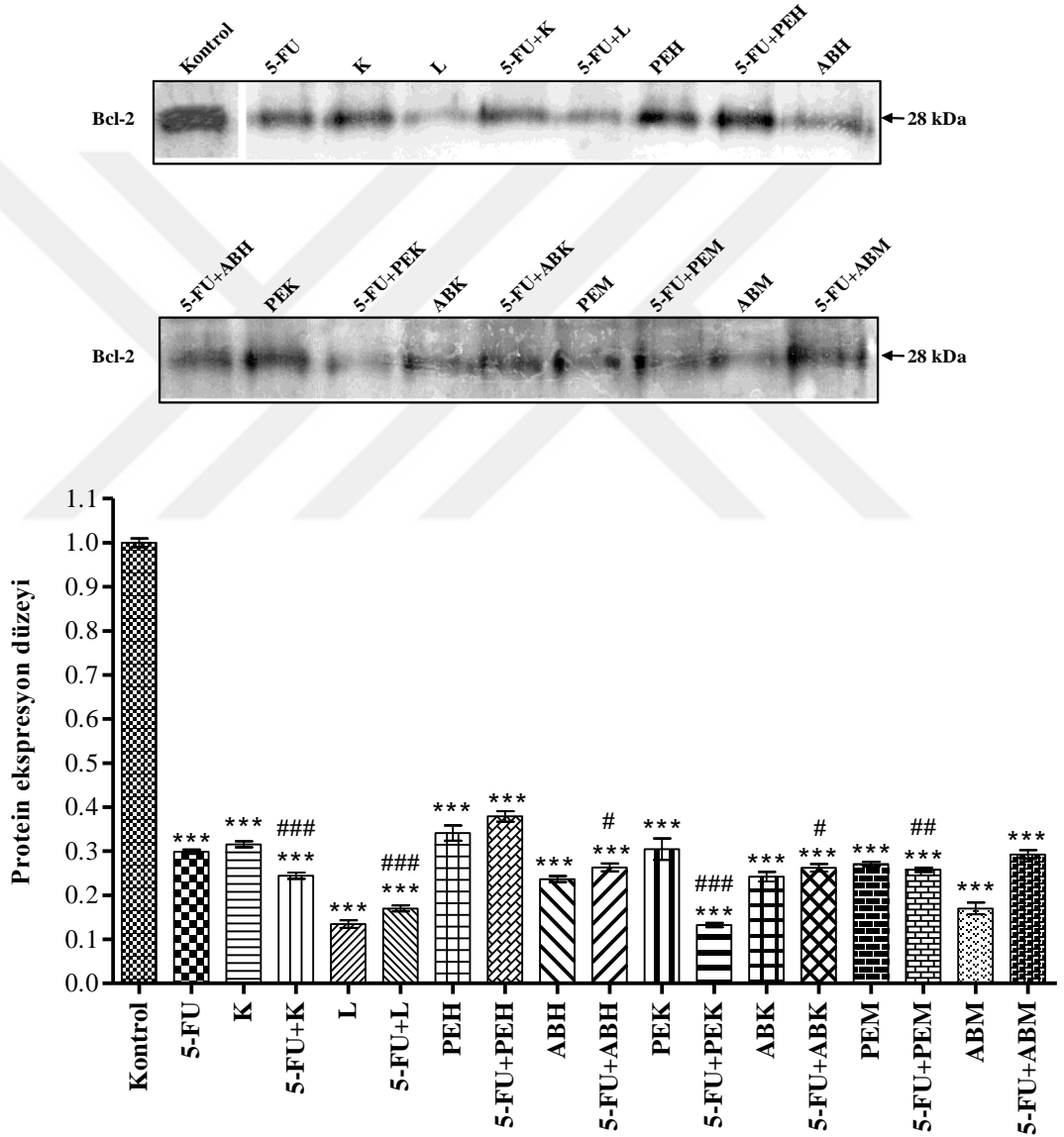
Kontrol ile kıyaslandığında 5-FU+L ve ABH uygulanan hücreler dışındaki tüm gruplardaki p53 protein ekspresyonu düzeylerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Kombinasyon grupları 5-FU ile karşılaştırıldığında 5-FU+ABH, 5-FU+PEM ve 5-FU+ABM tedavileri uygulanan hücrelerdeki p53 proteini ekspresyon seviyelerinin artışı anlamlı olurken ($p<0,0001$), diğer kombinasyon tedavilerinde anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p>0,05$). En yüksek p53 protein seviyesi, 5-FU+PEM ile muamele edilen hücrelerde görüldü (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. p53 proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri

*Kontrolle göre $p<0,05$; **Kontrolle göre $p<0,01$; ***Kontrolle göre $p<0,0001$; ###5-FU'ya göre $p<0,0001$

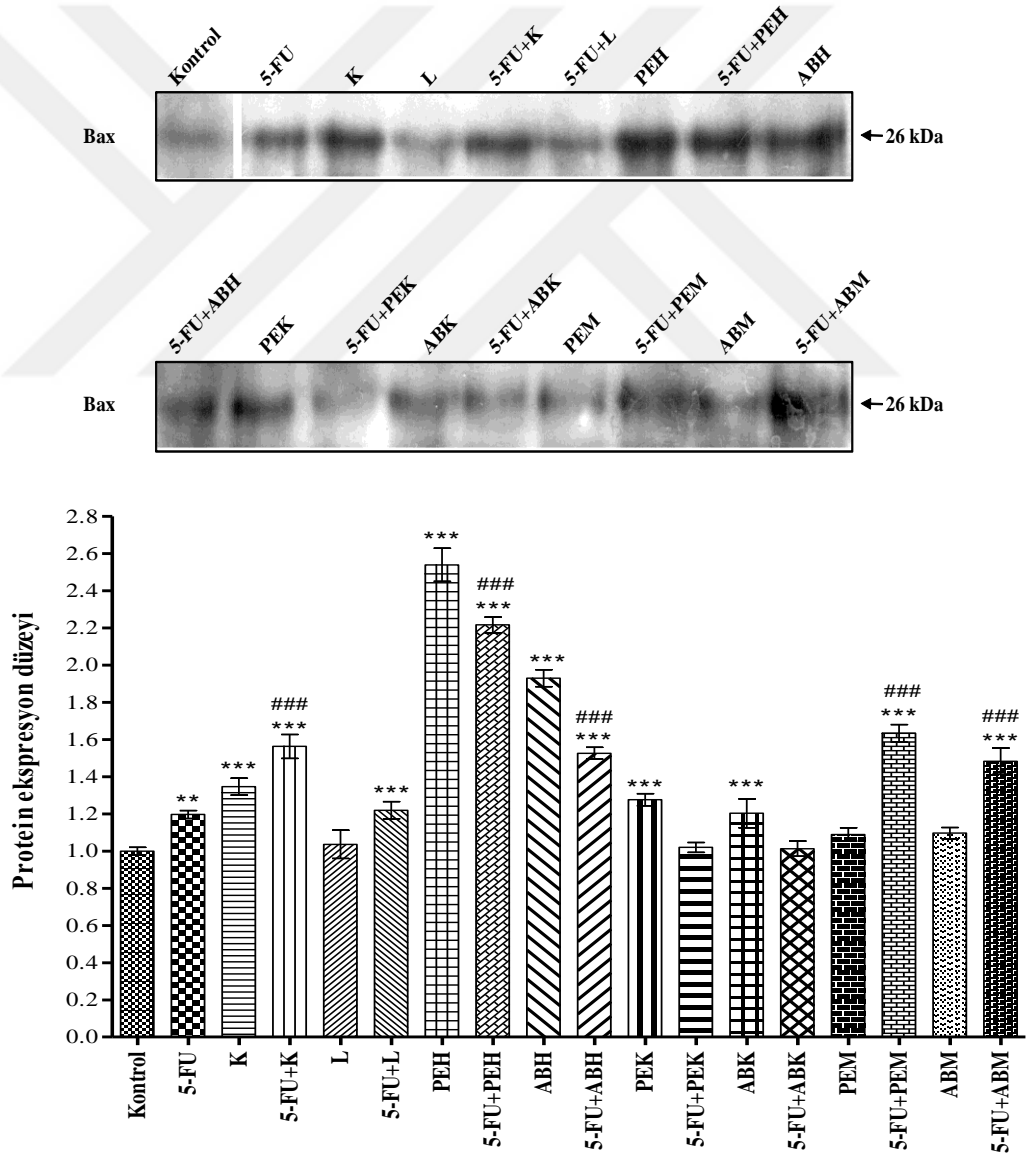
Bcl-2 protein ekspresyonu seviyeleri kontrol ile kıyaslandığında tüm tedavi gruplarında anlamlı bir düşüş görüldü ($p<0,0001$). En düşük Bcl-2 seviyesi luteolin ve 5-FU+PEK uygulanan hücrelerde belirlendi. 5-FU ile karşılaştırıldığında, 5-FU+PEH ve 5-FU+ABM ile tedavi edilen hücreler dışındaki tüm kombinasyon gruplarında, Bcl-2 protein düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0,05$) (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Bcl-2 proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri

***Kontrolle göre $p<0,0001$; #5-FU'ya göre $p<0,05$; ##5-FU'ya göre $p<0,01$; ###5-FU'ya göre $p<0,0001$

Bax protein seviyesindeki en fazla artış PEH uygulanan hücrelerde gözlemlendi (Şekil 4.27). Luteolin, 5-FU+PEK, 5-FU+ABK, PEM ve ABM uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı bir yükseliş görülmedi ($p>0,05$). Diğer tüm gruplarda kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,01$). Sadece 5-FU uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında, 5-FU+K, 5-FU+PEH, 5-FU+ABH, 5-FU+PEM ve 5-FU+ABM uygulanan kombinasyon gruplarında Bax proteinini seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülürken ($p<0,0001$), diğer kombine tedavilerde anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p>0,05$).



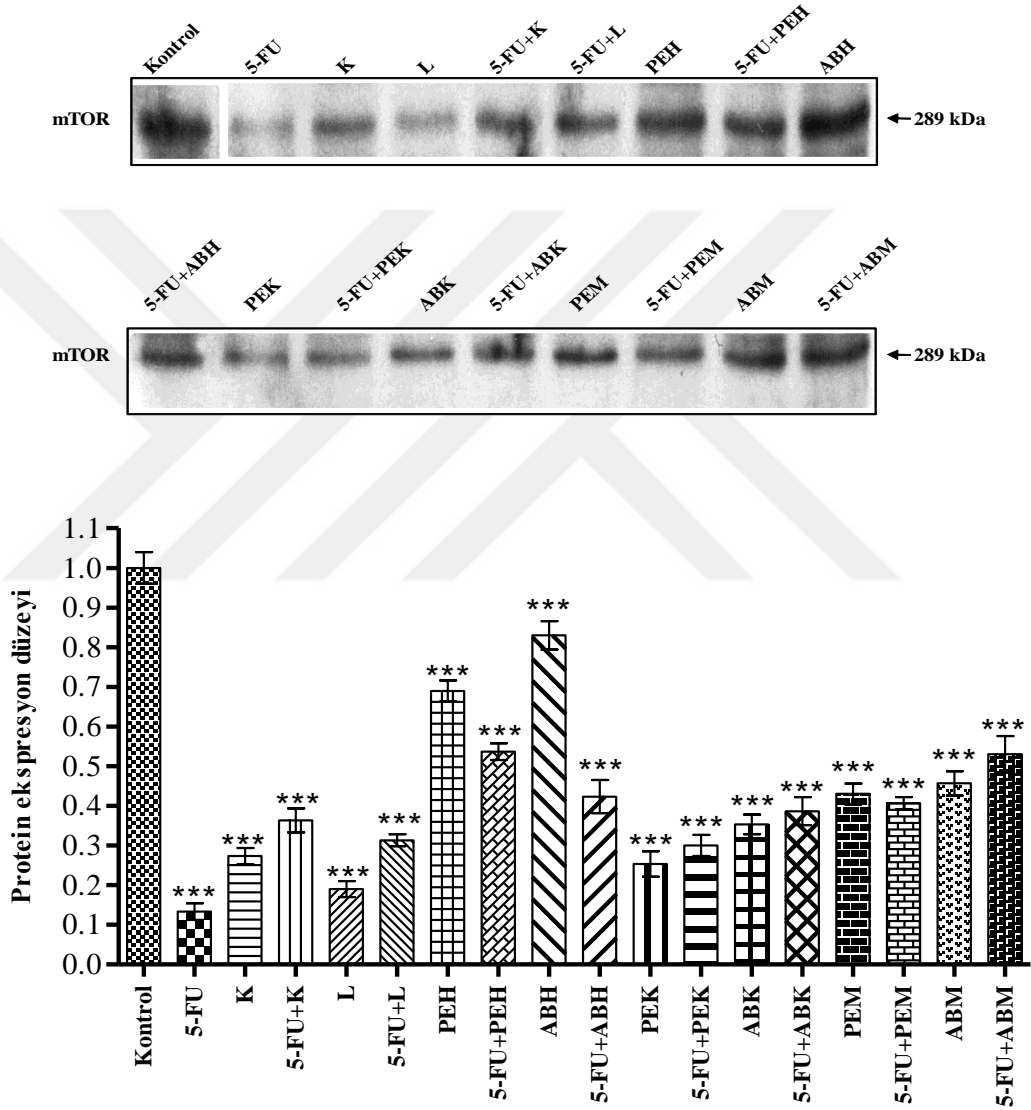
Şekil 4.27. Bax proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri
 Kontrole göre $p<0,01$; *Kontrole göre $p<0,0001$; ###5-FU'ya göre $p<0,0001$

mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK proteinlerinin ekspresyon düzeyleri kontrol gruplarına göre kıyaslanarak hesaplandı (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK proteinlerinin ekspresyon düzeyleri (Ortalama değerler \pm standart sapma)

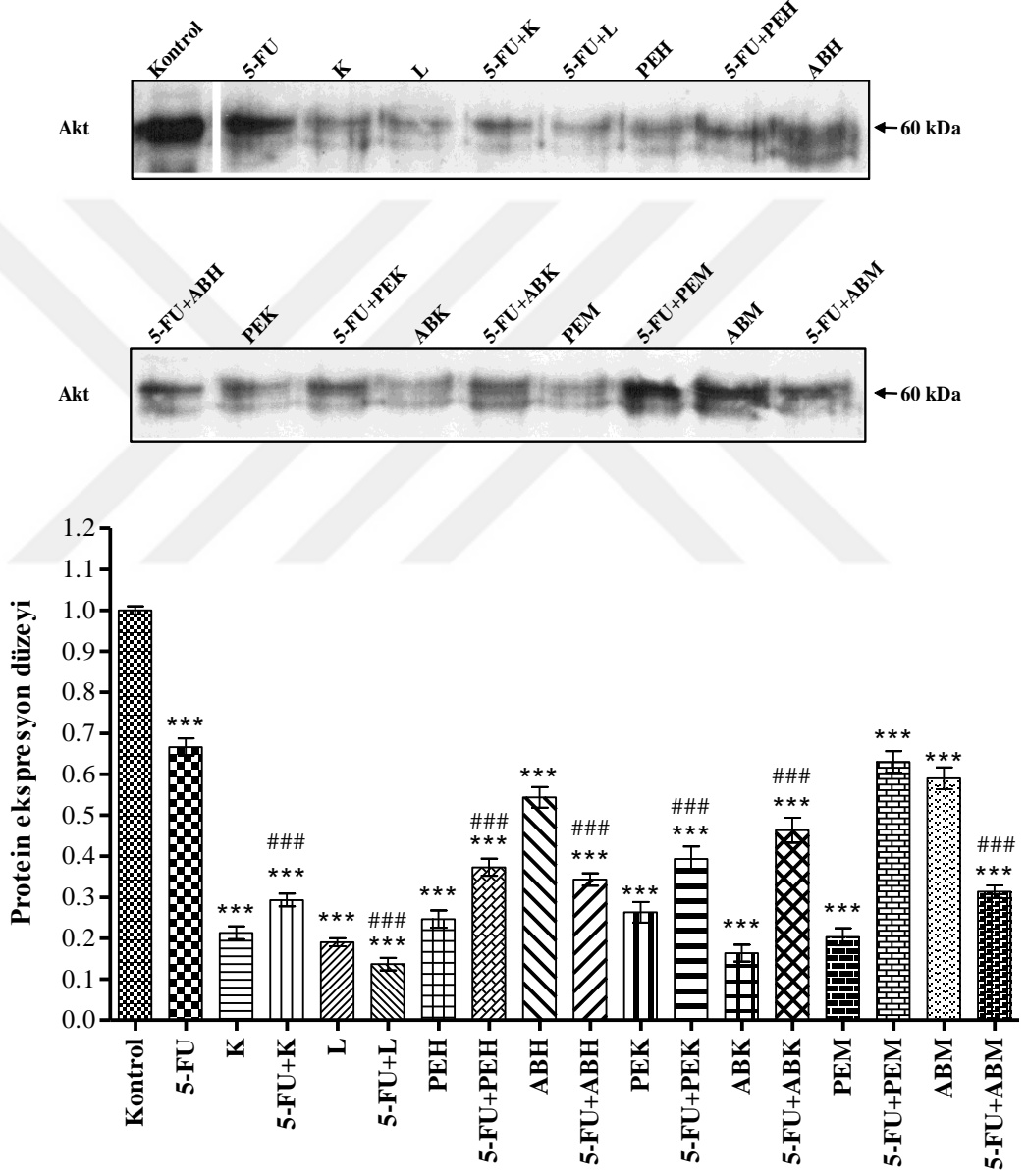
	mTOR	Akt	PTEN	p38 MAPK
Kontrol	1,00 \pm 0,04	1,00 \pm 0,01	1,00 \pm 0,01	1,00 \pm 0,02
5-FU	0,13 \pm 0,02	0,67 \pm 0,02	0,99 \pm 0,05	1,43 \pm 0,05
Kuersetin	0,27 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02	1,19 \pm 0,03	1,89 \pm 0,06
5-FU+K	0,36 \pm 0,03	0,29 \pm 0,02	3,33 \pm 0,08	3,25 \pm 0,07
Luteolin	0,19 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01	2,98 \pm 0,07	2,75 \pm 0,06
5-FU+L	0,31 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02	3,09 \pm 0,06	3,08 \pm 0,07
PEH	0,69 \pm 0,03	0,25 \pm 0,03	2,65 \pm 0,06	2,54 \pm 0,09
5-FU+PEH	0,54 \pm 0,02	0,37 \pm 0,02	3,24 \pm 0,05	3,37 \pm 0,08
ABH	0,83 \pm 0,04	0,54 \pm 0,03	1,97 \pm 0,06	1,35 \pm 0,04
5-FU+ABH	0,42 \pm 0,04	0,34 \pm 0,02	3,03 \pm 0,09	1,60 \pm 0,05
PEK	0,25 \pm 0,03	0,26 \pm 0,03	2,69 \pm 0,06	0,85 \pm 0,03
5-FU+PEK	0,30 \pm 0,03	0,39 \pm 0,03	4,85 \pm 0,08	1,49 \pm 0,07
ABK	0,35 \pm 0,03	0,16 \pm 0,02	1,39 \pm 0,04	0,71 \pm 0,06
5-FU+ABK	0,39 \pm 0,04	0,46 \pm 0,03	4,04 \pm 0,08	1,27 \pm 0,06
PEM	0,43 \pm 0,03	0,20 \pm 0,02	1,24 \pm 0,05	0,62 \pm 0,06
5-FU+PEM	0,41 \pm 0,02	0,63 \pm 0,03	6,47 \pm 0,08	5,09 \pm 0,11
ABM	0,46 \pm 0,03	0,59 \pm 0,03	5,71 \pm 0,04	2,62 \pm 0,10
5-FU+ABM	0,53 \pm 0,05	0,31 \pm 0,02	2,37 \pm 0,06	3,34 \pm 0,08

Tüm tedavi gruplarının mTOR protein seviyeleri, kontrole göre anlamlı bir düşüş sergiledi ($p<0,0001$). En düşük mTOR düzeyine 5-FU uygulanan hücrelerde rastlandı (Şekil 4.28). 5-FU'ya göre, hiçbir kombinasyon tedavisi mTOR protein seviyesinde anlamlı bir azalmaya neden olmadı ($p>0,05$).



Şekil 4.28. mTOR proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri
***Kontrole göre $p<0,0001$

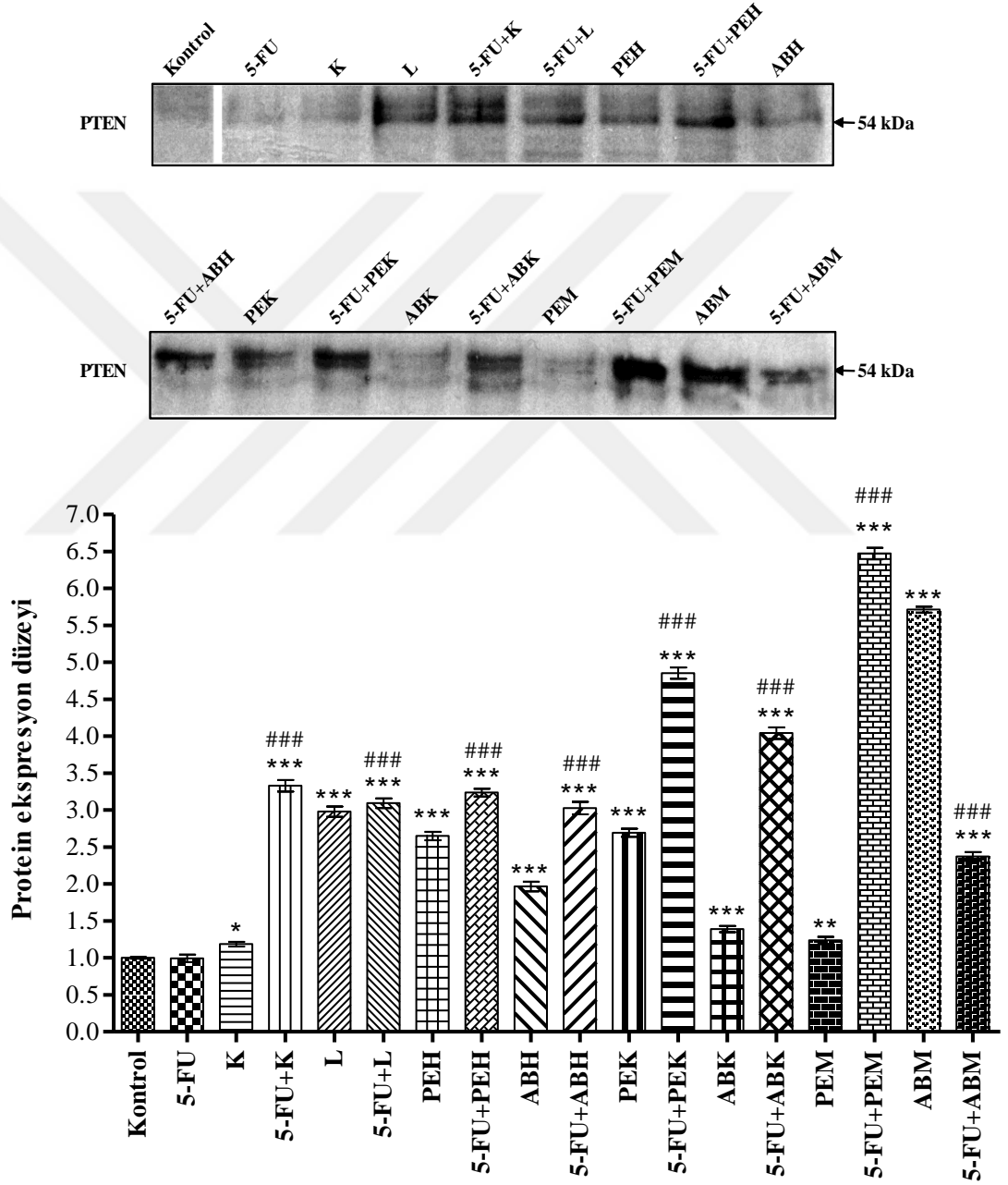
Akt protein seviyeleri tedavi gruplarının tamamında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdi ($p<0,0001$). En büyük düşüş 5-FU+L ve ABK uygulanan hücrelerde görüldü. 5-FU+PEM haricindeki tüm kombinasyon tedavilerinde, Akt protein düzeyleri 5-FU'ya göre anlamlı bir şekilde azaldı ($p<0,0001$) (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Akt proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri

***Kontrole göre $p<0,0001$; ###5-FU'ya göre $p<0,0001$

5-FU uygulanan hücreler dışındaki tüm grupların PTEN protein seviyelerinde kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.30). PTEN protein düzeyindeki en fazla yükseliş 5-FU+PEM uygulanan hücrelerde görüldü. 5-FU ile kıyaslandığında tüm kombinasyon tedavilerinin PTEN seviyelerinde anlamlı yükselişler görüldü ($p<0,0001$).

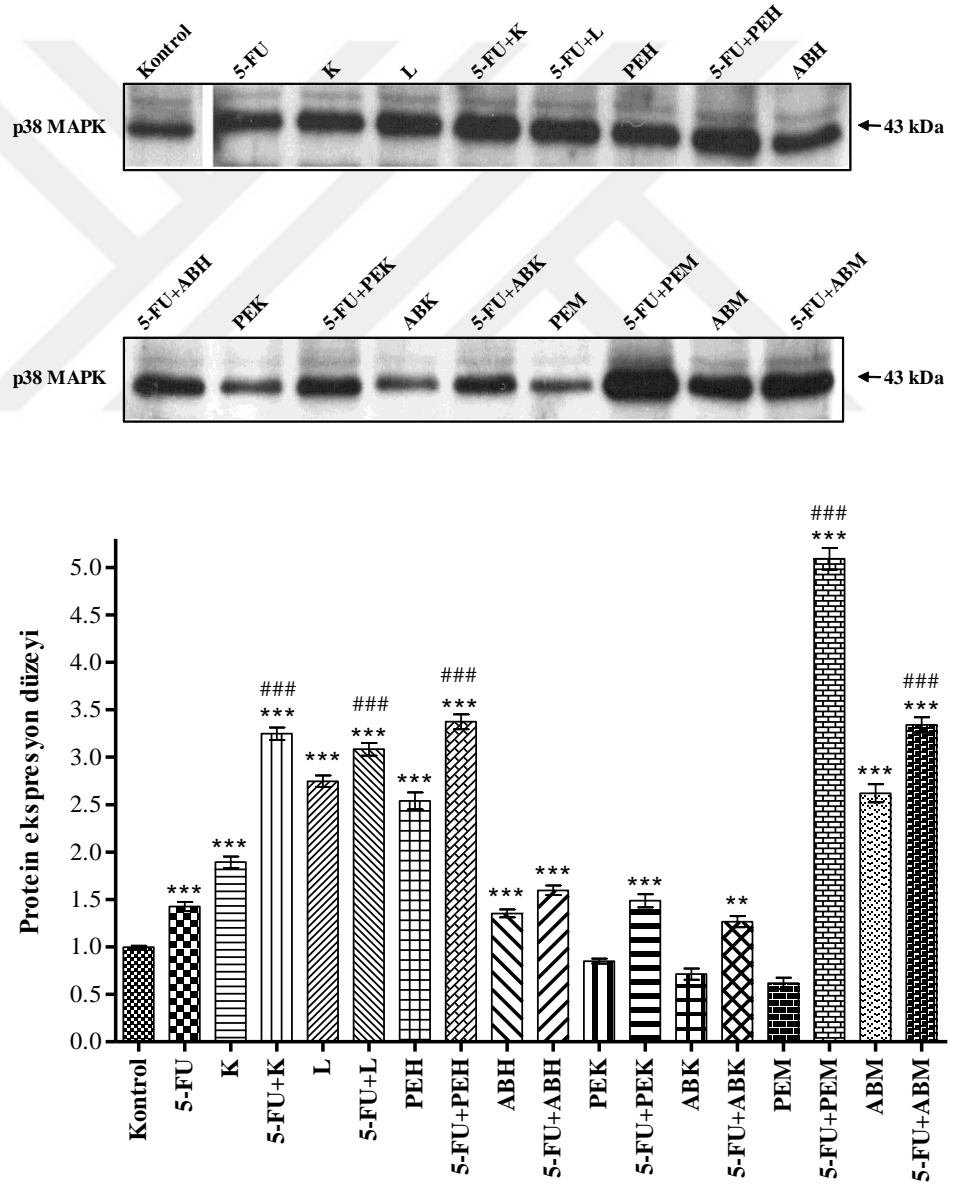


Şekil 4.30. PTEN proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri

*Kontrole göre $p<0,05$; **Kontrole göre $p<0,01$; ***Kontrole göre $p<0,0001$;

###5-FU'ya göre $p<0,0001$

p38 MAPK protein seviyeleri kontrol ile karşılaştırıldığında PEK, ABK ve PEM ile tedavi edilen hücreler dışındaki tüm tedavi gruplarında anlamlı artışlar görüldü ($p < 0,0001$) (Şekil 4.31). p38 MAPK protein seviyesini en fazla arttıran tedavinin 5-FU+PEM olduğu belirlendi. 5-FU+K, 5-FU+L, 5-FU+PEH, 5-FU+PEM ve 5-FU+ABM uygulanan gruplarda p38 MAPK protein seviyeleri 5-FU'ya göre istatistiki olarak anlamlı artışlar sergilerken ($p < 0,0001$), diğer kombinasyon gruplarında anlamlı değişiklikler görülmedi ($p > 0,05$).



Şekil 4.31. p38 MAPK proteinine ait membran görüntüsü ve ekspresyon düzeyleri
 Kontrolle göre $p < 0,01$; *Kontrolle göre $p < 0,0001$; ###5-FU'ya göre $p < 0,0001$

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kolorektal kanser dünya genelinde en sık rastlanan üçüncü kanser türüdür ve yeni vaka oranı her geçen yıl artmaktadır. Hastalığın tedavisinde evreye ve hastanın durumuna bağlı olarak farklı kemoterapi ilaçları ve tedaviler bulunmaktadır. FOLFOX ve FOLFIRI gibi 5-Fluorouracil temelli çeşitli kemoterapötiklerin neoadjuvant olarak kullanımı, bireysel olarak hastaya ve tümörün özelliklerine bağlıdır (Schmoll *et al.* 2012). Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi kanser tedavileri özellikle gelişen ülkelerde sınırlıdır ve kanser ilaçları kolay temin edilememektedir. Ayrıca bu ilaçların kullanımını bir dizi istenmeyen yan etkiye neden olabilmektedir (Chidambaram *et al.* 2011). Sonuç olarak, dünya nüfusunun büyük bir kısmı tamamlayıcı ve alternatif tıba yönelmektedir (Erejuwa *et al.* 2014). Sentetik ve standart ilaçlar ile karşılaştırıldığında bazı sınırlamaları olmasına rağmen tamamlayıcı ve alternatif tıp ekonomik olması, kolay kullanılabilir ve ulaşılabilir olması ve yan etkilerinin az olması gibi önemli avantajlara da sahiptir (Mendel 2004).

Kolorektal kanserin önlenmesinde çeşitli doğal ve sentetik ilaçların kullanımını özellikle son yıllarda büyük ilgi çekmektedir. Bitkiler ve bitkisel kaynaklı etken maddeler kanser gibi bazı hastalıklara karşı kemopreventif ve kemoterapötik etkiye sahiptirler (Jaganathan and Mandal 2009). Tüm kanser türlerinin %10 - %70'inin beslenme ile ilgili olduğu bilinmektedir. Kolorektal kanser insidansı ile beslenme arasında yakın bir ilişki vardır. Kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %90'ı beslenme düzeninin değiştirilmesi ile önlenbilir. Beslenme eksiklikleri genetik hasara olan hassasiyeti değiştirebilir ve kolorektal kanser gelişimine katkıda bulunan karsinojen metabolizmalarını etkileyebilir (Derry *et al.* 2013).

Bitkilerden elde edilen doğal bileşikler antikanser potansiyele sahiptirler ve kemoterapötik ilaçlarla kombine olarak kullanıldıklarında onların etkinliklerini arttırırlar. Çoğu doğal bileşik hücrel sinyal iletiminde birden fazla hedefe etki eder. Bu yüzden doğal bileşiklerle ilgili geniş ölçüde çalışmalar yapılmaktadır (Sarkar *et al.* 2009; Neergheen *et al.* 2010; Millimouno *et al.* 2014; Yang *et al.* 2014).

Epidemiyolojik çalışmalar, bazı tıbbi bitkilerin hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü etkileyerek kolorektal kanser riskini önemli oranda azalttığını ortaya koymaktadır (Xavier and Pereira-Wilson 2016).

Bu çalışmada, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücre hattı üzerinde iki farklı bitkisel etken maddenin (kuersetin ve luteolin) ve iki bitki türünden (*Pistacia eurycarpa* ve *Achillea biebersteinii*) polaritesi farklı çözücüler (hekzan, kloroform ve metanol) kullanılarak hazırlanmış bitki ekstraktlarının 5-Fluorouracil ile kombinasyonlarının sinerjistik etkileri araştırılmıştır. Literatürde 5-FU ile birlikte kuersetin veya luteolinin kombine olarak kolorektal kanser üzerine uygulandığı bir araştırmanın olmaması bu çalışmayı özgün kılmaktadır. Yine *P. eurycarpa* hakkında kolorektal kanser çalışmalarına rastlanmamış, *A. biebersteinii* ile 5-FU kombinasyonunun denendiği bir literatür çalışması da görülmemiştir. Uygulanan maddelerin kolorektal kanserde 7 farklı gen ve protein üzerindeki etkilerinin incelenmesi de literatürde bir ilktir. Tüm bunlar bu çalışmanın özgün değerini daha da arttırmaktadır.

In vivo ve *in vitro* çalışmalar kuersetinin, lösemi ve diğer malignan tümörlerin yanı sıra meme, over, kolon, karaciğer ve mide kanserlerinin gelişimini inhibe ettiğini göstermektedir (Ackland *et al.* 2005; Duo *et al.* 2012). Kuersetin, hücre döngüsünü bloke ederek, sinyal iletimini inhibe ederek veya apoptoza yönlendirerek tümör hücreleri üzerinde etkisini gösterir (Ackland *et al.* 2005). Kuersetinin, MCF7 meme kanseri hücreleri gibi farklı tümör hücrelerinin çoğalmasını önemli oranda inhibe ettiği ve Bcl-2 ve Bax proteinlerinin seviyelerini düzenleyerek hücreleri apoptoza yönlendirdiği bildirilmiştir (Duo *et al.* 2012).

Kuersetinin yabancıl tip p53 genine sahip kolorektal kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek 5-FU'nun etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (Xavier *et al.* 2011). Ayrıca *in vivo* bazı çalışmalar kuersetinin kolorektal kanserdeki antikarsinojenik etkisini ortaya koymaktadır (Warren *et al.* 2009). Bu flavonoid, kolorektal kanserli farelerde ACF oluşumunu %75 oranında azaltmıştır (Volate *et al.* 2005).

Bazı çalışmalar, luteolinin antioksidan etkisinin yanı sıra, lösemi (Ko *et al.* 2002), pankreas (Lee *et al.* 2001), prostat (Wang and Martins-Green 2014) ve karaciğer kanseri (Chang *et al.* 2005; Lee *et al.* 2006) hücre hatlarında antikanser aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Kolorektal kanserde luteolinin güçlü bir kemopreventif ajan olduğu ve kolon kanseri karsinogenezinde önemli olan moleküler hedefler üzerinde etkisini gösterdiği rapor edilmiştir (Pandurangan and Esa 2014). Fareler üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalar, luteolinin ACF oluşumunu azalttığını göstermektedir (Ashokkumar and Sudhandiran 2008).

Çeşitli *Pistacia* türlerinin antikanser etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Balan *et al.* 2007; Giaginis and Theocharis 2011). *Pistacia lentiscus* var. *chia*. bitkisinden elde edilen reçineyle hazırlanan hekzan ekstresinin HCT116 kolon kanseri hücrelerinde apoptotik ve antikanser etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Balan *et al.* 2005). Metastatik kolorektal kanser hastalarında setuksimab kullanımının oluşturduğu toksik etkinin *Pistacia terebinthus* ile ortadan kaldırıldığı bildirilmiştir (Tastekin *et al.* 2014).

Farklı *Achillea* türlerinin kolorektal kanser üzerindeki etkileri yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. *Achillea millefolium* ve *Achillea biebersteinii* etanol ekstralarının etkileri, SW742 insan kolorektal kanser hücrelerinin de arasında olduğu altı farklı kanser hücre hattı üzerinde denenmiştir. *A.biebersteinii* etanol ekstresi özellikle SW742 insan kolorektal kanser hücre hattı üzerinde yüksek oranda antiproliferatif etki göstermiştir (Ghavami *et al.* 2010). *Achillea falcata* bitkisinden izole edilen bazı bileşiklerin HCT116 kolon kanseri hücrelerinde toksik etki göstermeden antikanser potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir (Tohme *et al.* 2013). *Achillea teretifolia* Willd metanol ekstresinin ise DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücrelerinde güçlü şekilde antioksidan, sitotoksik ve apoptotik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Bali *et al.* 2015)

Uygulanan tüm kombine tedaviler, aynı dozda sadece 5-FU uygulanmış gruba göre hücre canlılığını önemli ölçüde düşürmüşlerdir. Aynı zamanda bu tedaviler tek başlarına uygulandıklarında da hücre canlılığını konsantrasyona bağlı bir şekilde azaltmışlardır. Bu durum literatürle uyumludur (Du *et al.* 2005; Tang *et al.* 2007; Tong *et al.* 2011).

5-FU+kuersetin kombinasyonu ile tedavi edilen HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin canlılık oranı %16,68 olarak bulundu. Bu değer, 5-FU'nun tek başına 600 µg/ml gibi yüksek bir konsantrasyonda yapmış olduğu etki olan %16,5'e yakındır.

5-FU+luteolin kombinasyonu ile tedavi edilen HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin canlılık oranı %9,8 olarak bulundu. Bu değer, 5-FU'nun tek başına 1000 µg/ml gibi çok yüksek bir konsantrasyonda yapmış olduğu etki olan %7,7'ye yakındır.

5-FU+*P.eurycarpa* metanol ekstresi kombinasyonu hücre canlılığını %11,97'ye düşürdü. Bu kombinasyon ile tedavi, sadece 800 µg/ml 5-FU uygulanan gruba göre hücre canlılığını daha düşük seviyeye indirmiştir.

5-FU ile *P.eurycarpa* hekzan ve kloroform ekstralarının hücrelere birlikte uygulanması ile 24 saat süre sonunda hücre canlılıkları sırasıyla %23,5 ve %21,2 olarak belirlendi. Tek başına 400 µg/ml 5-FU uygulanan hücrelere göre bu kombinasyonlar canlılık üzerinde daha etkili olmuşlardır.

5-FU+ *A.biebersteinii* metanol ekstresi kombinasyonu hücre canlılığını %14,86'ya düşürdü. Bu kombinasyon ile tedavi, sadece 600 µg/ml 5-FU uygulanan gruba göre hücre canlılığını daha düşük seviyeye indirmiştir.

5-FU ile *A.biebersteinii* hekzan ve kloroform ekstralarının hücrelere birlikte uygulanması ile 24 saat süre sonunda hücre canlılıkları sırasıyla %26 ve %19,1 olarak belirlendi. 5-FU+ABH kombinasyonu tek başına 400 µg/ml 5-FU uygulanan hücrelere yakın düzeyde hücre canlılığını etkilerken, 5-FU+ABK ile tedavi edilen hücreler 600 µg/ml 5-FU uygulanan gruba göre hücre canlılığı üzerinde benzer etki göstermiştir.

Çalışmamızda hem tek başlarına hem de 5-FU ile kombine olarak uygulanan tedaviler apoptoz oranını önemli ölçüde yükseltmiştir. Kolorimetrik analiz sonucunda 5-FU, kuersetin ve luteolin tek başlarına uygulandığında, apoptozda kontrole göre önemli yükselişler görüldü. 5-FU+K ve 5-FU+L uygulanan hücrelerde ise apoptozun daha

yüksek oranda tetiklendiği belirlendi. Yine bu tedavilerin uygulandığı gruplarda floresan ataçmanlı mikroskop altında sayım yapıldığında, 5-FU, kuersetin ve luteolin uygulanan hücrelerin apoptotik indekslerinde kontrol grubuna göre belirgin şekilde artış görüldü. 5-FU+kuersetin ve 5-FU+luteolin ile tedavi edilen gruplarda ise apoptotik indeksin, sadece 5-FU uygulanan hücrelere göre daha yüksek olduğu belirlendi. Bu sonuçlar, 5-FU ile kuersetin veya luteolinin birlikte uygulanması ile hücrelerin apoptoza daha fazla yöneldiğini göstermektedir.

P.eurycarpa hekzan, kloroform ve metanol ekstralarının hücrelerde apoptozu kontrol grubuna göre önemli oranda arttırdıkları görüldü. 5-FU+PEH ve 5-FU+PEK ve kombinasyonları ise hücrelerin apoptoza yönelme oranlarını önemli miktarda yükselttiler. Apoptotik indeksler, *P.eurycarpa* hekzan ve kloroform ekstraları tek başlarına uygulandığında kontrole göre önemli oranda artarken, bu ekstralar 5-FU ile kombine olarak uygulandıklarında ise artış daha belirgin oldu. Tüm tedavi grupları içerisinde kontrol grubuna göre apoptozdaki en büyük artış 5-FU+*P.eurycarpa* metanol ekstresi uygulanan hücrelerde görüldü. 5-FU+*P.eurycarpa* metanol ekstresinin uygulandığı grubun floresan ataçmanlı mikroskop altında sayımı yapıldığında, bu gruptaki hücrelerin apoptotik indeksinin, tedavi grupları arasındaki en yüksek değere sahip olduğu belirlendi.

A.biebersteinii hekzan, kloroform ve metanol ekstraları uygulanan hücrelerde apoptoz artış oranı kontrole göre önemli ölçüde yükseldi. Bu ekstraların 5-FU ile kombine olarak uygulanmasıyla hücrelerin apoptoza yönelişinde büyük artışlar görüldü. Apoptotik indekslerin ise, *A.biebersteinii* hekzan, kloroform ve metanol ekstraları tek başlarına uygulandığında ve bu ekstralar 5-FU ile kombine olarak uygulandıklarında kontrole göre büyük oranda yükseldiği belirlendi.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), kanser anjiyogenezinde önemli bir düzenleyicidir. Tedavi uygulanan gruplarda belirlenen VEGF miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tüm tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüşler görüldü. En düşük VEGF miktarı 5-FU+luteolin (62,5 pg/ml) ve 5-FU+*P.eurycarpa*

metanol ekstresi (64,7 pg/ml) uygulanan hücrelerde belirlendi. Özellikle kombine tedavilerin uygulandığı hücrelerdeki VEGF miktarlarındaki azalış, bu tedavilerin öneminin ortaya çıkmasına katkı sağlamaktadır.

Kolorektal kanser PTEN/Akt/mTOR ve MAPK gibi pek çok sinyal iletim yolağıyla ve bu yolaklarla etkileşimi olan p53, Bax ve Bcl-2 gibi proteinlerle ilişkilidir (Sarkar *et al.* 2009; Slattery *et al.* 2013; Millimouno *et al.* 2014; Pabla *et al.* 2015; Xavier and Pereira-Wilson 2016).

5-FU, 8 farklı kolorektal kanser hücre hattında p53 ve Bax proteinlerinin ekspresyon düzeylerini yükseltmiş, Bcl-2 seviyesini ise düşürmüştür (Violette *et al.* 2002).

Kolorektal kanserde, kuersetinin çeşitli sinyal yolakları üzerindeki etkisi bilinmektedir. Gen ekspresyon çalışmaları kuersetinin hücre döngüsü ve apoptozun düzenlenmesinin yanısıra (van Erk *et al.* 2005; Murtaza *et al.* 2006), MAPK sinyal yolakları ile ilgili genlerin üzerindeki etkisini göstermektedir (van Erk *et al.* 2005). Proteomik çalışmalar, Akt inhibisyonu (Kim *et al.* 2005) ve MAP kinazların seviyelerinin düzenlenmesinde kuersetinin rolünü ortaya koymaktadır (Wenzel *et al.* 2004). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada kuersetinin, p53'e bağlı olarak p38 MAPK seviyesini yukarı yönlü regüle ettiği ve bu şekilde apoptozisi inkübe ettiği gösterilmiştir (Kim *et al.* 2014; Xavier and Pereira-Wilson 2016).

Akt ve MAPK ile ilişkili yolaklarda luteolinin etkin rol oynadığı görülmüştür (Lee *et al.* 2006). Ayrıca luteolinin kolon kanseri hücrelerinde p53 seviyesinin arttırarak apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Shi *et al.* 2007).

p53, Bcl-2, Bax, mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK genlerine ait mRNA ekspresyon oranları ile bu proteinlerin ekspresyon seviyeleri arasında paralel bir ilişki görüldü. Tüm genlere ve proteinlere ait mRNA ekspresyon seviyeleri ve protein düzeyleri kontrol grubu için 1,0 olarak değerlendirildi ve sonuçlar kontrol grubuna göre kat ifade eden değerler olarak verildi.

p53 mRNA ekspresyon seviyesi 5-FU ile tedavi edilen hücrelerde kontrole göre 5,68 kat yükselirken protein düzeyi ise 5,73 olarak belirlendi. En yüksek p53 mRNA ekspresyonu 20,05 ile ve en yüksek p53 protein düzeyi ise 19,62 ile 5-FU+*P.eurycarpa* metanol ekstresi uygulanan hücrelerde görüldü. p53 mRNA ekspresyonunun ve protein seviyelerinin, 5-FU+luteolin kombinasyonu ve *A. biebersteinii* hekzan ekstresi uygulanan hücreler dışındaki tüm gruplarda kontrole göre önemli derecede yükseldiği görüldü.

Bcl-2 mRNA ekspresyon oranları ve protein düzeyleri tüm tedavi gruplarında kontrole göre anlamlı şekilde azaldı. Bcl-2 protein seviyesindeki en büyük azalma luteolin ve 5-FU+PEK ile tedavi edilen gruplarda görüldü. Her iki grupta da Bcl-2 proteini kontrol grubuna göre 0,13 oranında belirlendi. Kombinasyonların uygulandığı gruplar 5-FU tedavili hücrelerle karşılaştırıldığında, 5-FU+K, 5-FU+L ve 5-FU+PEK uygulanan gruplarda Bcl-2 mRNA seviyesi anlamlı şekilde azalırken, diğer kombinasyonların 5-FU'ya göre anlamlı bir azalmaya neden olmadığı görüldü. 5-FU+PEH ve 5-FU+ABM ile tedavi edilen gruplar dışındaki tüm kombinasyonlarda 5-FU'ya göre Bcl-2 protein düzeyleri önemli şekilde azaldı.

Bax mRNA ve protein ekspresyon oranlarındaki en fazla artış *P.eurycarpa* hekzan ekstresinin uygulandığı grupta görüldü. *P.eurycarpa* hekzan ekstresi kontrol grubuna göre Bax mRNA ekspresyonunu 2,78 kat ve Bax protein düzeyini 2,54 kat arttırmıştır. Bax mRNA ve protein ekspresyonlarındaki artış oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında luteolin, 5-FU+PEK, PEM ve 5-FU+ABK ile tedavi edilen gruplar dışındaki tüm örneklerde anlamlı olarak görüldü. 5-FU uygulanan grupla karşılaştırıldığında ise, 5-FU+K, 5-FU+PEH, 5-FU+ABH, 5-FU+PEM ve 5-FU+ABM tedavisi uygulanan gruplardaki Bax mRNA ve protein ekspresyonlarında anlamlı artışlar görüldü.

mTOR mRNA ekspresyon düzeyleri ve protein seviyeleri, tüm tedavi gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdi. En düşük mTOR mRNA ve protein düzeyi 0,24 ve 0,13 olarak 5-FU ile tedavi edilen grupta belirlendi.

Kombinasyon uygulanan grupların hiçbirisinde, 5-FU uygulanan hücelere göre mTOR mRNA ve protein seviyeleri anlamlı şekilde azalmamıştır.

Akt mRNA ve protein düzeyleri, uygulanan tüm tedavilerde anlamlı olacak şekilde düşüş gösterdi. Akt mRNA ve protein seviyelerindeki en fazla düşüş 5-FU+L kombinasyonunun uygulandığı grupta görüldü. Kombinasyon grupları 5-FU ile tedavi edilen hücelerle karşılaştırıldığında, 5-FU+PEM uygulanan hüceler dışındaki grupların Akt mRNA ve protein seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir azalış sergiledi.

Kontrole göre 5-FU uygulanan hüceler dışındaki tüm gruplarda PTEN mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinde anlamlı artışlar görüldü. PTEN mRNA ekspresyonundaki en fazla artış kontrole göre 5,91 oranı ile ABM tedavisi uygulanan hücelerde görüldü. PTEN protein düzeyindeki en fazla yükseliş kontrole göre 6,47 kat orana sahip olan 5-FU+PEM uygulanan hücelerde görüldü. 5-FU ile kıyaslandığında, tüm kombinasyon tedavileri sonucunda PTEN mRNA ve protein seviyelerinde önemli artışlar olduğu gözlemlendi.

Tedavi grupları kontrol ile karşılaştırıldığında, PEK, ABK ve PEM uygulanan hüceler dışındaki tüm gruplarda p38 MAPK genine ait mRNA düzeylerinde ve p38 MAPK protein seviyelerinde istatistiki olarak anlamlı bir artış görüldü. 5-FU+K, 5-FU+L, 5-FU+PEH, 5-FU+PEM ve 5-FU+ABM ile muamele edilen gruplar, yalnız 5-FU uygulanan gruba göre p38 MAPK mRNA ve protein düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken, diğer kombine gruplarında anlamlı bir değişim gözlenmedi. p38 MAPK mRNA ve protein seviyelerini en fazla arttıran tedavinin 5-FU+PEM olduğu görüldü.

Sonuç olarak, yaptığımız çalışma ile kolorektal kanser tedavisinde 5-FU'nun etkinliğinin artırılması ve toksik etkisinin azaltılmasına katkı sağlayabilecek yeni kombine tedaviler ve bu tedavilerin moleküler mekanizmaları ortaya konmuştur. HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücelerinin canlılığının azalması ve apoptoza

yönelmesinde, 5-FU ile birlikte hem bitkisel etken maddeler olan kuersetin ve luteolinin hem de *Pistacia eurycarpa* ve *Achillea biebersteinii* bitkilerine ait ekstrelerin kombinasyon olarak uygulanması, 5-FU'nun tek başına uygulanmasına göre daha etkili olmuştur. Ayrıca, çalışmada kullanılan bitkisel etken maddeler ve bitki ekstrelerinin tek başlarına uygulandıklarında, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücrelerinin canlılığı ve apoptoza yönelmesinde çok önemli etkilere sahip oldukları belirlenmiştir. Uygulanan kombine tedavilerde 5-FU'nun düşük dozlarda bile etkinliğinin arttığı ve böylece ilacın yüksek sitotoksik etkilerinin minimuma indirilebileceği saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen bulguların ileri dönemlerde yapılacak *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi, uygulanan tedavilerin moleküler etki mekanizmalarının ve antikanser etkinliklerinin daha iyi aydınlatılmasına ve düşük toksisite oranı ile daha az yan etkiye sahip yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aaltonen, L. A., 2000. Hereditary intestinal cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 10 (4), 289-298.
- Aarnio, M., Sankila, R., Pukkala, E., Salovaara, R., Aaltonen, L. A., Chapelle A. D. L., Peltomaki, P., Mecklin, J. P., Jarvinen, H. J., 1999. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *International Journal of Cancer*, 81 (2), 214-218.
- Ackland, M. L., Van De Waarsenburg, S., Jones, R., 2005. Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. *In vivo*, 19 (1), 69-76.
- Adams, J. M. and Cory, S., 2002. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Current opinion in cell biology*, 14 (6), 715-720.
- Adams, J. M., 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes and development*, 17 (20), 2481-2495.
- Aggarwal, B. B. and Shishodia, S., 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology*, 71 (10), 1397-1421.
- Aizpurua, O. O., Ormazabal, M., Vallejo, A., Olivares, M., Navarro, P., Etxebarria, N., Usobiaga, A., 2015. Optimization of supercritical fluid consecutive extractions of fatty acids and polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Journal of Food Science*, 80 (1), 101-107.
- Anonim. 2015. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003096-pdf.pdf>
- Anonymus. 2013. https://www.learner.org/courses/biology/archive/images/1903_d.html
- Anonymus. 2015. <http://www.mq.edu.au/newsroom/2015/02/19/biomarker-discovery-offers-clearer-prognosis-for-bowel-and-rectal-cancer-patients/>
- Arber, N., Shapira, I., Ratan, J., Stern, B., Hibshoosh, H., Moshkowitz, M., Gammon, M., Fabian, I., Halpern, Z., 2000. Activation of cK-ras mutations in human gastrointestinal tumors. *Gastroenterology*, 118 (6), 1045-1050.
- Ashokkumar, P. and Sudhandiran, G., 2008. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62 (9), 590-597.
- Assinder, S. J., Dong, Q., Kovacevic, Z., Richardson, D. R., 2009. The TGF- β , PI3K/Akt and PTEN pathways: established and proposed biochemical integration in prostate cancer. *Biochemical Journal*, 417 (2), 411-421.
- Aşkın, H., 2009. Bazı Bitkisel Östrojenlerin *Drosophila melanogaster*'de Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi ve Folik Asit Kullanılarak Bu Etkilerin İyileştirilmesi Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Attoub, S., Hassan, A. H., Vanhoecke, B., 2011. Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 651 (1), 18-25.

- Avila, M. A., Velasco, J. A., Cansado, J., Notario, V., 1994. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Research*, 54 (9), 2424-2428.
- Balan, K. V., Demetzos, C., Prince, J., Dimas, K., Cladaras, M., Han, Z., Pantazis, P., 2005. Induction of apoptosis in human colon cancer HCT116 cells treated with an extract of the plant product, Chios mastic gum. *In vivo*, 19 (1), 93-102.
- Balan, K. V., Prince, J., Han, Z., Dimas, K., Cladaras, M., Wychea, J. H., Sitaras, N. M., Pantazis, P., 2007. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*. *Phytomedicine*, 14 (4), 263-272.
- Bali, E. B., Aık, L., Eli, P., Sarper, M., Avcu, F., Vural, M., 2015. In vitro anti-oxidant, cytotoxic and pro-apoptotic effects of *Achillea teretifolia* Willd. extracts on human prostate cancer cell lines. *Pharmacognosy magazine*, 11 (2), 308.
- Barış, ., Gllce, M., şahin, F., zer, H., Kili, H., zkan, H., Skmen, M., zbek, T., 2006. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Turkish Journal of Biology*, 30 (2), 65-73.
- Bazensky, I., Shoobridge-Moran, C., Yoder, L. H., 2007. Colorectal cancer: an overview of the epidemiology, risk factors, symptoms, and screening guidelines. *Medsurg Nursing*, 16 (1), 46-51.
- Bernet, A. and Mehlen, P., 2007. Dependence receptors: when apoptosis controls tumor progression. *Bulletin du cancer*, 94 (4), 10012-10017.
- Birt, D. F., Hendrich, S., Wang, W., 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90 (2), 157-177.
- Bokoch, G. M. and Der, C. J., 1993. Emerging concepts in the ras superfamily of Gtp-binding proteins. *FASEB Journal*, 7 (9), 750-759.
- Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J. H., van der Eb, A. J., Vogelstein, B., 1987. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*, 327 (6120), 293-297.
- Botteri, E., Iodice, S., Raimondi, S., Maisonneuve, P., Lowenfels, A. B., 2008. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 134 (2), 388-395.
- Boujrad, H., Gubkina, O., Robert, N., Krantic, S., Susin, S. A., 2007. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Orchestrated Way to Die. *Cell Cycle*, 6 (21), 2612-2619.
- Boyle, P. and Langman, J. S., 2000. Epidemiology. *British Medical Journal*, 321 (7264), 805-808.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- Brady, C.A., Jiang, D., Mello, S. S., Johnson, T. M., Jarvis, L. A., Kozak, M. M., Kenzelmann Broz, D., Basak, S., Park, E. J., McLaughlin, M. E., Karnezis, A. N., Attardi, L. D., 2011. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell*, 145 (4), 571-583.
- Bunz, F., Hwang, P. M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., 1999. Disruption of p53 in

- human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *The Journal of clinical investigation*, 104 (3), 263-269.
- Burt, R. W., DiSario, J. A., Cannon-Albright, L., 1994. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annual review of medicine*, 46, 371-379.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74 (17), 2157-2184.
- Campbell, P. T., Cotterchio, M., Dicks, E., Parfrey, P., Gallinger, S., McLaughlin, J. R., 2007. Excess body weight and colorectal cancer risk in Canada: associations in subgroups of clinically defined familial risk of cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 16 (9), 1735-1744.
- Canivenc-Lavier, M. C., Vernevaut, M. F., Totis, M., Siess, M. H., Magdalou, J., Suschetet, M., 1996. Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology*, 114 (1), 19-27.
- Casagrande, F. and Darbon, J. M., 2001. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochemical Pharmacology*, 61 (10), 1205-1215.
- Casciato, D. A., 2009. Cancer chemotherapeutic agents. *Manual of clinical oncology*, 6th edn. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 46-99.
- Chan, T. S., Galati, G., Pannala, A. S., Rice-Evans, C., O'Brien, P. J., 2003. Simultaneous detection of the antioxidant and pro-oxidant activity of dietary polyphenolics in a peroxidase system. *Free Radical Research*, 37 (7), 787-794.
- Chang, J., Hsu, Y., Kuo, P., Kuo, Y., Chiang, L., Lin, C., 2005. Increase of Bax/Bcl-X L ratio and arrest of cell cycle by luteolin in immortalized human hepatoma cell line. *Life sciences*, 76 (16), 1883-1893.
- Chen, W., Wang, X., Zhuang, J., Zhang, L., Lin, Y., 2007. Induction of death receptor 5 and suppression of survivin contribute to sensitization of TRAIL-induced cytotoxicity by quercetin in non-small cell lung cancer cells. *Carcinogenesis*, 28 (10), 2114-2121.
- Chidambaram, M., Manavalan, R., Kathiresan, K., 2011. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 14 (1), 67-77.
- Chou, T. C. and Martin, N., 2005. *CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC₅₀ and ED₅₀ and LD₅₀ Values*. ComboSyn, Paramus, 68 p, New Jersey, USA.
- Chou, T. C. and Martin, N., 2007. *CompuSyn software for drug combinations and for general dose effect analysis, and user's guide*. ComboSyn, Inc. Paramus, NJ, USA.
- Chou, T. C., 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews*, 58 (3), 621-681.
- Chou, T. C., 2011. The mass-action law based algorithms for quantitative econo-green bio-research. *Integrative Biology*, 3 (5), 548-559.

- Chung, D. C., 2000. The genetic basis of colorectal cancer: Insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology*, 119 (3), 854-865.
- Clarke, C. N. and Kopetz, E. S., 2015. BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. *Journal of gastrointestinal oncology*, 6 (6), 660.
- Courtney, K. D., Corcoran, R. B., Engelman, J. A., 2010. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28 (6), 1075-1083.
- Cragg, G. M. and Newman, D. J., 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*, 100 (1), 72-79.
- Cuadrado, A. and Nebreda, A. R., 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal*, 429 (3), 403-417.
- Dachman, A. H., Buck, J. L., Burke, A. P., Sobin, L. H., 1989. Cronkhite-Canada syndrome: radiologic features. *Gastrointestinal radiology*, 14 (1), 285-290.
- Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J., 2004. Cell death: critical control points. *Cell*, 116 (2), 205-219.
- Davies, R. J., Miller, R., Coleman, N., 2005. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nature Reviews Cancer*, 5 (3), 199-209.
- Davis, P. H., 1967. *Flora of Turkey and The East Aegean Island*. Vol. 2, Edinburgh: Edinburgh University Press., 545-546.
- Davis, P. H., 1975. *Flora of Turkey and The East Aegean Island*. Vol. 5, Edinburgh: Edinburgh University Press., 250-251.
- De Jong, A. E., Morreau, H., Nagengast, F. M., Mathus-Vliegen, E. M., Kleibeuker, J. H., Griffioen, G., Cats, A., Vasen, H. F. A., 2005. Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *The American journal of gastroenterology*, 100 (1), 139-143.
- Delettre, C., Yuste, V. J., Moubarak, R. S., Bras, M., Lesbordes-Brion, J. C., Petres, S., Bellalou, J., Susin, S. A., 2006. AIFsh, a novel apoptosis-inducing factor (AIF) pro-apoptotic isoform with potential pathological relevance in human cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (10), 6413-6427.
- Demirci, F., Başer, K. H. C., Çalış, I., Gökhan, E., 2001. Essential oil and antimicrobial evaluation of the *Pistacia eurycarpa*. *Chemistry of Natural Compounds*, 37 (4), 332-335.
- Derry, M. M., Raina, K., Agarwal, R., 2013. Identifying molecular targets of lifestyle modifications in colon cancer prevention. *Frontiers in oncology*, 3, 119.
- Derwich, E., Manar, A., Benziane, Z., Boukir, A., 2010. GC/MS analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocco. *World Applied Sciences Journal*, 8 (10), 1267-1276.
- Diasio, R. B. and Harris, B. E., 1989. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clinical pharmacokinetics*, 16 (4), 215-237.
- Douillard, J., Cunningham, D., Roth, A. D., Navarro, M., James, R. D., Karasek, P., Gruia, G., 2000. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *The Lancet*, 355 (9209), 1041-1047.
- Du, B., Jiang, L., Xia, Q., Zhong, L., 2005. Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5- fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line HT-29. *Chemotherapy*, 52 (1), 23-28.

- Duo, J., Ying, G. G., Wang, G. W., Zhang, L., 2012. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Mol Med Rep*, 5 (6), 1453-1456.
- Duraj, J., Zazrivcova, K., Bodo, J., 2005. Flavonoid quercetin, but not apigenin or luteolin, induced apoptosis in human myeloid leukemia cells and their resistant variants. *Neoplasma*, 52 (4), 273-279.
- Easton, R. M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D. W., Mizrahi, M., Forman, M. S., Lee, V. M., Szabolcs, M., de Jong, R., Oltersdorf, T., Ludwig, T., Efstratiadis, A., Birnbaum, M. J., 2005. Role for Akt3/protein kinase B γ in attainment of normal brain size. *Molecular & Cellular Biology*, 25 (5), 1869-1878.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35 (4), 495-516.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Wahab, M. S. A., 2014. Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. *Molecules*, 19 (2), 2497-2522.
- Fearon, E. R. and Vogelstein, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61 (5), 759-767.
- Fearon, E. R., 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 479-507.
- Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., Kern, S., Simons, J., Ruppert, J., Hamilton, S.R., Preisinger, A. C., Thomas, G., Kinzler, K. W., 1990. Identification of a chromosome-18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, 247, 49-56.
- Foulkes, W. D., 1995. A tale of four syndromes: Familial adenomatous polyposis, Gardner syndrome, attenuated APC and Turcot syndrome. *Monthly Journal of the Association of Physicians*, 88 (12), 853-863.
- Fukuda, I. and Ashida, H., 2008. Suppressive effects of flavonoids on activation of the aryl hydrocarbon receptor induced by dioxins. *Functional Foods and Health, ACS Symposium Series*, Washington DC.
- Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., Komaitis, M., 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food chemistry*, 107 (3), 1120-1130.
- Ghavami, G., Sardari, S., Shokrgozar, M. A., 2010. Anticancerous potentials of *Achillea* species against selected cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (22), 2411-2417.
- Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., Adjei, A. A., 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55 (3), 178-194.
- Giacchetti, S. B. R. N. R., Perpoint, B., Zidani, R., Le Bail, N., Faggiuolo, R., Focan, C., Bertheaut-Cvitkovic, F., 2000. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 18 (1), 136-136.
- Giaginis, C. and Theocharis, S., 2011. Current evidence on the anticancer potential of Chios mastic gum. *Nutrition and cancer*, 63 (8), 1174-1184.
- Gorlin, R. J., Cohen, M. M., Condon, L. M., Burke, B. A., 1992. Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 44 (3), 307-314.

- Grady, W. M., Willis, J., Guilford, P. J., Dunbier, A. K., Toro, T. T., Lynch, H., Wiesner, G., Ferguson, K., Eng, C., Park, J. G., Kim, S. J., Markowitz, S., 2000. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nature genetics*, 26 (1), 16-17.
- Granado-Serrano, A. B., Martin, M. A., Bravo, L., Goya, L., Ramos, S., 2006. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *The Journal of Nutrition*, 136 (11), 2715-2721.
- Green, D. R. and Kroemer, G., 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458 (7542), 1127-1130.
- Guner, A., Ozhatay, N., Ekim, T., Baser, K. H. C., 2000. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, suppl. 2, vol. 11. Edinburgh University Press, Edinburgh, 158-159.
- Guo, L. D., Chen, X. J., Hu, Y. H., Yu, Z. J., Wang, D., Liu, J. Z., 2013. Curcumin inhibits proliferation and induces apoptosis of human colorectal cancer cells by activating the mitochondria apoptotic pathway. *Phytotherapy Research*, 27 (3), 422-430.
- Haggar, F. A. and Boushey, R. P., 2009. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery*, 22 (4), 191-197.
- Han, J. I. and Na, K. J., 2011. Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Canine Skin Melanoma and a Possibility as a Cancer Model for Human Skin Melanoma. *Melanoma in the Clinic-Diagnosis, Management and Complications of Malignancy*, <http://www.intechopen.com/books/melanoma-in-the-clinic-diagnosis-management-and-complications-of-malignancy/wnt-catenin-signaling-pathway-in-canine-skin-melanoma-and-a-possibility-as-a-cancer-model-for-human-> (15.06.2016).
- Han, X., Shen, T., Lou, H., 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8 (9), 950-988.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1), 57-70.
- Harborne, J. B. and Williams, C. A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55 (6), 481-504.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazenbik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S., 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (1), 432-438.
- Hempel, J., Pforte, H., Raab, B., Engst, W., Bohm, H., Jacobasch, G., 1999. Flavonols and flavones of parsley cell suspension culture change the antioxidative capacity of plasma in rats. *Food/Nahrung*, 43 (3), 201-204.
- Hengartner, M. O. and Horvitz, H. R., 1994. *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell*, 76 (4), 665-676.
- Hengartner, M. O., 2001. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*, 104 (3), 325-328.
- Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y., Mills, G. B., 2005. Exploiting the PI3K/Akt pathway for cancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4 (12), 988-1004.

- Herman, J. G., Umar, A., Polyak, K., Graff, J. R., Ahuja, N., Issa, J. P. J., Markowitz, S., Willson, J. K. V., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W., Kane, M. F., Kolodner, R. D., Vogelstein, B., Kunkel, T. A., Baylin, S. B., 1998. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (12), 6870-6875.
- Howe, J. R. and Guillem, J. G., 1997. The genetics of colorectal cancer. *Surgical Clinics of North America*, 77 (1), 175-195.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Zhang, Y., 2009. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and cancer*, 62 (1), 1-20.
- Hunter, A. M., LaCasse, E. C., Korneluk, R. G., 2007. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*, 12 (9), 1543-1568.
- Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcuoglu, M., Arabaci, T., Kupeli, E., Baser, K. H. C., 2006. Biological activity and composition of the essential oils of *Achillea schischkinii* Sosn. and *Achillea aleppica* DC. subsp. *aleppica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (1), 170-173
- Jaattela, M. and Tschopp, J., 2003. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nature immunology*, 4 (5), 416-423.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M. A., Hall, A., Hall, M. N., 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology*, 6 (11), 1122-1128.
- Jaganathan, S. K. and Mandal, M., 2009. Honey constituents and its apoptotic effect in colon cancer cells. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science*, 1 (2), 29-36.
- Janout, V. and Kollarova, H., 2001. Epidemiology of colorectal cancer. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae*, 145, 5-10.
- Jeghers, H., McKusick, V. A., Katz, K. H., 1949. Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits-A syndrome of diagnostic significance. *New England Journal of Medicine*, 241 (25), 993-1005.
- Jin, W., Han, H., Ma, L., Zhou, H., Zhao, C., 2016. The chemosensitization effect of quercetin on cisplatin induces the apoptosis of human colon cancer HT-29 cell line. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 9 (2), 2285-2292.
- Johnston, P. G. and Kaye, S., 2001. Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. *Anticancer Drugs*, 12 (8), 639-646.
- Jones, P. A. and Laird, P. W., 1999. Cancer-epigenetics comes of age. *Nature genetics*, 21 (2), 163-167.
- Kafkas, S., Kafkas, E., Kürkçüoğlu, M., Başer, K. H. C., 2007. Analysis of the fatty oil of *Pistacia eurycarpa* nuts by gas chromatography/mass spectrophotometry. *Chemistry Of Natural Compounds*, 43 (3), 313-314.
- Kafkas, S., Kafkas, E., Perl-Treves, R., 2002. Morphological diversity and a germplasm survey of three wild *Pistacia* species in Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49 (3), 261-270.
- Kaneria, M. J. and Chanda, S. V., 2013. The effect of sequential fractionation technique on the various efficacies of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Analytical Methods*, 6 (1), 164-175.

- Kang, T. B. and Liang, M. C., 1997. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL460 leukemia cells. *Biochemical Pharmacology*, 54 (9), 1013-1018.
- Karp, G., 2008. *Cell and molecular biology: Concepts and experiments*. 5 edition. John New Jersey, Wiley and Sons, 653-657.
- Kasdagly, M., Radhakrishnan, S., Reddivari, L., Veeramachaneni, D. R., Vanamala, J., 2014. Colon carcinogenesis: Influence of Western diet-induced obesity and targeting stem cells using dietary bioactive compounds. *Nutrition*, 30 (11), 1242-1256.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26 (4), 239.
- Kheirelseid, E. A. H., Miller, N., Kerin, M. J., 2013. Molecular biology of colorectal cancer: Review of the Literature. *American Journal of Molecular Biology*, 3, 72-80.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D. M., 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110 (2), 163-175.
- Kim, G. T., Lee, S. H., Kim, J. I., Kim, Y. M., 2014. Quercetin regulates the sestrin 2-AMPK-p38 MAPK signaling pathway and induces apoptosis by increasing the generation of intracellular ROS in a p53-independent manner. *International journal of molecular medicine*, 33 (4), 863-869.
- Kim, W. K., Bang, M. H., Kim, E. S., Kang, N. E., Jung, K. C., Cho, H. J., Park, J. H., 2005. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16 (3), 155-162.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Hellevoara, M., Teppo, L., Pukkala, E., Aromaa, A., 1997. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology*, 146 (3), 223-230.
- Ko, W. G., Kang, T. H., Lee, S. J., Kim, Y. C., Lee, B. H., 2002. Effects of luteolin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human myeloid leukaemia cells. *Phytotherapy Research*, 16 (3), 295-298.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*, 87 (1), 99-163.
- Kuru, C. ve Özsabuncuoğlu, İ. H., 1990. Yabani Pistacia türlerinin aşılmasında sorunlar ve çözüm yolları. *Türkiye 1. Antepfıstığı Sempozyumu*, Gaziantep.
- Kwon, K. H., Barve, A., Yu, S., Huang, M. T., Kong, A. N. T., 2007. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28 (9), 1409-1421.
- LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G., MacKenzie, A. E., 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, 17 (25), 3247-3260.
- LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S., Korneluk, R. G., 2008. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 27 (48), 6252-6275.
- Lane, D. P., 1993. Cancer-A death in the life of P53. *Nature*, 362 (6423), 786-787.

- Larsson, S. C. and Wolk, A., 2006. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *International journal of cancer*, 119 (11), 2657-2664.
- Le Marchand, L., 2002. Cancer preventive effects of flavonoids: a review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56 (6), 296-301.
- Lee, K. J., Inoue, M., Otani, T., Iwasaki, M., Sasazuki, S., Tsugane, S., JPHC Study Group., 2007. Physical activity and risk of colorectal cancer in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Cancer Causes & Control*, 18 (2), 199-209.
- Lee, L. T., Huang, Y. T., Hwang, J. J., Lee, P. P., Ke, F. C., Nair, M. P., Lee, M. T., 2001. Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer research*, 22 (3), 1615-1627.
- Lee, W. J., Wu, L. F., Chen, W. K., Wang, C. J., Tseng, T. H., 2006. Inhibitory effect of luteolin on hepatocyte growth factor/scatter factor-induced HepG2 cell invasion involving both MAPK/ERKs and PI3K–Akt pathways. *Chemico-biological interactions*, 160 (2), 123-133.
- Leela, V. and Saraswathy, A., 2013. Quantification of pharmacologically active markers gallic acid, quercetin and lupeol from acacia leucophloea wild flowers by HPTLC Method. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*, 4 (1), 1-4.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396 (6712), 643-649.
- Levine, A. J., 1997. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88 (3), 323-331.
- Li, S., Wang, A., Jiang, W., Guan, Z., 2008. Pharmacokinetic characteristics and anticancer effects of 5-fluorouracil loaded nanoparticles. *BMC Cancer*, 8 (1), 103-111.
- Lim, D. Y., Jeong, Y., Tyner, A. L., 2007. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292 (1), 66-75.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25 (4), 402-408.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P. G., 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330-338.
- Lorenzo, H. K. and Susin, S. A., 2004. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS letters*, 557 (1-3), 14-20.
- Melino, G., 2001. The Sirens' song. *Nature*, 412 (6842), 23-23.
- Mendel, J., 2004. Evidenced based medicine. Benefits, limitations and issues for complementary and alternative medicine. *Australian Journal of Holistic Nursing*, The, 11 (2), 21.
- Millimouno, F. M., Dong, J., Yang, L., Li, J., Li, X., 2014. Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. *Cancer Prevention Research*, 7 (11), 1081-1107.
- Miyaki, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Enomoto, M., Igari, T., Tanaka, K., Muraoka, M., Takahashi, H., Amada, Y., Fukayama, M., Maeda, Y., Iwama, T., Mishima, Y., Mori, T., Koike, M., 1994. Characteristics of somatic mutation

- of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer research*, 54 (11), 3011-3020.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman B., Reed, J. C., 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of Bcl-2 and Bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9 (6), 1799-1805.
- Monk, M., 1995. Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Developmental genetics*, 17 (3), 188-197.
- Moon, Y. J., Wang, X., Morris, M. E., 2006. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in vitro*, 20 (2), 187-210.
- Murakami, A., Ashida, H., Terao, J., 2008. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer letters*, 269 (2), 315-325.
- Murtaza, I., Marra, G., Schlapbach, R., Patrignani, A., Künzli, M., Wagner, U., Dutt, A., 2006. A preliminary investigation demonstrating the effect of quercetin on the expression of genes related to cell-cycle arrest, apoptosis and xenobiotic metabolism in human CO115 colon-adenocarcinoma cells using DNA microarray. *Biotechnology and applied biochemistry*, 45 (1), 29-36.
- Neergheen, V. S., Bahorun, T., Taylor, E. W., Jen, L. S., Aruoma, O. I., 2010. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology*, 278 (2), 229-241.
- Nelson, E. C., Evans, C. P., Mack, P. C., Devere-White, R. W., Lara, Jr., P. N., 2007. Inhibition of Akt pathways in the treatment of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Diseases*, 10 (4), 331-339.
- Nemeth, E. and Bernath, J., 2008. Biological activities of yarrow species (*Achillea* spp.). *Current Pharmaceutical Design*, 14 (29), 3151-3167.
- Neoh, C. A., Wang, R. Y. L., Din, Z. H., Su, J. H., Chen, Y. K., Tsai, F. J., Weng, S. H., Wu, Y. J., 2012. Induction of Apoptosis by Sinulariolide from Soft Coral through Mitochondrial-Related and p38MAPK Pathways on Human Bladder Carcinoma Cells. *Marine Drugs*, 10 (12), 2893-2911
- Neuhouser, M. L., 2004. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, 50 (1), 1-7.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75 (3), 311-335.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N., 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833 (12), 3448-3459.
- Norbury, C. J. and Hickson, I. D., 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41 (1), 367-401.
- O'Brien, M. A. and Kirby, R., 2008. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18 (6), 572-585.
- O'Connell, J. B., Maggard, M. A., Livingston, E. H., Cifford, K. Y., 2004. Colorectal cancer in the young. *The American journal of surgery*, 187 (3), 343-348.
- Olson, J. M. and Hallahan, A. R., 2004. p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends in molecular medicine*, 10 (3), 125-129.
- Oren M., 2003. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death & Differentiation*, 10 (4), 431-442.

- Orhan, I., Küpeli, E., Aslan, M., Kartal, M., Yesilada, E., 2006. Bioassay-guided evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of pistachio, *Pistacia vera* L. *Journal of ethnopharmacology*, 105 (1), 235-240.
- Pabla, B., Bissonnette, M., Konda, V. J., 2015. Colon cancer and the epidermal growth factor receptor: Current treatment paradigms, the importance of diet, and the role of chemoprevention. *World journal of clinical oncology*, 6 (5), 133.
- Pandurangan, A. K. and Esa, N. M., 2014. Luteolin, a bioflavonoid inhibits colorectal cancer through modulation of multiple signaling pathways: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (14), 5501-5508.
- Pathania, A. S., Guru, S. K., Verma, M. K., Sharma, C., Abdullah, S. T., Malik, F., Chandra, S., Katoch, M., Bhushan, S., 2013. Disruption of the PI3K/AKT/mTOR signaling cascade and induction of apoptosis in HL-60 cells by an essential oil from *Monarda citriodora*. *Food and chemical toxicology*, 62, 246-254.
- Petak, I., Tillman, D. M., Houghton, J. A., 2000. p53 dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines. *Clinical cancer research*, 6 (11), 4432-4441.
- Peutz, J. L. A., 1921. Over een zeer merkwaardige, gecombineerde familiale polyposis van de slijmvliezen van den tractus intestinalis met die van de neuskeelholte en gepaard met eigenaardige pigmentaties van huden slijmvliezen. *Ned Maandschr v Geneesk*, 10, 134-146.
- Phin, S., Moore, M., Cotter, P. D., 2013. Genomic rearrangements of PTEN in prostate cancer. *Frontiers in oncology*, 3, 240.
- Poschl, G. and Seitz, H. K., 2004. Alcohol and cancer. *Alcohol and Alcoholism*, 39 (3), 155-165.
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 359 (6392), 235-237.
- Psahoulia, F. H., Drosopoulos, K. G., Doubravaska, L., Andera, L., Pintzas, A., 2007. Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6 (9), 2591-2599.
- Ramos, A. A., Pereira-Wilson, C., Collins, A. R., 2010. Protective effects of ursolic acid and luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells. *Mutation Research*, 692 (1), 6-11.
- Ramsahoye, B. H., Davies, C. S., Mills, K. I., 1996. DNA methylation: biology and significance. *Blood reviews*, 10 (4), 249-261.
- Ranelletti, F. O., Maggiano, N., Serra, F. G., Ricci, R., Larocca, L. M., Lanza, P., Scambia, G., Fattorossi, A., Capelli, A., Piantelli, M., 2000. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. *International journal of cancer*, 85 (3), 438-445.
- Reed, J. C., 1997. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. In *Seminars in hematology*, 34 (4), 9-19.
- Ries, L. A. G., Melbert, D., Krapcho, M., Stinchcomb, D. G., Howlader, N., Horner, M. J., 2008. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005. National Cancer Institute, USA.

- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L., 2015. Cell viability assays. Assay Guidance Manual, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92012/?report=reader> (30.03.2016).
- Roncucci, L., Pedroni, M., Vaccina, F., Benatti, P., Marzona, L., De Pol, A., 2000. Aberrant crypt foci in colorectal carcinogenesis. Cell and crypt dynamics. Cell proliferation, 33 (1), 1-18.
- Ross, J. A. and Kasum, C. M., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. Annual Review of Nutrition, 22 (1), 19-34.
- Sakamoto, K. and Maeda, S., 2010. Targeting NF- κ B for colorectal cancer. Expert opinion on therapeutic targets, 14 (6), 593-601.
- Salem, O. S. and Steck, W. D., 1983. Cowdens disease (multiple hamartoma and neoplasia syndrome). A casereport and review of the English-literature. Journal of the American Academy of Dermatology, 8 (5), 686-696.
- Santarelli, R. L., Pierre, F., Corpet, D. E., 2008. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. Nutrition and cancer, 60 (2), 131-144.
- Sarkar, F. H., Li, Y., Wang, Z., Kong, D., 2009. Cellular signaling perturbation by natural products. Cellular signalling, 21 (11), 1541-1547.
- Schmoll, H. J., Van Cutsem, E., Stein, A., Valentini, V., Glimelius, B., Haustermans, K., Nagtegaal, I. D., 2012. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. Annals of Oncology, 23 (10), 2479-2516.
- Schneider, K. A., 2011. Counseling about cancer: Strategies for genetic counseling. John Wiley & Sons., 187-191.
- Schneider, P. and Tschopp, J., 2000. Apoptosis induced by death receptors. Pharmaceutica acta Helvetiae, 74 (2), 281-286.
- Senatore, F., Napolitano, F., Apostolides Arnold, N., Bruno, M., Herz, W., 2005. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea falcata* L.(Asteraceae). Flavour and Fragrance Journal, 20 (3), 291-294.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., 2001. Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in central Anatolia. Journal of Ethnopharmacology, 75 (2), 95-115.
- Shewach, D. S. and Kuchta, R. D., 2009. Introduction to cancer chemotherapeutics. Chemical reviews, 109 (7), 2859-2861.
- Shi, R., Huang, Q., Zhu, X., Ong, Y. B., Zhao, B., Lu, J., Shen, H. M., 2007. Luteolin sensitizes the anticancer effect of cisplatin via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated p53 phosphorylation and stabilization. Molecular cancer therapeutics, 6 (4), 1338-1347.
- Shih, H., Pickwell, G. V., Quattrochi, L. C., 2000. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. Archives of Biochemistry and Biophysics, 373 (1), 287-294.
- Shimoi, K., Okada, H., Furugori, M., Goda, T., Takase, S., Suzuki, M., Hara, Y., Yamamoto, H., Kinae, N., 1998. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans. FEBS Letters, 438 (3), 220-224.
- Si, X. T., Zhang, M. L., Shi, Q. W., Kiyota, H., 2006. Chemical constituents of the plants in the genus *Achillea*. Chemistry and biodiversity, 3 (11), 1163-1180.

- Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A., 2015. Cancer statistics, 2015. CA: a cancer journal for clinicians, 65 (1), 5-29.
- Skibber, J., Minsky, B., Hoff, P., 2001. Cancer of the colon and rectum. Cancer: principles & practice of oncology. 6th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1216-1271
- Skocibusic, M., Bezic, N., Dunkic, V., Radonic, A., 2004. Antibacterial activity of *Achillea clavennae* essential oil against respiratory tract pathogens. *Fitoterapia*, 75 (7), 733-736.
- Slattery, M. L., Lundgreen, A., Wolff, R. K., 2013. Dietary influence on MAPK-signaling pathways and risk of colon and rectal cancer. *Nutrition and cancer*, 65 (5), 729-738.
- Smith, G., Carey, F. A., Beattie, J., Wilkie, M. J., Lightfoot, T. J., Coxhead, J., Garner R. C., Steele R. J. C., Wolf, C. R., 2002. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (14), 9433-9438.
- Somasundaram, K. and El-Deiry, W. S., 2000. Tumor suppressor P53: Regulation and function. *Frontiers in Bioscience*, 5, 424-437.
- Soravia, C., Berk, T., Madlensky, L., Mitri, A., Cheng, H., Gallinger, S., Cohen, Z., Bapat, B., 1998. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *The American Journal of Human Genetics*, 62 (6), 1290-1301.
- Spigelman, A. D., Arese, P., Phillips, R. K. S., 1995. Polyposis: The Peutz-Jeghers syndrome. *British journal of surgery*, 82 (10), 1311-1314.
- Srimuangwong, K., Tocharus, C., Tocharus, J., Suksamrarn, A., Chintana, P. Y., 2012. Effects of hexahydrocurcumin in combination with 5-fluorouracil on dimethylhydrazineinduced colon cancer in rats. *World J. Gastroenterol*, 18 (47), 6951-6959.
- Stewart, B. W. and Wild, C. P., 2014. World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, 505, Lyon.
- Suh, D. K., Lee, E. J., Kim, H. C., Kim, J. H., 2010. Induction of G1/S phase arrest and apoptosis by quercetin in human osteosarcoma cells. *Archives of pharmacal research*, 33 (5), 781-785.
- Sun, M., Estrov, Z., Ji, Y., Coombes, K. R., Harris, D. H., Kurzrock, R., 2008. Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 7 (3), 464-473.
- Surh, Y. J., 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3 (10), 768-780.
- Tabanca, N., Demirci, B., Gurbuz, I., Demirci, F., Becnel, J. J., Wedge, D. E., Baser, K. H., 2011. Essential oil composition of five collections of *Achillea biebersteinii* from central Turkey and their antifungal and insecticidal activity. *Natural Product Communications*, 6 (5), 701-706.
- Tanaka, T., 2009. Colorectal carcinogenesis: review of human and experimental animal studies. *Journal of carcinogenesis*, 8 (1), 5.
- Tang, X. Y., Zhu, Y. Q., Tao, W. H., Wei, B., Lin, X. L., 2007. Synergistic effect of triptolide combined with 5-fluorouracil on colon carcinoma. *Postgraduate Medical Journal*, 83 (979), 338-343.

- Tastekin, D., Tambas, M., Kilic, K., Erturk, K., Arslan, D., 2014. The efficacy of *Pistacia terebinthus* soap in the treatment of cetuximab-induced skin toxicity. *Investigational new drugs*, 32 (6), 1295-1300.
- Tohme, R., Al Aaraj, L., Ghaddar, T., Gali-Muhtasib, H., Saliba, N. A., Darwiche, N., 2013. Differential growth inhibitory effects of highly oxygenated guaianolides isolated from the Middle Eastern indigenous plant *Achillea falcata* in HCT-116 colorectal cancer cells. *Molecules*, 18 (7), 8275-8288.
- Tokunaga, E., Oki, E., Egashira, A., Sadanaga, N., Morita, M., Kakeji, Y., Maehara, Y., 2008. Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 8 (1), 27-36.
- Tomlinson, I. P. M. and Houlston, R. S., 1997. Peutz- Jeghers syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 34, 1007-1011.
- Tong, J., Xie, G., He, J., Li, J., Pan, F., Liang, H., 2011. Synergistic antitumor effect of dichloroacetate in combination with 5-fluorouracil in colorectal cancer. *BioMed Research International*, 2011, 1-7.
- Toyota, M., Ho, C., Ahuja, N., Jair, K. W., Li, Q., Ohe-Toyota, M., Baylin, S. B., Issa, J. P. J., 1999. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer research*, 59 (10), 2307-2312.
- Tsang, C. K. and Zheng, X. F., 2007. TOR-in(g) the nucleus. *Cell Cycle*, 6 (1), 25-29.
- Tsao, J. and Shibata, D., 1994. Further evidence that one of the earliest alterations in colorectal carcinogenesis involves APC. *The American journal of pathology*, 145 (3), 531.
- Tschopp, O., Yang, Z. Z., Brodbeck, D., Dummler, B. A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., Hemmings, B. A., 2005. Essential role of protein kinase B γ (PKB γ /Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development*, 132 (13), 2943-2954.
- Tsong, W. H., Koh, W. P., Yuan, J. M., Wang, R., Sun, C. L., Yu, M. C., 2007. Cigarettes and alcohol in relation to colorectal cancer: the Singapore Chinese Health Study. *British journal of cancer*, 96 (5), 821-827.
- Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., Croce, C. M., 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14; 18) chromosome translocation. *Science*, 226 (4678), 1097-1099.
- van Erk, M. J., Roepman, P., van der Lende, T. R., Stierum, R. H., Aarts, J. M. M. J. G., van Bladeren, P. J., van Ommen, B., 2005. Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro. *European journal of nutrition*, 44 (3), 143-156.
- Vaseva, A. V., Marchenko, N. D., Ji, K., Tsirka, S. E., Holzmann, S., Moll, U. M., 2012. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, 149 (7), 1536-1548.
- Verhagen, A. M., Silke, J., Ekert, P. G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L. M., Day, C. L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Vaux, D. L., 2002. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (1), 445-454.

- Viguiier, J., Boige, V., Miquel, C., Pocard, M., Giraudeau, B., Sabourin, J. C., Ducreux, M., Sarasin, A., Praz, F., 2005. ERCC1 codon 118 polymorphism is a predictive factor for the tumor response to oxaliplatin/5-fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 11 (17), 6212-6217.
- Violette, S., Poulain, L., Dussaulx, E., Pepin, D., Faussat, A. M., Chambaz, J., Lesuffleur, T., 2002. Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-XL in addition to Bax and p53 status. *International Journal of Cancer*, 98 (4), 498-504.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K. W., 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87 (2), 159-170.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Alida, M. M., Smits, B. S., Bos, J. L., 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New England Journal of Medicine*, 319 (9), 525-532.
- Volate, S. R., Davenport, D. M., Muga, S. J., Wargovich, M. J., 2005. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis*, 26 (8), 1450-1456.
- Wang, L. and Martins-Green, M., 2014. Pomegranate and its components as alternative treatment for prostate cancer. *International journal of molecular sciences*, 15 (9), 14949-14966.
- Wani, Z. A., Guru, S. K., Rao, A. S., Sharma, S., Mahajan, G., Behl, A., Kumar, A., Sharma, P. R., Kamal, A., Bhushan, S., Mondhe, D. M., 2016. A novel quinazolinone chalcone derivative induces mitochondrial dependent apoptosis and inhibits PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human colon cancer HCT-116 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 87, 1-11.
- Warren, C. A., Paulhill, K. J., Davidson, L. A., Lupton, J. R., Taddeo, S. S., Hong, M. Y., Turner, N. D., 2009. Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *The Journal of nutrition*, 139 (1), 101-105.
- Watson, P. and Lynch, H. T., 1994. The Tumor Spectrum in Hnpcc. *Anticancer Research*, 14 (4B), 1635-1639.
- Wenzel, U., Herzog, A., Kuntz, S., Daniel, H., 2004. Protein expression profiling identifies molecular targets of quercetin as a major dietary flavonoid in human colon cancer cells. *Proteomics*, 4 (7), 2160-2174.
- Willett, W. C., 2005. Diet and cancer: an evolving picture. *JAMA*, 293 (2), 233-234.
- Wolff, M.E., 1994. Burger Medicinal Chemistry and Drug Discovery. *American Journal of Therapeutics*, 3 (8), 608.
- Wong, R. S., 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30 (1), 1.
- Wright, G. L., Maroulakou, I. G., Eldridge, J., Liby, T. L., Sridharan, V., Tsiichlis, P. N., Muise-Helmericks, R. C., 2008. VEGF stimulation of mitochondrial biogenesis: requirement of AKT3 kinase. *The FASEB Journal*, 22 (9), 3264-3275.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M. N., 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124 (3), 471-484.

- Xavier, C. P. and Pereira-Wilson, C., 2016. Medicinal plants of the genuses *Salvia* and *Hypericum* are sources of anticolon cancer compounds: Effects on PI3K/Akt and MAP kinases pathways. *Pharma Nutrition*, 4 (2), 112-122.
- Xavier, C. P., Lima, C. F., Preto, A., Seruca, R., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C., 2009. Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer letters*, 281 (2), 162-170.
- Xavier, C. P., Lima, C. F., Rohde, M., Pereira-Wilson, C., 2011. Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 68 (6), 1449-1457.
- Xing, N., Chen, Y., Mitchell, S. H., Young, C. Y., 2001. Quercetin inhibits expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 22 (3), 409-414.
- Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X., He, K., 2014. Synergy effects of herb extracts: pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*, 92, 133-147.
- Yeatman, T. J., 2001. Colon cancer. *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, 1-6.
- Zhan, Q., Chen, I. T., Antinore, M. J., Fornace, A. J., 1998. Tumor suppressor p53 can participate in transcriptional induction of the GADD45 promoter in the absence of direct DNA binding. *Molecular and cellular biology*, 18 (5), 2768-2778.
- Zhang, L., Yu, J., Park, B. H., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., 2000. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science*, 290 (5493), 989-992.
- Zisman, A. L., Nickolov, A., Brand, R. E., Gorchow, A., Roy, H. K., 2006. Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Archives of internal medicine*, 166 (6), 629-634.

ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Kadir ERDOĞAN 1985 yılında doğdu. Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2008 yılında mezun oldu. 2012 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. 2012-2013 Eğitim-Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Doktora programına başladı. Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir.