

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**TÜMÖRE YATKIN MİKROÇEVREDE, KANSER SİNYAL YOLAKLARI İLE
İLİŞKİLİ SIRT2 VE SIRT3 PROTEİNLERİ VE E-KADERİN, β -KATENİN
YÜZEY ADEZYON MOLEKÜLLERİNİN EKSPRESYONU İLE OKSİDATİF
STRES ÜZERİNE KİMİZİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Canan GÜLMEZ

Doktora Tezi

Danışman

Prof. Dr. Onur ATAKIŞI

MAYIS-2018

KARS



T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI



**TÜMÖRE YATKIN MİKROÇEVREDE, KANSER SİNYAL YOLAKLARI İLE
İLİŞKİLİ SIRT2 VE SIRT3 PROTEİNLERİ VE E-KADERİN, β -KATENİN
YÜZEY ADEZYON MOLEKÜLLERİNİN EKSPRESYONU İLE OKSİDATİF
STRES ÜZERİNE KİMİZİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Canan GÜLMEZ

Doktora Tezi

Danışman

Prof. Dr. Onur ATAKIŞI


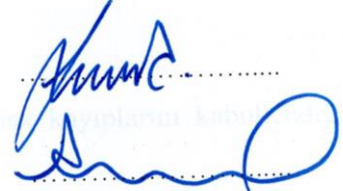



**Bu tez çalışması “2017-TS-32” nolu proje ile Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)
Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.**

MAYIS-2018

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı öğrencisi Canan GÜLMEZ'in Prof. Dr. Onur ATAKIŞI danışmanlığında doktora tezi olarak hazırladığı “*Tümöre yatkın mikroçevrede, kanser sinyal yolları ile ilişkili SIRT2 ve SIRT3 proteinleri ve E-kaderin, β -katenin yüzey adezyon moleküllerinin ekspresyonu ile oksidatif stres üzerine kırmızın etkisinin araştırılması*” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **oy BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

09 / 05 / 2018

Adı ve Soyadı	İmza
Başkan : Prof. Dr. Onur ATAKIŞI	
Üye : Prof. Dr. Emine ATAKIŞI	
Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN	
Üye : Dr. Öğretim Üyesi Özkan ÖZDEN	
Üye : Dr. Öğretim Üyesi Altuğ KÜÇÜKGÜL	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .. / .. / 20... gün ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Fikret AKDENİZ
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Canan GÜLMEZ

09.05.2018

ÖZET

(Doktora Tezi)

Tümöre Yatkın Mikroçevrede, Kanser Sinyal Yolakları ile İlişkili SIRT2 ve SIRT3 Proteinleri ve E-Kaderin, β -Katenin Yüzey Adezyon Moleküllerinin Ekspresyonu ile Oksidatif Stres Üzerine Kımyın Etkisinin Araştırılması

Canan GÜLMEZ

Kafkas Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Onur ATAĞIŞI

Yapılan çalışmada bir prokarsinojen olan 1,2-dimetil hidrazin (DMH) ile farelerde oluşturulan tümöre yatkın mikroçevrede, kanser sinyal yollarıyla ilişkili SIRT2 ve SIRT3 proteinleri ve E-kaderin, β -katenin yüzey adezyon proteinlerinin ekspresyonu ile oksidatif stres üzerine kımyın etkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada 40 adet BALB/C türü erkek fare, kontrol, kımyı, DMH ve kımyı+DMH olmak üzere dört gruba ayrıldı. Deney gruplarındaki farelere 20 mg/kg dozda, 20 hafta boyunca DMH haftada bir kez intraperitoneal uygulandı. Deneme süresince farelerin günlük 2×10^8 kob/mL bakteri kolonisi içeren kımyı almaları sağlandı. Deney sonunda farelerden kan, karaciğer, kolon ve böbrek doku örnekleri alındı. Alınan plazma numunelerinde 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) ve adenozin deaminaz (ADA) ölçümleri gerçekleştirildi. Doku örneklerinde, western blotlama ile E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 proteinlerinin ekspresyonu düzeyleri, SIRT2 ve SIRT3 proteinlerinin immunlokalizasyonu ve spektrofotometrik olarak redükte glutatyon, total antioksidan kapasite (TAK) ve total oksidan kapasite (TOK) düzeyleri belirlendi. Yapılan çalışmada

DMH uygulaması ile plazma 8-OHdG düzeyi ve karaciğer, böbrek ve kolon dokuları oksidatif stres indeksi (OSİ) ve TOK düzeylerinin arttığı, redükte glutasyon ve TAK düzeylerinin önemli şekilde azaldığı tespit edildi ($P<0.001$). Kırmızı takviyesi OSİ ve TOK düzeylerini azaltırken, redükte glutasyon ve TAK düzeylerini önemli şekilde artırdı ($P<0.001$). Plazma ADA aktivitesinin DMH grubunda arttığı, kırmızı takviyesi ile önemli şekilde azaldığı gözlemlendi ($P<0.001$). DMH grubu E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 proteinleri ekspresyon düzeyleri tüm dokularda önemli şekilde azaldığı tespit edildi ($P<0.05$). Kırmızı takviyesi ile karaciğer ve kolon dokuları E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 protein ekspresyon düzeyleri ve böbrek dokusu E-kaderin, β -katenin protein ekspresyon düzeylerinin önemli şekilde arttığı saptandı ($P<0.05$). Mitokondriyal lokasyonlu olarak bilinen SIRT3'ün protein ekspresyon düzeyinin kırmızı grubunda diğer gruplardan farklı şekilde karaciğer, kolon ve böbrek dokularının hücre çekirdeklerinde arttığı tespit edildi. Aynı zamanda kırmızı verilen grupta SIRT2'nin hücre içi lokasyonlarında da farklılıklar gözlemlendi.

Sonuç olarak; DMH uygulaması ile E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 protein ekspresyon düzeylerinin azalması ve antioksidan sistemin bozulması, DNA hasarı ve oksidatif stresi artırarak tümör oluşumunu tetikleyebileceği, kırmızın ise tümör oluşumuna yatkın mikroçevrede kanser sinyal yollarında görevli bu moleküllerin ekspresyonlarını düzenleyerek koruyucu bir etki gösterebileceği kanısına varıldı. SIRT2 ve SIRT3 lokasyonundaki değişiklikler ve kanser oluşumu arasındaki moleküler ilişkinin aydınlatılması ilerde yeni tıbbi tedavilerin geliştirilmesi açısından önem oluşturabilir.

Anahtar Kelimeler: SIRT2 ve SIRT3, E-kaderin ve β -katenin, kırmızı, tümöre yatkın mikroçevre, oksidatif stres.

2018, 124 Sayfa

ABSTRAT

(PhD Thesis)

Investigation of The Effects of Kumiss on Expression Levels of Cancer Signaling Pathways Associated SIRT2 and SIRT3 Proteins, E-Cadherin and β -Catenin Surface Adhesion Molecules, and Oxidative Stress in Tumor-Permissive Microenvironment

Canan GÜLMEZ

Kafkas University
Faculty of Science and Literature
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Onur ATAKISI

In study, it was aimed to investigate the effects of kumiss on the expression of SIRT2 and SIRT3 proteins and E-cadherin, β -catenin surface adhesion proteins, and oxidative stress in tumor permissive microenviroment which had been induced by 1,2-dimethyl hydrazine (DMH), a procarcinogen in mice. Forty BALB/C male mice were divided into four groups as control, kumiss, DMH and kumiss+DMH. DMH was administered intraperitoneally to mice in the experimental groups at a dose of 20 mg/kg once a week for 20 weeks. During the experiment, mice were allowed to receive a daily dose of 2×10^8 cfu/mL bacterial colonies. At the end of the regimen, blood, liver, colon and kidney tissue samples were collected. Plasma samples were used for the measurements of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) and adenosine deaminase (ADA). In tissue samples, expression levels of E-cadherin, β -catenin, SIRT2 and SIRT3 proteins by western blotting, immunolocalizations of SIRT2 and SIRT3 proteins, and spectrophotometric reduced glutathione, total antioxidant capacity (TAC) and total oxidant capacity (TOC) levels were determined. In the study, it was determined that

plasma 8-OHDG level and oxidative stress index (OSI) and TOC levels in liver, kidney and colon tissues were increased, reduced glutathione and TAC levels were significantly decreased with DMH administration ($P<0.001$). Reduced glutathione and TAC levels were significantly increased while the decrease in the levels of OSI and TOC with kumiss was enhanced ($P<0.001$). It was observed that plasma ADA activity increased in DMH group and decreased with kumiss ($P<0.001$). Expression levels of E-cadherin, β -catenin, SIRT2 and SIRT3 proteins in DMH group were decreased in all tissues ($P<0.05$). In the liver and colon tissues, E-cadherin, β -catenin, SIRT2 and SIRT3 proteins expression levels and in kidney tissue E-cadherin, β -catenin protein expression levels were found to be increased with kumiss ($P<0.05$). SIRT3, a mitochondrial protein, was increased in nuclei of liver cells, colon and kidney tissues in kumiss treated group which was different from other groups. Some differences were also observed in SIRT2 intracellular locations with kumiss reinforcement.

As a result, reduction of E-cadherin, β -catenin, SIRT2 and SIRT3 protein expression levels and deterioration of the antioxidant system by DMH administration, increasing DNA damage and oxidative stress can trigger tumor formation. It was concluded that the kumiss may show a protective effect by regulating the expression of these molecules involved in the cancer signal pathways in this tumor-permissive microenvironment. The elucidation of the molecular relationship between changes in SIRT2 and SIRT3 locations and cancer formation may be of importance in the future for the development of new medical treatments.

Key Words: SIRT2 and SIRT3, E-cadherin and β -catenin, kumiss, tumor-permissive microenvironment, oxidative stress

2018, 124 pages

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım sırasında her türlü bilgi, teşvik ve deneyimleri ile yardımlarını esirgemeyen başta danışman hocam Prof. Dr. Onur ATAKİŞİ olmak üzere, fikirleri ve desteğinden yararlandığım Dr. Öğretim Üyesi Özkan ÖZDEN'e, tez çalışmalarım sırasında destek olan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Emine ATAKİŞİ, Prof. Dr. Burhan ÖZBA, Doç. Dr. Çiğdem SEZER, Dr. Öğretim Üyesi Kezban Yıldız DALGINLI'ya ve yüksek lisans öğrencileri Melek ÖZTÜRKLER ve Serpil AYGÖRMEZ'e,

Tüm yaşamım boyunca her zaman arkamda olan, eğitimimde en büyük pay sahibi, annem, babam ve kardeşlerime, destek ve dostluğunu unutamayacağım değerli dostum Melis KESKİN'e,

Bilime ve insanlığa katkı sağlayan ismi bilinen ve bilinmeyen, HAWKING ve SANCAR'a kadar gelmiş geçmiş tüm bilim insanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Canan GÜLMEZ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ÖNSÖZ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
TABLolar LİSTESİ	xv
KISALTMALAR	xvi
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Kanser.....	1
1.1.1. Kolorektal Kanser	1
1.1.1.1. Kolorektal Kanserın Epidemiyolojisi.....	1
1.1.1.2. Kolorektal Kanserın Etiyolojisi.....	2
1.1.1.3. Kolorektal Kanserın Moleküler Mekanizması	3
1.2. 1,2-Dimetilhidrazin (DMH)	4
1.3. Oksidatif Stres	5
1.4. DNA Hasarı	8
1.5. Yüzey Adezyon Molekülleri; E-kaderin ve β -katenin.....	9
1.6. Probiyotikler	12
1.7. Probiyotikler ve Kolorektal Kanser	15
1.8. Kıımız	21
1.9. Sirtuin Proteinleri	23
1.10. Glutasyon	31
1.11. Adenozin deaminaz	31
2. MATERYAL ve METOT	33
2.1. Materyal.....	33
2.1.1. Cihazlar ve Gereçler	33
2.1.2. Kimyasallar	34
2.1.3. Kit ve Antikorlar	34
2.2. Metot	35
2.2.1. Deney Düzenegi.....	35
2.2.2. 1,2-Dimetilhidrazin Uygulaması	37

2.2.3. Kımız Örneklerinde Spesifik Toplam Canlı Bakteri Sayısının Belirlenmesi	37
2.2.4. Kımızın Hazırlanması ve Uygulanması	38
2.2.5. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması	38
2.2.6. Karaciğer, Böbrek ve Kolon Dokularının Homojenizasyonu	39
2.2.7. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini	39
2.2.8. SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi	41
2.2.8.1. Kimyasallar ve Çözeltiler	41
2.2.8.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)	42
2.2.8.3. Western Blotlama ile Proteinlerin Analizi	43
2.2.9. İmmunohistokimyasal Analizler	45
2.2.9.1. Kimyasallar ve Çözeltiler	45
2.2.9.2. Deneyin Yapılışı	45
2.2.10. Plazma 8-hidroksi-2-deoksiguanozin Analizi	47
2.2.10.1. Deneyin Prensibi	47
2.2.10.2. Deneyin Yapılışı	47
2.2.11. Redükte Glutatyon Analizi	49
2.2.11.1. Deneyin Prensibi	49
2.2.11.2. Çözeltiler ve Deneyin Yapılışı	49
2.2.12. Total Oksidan Kapasite Analizi	50
2.2.12.1. Deneyin Prensibi	50
2.2.12.2. Reaktif ve Standartlar	50
2.2.13. Total Antioksidan Kapasite Analizi	51
2.2.13.1. Deneyin Prensibi	52
2.2.13.2. Reaktif ve Standartlar	52
2.2.14. Oksidatif Stres İndeksinin Belirlenmesi	53
2.2.15. Plazma Adenozin Deaminaz Aktivitesi Analizi	53
2.2.15.1. Deneyin Prensibi	53
2.2.15.2. Çözeltiler ve Deneyin Yapılışı	54
2.2.16. İstatistiksel Analiz	55
3. BULGULAR	56
3.1. Canlı Ağırlık Değişimi	56

3.2. Western Blot Analiz Bulguları	57
3.2.1. Karaciğer E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 Protein Ekspresyon Düzeyleri.....	58
3.2.2. Kolon E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 Protein Ekspresyon Düzeyleri	61
3.2.3. Böbrek E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 protein ekspresyon düzeyleri	64
3.3. İmmunohistokimyasal Analiz Bulguları	67
3.3.1. Karaciğer Dokusu SIRT2 ve SIRT3 Proteinlerinin Ekspresyon Bulguları ...	67
3.3.2. Kolon SIRT2 ve SIRT3 Proteinlerinin Ekspresyon Bulguları.....	69
3.3.3. Böbrek SIRT2 ve SIRT3 Proteinlerinin Ekspresyon Bulguları.....	71
3.4. Biyokimyasal Analiz Bulguları	73
3.4.1. Plazma 8-hidroksi-2-deoksiguanozin Düzeyleri.....	73
3.4.2. Karaciğer, Kolon ve Böbrek Dokuları Redükte Glutasyon Düzeyleri.....	73
3.4.3. Karaciğer, Böbrek ve Kolon Dokuları Total Oksidan Kapasite, Total Antioksidan Kapasite ve Oksidatif Stres Düzeyleri	75
3.4.4. Plazma Adenozindeaminaz Aktivitesi	78
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	79
ÖZGEÇMİŞ.....	118

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. ROT'nin Subselüler Kopartmanları.....	6
Şekil 1.2. Karsinogenez ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişki	7
Şekil 1.3. Kaderin, Katenin ve Hücre İskeleti Arasındaki Kompleks	10
Şekil 1.4. İnaktif ve Aktif Wnt/ β -katenin Sinyal Yolu	11
Şekil 1.5. Probiyotiklerin Düzenli Tüketimi İle Bağırsak Mikrobiyota Kompozisyonunun Düzenlenmesi	16
Şekil 1.6. Bazı Probiyotik Suşlarının Bağırsaklardaki Fonksiyonları	16
Şekil 1.7. Hücrede Sirtuinlerin Lokasyonları	23
Şekil 1.8. ROT Üretimi ve Sirtuinler Arasındaki İlişki	27
Şekil 1.9. EMT'in Sirtuinler Tarafından Pozitif Düzenlenmesi	28
Şekil 1.10. EMT'in Sirtuinler Tarafından Negatif Düzenlenmesi	29
Şekil 2.1. Deneyin Şematik Gösterimi.....	36
Şekil 2.2. Deney Materyalini Oluşturan BALB/C Erkek Fareler	36
Şekil 2.3. Farelerden Dokuların Alınması	39
Şekil 2.4. BSA Standart Grafiği.....	40
Şekil 2.5. Jel, Nitroselüloz Membran ve Filtre Kağıtlarının Kasete Yerleştirilmesi	44
Şekil 2.6. İmmünohistokimyasal Ölçümlerde Kullanılan Dijital Mikroskop	46
Şekil 2.7. Standartların Hazırlanması	47
Şekil 2.8. 8-hidroksi-2-deoksiguanozin Standart Grafiği	48
Şekil 3.1. Canlı Ağırlık Değişimleri	56
Şekil 3.2. Başlangıç ve Bitiş Canlı Ağırlıkları.....	57
Şekil 3.3. Proteinlerin Karaciğer Dokularındaki Bant Yoğunlukları.....	58
Şekil 3.4. E-kaderin Protein Ekspresyon Düzeyleri.....	59
Şekil 3.5. β -katenin Protein Ekspresyon Düzeyleri	59
Şekil 3.6. SIRT2 Protein Ekspresyon Düzeyleri.....	60
Şekil 3.7. SIRT3 Protein Ekspresyon Düzeyleri.....	60
Şekil 3.8. Proteinlerin Kolon Dokularındaki Bant Yoğunlukları	61
Şekil 3.9. E-kaderin Protein Ekspresyon Düzeyleri.....	62

Şekil 3.10. β -katenin Protein Ekspresyon Düzeyleri	62
Şekil 3.11. SIRT2 Protein Ekspresyon Düzeyleri.....	63
Şekil 3.12. SIRT3 Protein Ekspresyon Düzeyleri.....	63
Şekil 3.13. Proteinlerin Böbrek Dokularındaki Bant Yoğunlukları.....	64
Şekil 3.14. E-kaderin Protein Ekspresyon Düzeyleri.....	65
Şekil 3.15. β -katenin Protein Ekspresyon Düzeyleri	65
Şekil 3.16. SIRT2 Protein Ekspresyon Düzeyleri.....	66
Şekil 3.17. SIRT2 Protein Ekspresyon Düzeyleri.....	66
Şekil 3.18. Karaciğer Dokusu Negatif Kontrol	67
Şekil 3.19. Karaciğer Dokusu SIRT2 Protein Ekspresyonu.	68
Şekil 3.20. Karaciğer Dokusu SIRT3 Protein Ekspresyonu	68
Şekil 3.21. Kolon Dokusu Negatif Kontrol	69
Şekil 3.22. Kolon Dokusu SIRT2 Protein Ekspresyonu	70
Şekil 3.23. Kolon Dokusu SIRT3 Protein Ekspresyonu	70
Şekil 3.24. Böbrek Dokusu Negatif Kontrol	71
Şekil 3.25. Böbrek Dokusu SIRT2 Protein Ekspresyonu	72
Şekil 3.26. Böbrek Dokusu SIRT3 Protein Ekspresyonu.	72
Şekil 3.27. 8-hidroksi-2-deoksiguanozin Düzeyleri	73
Şekil 3.28. Karaciğer Dokusu Redükte Glutasyon Düzeyleri	74
Şekil 3.29. Kolon Dokusu Redükte Glutasyon Düzeyleri.....	74
Şekil 3.30. Böbrek Dokusu Redükte GSH Düzeyleri	75
Şekil 3.31. Adenozin Deaminaz Aktivitesi Düzeyleri	78

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları.....	14
Tablo1.2. Probiyotik Olarak Kullanılacak Mikroorganizmalarda Aranılan Özellikler	15
Tablo 1.3. Kolorektal Kanserin Önlenmesinde Probiyotiklerin Potansiyel Etkileri ve Mekanizmaları: Deneysel Hayvan Çalışmalarından Kanıtlar	19
Tablo 1.4. Çeşitli Sütlerin Ortalama Yüzde Bileşenleri	22
Tablo 1.5. SIRT2 ve SIRT3 Proteinlerini Subselüler Lokalizasyon, Substrat ve Çeşitli Fonksiyonlarının Gösterilmesi	30
Tablo 2.1. Antikorlar	34
Tablo 2.2. Deneklerin Beslenmesinde Kullanılan Yem İçeriği.....	37
Tablo 2.3. BSA Standartları ve Protein Örneklerinin Hazırlanması	40
Tablo 2.4. SDS-PAGE Hazırlamak İçin Gerekli Bileşenler ve Oranları	43
Tablo 2.5. Redükte Glutasyon Analizi.....	50
Tablo 2.6. Total Oksidan Kapasite Analizi	51
Tablo 2.7. Total Antioksidan Kapasite Analizi	52
Tablo.2.8. Plazma Adenozin Deaminaz Aktivitesi Tayini	55
Tablo 3.1. Karaciğer, Böbrek ve Kolon Dokuları TOK, TAK ve OSİ Düzeyleri.....	77

KISALTMALAR

KRK	: Kolorektal kanser
ROT	: Reaktif oksijen türleri
HNPCC	: Kalıtsal non-poliozis kolon kanseri
PJS	: Peutz-jeghers sendromu
APC:	: Adenomatosis poliposis koli
FAP	: Ailesel adenomatoz poliposis
DCC	: Kolorektal kanserde silinen bölge
DMH	: 1,2-Dimetil hidrazin
EMT	: Epitelyal mezenkimal geçiş
8-OHdG	: 8-hidroksi-2-deoksiguanozin
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
TCF-4	: Nükleer transkripsiyon faktörü
LEF-1	: Lenfoid artırıcı faktör-1
GSK-3 β	: Glikojen sentaz kinaz-3 β
FRZ	: Kıvrımlı
ISAPP	: Probiyotik ve Prebiyotikler Uluslararası Bilim Derneği
TLR	: Toll-benzeri reseptör
NOD	: Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı
IgA	: İmmunglobulin A
SCFAs	: Kısa zincirli yağ asitleri
ACF	: Anormal kript odakları
SIR2	: Sessiz Bilgi Düzenleyici 2
HDAC:	: Histon deasetilaz
PGC-1 α	: Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör- γ koaktivatör 1 α
RIP-1	: Reseptör etkileşimli protein-1
NF- $\kappa\beta$: Nükleer faktör kapa B
Ace CS1	: Asetil coA sentaz
UCP-1	: Ayırıştırma proteinleri 1
GDH	: Glutamat dehidrojenaz

NOX	: NADPH-oksidadaz
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
COX-2	: Siklooksijenaz-2
HO-1	: Hem-oksigenaz-1
HIF1 α	: Hipoksi-indüklenebilir faktör 1 α
Zeb1	: Çinko Parmak E-box bağlama homeobox 1
MBD1	: Metil-CpG bağlayıcı alan protein 1
MMP	: Matriks metallopeptidaz
MAPK	: Mitojenle etkileşen protein kinaz
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
SLE	: Sistemik lupus eritematozus
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSH	: Redükte glutatyon
ADA	: Adenozin deaminaz
BSA:	: Sığır serum albumin
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidin
DTNB	: 5,5'-(2-ditiobis nitrobenzoik asit)
ABTS	: 2,2'-azino-bis (3-etil benzolin-6 sülfonik asit)
IL	: İnterlökin
IFN- γ	: İnterferon- γ
TNF- α	: Tümör nekroz faktör

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Kanser

Kanser genel olarak, anormal ve kontrol edilemeyen hücre bölünmesi sonucu oluşan kötü huylu büyüme veya tümör olarak tarif edilmektedir. Vücut hücrelerinin kontrolsüz olarak çoğalması ve büyümesi çevresel, kalıtsal ya da her iki faktörün etkisi ile DNA'da meydana gelen hasar sonucu ortaya çıkabilmektedir [1]. Benign tümörler, meydana geldikleri bölgelerde kalıp sınırlı şekilde büyüyerek vücudun diğer bölgelerine sıçramayan iyi huylu özellikler taşıırken, malign tümörler sürekli bölünen, kan ve lenf dolaşımı ile metastaz yapma özelliği taşıyan tümörlerdir [2].

Tüm dünyada her yıl yaklaşık 600.000 kişinin kanserden dolayı öldüğü, en çok tanı konulan kanser türlerinin sırasıyla; akciğer (%13), meme (%11.9) ve kolon (%9.7) olduğu, kanserden ölümlerin ise en çok akciğer (%19.4), karaciğer (%9.1) ve mideden (%8.8) gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu şekilde kanser artış hızının devam etmesi durumunda, Dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak 2025 yılında toplam 19.3 milyon yeni kanser vakası olacağı tahmin edilmektedir [3]. Global büyük bir sağlık sorunu olan kolorektal kanserin 2030'a kadar Dünya çapında 2.2 milyon yeni vaka ve 1.1 milyondan fazla ölüme neden olacağı rapor edilmiştir [4].

1.1.1. Kolorektal Kanser

1.1.1.1. Kolorektal Kanserin Epidemiyolojisi

Kanser, ekonomik olarak gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde en çok görülen ölüm nedenleri arasındadır [5]. Kolorektal kanserlerin gelişiminde, hastalık insidansında görülen bölgeler arasındaki farklılıklar coğrafi yatkınlığa işaret etmekle birlikte farklı yaşam tarzlarının hastalık üzerinde etkisinin önemli olduğunu göstermektedir [6]. Kolon kanserinin epidemiyolojisi bölgeden bölgeye farklılık göstermekle birlikte Amerika,

Kanada, Avustralya, Yeni Zelanda ve Orta Avrupa'da yüksek sıklık gösterirken; Asya ve Afrika ülkelerinde daha az görülmektedir [7]. ABD'de yılda yaklaşık olarak 150.000, Avrupa'da 170.000 tüm dünyada ise yaklaşık olarak yılda bir milyon yeni vaka görülmektedir. ABD'de tüm yeni kanser vakaları içinde görülme sıklığı erkekte ve kadında %11 oranı ile üçüncü sırayı almaktadır [8]. Tüm Dünya'da, erkeklerde akciğer ve prostat kanseri sonrası en sık görülen üçüncü, kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci ölüm nedeni olarak bildirilmektedir Kolorektal karsinomaların görülme sıklığı yaşla beraber artış göstermekle birlikte en yüksek görülme dönemi 60-70 yaşlarıdır ve hastaların %20'sinden daha azı 50 yaşın altındadır [9].

Türkiye'de ise sindirim sistemi kanserleri içerisinde mide ve kolon kanserinin ilk sıralarda olduğu kabul edilmektedir ve son yıllarda kolorektal kanser vaka sayısında artış gözlenmektedir [10]. Sağlık Bakanlığı'nın on iki ildeki kanser kayıt merkezi verilerine göre, kolorektal kanserin görülme sıklığı açısından tüm kanserler içinde %7.8 ile kadınlarda üçüncü, %7.5 ile de erkeklerde dördüncü sırada yer aldığı bildirilmiştir [11].

1.1.1.2. Kolorektal Kanserin Etiyolojisi

Beslenme ve Diyet: Kolorektal kanserin nedenleri ve patogenezi genetik faktörlerle ilişkili olmakla birlikte diyet bileşenleri ve diyet alışkanlığının da kolon kanseri için risk oluşturabileceği öne sürülmüştür. Çevresel faktörlerden olan yağ ve hayvansal proteinin intestinal mikroflora ve intraluminal içeriğin kimyasal kompozisyonu üzerine etkilerinden dolayı diyetle kolorektal kanser arasında ilişki bulunmaktadır [12,13].

Epidemiyolojik çalışmalar kolorektal kanserin yüksek yağ ve düşük lif oranı içeren diyetle beslenen bölgelerde daha sık görüldüğünü göstermektedir [7,14] . Kırmızı et ya da domuz eti gibi protein kaynaklı besinlerin aşırı tüketimi yüksek kolorektal kanser riski arasında bir ilişki bulunmaktadır [12,13]. Antioksidan içermeyen, vitamin ve eser elementlerden yoksun beslenme tarzı kolorektal kanser gelişiminde etkili olduğu, alkol ve sigara kullanımının ağız, yutak, gırtlak, yemek borusu, kolon, rektum ve meme kanserleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [15, 16].

Genetik Faktörler: Kanserin türüne ve yaşanılan çevreye göre genetik faktörlerin kanser oluşumuna katkısı değişmektedir. Bazı kanser vakaları çevresel faktörlerin genlerde meydana getirdiği değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkabilmesine rağmen meme ve kolorektal gibi kanserlerde ailesel yığılım gözlenmektedir. Herediter kolorektal kanserler tüm vakaların %6-10'unu oluşturmaktadır. Bunların en çok bilinenlerinden olan ailesel adenomatöz polipozis koli (FAP), kalıtsal non-poliozis kolon kanseri (HNPCC), Peutz-jeghers sendromu (PJS) ve Cowden hastalığı gibi bazı ailesel kanser sendromları da kolon kanseri riskini artırmaktadır [17,18].

Kronik inflamasyon: Kolorektal kanser gelişimi açısından kronik inflamatuvar barsak hastalığı önemli etiyolojik faktörler arasındadır. Bunun en tipik örnekleri olan ülseratif kolit ve Crohn hastalığı, kolon ve rektum mukozalarının iltihaplanması olarak tanımlanmaktadır. Bu hastalıklar bireyin kolon kanserine yakalanma riskini 4-20 kat artırmaktadır. Kalın bağırsak karsinomu, Crohn hastalığının önemli bir komplikasyonu olmakla birlikte ülseratif kolite göre daha az oranda karsinom gelişim riskine sahiptir [19].

Diğer faktörler: Hormonal faktörler, kolesistektomi ve safra asidi artışı, üreterosigmoidostomi, ileostomi ve anastomozlar, mesleki faktörler (asbest ve organik çözücüler) ve radyasyon bu faktörler arasındadır [19].

1.1.1.3. Kolorektal Kanserin Moleküler Mekanizması

Kalın bağırsak ve rektumda görülen malign oluşumlar olan kalın bağırsak (*kolorektal*) kanseri çeşitli moleküler yollara sahip heterojen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Temel mekanizması adenom-karsinom sekansı olup, normal epitelden displastik epitele ve karsinoma kadar uzanan genetik ve epigenetik değişikliklerin adım adım birikimi sonucu gelişen bir süreçtir [20,21]. Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri, adenom-karsinom sekansında yer alan ilişkili genlerdir. Onkogen mutasyonları ya da aşırı ekspresyonları durumunda ve büyüme sinyallerinin yokluğunda

hücre fonksiyon kazanarak çoğalabilmektedir. Tümör baskılayıcı genler, normalde hücre siklusundaki ilerlemeyi durdurur veya apoptozisi uyarır. Fakat mutasyona uğradıklarında ya da allel kayıplarından dolayı eksprese edilemediklerinden inhibitör kontrol fonksiyonları kaybolur. DNA onarım genleri ise diğer genlerin mutasyon hızlarından sorumludur ve bu genler mutasyona uğradıklarında hataları düzeltilemez, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar birikerek artış gösterirler [20].

Kolorektal karsinogenezin, onkogenin mutasyonel aktivasyonunun tümör supresör gen inaktivasyonu ile birlikte geliştiği ve bu mutasyonların, gerçekleştikleri genler ve birikim mekanizmaları bakımından farklılık gösterdiği bildirilmiştir [22]. Kolorektal kanserlerin ve onun öncül lezyonlarının moleküler analizi sonucunda Adenomatöz polipozis koli (APC) ve Ras (aktif bir onkogen) geninde mutasyon, 18. Kromozomda kolorektal kanserde silinen bölge (DCC) gen kaybı, 17. kromozomda yer alan p53 geni fonksiyon kaybı ve hipometilasyon gözlenen moleküler değişiklikler arasındadır [23]. Ailesel adenomatoz polipozis vakalarında meydana gelen ilk mutasyon APC geninde oluşmaktadır. APC mutasyonu kolon kanserli olguların %40-80'inde görülmektedir [20]. Epitelyal homeostazın önemli bir düzenleyicisi olan APC proteini sitoplazmik β -catenin'in yıkımını düzenlemektedir. APC proteini ve β -catenin kolorektal kansinogenezde önemli rol oynayan Wnt sinyal yolunun bileşenleridir. APC'nin kansinogenezdeki diğer önemli rolü mikrotübül stabilizasyonu ve hücre döngüsünün kontrolünü sağlayarak kromozomal stabilitenin devamlılığını sağlamaktadır [24].

1.2. 1,2-Dimetilhidrazin (DMH)

Bir metil hidrazin türevi olan DMH, bir dizi oksidasyon kademesi sonucu metabolize edilmektedir. Bunlar azometana dehidrojenasyon, azoksimetanın N-oksidasyonu ve sonunda metilazoksimetanol'e C-oksidasyon şeklinde oluşmaktadır [25]. Bu son metabolit parçalanarak çok reaktif metildiazonyum iyonu vermektedir [26]. Bu yola ilaveten, metil radikal ara maddeleri hemoglobin, peroksidazlar ve sitokrom P450 tarafından katalizlenen 1,2-dimetilhidrazinin metabolizması ve toksisitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [27]. DMH'nin bir sonraki yolu mono metilhidrazin ve formaldehitin oluştuğu N-demetilasyon yoludur [28].

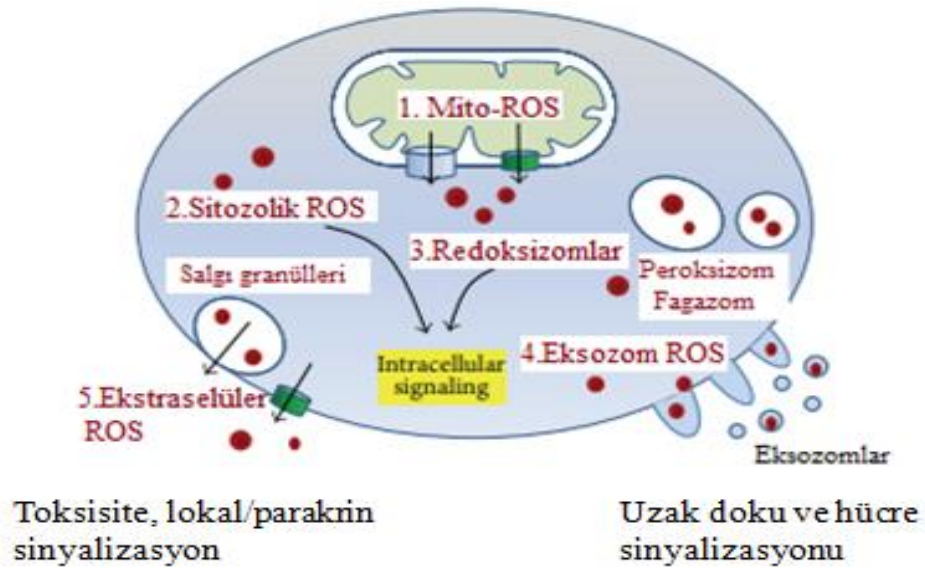
DMH, DNA bazları, nokta mutasyonları, mikroçekirdek ve kardeş kromatid değişimi ile metil eklentilerinin oluşumunu uyarmaktadır. Bu eklentilerin oluşumu, genetik mutasyonların oluşumuna sebep olarak ve normal gen transkripsiyonunu değiştirerek normal hücre büyümesini bozmaktadır [29]. DMH, organizmada metil radikali salıveren bileşiklere dönüşmek sureti ile etkinlik kazanmaktadır. DNA moleküllerini metilleyerek mutajenik etki yapan DMH aynı zamanda RNA ve dolayısıyla protein sentezini de bozmaktadır. Radyoaktif olarak işaretli DMH'nin albino ratlara subkutan verilmesinin intestinal mukoza, karaciğer ve böbrekte yüksek derece DNA, RNA ve protein metilasyonu ile sonuçlandığı gözlemlenmiştir [30].

Kolon, DMH toksisitesi için hedef organdır. Karsinogenezis, DMH'in karaciğerde azoksimetan ve azoksimetanole dönüşmesi ile başlamakta ve azoksimetanolün glukuronik asitle konjuge olarak bilier ekskresyona uğraması ile devam etmektedir. Kolon lümeninde glukuronoidler bakteriyal hidrolize uğramak suretiyle aktif karsinojen metabolitlere dönüşmektedirler [31].

1.3. Oksidatif Stres

Oksijen metabolizmasının sonuçlarından biri kısa ömürlü, oldukça reaktif ve bu nedenle tüm biyolojik moleküllerin fonksiyonu ve yapısını değiştirerek onlarla reaksiyona giren reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimidir. Süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi ROT'leri, aerobik hücrelerde mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sürecinde moleküler H₂O'yu O₂'e yetersiz indirgenmesi ile sürekli olarak üretilmektedir. Hücrede fizyolojik koşullar altında sürekli ROT üretilir ve tüketilir. ROT üretimi, ROT sinyalleri ve ROT indüklü hasar arasındaki ilişki çoğunlukla enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemlerinin kontrolü altında tür ve dokulara bağlı gerçekleşir [32,33]. Oksidatif stres, hücrelerin antioksidan yetenekleri ve ROT üretimi arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. ROT, inflamasyon, enfeksiyon, mekanik ve kimyasal stres, UV ışın ve iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma gibi birçok süreçte oluşmaktadır. Temel seviyede hücre proliferasyonunun

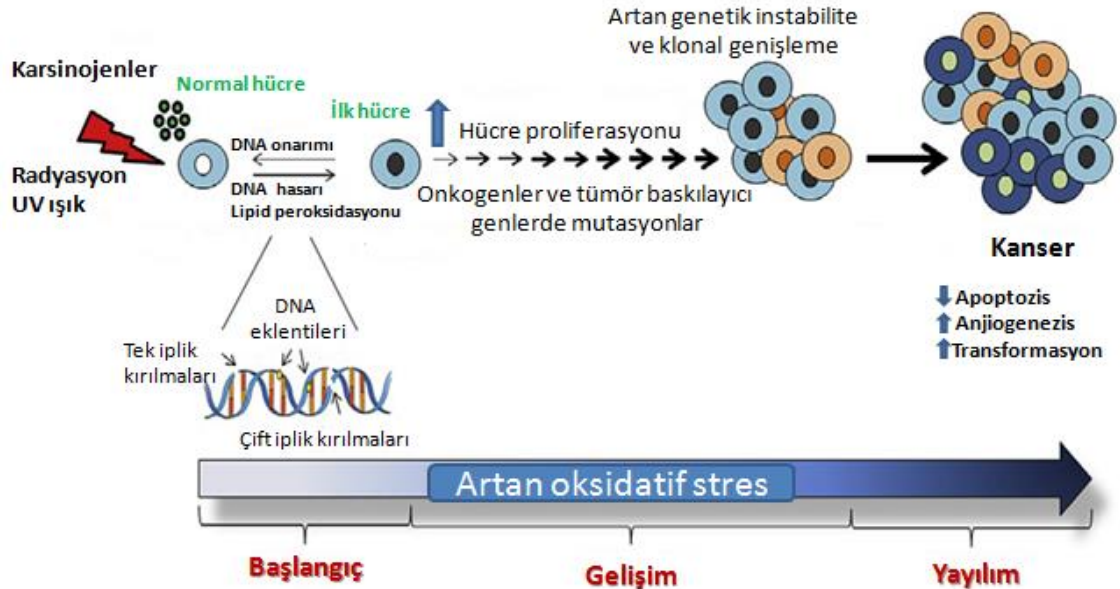
aktivasyonu, hayatta kalma, apoptozis, farklılaşma, immün yanıt, motilite ve stres-yanıt sinyal molekülleri gibi hareket etmektedir. Organizmada meydana gelen ROT, hücrelerden uzaklaştırılmazsa, mutasyonlara ve sonrasında kansinogeneze yol açan protein, lipid ve DNA hasarına neden olmaktadır. ROT'un aşırı üretimi tek ya da çift iplikli kırılmalar, baz modifikasyonları ve nihayetinde hücre ölümüne yol açan DNA çapraz bağları gibi dönüşümsüz DNA hasarı ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle hücrel ROT'un düzenlenmesi hücrel homeostazinin korunması açısından oldukça önemlidir [34].



Şekil 1.1. ROT'nin Subselüler Kopartmanları [35]

Reaktif oksijen türlerinin hücre içerisindeki artışı veya antioksidanların patolojik süreçler sonucunda azalmasına bağlı olarak oksidatif denge bozulmaktadır. Oksidatif stres ve birçok patofizyolojik durum arasında kompleks bir ilişki mevcuttur. Bu ilişkinin patojenlere yanıt gibi olumlu sonuçları olabildiği gibi dejenerasyonu başlatma ya da artırma, metabolik ve otoimmün hastalıklar ya da kanser gelişimine yol açabilme gibi olumsuz sonuçları da bulunmaktadır. ROT miktarındaki bu artışa bağlı olarak hücre membranlarında hasar, hücre içi proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında bozulma ve DNA'da yapısal hasar meydana getirerek hücre zedelenmesine yol açmaktadır [36,37].

Oksidatif stres, kanserin başlangıç, gelişimi ve yayılımı aşamaları ile ilişkilidir (Şekil 1.2). Oksidatif stres ya DNA hasarı ile ilgili direk bir mekanizma ile ya da hücre sinyal iletimini düzenleyerek tumorigenezisin tüm aşamalarına katkı sağlamaktadır. Genetik düzeyde malign değişiklikler, çoğunlukla oksidatif stres ilişkili karsinogenezin altında yatan esas patolojik etkindir. Malign oluşumlara ve DNA hasarına neden olan ROT üretiminin nasıl genetik mutasyonlara (kalıtsal ya da sonradan edinilen) yol açtığı ile ilgili literatürde bazı mekanizmalar önerilmiştir. Kanser hücrelerinin gelişimi bir şekilde oksidatif stresin son derece kararsız ve mutajenik çevresine bağlıdır. Tümör gelişimi üzerine oksidatif stresin etkisi, hücrel immun sistemin kompleks reaksiyonları ve biyoaktivitelerinin aracılığı ile oksidatif strese neden olan kronik inflamasyon bölgelerinde görülebilmektedir. Artan ROT üretimi sonrasında DNA mutasyonlarını etkileyecek olan birçok farklı onkogenin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin mutasyonları gözlemlenmektedir. Aynı zamanda artan ROT üretimi, tümör gelişimine birlikte katkı sağlayan, anjiogenezis ve epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir [38]. Yapılan bir çalışmada stromelisin-1/matriks metalloproteinaz-3 (MMP-3)'ün ROT düzeyinde bir artışa neden olan ve bir RNA-DNA helikaz olan rho faktör ilişkili proteinlerin ekspresyonu aracılığı EMT'yi indüklediği rapor edilmiştir [39].



Şekil 1.2. Karsinogenez ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişki [34]

1.4. DNA Hasarı

Serbest radikaller ve oksidatif mekanizmalarla ortaya çıkan ürünler, DNA'da farklı mekanizmalar ile baz ve şeker moleküllerinde bozulmalara, tek ve çift zincir kırıklarına, abazik bölgelere, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım modifikasyonlara neden olarak DNA'nın yapısını bozmaktadırlar. DNA'da ROT tarafından oluşturulan oksidatif hasar, yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immun sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi hastalıkların başlıca nedeni olarak gösterilmektedir [40].

Tüm organizmaların hayatta kalması ve çoğalması, genetik materyalin doğru kopyalanması ve aktarılmasına, aynı zamanda genomik bilgi bütünlüğünün ve stabilitesinin korunmasına bağlıdır [41]. Bu nedenle, genom sağlığına müdahale ederek olası hasarları algılamak ve onarmak için bir sistemin varlığı kritiktir. Hiyerarşik bir sinyal yolu olan DNA hasar yanıtı, DNA hasarını algılayan, sinyalleri efektörlere dönüştüren ve hücrenin akıbetini belirleyen çeşitli proteinlerle düzenlenmiştir [42]. Tamir edilebilir hasarların varlığında DNA onarım yolları harekete geçirilir ve daha sonra replikasyona karşı herhangi bir engeli kaldırır. Öte yandan, DNA hasarları çok şiddetli ise ve onarılmazsa, hücreler programlı hücre ölümüne geçerler [43]. DNA hasarına yanıtın önemi, bu mekanizmalardaki herhangi bir kusurlu hücrenin, çeşitli hastalıklara oldukça yatkın ve DNA hasarını indükleyen ajanlara karşı hassas olmasıdır [44]. Çeşitli çevresel ve endojen genotoksik uyarılara ek olarak, normal hücre metabolizmasının yan ürünü olan ROT, DNA ve diğer makromoleküllerin yapısal bütünlüğünü tehdit etmektedir. Hücre, çoklu eksojen faktörlere, UV andiyonize radyasyona, büyüme faktörlerine, sitokinlere, çevresel toksinlere, kemoterapötik ajanlara, hipertermi ve inflamasyona maruz kaldığında süperoksit ve hidroksil radikali, H₂O₂ ve diğer tehlikeli ROT formlarını üretmektedir [45].

Guanin, DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olan ve oksidasyona en yatkın olan bazdır [46]. 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG), ROT'nin DNA'da yaptığı yaklaşık 23 tane oksidatif baz hasar ürününden en sık

karşılaşılması ve mutajenitesi en iyi bilinenidir. Hidroksil radikalleri, guanin molekülü ile 8. pozisyonda etkileşerek oksidasyona yol açmaktadır. Değişikliğe uğrayan DNA'nın oksidatif hasarı sonucu oluşan 8-OHdG'nin guanin bazlarına Cu^{+2} iyonları yüksek afinite ile bağlanır ve H_2O_2 ile etkileşime girerek DNA hasarına neden olurlar. 8-OHdG formunda oksidatif değişikliğe uğrayan DNA, DNA hasarı miktarının belirlenmesinde kullanılmaktadır 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte ve oksidatif DNA hasarını belirlemede en sık kullanılan yöntem olarak uygulanmaktadır [46].

DNA hasarı ile ilişkili en önemli patolojik süreç karsinogenezis olup oksidatif hasarın karsinogenezisin başlangıç, ilerleme ve malign dönüşüm evreleri üzerinde önemli bir rol üstlendiği düşünülmektedir. DNA üzerine oksidatif hasarın göstergesi olarak yüksek 8-OHdG düzeyi, potansiyel mutajenik özelliğe sahip olup doku, plazma ve idrarda biyokimyasal belirteç olarak kullanılmaktadır [47].

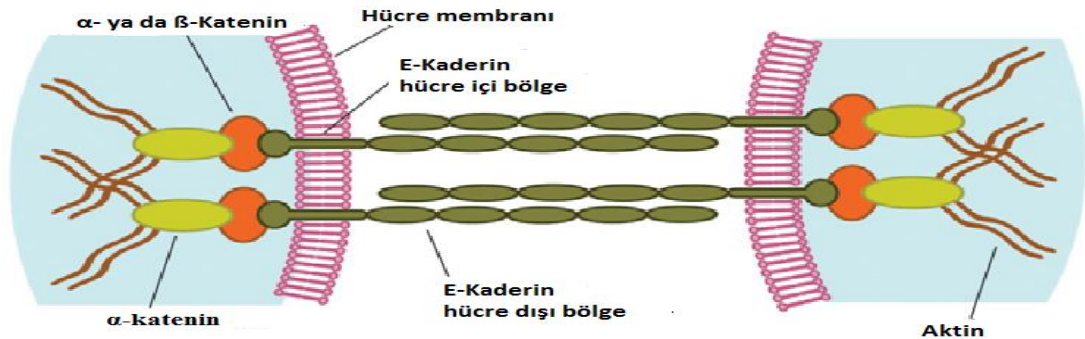
1.5. Yüzey Adezyon Molekülleri; E-kaderin ve β -katenin

Yüzey adezyon molekülleri, hücre yüzeyinde bulunan ve hücre-hücre, hücre-matriks etkileşiminde rol oynayan moleküllerdir. Hücre-hücre adezyonu aynı (homofilik) ya da iki farklı (heterofilik) hücre arasında bağlanma oluşturan ekstraselüler bağlayıcı moleküller aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu moleküller; embriyogenez, hücre büyümesi ve farklılaşması, inflamasyonun düzenlenmesi, hücrelerin çoğalması ve göçü gibi önemli hareketlerin başlatılması ve hücre içi ve hücreler arası sinyal iletiminin düzenlenmesinde etkin roller oynamaktadır. Adezyon molekülleri, moleküler, yapısal ve fonksiyonel farklılıklarına göre integrinler, selektinler, kaderinler ve immünooglobulin süper ailesi olmak üzere dört ana grup altında sınıflandırılmaktadır [48].

Kaderinler, molekül ağırlıkları 120-140 kDa arasında değişen, kalsiyum bağımlı, hücreler arası adezyonu sağlayan homofilik hücre yüzey proteinleridir. Kaderinlerin; E-kaderin (epitelyal), D-kaderin (desmosomal), P-kaderin (plasental) ve N-kaderin (nöral) şeklinde üzerinde buldukları dokulara göre sınıflandırılmaktadır [49]. Embriyonik

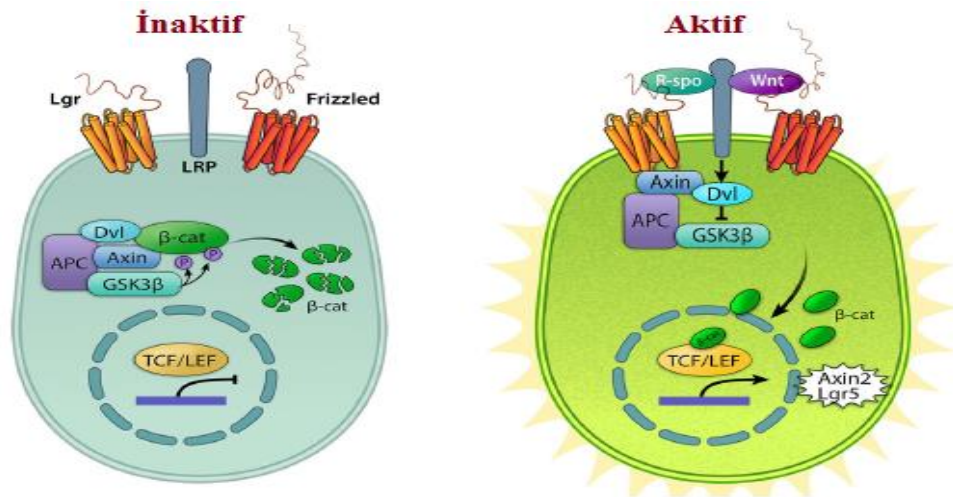
gelişim ve organogenez süresince dokuların şekillenmesinde önemli rol oynamaktadırlar [50]. Kaderinler fonksiyonlarını kateninler ve aktin filament zinciri ile kompleks halinde yerine getirmektedir. Kaderin-katenin kompleksinin yapı ve fonksiyonu fosforilasyonla düzenlenmektedir. Bu kompleksin fosforilasyonu c-src, Fer, Fyn ve Met tirozin kinazları katalizlemektedir [51,52]. Kaderin-katenin kompleksi sinyal transdüksiyonunda ve gen ekspresyon regülasyonunda görev alır ve bu kompleks interselüler adezyonun temelini oluşturmaktadır [53].

Kaderinlerin ekstrasellüler, transmembran ve intrasellüler bölgeleri bulunmaktadır. Ekstrasellüler domain bakır benzeri yapılarla kalsiyumu ve intrasellüler sitoplazmik ise kuyruk kateninleri bağlar. Böylece katenin ailesi iskelet sistemindeki aktinle köprüler yapar ve böylelikle hücre grupları ve dokular arasındaki koordinasyon bu transselüler ağ ile sağlanmış olur [54]. E-kaderin, kateninler aracılığıyla hücre-hücre adezyon sürecini kolaylaştırır ve E-kaderin düzeyinin azalması hücre-hücre ilişkisinin kesilmesi, tümörleşme, invazyon ve metastaz ile ilişkilidir. Kanserde ekspresyon kaybıyla E-kaderindeki sitoplazmik kuyruğun fosforilasyon bozukluğu, epitel hücrelerin hareketliliğini artırarak yayılımı başlattığı bildirilmiştir [55]. E-kaderin- β -katenin kompleksinin komponentlerinden herhangi biri ya da ikisinde meydana gelebilecek anomaliler ve anormal APC ekspresyonu, hücre-hücre adezyonunu olumsuz yönde etkilemektedir. E-kaderin ve/veya β -katenin ekspresyonunun azalması ya da tamamen kaybının karsinojenik sürecin başlaması, invazyon ve metastaz yeteneğinin kazanılması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [53,56].



Şekil 1.3. Kaderin, Katenin ve Hücre İskeleti Arasındaki Kompleks [57]

Kateninler, α -katenin, β -katenin ve γ -katenin olmak üzere üç protein grubundan oluşmaktadır. α -katenin ve γ -katenin E-kaderinlerin sitoplazmik bölgesiyle ilişkisi ve Ca^{+2} bağımlı hücre adezyonundaki önemli rolü nedeniyle tanımlanmıştır [58]. β -katenin hücrede çekirdek veya sitoplazma/membran yerleşimli ve multifonksiyonel bir proteindir [48,53]. β -katenin, kalsiyum bağımlı interselüler adezyon olaylarında ve Wnt sinyal yolu ile nükleer gen ekspresyonunda anahtar rol oynamaktadır. β -kateninin hücre adezyonu yapıcı etkisi transkripsiyon faktörü rolünden bağımsızdır. Wnt sinyal yolu, hücre adezyonunda, hedef hücre genlerinin transkripsiyonunun kontrol edilmesinde, hücre polaritesinin ve proliferasyonunun sağlanmasında, farklılaşmada ve hücre göçünde önemli ölçüde görev almaktadır [59]. β -katenin, bu sinyal yolunda epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörü, APC tümör süpressör geni ve nükleer transkripsiyon faktörleri olan TCF-4 (T hücre faktörü-4) ve LEF-1 (lenfoid artırıcı faktör-1) ile etkileşim içerisinde. Hücrelerdeki β -katenin ekspresyonu, membranda E-kaderin, sitoplazmada APC proteini ve glikojensentaz kinaz-3 β (GSK-3 β) enzimi tarafından düzenlenmektedir [48,56,60]. Wnt sinyalleri “frizzled” (FRZ) (kıvrımlı, plazma membranında yedi kez katlanma oluşturabilen transmembran proteinleri) adı verilen hücre yüzey reseptörleri ailesi üzerinden taşınarak β -katenin ve APC’yi de içeren çeşitli yolları uyarmaktadır. β -katenin’in önemli bir bileşeni olan Wnt sinyal yolunun aktif ve inaktif olduğu mekanizma Şekil 1.4’de gösterilmiştir [61].



Şekil 1.4. İnaktif ve Aktif Wnt/ β -katenin Sinyal Yolu [62]

Epitelyal bir değişim olan epiteliyal-mezenkimal geçiş (EMT), uzun sürede epitelyal hücrelerin birtakım morfolojik ve moleküler değişiklikler sonucu mezenkimal hücre tipine farklılaşmasını sağlayan bir dizi reaksiyon basamağını kapsamaktadır. EMT embriyogenezde önemli olup organların yapısal özelliğinin gelişiminde belirleyicidir. Bu dönüşüm epitelyal orjinli malign tümörlerde de gözlenmiştir [63]. Kanser hücreleri, zayıf interselüler adezyon, epitelyal diferansiyasyon kaybı ve hüresel motilitenin artışı ile karakterizedir. Adezyonun baskılanması epitelyal mezenkimal dönüşümün başlaması için yeterli olabilir ve bu nedenle de E-kaderin, epitelyal mezenkimal dönüşümün en önemli bileşenidir [64]. E-kaderin aracılığı ile oluşan kaderin, katenin ve hücre iskeleti arasındaki kompleks, epitelyal hücreleri hareketsiz bir durumda tutar. E-kaderin aracılı hücre adezyonun kaybı, epitel morfolojisinin bozulması ve karsinom hücrelerinin metastatik potansiyel kazanması ile ilişkilidir. Bu nedenle E-kaderin bir “invazyon baskılayıcı gen” olarak kabul edilmektedir [50]. İnsan kanserlerinde kaderin aracılı hücre adezyon sistemi değişiklikleri  mekanizma ile açıklanmaktadır. Birincisi E-kaderinin “down” regülasyonu ve gen mutasyonları, ikinci mekanizma katenin anormalileri veya delesyonları, üçüncü mekanizma ise kateninlerin biyokimyasal modifikasyonudur [65].

1.6. Probiyotikler

Probiyotikler farklı şekillerde tanımlanmış olmakla birlikte, “International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)” tarafından yeterli oranda tüketildiklerinde insan sağlığına katkı sağlayan canlı mikrobiyal gıda içerikleri olarak tanımlanmıştır [66]. Bu grupta *Laktobasiller*, *Bifidobakterler* ve *Enterokoklar* bulunmaktadır. Probiyotiklere "biyoterapötik ajan", probiyotik ile tedaviye “bakteriyel yerine koyma tedavisi”, “bakteriyoterapi” ve “patojen mikroorganizmaların patojen olmayanlar ile kontrollü tedavisi” denilmektedir [67]. Gastrointestinal sistemde oldukça yüksek sayıda patojen ve patojen olmayan mikroorganizmalar bulunmaktadır. Sağlıklı bireylerde patojen ve patojen olmayan mikroorganizmalar arasındaki dengenin hastalık, stres, yetersiz beslenme ve bazı ilaçların alınımı gibi durumlara bağlı olarak bozulması halinde mukozanın engel oluşturma işlevi bozularak inflamasyonun

başlangıcını tetiklenmektedir. Patojen bakterilere karşı flora bakterileri müsin salınımı, hücrelerin çoğalma ve farklılaşması gibi koruyucu mekanizmaları uyararak gastrointestinal sistemi korumaktadır. Flora bakterileri ile bağırsak epitel hücreleri ve intestinal lenfoid doku arasında devamlı bir etkileşim bulunmaktadır. Toll-benzeri reseptörler (TLR) ve nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı (NOD) proteinleri, bağırsak bakterilerini bakteri hücre duvarı lipopolisakkaritleri, peptidoglikanlar, bakteriyal flajellin ve metillenmemiş bakteri DNA'ları aracılığı ile tanımaktadır. Patojen bakteriler bu reseptörler aracılığı ile inflamasyonu başlatırken, patojen olmayanlar başlatmamaktadır [68,69].

Organizmada probiyotiklerin patojenlere karşı antimikrobial savunma, immun sistemin düzenlemesi, kolitis ve inflamasyonu azaltma, çeşitli organ kanserlerini önleme, enerji metabolizmasını düzenleme, rotavirus ishalinin süresini kısaltma, laktoz intoleransı semptom ve bulgularının hafifletme, atopik bünyeli bireylerde allerji riskini azaltma, serum kolesterol düzeyini düşürme, ürogenital enfeksiyonları önleme, bazı besin maddelerinin biyolojik yararlılığını artırma ve vücutta sentezleme gibi sağlık üzerine bir çok olumlu etkileri bulunmaktadır [66]. Bağırsak mikroflorası, hücresel özellikleri, fizyolojisi, metabolizması, gelişimi ve immun homeostazisi dahil bağırsak sağlığını bir çok yönü ile etkilemektedir. Ayrıca, probiyotikler besinlerle rekabet, büyüme faktörleri ve adezyon reseptörleri dahil farklı yollarla patojenik bakteri popülasyonunu azaltabilme yeteneğine sahiptir. Bazı probiyotikler bağırsak lümeninden patojenik bakterilerin büyümesini engelleyen ya da yok eden bakteriosin, reuterin, hidrojen peroksit ve laktik asit gibi antibakteriyal maddeleri üretebilmektedir. *Laktobacillus* suşlarının çoğunun asetik asit ve laktik asit gibi metabolitlerin ve pH'yi düşürebilme özelliklerinden dolayı bakteriyel patojenlerin çoğalmasını engellediği *in vitro* gösterilmiştir. Bazı laktobasillerin (*Lactobacillus lactis* ve *Lactobacillus acidophilus* YIT 0070 suşları) hidrojen peroksit üreterek, *Escherichia coli* 0157:H7 çoğalmasını, insan sindirim sisteminden izole edilen *Laktobacillus* suşlarının gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına neden olduğu bilinen dört patojenin *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* ve *C. Difficile*'nin üremesini sınırlandırdığı belirlenmiştir [70,71].

Tablo 1.1. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları [72]

Yararlı Etki	Etki Mekanizması
Laktoz sindirimine katkı	Bakteriyel laktaz ile laktozun sindirimi
Enterik patojenlere karşı direnç	Bağıışıklık salgılama etkisi, Kolonizasyon direnci, İntestinal sistemin patojenleri için uygun olmayan koşullara değişimi (pH, kısa zincirli yağ asitleri ve bakteriyosinler), Toksin bağlama bölgelerinin yapısal değişimi, İntestinal flora popülasyonları üzerindeki etki, İntestinal mukozada agregasyon oluşturarak patojenlerin bağlanması engelleme, İntestinal müsin üretimini düzenleyerek patojenlerin epitel hücrelere tutunmasını önlemek
Bağırsak kanserini önleyici etkisi	Mutajenleri bağlama, Karsinojenlerin aktivitesini engelleme, Bağırsak mikroorganizmalarının ürettiği kasinojen üreten enzimlerin inhibisyonu, Bağıışıklık sistemini güçlendirme,
İmmün sistemin düzenlenmesi	Enfeksiyon ve tümör oluşumuna karşı spesifik olmayan savunma mekanizmasını güçlendirme, Antijene özgü immün yanıtı yardımcı etki, IgA üretiminin artırılması, Beyaz kan hücrelerinin fagositik aktivitelerinin artırılması,
Alerji	Antijen etkiye sahip maddelerin dolaşım sistemine geçişinin engellenmesi,
Kan lipidleri ve kalp hastalıkları	Kolesterolün bakteri hücresi içinde asimilasyonu, Safra tuzu hidrolaz enzim aktivitesi ile safra tuzlarının atılımını arttırmak, Antioksidan etki,
<i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu	<i>H. pylori</i> inhibitörlerinin (laktik asit, bakteriyosin v.b.) üretimi, <i>H. pylori</i> 'nin üreaz aktivitesini azaltma.

Tablo1.2. Probiyotik Olarak Kullanılacak Mikroorganizmalarda Aranılan Özellikler [73]

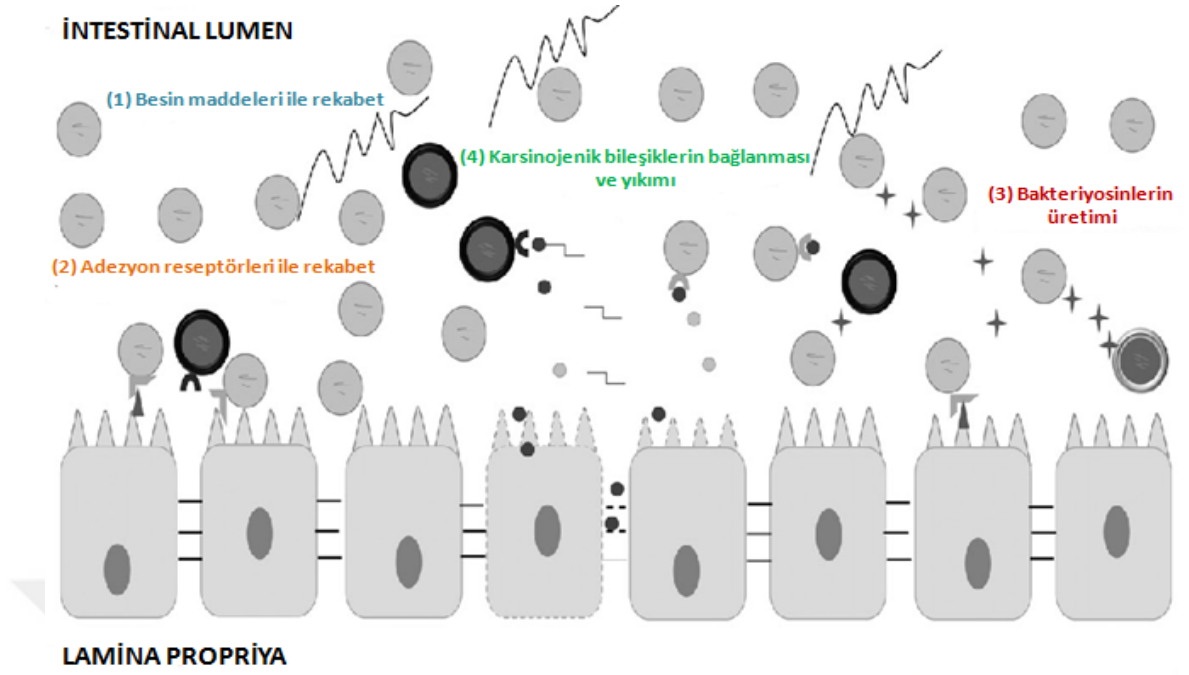
Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalarda aranılan özellikler

- Patojen ve toksik olmamalı
 - İnsan kaynaklı olmalı
 - Mide asiditesi ve safra asitlerine dayanıklı olmalı
 - Bağırsak duvarına tutunabilmeli
 - Doğal floraya adapte olabilmeli
 - Sindirim kanalında geçiçi olarak kolonize olabilmeli
 - Antimikrobiyal maddeler salgılayabilmeli
 - Konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkileri olmalı
-

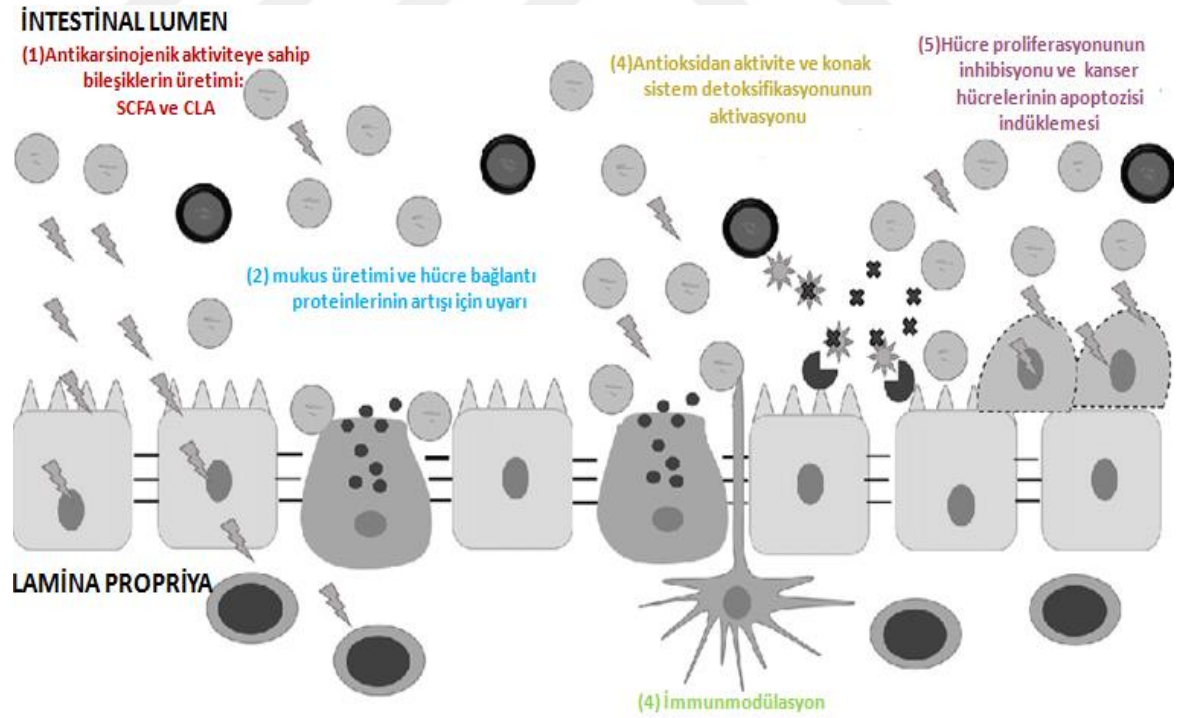
1.7. Probiyotikler ve Kolorektal Kanser

Son yıllarda intestinal mikrobiyota bileşenlerinin kolorektal kanser gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğu gözlemlenmiştir. Kolorektal kanserin gelişimini engelleyen probiyotiklerin potansiyel mekanizmaları önerilmiştir (Şekil 1.5 ve Şekil 1.6). Probiyotiklerin antikarsinojenik aktiviteleri aşağıdaki mekanizmalar ile tanımlanmıştır: (1) bağırsak mikrobiyota içeriğinin modifikasyonu; (2) bağırsak mikroflorasının metabolik aktivitesindeki değişiklikler; (3) bağırsak lümeninde varolan karsinojenik bileşiklerin bozunması ve bağlanması; (4) kısa zincirli yağ asitleri (SCFAs) ve konjuge linoleik asit (CLA) gibi antikarsinojenik aktiviteye sahip bileşiklerin üretimi; (5) immunmodulasyon; (6) bağırsak bariyerinin geliştirilmesi; (7) Konak fizyolojisindeki değişiklikler; ve (8) kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptozisin indüklenmesi [74].

Yapılan çalışmalar kolorektal kanserli hastaların bağırsak mikrobiyota içeriklerinin kişiden kişiye değiştiğini göstermektedir. Hem bağırsak mikrobiyotasını etkilediği hem de konağa karşı sağlıklı etkilerinden dolayı yeterli miktarda alındığında probiyotiklerin, bağırsak mikrobiyota içeriği modifiye ederek kolorektal kanserin gelişimini önleyebileceği bildirilmiştir [75]. Tablo 1.3'de kolorektal kanserin önlenmesinde kullanılan probiyotiklerin potansiyel etkileri ve mekanizmaları gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Probiyotiklerin Düzenli Tüketimi İle Bağırsak Mikrobiyota Kompozisyonunun Düzenlenmesi [74]



Şekil 1.6. Bazı Probiyotik Suşlarının Bağırsaklardaki Fonksiyonları [74]

Bağırsaklarda kronik inflamasyon kolorektal kanserin gelişme riskini artırmaktadır. İnflamator bağırsak hastalığına sahip bireyler sağlıklılara kıyasla kolorektal kansere yakalanma riski 5 kat yüksektir [76]. Kolorektal kanser vakalarında proinflamator sitokinler IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 ve TNF- α kanser gelişimi ile ilişkilidir. Aksine antiinflamator sitokin IL-10 ve Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) inhibe edici etki göstermektedir [77]. Probiyotikler antiinflamator sitokinlerin üretimini artırabilir ya da azaltabilir. Bu şekilde kolon kanseri hücrelerinin gelişimini geciktirebilir. Diğer önemli bir immün modülatör yol immunglobulin A (IgA) üretimini artırmaktır. Proteolize olan dirençlerinden dolayı bu immunglobulinler, intestinal lümende varolan karsinogenik bileşiklerin kolonositlerle potansiyel etkileşimi sınırlandırarak bağırsak yüzeyine etki etmektedirler [78].

İntestinal bariyerin esas fonksiyonu organizmayı fiziksel ve kimyasal hasardan ve intestinal lumende zaten varolan mikroorganizmaların istilasından korumaktır. Bu bariyer epitelyal hücreler ve bazı immün hücre tabakaları, goblet ve paneth hücreleri, hücre bağlama proteinleri, mukus tabakaları, IgA, pH, antimikrobal peptidler ve intestinal mikrobiyotayı oluşturan mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Bu bariyerde herhangi bir hasar meydana geldiğinde konak ile intestinal mikrobiyotanın etkileşimi artarak kronik inflamasyona ve nihayetinde de kolorektal kansere yol açmaktadır. İntestinal mikrobiyota mikroorganizmaları az ya da çok intestinal bariyerin geçirgenliğini değiştirebilmektedir. Bazı probiyotik türleri intrakolonik pH, hücresel bağlanma proteinleri ve müsin üretimi gibi intestinal bariyerin önemli komponentlerini modifiye ederek intestinal geçirgenliği azaltabilmektedir [87].

Kısa zincirli yağ asitleri, diyet ya da mukus gibi endojen olarak alınan sindirilmeyen karbonhidratların bakteriyal fermantasyonu sonucu üretilmektedirler. Asetat ve propiyonattan ziyade kolorektal kanser söz konusu olduğunda en çok çalışılan bütirat, kolonositlerin enerji kaynağıdır. Butirat kolonositlerin proliferasyonu, epitelyum bariyer fonksiyonu, mukozal hücre farklılaşması, apoptozisin düzenlenmesi ve oksidatif stresle ilişkili elektrofillerin detoksifikasyonu gibi hem lokal hem de sistemik biyolojik etkilere ve kanseri önlemede çok önemli bir role sahiptir [88]. Kolorektal kanserli hastalarda

sağlıklı olanlarla karşılaştırıldığında feçeslerinde daha düşük düzeyde bütirat bulunmuştur [89]. Probiyotik takviyesinin (*Lactobacillus salivarius* Ren, düşük doz: 5×10^8 kob/kg, yüksek doz: 1×10^{10} kob/kg, 15 hafta boyunca) DMH indüklü rat kolorektal kanser modelinde feçeste total SCFA ve bütirat düzeyini artırdığı gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada probiyotik takviyesi ile kolonda anormal kript odaklarının (ACF) önemli şekilde azaldığı bildirilmiştir [90].



Tablo 1.3. Kolorektal Kanserin Önlenmesinde Probiyotiklerin Potansiyel Etkileri ve Mekanizmaları: Deneysel Hayvan Çalışmalarından Kanıtlar

Probiyotik	Hayvanlar ve diyet	Takviye	Etki	Potansiyel mekanizma	Referans
<i>Bacillus polyfermenticus</i> SCD	Erkek F344 rat (5haftalık) DMH (30 mg/kg, 6 hafta) indüklü KRK modeli Yağdan zengin (%12) ve düşük lif (%2) içeren diyet	Probiyotik diyet ile karıştırıldı (3x10 ⁶ cfu) ve her DMH enjeksiyonundan 1 hafta önce bu diyet ile beslendi. 10 hafta	↑ACF insidansı	?	[79]
<i>Bacillus polyfermenticus</i>	Erkek F344 rat (5 haftalık) DMH (30 mg/kg, 6 hafta) indüklü KRK modeli Yağdan zengin (%12) ve düşük lif (%2) içeren diyet	Probiyotik diyet ile karıştırıldı (3.1x10 ⁸ cfu/1.3g) 10 hafta	↑ACF insidansı	↑Total plazma antioksidan potansiyeli ↑lökosit DNA hasarı	[80]
<i>E faecium</i> CRL 183	SPF erkek Wistar rat (4 haftalık) DMH (20 mg/kg, 14 hafta) indüklü KRC modeli Standart rat yemi	3 mL/kg probiyotik süspansiyonu (10 ⁸ cfu/mL) Günlük gavaj ile verildi. 42 hafta	↑ACF ve adenokarsinom insidansı	IL-4, IFN-γ ve TNF-α üretimini artırarak immün yanıtı artırma	[81]
Hindistan'da yaygın üretilen fermente süt, curd (<i>L acidophilus</i> , <i>L casei</i> ve <i>L lactis biovar diacetylactis</i> DRC-1)	Ratlarda DMH (20 mg/kg, 15 hafta) indüklü KRK modeli Standart diyet	Curd, diyet ile karıştırıldı (%30 w/w). 40 hafta	↑Tümör insidansı, derecesi ve büyüklüğü	↑DNA hasarı	[82]

VSL#3	Erkek Sprague-Dawley rat (6 haftalık KRK modeli ile ilişkili kolitis Standart diyet	Enjeksiyondan 1 hafta önce probiyotik günlük içme suyu ile alınmaya başlandı (5×10^{10} cfu/100g vücut ağırlığı) ve deney sonuna kadar devam edildi. 10 hafta	Hayvanların hiçbirisinde KRK gelişmedi	[†] Mikrobiyal zenginlik ve anjiostatin	[83]
<i>L delbrueckii</i> UFV-H2b20, <i>B animalis var lactis</i> Bb12 ve <i>Saccharomyces boulardii</i>	Erkek Swiss fare (8 haftalık DMH indüklü (25 mg/kg, 6 hafta) KRK modeli Ticari yem	Probiyotik günlük içme suyu ile alındı (3×10^8 cfu/mL). 14 hafta	[†] ACF miktarı	?	[84]
<i>L rhamnosus</i> GG MTCC #1408 ya da <i>L acidophilus</i> NCDC #15	Erkek Sprague-Dawley rat DMH indüklü KRK Standart diyet	Probiyotik oral olarak günlük alındı (1×10^9 cfu/0.1 mL). DMH enjeksiyonundan 1 hafta önce takviyeye başlandı ve deney sonuna kadar devam edildi. 19 hafta	[†] Tümör insidansı, yükü ve derecesi [†] Lipid peroksidasyonu	[†] GSH [†] SOD ve GPx aktiviteleri	[85]
<i>L acidophilus</i> ATCC 314'un mikroenkapsülasyonu ile desteklenmiş yoğurt	Erkek C57BL/6J-Apc Min/+ (6 haftalık)	Probiyotik oral olarak 6 hafta alındı (0.3 mL/drop) 10 hafta	[†] Tümör insidansı	[†] CD8 hücreleri aracılığıyla [†] intestinal inflamasyon	[86]

([†]Azalma, [†]Artma)

(Kısaltmalar: ACF=Anormal kript odakları; KRK=Kolorektal kanser; IL-4=İnterlökin-4; IFN- γ =İnterferon- γ ; TNF- α = Tümör nekroz faktör- α , SOD= Süper oksit dismutaz; GSH= Glutasyon; GPx= Glutasyon peroksidaz)

1.8. Kımız

Kımız Orta Asya göçebe halklarının geleneksel içeceği. Bu içecek Çin, Moğolistan, Kazakistan, Kırgızistan ve Rusya'nın (Bouriatie, Kalmoukie ve Bashkirie) bazı bölgelerinin azınlık etnik grupları arasında çok sevilen ve çeşitli hastalıkları iyileştirici bir ilaç olarak içilen bir içecektir [91]. Eskiden Türkler tarafından "Tanrılar içkisi" olarak kabul edildiği ve tanrılara sunulduğu bildirilmektedir. Kımız hakkında ilk bilimsel çalışma Rus ordusunda görev yapan İskoçyalı doktor Con Griv tarafından 1784 yılında yayınlamıştır ve sonraki yıllarda Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği'nde kımız ile ilgili yapılan çalışmalar giderek hız kazanmıştır. Eski S.S.C.B'de 1962 yılında 50'ye yakın sanatoryumda 11.000 hastanın kımız ile iyileştirildiği bildirilmiştir [92].

Kımız, kendi doğal mikrobiyota içeriği (laktik asit bakterileri ve mayaların karışımı) kullanılarak elde edilen hafif alkollü fermente bir kısırak sütü içegeğidir. Kımız küçük bir hacimde taze kısırak sütü içine daha önceden oluşmuş fermante süt aşılıyarak yapılmaktadır. Geleneksel yöntemle kımız üretiminde kısırak sütü sağımdan hemen sonra "saba" denilen kabın içerisine konmakta ve starter kültür (bir önceki kımız) eklendikten sonra fermentasyona bırakılmaktadır. Fermentasyon sırasında 3-4 saatte bir yeniden kısırak sütü eklenerek bir günlük fermentasyonun sonunda kımız elde edilmektedir. Fermentasyon sırasında laktoz, laktik asit, alkol ve karbondioksit dönüşmektedir. Oluşan laktik asit ve alkol fermentasyonunda kımıza spesifik tat ve aromasını kazandıran propil alkol, bütil alkol, propiyonik asit, pirüvatlar, aldehitler, gliserin, aseton, diasetil, çeşitli eterler ve uçucu asitleri gibi bileşikler meydana gelmektedir [92]. Kımız fermentasyonu iki farklı mikroorganizma türü olan laktik asit bakterileri ve mayalara (*Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida*) bağlıdır [93]. Laktik asit bakterilerinin, insan sağlığı üzerine bazı yararlarının yanı sıra ürünün aroması, doku ve asitliğini etkileyen fermentasyonda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Maya ise kımız ürününün tipik tat ve lezzetine katkı sağlayan laktozu alkole fermente etmektedir. Kımızın kan yapıcı organlar, böbrek fonksiyonu, iç salgı bezleri, bağışıklık sistemi, dolaşım sistemi, sinir sistemi ve sindirim kanalı aktivitesine yararlı etkiler gösterdiği

kaydedilmiştir [91,94,95]. Aynı zamanda tüberküloz, dizanteri, tifo, paratifo, ülser ve hepatit gibi hastalıkların tedavisinde olumlu sonuç verdiği ve çok sayıdaki bakteriye karşı antibiyotik etki gösterdiği bildirilmiştir [91, 96, 97].

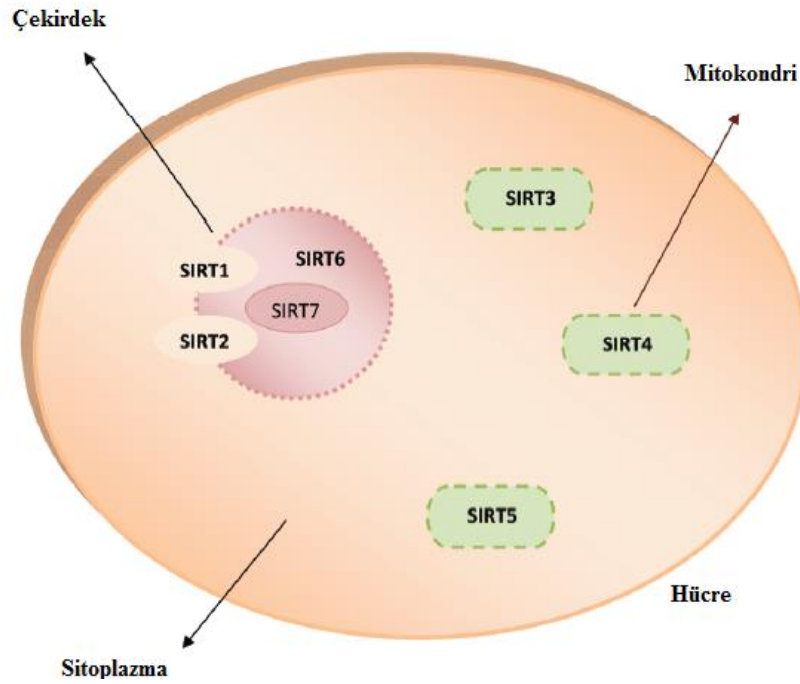
Tablo 1.4. Çeşitli Sütlerin Ortalama Yüzde Bileşenleri [91]

Sütün türü	Su	Kuru madde	Laktoz	Yağ	Protein	Kül
Kısrak sütü	88.2	11.8	6.2	1.9	2.5	0.5
Kadın sütü	87.6	12.4	7.0	4.0	0.9	0.2
İnek sütü	87.3	12.7	4.7	3.7	3.4	0.7
Koyun sütü	80.7	19.3	4.8	7.4	5.5	1.0
Keçi sütü	86.8	13.2	4.1	4.5	2.9	0.8
Deve sütü	88.2	11.8	5.0	2.5	3.6	0.7

İnek, keçi ve koyun sütü ile kıyaslandığında kısrak sütünde su ve laktoz oranının daha yüksek olduğu, kuru madde, protein, yağ ve mineral madde oranının ise düşük olduğu görülmektedir. Farklılık protein ve yağdaki kimyasal yapı değişikliğinden kaynaklanmaktadır (Tablo 1.4). Albuminli sütler grubuna giren kısrak sütünde proteinin yaklaşık %50'sinin kazein, %50'sini ise laktalbumin ve laktoglobulin oluşturmaktadır. Diğer sütlerde ise kazein toplam proteinin %80'inden fazlasını oluşturduğundan kazeinli sütler grubuna girmektedir. Total protein içerisinde laktalbumin ve laktoglobulin oranının yüksek olması diğer sütlerle karşılaştırıldığında kısrak sütünün kolay sindirilebilen, sıvı durumda kalabilen ve besleme değeri yüksek bir gıda olma özelliği kazandırmaktadır. Aynı zamanda daha küçük çaptaki yağ tanecikleri sayesinde kolay hidrolizden dolayı sindirimi kolaydır. Yüksek moleküllü doymamış yağ asitleri olan linoik, linolenik ve araşidonik asit gibi fizyolojik değeri yüksek yağ asitlerince zengindir. Kısrak sütü içerdiği laktoz miktarı, protein ve süt yağının yapısı sebebiyle kadın sütüne benzemektedir. Diğer önemli bir özelliği ise protein fraksiyonlarından kazein ve serum proteini miktarının neredeyse eşit olmasıdır [91].

1.9. Sirtuin Proteinleri

Sirtuin (SIRT), nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) bağımlı sınıf III histon deasetilaz bir proteindir. İlk olarak Klar ve ark. (1979) tarafından mayada keşfedilen sessiz bilgi düzenleyici 2 (Silent Information Regulatory 2) (SIR2) bakteri, sinek, solucan, bitki ve memelilerde gözlemlenmiştir. Bakterilerden memelilere kadar birçok cinsten ve farklı sayıda bulunmakla birlikte memelilerde sirtuin ailesinin 7 farklı türü bulunmaktadır. Her sirtuin korunmuş 273 aminoasit katalitik temel alana sahiptir ve bu alanını saran N-terminal ve C-terminal zincirlerinin boyları farklı sirtuinler arasında değişkenlik göstermektedir. Sirtuinler hücrede farklı yerlerde bulunmakla birlikte farklı dokularda farklı miktarlarda ekspresyon edilmektedir. Sirtuin 1, 2, 6 ve 7 ağırlıklı olarak nükleusta, SIRT1 ve SIRT2 ayrıca sitoplazmada, SIRT 3, 4 ve 5 ise mitokondride bulunmaktadır (Şekil 1.7) [98, 99].



Şekil 1.7. Hücrede Sirtuinlerin Lokasyonları [100]

NAD⁺ bağımlı deasetilaz aktivitesine sahip sirtuinler hücre döngüsünün düzenlenmesi, yağ asidi metabolizması, gen transkripsiyonu ve hücrenin strese yanıtı gibi birçok hücresel süreçte görev almaktadırlar [98]. Sirtuinler çeşitli transkripsiyon faktörlerinin

ve enzimlerin deasetilasyonu ile birçok hücrel mekanizmayı düzenlemektedir. Histonların deasetilasyonu, kromatinin yoğunlaşmasını ve bu şekilde gen ifadesinin baskılanmasını sağlamaktadır. Gen ifadesinin baskılanması, histonların amino kuyruklarındaki lizin kalıntılarını ve histon olmayan proteinlerin asetil gruplarının, histon deasetilaz (HDAC) aracılığı ile çıkarılmasıyla gerçekleşmektedir [101]. Sirtuinler kanser ve diyabet, karaciğer yağlanması, yaşlanma, yaşlanmaya bağlı hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi metabolik hastalıklar dahil bir çok hastalıklarda önemli düzenleyiciler olup strese bağlı sinyal yollarında kritik bir öneme sahiptir [102].

Tüm memeli sirtuinleri arasında en çok çalışılan SIRT1, dayanıklı deasetilaz aktivitesi göstermektedir. SIRT1, inflamasyonu ve oksidatif stresi azaltarak yaşlanmanın düzenlenmesinde hayati bir rol oynamaktadır [103]. Memeli sirtuinleri hücrenin strese karşı direncinde ve hücre ölümünde önemli rol oynamaktadır. Sirtuinlerin strese karşı bu direnci, bir transkripsiyon faktörü olan Forkhead box class O (FOXO) ile etkileşimi sonucu meydana gelmektedir. Bu transkripsiyon faktörleri stres direncini ve enerji durumunu düzenleyerek hücrenin yaşam süresini etkilemektedir [104]. SIRT1'in doğal aktivatörleri olan kalori kısıtlaması ve resveratrol ile SIRT1 aktivasyonunun yaşam süresini önemli şekilde artırdığı bildirilmiştir [105]. Aynı zamanda SIRT1, p53, Ku70, E2F1 ve TGF- β sinyal yolları gibi hücre ölümü ile ilişkili hedefleri düzenlediği bildirilmiştir [98]. Enerji metabolizmasında düzenleyici anahtar bir rol oynayan peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör- γ koaktivatör 1 α (PGC-1 α), karaciğerde glukoneogenezin düzenlenmesi ve yağ asidi oksidasyonunda önemli görev almaktadır. PGC-1 α 'in bu iki yol üzerinde düzenleyici rolü için SIRT1'e gereksinim duymaktadır [106]. Yapılan çalışmalarda, SIRT1 aktivasyonunun diyabet, karaciğer yağlanması, inflamasyon, osteoporozis ve nörodejeneratif hastalıkların azalmasında etkili olduğu bildirilmiştir [107].

Sirtuin 2'nin karsinogenez, enfeksiyon, hücre sağkalımı, ve hücre döngüsünün düzenlenmesindeki rolünün mekanizması henüz aydınlatılmamış olsa da inflamasyon gibi bir çok süreçte görev aldığı bildirilmiştir [108]. SIRT2, reseptör etkileşimli protein-1 (RIP-1) ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B)'nin p65 altünitesi ile etkileşmektedir.

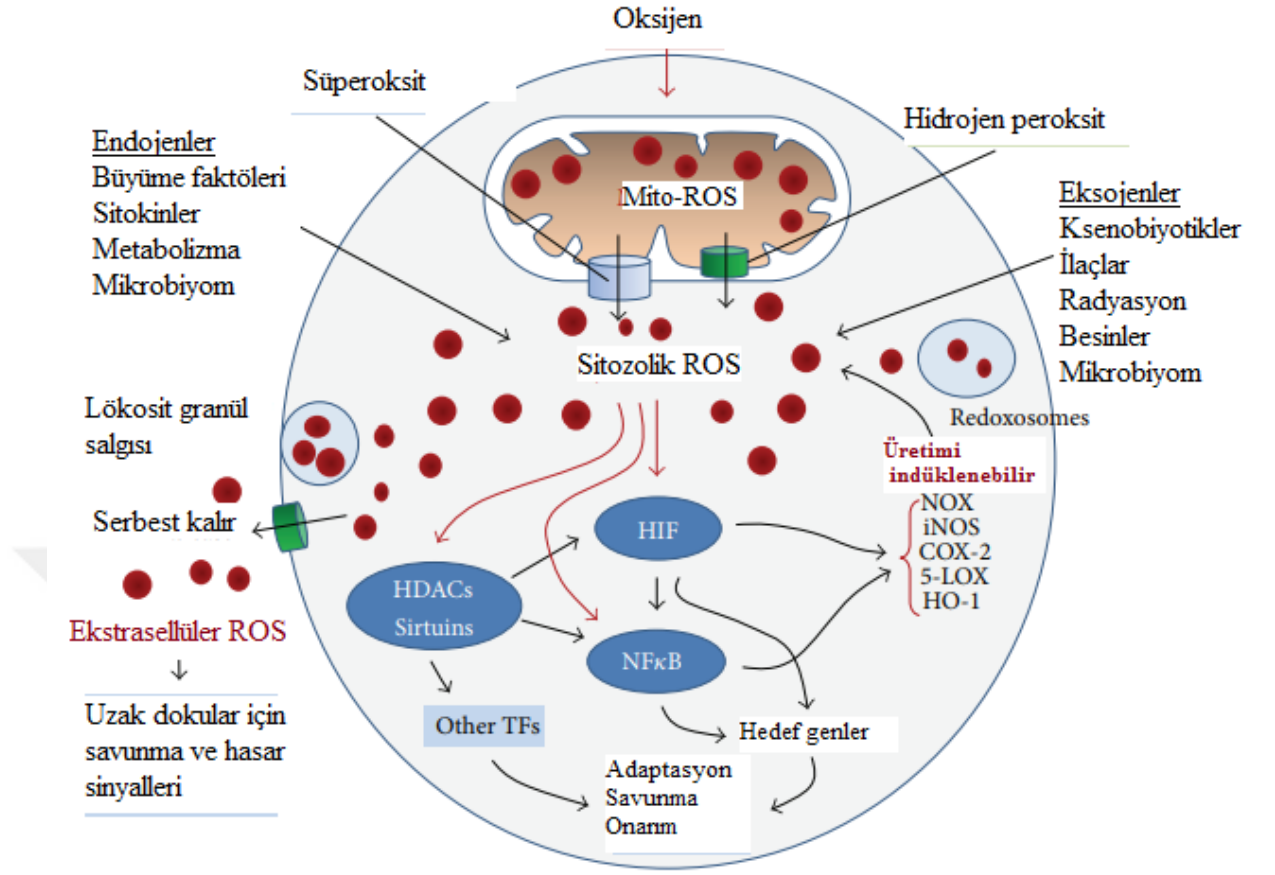
SIRT2 geni silinmiş fare hattında, SIRT2 delesyonları NF- κ B'nin asetilasyonunu artırarak ve inflamasyon sürecinin gelişiminde SIRT2'nin koruyucu rolünü gösteren antiinflamasyon yolunu azaltarak inflamasyona cevabı geliştirmektedir [109]. Mitokondriyal SIRT3 deasetilaz, ROT ve SIRT1 üretimini azaltarak ömür uzunluğunu kontrol etmektedir. SIRT3 deasetilaz yağların β -oksidasyonu, aminoasit metabolizması, elektron transport zinciri ve antioksidan savunma ile ilgili mitokondriyal enzimleri aktive etmektedir. SIRT3, Asetil coA sentaz (Ace CS1), PGC-1 α ve ayrıştırma proteinleri (UCP-1) gibi mitokondriyal genleri düzenleyerek birçok hücre yolunu aktive ettiği bildirilmektedir [110].

Sirtuin 4, etkisini ADP-ribozil transferans aktivitesiyle gösterir ve mitokondriyal glutamat dehidrojenazı (GDH) inhibe eder. Böylece glutamin ve glutamatu düzenleyerek oksidatif metabolizma ve aminoasitlerin stimüle ettiği insülin salınımını düzenler [111]. Mitokondriyal SIRT5'in ana hedefi, üre siklusu enzimi karbamoil fosfat sentetaz-1 (CPS-1)'dir. Ürenin NH₃'e dönüşümü katalizler ve oksidatif stres üretimini azaltır [111,112]. SIRT6, DNA stabilizasyonu ve onarımını kontrol etmektedir [98,108]. SIRT7, RNA polimeraz-I ve histonlarla etkileşerek memelilerde rRNA transkripsiyonunu düzenlediği bildirilmiştir [113].

Mitokondri; karbonhidrat, lipid ve proteinlerin metabolizmasında merkezi bir konumdadır. Mitokondriyal proteinler metabolik dönüşümleri süresince posttranslasyonel modifikasyonlara maruz kalmaktadır. Lizin asetilasyonu Asetil CoA metabolizması ve hücre sinyalleri arasında ilişkiyi sağlayan korunmuş bir posttranslasyonel modifikasyondur [114]. TCA, yağ asidi oksidasyonu ve oksidatif fosforilasyon enzimlerinin posttranslasyonel modifikasyonları süresince asetillendiği bildirilmiştir [115]. Sirtuinler mitokondriyal protein asetilasyonu dinamiğini kontrol etmede önemli bir pozisyonda olduğundan, onların potansiyel olarak enerji üretimi, sinyalizasyon, mitokondriyal translasyon, apoptozis ve mitokondriyal biogenezis gibi mitokondriyal fonksiyonların her aşamasını etkileme potansiyelinin mümkün olduğu bildirilmiştir [116]. Mitokondride önemli bir enerji metabolizması düzenleyicisi olan SIRT3 kahverengi adipoz doku, kas, karaciğer, böbrek, kalp ve beyin dokularında

metabolik olarak aktif şekilde yüksek derecede ekspresse olduğu saptanmıştır [117]. SIRT3 aracılığı ile elektron transport zinciri ve oksidatif fosforilasyonun çeşitli proteinlerinin deasetilasyonu onun mitokondriyal enerji üretimindeki önemini göstermektedir [118].

Mitokondriyal enerji metabolizmasındaki bozukluk çoğunlukla hücrel oksidatif stres ile açıklanmaktadır [119]. Mitokondri oksidatif stresi düzenlemek ve fonksiyonel homeostaziyi muhafaza etmek için sayısız biyolojik programlar geliştirmiştir. Tüm mitokondriyal sirtuinler arasında SIRT3, antioksidan savunma sistemini geliştirerek hücrel ROS düzeyini korumada sorumlu önemli bir deasetilazdır [120]. Sirtuinler, detoksifikasyon aracılığı ile ROS düzeyini düzenleyebilme özelliğinden dolayı gen susturulması, hücre ölümü, uzun ömür, inflamasyon ve kanser gibi birçok fizyolojik fonksiyon ile ilişkilendirilmiştir [35,98,107,108,119]. ROS esas olarak mitokondride üretilmektedir. ROS radikalleri mitokondriyal Mn süperoksit dismutaz (MnSOD) tarafından hızlı şekilde detoksifiye edilmektedir. Hidrojen peroksitler membran akuaporinleri aracılığı ile sitozole kolaylıkla geçebilmektedirler. Mitokondriye gelen ROS'a ek olarak sitozolik ROS, besinler radyasyon, mikrobiyom, büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer metabolizmalar dahil birçok endojen ve eksojen kaynaklar ile oluşmaktadır. NADPH-oksidaz (NOX), nitrik oksit sentetaz (iNOS), siklooksijenaz 2 (COX2), 5-lipoksijenaz ve hem-oksidanaz-1 (HO-1) gibi proinflamator indüklenebilir enzimler, ROS artışı ile üretilebilirler. Hipoksi-indüklenebilir faktör 1- α (HIF1 α), NF κ B ve HDAC'lar, özellikle sirtuinler, ROS tarafından reseptörler ve metabolizmadan gelen spesifik sinyalizasyon ile sinerji içerisinde aktive edilirler. Aktive olmuş transkripsiyonel faktörlerin hedef genleri hipoksiye adaptasyonu, proinflamator zararlı ajanların inaktivasyonu ve DNA onarımını amaçlamaktadır. ROS aynı zamanda iyonik kanallar (süperoksitler) ya da akuaporinler (hidrojen peroksit) aracılığı ile plazma membranını geçerek ya da aktive lökosit granüllerini salgılayarak ekstraselüler boşluğuna salınmaktadır. Ekstraselüler ROS, lokal hasar sinyalizasyonu ve adaptasyon, yeniden modelleme ve kronik hasar mekanizmalarının uygun şekilde aktivasyonunu sağlayan uzak doku ve organları etkileyebildiği için savunma için önemlidir [35].

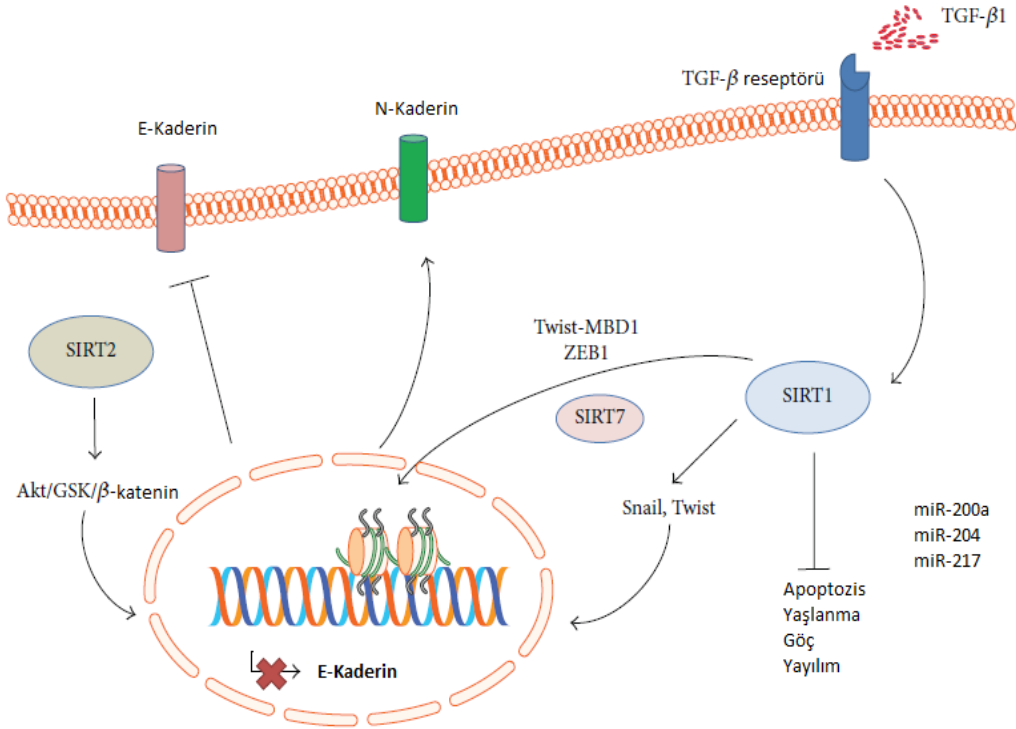


Şekil 1.8. ROT Üretimi ve Sirtuinler Arasındaki İlişki [35]

Sirtuinler EMT sinyalinin hem artırılmasında hem de baskılanmasında kompleks bir rol oynamaktadır. EMT sürecinde sirtuinlerin rolü henüz tartışılmakla beraber fonksiyonel özellikleri önemli ölçüde hücre içi içeriğe, kanser gelişim aşamasına, doku türüne ve mikroçevre yapısına bağlıdır. Kanser hücrelerinde EMT sinyal yolu, sirtuinler tarafından aktive ya da inhibe edilerek başlatılan sinyal yolu Şekil 1.9 ve Şekil 1.10’da özetlenmiştir [102]. Kanser ve diğer hastalık süreçlerinde sirtuinlerin rolünün araştırıldığı giderek artan sayıdaki çalışmalarda, sirtuinlerin EMT sürecindeki tam rolü henüz tartışma konusudur. SIRT1 ve SIRT2 hem EMT-artırıcı hem de EMT-baskılayıcı özellik gösterirken SIRT3 ve SIRT4 EMT baskılayıcıdır. Öte yandan SIRT7 sadece EMT indüksiyonu ile ilişkilidir. [102,121]. SIRT1 ve SIRT2 tümörigenik süreçte hem pozitif hem de negatif düzenleyici olarak görev görmektedir. SIRT1 aşırı

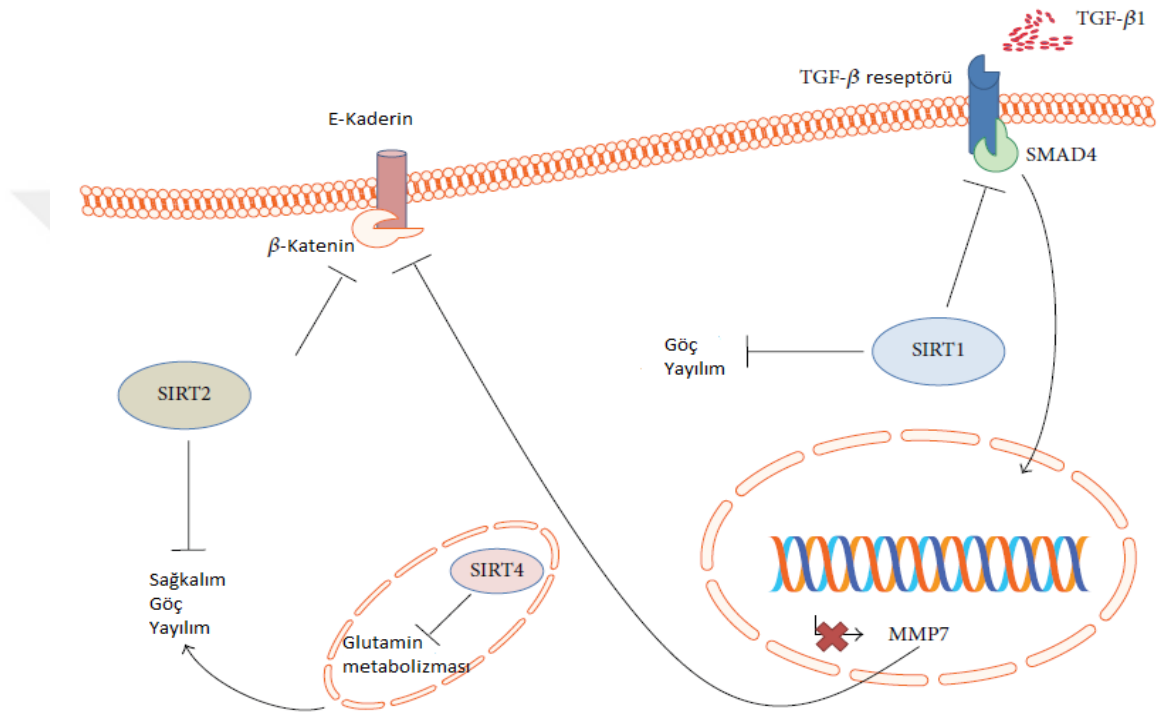
ekspresyonunun, APC gen ilişkili kolon kanseri gelişimini engellediği bazı model çalışmalarda görülmüştür [122]. SIRT3, oksidatif yanıt, enerji dengesi ve metabolik regülasyon ile ilişkili mekanizmasından dolayı tümör baskılayıcı rol oynamaktadır. Azalan SIRT3 aktivitesi, artan ROT üretimi ve SOD, mitokondrial izositrat dehidrojenaz 2 ve FOXO3a gibi ilgili antioksidan enzimlerin daha düşük aktivitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [35,104,120].

Transforme edici büyüme faktörü beta, sinyalizasyon aktivasyonu, apoptozis ve yaşlanmaya karşı hücrel direnci artırarak, göç ve yayılımı azaltarak SIRT1 ekspresyonunu regüle etmektedir. Çinko Parmak E-box bağlama homeobox 1 (Zeb1), Twist- Metil-CpG bağlayıcı alan protein 1 (MBD1) ve SIRT7 ile etkileşerek SIRT1, N-kaderin ve vimentin gibi mezenkimal genlerin ekspresyonunu artırırken, E-kaderin dahil olmak üzere epitelyal genlerin transkripsiyonunu baskılamaktadır. SIRT1 aynı zamanda EMT ana düzenleyicileri olan Snail ve Twist'i regüle ederek E-kaderin ekspresyonunu baskılamaktadır [102].



Şekil 1.9. EMT'in Sirtuinler Tarafından Pozitif Düzenlenmesi [102]

Sirtuin 1, TGF- β ve Smad4 sinyal yolunu deasetilleyerek inhibe edebilmektedir. Bu, sonuçta E-kaderinin yıkımını azaltan matris metallopeptidaz 7 (MMP7)'nin transkripsiyonu ve ekspresyonunun azalmasına yol açmaktadır. E-kaderine bağlı olan β -katenin, EMT indükleyici etkilerin eksikliği ile çekirdeğe giremez. Benzer şekilde SIRT2, E-kaderin ekspresyonunu artırırken β -kateninin ekspresyonunu azaltır. SIRT4 mitokondriyal glutamin metabolizmasını inhibe ederek E-kaderini baskılar [102].



Şekil 1.10. EMT'in Sirtuinler Tarafından Negatif Düzenlenmesi [102].

Tablo 1.5. SIRT2 ve SIRT3 Proteinlerini Subselüler Lokalizasyon, Substrat ve Çeşitli Fonksiyonlarının Gösterilmesi [116]

Sirtuinler	Subselüler lokalizasyon	Aktivite	Substratlar	Fonksiyonlar
SIRT 2	Sitoplazma	Deasetilaz	Tubulin, H4, Foxo3a	Hücre Siklusu
SIRT3	Mitokondri	Deasetilaz	Siklofilin D LCAD HMGCS2, mitokondriyal AceCS2 Ornitin transkarbamoil transferaz GDH1 NADH dehidrojenaz 1 α SOD2, mitokondriyal IDH 2, mitokondriyal Ribozomal protein L10 Foxo3 Serine/threonine kinase 1 (LBK1)	Glikoliz Yağ asitlerinin oksidasyonu Ketone cisimlerinin sentezi Asetat metabolizması Üre siklusu Aminoasit katabolizması Oksidatif ROT TCA siklusu Mitokondriyal protein sentezi Transkripsiyonel aktivasyon Tümör baskılayıcı, AMPK Sinyal

(Kısaltmalar: H4= histone, LCAD= uzun zincirli açıl CoA dehidrojenaz, HMGCS2= 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA sentaz 2; AceCS2= asetil-CoA sentetaz 2, GDH= glutamat dehidrojenaz, IDH2= izositrat dehidrojenaz 2)

1.10. Glutatyon

Antioksidanlar enzimatik ve non enzimatik antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Nonenzimatik antioksidanlar sınıfına giren glutatyon (GSH), karaciğerde glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. GSH ve GSH ilişkili metabolizma, oksidatif stres ve stresin diğer türlerinden hücreleri korumada çok önemli bir role sahiptir. Bu etkisini serbest radikalleri yakalarak, peroksitleri azaltarak ve elektrofilik bileşiklere bağlanarak göstermektedir [123]. Endojen olarak üretilen H_2O_2 , selenyum bağlı glutatyon peroksidaz (GSH-Px) varlığında GSH tarafından indirgenmektedir. GSH'un okside olmasıyla meydana gelen okside glutatyon ise redoks döngüsünde oluşan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında glutatyon redüktaz tarafından GSH'a yeniden indirgenmektedir. Katalaz tarafından da indirgenen H_2O_2 , mitokondride katalazın bulunmamasından dolayı GSH daha büyük önem arz etmektedir. Aynı zamanda GSH, eritrositlerde bulunan hemoglobinin ve diğer proteinlerdeki sülfidril gruplarını (-SH) redükte halde tutarak bu grupların oksidasyonunu önlemektedir. Bu şekilde hem hemoglobinin methemoglobine dönüşümünü hem de fonksiyonel grupların ve enzimlerin inaktivasyonunu engellemektedir [124].

1.11. Adenozin deaminaz

Pürin metabolizmasında anahtar bir enzim olan adenozin deaminaz (ADA), adenozin ile 2'-deoksiadenozini sırasıyla inozin ve 2'-deoksiinozine dönüşümünü katalize eden bir enzimdir. Reaksiyon adenozinin hücre içi konsantrasyonunun kontrol edilmesinde büyük önem taşımaktadır. ADA'nın katalizlediği bu reaksiyon geri dönüşümsüz olduğu için, adenozinin yıkılmasında kontrol basamağını oluşturmaktadır. Adenozin ile deoksiadenozinin hücre içi düzeylerinin artması toksik olduğundan ADA, bu nükleosidlerin hücre içi düzeylerinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [125].

İnsanda ADA aktivitesi timüs, dalak, lenf nodu, kemik iliği ve periferik kan lenfositlerinde daha yüksek gözlemlenmektedir. İki izoformundan düşük molekül

ağırlıklı olan ADA1 timus, eritrosit ve kalpte bulunurken, yüksek molekül ağırlıklı ADA2 karaciğer, böbrek ve barsaklarda bulunmaktadır. Aynı zamanda ADA2 insan kan plazmasında baskın olan enzim formudur [126]. T lenfositte saptanan ADA aktiviteleri B lenfositlere göre daha yüksek olmakla birlikte T hücre farklılaşması esnasında ADA aktivitesinde belirgin artış görülmektedir. Aktivitesinin hücrenin mitojenik savunması esnasında arttığı ve lenfosit ve monositlerin hücrenin proliferasyonu ve diferansiyasyonundan sorumlu olan ADA, hücrel immünite belirteci olarak düşünülmektedir. ADA aktivitesi hücrel immünitenin uyarıldığı tifo, infeksiyöz mononükleoz, bruselloz, akut pnömoni, tüberküloz, sarkodiyoz, karaciğer hastalıkları, akut lösemi, kanser, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus (SLE), psöriazis ve behçet hastalığı gibi otoimmün hastalıkların aktivasyon döneminde gösterilmiştir [127]. İmmün sistemin normal fonksiyonunu yerine getirebilmesi için yeterli miktarda ADA enzimi bulunması gereklidir. Yapılan çalışmalarda, adenozinin antiinflamatuvar bir molekül olduğu ve immünespresif bir ajan gibi işlev gördüğü gösterilmiştir [128]. ADA eksikliğinin lenfopeni, ileri derecede bozulmuş hücrel ve humoral immünite, gelişme geriliği ve ciddi infeksiyonlar ile birlikte seyrettiği bildirilmiştir [129].

Kımız ile ilgili, içeriği ve genel özelliklerini ortaya koyan birkaç çalışma yapılmış olmasına karşın yapılan literatür taramalarında antikarsinojenik ve antioksidan özelliklerinin araştırıldığı kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda kımızın bu özelliklerini ortaya koyan ilk çalışma olması bakımından önem arzettiği öngörülmektedir. Diğer önemli özelliği kansere yatkın bir çevrede E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 protein ekspresyon düzeylerinin ilk defa araştırılmasıdır. Yapılan çalışma bu proteinlerin tümöre yatkın bir ortamda moleküler davranışlarının tanımlanmasında bir temel niteliğindedir.

Bu çalışmada bir prokarsinojen olan 1,2-dimetil hidrazin ile farelerde oluşturulan tümöre yatkın mikroçevrede (tumor-permissive microenvironment) kanser sinyal yollarıyla ilişkili SIRT2 ve SIRT3 proteinleri ve E-kaderin, β -katenin yüzey adezyon proteinlerinin ekspresyonu ile oksidatif stres üzerine kımızın etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Cihazlar ve Gereçler

1. Mikroplak Okuyucu (Bio-Tek Eon, USA)
2. Soğutmalı Santrifüj (Hettich, Rotina 35R)
3. Etüv (Labart)
4. Vorteks (Yellow line TTS 2, USA)
5. Mikroplak Çalkalayıcı (Biosan, PSU-2T, EU)
6. Çalkalamalı İnkübatör (Inovia, INO THZ-100B)
7. Çalkalamalı Su Banyosu (Jeio Tech BS-06, Kore)
8. Hassas Terazî (Denver, TP-214)
9. Manyetik Karıştırıcı (Wisestir, MSH-20A, Kore)
10. pH Metre (Adwa AD800, Romanya)
11. Otomatik Pipet (Eppendorf, Socorex)
12. Soğutucu (+4°C, Profilo)
13. Derin Dondurucu (-20°C, Profilo)
14. Derin Dondurucu (-45°C, Uğur)
15. Mekanik homojenizatör
16. Dikey Elektroforez Sistemi, Mini-Protean 4 gel system (Biorad, USA)
17. Western Blot transfer aparatı (Biorad, USA)
18. Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, USA)
19. Nitroselüloz membran (Biorad, USA)
20. Filtre kağıtları (Biorad, USA)
21. Manuel mikrotom (Leica RM 2135)
22. Kameralı dijital mikroskop (Bestscope, CHINA)
23. PAP Pen (Elite, CA)
24. Poli-L-lizinli lam (Sigma, USA)
25. Lamel (Isolab)

26. Distile Su Cihazı (GFL, Water Stills 2004, Germany)

27. Ultra pure su (VWR Chemicals, USA)

2.1.2. Kimyasallar

Protein belirteci (GeneON, Japonya), Bradford solüsyonu (Biorad, USA), 1-Step Ultra TMB-Blotting solüsyonu (Thermo Fisher Scientific, USA), 4x Laemmli (Biorad, USA). Deneysel çalışmalarda kullanılan diğer tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)'den temin edilmiştir.

2.1.3. Kit ve Antikorlar

1. DAB Peroksidaz substrat kit (Vector Labs, USA)
2. Rabbit Vectastain abc kiti (Vector Labs, USA)
3. Mouse 8-OHdG ELISA kit (Sunred, CHINA)
4. Total Antioksidan Kapasite (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep-TURKEY)
5. Total Oksidan Kapasite (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep-TURKEY)

Tablo 2.1. Antikorlar

Antikor	Kaynak	Dilüsyon	Marka
SIRT2 ve SIRT3	Tavşan	1: 1000 (WB) 1: 200 (İHK)	Cell Signaling, USA
E-kaderin ve β -katenin	Mouse	1: 500	Santa Cruz Biotechnology, Germany
GAPDH	Mouse, Tavşan	1: 2000	Santa Cruz Biotechnology, Germany

(Kısaltmalar: WB= Western blotlama; İHK= İmmünohistokimya)

2.2. Metot

2.2.1. Deney Düzenegi

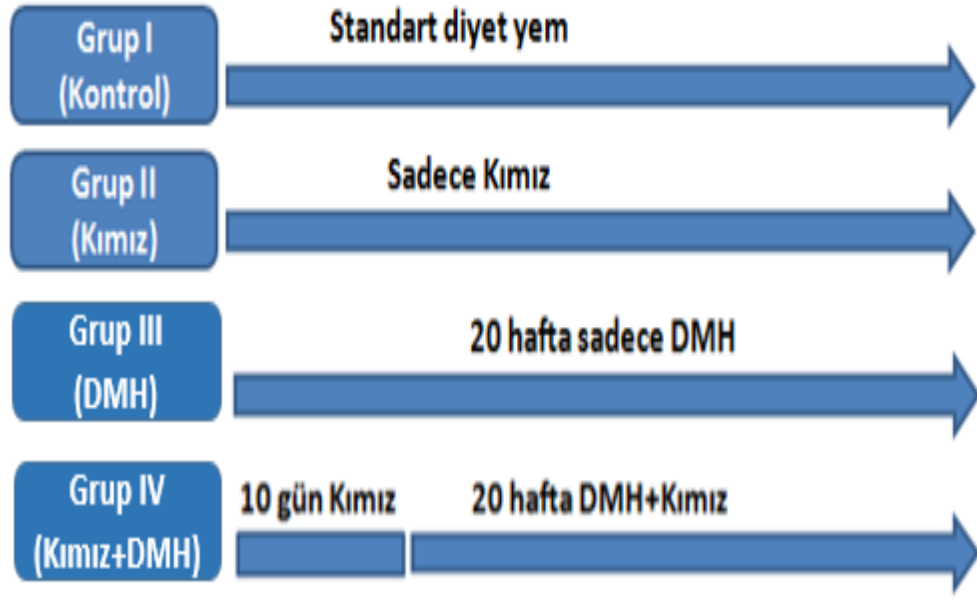
Çalışmada 8 haftalık, 20-25 g ağırlığında 40 adet BALB/C erkek fare kullanıldı. Deneye başlamadan önce Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (KAÜ-HADYEK/2016-127) gerekli izin alındı. Denekler; kontrol (Grup I), kırmız (Grup II), DMH (Grup III) ve kırmız+DMH (Grup IV) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Barınma, bakım ve deneysel işlemler Kafkas Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinde yapıldı. Hayvanlar özel kafeslerde, gruplar arasında herhangi bir temas olmadan muhafaza edildi ve bütün gruplar *ad libitum* balans edilmiş diyetle beslendi. Fareler deneme süresince talaş altlıklı plastik kafeslerde her birinde 5 adet fare olacak şekilde barındırıldı. Oda ısı yaklaşık 19-21°C, 12 saat ışık ve 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Deney düzenegi aşağıdaki gibidir.

Grup I (Kontrol Grubu, n=8): Deney süresince özel bir sağaltım uygulanmamış ve olağan beslenme koşulları sağlanmıştır.

Grup II (Kırmız Grubu, n=8): 20 hafta günde bir defa per oral kırmız verilmiştir.

Grup III (DMH Grubu, n=12): 20 hafta (haftada bir kez) intraperitoneal DMH uygulaması yapılmıştır.

Grup IV (Kırmız+DMH Grubu, n=12): 10 gün per oral kırmız verilmesini takiben 20 hafta (haftada bir kez) intraperitoneal DMH enjeksiyonu ile beraber per oral günde bir defa kırmız verilmiştir.



Şekil 2.1. Deneyin Şematik Gösterimi



Şekil 2.2. Deney Materyalini Oluşturan BALB/C Erkek Fareler

Tablo 2.2. Deneklerin Beslenmesinde Kullanılan Yem İçeriği

Yem içeriği	
Ham protein	%18
Ham selüloz	%11,2
Ham kül	%6,8
Ham yağ	%4,5
Kalsiyum	%1
Fosfor	%0,62
Lizin	%98
Metiyonin	%0,58
Sodyum	%0,24
Enerji (kcal/kg)	2650

2.2.2. 1,2-Dimetilhidrazin Uygulaması

Deney gruplarındaki farelere 1,2-dimetil hidrazin 20 mg/kg olacak şekilde, 20 hafta boyunca haftada bir kez intraperitoneal uygulanmıştır. DMH, % 0.05'lik etilendiamin tetra asetik asitte (EDTA) çözülerek ve NaHCO₃ ile pH'sı 6.5 olacak şekilde ayarlanarak farelere 0.5 mL verilmiştir.

2.2.3. Kıymız Örneklerinde Spesifik Toplam Canlı Bakteri Sayısının Belirlenmesi

İzolasyon amacıyla kıymız örneklerinin ¼ Ringer çözeltisi ile desimal dilüsyonları hazırlandı. Kıymızda mevcut toplam spesifik canlı mikroorganizma sayısını belirlemek için uygun dilüsyonlardan MRS Agar, modifiye Chalmers Agar [130] ve M17 Agar besiyerlerine yayma yöntemi ile ekim yapılarak, 30°C'de 48–72 saat inkübe edildi [131]. İnkübasyon sonrası her besiyerinden tipik bakteri koloni sayısı 2×10^8 kob/mL olarak tespit edilmiş ve hayvanların deney süresince günlük 2×10^8 kob/mL bakteri kolonisi almaları sağlanmıştır.

2.2.4. Kımızın Hazırlanması ve Uygulanması

Deney süresince çalışmada kullanılan kımız İzmir’de bulunan ve ticari üretim yapan Alaş kımız çiftliğinden temin edilmiştir. Taze olarak alınıp, buzdolabında 4°C’de muhafaza edilen kımız, deneme süresince farelerin içme sularına 1:1 oranında eklenerek günlük 2×10^8 kob/mL bakteri kolonisi almaları sağlanmıştır. Çalışmada kımız, Grup IV’deki hayvanlara DMH uygulamasından 10 gün önce vermeye başlanmıştır. Bu uygulama ile amaç, maddelerin barsak mukozasında optimum düzeyde savunma mekanizması oluşturmasını sağlamaktır [132].

2.2.5. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Deney sonunda hayvanlara ksilazin-ketamin kombinasyonu (15mg/kg-50mg/kg) intraperitoneal uygulandıktan sonra farelerin kalplerinden heparinli tüplere kan örnekleri alındı. Kan örnekleri 3000 rpm ve +4°C’de 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Alınan plazma numuneleri 8-OHdG ve ADA parametrelerinin ölçümü için kullanıldı.

Kan örnekleri alındıktan sonra dekapite edilen fareler batın bölgelerinden açılarak karaciğer, kolon ve böbrek dokuları alındı. Alınan tüm dokular iki kısma ayrıldı. Birinci kısım, western blot analizi (E-kaderin, β -katenin ve sirtuin proteinlerinin ekspresyonu) ve spektrofotometrik olarak redükte GSH, TAS ve TOS analizleri için kullanıldı. İkinci kısım %10’luk formale alınarak sirtuin proteinlerinin (SIRT2 ve SIRT3 proteinlerinin immünlokalizasyonu) immünohistokimyasal analizi için kullanıldı. Numuneler analiz edilinceye kadar -20°C’de muhafaza edildi.



Şekil 2.3. Farelerden Dokuların Alınması

2.2.6. Karaciğer, Böbrek ve Kolon Dokularının Homojenizasyonu

Karaciğer, böbrek ve kolon dokuları fosfat tamponunda yıkandıktan sonra proteazlar tarafından proteinlerin bozulmasını önlemek için mümkün olduğu kadar hızlı şekilde ve buz üzerinde dokulardan birer parça kesildi. Kesilen dokular ependorf tüpe alınarak ve her ~ 10 mg doku örneği için 500 μ L lizis tamponu eklenerek dokular buz üzerinde mekanik homojenizatör ile homojenize edildi. Numuneler 12.000 rpm ve 4°C'de 30 dk santrifüj edilerek süpernatant daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi. Süpernatantta protein analizi gerçekleştirildikten sonra diğer analizler için saklandı.

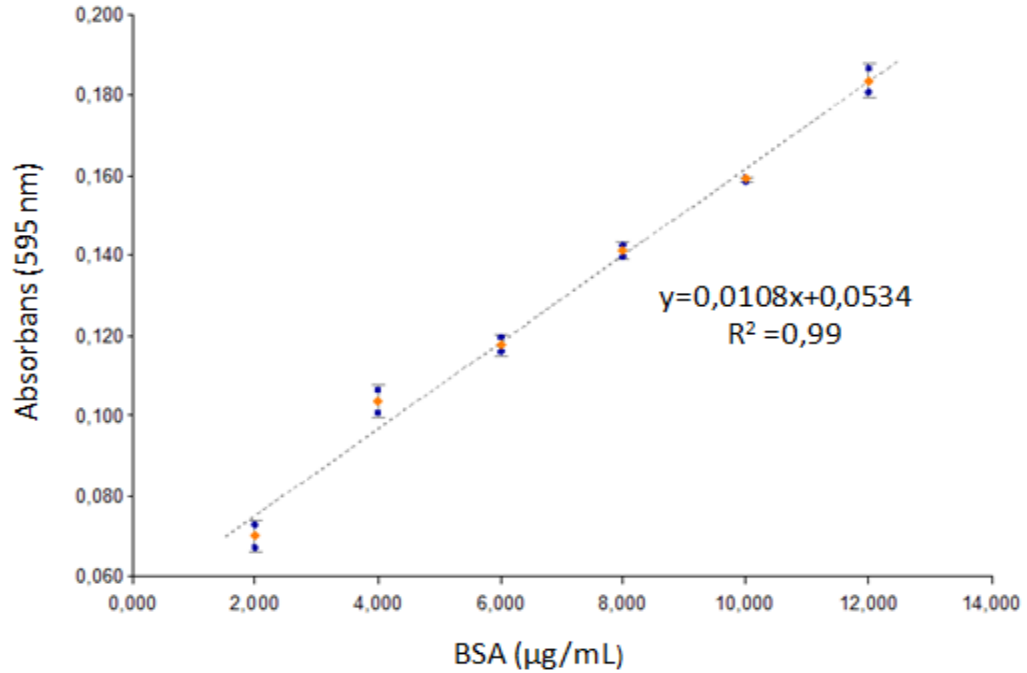
2.2.7. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini

Protein miktar tayini Bradford [133] yöntemine göre belirlendi. BSA'nın 0,2 mg/mL stok çözeltisinden 2-12 μ g/mL konsantrasyon aralığında standartlar hazırlandı. Protein içeriği tayin edilecek standart ve numuneler, Tablo 2.3'de gösterilen hacimlerde saf su ve Bradford reaktifi ile hazırlandı. Oda sıcaklığında 10 dakika beklendikten sonra, 595

nm'de absorbans değerleri ölçülerek çizilen BSA kalibrasyon grafiğine göre doku numunelerinin protein konsantrasyonları hesaplandı.

Tablo 2.3. BSA Standartları ve Protein Örneklerinin Hazırlanması

	0,2 mg/mL Stok BSA, µL	Su, µL	Bradford Reaktifi, µL
Kör	0	800	200
BSA Std1- 2 µg/mL	10	790	200
BSA Std2- 4 µg/mL	20	780	200
BSA Std3- 6 µg/mL	30	770	200
BSA Std4- 8 µg/mL	40	760	200
BSA Std5- 10 µg/mL	50	750	200
BSA Std6- 12 µg/mL	60	740	200
Protein Örneği	50	750	200



Şekil 2.4. BSA Standart Grafiği

2.2.8. SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi

2.2.8.1. Kimyasallar ve Çözeltiler

PBS tamponu

- 1,45 M NaCl
- 75 mM Na₂HPO₄.12 H₂O
- 25 mM NaH₂PO₄.12 H₂O

Lizis tamponu (NP-40 Buffer)

- 150 mM NaCl
- %1.0 NP-40
- 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
- 1µg/mL Aprotinin (Proteaz inhibitörü)

Yükleme tamponu

- Laemmli 4X Buffer
- %2 β-merkapto etanol

Koşurma tamponu (Tris/Glisin/SDS)

- 25 Mm Tris base
- 190 mM Glisin
- %0.1 SDS

pH 8.3'e ayarlandı.

Yıkama solüsyonu (TBST buffer)

- 20 Mm Tris, pH 7.5

- 150 mM NaCl
- %0.1 Tween 20

Transfer tamponu

- 25 mM Tris base
- 190 mM Glisin
- % 20 Metanol

pH 8.3'e ayarlandı.

Bantları temizleme tamponu (Stripping Buffer)

- 20 mL %10 SDS
- 12.5 mL 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
- 67.5 mL ultra saf su
- 0.8 mL β -merkapto etanol

Bloklama tamponu

- %5'lik süt tozu

TBST tamponu eklenip filtre edilerek kullanıldı.

2.2.8.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

E-kaderin, β -katenin ve sirtuin proteinlerinin ekspresyon düzeylerini belirlemek için hayvanların karaciğer, kolon ve böbrek dokuları SDS-PAGE ile jelde yürütüldü. Proteinleri ayırmak için kullanılan jeller aşağıdaki gibi hazırlanmıştır [134].

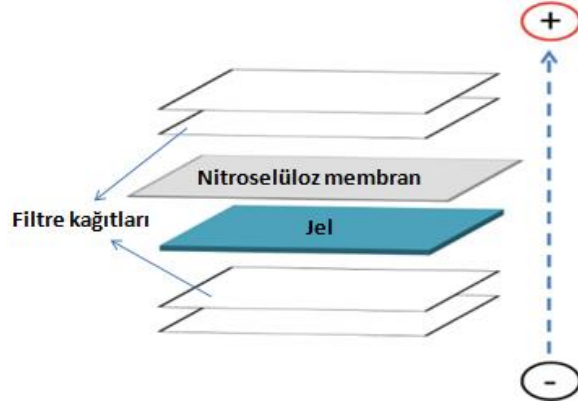
Tablo 2.4. SDS-PAGE Hazırlamak İçin Gerekli Bileşenler ve Oranları

Ayırma jeli			Yığıma jeli	
	%8	%12		%4.5
% 30 Akrilamid/Bis	1.3 mL	2.0 mL	% 30 Akrilamid/Bis	330 µL
1,5 M Tris HCl [pH 8.8]	1.3 mL	1.3 mL	1,5 M Tris HCl [pH6.8]	250 µL
dH ₂ O	2.3 mL	1.6 mL	dH ₂ O	1.4 mL
% 10 SDS	50 µL	50 µL	% 10 SDS	20 µL
% 10 APS	50 µL	50 µL	% 10 APS	20 µL
TEMED	3 µL	2 µL	TEMED	2 µL

SDS-PAGE analizi, Laemmli'nin metoduna göre [134] Mini-Protean 4 gel system kullanılarak gerçekleştirildi. Protein örnekleri (60µg) kuyucuklara yerleştirilmeden önce 4x yükleme boyası ile karıştırıldı. Örnekler 5 dakika 100°C'de kaynatıldıktan sonra SDS-PAGE'de 10 dakika 90 volt ve ardından 1.5 saat 100 voltta koşuruldu. Örneklerin moleküler ağırlıklarını belirlemek için renkli protein marker (180- 10 kDa) kullanıldı.

2.2.8.3. Western Blotlama ile Proteinlerin Analizi

Western blotlama jel elektroforezi ile ayrılmış olan proteinlerin görüntülenmesini sağlamak için kullanılan bir yöntemdir. Western blotlama Mini-Protean 3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Elektroforez işleminin ardından proteinlerin jelden nitroselüloz membrana transfer etme aşamasına geçildi. Jel büyüklüğünde kesilen nitroselüloz membran, filtre kağıtları ile birlikte transfer tamponu içerisinde bekletildi. Western blota özgü kasetin kapağı açılarak Şekil 2.5'de görüldüğü şekilde filtre kağıtları ve jel yerleştirildi. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek jelin üzerine nitroselüloz membran ve tekrar bir filtre kağıdı yerleştirildi. Kasetin kapağı kapatılarak elektroforez tankına yerleştirildi.



Şekil 2.5. Jel, Nitroselüloz Membran ve Filtre Kağıtlarının Kasete Yerleştirilmesi

Tanka buz ünitesi yerleştirildikten sonra transfer tamponu dolduruldu ve güç kaynağına bağlanarak 150 mA'de 2-3 saat akım verildi. Blotlama sonrası membran, TBST'de 5 dakika yıkandıktan sonra TBST'de hazırlanan %5'lik süt tozu içerisinde oda sıcaklığında çalkalanarak 1 saat bloklama işlemi yapıldı.

Nitroselüloz membran 1/500 oranında %1'lik süt tozunda seyreltilmiş primer antikor içerisinde 4°C'de çalkalanarak bir gece bekletildi ve ardından 15 dakika TBST ile en az 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra 1/2000 oranında %1'lik süt tozunda seyreltilmiş sekonder antikor ilave edildi ve 1.5 saat oda ısısında çalkalanarak bekletildi. Aynı şekilde 15 dakika TBST ile en az 3 kez yıkama yapıldı. Ardından nitroselüloz membran 1-Step Ultra TMB-Blotting solüsyonu ile kaplandıktan sonra karanlık ortamda 10-30 dakika arası bantlar belirinceye kadar bekletildi. Renk oluşuktan sonra membran dH₂O içerisine alınarak reaksiyon durduruldu. Bantların yoğunluğu Adobe Photoshop (Adobe Systems, Inc.) programı yardımıyla belirlendi.

2.2.9. İmmunohistokimyasal Analizler

2.2.9.1. Kimyasallar ve Çözeltiler

BSA'nın hazırlanışı

- %0.1'lik BSA, PBS tamponunda çözülüp filtre edilerek kullanıldı.

3,3'-Diaminobenzidin (DAB) peroksidaz substrat çözeltisinin hazırlanması

- 1 damla (~42 µL) Buffer stok çözeltisi
- 2 damla (~50 µL) DAB stok çözeltisi
- 1 damla (~40 µL) Hidrojen peroksit çözeltisi

2.5 mL distile suya eklenip karıştırılarak hazırlandı.

Dokularda SIRT2 ve SIRT3 immünohistokimyasal analizi için Vectastain abc kiti kullanıldı.

2.2.9.2. Deneyin Yapılışı

Etiketlenerek bloklanmış dokulardan mikrotomda 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Sıcak su banyosunda (40°C) alınan kesitler poli-L-lizinli lamlar üzerine alınıp numaralandırılarak 30 dakika 58°C'lik etüve konuldu. Lam üzerindeki kesitler, parafinden arındırılmaları amacıyla, 10'ar dakika iki kez ksilen solüsyonuna alındı. İmmunohistokimyasal boyamaya hazırlamak için rehidratasyon işlemine başlandı. Kesitler rehidratasyon işlemi için 5'er dakika sırasıyla azalan oranlardaki alkol solüsyonuna alındı. Uygulanacak solüsyonların lamdan akmasını önlemek ve hidrofobik bir bariyer sağlamak amacıyla lam üzerinde kesitlerin etrafına PAP Pen ile daireler çizildi ve suda 5 dakika bekletildikten sonra %3'lük H₂O₂ içerisinde 30 dakika inkübe edildi.

Fosfat tamponunda 5'er dakika 3 kez yıkandıktan sonra bloklama işlemine geçildi. Spesifik olmayan fon boyanmasını engellemek için kesitler %0.1 BSA'da da hazırlanan

normal serum ile 1 saat inkübe edildi. Ardından %0.1 BSA'da hazırlanan 1/200 dilüsyon oranındaki SIRT2 ve SIRT3 primer antikorları ile kesitler gece aşırı +4°C'de inkübe edildi. Negatif kontrol için ayrılmış kesitler primer antikor yerine non-immün tavşan serumuyla inkübe edildi. Kesitler inkübasyonun ardından PBS'de 5 dakika yıkandıktan sonra dilüe biotinlenmiş sekonder antikor ile 45 dakika bekletildi. Tekrar PBS'de 5 dakika yıkandıktan sonra üretici talimatlarına göre hazırlanan Vectastain abc reagent A (Avidin DH) ve B (Biotinlenmiş horseradish peroksidaz H) ile 45 dakika bekletildi. PBS'de 5 dakika yıkandıktan sonra kesitler DAB peroksidaz substrat solüsyonu ile yaklaşık 5 dakika boyanma yoğunluğu kontrol edilerek bekletildi. PBS'de 3 kez yıkandıktan sonra kesitler hemotoksilen solüsyonu ile 1-5 dakika zıt boyama yapıldı. Su ile yıkandıktan sonra sırasıyla artan oranlarda alkol solüsyonu ve en son iki kez ksilen solüsyonuna alındı. Bütün immünohistokimyasal aşamalar nemli bir ortamda ve oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Değerlendirme ve fotoğraflama işlemleri kameralı dijital mikroskop ile gerçekleştirildi (Şekil 2.6). Tüm kesitler x100'lük büyütme ile incelendi.



Şekil 2.6. İmmünohistokimyasal Ölçümlerde Kullanılan Dijital Mikroskop

2.2.10. Plazma 8-hidroksi-2-deoksiguanozin Analizi

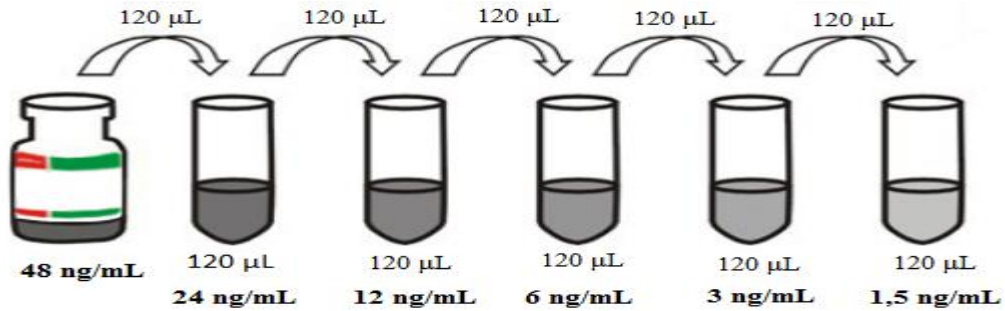
DNA hasarını tespiti için 8-OH-2-deoksiguanozin analizi hayvanlardan alınan plazma numunelerinde enzim bağılı immünosorbent analizi (ELISA) ile ticari kit kullanılarak spektrofotometrede gerçekleştirildi.

2.2.10.1. Deneyin Prensibi

Fare plazma 8-OHdG düzeyini analiz etmek için çift antikorlu ELISA yöntemi kullanıldı. Daha önceden fare 8-OHdG monoklonal antikoruna ile kaplanmış olan playte numuneler ve standartlar eklenir. İnkübasyondan sonra 8-OHdG antikorları biotin ile işaretlenerek ve streptavidin-HRP ile birleşerek immün kompleks oluşturur. İnkübasyonun ardından birleşmeyen enzimi uzaklaştırmak için yıkama işlemi gerçekleştirilir. Ortama eklenen kromojen A ve B ile sıvının rengi maviye, asit eklenmesi ile sarıya dönüşerek reaksiyon durdurulur. Renk yoğunluğu ve fare plazma numunelerin 8-OHdG düzeyi arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır.

2.2.10.2. Deneyin Yapılışı

Deneyde stok standart (48 ng/mL), standart dilüsyonu için buffer, streptavidin-HRP konjugat solüsyonu, biotin-8-OHdG antikoruna, kromojen A ve B, stop ve yıkama solüsyonları kullanıldı.



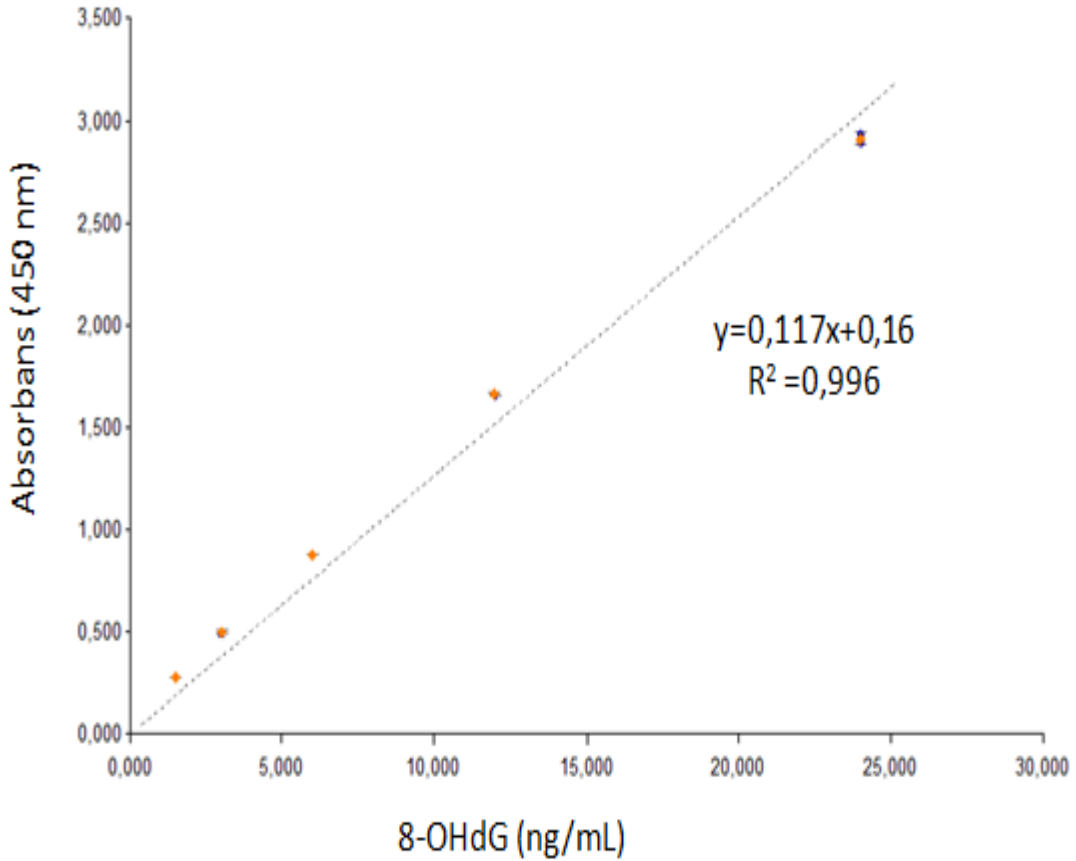
Şekil 2.7. Standartların Hazırlanması

Kör: Su (Sadece kromojen A, B ve stop solüsyonu eklendi).

Standartlar: 48 ng/mL stok standarttan 1.5, 3, 6, 12 ve 24 ng/mL konsantrasyonda standartlar hazırlandı. Kuyucuklara 50 µL standart ve 50 µL streptavidin-HRP eklendi.

Numuneler: Her kuyucuğa 40 µL numune, 10 µL 8-OHdG antibody ve 50 µL streptavidin-HRP eklendi.

Plate hafif çalkalanarak 37°C’de 1 saat inkübe edildikten sonra yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Ardından 50 µL kromojen A ve 50 µL kromojen B solüsyonları eklenerek çalkalandıktan sonra karanlık ortamda 37°C’de 10 dakika inkübe edildi. Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklendikten sonra (mavi → sarı) 15 dakika içinde 450 nm’de köre karşı okunup standart-curve grafiği çizilerek konsantrasyonları hesaplandı.



Şekil 2.8. 8-hidroksi-2-deoksiguanozin Standart Grafiği

2.2.11. Redükte Glutasyon Analizi

2.2.11.1. Deneyin Prensibi

Glutasyon (GSH) analizi Beutler metoduna (1963) göre gerçekleştirildi. Lizis tamponunda homojenize edilmiş olan karaciğer böbrek ve kolon dokularında sülfidril (-SH) taşımayan tüm proteinler çöktürüldü. Elde edilen berrak sıvıda -SH gruplarının 5,5'-(2-ditiobis nitrobenzoik asit (DTNB) ile oluşturduğu sarı renkli kompleksin absorbanı 412 nm'de okundu.

2.2.11.2. Çözeltiler ve Deneyin Yapılışı

Çöktürücü Çözelti: 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl bir miktar distile suda çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Fosfat Çözeltisi (0,3 M Na₂HPO₄): 53,4 g Na₂HPO₄.2H₂O distile suda çözülerek, hacim 1L'ye tamamlandı.

DTNB (Ellman's çözeltisi): 40 mg DTNB alınarak ve %1'lik sodyum sitrat ile hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Standart GSH Çözeltisi: 40 mg GSH distile suda çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Kör, standart ve numune olarak işaretlenen deney tüplerinden numune tüpüne, dokulardan 200 µL, standart tüpü ise standart çözeltiden 200 µL alındı. Üzerine 1,8 mL distile su ve 3 mL çöktürücü çözelti eklendi. Kör olarak işaretlenen tüpe 800 µL distile su üzerine 1,2 mL çöktürücü çözelti eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra buzlu suda 5 dakika bekletilip, 3000 rpm ve +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Kör tüpü ise aynen alındı. Standart ve numune olarak işaretlenen yeni tüplere 2 mL süpernatant ve 8 mL fosfat çözeltisi eklenerek karıştırıldı. 1 mL DTNB eklendikten sonra 412 nm'de köre karşı standart ve testin optik dansitesi okundu.

Tablo 2.5. Redükte Glutatyon Analizi

	Kör	Standart	Numune
Doku			200 µL
Standart		200 µL	
Distile su	800 µL	1,8 mL	1,8 mL
Çöktürücü çözelti	1,2 mL	3 mL	3 mL
<i>Buzlu suda 5 dakika bekletildikten sonra 3000 rpm ve +4°C'de 10 dakika santrifüj edilir. Yeni tüplere 2 mL süpernatant alındı.</i>			
Fosfat çözeltisi	8 mL	8 mL	8 mL
DTNB	1 mL	1 mL	1 mL
<i>412 nm 'de köre karşı absorbanlar okundu.</i>			

Sonuçların hesaplanması:

Dokuların redükte GSH konsantrasyonu mg/dL olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$GSH (mg/dL) = (Testin\ Optik\ Dansitesi / Standartın\ Optik\ Dansitesi) \times Standartın\ derişimi (40\ mg/dL).$

Bradford metoduna göre protein tayini gerçekleştirildikten sonra dokulardaki redükte GSH düzeyi nmol/mg protein olarak ifade edildi.

2.2.12. Total Oksidan Kapasite Analizi

Karaciğer, böbrek ve doku total oksidan kapasite düzeyi ticari kit kullanılarak spektrofotometrede ölçüldü.

2.2.12.1. Deneyin Prensibi

Numunede bulunan oksidan maddelerin, o-dianisidin dihidroklorürle renkli kompleks oluşturması temeline dayanan metotta standart olarak hidrojen peroksit kullanıldı.

2.2.12.2. Reaktif ve Standartlar

Ayraç 1: Test tamponu

Ayraç 2: Prokromojen solüsyonu

Standart 1: Kör (deiyonize su)

Standart 2: Stabilize edilmiş standart stok solüsyonu (SSSS) (800 µmol H₂O₂ Equiv./L).

Analize başlamadan SSSS'den 20 µmol H₂O₂ standart solüsyonu hazırlandı.

Tablo 2.6. Total Oksidan Kapasite Analizi

	Standart 1	Standart 2	Test
Ayraç 1	500 µL	500 µL	500 µL
Standart	75 µL	75 µL	-
Numune	-	-	75 µL
<i>530 nm'de ilk okuma</i>			
Ayraç 2	25 µL	25 µL	25 µL
<i>37 °C'de 5 dakika inkübasyon</i>			
<i>530 nm'de ikinci okuma</i>			

Sonuçların Hesaplanması:

Sonuç =[(ΔAbsorbans Örnek) / (ΔAbs Std2)] x 20 (Std 2 değeri)

ΔAbs Örnek = Örneğin ikinci absorbansı – Örneğin ilk absorbansı

ΔAbs Std2 = Standart 2'nin ikinci absorbansı – Standart 2'nin ilk absorbansı

Std 2 değeri = 20 µmol H₂O₂ Equiv./L

Doku TOK konsantrasyonları µmol H₂O₂ Eqv./L olarak hesaplandı. Bradford metoduna göre dokularda protein analizi gerçekleştirildikten sonra doku TOK düzeyi µmol H₂O₂ Eqv./mg protein olarak ifade edildi.

2.2.13. Total Antioksidan Kapasite Analizi

Karaciğer, böbrek ve doku total antioksidan kapasite düzeyi ticari kit kullanılarak spektrofotometrede ölçüldü.

2.2.13.1. Deneyin Prensibi

Numunelerde bulunan antioksidan maddelerin mavi-yeşil renkteki 2,2'-Azino-bis(3- etilbenzoitazolin-6-sülfonat (ABTS) radikali ile reaksiyona girerek bileşiğin renginde azalmaya ya da rengin kaybolmasına neden olması prensibine dayanan metotta standart olarak E vitamini analogu olan trolox kullanıldı.

2.2.13.2. Reaktif ve Standartlar

Ayraç 1: Test tamponu

Ayraç 2: Renklendirilmiş ABTS radikal çözeltisi

Standart 1: 0,0 mmol Trolox Equiv./L çözeltisi

Standart 2: 1,0 mmol Trolox Equiv./L çözeltisi

Tablo 2.7. Total Antioksidan Kapasite Analizi

	Standart 1	Standart 2	Test
Ayraç 1	175 µL	175 µL	175 µL
Standart	10 µL	10 µL	-
Numune	-	-	10 µL
<i>660 nm'de ilk okuma</i>			
Ayraç 2	25 µL	25 µL	25 µL
<i>37 °C'de 5 dakika inkübasyon</i>			
<i>660 nm'de ikinci okuma</i>			

Sonuçların Hesaplanması:

$$\text{Sonuç} = [(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Örnek})] / [(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Std2})]$$

$\Delta\text{Abs Std1}$ = Standart 1'in ikinci absorbansı – Standart 1'in ilk absorbansı

$\Delta\text{Abs Std2}$ = Standart 2'in ikinci absorbansı – Standart 2'in ilk absorbansı

Δ Numunenin absorbansı = Numunenin ikinci absorbansı – Numunenin ilk absorbansı

Doku TAK konsantrasyonu $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ olarak hesaplandı. Bradford metoduna göre dokularda protein analizi gerçekleştirildikten sonra doku TAK düzeyi $\text{mmol Trolox Eqv./mg protein}$ olarak ifade edildi.

2.2.14. Oksidatif Stres İndeksinin Belirlenmesi

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

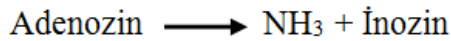
$$\text{OSİ} = \frac{\text{TOK } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eqv./L})}{\text{TAK } (\mu\text{mol Trolox Eqv./L})} \times 100$$

2.2.15. Plazma Adenozin Deaminaz Aktivitesi Analizi

2.2.15.1. Deneyin Prensibi

Plazmada ADA aktivitesi Giusti ve Galanti'nin metoduna göre [135] gerçekleştirildi. Substrat olarak kullanılan adenozin, numune ile 1 saat 37°C 'de inkübe edilerek oluşan amonyak, alkali ortamda sodyum hipoklorit ve fenol varlığında mavi indofenol oluşturur. Sodyum nitroprussid'in katalizör etki gösterdiği bu deneyde, amonyak derişimi indofenolün absorbansıyla doğru orantılıdır. ADA aktivitesinin bir birimi dakikada adenozinden $1\mu\text{mol}$ amonyak açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı. Grupların ADA aktiviteleri U/L olarak ifade edildi.

Deney prensibi aşağıdaki reaksiyonlar ile özetlenebilir.



2.2.15.2. Çözeltiler ve Deneyin Yapılışı

Fosfat tamponu (50 mmol/L, pH:6.5): 5,34 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 5,62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ distile suda çözüldükten sonra pH 6,5'e ayarlanarak hacmi 1L'ye tamamlandı.

Adenozin çözeltisi (adenozin 21 mmol/L, fosfat 50 mmol/L, pH:6.5): 280 mg adenozin üzerine yaklaşık 30 mL fosfat tamponu ilave edildikten sonra pH 6,5'e ayarlanarak fosfat tamponu ile hacim 50 mL'ye tamamlandı.

Amonyum sülfat stok çözeltisi (15 mmol/L): 1,982 g amonyum sülfat distile suda çözülerek hacmi 1L'ye tamamlandı.

Amonyum sülfat standart çözeltisi (75 $\mu\text{mol/L}$ NH_3): 0,5 mL amonyum sülfat stok çözeltisi fosfat tamponu ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Fenol nitroprussid çözeltisi (fenol 106 mmol/L, nitroprussid 0,17 mmol/L): 10 g fenol ve 50 mg sodyum nitroprussid 500 mL distile suda çözülerek hacim 1L'ye tamamlandı.

Reaktif körü, standart, numune ve numune körü olmak üzere 4 adet kapaklı deney tüpü alındı. Reaktif körü tüpüne 1 mL fosfat tamponu ve 50 μL distile su, standart tüpüne 1 mL amonyum sülfat ve 50 μL distile su, numune tüpüne 1 mL adenozin çözeltisi ve 50 μL numune, numune körü tüpüne ise 1 ml adenozin çözeltisi eklendi. Tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra 37°C'de inkübatörde 1 saat inkübe edildi. Bütün tüplere 3 mL fenol/nitroprussid çözeltisinden ilave edildi. Numune körü tüpüne 0,05 mL numune eklendikten sonra bütün tüplere 3 mL alkali hipoklorid çözeltisinden ilave edilerek tekrar tüplerin ağzı kapatıldı ve 37°C'de inkübatörde 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından su körüne karşı tüplerin absorbansları 625 nm'de okundu.

Tablo.2.8. Plazma Adenozin Deaminaz Aktivitesi Tayini

	Reaktif körü	Standart	Numune körü	Numune
Fosfat tamponu	1 mL	-	-	-
Adenozin	-	-	1 mL	1 mL
Amonyum sülfat	-	1 mL	-	-
Plazma	-	-	-	50 µL
Distile su	50 µL	50 µL	-	-
<i>Tüplerin ağzı dikkatli şekilde kapatılıp karıştırıldıktan sonra 37°C'de 1 saat inkübe edildi.</i>				
Fenol/nitroprussid	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL
Plazma	-	-	50 µL	-
Alkali hipoklorid	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL
<i>37°C'de 30 dakika inkübasyondan sonra 625 nm'de absorbanslar okundu.</i>				

Sonuçların hesaplanması:

$$ADA (U/L) = (A/B) \times 50 = \mu\text{mol/dakika/L}$$

A: Numunenin absorbansı – numune körünün absorbansı

B: Standardın absorbansı – reaktif körünün absorbansı

50: Molar ekstinksiyon katsayısı

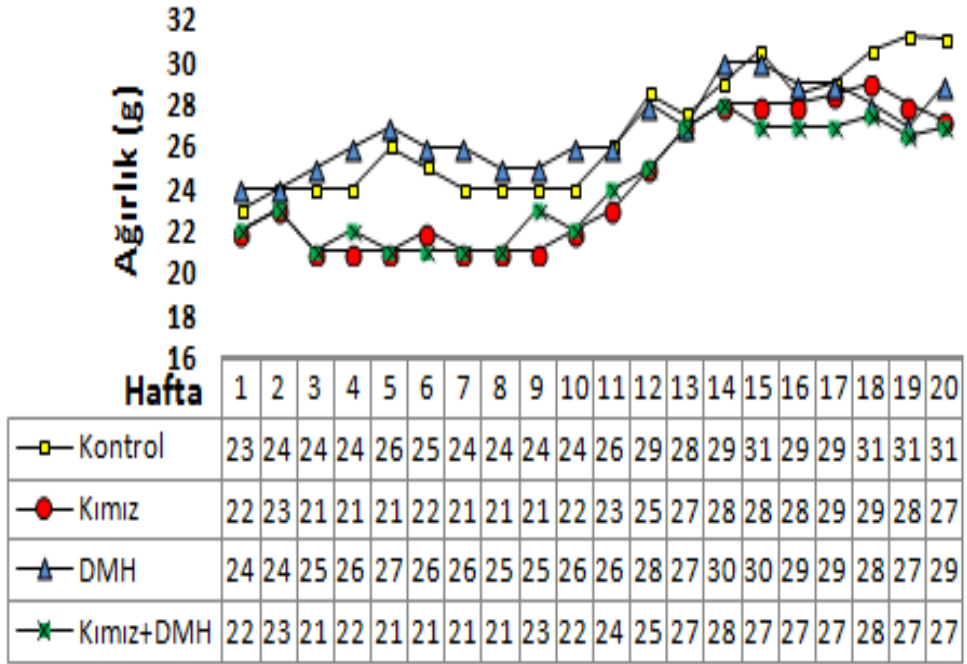
2.2.16. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS Windows 16.0 paket programı kullanılarak yapıldı (SPSS Inc.). Gruplar arasındaki ortalama değerler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve gruplar arası farklılıklar Duncan testi ile belirlendi. Sonuçlar, ortalama (\pm) ve standart hata ($x \pm S_x$) olarak ifade edildi.

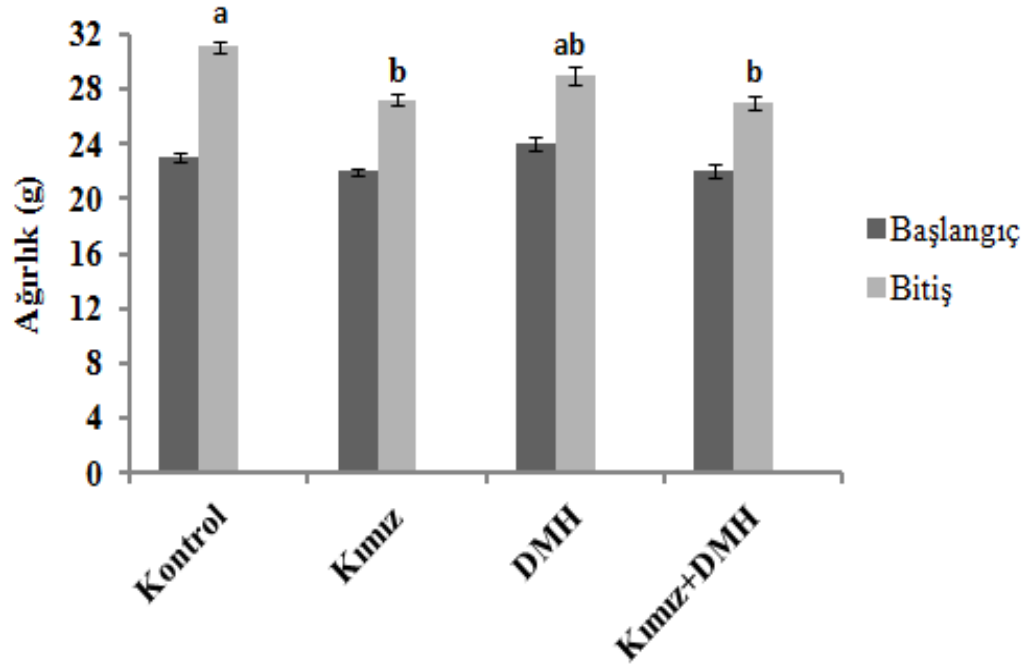
3. BULGULAR

3.1. Canlı Ağırlık Değişimi

Gruplardaki bitiş canlı ağırlıkları incelendiğinde, kırmız ve kırmız+DMH grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında canlı ağırlıkların istatistiksel olarak önemli şekilde azaldığı ($P<0.05$) görülmüştür. DMH grubunun bitiş canlı ağırlıklarında diğer gruplar ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır. 1,2-dimetil hidrazin verilen farelerde kırmızın canlı ağırlık üzerine etkisi Şekil 3.1 ve 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Canlı Ağırlık Değişimleri



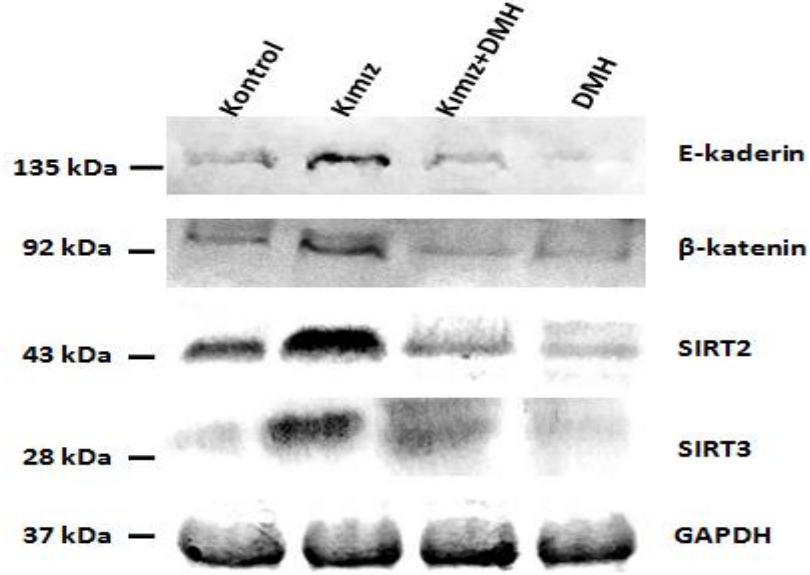
Şekil 3.2. Başlangıç ve Bitiş Canlı Ağırlıkları

a-b: Farklı harf taşıyan gruplar arası fark istatistiksek olarak önemlidir ($P < 0.05$).

3.2. Western Blot Analiz Bulguları

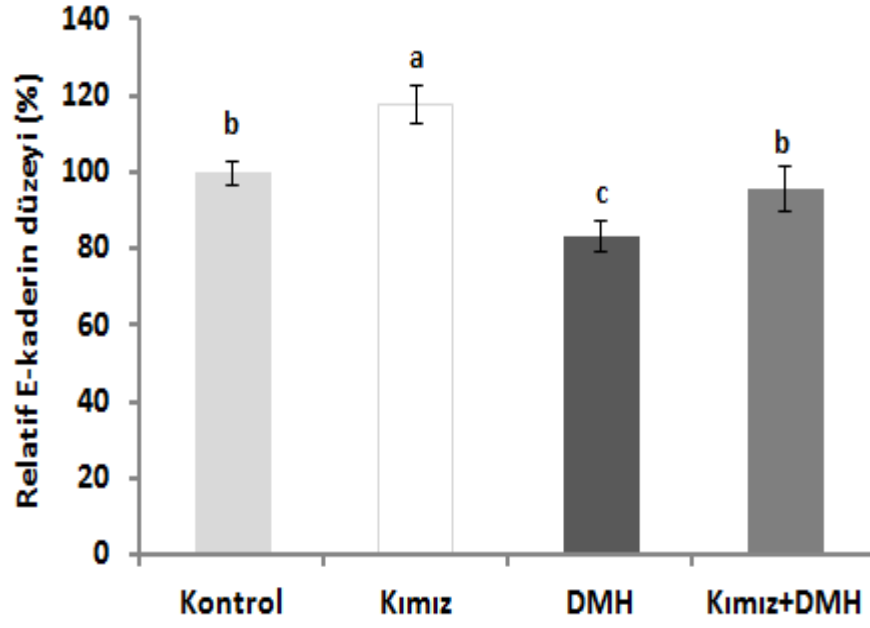
Western blot yöntemiyle düzeyleri belirlenen E-kaderin, β -katenin, SIRT2, SIRT3 ve GAPDH proteinlerinin karaciğer, kolon ve böbrek dokularındaki bant değişimleri (Şekil 3.3) ve karaciğer, kolon ve böbrek dokuları ekspresyon düzeyleri sırasıyla Şekil 3.4, 3.5, 3.6 ve 3.7'de gösterilmiştir. Proteinlerin ekspresyonları GAPDH ekspresyonuna göre standardize edilmiş ve kontrole göre relatif yüzde değerleri hesaplanmıştır.

3.2.1. Karaciğer E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 Protein Ekspresyon Düzeyleri



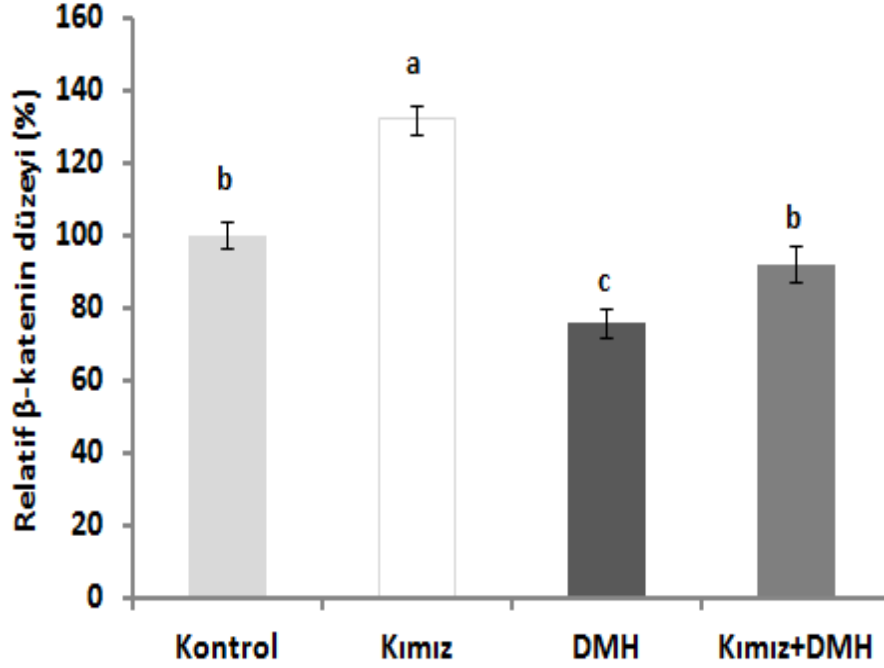
Şekil 3.3. Proteinlerin Karaciğer Dokularındaki Bant Yoğunlukları

Şekil 3.4, 3.5 ve 3.6'de, kımız verilen grupta karaciğer E-kaderin, β -katenin ve SIRT2 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli şekilde artarken, DMH verilen grupta önemli şekilde azalmıştır. DMH ile birlikte kımız verilen gruptaki bu proteinlerin ekspresyon düzeyleri, sadece DMH verilen grup ile karşılaştırıldığında önemli şekilde artarak istatistiksel olarak kontrole benzemiştir ($P < 0.05$). Şekil 3.7'de SIRT3 protein ekspresyon düzeyi kımız grubunda kontrol ve DMH grupları ile kıyaslandığında önemli şekilde artarken, farklı şekilde kontrol ve DMH grubu ile kımız ve kımız+DMH grupları arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır.



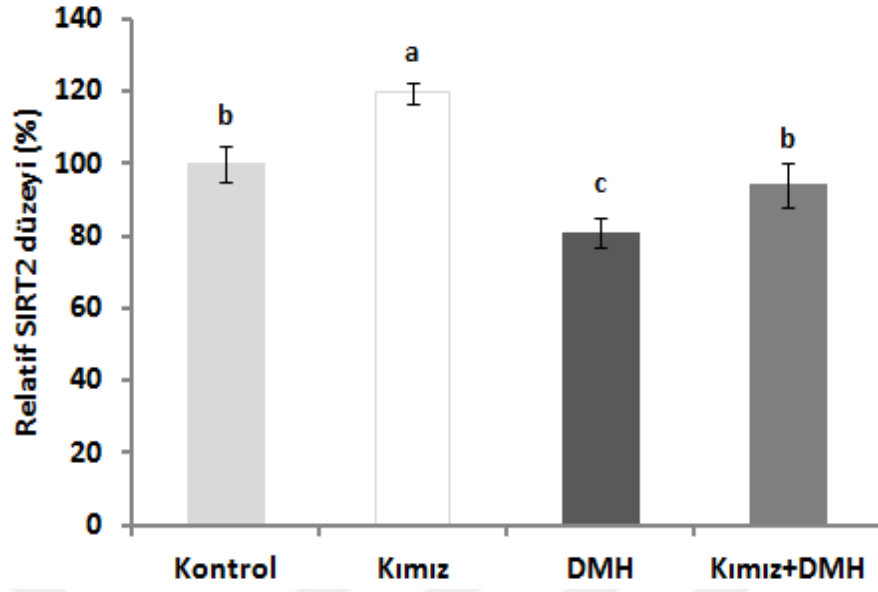
Şekil 3.4. E-kaderin Protein Ekspresyon Düzeyleri

a-b-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.05$).



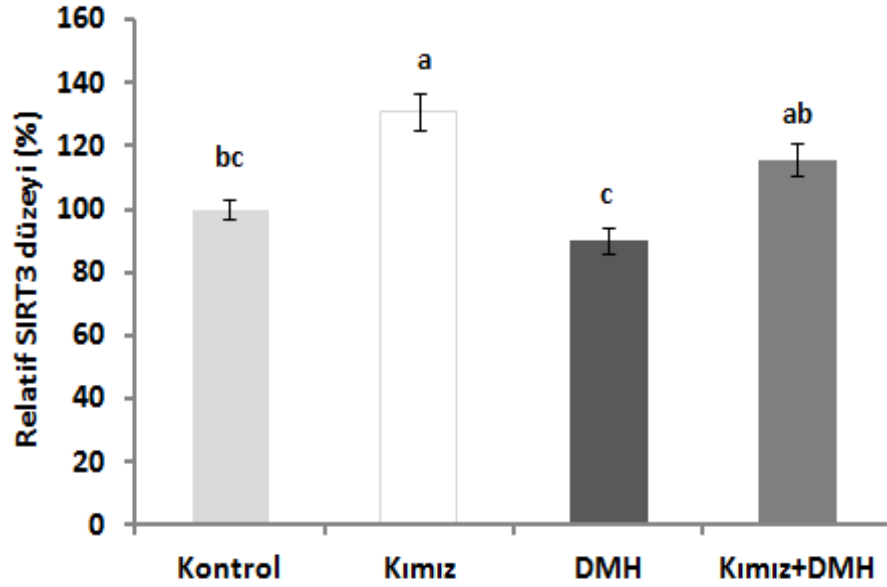
Şekil 3.5. β -katenin Protein Ekspresyon Düzeyleri

a-b-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.05$).



Şekil 3.6. SIRT2 Protein Ekspresyon Düzeyleri

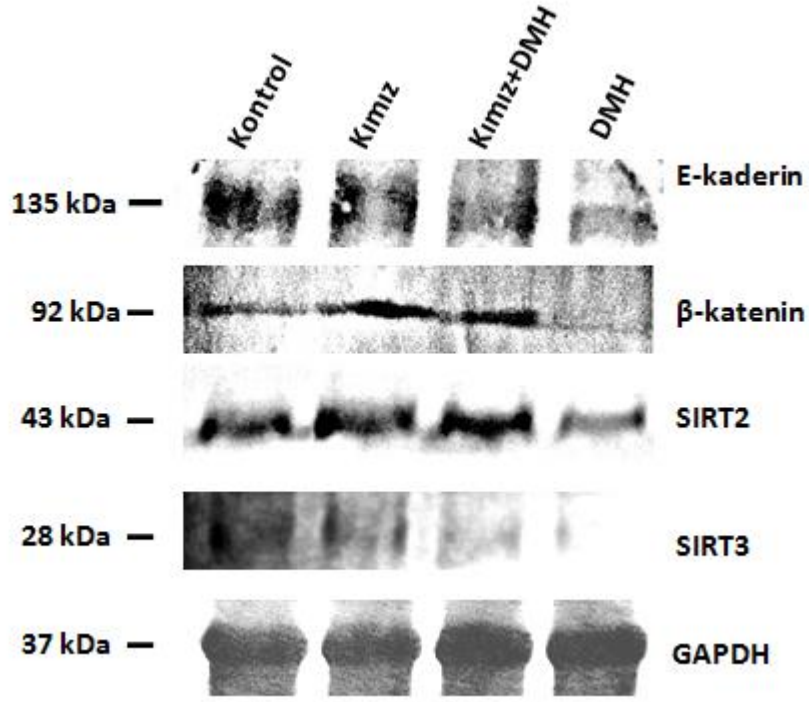
a-b-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.05$).



Şekil 3.7. SIRT3 Protein Ekspresyon Düzeyleri

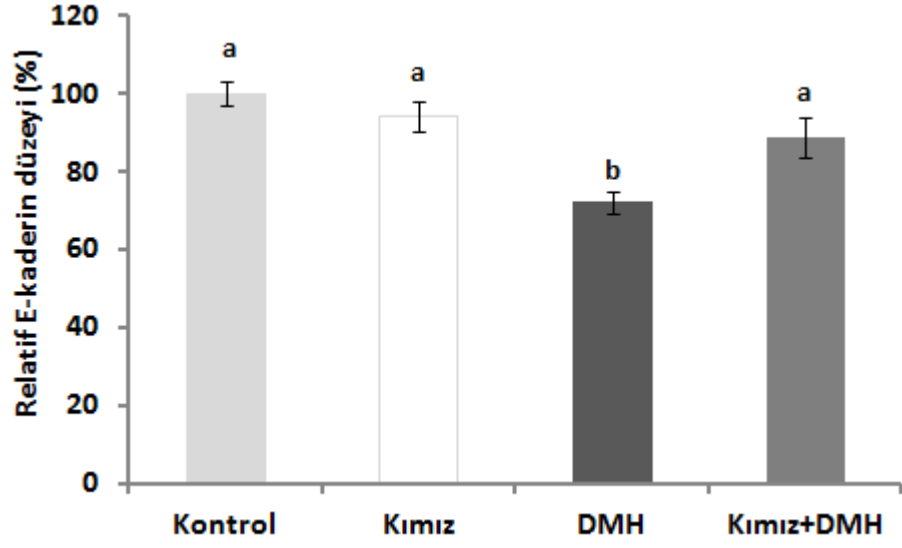
a-b-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.05$).

3.2.2. Kolon E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 Protein Ekspresyon Düzeyleri



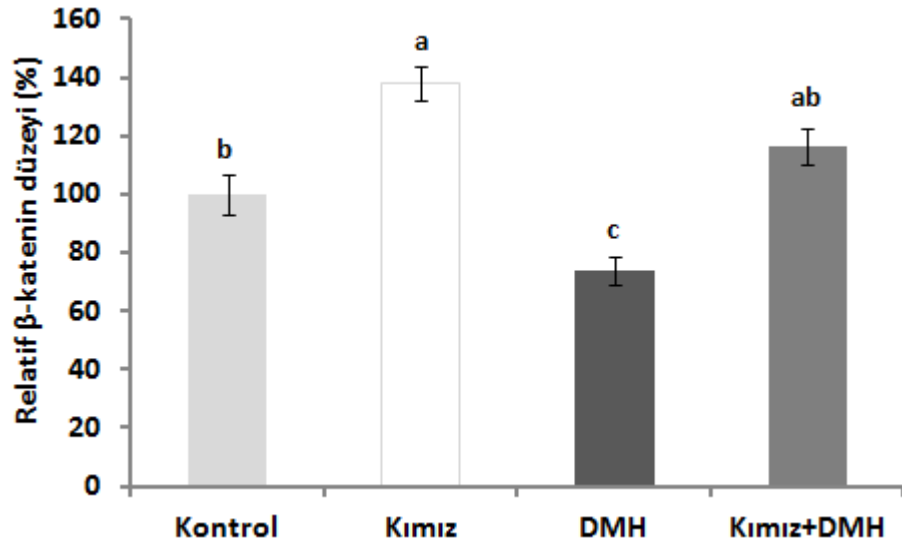
Şekil 3.8. Proteinlerin Kolon Dokularındaki Bant Yoğunlukları

Şekil 3.9, 3.10, 3.11 ve 3.12’de, DMH grubu kolon E-kaderin, β -katenin ve SIRT2 ve SIRT3 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli düşük bulunmuştur ($P < 0.05$). Şekil 3.9’da kontrol, kırmız ve kırmız+DMH gruplarında E-kaderin protein ekspresyonları açısından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Kırmız grubu β -katenin protein ekspresyon düzeyi kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli şekilde yüksek bulunurken, kırmız+DMH grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir fark elde edilememiştir. Önemli şekilde, kırmız grubu SIRT2 ekspresyon düzeyi diğer tüm gruplardan önemli şekilde daha yüksek saptanmıştır. Aynı zamanda SIRT2 protein ekspresyon düzeyleri açısından kontrol ve kırmız+DMH grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. En yüksek SIRT3 protein ekspresyon düzeyi kontrol ve kırmız grubunda saptanırken, kırmız+DMH grubunda istatistiksel olarak önemli şekilde düşüş gözlemlenmiştir.



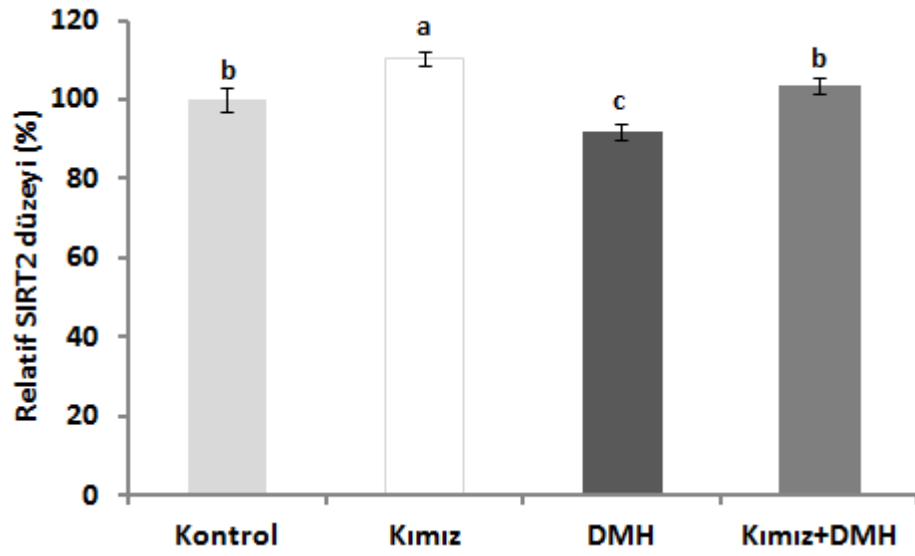
Şekil 3.9. E-kaderin Protein Ekspresyon Düzeyleri

a-b: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.05$).



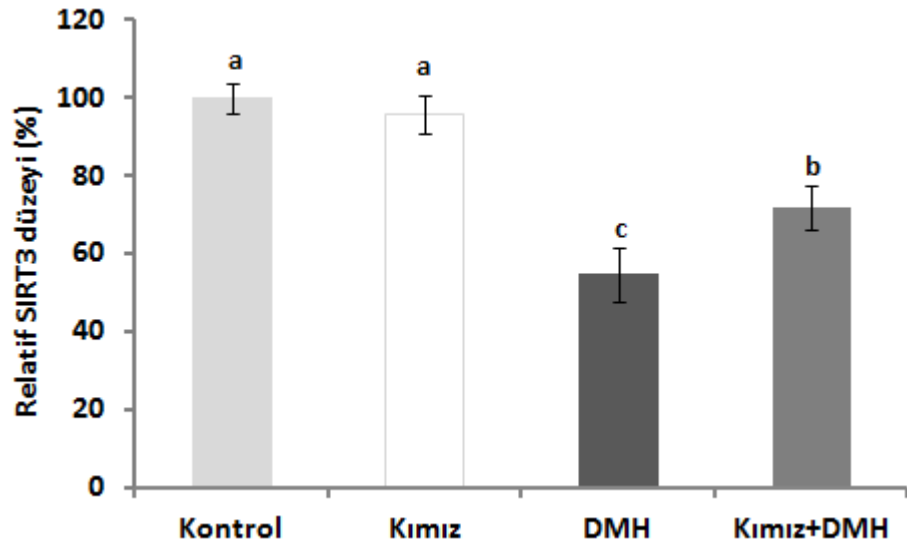
Şekil 3.10. β -katenin Protein Ekspresyon Düzeyleri

a-b-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.05$).



Şekil 3.11. SIRT2 Protein Ekspresyon Düzeyleri

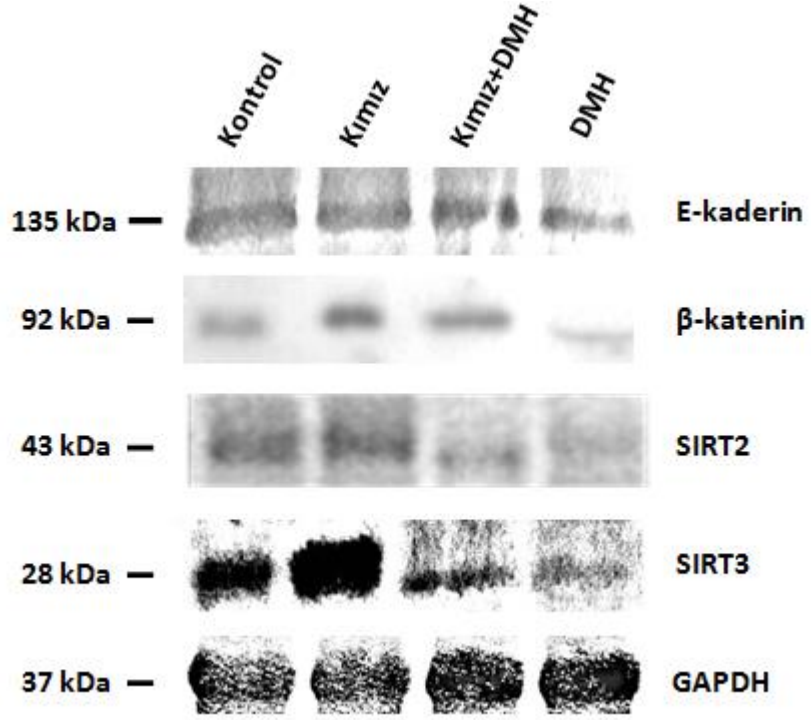
a-b-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.05$).



Şekil 3.12. SIRT3 Protein Ekspresyon Düzeyleri

a-b-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.05$).

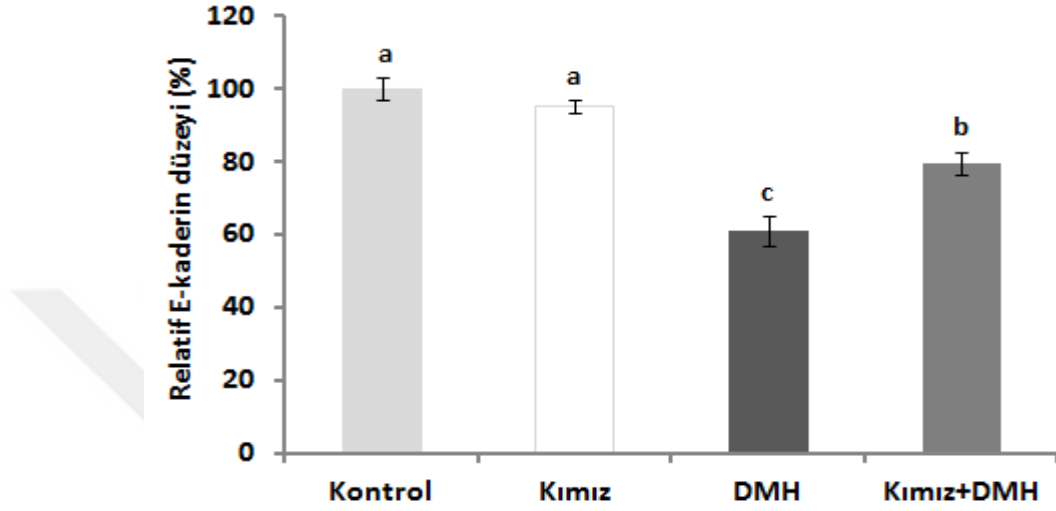
3.2.3. Böbrek E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 protein ekspresyon düzeyleri



Şekil 3.13. Proteinlerin Böbrek Dokularındaki Bant Yoğunlukları

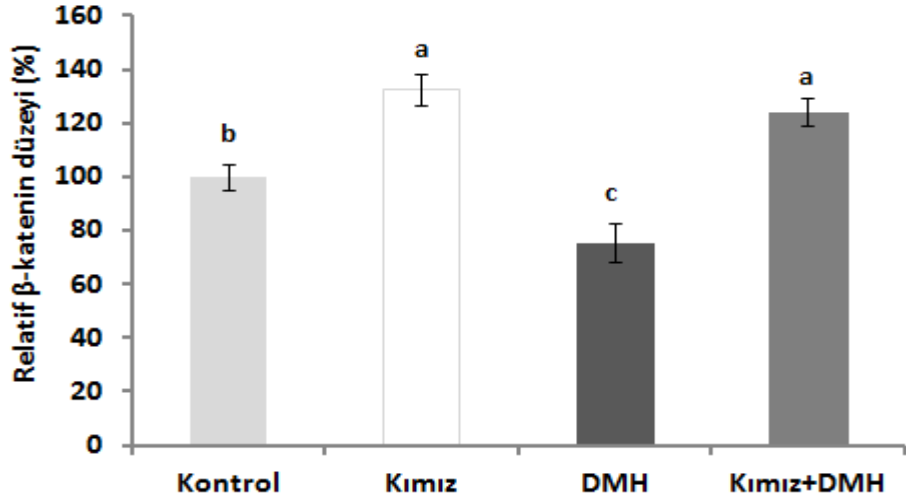
Şekil 3.14, 3.15 ve 3.17’de, DMH grubu kolon E-kaderin, β -katenin ve SIRT3 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak düşük bulunmuştur ($P<0.05$). Kontrol ve kıviz grubu E-kaderin protein ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamakla birlikte diğer gruplardan daha yüksek ekspresyon düzeyi gözlemlenmiştir. Kıviz+DMH grubu E-kaderin protein ekspresyon düzeyinin kontrol ve kıviz gruplarından daha düşük, DMH grubundan ise önemli şekilde daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Önemli şekilde, kıviz ve kıviz+DMH grupları β -katenin protein ekspresyon düzeyleri arasında bir fark saptanmamıştır. Kontrol grubu β -katenin protein ekspresyon düzeyinin, kıviz ve kıviz+DMH grupları ile kıyaslandığında önemli şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Kontrol ve kıviz grupları SIRT2 protein ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak bir fark saptanamamıştır. Kıviz+DMH grubu SIRT2 protein ekspresyon düzeyi,

DMH grubu ile kıyaslandığında artsa da bu artış istatistiksel olarak önemli değildir. Kırmızı+DMH ve DMH grupları SIRT3 protein ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır. Kontrol grubu SIRT3 protein ekspresyon düzeyinin, kırmızı grubu ile kıyaslandığında önemli şekilde azaldığı, kırmızı+DMH ve DMH grupları ile kıyaslandığında ise önemli şekilde arttığı kaydedilmiştir ($P<0.05$).



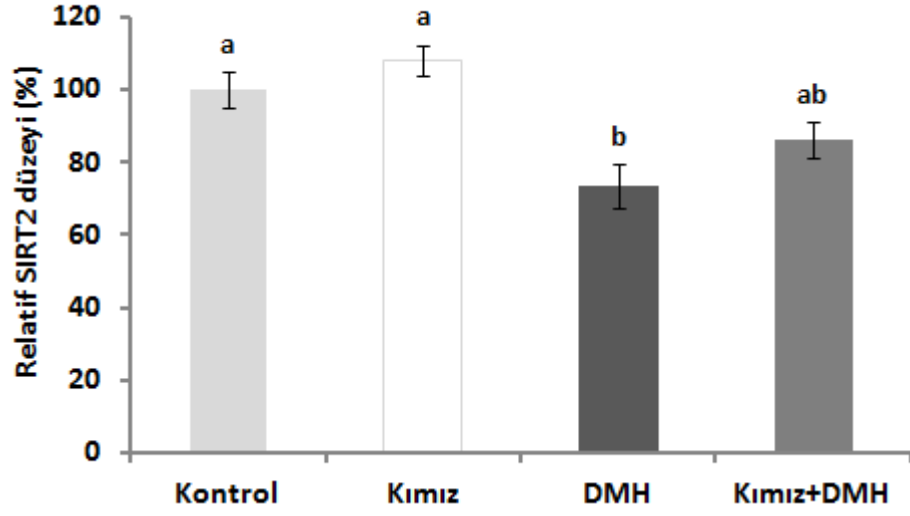
Şekil 3.14. E-kaderin Protein Ekspresyon Düzeyleri

a-b-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P<0.05$).



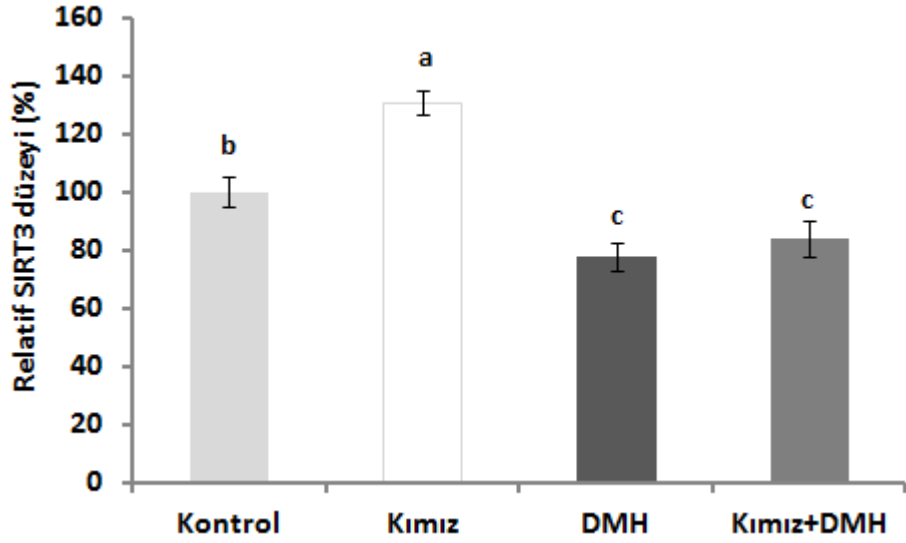
Şekil 3.15. beta-katenin Protein Ekspresyon Düzeyleri

a-b-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P<0.05$).



Şekil 3.16. SIRT2 Protein Ekspresyon Düzeyleri

a-b: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.05$).



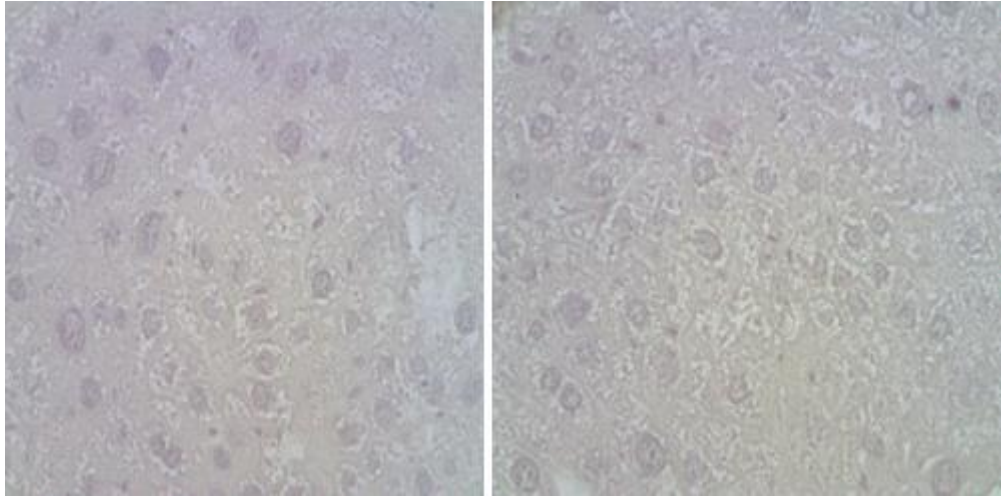
Şekil 3.17. SIRT2 Protein Ekspresyon Düzeyleri

a-b-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.05$).

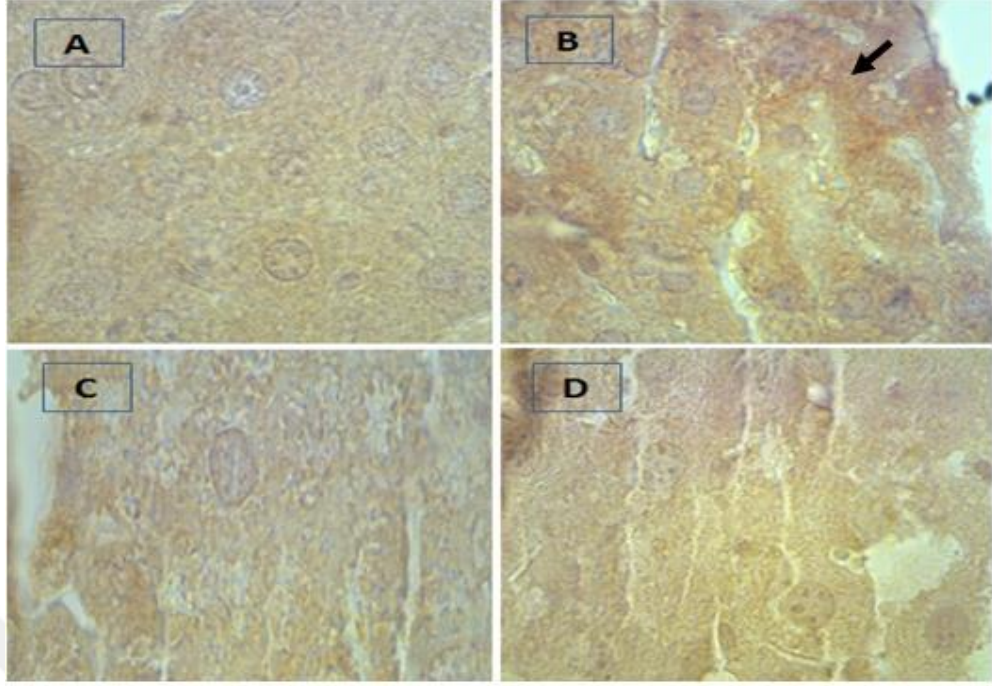
3.3. İmmünohistokimyasal Analiz Bulguları

3.3.1. Karaciğer Dokusu SIRT2 ve SIRT3 Proteinlerinin Ekspresyon Bulguları

İmmünohistokimyasal değerlendirme için SIRT-2 ve SIRT3 antikoru ile boyanan karaciğer dokularının görüntüleri sırasıyla Şekil 3.19 ve 3.20’de gösterilmiştir. Şekil 3.19’da görüldüğü üzere SIRT2 protein ekspresyon düzeyi negatif kontrol ve diğer gruplarla kıyaslandığında kırmızı grubunda sitoplazmada arttığı görülmüştür. Kontrol ve Kırmızı+DMH gruplarında sitoplazmada görülen immünboyamaya ek olarak kırmızı grubundan farklı şekilde çekirdeklerde de immünboyama gözlemlenmiştir. Nispeten DMH grubu SIRT2 protein ekspresyon düzeyi diğer gruplara kıyasla azalmıştır. Kırmızı grubu SIRT3 protein ekspresyon düzeyinin diğer gruplardan farklı şekilde çekirdekte oldukça arttığı görülmüştür. Aynı zamanda sitoplazmada da (muhtemelen mitokondride) SIRT3 protein ekspresyonu diğer gruplara kıyasla artmıştır. Bu boyama kontrol grubunda çekirdekte neredeyse görülmezken kırmızı+DMH grubunda hem çekirdekte hem de sitoplazmada görülmektedir. DMH grubu SIRT3 immünoboyaması kırmızı ve kırmızı+DMH gruplarına kıyasla hem çekirdek hem de sitoplazmada azalmıştır. Kontrol grubuna kıyasla DMH grubunda çekirdekte SIRT3 protein ekspresyonu artarken sitoplazmada azaldığı gözlemlenmiştir.

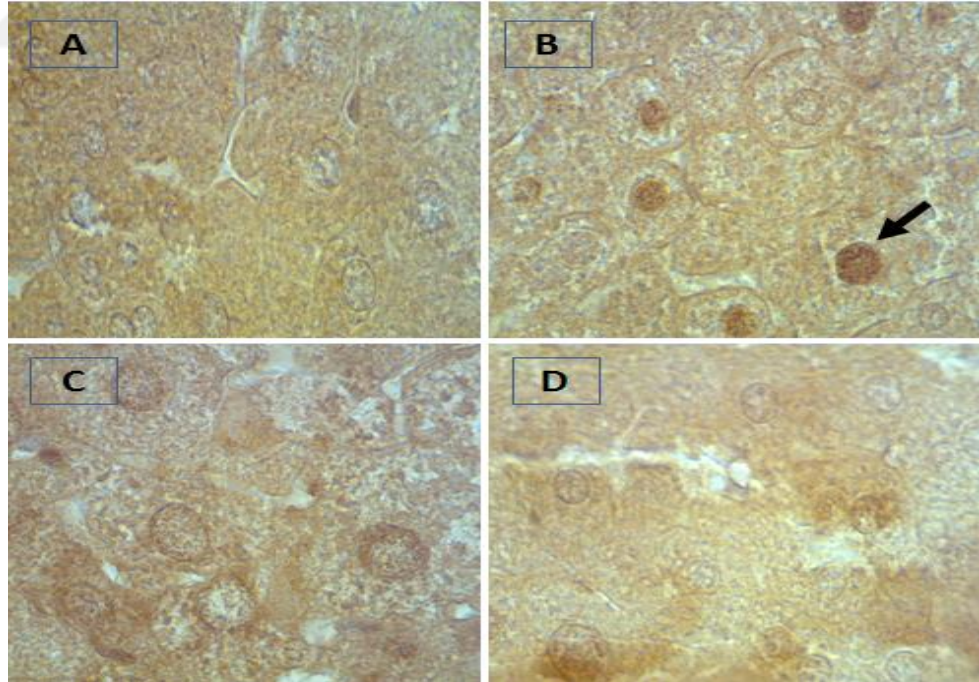


Şekil 3.18. Karaciğer Dokusu Negatif Kontrol (x100)



Şekil 3.19. Karaciğer Dokusu SIRT2 Protein Ekspresyonu (x100).

(A) Kontrol; (B) Kırmız; (C) DMH; (D) Kırmız+DMH



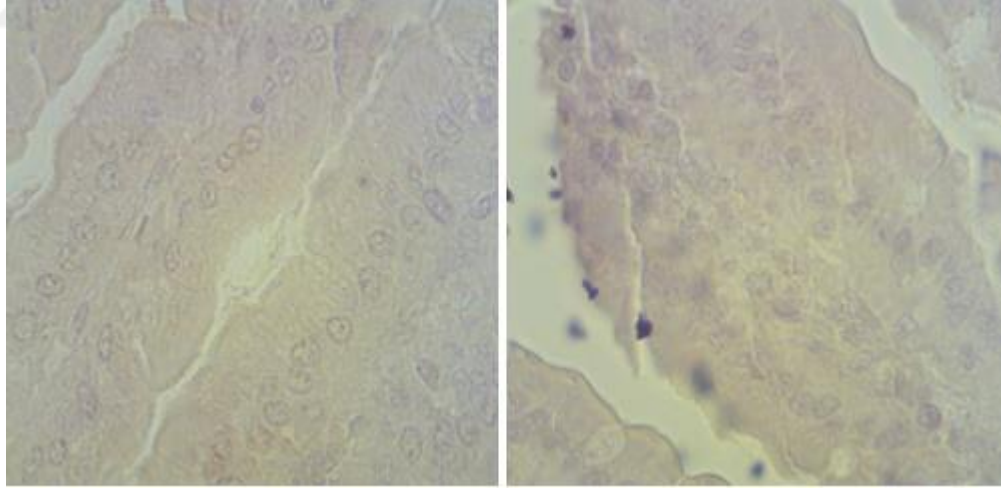
Şekil 3.20. Karaciğer Dokusu SIRT3 Protein Ekspresyonu (x100)

(A) Kontrol; (B) Kırmız; (C) DMH; (D) Kırmız+DMH

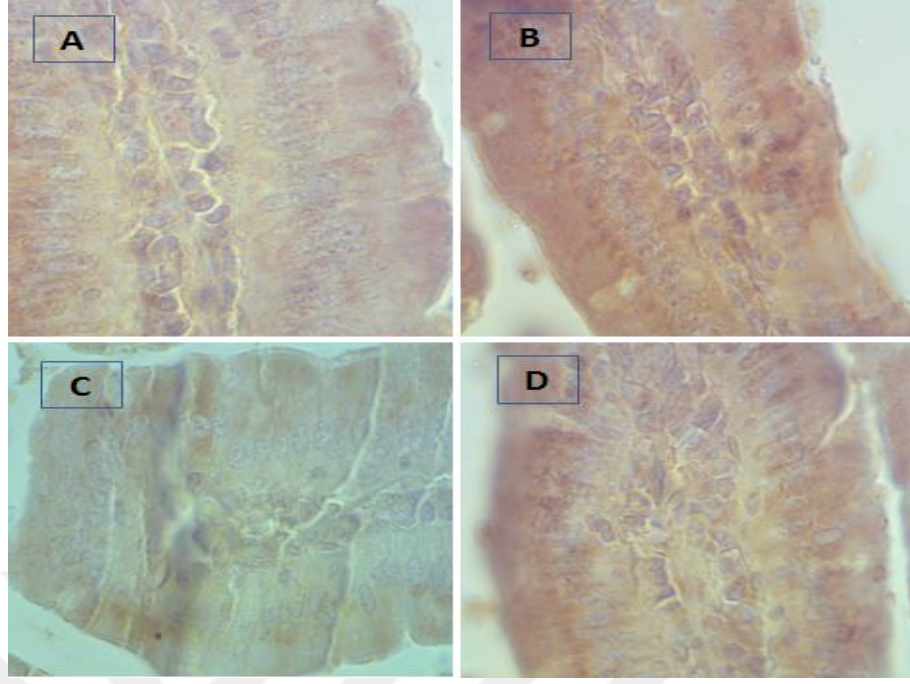
3.3.2. Kolon SIRT2 ve SIRT3 Proteinlerinin Ekspresyon Bulguları

İmmünohistokimyasal değerlendirme için SIRT2 ve SIRT3 antikoları ile boyanan kolon dokularının görüntüleri sırasıyla Şekil 3.22 ve 3.23’de gösterilmiştir.

Şekil 3.22’de görüldüğü şekilde kırmızı grubu SIRT2 protein ekspresyon düzeyi negatif kontrol ve diğer gruplarla kıyaslandığında özellikle kolon epitel hücrelerinin hem çekirdeklerinde hem de hem de sitoplazmalarında artmıştır. Kontrol ve kırmızı+DMH grupları SIRT2 protein ekspresyon düzeyleri arasında önemli bir farklılık görülmemektedir. Ancak DMH grubunda immünboyamanın azaldığı gözlemlenmiştir. Şekil 3.23’e bakıldığında, kontrol ve kırmızı SIRT3 protein ekspresyon düzeyleri arasında proteinlerin lokasyonları açısından farklılık göze çarpmaktadır. Kontrol grubunda çekirdekte nerdeyse immünboyama gözlenmezken kırmızı grubunda çekirdekte boyanma artmıştır. Kırmızı+DMH grubunda kontrol ve kırmızı grubuna kıyasla immünoboyama azalmakla birlikte ekspresyon artışı daha çok sitoplazmada (muhtemelen mitokondride) gözlemlenmiştir. DMH grubu SIRT3 protein ekspresyon düzeyinin diğer gruplara kıyasla azaldığı tespit edilmiştir.

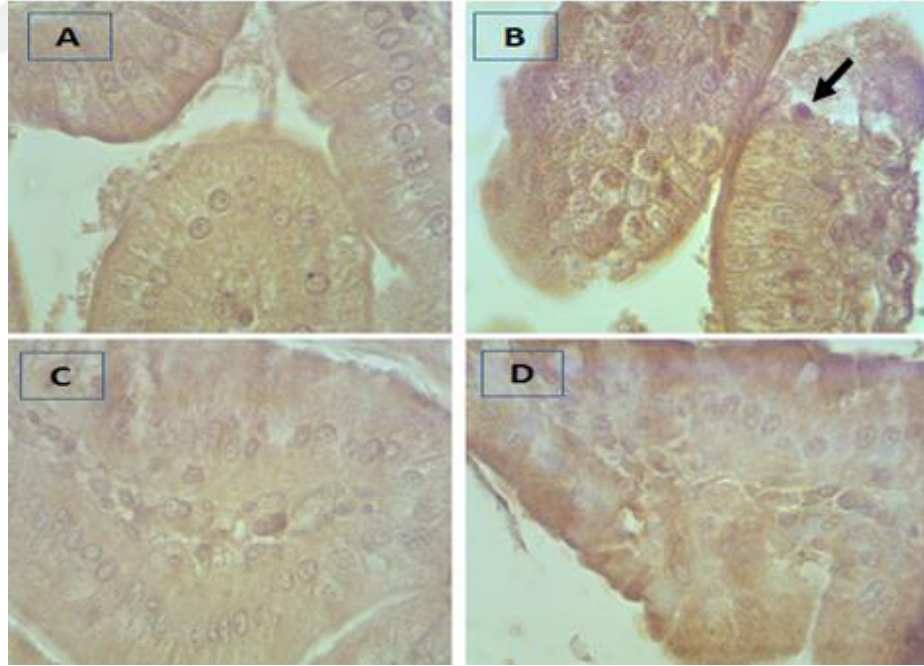


Şekil 3.21. Kolon Dokusu Negatif Kontrol (x100)



Şekil 3.22. Kolon Dokusu SIRT2 Protein Ekspresyonu (x100)

(A) Kontrol; (B) Kımız; (C) DMH; (D) Kımız+DMH



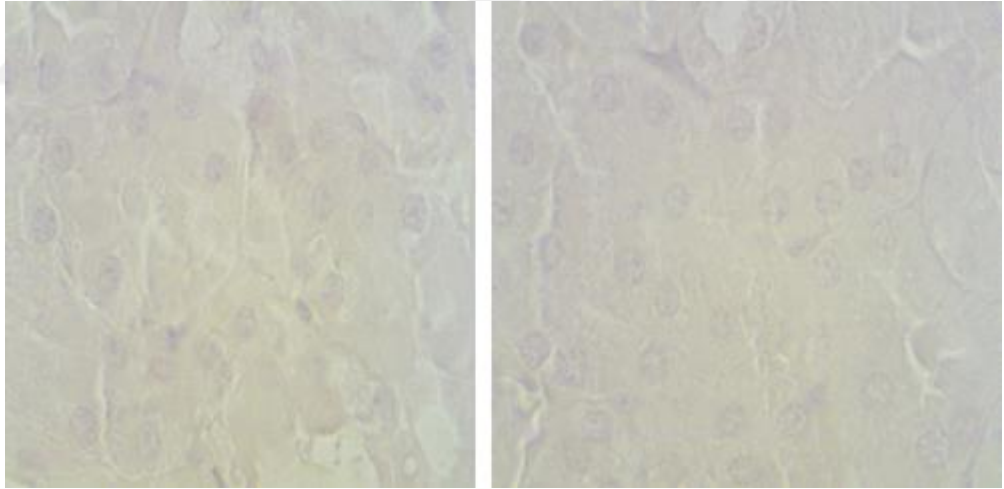
Şekil 3.23. Kolon Dokusu SIRT3 Protein Ekspresyonu (x100)

(A) Kontrol; (B) Kımız; (C) DMH; (D) Kımız+DMH

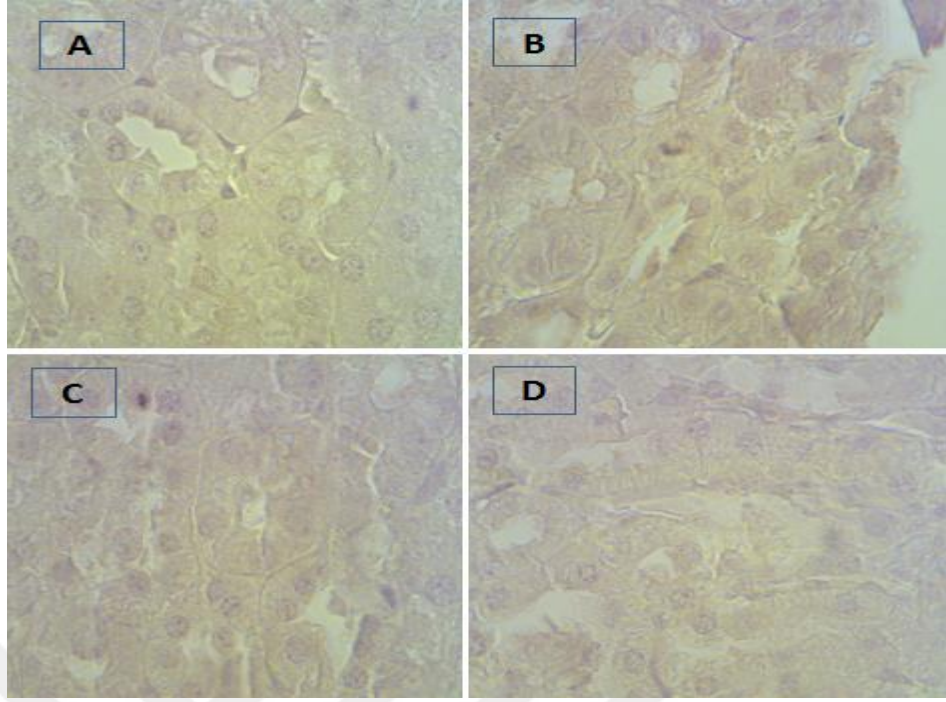
3.3.3. Böbrek SIRT2 ve SIRT3 Proteinlerinin Ekspresyon Bulguları

İmmünohistokimyasal değerlendirme için SIRT2 ve SIRT3 antikoları ile boyanan böbrek dokularının görüntüleri sırasıyla Şekil 3.25 ve 3.26'da gösterilmiştir.

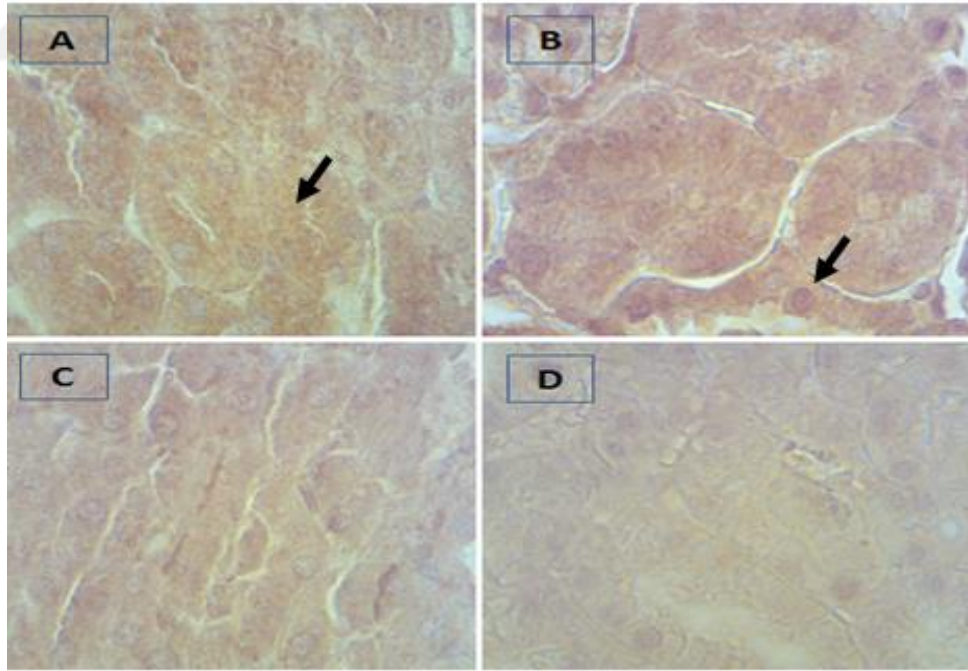
Şekil 3.25'de görüldüğü şekilde kontrol grubunda SIRT2 protein ekspresyonu daha çok sitoplazmada gözlemlenirken kırmızı grubunda hem sitoplazmada hem de çekirdekte gözlemlenmiştir. Kırmızı+DMH grubu ve DMH gruplarında nispeten daha düşük immünboyama tespit edilmiştir. Böbrek SIRT3 protein ekspresyonu düzeyi kırmızı grubunda diğer gruplara kıyasla artmıştır. Bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kontrol grubunda ekspresyon artışı belirgin şekilde daha çok sitoplazmada (muhtemelen mitokondride) görülürken kırmızı grubunda hem çekirdekte hem de sitoplazma (muhtemelen mitokondride) görülmüştür. Kırmızı+DMH ve DMH grupları arasında immünoboyama açısından bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak kırmızı+DMH grubu, kontrol ve DMH grupları ile kıyaslandığında kısmi olarak çekirdeklerdeki SIRT3 protein ekspresyon düzeylerinin arttığı gözlenmiştir.



Şekil 3.24. Böbrek Dokusu Negatif Kontrol (x100)



Şekil 3.25. Böbrek Dokusu SIRT2 Protein Ekspresyonu (x100).
(A) Kontrol; (B) Kımız; (C) DMH; (D) Kımız+DMH

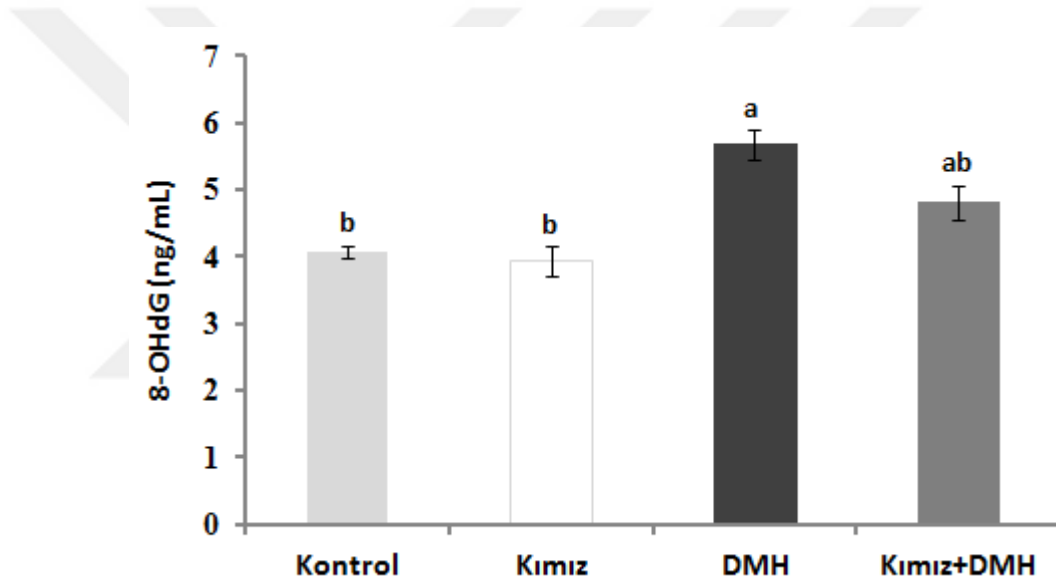


Şekil 3.26. Böbrek Dokusu SIRT3 Protein Ekspresyonu (x100).
(A) Kontrol; (B) Kımız; (C) DMH; (D) Kımız+DMH

3.4. Biyokimyasal Analiz Bulguları

3.4.1. Plazma 8-hidroksi-2-deoksiguanozin Düzeyleri

DNA hasarı üzerine kımızın etkisini incelemek amacıyla 1,2-dimetil hidrazin verilen farelerin plazma 8-OHdG düzeyleri araştırılmıştır. Şekil 3.27'deki gruplar incelendiğinde plazma 8-OHdG düzeylerinin DMH grubunda istatistiksel olarak yüksek, kontrol ve kımız grubunda ise düşük olduğu belirlenmiştir ($P<0.001$). DMH ile birlikte kımız verilmesinin 8-OHdG düzeylerini azalttığı ancak bunun istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır.



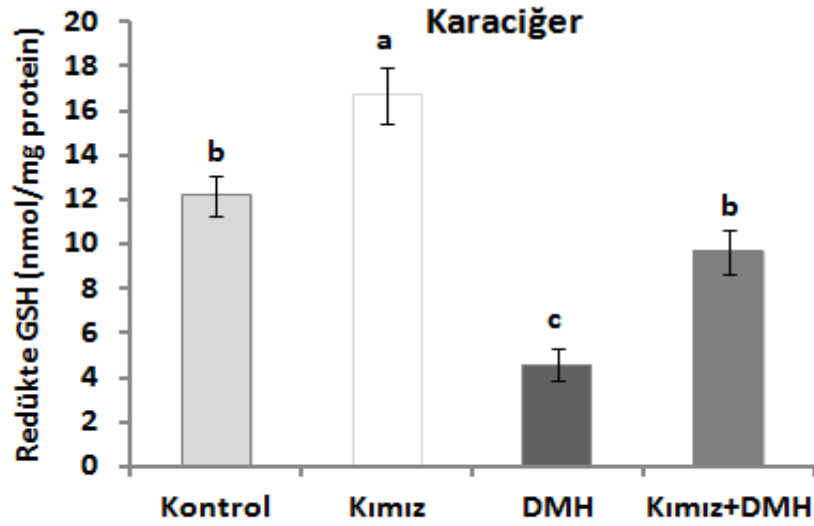
Şekil 3.27. 8-hidroksi-2-deoksiguanozin Düzeyleri

a-b: Farklı harf taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P<0.001$).

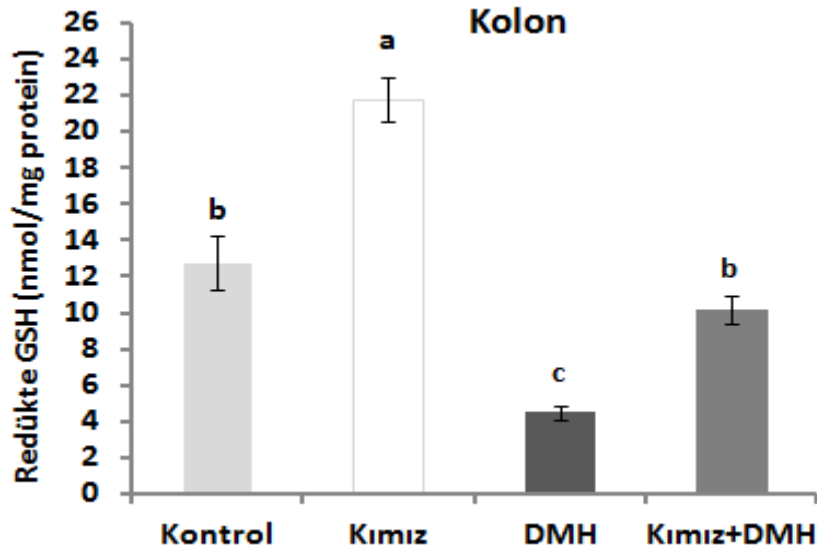
3.4.2. Karaciğer, Kolon ve Böbrek Dokuları Redükte Glutasyon Düzeyleri

1,2-dimetil hidrazin verilen farelerin karaciğer, kolon ve böbrek dokularında kımızın redükte GSH üzerine etkileri sırasıyla Şekil 3.28, 3.29 ve 3.30'da gösterilmiştir. Karaciğer, kolon ve böbrek dokularında gruplar arası GSH düzeyi incelendiğinde, tüm dokularda istatistiksel olarak en yüksek redükte GSH düzeyi kımız grubunda saptanırken, en düşük DMH grubunda saptanmıştır ($P<0.001$). Tüm dokulardaki

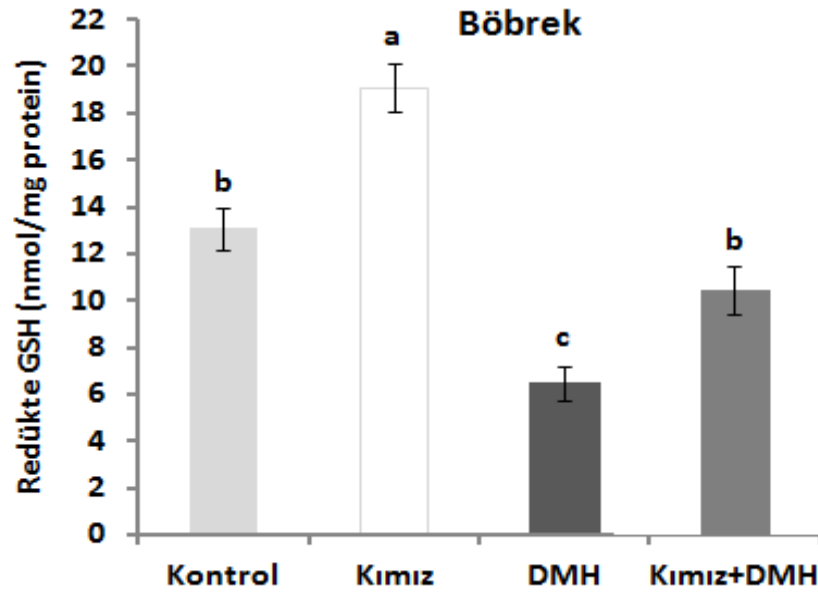
Kıymız+DMH grubu redükte GSH düzeyleri, DMH grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak yüksek bulunurken kıymız grubu ile kıyaslandığında düşük bulunmuştur ($P<0.001$). Kontrol grubundan GSH düzeyleri ile kıymız+DMH grubu GSH düzeyleri arasında istatistiksel olarak bir fark elde edilememiştir.



Şekil 3.28. Karaciğer Dokusu Redükte Glutasyon Düzeyleri
a-b-c: Farklı harf taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P<0.001$).



Şekil 3.29. Kolon Dokusu Redükte Glutasyon Düzeyleri
a-b-c: Farklı harf taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P<0.001$).



Şekil 3.30. Böbrek Dokusu Redükte GSH Düzeyleri

a-b-c: Farklı harf taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.001$).

3.4.3. Karaciğer, Böbrek ve Kolon Dokuları Total Oksidan Kapasite, Total Antioksidan Kapasite ve Oksidatif Stres Düzeyleri

Fare karaciğer, böbrek ve kolon dokusunda ölçülen total oksidan kapasite, total antioksidan kapasite ve oksidatif stres indeksi düzeyleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Karaciğer, böbrek ve kolon dokularının total oksidan kapasite düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak en yüksek TOK düzeyi DMH grubunda, en düşük ise karaciğer ve böbrek dokuları kontrol ve kırmız grupları ile kolon dokusu kırmız grubunda gözlemlenmiştir ($P < 0.001$). Tüm dokulardaki kırmız+DMH grubu TOK düzeyi, DMH grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli şekilde düşük saptanmıştır. Aynı zamanda karaciğer ve böbrek dokuları kırmız+DMH grubu TOK düzeyi, kontrol ve kırmız ile kıyaslandığında önemli şekilde yüksek bulunmuştur. Kolon dokusu kırmız+DMH grubu TOK düzeyi, DMH grubu ile kıyaslandığında önemli şekilde düşük olduğu ve istatistiksel olarak kontrol grubunun TOK düzeyine benzediği belirlenmiştir.

Karaciğer, böbrek ve kolon dokularının total antioksidan kapasite düzeyleri incelendiğinde istatistiksel olarak en yüksek TAK düzeyi kırmız grubunda, en düşük ise DMH grubunda saptanmıştır ($P<0.001$). Karaciğer TAK düzeyi kırmız+DMH grubunda, DMH grubu ile kıyaslandığında önemli şekilde yüksek bulunurken, kontrol ve kırmız grubu ile kıyaslandığında düşük bulunmuştur. Ayrıca kırmız grubu karaciğer TAK düzeyi önemli şekilde kontrol grubundan yüksek saptanmıştır. Kırmız+DMH grubu böbrek ve kolon TAK düzeyi, DMH grubu ile kıyaslandığında önemli şekilde yüksek bulunurken, kırmız grubu ile kıyaslandığında düşük bulunmuştur. Hem karaciğer hem de böbrek dokusu kontrol ile kırmız+DMH grupları TAK düzeyleri açısından istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir.

Karaciğer, böbrek ve kolon dokularının oksidatif stres indeksi düzeyleri incelendiğinde, en yüksek OSİ düzeyi DMH grubunda bulunurken, en düşük kontrol ve kırmız grubunda bulunmuştur. Karaciğer OSİ düzeyi kırmız+DMH grubunda, DMH grubu ile kıyaslandığında önemli şekilde düşük saptanırken, kontrol ve kırmız grubu ile kıyaslandığında yüksek saptanmıştır. Kırmız+DMH grubu böbrek ve kolon OSİ düzeyleri, DMH ile kıyaslandığında önemli şekilde düşükken, kırmız grubu ile kıyaslandığında yüksek saptanmıştır. Kırmız ve kontrol grubunun tüm dokulardaki OSİ düzeyleri arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Kırmız grubu böbrek ve kolon dokuları OSİ düzeyleri kontrol grubuna kıyasla düşük olsa da istatistiksel olarak önemli bir fark elde edilmemiştir. Böbrek ve kolon dokuları OSİ değerleri açısından kontrol ve kırmız+DMH grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır.

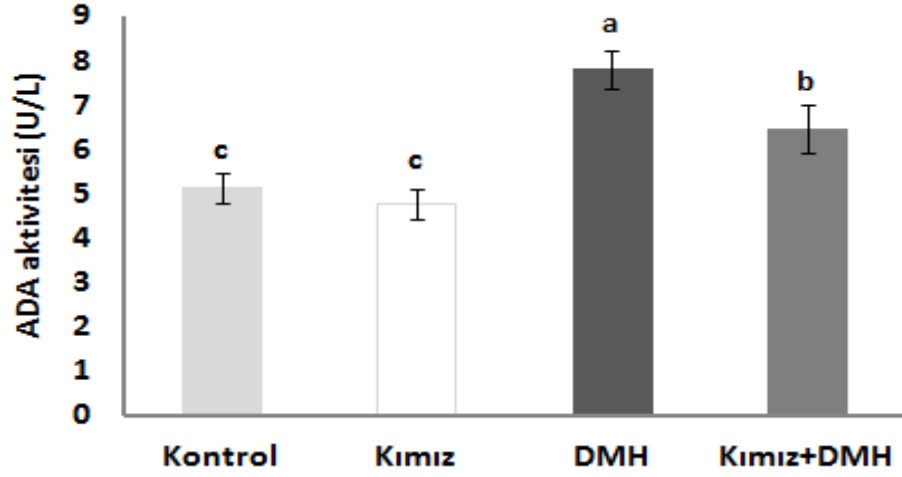
Tablo 3.1. Karaciğer, Böbrek ve Kolon Dokuları TOK, TAK ve OSİ Düzeyleri

Parametreler	Gruplar	Karaciğer	Kolon	Böbrek
Total Oksidan Kapasite ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	<i>Kontrol</i>	$35,29 \pm 1,353^c$	$35,55 \pm 1,106^c$	$36,21 \pm 1,186^b$
	<i>Kimız</i>	$34,35 \pm 1,117^c$	$34,62 \pm 0,915^c$	$34,09 \pm 0,888^c$
	<i>Kimız+DMH</i>	$39,0 \pm 1,279^b$	$41,54 \pm 1,911^b$	$39,18 \pm 1,320^b$
	<i>DMH</i>	$49,37 \pm 1,136^a$	$49,54 \pm 0,899^a$	$52,43 \pm 0,993^a$
	<i>P</i>	*	*	*
Total Antioksidan Kapasite (mmol/mg protein)	<i>Kontrol</i>	$0,97 \pm 0,025^b$	$0,85 \pm 0,029^b$	$0,93 \pm 0,035^b$
	<i>Kimız</i>	$1,13 \pm 0,036^a$	$1,02 \pm 0,032^a$	$1,09 \pm 0,041^a$
	<i>Kimız+DMH</i>	$0,85 \pm 0,043^c$	$0,82 \pm 0,056^b$	$0,88 \pm 0,44^b$
	<i>DMH</i>	$0,73 \pm 0,031^d$	$0,65 \pm 0,056^c$	$0,69 \pm 0,025^c$
	<i>P</i>	*	*	*
Oksidatif Stres İndeksi (Arbitrary unit)	<i>Kontrol</i>	$3,64 \pm 0,243^c$	$4,19 \pm 0,177^{bc}$	$3,89 \pm 0,202^{bc}$
	<i>Kimız</i>	$3,08 \pm 0,166^c$	$3,41 \pm 0,150^c$	$3,17 \pm 0,162^c$
	<i>Kimız+DMH</i>	$4,68 \pm 0,322^b$	$5,13 \pm 0,362^b$	$4,51 \pm 0,208^b$
	<i>DMH</i>	$6,80 \pm 0,292^a$	$8,00 \pm 0,778^a$	$7,69 \pm 0,304^a$
	<i>P</i>	*	*	*

a-b-c-d: Farklı harf taşıyan sütunlardaki gruplar arası fark önemlidir (* $P < 0.001$).

3.4.4. Plazma Adenozindeaminaz Aktivitesi

Çalışmada tüm gruplarda saptanan ADA aktiviteleri Şekil 3.31’de gösterilmiştir. Gruplardaki ADA aktivitesi incelendiğinde, istatistiksel olarak en yüksek ADA aktivitesi DMH grubunda saptanırken, en düşük kontrol ve kırmız grubunda saptanmıştır. Kırmız+DMH grubu plazma ADA aktiviteleri, DMH grubu ile kıyaslandığında önemli şekilde düşük bulunurken, kontrol ve kırmız grupları ile kıyaslandığında ise yüksek bulunmuştur ($P<0.001$). Kontrol ve kırmız grupları plazma ADA aktiviteleri arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır.



Şekil 3.31. Adenozin Deaminaz Aktivitesi Düzeyleri

a-b-c: Farklı harf taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P<0.001$).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan çalışmada gruplardaki hayvanların bitiş canlı ağırlıkları incelendiğinde kırmızı ve kırmızı+DMH gruplarında kontrol grubu ile kıyaslandığında canlı ağırlıkların önemli şekilde azaldığı ($P<0.05$) görülmüştür. Yapılan deneysel çalışmalarda *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türü bakterilerin ağırlık kaybı, iç organlara ait yağı azaltma ve glikoz toleransını artırma gibi metabolik sendrom üzerine faydalı etkilerinin olduğu rapor edilmiştir [136]. Bağırsak mikrobiyotası içeriğinin probiyotik takviyesi ile değiştirilmesinin yemek alımından bağımsız şekilde kilo kaybı ile ilişkili olduğu ya da farklı şekilde probiyotiklerin vücut ağırlığı ve vücut kitle indeksini azaltma açısından sınırlı etkiye sahip olduğu ve kilo kaybında etkili olmadığı daha önce bildirilmiştir [137]. Ancak, vücut ağırlığı ve yağlılık (adiposite) değişimleri üzere probiyotiklerin faydalı etkileri çeşitli çalışmalarda önerilmiş olsa da altında yatan mekanizma henüz açık değildir. Canlı ağırlıklarda görülen azalma üzerine kırmızın etkisi, içerdiği bileşenlerinin ya da bakterilerin çok yönlü etkisi ve tüm metabolizmayı düzenlemesinin önemli bir sonucu olabilir. Çalışmada elde edilen bu bulgunun altında yatan mekanizmanın araştırılmasının, ayrı bir çalışma konusu olduğu düşünülmektedir.

Dimetil hidrazin, oksidatif strese neden olduğu bilinen elektrofilik diazonyum iyonlarının oluşumunu takiben kolon kanseri oluşumunu indükleyen potansiyel bir prokarsinojendir [25]. Yapılan çalışmalarda deneysel kolorektal kanser oluşturmak için değişik dozların değişik sürelerde uygulandığı görülmektedir. Bir çalışmada farelere haftada tek doz şeklinde 24 hafta süresince (20 mg/kg) DMH uygulanmış ve tedavinin başlangıcından 186 gün sonra hayvanların % 90'ında kolon kanserinin olduğu rapor edilmiştir [138]. Başka bir çalışmada farelere 6,8 mg/kg DMH dozunu 1, 5, 10 ve 20 hafta süresince uyguladıktan sonra, fareler iki yıl boyunca takip edilmiştir. DMH dozundaki artışın farelerin hayatta kalma süresini azalttığı tespit edilmiştir [139]. Ayrıca toplam 34, 68 ve 136 mg/kg DMH alan hayvanların sırasıyla % 26, % 76 ve % 87'sinde kolon tümörlerinin geliştiği rapor edilmiştir. Diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda ise DMH uygulamasına ait doza bağlı değişimler 10-30 mg/kg arasında, süreye bağlı değişimler ise 1 hafta ile 22 haftalık uygulama arasında değişmekte olup,

DMH hayvanlara subkutan veya intraperitoneal yolla uygulanmıştır [140-142]. Yapılan çalışmada DMH, farelere intraperitoneal olarak 20 mg/kg dozda 20 hafta süresince uygulanmıştır. Ancak birçok çalışmadan farklı şekilde süre sonunda hayvanların kolon dokusunda tümör oluşumu gözlenmemiştir. Yapılan bu çalışmada bir prokarsinojen olan DMH ile farelerin kolon dokularında kansere yatkın bir çevre oluşturulmuştur. Kolorektal kanser gelişme oranının kullanılan karsinojen'in dozu, uygulama sıklığı, süresine ve uygulama şekline bağlı olduğu bildirilmiştir [143]. DMH'nin farklı hayvan ırkları üzerinde etkisinin incelendiği bir çalışmada, DMH'nin metabolik yollarının aktivasyon ve inaktivasyonu, hayvanların çeşitli ırklarında ve organlarında farklı şekilde etkili olduğu rapor edilmiştir [144].

Bağırsak mikrobiyotası çoğunlukla *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* ve *Actinobacteria* olmak üzere 100 trilyondan fazla mikrobiyal hücre topluluğu içermektedir [145]. Bağırsak mikrobiyotasının, besin takviyesinde bulunma, immün sistemi düzenleme, patojenlerden koruma gibi konağa faydalı olan bir dizi fonksiyonu bulunmaktadır [146]. Kolon sağlığını korumak amacıyla probiyotiklerin kullanımı son zamanlarda büyük dikkat çekmektedir. Çin'de kolorektal kanserli hastalarda yapılan çalışmada immünite ve bakteriyal disbiosisi artırmak için oral olarak *Bifidobacterium* ya da intestinal probiyotik tabletleri üretilmiştir. Özellikle *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* türleri önemli şekilde immünite ve bakteriyal disbiosisi artırırken, *E.coli* gibi kolorektal kansere dayanıklı patojenik bakteri azaltmıştır [147]. *Lactobacillus salivarius* ile beslenen ratların DMH indüklü kolon kanserine karşı direnç gösterdikleri gözlemlenmiştir [148]. Aynı zamanda yapılan çalışmalarda insan bağırsak mikrobiyotasının normal bir bileşeni olan *Lactobacillus* türlerinin, sütü mutajenlerden nötralize ettiği [149] ve kolorektal kanser üzerine antiproliferatif etki gösterdiği *in vitro* ve *in vivo* olarak bildirilmiştir [150]. Benzer şekilde, *Bifidobacterium lactis*'in epitelyum hücrelerde IL-1 β , LPS ve TNF- α aracılığı ile NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek kolorektal kansere karşı koruduğu rapor edilmiştir [151].

İnsan bağırsak sisteminde bazı bakterilerin β -glukosidaz, β -glukuronidaz, nitrat redüktaz, azoredüktaz, 7- α -dehidrosilaz gibi bazı enzim aktiviteleri sonucu polisiklik aromatik hidrokarbon, heterosiklik aromatik amin ve sentetik fenol, kresol, amonyum, N-nitroso bileşikleri gibi aktif karsinojenler oluşmaktadır. Sitotoksik ve genotoksik aktiviteye sahip olan bu metabolitler kolonositlerde antiapoptotik yolun aktivasyonuna ve anormal hücre büyümesine yol açmaktadır [77]. Sunulan bazı *in vitro* [152], *in vivo* [153] ve klinik [154] araştırmalar probiyotik bakterilerinin bazı suşlarının tüketiminin bu enzimlerin aktivitelerini azaltabileceğini göstermiştir [74]. Yapılan *in vitro* çalışmalarda intestinal lümeninde varolan karsinogenik bileşiklerin bazı probiyotik bakterilerin hücre duvarına bağlanabildiği bildirilmiştir. Bunu karsinogenik bileşiklerle aralarında katyonik değişimlerle ve bazı probiyotik mikroorganizmaların hücre duvarından sentezledikleri peptidoglikanlar aracılığı ile gerçekleştirdikleri rapor edilmiştir [155]. Bazı bakterileri suşlarının özellikle N-nitroso bileşikleri ve heterosiklik aminleri inaktif hale getirdikleri ve metabolize ettikleri gözlemlenmiştir [77]. Bazı probiyotikler bağırsak lümeninden patojenik bakterilerin büyümesini engelleyen ya da yok eden bakteriosin, reuterin, hidrojen peroksit ve laktik asit gibi antibakteriyel maddeleri üretebilmektedir. Probiyotiklerin toksin ve patojenlerin bağlanması engellenmesi, musin gibi konak faktörlerin uyarımı ya da reseptörlere kompetitif bağlanma gibi hipotezler ileri sürülmesine karşın inhibisyon mekanizması henüz tam olarak netlik kazanamamıştır [156]. Ayrıca kolonositlerin enerji kaynağı ve oksidatif stresi detoksifiye etme potansiyeli olan SCFAs doğal olarak intestinal mikrobiyotada bakterileri tarafından üretilmesine karşın miktarı bağırsak hastalıklarını ve kolorektal kanseri engellemek için yeterli değildir. Probiyotiklerin tüketimi ile bağırsak mikrobiyotasının içeriğinin ve metabolik aktivitesinin değiştiği, karsinogenik bileşiklerin engellendiği, antikarsinogenik bileşiklerin üretildiği, bağırsak geçirgenliğinin ve fizyolojik özelliklerinin değiştirildiği son zamanlarda giderek artan sayıdaki çalışma ile desteklenmektedir. Kıymız mayasında *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* ssp. *Lactis*, *Lb. Acidophilus* bakterileri ve *Pichia* ssp, *Rhodotorula* ssp, *Torula lactis*, *Mycoderma* ssp, *Saccharomyces cartilaginosus*, *Torula koumiss*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus* ve *Kluyveromyces marxianus* var.

bulgaricus mayalarının olduğu bildirilmiştir [94,157]. Yapılan çalışmada farelere prokarsinojen madde verilerek oluşturulan kansere yatkın çevrede, kırmızın antikarsinojenik ve antioksidan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. İlk defa yapılan bu çalışmada hayvanlara kırmız takviyesi ile DMH gibi güçlü bir prokarsinojenin oluşturmuş olduğu kansere yatkın çevrenin olumsuz etkileri önemli ölçüde ortadan kaldırılabilmektedir. Kırmızın bu etkiyi ya içerdiği doğal ve zengin bakteri ve maya içeriği ile bağırsak mikrobiyotasını değiştirerek ya da fizyolojik değeri yüksek yağ asidi içeriği, vitamin içeriği, laktoz miktarı, protein ve süt yağının yapısı gibi diğer önemli özelliklerinden dolayı göstermiş olabileceği hipotezi ileri sürülebilir.

Proteinlerdeki lizin kalıntılarına spesifik açıl grupları ekleme ile ilgili lizin açılması post-transyonal modifikasyonların en önemli formlarından biridir. Bu reversibl açıl modifikasyonları lizin kalıntılarının yükünü değiştirmekte ve böylelikle enzim aktivitesi, yapısı, substrat spesifitesi ve hücre içi hedef lokalizasyonu dahil proteinlerin fonksiyonlarını etkilemektedir [159]. Birçok protein hedeflerini deasetile edebilme yeteneklerinden dolayı sirtuinler metabolizmada rolleri iyi bilinen gen transkripsiyonu, farklılaşma, apoptozis ve hücre siklusu, antioksidan savunma, yaşam uzunluğu, sirkadiyen ritim gibi sayısız hücresel süreç ile ilişkilidir [160].

Metabolik yollarının dışında SIRT3, özellikle hücresel antioksidan savunma sistemleri ile etkileşerek oksidatif stres ile mücadele etmek gibi çeşitli mitokondriyal streslere karşı direnç göstermede önemli görev almaktadır. Hücrenin enerji transfer bölgeleri olarak mitokondri, peroksit ve süperoksit gibi ROT üretiminde ana organeldir. Anahtar süperoksit yakalayıcısı ve oksidatif hasara karşı korumada görevli SOD, SIRT3 aracılı deasetilasyon ile aktive olmaktadır [161]. SIRT3 aynı zamanda SOD2 ve katalaz dahil anahtar antioksidan genlerin transkripsiyonunu artıran transkripsiyon faktörü FOXO3a ile etkileşerek kardiyomyosit ve mikrogliaları oksidatif strese karşı korumaktadır [162]. Oiu ve ark. (2010) yaptıkları kalori kısıtlaması çalışmasında SOD2 üzerindeki K53 ve K89 asetilasyon bölgelerinin SIRT3 tarafından hedeflendiği ve SIRT3'ün, SOD2'yi deasetilleyerek oksidatif strese direnç gösterdiği ileri sürülmüştür [116]. SOD2 ya da

izositrat dehidrojenaz 2'nin SIRT3 tarafından deasetilasyonu hücrel ROT düzeyinin azalması ve bu enzimlerin antioksidan aktivitelerinin artması ile sonuçlanmıştır [163].

SIRT3 çeşitli solunum zinciri komplekslerinin aktivitelerini etkilemektedir. SIRT3 kaybının, hem matriks hem de sitoplazmada ROT üretimini artıran elektron transport zincirinin kompleks III'ün asetilasyonunu artırdığı gözlemlenmiştir [164]. SIRT3 kompleks III'ü düzenleyerek sitoplazmik ROT düzeyini düzenlemektedir. Yüksek düzeyde ROT, proteinlerin yanlış katlanmasına ve nihayetinde apoptozisine neden olarak proteinlerin irreversibl hasarına neden olmaktadır. Papa ve Germain (2014) tarafından yapılan bir çalışmada mitokondride yanlış katlanan proteinlerin birikiminin, SIRT3 tarafından düzenlendiği rapor edilmiştir [165]. Protein katabolizması sonucu amonyum iyonu oluşmakta ve bu iyonlar üre siklusu aracılığı ile detoksifiye edilmektedir [166]. SIRT3 ve SIRT5 ornitin transkarbomilaz ve karbomil fosfat sentetaz enzimlerini deasetilleyerek üre siklusunun mitokondride gerçekleşen reaksiyonlarını düzenlemektedir [167].

Tüm bu bilgiler göstermektedir ki; SIRT3 oksidatif hasara karşı mitokondrinin fizyolojik fonksiyonunu korumada kritik bir role sahiptir. Yapılan çalışmada hayvanlara verilen kırmızın fare karaciğer ve böbrek dokularında SIRT3 protein ekspresyonunu önemli şekilde artırdığı gözlemlenmiştir. Karaciğer ve kolon dokuları kırmız+DMH grubunda, DMH grubuna kıyasla önemli şekilde SIRT3 ekspresyonu düzeyinin arttığı saptanmıştır. Kırmızın SIRT3 ekspresyon düzeyinin artırıcı ya da SIRT3 ekspresyonunu tetikleyici bu etkisini ROT seviyesini düzenleyerek ya da transkripsiyon faktörleri ile etkileşip hücreyi oksidatif strese karşı koruyarak gösterdiği düşünülebilir. Nitekim kırmızın tüm dokularda OSİ ve TOK düzeylerini azaltarak redükte GSH ve TAK düzeyini artırması bu düşünceyi doğrular niteliktedir. Elde edilen immünohistokimyasal bulgular da bu bulgularını desteklemekle birlikte literatürde daha önce çok az karşılaşılmış bir duruma rastlanılmıştır. Mitokondriyal lokasyonlu olarak bilinen SIRT3'ün protein ekspresyon düzeyi karaciğer dokusu kırmız grubunda diğer gruplardan farklı şekilde çekirdekte arttığı tespit edilmiştir. Benzer bulgulara hem kolon hem de böbrek dokusunda rastlanmıştır. Bu boyamalar tüm dokuların kontrol gruplarında

çekirdekte neredeyse görülmezken kımız takviyesi ile çekirdekte boyanma oranı artmıştır.

Karaciğer dokusu kımız+DMH grubu, kontrol ve DMH grupları ile kıyaslandığında kısmi olarak çekirdeklerdeki SIRT3 protein ekspresyon düzeylerinin arttığı gözlemlenmiştir. Böbrek dokusu kontrol grubu, SIRT3 protein ekspresyonu sitoplazmada (muhtemelen mitokondride) görülürken kımız grubunda hem sitoplazma hem de çekirdekte görülmüştür. Benzer şekilde kontrol ve DMH grupları ile kıyaslandığında, kımız+DMH grubunda kısmi olarak çekirdek SIRT3 protein ekspresyon düzeyleri artmıştır. Yapılan iki ayrı çalışmada SIRT3'ün hücrel stres altında mitokondriden çekirdeğe geçtiği rapor edilmiştir. SIRT3'ün çekirdekte varolabilmesi onun asetile histon H3 Lys 9 ve H4K16ac'e karşı histon deasetilazı aktive etme yeteneğinden kaynaklandığı bildirilmiştir [168,169]. SIRT3'ün çekirdekteki rolü henüz belirsiz olmakla birlikte yapılan bir çalışmada SIRT3'ün çekirdekteki rolü stresle ilişkili ve nükleer kodlanmış bazı mitokondriyal genlerin ekspresyonunu düzenlemesi ile açıklanmıştır [170].

SIRT3 çeşitli stres formları altında mitokondrinin sağlığını muhafaza etmek için mitokondri koruyucu protein olarak fonksiyon gördüğü teorisi birçok çalışma tarafından desteklenmektedir. Özetle, SIRT3, besin depolarının tükendiği koşullar altında lipid ve aminoasitlerin kullanımını başlatarak glikoz aracılı metabolizmada değişikliği sağlamaktadır (besin stresi). Enerji üretimi ve besin stresi ile ilişkili oksidatif hasar ile mücadele etmektedir (Oksidatif stres). Hücrel strese cevap olarak spesifik olarak mitokondriyal dinamikleri ve geçirgenliği kontrol etmektedir (Mitokondriyal özelliklerin kontrolü) [171].

Metabolik düzenleyiciler olarak mitokondriyal sirtuinler, Warburg etkisini baskılaması sayesinde kanser metabolizmasına ket vurmaktadır [172]. Yapılan bazı çalışmalarda kanser sürecinde sirtuinlerin olası rolleri çalışılmıştır. SIRT3 fonksiyon kaybının, seçici hasara ve hücrel çevre indüklü tümöre neden olduğu rapor edilmiştir. SIRT3 ekspresyonunun çeşitli insan kanserlerinde azaldığı bildirilmiştir [102,107]. Önemli bir

sinyal molekölü olan ROT, düşük düzeyde bile olsa gen transkripsiyonunu ve hücre proliferasyonunu değiştirebilmekte ve SIRT3 mitokondride ROT düzeyini kontrol ederek tümör gelişimini önleyebilmektedir [102]. SIRT3 geninin silindiği kanser çalışmalarında hem tümörün başlamasına hem de ilerleme sürecine muhtemelen katkı sağlayan hücre metabolizmasında oksidatif stresin ve değişikliklerin arttığı bulunmuştur. SIRT3 bu tümör baskılayıcı rolünü, HIF1 α 'nın stabilizasyonunu inhibe eden süperoksit gibi ROT'ni baskılama yeteneği ile gerçekleştirmektedir [173]. Birçok transforme hücre hattı ve insan tümörlerinde SIRT3 ekspresyonunun azalması SIRT3'ün bir tümör supresör olarak görev almasına bir kanıt olarak ileri sürölmüştür [174]. Aynı zamanda SIRT3 geni silinmiş farelerde tümörün eř zamanlı olarak yüksek insidans gösterdiği gözlemlenmiştir [174]. Yapılan çalışmada DMH uygulaması ile tüm dokularda SIRT3 protein ekspresyonu düzeyinin azalması ile hücredeki oksidatif stresin artması arasında ya da farklı şekilde şekilde kırmız takviyesi ile SIRT3'ün muhtemelen mitokondriden çekirdeğe yönelmesi/çekirdekte düzeyinin artması ile hücredeki oksidatif stresin azalması arasında önemli bir ilişki bulunmaktadır. Nitekim, SIRT3 ekspresyonu düzeyi, sadece DMH verilen grupta karaciğer, kolon ve böbrek dokularında azalmıştır. SIRT3 ekspresyonunun azalması hücrede oksidatif stresi artırarak tümör oluşumunu tetikleyebilir. Ancak mitokondriyal lokasyonlu SIRT3'ün neden çekirdeğe yöneldiği sorusunun cevabı daha ileri çalışmaları gerektirmektedir.

Tümörigenezde SIRT2, tümörün tipine göre hem tümör oluşumunu tetikleyici hem de hem de FOXO1, FOXO3A, CDH1, H3K56 ve H4K16 gibi substratları deasetile ederek tümör baskılayıcı rol oynadığı bildirilmiştir. Bunlar hücre siklusu, replikasyon ve DNA hasarına cevabı koruyan önemli moleküllerdir [100]. Kronik stres gibi organizmayı etkileyen olumsuz şartlar altında, SIRT1, SIRT2 ve SIRT3 hücre yaşlanması ve apoptozisi indükleyerek organizmayı koruduğu ileri sürölmüştür [37,172]. SIRT2 geni nakavt edilmiş farelerde kanserin geliştiği ve SIRT2 düzeyinin meme, karaciğer, renal ve prostat kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde azaldığı bildirilmiştir [175]. SIRT2'nin tümörü tetikleyici karakterini gösteren tam tersi yönde veriler de literatürde bulunmaktadır [176,177]. SIRT2 ekspresyonunun pankreatik kanser hücreleri [176] ve hepatoselüler karsinomada [177] arttığı gözlemlenmiştir. SIRT2 seviyesi ve küçük

hücreli akciğer kanseri ya da ileri evre servikal kanserlerde zayıf prognoz arasındaki korelasyonu gösteren [178] ya da düşük düzey SIRT2 ve küçük hücreli akciğer kanseri arasındaki korelasyonu gösteren diğer raporlar [179] olmasına karşın tümörde SIRT2'nin tam rolü henüz tartışılmaktadır. Yapılan bir çalışmada inflamasyonla ilişkili kanser dahil kronik inflamasyon hastalıklarına karşı SIRT2'nin koruyucu rolü olduğu bildirilmektedir [180].

Yapılan çalışmada hayvanlara verilen kırmızın fare karaciğer ve kolon dokularında SIRT2 protein ekspresyonunu önemli şekilde artırdığı gözlemlenmiştir. Karaciğer ve kolon dokuları kırmız+DMH grubunda, DMH grubuna kıyasla önemli şekilde SIRT2 protein ekspresyon düzeyinin arttığı saptanmıştır ($P<0.05$). İmmünohistokimyasal bulgular da bu sonuçları desteklemekle birlikte hayvanlara kırmız takviyesinin karaciğer SIRT2 proteinin hücre içi lokasyonlarında farklılığa neden olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol ve kırmız+DMH gruplarında hem çekirdekte hem de sitoplazmada ekspresyon olurken, kırmız grubunda sitoplazmada daha fazla ekspresyon olduğu tespit edilmiştir. Böbrek dokusu kontrol grubunda SIRT2 protein ekspresyonu daha çok sitoplazmada gözlemlenirken kırmız grubunda hem sitoplazmada hem de çekirdekte gözlemlenmiştir. Çekirdeksel SIRT2, ROT üretiminin azalması ve SIRT2'nin hedef genlerinin transkripsiyonunu artırması ile sonuçlanan FOXO3A transkripsiyon faktörünü deasetile ve aktive ederek DNA'ya bağlanmasını sağladığı bildirilmiştir [181]. Kırmız bir şekilde SIRT2'nin fonksiyonlarını etkileyerek ekspresyon lokasyonlarında farklılığa neden olmaktadır. SIRT2'nin bu lokasyon farklılığı çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ve enzimlerin deasetilasyonu ile hücresel mekanizmayı düzenleyebilme özelliğinin bir sonucu olabilir. SIRT2 ve SIRT3 lokasyonlarının hangi sebepten ötürü değiştiği sorusunun cevabı aynı zamanda kanser öncesi ve kanserin başlangıç süreçlerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Sirtuin 1, Wnt sinyal yolunun önemli bir bileşeni olan β -katenini deasetile etmektedir. SIRT1'in tümör baskılayıcı rolünü çekirdekte β -kateninin lokalizasyonunu baskılayarak ve β -kateninin transkripsiyonunu aktive etme yeteneğini azaltarak gösterdiği bildirilmiştir [122]. Son zamanlarda SIRT2'nin β -katenin ile direkt olarak etkileştiği ve onkoprotein

survivin, c-MYC ve siklin D1 gibi onkoproteinler dahil Wnt transkripsiyonel hedefleri inhibe ettiği gösterilmiştir [183]. Literatürde SIRT2'nin fonksiyonel mekanizmaları ile ilgili yapılan çalışma sayısı az olmakla birlikte β -katenin ile olası etkileşimi ve bu etkileşimin altında yatan mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Yüzey adezyon molekülü ve Wnt sinyal bileşeni olan β -kateninin, E-kaderin ile etkileşimi göz önüne alındığında, bu proteinler hücrel kronik stresle başa çıkmak için SIRT2 ve SIRT3 proteinleri ile de etkileşiyor olabilirler. Nitekim, yapılan çalışmada DMH verilen grupta E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 proteinleri istatistiksel olarak önemli şekilde tüm dokularda azalmıştır ($P<0.05$). Kırmızı takviyesi ile karaciğer ve kolon dokularında E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 protein ekspresyon düzeyleri ve böbrek dokusu E-kaderin, β -katenin protein ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak arttığı kaydedilmiştir. ($P<0.05$). Aynı zamanda kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece kırmızı verilen grupta karaciğer E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 protein ekspresyon düzeyleri, kolon E-kaderin, β -katenin, SIRT2 protein ekspresyon düzeyleri ve böbrek β -katenin ve SIRT3 protein ekspresyon düzeylerinin önemli şekilde arttığı gözlemlenmiştir ($P<0.05$). Ancak tüm dokularda benzer bulgular elde edilmesine rağmen mekanizmalarının ilişkili olduğunu söylemek ve bu ilişki/ilişkileri açıklayabilmek için daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Gelişim süresince E-kaderin, embriyogenezde epitelyal mezenkimal dönüşümün kontrolü ile ilişkilidir fakat yaşam süresince inflamasyon, fibrozis ve kanser dahil çeşitli hastalıkların patofizyolojik süreçlerinde rol oynamaktadır. EMT sürecinde hücre-matriks adezyon kuvvetleri artarken, hücre-hücre adezyon molekülleri inaktif hale gelir ve bazı durumlarda da yıkılır [184]. Kaderinler fonksiyonlarını katenin proteinleri ve aktin filament zinciri ile kompleks halinde yerine getirirler. β -katenin, E-kaderinlerin direk sitoplazmik bölgesine bağlanır ve adezyonu düzenler [51,52]. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar E-kaderin ve β -katenin ekspresyonlarındaki değişimlerin invazif tümör fenotipi ile ilişkili olduğunu göstermiştir [185-187]. Tümör hücreleri aracılığı ile hücre adezyonunun azalması, hücre motilitesinin ve proteolitik enzimlerin salınımının artması tümör invazyonunda önemli bir indikatör olarak görülmektedir [187,188]. E-kaderin-katenin kompleks immün reaktivitesinin kaybı sıklıkla epitelyal karsinomlarda

meydana gelmekle birlikte yüksek derece, ileri evre ve kötü prognozla ilişkilidir [189]. Benzer şekilde kateninlerin düşük ekspresyonunun karsinomlarda dedifransiyasyon, invazyon ve metastazın artması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, E- kaderin ve β -katenin ekspresyonlarında azalma kolorektal kanser vakalarının sırasıyla %75 ve %81.8'inde görülmüştür. E-kaderin-katenin kompleks fonksiyonunun karsinogenezin ilk aşamasında bozulmaya başladığı ve dokuların yapısının bozulması tümör invazyonu ile ilişkili ilerleyici bir süreç olduğu rapor edilmiştir [187]. Yapılan bu çalışmalara dayanarak E- kaderin ve β -katenin proteinlerinin kanser süreci ile ilişkili olduğu söylenebilir. Ancak kanser oluşmadan önce yatkın bir çevrede bu proteinlerin düzeylerinin nasıl değiştiği veya etkiledikleri sinyal yollarında nasıl bir değişikliğe neden olarak kansere yol açtıkları henüz aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmada E-kaderin ve β -katenin proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin kansere yatkın bir ortamda nasıl değiştiği ve bu değişime kırmızın etki edip etmediği araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre karaciğer, kolon ve böbrek dokuları DMH gruplarında E-kaderin ve β -katenin proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin önemli şekilde azaldığı ($P<0.05$), kırmız takviyesi ile tüm dokulardaki β -katenin ve karaciğer E-kaderin ekspresyon düzeyleri önemli şekilde artmıştır ($P<0.05$). Kırmız+DMH grupları E-kaderin ve β -katenin proteinlerinin ekspresyon düzeyleri tüm dokularda DMH grubundan önemli şekilde daha yüksek saptanmıştır ($P<0.05$). Çalışma verilerinin ışığında E- kaderin ve β -katenin ekspresyon düzeylerindeki azalmanın sadece karsinojenik süreçte değil aynı zamanda kanser öncesi süreçte de azaldığı söylenebilir. Bu bulgu hücreler henüz karsinojenik sürece evrilmeden önce davranışlarının tanımlanmasında ve bu sürecin engellenebilirliğinde yol gösterici olabilir.

Inumaru ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada oksidatif stresin, p120-kateninin hücre-hücre bağlantılarının ayrılmasını indüklediği ve endozomlardaki p120-kateninin translokasyonunun NF- κ B aracılı intraselüler oksidatif streste azalma ile ilişki olduğunu saptamışlardır. Son derece yüksek oksidatif stres altında negatif feedback mekanizmasının epitelyal yapının korunmasında hayati bir rol oynadığı belirtilmiştir [184]. Gorowiec ve ark. (2012) 400 μ M H₂O₂ ile muamele ettikleri A549 hücrelerinde epitelyal belirteçlerin (E-kaderin ve ZO-1) azaldığını, mezenkimal belirteçlerin

(vimentin ve α -smooth muscle aktin) ve ekstraselüler matriks bileşenleri salınımının arttığını rapor etmişlerdir. Yaptıkları çalışmalarında oksidatif stresin hücrel sinyal yolları ve ROT üretimi ile ilişkili olan TGF- β 1 ekspresyonunu artırdığını, fenil tert-butil nitron ve SOD3 takviyesi ile TGF- β 1 sinyal yolu inhibisyonunun oksidatif strese bağlı EMT gibi değişiklikleri önleyebileceğini bildirmişlerdir [190].

Zhang ve ark. (2015) lipopolisakkarit (LPS) (28 gün, 5 mg/mg *Escherichia coli*:0111:B4) verilen farelere resveratrolün (0.3 mg/kg) koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında, LPS verilmesinin akciğer dokusunda 21. ve 28. günleri arasında EMT sürecini indüklediği ve bu sürecin TGF- β 1 üretimini ve SMAD aktivasyonunu uyardığı rapor edilmiştir. Resveratrol takviyesinin TAK, CAT ve SOD aktiviteleri artırdığı ve oksidatif stresi baskılayarak EMT ve pulmoner fibrozisi zayıflattığı gösterilmiştir. Resveratrolün EMT üzerine etki mekanizmasının arkasında oksidatif stres sürecini ve TGF- β 1/SMAD sinyal yolunu düzenlemesi olduğu bildirilmiştir [191]. Fukawa ve ark. (2012) yaptıkları çalışmalarında H₂O₂'in, transkripsiyonel düzenleyici Snail1 aracılı epitelyal kaderin ve α -smooth muscle aktin dahil EMT belirteçlerinin ekspresyonunu değiştirdiğini ve TGF- β 1 salınımını artırdığını saptamışlardır [192]. EMT'de önemli bir belirteç olan E kaderinin protein ekspresyon düzeyinin DMH grubunda tüm dokularda önemli şekilde azalmasının, DMH'nin EMT sürecini tetiklemesinin bir sonucu olduğunu düşündürmektedir. Iizuka ve ark (2017), ROT'nin, SMAD ve mitojenle etkileşen protein kinaz (MAPK)/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) sinyalizasyon yolu ile TGF β -aracılı EMT'yi indüklediği sonucuna varmışlardır [193].

Önemli bir transkripsiyon faktörü olan FOXO, oksidatif strese yanıt olarak hücre döngüsünün durdurulması ve susturulmasını indükleyerek hücrenin hayatta kalmasını artırmaktadır. Oksidatif stres, FOXO'nun hücrelerdeki ekspresyonunu aktive etmektedir. β -katenin ile FOXO transkripsiyon faktörleri (FOXO1, FOXO3A ve FOXO4) arasındaki etkileşim, hücre döngüsünden çıkışı ve susturma veya apoptozu arttırmaya yardımcı olmaktadır. Aksine, β -kateninin TCF ile etkileşimi ise hücre proliferasyonunu arttırmaktadır [194,195]. Literatürde β -kateninin APC proteini ile birlikte kolon kanseri oluşumunda etkili olduğu yönünde çalışmalar bulunmaktadır. Buna göre β -katenin, axin

ve glikojen sentaz enzimlerinin oluşturduğu komplekste APC proteini de yer almaktadır. Glikojen sentaz kinaz, β -katenini fosforilleyerek kompleksten ayrılmasına ve β -katenin'in DNA bağlayan bir protein olan TCF veya LEF faktörlerine bağlanarak transkripsiyon genlerini aktive etmektedir. Bu da kolon kanserinin gelişimini aktive etmektedir [48,56,60]. Lento ve ark. (2014), β -katenin transgenik farelerde gerçekleştirdikleri çalışmalarında, radyasyona maruz kalmanın kök hücrelerde H_2O_2 'i detoksifike eden katalazın ekspresyonunu azalttığı, ROT ve süperoksit serbest radikallerinin birikimine neden olduğu ve DNA hasarının onarılmadığını bildirmişlerdir [196]. Yapılan çalışmada benzer şekilde Wnt sinyal yolunun önemli bir bileşeni ve yüzey adezyon molekülü olan β -katenin protein ekspresyon düzeyinin DMH grubunda tüm dokularda önemli şekilde azaldığı ve bu azalmaya OSİ ve ROT düzeylerindeki önemli artışların eşlik ettiği kaydedilmiştir.

Çevresel ve genetik faktörler, kanser ve gelişiminde riski tetikleyebilen mutasyonların sıklığını artırmakta ya da hücrel proliferasyonu desteklemektedir. Oksidatif stresin artması genomik instabilite ve mutagenезisin artmasına neden olan DNA hasarını artırmasına paralel olarak kanser riskini artırdığı bildirilmiştir. Artan oksidatif stres mutasyon sıklığını neden olarak genomik stabiliteyi ve DNA hasarını tetikleyebilmektedir [197]. Yapılan çalışmada DMH grubunda DNA hasarının bir belirteci olarak 8-OHdG düzeyinin plazmada arttığı ve kırmızın bu hasarı azalttığı ancak bu azalışın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

Mitokondriyal savunma mekanizmasında glutatyon peroksidaz önemli bir antioksidan enzimdir. ROT'ü detoksifikiye etmek için glutatyon peroksidaz okside glutatyonu (GSSG), yüksek NADPH gerektiren glutatyon redüktaz aracılığı ile redükte glutatyon dönüşürmektedir [198]. Redükte glutatyon ve glutatyon ilişkili metabolizma, oksidatif stres ve stresin diğer türlerinden hücreleri korumada çok önemli bir role sahiptir. OSİ, TOK ve TAK ve düzeyleri organizmanın tüm oksidatif stres durumunu değerlendirmede kullanılan oksidatif stres parametreleridir. Ratlarda DMH ile oluşturulan toksisite ve oksidatif stres üzerine Amla'nın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 12 hafta boyunca subkutan DMH (60 mg/kg canlı ağırlığı) enjeksiyonu ile

birlikte karaciğer GSH düzeyinin azaldığı ve MDA düzeylerinin arttığı gözlemlenmiştir. DMH enjeksiyonu ile birlikte karaciğer katalaz ve GSH-Px aktivitelerinin önemli şekilde azaldığı, Amla takviyesi ile katalaz, GSH-Px ve SOD aktivitelerinin arttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada DMH verilen grupta kolon GSH, SOD, GSH-Px ve glutatyon-S-transferaz aktiviteleri önemli şekilde azalırken, böbrek γ -glutamil transferaz aktiviteleri önemli şekilde artmıştır [199]. Jrah Harzallah ve ark. (2013) kolon karsinogenezinin başlangıç ve ilerleme süreci boyunca DMH indüklü oksidatif stres üzerine timokinonun etkisini araştırdıkları çalışmalarında, ratlara 10 hafta (başlangıç) ve 20 hafta (ilerleme) boyunca 20 mg/kg canlı ağırlığı dozunda DMH uygulayarak kolon dokularında ROT, GSH-Px, SOD, CAT aktiviteleri ve redükte GSH düzeylerini araştırmışlardır. Çalışmalarında ROT düzeyi artışı tümörün başlangıç ve ileri sürecinde gözlemlenmiştir. Tüm ROT yakalayıcı enzimlerin aktivitelerinin kısa süreli DMH uygulamasında artmasına rağmen, uzun süreli DMH uygulamasında azaldığı saptanmıştır. Farklı şekilde redükte GSH düzeyi her iki uygulamada da artmıştır. Oksidatif durum dengesizliklerinin orta derece kolon displazisi, başlangıç sürecinde %30 ve ileri derecede ise %100 tümör insidansı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Tümör başlangıç aşamasında, timokinon takviyesinin (5 mg/kg canlı ağırlığı) DMH-indüklü oksidatif stresi önemli derecede iyileştirdiği (%67) sonucuna varılmıştır [200]. Yapılan çalışmada karaciğer, kolon ve böbrek dokuları redükte glutatyon düzeyinin DMH grubunda önemli şekilde azaldığı ve kırmızı takviyesi ile arttığı gözlemlendi. GSH'un DMH ile oluşturulan oksidatif hasara karşı koruyucu bir rol oynadığı ve antioksidan bir molekül olan GSH'un karsinojen metabolitleri ile etkileşiminden dolayı düzeyinde azalma olduğu ileri sürülebilir.

Anilkumar ve ark. (2010) tarafından ratlarda DMH indüklü oksidatif stres ve toksisite üzerine kişniş otu tohumunun etkisinin araştırıldığı bir çalışmada DMH uygulamasının SOD, CAT, Glikoz-6-P dehidrojenaz aktiviteleri ve GSH düzeyini azalttığı tespit edilmiştir. Kişniş otu tohumunun %10 konsantrasyonunda alınımının, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve Glutatyon-S-transferaz aktivitelerini artırarak hepatik GSH-redoks sistemini artırdığı, %5 ve %10 konsantrasyonda alınımının ise kolonik katalaz ve GSH-Px aktivitelerini artırdığı rapor edilmiştir [201]. Habib ve ark. (2013)

kolon kanserli hücre kültüründe gerçekleştirdikleri çalışmalarında deve sütü laktoferrinin kanserli hücrelerin proliferasyonunu ve DNA hasarını azalttığını, aynı zamanda serbest radikal yakalama aktivitesi, NO ve total antioksidan aktiviteyi artırdığı rapor edilmiştir [202]. Benzer şekilde yapılan bu çalışmada DMH ile oluşturulan oksidatif stresin plazma DNA hasarı, doku OSİ ve TOK düzeylerini artırdığı, kırmız verilmesi ile bu düzeylerin azaldığı, doku TAK ve redükte GSH düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre kırmızın oral alınımının, kansere yatkın bir çevrede oksidatif stresi azaltmasına ilaveten antioksidan sistemi koruduğu ve geliştirdiği söylenebilir.

Wu ve ark. (2017) tarafından 132 kolorektal kanserli (76 erkek ve 56 kadın) ve 64 (30 erkek ve 34 kadın) sağlıklı birey üzerinde yapılan çalışmada TOK, TAK ve OSİ parametrelerinin kolorektal kanserin durumu ile ilişkili olduğunu ve kanserin şiddetinin bir göstergesi olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür [203]. Yapılan çalışmada kolon karsinogenezine spesifik DMH verilen fare karaciğer, böbrek ve kolon dokularında OSİ ve TOK düzeylerinin DMH enjeksiyonu ile arttığı, kırmız takviyesi ile ise önemli şekilde azaldığı belirlenmiştir. Aynı zamanda kolon TOS düzeyi diğer dokulardan farklı şekilde, kontrol ve diğer gruplara kıyasla kırmız grubunda önemli şekilde düşük bulunmuştur ($P<0.001$). Bu durumun kırmızın bağırsaklarda gösterdiği yüksek savunma mekanizması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Adenozin ile deoksiadenozinin hücre içi düzeylerinin artması toksik olduğundan ADA, bu nükleosidlerin hücre içi düzeylerinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [125]. ADA aktivitesinin hücrel bağışıklıktan sorumlu olduğu düşünülen fizyolojik işlevleri bulunmaktadır. Bu etkiyi hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak T hücrelerini harekete geçirerek göstermektedirler [204]. ADA'nın, hücrel immünite ve T hücre fonksiyonlarının bir belirteci olduğunun anlaşılmasından sonra romatoid artrit, juvenil idiyopatik artrit, sistemik lupus eritamatozus ve still hastalığı gibi romatolojik hastalıklarda, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarında hastalık aktivasyon belirteci olarak kullanılabilme potansiyeline ilişkin çeşitli araştırmalarda ADA aktiviteleri incelenmiştir. Yapılan bir çalışmada, 43 tane ülseratif

kolit hastası incelenmiş ve aktif hastalığı olanların sağlıklı kontrol grubuna göre önemli şekilde daha yüksek ADA aktivitesine sahip oldukları görülmüştür [205]. Maor ve ark. (2011) [206] Crohn hastalarında yapmış oldukları çalışmada, aktif hastalıkla yüksek ADA düzeyi arasında anlamlı bir ilişki saptanmasına karşın Sajjadi ve arkadaşlarının (2015) [207] 30 Crohn hastası ile yaptıkları çalışmalarında, hastalık aktivasyonu ile ADA aktivitesi arasında bir ilişki saptanmamıştır. Bir başka çalışmada 7,12-dimetilbenz[*a*]antresen ile farelerde oluşturulan karaciğer hasarında ADA aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bu artışın DNA mutasyonları ve serbest radikal konsantrasyonunun artması ile ilişkili olduğu önerilmiştir [208]. Yapılan bu çalışmada DMH verilen farelerde plazma ADA aktivitesinin arttığı, bu artışın kırmızı takviyesi ile istatistiksel olarak önemli şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Kırmızı bu etkisini, hücre içi adenozin ve deoksiadenozin düzeylerini düzenleyerek göstermiş olabileceği düşünülmeye karşın hangi mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştiği ileri çalışmaları gerektirmektedir.

Kırmızın kolorektal kanserin oluşum, gelişim ve tedavisinde kullanılan geleneksel ilaçlara alternatif olup olamayacağı ya da ciddi komplikasyon riski ve yan etkileri olan kemoterapi, radyoterapi, cerrahi ve ileri terapi gibi mevcut sağaltım yöntemlerinin olumsuz etkilerini ortadan kaldırabilme potansiyeli bir yana, ilk defa yapılan bu çalışma ile bir prokarsinojen olan 1,2-dimetilhidrazin ile oluşturulan kansere yatkın mikroçevre ve oksidatif stres ortamında kırmızın koruyucu etkisinin olduğu ifade edilebilir.

Çalışmadan elde edilen önemli sonuçlar şu şekilde özetlenebilir;

DMH uygulaması ile azalan E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 protein ekspresyon düzeyleri önemli şekilde kırmızı takviyesi ile artmıştır.

Kırmızı, SIRT2 ve SIRT3 lokasyonlarında değişikliğe neden olmuştur. Özellikle SIRT3 ile ilgili literatürde daha önce karşılaşılmamış bir bulguya rastlanmıştır. Mitokondriyal lokasyonlu olarak bilinen SIRT3'ün ekspresyonu kırmızı takviyesi ile karaciğer, böbrek ve kolon dokularının çekirdeklerinde artmıştır. SIRT3 protein ekspresyonu düzeyinin

artması ve muhtemelen mitokondriden çekirdeğe yönelmesi ya da çekirdekdeki ekspresyonunun artması ile hücredeki oksidatif stresin azalması arasında önemli bir ilişki olduğu hipotezi ileri sürülebilir. Ancak mitokondriyal lokasyonlu SIRT3'ün neden çekirdeğe yöneldiği/ekspresyonunun arttığı ya da hangi mekanizmalar aracılığı ile bunu gerçekleştirdiği sorusunun yanıtı kanser öncesi sürecin ve kanserin başlangıç aşamasının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

EMT sürecinde önemli bir belirteç olan ve kanserde ekspresyon düzeyi azalan E-kaderinin, yapılan bu çalışma ile kanser oluşmadan önce ve kansere yatkın bir ortamda da ekspresyon düzeyinin azaldığı görülmüştür. Bu bilgi kanserin önceden teşhis edilebilirliğinde yol gösterici olabilir.

Kıımızın DMH gibi güçlü bir prokarsinojenin oluşturmuş olduğu kansere yatkın çevrenin olumsuz etkilerini önemli ölçüde ortadan kaldıracak yeteneği sirtuin proteinleri, yüzey adezyon molekülleri ve antioksidan sistem üzerine göstermiş olduğu çok yönlü etkilerinin bir sonucudur. Probiyotik bakterilerin ve fermantasyon boyunca sentezledikleri önemli metabolitlerin bu süreçte etkili oldukları öngörülse de kıımız bu etkisini hangi özelliğinden dolayı gerçekleştirdiği araştırılması gereken önemli bir konudur.

Çalışmada elde edilen en önemli sonuçlardan birisi de kıımızın hayvanların canlı ağırlıklarını azaltıcı etkisidir. Literatürde probiyotiklerin kilo kaybı üzerine etkileri çelişkili olmakla birlikte altında yatan mekanizma henüz açık değildir. Kıımızın hangi özelliği/özelliklerinden dolayı zayıflatıcı etkisinin olduğu ya da antiobezite etkilerinin olup olmadığı araştırılmalıdır.

Sonuç olarak; DMH uygulaması ile E-kaderin, β -katenin, SIRT2 ve SIRT3 protein ekspresyon düzeylerinin azalması ve antioksidan sistemin bozulması, DNA hasarı ve oksidatif stresi artırarak tümör oluşumunu tetikleyebileceği, kıımızın ise tümör oluşumuna yatkın bu mikroçevrede kanser sinyal yollarında görevli bu moleküllerin ekspresyonlarını düzenleyerek koruyucu bir etki gösterebileceği kanısına varıldı. SIRT2

ve SIRT3 lokasyonundaki değişiklikler ve kanser oluşumu arasındaki moleküler ilişkinin aydınlatılması ilerde yeni tıbbi tedavilerin geliştirilmesi açısından önem oluşturabilir.



5. KAYNAKLAR

- [1] Weinberg, R.A., (2007). The biology of cancer. Second Edition, New York, ABD: Garland Science.
- [2] Lüleyap, H.Ü., (2008). Moleküler Genetiğin Esasları, Nobel Kitabevi, Ankara.
- [3] Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 62, 10–29.
- [4] Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F., (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. Gut, 66 (4) 683-691.
- [5] World Health Organization, (2008). The Global Burden of Disease: (2004) Update. Geneva: World Health Organization.
- [6] Bresalier, R.S. and Kim, Y.S., (1998). Malignant neoplasms of the large intestine. In Gastrointestinal and Liver disease, (eds. Sleisenger and Fordtran) ed 6, vol 2. WB Saunders Company, Philadelphia, 1906-1942.
- [7] Kato, I., Majumdar, A.P., Land, S.J., Barnholtz-Sloan, J.S. and Severson, R.K., (2010). Dietary fatty acids, luminal modifiers, and risk of colorectal cancer. International Journal of Cancer, 127, 942-951.
- [8] American Cancer Society. Cancer Facts and Figs, (2008), Atlanta: American Cancer Society.
- [9] Guessous, I., Dash, C., Lapin, P., Doroshenk, M., Smith, R.A. and Klabunde, C.N., (2010). Colorectal Cancer Screening Barriers and Facilitators in Older Persons, Preventive Medicine, 50, 3-10.
- [10] Değertekin, H., Sarı, Y., Arslan, A., Akgül, Y. and Büyükbayram, H., (1999). Age and Sex Distribution of Colorectal Carcinoma in The Southeast of Turkey, The Turkish Journal of Gastroenterology, 10, 153-156.
- [11] Kıray, E. ve Kariptaş, E., (2015). Probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotiklerin kolorektal kanser ilişkisi. Mikrobiyoloji Dergisi, 13, 28-46.

- [12] Butler, L.M., (2003). Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study. *American Journal of Epidemiology*, 157, 434–445.
- [13] Kampman, E., (1999). Meat consumption, genetic susceptibility, and colon cancer risk: a United States multicenter case-control study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 8,15–24.
- [14] Parkin, D.M., Pisani, P. and Ferlay, J., (1999). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 49, 33–64.
- [15] Crawford, J.M., (1999). The Gastrointestinal System, *Robins Pathologic Basis of Disease*, 6. Edition, pp:775-845, USA.
- [16] Levine, D.S., (1992). Haggitt RC: Histology for Pathologists. In: Sternberg SS. *Colon*. 1 st ed. New York: Raven Press Ltd., 573-591.
- [17] World Cancer Research Found and American Institute for Cancer Research, (2007). *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*, Washington, USA,
- [18] Papadopoulos, N., (1994). Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*, 263, 1625–1629.
- [19] Jass, J.R., (2000). Tumours of the Small and Large Intestines (Including the Anal Region). In: Fletcher CDM, Livingstone C eds. *Diagnostic Histopathology of Tumours*. 2. Edition, pp. 369- 409.
- [20] Leslie, A., Carey, F.A., Partt, N.R. and Steele, R.J., (2002). The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *R.J.C. British Journal of Surgery*, 89, 845-860.
- [21] Behrens, J., (2005). The role of the Wnt signaling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochemical Society Transactions*, 33, 672-675.
- [22] Crawford, J.M. and Kumar, V., (2003), *Robbins Temel Patoloji*. In Çevikbaş U. *Ağız Boşluğu ve Gastrointestinal Sistem*. 7. Edition, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 563-590.
- [23] Bienz, M. and Clevers, H., (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, 103, 311-320.

- [24] Lustig, B. and Behrens, J., (2003). The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*; 129, 199-221.
- [25] Fiala, E.S., (1975). Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer*, 36, 2407–2412.
- [26] Wolter, S. and Frank, N., (1982). Metabolism of 1,2-dimethylhydrazine in isolated perfused rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 42, 335–344.
- [27] Augusto, O., Du Plessis, L.R., and Weingrill, C.L.V., (1985). Spin-trapping of methyl radical in the oxidative metabolism of 1,2-dimethylhydrazine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 126, 853–858.
- [28] Coomes, M.W. and Prough, R.A., (1983). The mitochondrial metabolism of 1,2-disubstituted hydrazines, procarbazine and 1,2-dimethylhydrazine. *Drug Metabolism and Disposition*, 11, 550–555.
- [29] Senapathy, J.G., Jayanthi, S., Viswanathan, P., Umadevi, P. and Nalini, N., (2011). Effect of gallic acid on xenobiotic metabolizing enzymes in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon carcinogenesis in Wistar rats – A chemopreventive approach. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 887–892.
- [30] Pozharisski, K.M., Kapustin, Y.M., Likhachev, A.J. and Shaposhnikov, J.D., (1975). The mechanism of carcinogenic action of 1,2-dimethylhydrazine (SDMH) in rats. *International Journal of Cancer*, 15, 673–683.
- [31] Ergenoğlu, O.M., (1999). 1,2-Dimetilhidrazin ile Kolorektal Kanser Oluşturulan Sıçanlarda Selenyum, Vitamin E ve Levamizolün Etkileri, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- [32] Schieber, M., Chandel, N.S., (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Current Biology*, 24 R453–R462.
- [33] Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. and Kalayci, O., (2012). Oxidative stress and antioxidant defense, *World Allergy Organization Journal*, 5, 9-19.
- [34] Chikara, S., Nagaprashantha L.D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S. and Singhal, S.S., (2018). Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment, *Cancer Letters*, 413, 122-134.

- [35] Tafani, M., Sansone, L., Limana, F., Arcangeli, T., Santis, E., Polese, M., Fini, M. and Russo, M.A., (2016). The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-18.
- [36] Andrisic, L., Dudzik, D., Barbas, C., Milkovic, L., Grune, T. and Zarkovic, N., (2018). Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer, *Redox Biology*, 14, 47–58.
- [37] Sohal, R.S., and Weindruch, R., (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging, *Science*, 273, 59–63.
- [38] Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. and LLeonart, M.E., (2013). Oxidative stress and cancer: an overview, *Ageing Research Reviews*, 12, 376–390.
- [39] Radisky, D.C., Levy, D.D., Littlepage, L.E., Liu, H., Nelson, C.M., Fata, J.E., Leake, D., Godden, E.L., Albertson, D.G., Nieto, M.A., Werb, Z. and Bissel, M.J., (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3- induced EMT and genomic instability. *Nature*, 436, 123-127.
- [40] Yokuş, B. ve Çakır, D.Ü., (2002). İnvivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkırı; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* , 22 (5), 535-543.
- [41] Strzyz, P., (2016). DNA damage response: cell thriving despite DNA damage, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 396.
- [42] Strzyz, P., (2016). DNA damage response: controlling ubiquitylation at DNA lesions, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 329.
- [43] Pearl, L.H., Schierz, A.C., Ward, S.E., Al-Lazikani, B. and Pearl, F.M., (2015). Therapeutic opportunities within the DNA damage response, *Nature Reviews Cancer*, 15, 166–180.
- [44] Goldstein, M. and Kastan, M.B., (2015). The DNA damage response: implications for tumorresponses to radiation and chemotherapy, *Annual Review of Medicine*, 66, 129–143.
- [45] Majidinia, M. and Yousefi, B., (2016). DNA damage response regulation by MicroRNAs as atherapeutic target in cancer, *DNA Repair*, 47, 1–11.

- [46] Kemp, D.E., Sylvia, L.G., Calabrese, J.R., Nierenberg, A.A., Thase, M.E., Reilly-Harrington, N.A., Ostacher, M.J., Leon, A.C., Ketter, T.A., Friedman, E.S., Bowden, C.L., Rabideau, D.J., Pencina, M. and Iosifescu, D.V., (2014). General medical burden in bipolar disorder: Findings from the LiTMUS comparative effectiveness trial. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 129, 24-34.
- [47] Hardie, L.J., Briggs, J.A., Davidson, L.A., Allan, J.M., King, R.F.G.J., Williams, G.I. and Wild, C.P., (2000). The effect of hOGG1 and glutathione peroxidase I genotypes and 3p chromosomal loss on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in lung cancer. *Carcinogenesis*, 21, 167- 172.
- [48] Washington, K. and Hamilton, K., (1998). Expression of beta-catenin and alfa catenin and E-cadherin in barrett's esophageal adenocarcinomas. *Modern pathology*, 11, 805-813.
- [49] Mialhe, A., Levacher, G., Champelovier, P., Martel, V., Serres, M., Knudsen, K. and Seigneurin, C., (2000). Ekspression of E-, P-, N-cadherins and catenins human bladder carcinoma cell lines. *The Journal of Urology*, 164, 826-835.
- [50] Pećina-Slaus, N., (2003). Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell International*, 14, 1-17.
- [51] Bienz, M., (2004). β -Catenin: A pivot between cell adhesion and Wnt signaling. *Current Biology*, 15, 64-67.
- [52] Gottardi, C.J. and Gumbiner, B.M., (2004). Distinct molecular forms of β -catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *The Journal of Cell Biology*, 162, 339-349.
- [53] Huiping. C., Kristjansdottir, S., Jonassan, J.G., Magnusson, J., Egilsson, V. and Ingvarsson, S., (2001). Alterations of E-cadherin and beta-catenin in gastic cancers. *BMC Cancer*, 1, 16-30.
- [54] Mateusa, A.R., Simoes-Correiaa, J., Figueiredoa, J., Heindlb, S., Alvesa, C.C., Surianoa, G., Luberb, B. and Seruca, R., (2009). E-cadherin mutations and cell motility A genotype–phenotype correlation. *Experimental Cell Research*, 315, 1393-1402.

- [55] Dilek, F.H., Topak, N., Tokyol, C., Akbulut, G. and Dilek, O.N., (2010). β -Catenin and its relation to VEGF and cyclin D1 expression in pT3 rectosigmoid cancers. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 21, 365-71.
- [56] Aust, D.E., Terdiman, J.P., Willenbacher, R.F., Chew, K., Ferrell, L., Florendo, C., Molinaro-Clark, A., Baretton, G.B., Löhrs, U. and Waldman, F.M., (2001). Altered distribution of beta catenin, and its binding proteins E-cadherin and APC, in ulcerative colitis related colorectal cancers. *Modern Pathology*, 14, 29-39.
- [57] Perry, J. K. , Lins, R.J., Lobie, P.E. and Mitchell, M.D, (2009). Regulation of invasive growth: similar epigenetic mechanisms underpin tumour progression and implantation in human pregnancy. *Clinical Science*, 118, 451-457.
- [58] Mittal, K., (2004).The 9 lives of β -Catenin. *Human Pathology*, 35: 647-648.
- [59] Tanır, H.G. ve Demirezen, Ş., (2009). Wnt sinyal yolunun biyolojisi ve bu yolda görev alan biyomoleküller. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 29, 1292-7.
- [60] Porfiri, E., Albert, I., Rubinfeld, B., Hovanes, K., Waterman, M. and Polakis, P., (2007). Induction of beta-catenin-LEF-1 complex by WNT-1 and transforming mutants of beta-catenin. *Oncogene*,15, 2833-39.
- [61] Huiping, C., Kristjansdottir, S., Jonasson, J.G., Magnusson, J., Egilsson, V. and Ingvarsson, S., (2001). Alterations of E-cadherin and β -catenin in gastric cancer. *BMC Cancer*, 1, 16.
- [62] Lina Jansson, Grace S. Kim G.S and Cheng A.G.,(2015). Making sense of Wnt signaling linking hair cell regeneration to development, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 1-12.
- [63] Guarino, M., Rubino, B. and Ballabio, G., (2007). The role of epithelial-mesenchymal transitions in cancer pathology. *Pathology*, 39, 305-318.
- [64] Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646–674.
- [65] Hirohashi, S. and Kanai, Y., (2003). Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Science*, 94, 575–581.

- [66] Raman, M., Ambalam, P., Kondepudi, K.K., Pithva, S., Kothari, C., Patel, A.T., Purama, R.K., Dave, J.M. and Vyas, B.R.M., (2013). Potential of probiotics, prebiotics and synbiotics for management of colorectal cancer. *Gut Microbes*, 4, 181–192.
- [67] Hill, H.S. and Guarner, F., (2004). Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgraduate Medical Journal*, 80, 516-526.
- [68] Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. and Medzhitov, R., (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118, 229 –241.
- [69] Zeuthen, L.H., Fink, L.N. and Frøkiær, H., (2008). Toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain-2 play divergent roles in the recognition of gut-derived lactobacilli and bifidobacteria in dendritic cells. *Immunology*, 124, 489–502.
- [70] Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Yamasaki, S. and Takeda, T., (2001). Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic lactobacillus strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 135-140.
- [71] Strus, M., Pakosz, K., Gościński, H., Przondo-Mordarska, A., Rozynek, E., Pituch, H., Meisel- Mikołajczyk, F. and Heczko, P.B., (2001). Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria strains against anaerobic gastrointestinal tract pathogens (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). *Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia*, 53, 133–142.
- [72] Ceyhan, N. ve Aliç, H., (2012). Bağırsak Mikroflorası ve Probiyotikler, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 5 (1), 107-113.
- [73] Coşkun, T., (2006). Pro-, Pre- ve Sinbiyotikler Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 49, 128-1.
- [74] Sandra, A. dos Reis, Lisiane L. da Conceição, Nathane P. Siqueira, Damiana D. Rosa, Letícia L. da Silva and Maria do Carmo G. Peluzio, (2017). Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer, *Nutrition Research*, 37, 1–19.

- [75] Ahn, J., Sinha, R., Pei, Z., Dominianni, C., Wu, J., Shi, J., Goedert, J.J., Hayes, R.B. and Yang, L., (2013). Human gut microbiome and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 105 (24), 1907-11.
- [76] Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R. and Dutilh, B.E., (2012). A bacterial driverpassenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 575–82.
- [77] Zhu, Q., Gao, R., Wu, W. and Qin, H., (2013). The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. *Tumor Biology*, 34, 1285–300.
- [78] Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., Rhodes, J.M., Stintzi, A., Simpson, K.W., Hansen, J.J., Keku, T.O., Fodor, A.A. and Jobin, C., (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 338, 120–3.
- [79] Lee, N.K., Park, J.S., Park, E. and Paik, H.D., (2007). Adherence and anticarcinogenic effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD in the large intestine. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 274–8.
- [80] Park, E., Jeon, G.I., Park, J.S. and Paik, H.D., (2007). A probiotic strain of *Bacillus polyfermenticus* reduces DMH induced precancerous lesions in F344 male rat. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 569–74.
- [81] Sivieri, K., Spinardi-Barbisan, A.L.T., Barbisan, L.F., Bedani, R., Pauly, N.D., Carlos, I.Z., Benzatti, F., Vendramini, R. C. and Rossi, E. A., (2008). Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male wistar rats. *European Food Research and Technology*, 228, 231–7.
- [82] Kumar, A., Singh, N.K. and Sinha, P.R., (2010). Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine induced colon genotoxicity in rats by the administration of probiotic curd. *Molecular Biology Reports*, 37, 1373–6.
- [83] Appleyard, C.B., Cruz, M.L., Isidro, A.A., Arthur, J.C., Jobin, C. and De Simone, C., (2011). Pretreatment with the probiotic VSL#3 delays transition from inflammation to dysplasia in a rat model of colitis-associated cancer.

American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 301, 1004–13.

- [84] Liboredo, J.C., Anastácio, L.R., Pelúzio, M.C.G., Valente, F.X., Penido, L.C.P., Nicoli J.R. and Correia, M.I., (2013). Effect of probiotics on the development of dimethylhydrazine-induced preneoplastic lesions in the mice colon. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 28, 367–72.
- [85] Verma, A. and Shukla, G., (2014). Synbiotic (*Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus acidophilus* + inulin) attenuates oxidative stress and colonic damage in 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride-induced colon carcinogenesis in Sprague–Dawley rats: a long-term study. *European Journal of Cancer Prevention*, 23, 550–9.
- [86] Urbanska, A.M., Bhatena, J., Cherif, S. and Prakash, S., (2012). Orally delivered microencapsulated probiotic formulation favorably impacts polyp formation in APC (Min/+) model of intestinal carcinogenesis. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*, 44 (1), 1-11.
- [87] Schwabe, R.F. and Jobin, C., (2013). The microbiome and cancer. *Nature*, 13, 800-12.
- [88] Vipperla, K. and O'Keefe, S.J., (2012). The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. *Nutrition in Clinical Practice*, 27, 624–35.
- [89] Weir, T.L., Manter, D.K., Sheflin, A.M., Barnett, B.A., Heuberger, A.L. and Ryan, E.P., (2013). Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. *PLOS ONE*, 8, 1-10.
- [90] Karczewski, J., Troost, F.J., Konings, I., Dekker, J., Kleerebezem, M., Brummer, R.J. and Wells, J.M., (2010). Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289, 851–9.
- [91] Danova, S., Petrov, K., Pavlov, P. and Petrova P., (2005). Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains involved in koumiss fermentation. *Society of Dairy Technology*, 2, 100-105.

- [92] Yaygın, H., (1991). Kımızın nitelikleri ve sağlıkıla ilgili özellikleri. *Gıda*, 16 (2), 111-115.
- [93] Kerr, T.J. and McHale, B.B., (2001). *Applications in General Microbiology: A Laboratory Manual*. Hunter Textbooks, Winston-Salem.
- [94] Montanari, G., Zambonelli, C., Graziati L., Kamesheva, G.K. and Shigaeva, M.K., (1996). *Saccharomyces unisporus* as the principal alcoholic fermentation microorganisms of traditional koumiss. *Journal of Dairy Research*, 63, 327-331.
- [95] Viljoen, B.C., (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 37-44.
- [96] Uluğtuğ, N., (1939). *Kımız*. Ankara Basımevi. Ankara. 26ss.
- [97] Kurmann, J.A., Rasic, J.Lj. and Kroger, M., (1982). *Encyclopedia of fermented fresh milk products*. AVI Books Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 368 pp.
- [98] Michan, S. and Sinclair, D., (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochemical Journal*, 404, 1-13.
- [99] Michishita, E., Park, J.Y., Burneskis, J.M., Barrett, J.C. and Horikawa, I., (2005). Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 4623-4635.
- [100] Kulić, A., Sirotković-Skerlev, M., Dedić Plavetić, N., Belev, B., Kralik-Ogüić, S., Ivić, M. and Vrbanec, D., (2014). Sirtuins In Tumorigenesis. *Periodicum Biologorum*, 116, 381–386.
- [101] Taddei, A., Roche, D., Bickmore, W.A. and Almouzni, G., (2005). The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anti-cancer therapy?. *EMBO Reports*, 6, 520-4.
- [102] Palmirotta, F., Cives, M., Della-Morte, D., Capuani, B., Lauro, D., Guadagni, F. and Silvestris, F., (2016). Sirtuins and Cancer: Role in the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-9.
- [103] Guarente, L. and Picard, F., (2005). Calorie restriction—the SIRT2 connection. *Cell*, 120, 473–482.

- [104] Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., Hu, L.S., Cheng, H.L., Jedrychowski, M.P., Gygi, S.P., Sinclair, D.A., Alt, F.W. and Greenberg, M.E., (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 303:2011-2015.
- [105] Bordone, L. and Guarente, L., (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 298–305.
- [106] Nemoto, S., Fergusson, M.M. and Finkel, T., (2005). SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α . *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 16456-60.
- [107] Herranz, D., Muñoz-Martin, M., Cañamero, M., Mulero, F., Martinez-Pastor, B., Fernandez-Capetillo, O. and Serrano, M., (2010). Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nature Communications*, 1, 3.
- [108] Mendes, K.L., Lelis, D.F. and Santos, S.H.S., (2017). Nuclear sirtuins and inflammatory signaling pathways. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 38, 98-105.
- [109] Lo Sasso, G., Menzies, K.J., Mottis, A., Piersigilli, A., Perino, A., Yamamoto, H., Schoonjans, K. and Auwerx, J., (2014). SIRT2 deficiency modulates macrophage polarization and susceptibility to experimental colitis, *PLOS ONE*, 9, 1-12.
- [110] Lombard, D.B. and Zwaans, B.M.M. (2014). SIRT3: as simple as it seems. *Gerontology*, 60, 56–64.
- [111] Argmann, C. and Auwerx, J., (2006). Insulin secretion: SIRT4 Gets in on the Act. *Cell*, 126, 837–839.
- [112] Nakagawa, T., Lomb, D. J., Haigis, M.C. and Guarente, L., (2009). SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle, *Cell*, 137, 560–570.
- [113] Grummt I. and Pikaard, C. S., (2003). Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 641–649.

- [114] Choudhary, C., Weinert, B.T., Nishida, Y., Verdin, E. and Mann, M., (2014). The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 536–550.
- [115] Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S.M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., Xiong, Y. and Guan, K.L., (2010). Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*, 327, 1000-4.
- [116] Parihar, P., Solanki, I., Mansuri, M.L. and Parihar, M.S., (2015). Mitochondrial sirtuins: emerging roles in metabolic regulations, energy homeostasis and diseases. *Experimental Gerontology*, 61, 130-41.
- [117] Palacios, O.M., Carmona, J.J., Michan, S., Chen, K.Y., Manabe, Y., Ward, J.L.3rd, Goodyear, L.J. and Tong, Q., (2009). Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle. *Aging (Albany NY)*, 1 (9), 771-83.
- [118] Ahn, B.H, Kim, H.S., Song, S., Lee, I.H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C.X. and Finkel T., (2008). A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (38), 14447–52.
- [119] Beal, M.F., (2005). The theory that oxidative stress limits lifespan and causes age-related disease rests on experiments in invertebrates and correlative evidence from studies in mammals. This theory now gains a strong experimental basis in mammals. *Nature Medicine*, 11, 598–599.
- [120] Bell, E.L. and Guarente, L., (2011). The SirT3 divining rod points to oxidative stress. *Molecular Cell*, 42 (5), 561-8.
- [121] Zhang, W., Shi, X., Peng Y., Wu, M., Zhang, P., Xie, R., Wu, Y., Yan, Q., Liu, S. and Wang, J., (2015). HIF-1 α promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis through direct regulation of ZEB1 in colorectal cancer, *PLOS ONE*, 10 (6), 1-16.
- [122] Firestein, R., Blander, G., Michan, S., Oberdoerffer, P., Ogino, S., Campbell, J., Bhimavarapu, A., Luikenhuis, S., de Cabo, R., Fuchs, C., Hahn, W.C.,

- Guarente, L.P. and Sinclair, D.A., (2008). The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLOS ONE*, 3(4), 1-9.
- [123] Dickinson, D.A. and Forman, H.J., (2002). Glutathione in defense and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 973, 488–504.
- [124] Lu, S.C., (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and controversies. *FASEB Journal*, 13, 1169-1183.
- [125] Sauer, A., Brigida, I., Carriglio, N. and Aiuti, A., (2012). Auto immun edysregulation and purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. *Frontiers Immunology*, 3, 1–19.
- [126] Balis, M.E., (1985). Adenosine deaminase and Malignant Cells. *Annals New York Academy of Sciences*, 45, 142-149.
- [127] Hatipoğlu, K., Yüksekol, İ., Özkan, M., Balkan, A., Koparan, E.Z., Bedirhan, İ., Bilgiç, H. ve Demirci, N., (2003). Tüberküloz tanısında serum adenzin deaminaz ölçümünün önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45(2), 165–168.
- [128] Spychala J. (2000). Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacology-Therapeutics*, 87 (2-3), 161–73.
- [129] Hirschhorn, R., Nicknam, M.N., Eng, F., Yang, D.R. and Borkowsky, W., (1992). Novel deletion and a new missense mutation (Glu 217 Lys) at th catalytic site in two adenosine deaminase alleles of a patient with neonatal on set adenosine deaminase- severe combined immuno deficiency. *The Journal of Immunology*, 149 (9), 3107-12.
- [130] Vanos, V. and Cox, L., (1986). Rapid routine method for the detection of lactic acid bacteria among competitive flora. *Food Microbiology*, 3, 223–234.
- [131] Kandler, O. and Weiss, N., (1986). Regular, Nonsporing Gram positive rods. Genus *Lactobacillus*. Williams and Wilkins, Baltimore, 2, 1208–1234.
- [132] Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G. and Gobbato, N., (1995). Immune system stimulation by probiotics. *Journal of Dairy Science*, 78, 1597–1606.
- [133] 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, 248–254.

- [134] Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680–685.
- [135] Giusti, G. 1974. In: *Methods of Enzyme Analysis*. Bergmayer ed., Academic Press Inc., New York
- [136] Le Chatelier, E. and Nielsen, T., (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500, 541–546,
- [137] Park, S. and Bae, J.H., (2015). Probiotics for weight loss: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Research*, 35 (7), 566-75.
- [138] Thurner, N., Deschner, E.E., Stonehill, E.H. and Lipkin, M., (1973). Induction of Adenocarcinomas of the Colon in Mice by Weekly Injections of 1,2-Dimethylhydrazine. *Cancer Research*, 33, 940-945.
- [139] Jackson, P.E., Copper, D.P., O'Connor, P.J. and Povey, A.C., (1999). The Relationship Between 1,2-Dimethylhydrazine Dose and the Induction of Colon Tumors: Tumour Development in Female SWR Mice Does Not Require a K-Ras Mutational Event. *Carcinogenesis*, 20, 509-513.
- [140] Wang, J.G., Wang, D.F., Lv, B.J. and Si, J.M., (2004). A Novel Mouse for Colitis-Associated Colon Carcinogenesis Induced by 1,2-Dimethylhydrazine and Dextran Sulfate Sodium. *World Journal of Gastroenterology*, 10, 2958-2962.
- [141] Newell, L.E. and Heddle, J.A., (2004). The Potent Colon Carcinogen, 1,2-Dimethylhydrazine Induces Mutations Primarily in the Colon. *Mutation Research*, 564, 1-7.
- [142] Leblanc, A.M. and Perdigon, G., (2004). Yogurt Feeding Inhibits Promotion and Progression of Experimental Colorectal Cancer. *Medical Science Monitor*, 10, 96-104.
- [143] Heijstek, M.W., Kranenburg, O., Rinkes, I.H.M.M., (2005). Mouse Models of Colorectal Cancer and Liver Metastases. *Digestive Surgery*, 22, 16-25.
- [144] Cooper, H.K., Buecheler, J. and Kleihues, P., (1978). DNA Alkylation in Mice with Genetically Different Susceptibility to 1,2-Dimethylhydrazine-induced Colon Carcinogenesis. *Cancer Research*, 38, 3063-5.

- [145] O'Hara, A.M. and Shanahan, F., (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7 (7), 688–693.
- [146] Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M. and Reddy D.N., (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21 (29), 8787–803.
- [147] Zhu, D., Chen, X., Wu, J., Ju, Y., Feng, J., Lu, G., Ouyang, M., Ren, B. and Li, Y., (2012). Effect of perioperative intestinal probiotics on intestinal flora and immune function in patients with colorectal cancer, *Journal of Southern Medical University*, 32 (8), 1190–1193.
- [148] Zhang, M., Fan, X., Fang, B., Zhu, C., Zhu, J. and Ren, F., (2015). Effects of *Lactobacillus salivarius* Ren on cancer prevention and intestinal microbiota in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat model, *Journal of Microbiology*, 53 (6), 398–405.
- [149] Ijssennagger, N., Belzer, C., Hooiveld, G.J., Dekker, J., van Mil, S.W., Müller, M., Kleerebezem, M. and van der Meer, R.N., (2015). Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (32), 10038–43.
- [150] Janakiram, N.B. and Rao, C.V., (2014). The role of inflammation in colon cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 816, 25–52.
- [151] Kim, S.W., Kim, H.M., Yang, K.M., Kim, S.A., Kim, S.K., An, M.J., Park, J.J., Lee, S.K., Kim, T.I., Kim, W.H. and Cheon, J.H., (2010). *Bifidobacterium lactis* inhibits NF-kappaB in intestinal epithelial cells and prevents acute colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16 (9), 1514–1525.
- [152] Nowak, A., Slizewska, K., Blasiak, J. and Libudzisz, Z., (2014). The influence of *Lactobacillus casei* DN 114 001 on the activity of faecal enzymes and genotoxicity of faecal water in the presence of heterocyclic aromatic amines. *Anaerobe*, 30, 129–36.
- [153] Zhu, J., Zhu, C., Ge, S., Zhang, M., Jiang, L., Cui, J. and Ren, F., (2014). *Lactobacillus salivarius* Ren prevent the early colorectal carcinogenesis in 1,2-

dimethylhydrazine-induced rat model. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 208-16.

- [154] Hatakka, K., Holma, R., El-Nezami, H., Suomalainen, T., Kuisma, M., Saxelin, M., Poussa, T., Mykkänen, H. and Korpela, R., (2008). The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. *The International Journal of Food Microbiology*, 128, 406–10.
- [155] Burns, A.J. and Rowland, I.R., (2004). Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutation Research*, 551, 233–43.
- [156] Rastall, R.A., Gibson, G.R., Gill, H.S., Guarner, F., Klaenhammer, T.R., Pot, B., Reid, G., Rowland, I.R. and Sanders, M.E., (2005). Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology*, 52, 145-152.
- [157] Özer, B., (2000). Fermented milks. Products of Eastern Europe and Asia,. In: R.K. Robindon, C.A. Batt, &P.D. Patel (Editors), *Encyclopedia of food microbiology*, Academic Press., London, UK. pp. 803-804.
- [158] Montanari, G., Zambonelli, C., Graziai, L., Kamesheva, G.K. and Shigaeva, M.K., (1996). *Saccharomyces unisporus* as the principal alcoholic fermentation microorganisms of traditional koumiss. *Journal of Dairy Research*, 63, 327-331.
- [159] Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X. and Seto, E., (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, 363, 15-23.
- [160] Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., Mann, M., (2009). Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and CoRegulates Major Cellular Functions. *Science*, 325, 834-840.
- [161] Tao, R., Coleman, M.C., Pennington, J.D., Ozden, O., Park, S.H., Jiang, H., Kim, H.S., Flynn, C.R., Hill, S., Hayes McDonald, W., Olivier, A.K., Spitz, D.R. and Gius, D., (2010). Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily

conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Molecular Cell*, 40, 893-904.

- [162] Rangarajan, P., Karthikeyan, A., Lu, J., Ling, E.A. and Dheen, S.T., (2015). Sirtuin 3 regulates Foxo3a-mediated antioxidant pathway in microglia. *Neuroscience*, 311, 398- 414.
- [163] Chen, Y., Zhang, J., Lin, Y., Lei, Q., Guan, K.L., Zhao, S. and Xiong, Y., (2011). Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS. *EMBO Reports*, 12, 534-541.
- [164] Muller, F.L., Liu, Y. and Van Remmen, H., (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (47), 49064–73.
- [165] Papa, L. and Germain, D., (2014). Sirt3 regulates the mitochondrial unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology*, 34 (7), 1378.
- [166] Braissant, O., (2010). Ammonia toxicity to the brain: effects on creatine metabolism and transport and protective roles of creatine. *Molecular Genetics and Metabolism*, 769, 53–58.
- [167] Nakagawa, T., Lomb, D.J., Haigis, M.C. and Guarente, L., (2009). SIRT5 Deacetylates carbamoyl 1021 phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell*, 137 (3), 560–570.
- [168] Nakamura, Y., Ogura, M., Tanaka, D. and Inagaki, N., (2008). Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by coexpression with SIRT5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366, 174 –179.
- [169] Scher, M.B., Vaquero, A. and Reinberg, D., (2007). SirT3 is a nuclear NAD₊-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Development*, 21, 920–928.
- [170] Iwahara, T., Bonasio, R., Narendra, V. and Reinberg, D., (2012). SIRT3 Functions in the Nucleus in the Control of Stress-Related Gene Expression *Molecular and Cellular Biology*, 32, 5022–5034.

- [171] Osborne, B., Bentley, N.L., Montgomery, M.K, and Turner, N., (206). The role of mitochondrial sirtuins in health and disease, *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 164–174.
- [172] Guarente, L., (2007). Sirtuins in aging and disease. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 72, 483–488.
- [173] Bell, E.L., Emerling, B.M., Ricoult, S.J. and Guarente, L., (2011). SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene*, 30, 2986-2996.
- [174] Kim, H. S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K.S., Aykin-Burns, N., Pennington, J.D., van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, K.M., Vassilopoulos, A., Ozden, O., Park, S.H., Singh, K.K., Abdulkadir, S.A., Spitz, D.R., Deng, C.X. and Gius, D., (2010). SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell*, 17, 41-52.
- [175] Fiskus, W., Coothankandaswamy, V., Chen, J., Ma, H., Ha, K., Saenz, D.T., Krieger, S.S., Mill, C.P., Sun, B., Huang, P., Mumm, J.S., Melnick, A.M. and Bhalla, K.N., (2011). SIRT2 deacetylates and inhibits the peroxidase activity of peroxiredoxin-1 to sensitize breast cancer cells to oxidant stress inducing agents. *Genes Cancer*, 2 (6), 648–662.
- [176] Liu, P.Y., Xu, N., Malyukova, A., Scarlett, C.J., Sun, Y.T., Zhang, X.D., Ling, D., Su, S.P., Nelson, C., Chang, D.K., Koach, J., Tee, A.E., Haber, M., Norris, M.D., Toon, C., Rومان, I., Xue, C., Cheung, B.B., Kumar, S., Marshall, G.M., Biankin, A.V. and Liu, T., (2013). The histone deacetylase SIRT2 stabilizes Myc oncoproteins. *Cell Death Differ*, 20, 503-5.
- [177] Chen, J., Chan, A.W, To, K.F., Chen, W., Zhang, Z., Ren, J., Song, C., Cheung, Y.S., Lai, P.B., Cheng, S.H., Ng, M.H., Huang, A. and Ko, B.C., (2013). SIRT2 overexpression in hepatocellular carcinoma mediates epithelial to mesenchymal transition by protein kinase B/glycogen synthase kinase-3b/b-catenin signaling. *Hepatology*, 57, 2287-2298.
- [178] Singh, S., Kumar, P.U., Thakur, S. Kiran, S., Sen, B., Sharma, S., Rao, V.V., Poongothai, A.R. and Ramakrishna, G., (2015). Expression/localization

patterns of sirtuins (SIRT1, SIRT2, and SIRT7) during progression of cervical cancer and effects of sirtuin inhibitors on growth of cervical cancer cells. *Tumor Biology*, 36, 6159– 6171.

- [179] Xu, W., Jiang, K., Shen, M., Qian, Y. and Peng, Y., (2015). SIRT2 suppresses non-small cell lung cancer growth by targeting JMJD2A. *Biological Chemistry*, 396, 929–936.
- [180] Ozden, O., (2015). SIRT2-JAK1 Interaction Decreases IL-6 Induced Inflammatory Response in Cancer Cells. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21 (6) 813-817.
- [181] Ma, L., Maruwge, W., Strambi, A., D'Arcy, P., Pellegrini, P., Kis, L., de Milito, A., Lain, S. and Brodin, B., (2014). SIRT1 and SIRT2 inhibition impairs pediatric soft tissue sarcoma growth. *Cell Death & Disease*, 5, 1-11.
- [182] Firestein, R., Blander, G., Michan, S. Oberdoerffer, P., Ogino, S., Campbell, J., Bhimavarapu, A., Luikenhuis, S., de Cabo, R., Fuchs, C., Hahn, W.C., Guarente, L.P. and Sinclair, D.A., (2008). The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLOS ONE*, 3(4), 1-9.
- [183] Nguyen, P., Lee, S., Lorang-Leins, D., Trepel, J. and Smart, D.K., (2014). SIRT2 interacts with beta-catenin to inhibit Wnt signaling output in response to radiation-induced stress. *Molecular Cancer Research*, 12, 1244–53.
- [184] Inumaru, J., Nagano, O. and Takahashi, E., (2009). Molecular mechanisms regulating dissociation of cell–cell junction of epithelial cells by oxidative stress. *Genes to Cells*, 14, 703–716.
- [185] Richmond, P.J., Karayiannakis, A.J., Nagafuchi, A., Kaisary, A.V. and Pignatelli, M., (1997). Aberrant E-cadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. *Cancer Research*, 57, 3189–3193.
- [186] Morton, R.A., Ewing, C.M., Nagafuchi, A., Tsukita, S. and Isaacs, W.B., (1993). Reduction of E-cadherin levels and deletion of the alpha-catenin gene in human prostate cancer cells. *Cancer Research*, 53, 3585–3590.

- [187] Aresu, L., Pregel, P., Zanetti, R., Caliari, D., Biolatti, B. and Castagnaro, M., (2010). E-cadherin and b-catenin expression in canine colorectal adenocarcinoma. *Research in Veterinary Science*, 89, 409–414.
- [188] Masszi, A., Fan, L., Rosivall, L., McCulloch, C.A., Rotstein, O.D., Mucsi, I. and Kapus, A., (2004). Integrity of cell–cell contacts is a critical regulator of TGF-beta 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition: role for beta-catenin. *American Journal of Pathology*, 165, 1955–1967.
- [189] Harington, K.J. and Syrigos, K.N., (2000). The Role of E-Cadherin-Catenin Complex: More Than an Intercellular Glue?. *Annals of Surgical Oncology*, 7, 783-788.
- [190] Gorowiec, M.R, Borthwick, L.A., Parker, S.M., Kirby, J.A., Saretzki, G.C. and Fisher, A.J., (2012) Free radical generation induces epithelial-to-mesenchymal transition in lung epithelium via a TGF-β1-dependent mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*, 52 (6), 1024-32.
- [191] Zhang, Y.Q., Liu, Y.J., Mao, Y.F., Dong, W.W., Zhu, X.Y. and Jiang, L., (2015). Resveratrol ameliorates lipopolysaccharide-induced epithelial mesenchymal transition and pulmonary fibrosis through suppression of oxidative stress and transforming growth factor-β1 signaling. *Clinical Nutrition*, 34 (4), 752-60.
- [192] Fukawa, T., Kajiya, H., Ozeki, S., Ikebe, T. and Okabe, K., (2012). Reactive oxygen species stimulates epithelial mesenchymal transition in normal human epidermal keratinocytes via TGF-beta secretion. *Experimental Cell Research*, 318 (15), 1926-32.
- [193] Iizuka, D., Sasatani, M., Barcellos-Hoff, M.H. and Kamiya, K., (2017). Hydrogen Peroxide Enhances TGFβ-mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Mammary Epithelial MCF-10A Cells. *Anticancer Research*, 37, 987-996.
- [194] Bowerman, B., (2005). Oxidative stress and cancer: a β-catenin convergence. *Science*, 308, 1119–1120.

- [195] Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L. and Burgering, B.M. (2000). AFX-like Forkheadtranscription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1, *Nature*, 404, 782–787.
- [196] Lento, W., Ito, T., Zhao, C., Harris, J.R., Huang, W., Jiang, C., Owzar, K., Piryani, S., Racioppi, L., Chao, N. and Reya, T., (2014). Loss of β -catenin triggers oxidative stress and impairs hematopoietic regeneration. *Genes and Development*, 28 (9), 995–1004.
- [197] Yao, Y. and Dai, W., (2014). Genomic Instability and Cancer. *Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis*, 5, 1-17.
- [198] Someya, S., Yu, W., Hallows, W.C., Xu, J., Vann, J.M., Leeuwenburgh, C., Tanokura, M., Denu, J.M. and Prolla, T.A., (2010). Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell*, 143, 802–812.
- [199] K.R.Anilakumar, K.R. Nagaraj N.S. and Santhanam, K., (2004). Protective effects of amla on oxidative stress and toxicity in rats challenged with dimethyl hydrazine. *Nutrition Research*, 24, 313-319.
- [200] Jrah-Harzallah, H., Ben-Hadj-Khalifa, S., Almawi, W.Y., Maaloul, A., Houas, Z. and Mahjoub, T., (2013). Effect of thymoquinone on 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative stress during initiation and promotion of colon carcinogenesis. *European Journal of Cancer*, 49 (5), 1127-35.
- [201] Anilakumar, K.R., Khanum, F. and Bawa, A.S., (2010). Effect of Coriander Seed Powder (CSP) on 1, 2-Dimethyl Hydrazine-Induced Changes in Antioxidant Enzyme System and Lipid Peroxide Formation in Rats. *Journal of Dietary Supplements*, 7 (1), 9-20.
- [202] Habib, H.M., Ibrahim, W.H., and Hassan, M.H., (2013). Camel milk lactoferrin reduces the proliferation of colorectal cancer cells and exerts antioxidant and DNA damage inhibitory activities. *Food Chemistry*, 141, 148-152

- [203] Wu, R., Feng, J., Yang, Y., Dai, C., Lu, A., Liao, Y., Xiang, M., Huang, Q., Wang, D. and Du, X., (2017). Significance of Serum Total Oxidant/Antioxidant Status in Patients with Colorectal Cancer, PLOS ONE, 1-13.
- [204] Sogut, S., Aydin, E., Elyas, H., Aksoy, N., Ozyurt, H., Totan, Y., and Akyol. O., (2002). The activities of serum adenosine deaminase and xanthine oxidase enzymes in Behcet's disease. *Clinica Chimica Acta*, 325, 133–138.
- [205] Beyazit, Y., Koklu, S., Tas, A Purnak, T., Sayilir, A., Kurt, M., Turhan, T., Celik, T., Suvak, B., Torun, S. and Akbal, E., (2012). Serum adenosine deaminase activity as a predictor of disease severity in ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 6 (1), 102–7.
- [206] Maor, I., Rainis, T, Lanir, A and Lavy, A., (2011). Adenosine deaminase activity in patients with Crohn's disease: distinction between active and nonactive disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23 (7), 598–602.
- [207] Sajjadi, M., Gholamrezaei, A. and Daryani, N.E., (2015). No Association Between Serum Adenosine Deaminase Activity and Disease Activity in Crohn's Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 60, 1755-60.
- [208] Ozturk, I.C and Batcioglu, K., (2002), Investigation of the Relationship between Nitric Oxide Metabolites Levels and Adenosine Deaminase Activity in 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene Induced Mouse Liver. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 16, 260-262.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Canan GÜLMEZ
Doğum Yeri ve Tarihi : KADIKÖY/ 1990
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (e-posta) : canan_glm@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :Çekmeköy Mehmetçik Lisesi /2004-2007
Lisans :Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü /2008-2012
Yüksek Lisans :Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı /2012-2014

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Erzurum Atatürk Üniversitesi Atateknokent'te "ENSAN KİMYA (Canan Gülmez)" adlı Ar-Ge firmasında, firma sahibi, 2015-2016.

Uluslararası SCI, SCI Expanded, SSCI, AHCI kapsamındaki hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Gulmez, C., Atakisi, O., "Alterations in Folic Acid, Vitamin B12, Thyroid Hormones and Antioxidant/oxidant Levels in Different Age Groups of Sprague Dawley Rats", Acta Medica Mediterranea, 32: 361-365, 2016.

2- Kart,A., Koc, E., Yıldız Dalgınlı, K., **Gulmez, C.,** Sertcelik, M., Atakisi, O., "The Therapeutic Role of Glutathione in Oxidative Stress and Oxidative DNA

Damage Caused by Hexavalent Chromium”, Biological Trace Element Research, 174:387-391, 2016.

3- Atakisi, E., Topcu, B., Yıldız Dalgınlı, D., **Gulmez, C.**, Atakisi, O., “Acute Effects of N-Acetylcysteine on Total Antioxidant Capacity, Total Oxidant Capacity, Nitric Oxide Level and Gammaglutamyl Transpeptidase Activity in Rabbits”, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 40:871-875, 2016.

4- Ilgun, T., Yıldız Dalgınlı, K., **Gulmez, C.**, Atakisi, O., “Changes in the Levels of Liver HSP70, Plasma Nitric Oxide, and Antioxidative System in Experimentally Induced Endotoxemia Mouse Model and the Role of Reduced Glutathione”, Turkish Journal of Biology, 40: 1272-1277, 2016.

5- **Gulmez, C.**, Atakisi, O., Yıldız Dalgınlı, K., Atakişi E. “A Novel Detergent Additive: Organic solvent- and Thermo-alkaline-stable Recombinant Subtilisin”, International Journal of Biological Macromolecules, 108:436-443, 2018

6- **Gulmez, C.**, Altınkaynak, C., Ozdemir, N., Atakisi, O., “Proteinase K hybrid nanoflowers (P-hNFs) as a novel nanobiocatalytic detergent additive”, Journal of Biotechnology, 2018 (baskıda).

7- Atakisi, O., Yıldız Dalgınlı, K., **Gulmez, C.**, Kaya, R., Ozden, O., Kart, A., Atakişi, E., “Boric acid and Borax Supplementation Reduces Weight Gain in Overweight Rats and Alter L-Carnitine and IGF-I Levels”, International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 2018 (baskıda).

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1- Atakişi, O., Yıldız Dalgınlı, K., Atakişi E., Kaya, R., **Gülmez, C.:** “The Effect of Boron Compounds on the levels of L- Carnitine, Leptin, IGF-I and HSP70 in Rat Fed with High-Fat Diet”. 1st International Turkic World

Conference on Chemical Sciences and Technologies, 27 October - 01 November Bosnia and Herzegovina, Sarajevo, 2015 (Sözlü).

2- Atakişi, O., **Gülmez, C.**, Yildiz Dalginli, K. “Expression and Purification of A Recombinant Serine Protease from *Bacillus Subtilis*”, International Conference on Research in Education and Science (ICRES), 18-21 Mayıs, Ephesus-Kusadası ,Turkey, 2017 (Sözlü).

3- Atakişi, E., Atakişi, O., Ozbey, C., **Gülmez, C.**, Yildiz Dalginli, K. “The Evaluation of Some Biochemical Parameters and Oxidative-Antioxidative Balance in Aluminium Chloride Induced Toxicity”, International Conference on Reserch in Education and Science (ICRES), 18-21 Mayıs, Ephesus-Kusadası, Turkey, 2017 (Sözlü).

4- Ilgun,T., Yildiz Dalginli, K., **Gulmez, C.**, Atakisi, O. “Changes in the Levels of Liver HSP70, Plasma Nitric Oxide, and Antioxidative System in Experimentally Induced Endotoxemia Mouse Model and the Role of Reduced Glutathione”, International Conference on Reserch in Education and Science (ICRES), 18-21 Mayıs, Ephesus-Kusadası ,Turkey, 2017 (Sözlü).

5- Atakişi, O., **Gülmez, C.**, Ozbey, C. “Kinetic Study of Serine Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* 1023 (PTTC)”, International Conference on Reserch in Education and Science (ICRES), 18-21 Mayıs, Ephesus-Kusadası, Turkey, 2017 (Sözlü).

6- Atakişi, E., Atakisi, O., **Gulmez, C.**, Yildiz Dalginli, K. “Lipopolysaccharide Treatment Changes Plasma Total Oxidant and Antioxidant Capacity on A Time Dependent Manner in Rabbits” 3rd International Conference on New Trends in Chemistry April 28-30, Helsinki, Finland, 2017 (Sözlü).

7- Altinkaynak C., **Gulmez C.**, Özdemir N., Atakisi O., “Self-assembled Enzyme-inorganic Hybrid Nanostructures and Their Characterization”, The International Conference on Materials Science, Machine and Automotive

Engineerings and Technology'18, April 10-12, Cesme, Izmir, Turkey, 2018 (Sözlü).

8- Atakisi, E., Ozturkler, M., Yildiz Dalgınlı, K., **Gulmez, C.**, Atakisi, O., "Effects of Omega-3 Oil acids on Adenozine Deaminase Activity, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and Reduced Glutathion Levels in Aluminium Toxicity", 1st International Veterinary Biochemistry and Clinical Biochemistry Congress, 12-15 April, Hatay, Turkey, 2018 (Sözlü).

9- Yildiz Dalgınlı, K., Atakisi, O., **Gulmez, C.**, "Expression and Biochemical Characterization of Recombinant Lipase from *Bacillus Pumilus* MBB03", 1st International Veterinary Biochemistry and Clinical Biochemistry Congress, 12-15 April, Hatay, Turkey, 2018 (Sözlü).

Desteklenen projeler

1- "Endüstride Yaygın Olarak Kullanılan Proteazın Üretimi" adlı "0026.TGSD.2015-2" nolu TEKNOGİRİŞİM projesi Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından desteklenmiştir (Proje Yürütücüsü, 2015-2016, 75.000,00 TL destek miktarı).

2- "Deneysel Kolorektal Kanseri Modelinde Kırmızın Siklooksijenaz-2 (COX-2), Kaspaz-3, TGF- β , β -Katenin, Sirtuin Proteinlerinin Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisinin Araştırılması", 2017-TS-32 nolu araştırma projesi KAÜ-BAP tarafından desteklenmiştir (Araştırmacı, 2017-).

3- "*Bacillus subtilis*'ten Rekombinant Olarak Proteaz Enziminin Üretimi ve Karakterizasyonu" adlı "2017-FM-22" nolu araştırma projesi, KAÜ-BAP tarafından desteklenmiştir (Araştırmacı, 2017-).

4- “Laktoferrinin Deneysel Endotoksemide DNA Hasarı, İmmun Sistem ve Biyokimyasal Parametrelere Etkisinin Araştırılması” adlı “2017-FM-79” nolu araştırma projesi, KAÜ-BAP tarafından desteklenmiştir (Araştırmacı, 2017-).

Ulusal kongrelerde sunulan bildiriler

1- Kanıcı A., Atakişi, E., **Gülmez, C.**, Ersan, Y., Kaya, R. Koç, E. Atakişi, O., “Fenilhidrazin Toksikasyonunda Panaks Ginsengin Etkisinin Araştırılması”, 6. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, Kars, 2013 (Poster).

2- Kanıcı, A., Yıldız Dalgınlı, K., Atakişi, O., Kart, A., Aydın, Y., **Gülmez, C.**, Kaya, R., Mert, B., Atmaca, N., “Karaciğer Dokusu Albümin, Total Protein, Glukoz ve Globülin Düzeylerine Metotreksatın Etkisinin Araştırılması”, IV. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, Elazığ, 2013 (Poster).

3- Atakişi, O., Yıldız Dalgınlı, K., Aydın, Y., Kanıcı, A., Topçu, B., Mert, B., **Gülmez, C.**, Kaya, R., Kart, A., Atmaca, N., “Dietilnitrozamin Toksisitesine Karşı Çörek Otu Yağının Total Oksidan ve Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi”, IV. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, Elazığ, 2013 (Poster).

4- Kanıcı, A, Yıldız Dalgınlı, K., **Gülmez, C.**, Atakişi, O., Atakişi, E., Aydın, Y., Kaya, R., Mert, B., Ersan, Y., “Karaciğer Dokusunda Fenilhidrazin Toksikasyonuna Karşı Panaks Ginsengin Etkisinin Araştırılması”, IV. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, 11-14 Eylül, Elazığ, 2013 (Poster).

5- Yıldız Dalgınlı, K., Atakişi, O., **Gülmez, C.**, Kanıcı, A., Atakişi, E., Aydın Dursun, Y., Yılmaz, Y.: “*Nigella sativa* Yağının Dietilnitrozamin

Toksisitesinde Koruyucu Etkisinin İncelenmesi”, 2. Ulusal Hesaplamalı Kimya Kongresi, Kars, 2015 (Poster).

6- Gülmez, C., Atakişi, O., “Farklı Yaş Gruplarındaki Sprague Dawley Ratlarda Folik asit, Vitamin B12, Tiroid hormonları ve Antioksidan/oksidan Düzey Değişimleri”, 8. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, Bursa, 2016 (Poster).

7- Yıldız Dalgınlı, K., Atakişi, O., Gülmez, C. “Bacillus thermocateulatus’dan Lipaz Enziminin Rekombinant Olarak Üretimi, Karakterize Edilmesi ve İmmobilizasyonu.”, 8. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, Bursa, 2016 (Sözlü).

Ödüller

1- Gülmez C., Atakişi O., Yıldız Dalgınlı K., 6. Ar-Ge Proje Pazarı organizasyonu kapsamında, “Kozmetik, Sabun ve Temizlik Ürünleri” kategorisinde ikincilik ve 10.000 TL para ödülüne layık görülmüştür (26 Kasım 2016).

2- TÜBİTAK yayın teşvik ödülü, 2016.

3- TÜBİTAK yayın teşvik ödülü, 2018.

Alınan sertifika ve belgeler

Uluslararası Katılımlı Nobelyum Bilim Kongresine Katılım Belgesi (14-15 Nisan 2018, Erzurum Teknik Üniversitesi, Erzurum)

Gülmez C., Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, 12.12.2016, Başarı Belgesi.

İstanbul Kimyevi Maddeler ve Mamulleri İhracatçılar Birliği Akdeniz Kimyevi Maddeler ve Mamulleri Birliği'nin ortaklaşa olarak düzenlediği Kimyevi Maddeler ve Mamulleri Sektöründe 6. Ar-Ge Proje Pazarı etkinliğine katılım ve teşekkür belgesi (26 Kasım 2016, Bahçelievler, İstanbul)

T.C. Ekonomi Bakanlığı katkıları, Türkiye İhracatçılar Meclisi koordinasyonu ile gerçekleştirilen Türkiye İnovasyon Haftası etkinlikleri katılım belgesi (8-9-10 Aralık 2016, Şişli, İstanbul)

“Uygulamalı Biyokimyada Güncel Konular” Adlı Biyokimya Lisansüstü Yaz Okuluna Katılım Belgesi (22-24 Ağustos 2014, Aksaray).

“EN ISO 14001:2004 Çevre Yönetim Sistemi” Konulu Eğitim Sertifikası. Klavis Consulting Group (25-26 Aralık 2010, Kars).

“Toplam Kalite Yönetimi” Konulu Eğitim Sertifikası. Klavis Consulting Group (25-26 Aralık 2010, Kars).

“ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi” Konulu Eğitim Sertifikası. Klavis Consulting Group (25-26 Aralık 2010, Kars).

“OHSAS 18001:2007 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi” Konulu Eğitim Sertifikası. Klavis Consulting Group (25-26 Aralık 2010, Kars).

“İç Denetimci Eğitimi” Konulu Eğitim Sertifikası. Klavis Consulting Group (25-26 Aralık 2010, Kars).

Bilgisayar Meslek Dalı Eğitim Programları Kurs Sertifikası (03/02/2003-30/06/2003, 120 saat, Ümraniye, İstanbul).

Mikro Yazılımevi Ticari ve Muhasebe Programları Standart Eğitim Belgesi (2003, Ümraniye, İstanbul).