T.C.

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

FLAVANOİD TÜREVLERİ GONZALİTOSİN-I VE ANTRAFLAVİK ASİT'İN KOLON KANSER HÜCRE HATTINDAKİ STOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MALİKA BEZGRARİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. HURİ BULUT

KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ

ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2023

T.C.

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

FLAVANOİD TÜREVLERİ GANZALİTOSİN-I VE ANTRAFLAVİK ASİT'İN KOLON KANSER HÜCRE HATTINDAKİ STOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MALİKA BEZGRARİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. HURİ BULUT

İSTANBUL-2023

TEZ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. ENGIN ULUKAYA

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. PEYAMİ ÇELİKCAN

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Doç. Dr. HURİ BULUT
Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri (İlk isim jüri başkanına, ikinci isim danışmana aittir)

Prof. Dr. ENGIN ULUKAYA
Doç. Dr. HURİ BULUT
Dr. Öğr. Üyesi. EBRU HACIOSMANOĞLU

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum, “Flavanoid Türevleri Ganzalitosin-I ve Antraflavik Asit’in Kolon Kanser Hücre Hattındaki Stotoksik/Stostatik Etkilerinin Araştırılması” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

MALİKA BEZGRARİ

İTHAF

Bu tezi, en büyük destekçim, iyi ve kötü günlerimde yanımda olan ve gelecekte de benimle birlikte olmaya devam edecek olan aile fertlerim; bana inanan ve hayallerimin peşinden gitmeme destek olan annem Fatima Kherfi; eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen babam Ahmed Bezgrari; hayatımın her aşamasında beni en içten saygı, sevgi ve minnetle maddi ve manevi olarak destekleyeceğini bildiğim kardeşim Aissa Bezgrari, her zaman benim yeteneklerime inanan kardeşlerim Halima Bezgrari; en tatlı küçük kız kardeşim İkram Hana Bezzari ve iki erkek kardeşim Mohammed Bezgrari ve Amir Bezgrari'ye ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çok değerli danışmanım, Doç. Dr. HURİ BULUT'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve laboratuvar hayatım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan, yol gösteren ve destek olan çok değerli hocalarım, Prof. Dr. Engin ULUKAYA, Dr. Öğr. Üyesi Yelda KUDU, Dr. Öğr. Üyesi Didem Karakaş ZEYBEK, Dr. Öğr. Üyesi Öykü GÖNÜL GEYİK, Dr. Öğr. Üyesi Caner GEYİK, Arş. Gör. Hilal ŞENTÜRK, Uzm. Bio. Merve ERKISA ve Uzm. Bio Gökçe ERDEMİR'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımız boyunca beni her yönden destekleyen, morallerini ve desteklerini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım çalışma arkadaşlarım Merve, Sıla, Nourhan, Derya, senanur, Gizem, zeynep ve Janset'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI
ETİK BEYANI……...İ
İTHAF……...İİ
TEŞEKKÜR……İİİ
İÇİNDEKİLER ..... İV
ŞEKİLLER LİSTESİ……...Vİ
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ..... Vİİ
ÖZET ..... İX
ABSTRACT.....X
1.GİRİŞ…..……....3
2.GENEL BİLGİLER……5
2.1 Kolon Kanseri……..9
2.1.1 Kolon Kanseri Risk Faktörleri……10
2.1.2 Kolon kanseri kök hücreleri……11
2.1.3 Kolon Kanseri Moleküler Biyolojisi.....12
2.1.4 Kolon Kanseri Tanı ve Tedavisi 15
2.2 Apoptoz.....19
2.3 Nekroz.....21
2.4. Flavonoidler.....23
2.4.1 Gonzalitosin-I……...……...……..…..29
2.4.2 Antraflavik asit……..……...……...……....30
3. MATERYAL VE METOD……..31
3.1 MATERYAL……31
3.1.1 Kimyasal……31
3.1.2 Sarf malzemeler……..32
3.1.3 Cihazlar……...…32
3.2 METOD……33
3.2.1 Hücre Kültürü 33
3.2.2 Hücrelerin Depolanması.....33
3.2.3 Besiyerlerinin Hazırlanması.....34
3.2.4 Bileşik Stoklarının Hazırlanması..... 34

3.2.5 Hemositometri ile Hücrelerin Sayılması 34
3.2.6 Sülfrodamin B (SRB) Testi ile Canlılığın Belirlenmesi.....34
3.2.7 ATP Testi ile Canlılık Tayini ... .35
3.2.8 Yara İyileştirme Testi.....37
3.2.9 Double Staining DAPI/PI.....37
3.2.10 Western Blot Analizi.....38
3.2.11 İstatistik Analizi……....……...39
4. BULGULAR……40
5. TARTIŞMA…… 52
6. SONUÇ, ÖNERİLER VE TOPLUMA KATKI……...58
7. KAYNAKÇA……...59
EKLER……86
EK-1 İNTİHAL RAPORU…….……..……87
EK-2 ÖZGEÇMİŞ..……...…..…….....88

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Kanserin işaretleri.....9

Şekil 2: Temel flavonoid yapısı.....24

Şekil 3: Gonzalitosin-I'in kimyasal yapısı.....29

Şekil 4: Antraflavik asidin kimyasal yapısı.....30

Şekil 5: Doza bağımlı antraflavik asit bileşiği tedavisinin hücre hattı sağkalımı üzerindeki etkisini gösteren SRB test sonuçları.....41

Şekil 6: Doza bağımlı antraflavik asit bileşiği tedavisinin hücre hattı sağkalımı üzerindeki etkisini gösteren SRB test sonuç grafikleri.....42

Şekil 7: Doza bağımlı gonzalitosin-I bileşiği tedavisinin hücre hattı sağkalımı üzerindeki etkisini gösteren SRB test sonuçları.....43

Şekil 8: Doza bağımlı gonzalitosin-I bileşiği tedavisinin hücre hattı sağkalımı üzerindeki etkisini gösteren SRB test sonuç grafikleri.....44

Şekil 9: Doza bağımlı antraflavik asit bileşiği tedavisinin hücre hattı sağkalımı üzerindeki etkisini gösteren ATP test sonuçları.....45

Şekil 10: Doza bağımlı gonzalitosin-I bileşiği tedavisinin hücre hattı sağkalımı üzerindeki etkisini gösteren ATP test sonuçları.....46

Şekil 11: Antraflavik asit ve gonzalitosin-I bileşikleri tedavisinin HCT-116 hücre hattı göçü üzerindeki etkisini gösteren yara iyileşme testi sonuçları.....47

Şekil 12: Antraflavik asit ve gonzalitosin-I bileşikleri tedavisinin HT-29 hücre hattı göçü üzerindeki etkisini gösteren yara iyileşme testi sonuçları.....48

Şekil 13: Antraflavik asit tedavisi sonrasında PARP, RIPK1, Kaspaz-3 ve Bax/Bcl2 protein ifade düzeylerinin Western Blot yöntemiyle alınan sonuçları.....50

Şekil 14: Gonzalitosin-I tedavisi sonrasında PARP, RIPK1, Kaspaz-3 ve Bax/Bcl2 protein ifade düzeylerinin Western Blot yöntemiyle alınan sonuçları.....51

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

AIF : Apoptozu İndükleyen Faktör

AKT : Serin-Treonin Kinaz (Protein Kinaz B)

ATM : Ataksi Telanjiektazi Mutasyona Uğramış

ATP : Adenozin Trifosfat

Bax : Bcl-2 İlişkili X Protein

BCA : Bikinkoninik Asit

KASPAZ 3 : Sistein Proteaz Ailesi

CCND1 : Siklin D1

DMSO : Dimetilsulfoksit

DNA : Deoksiribonükleik Asit

ECM : Hücre Dışı Matris

EGF : Epidermal Büyüme Faktörü

FBS : Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)

FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü

kDa : Kilodalton

KKH : Kanser Kök Hücreleri

KKKH : Kolon Kanseri Kök Hücreler

KRAS : Kirsten Sıçan Sarkomu Virüsü

Mtor : Rapamisinin Memeli Hedefi

NF-Kb : Nükleer Faktör Kappa B

P53 : Tümör Proteini TP53

PARP : Poli(ADP-Riboz)Polimeraz

PBS : Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

PBS : Fosfat Tuz Tamponu

PI : Propidyum Iyodür (Propdium Iodide)

PRM : Retinoblastom Proteini

PVDF : Polivilinilden Diflorür

RIPK1 **:** Reseptör Etkileşimli Serin/treonin-protein Kinaz 1

RNA **:** Ribonükleik Asit

ROS **:** Reaktif Oksijen Türleri

RPMI **:** Roswell Park Memorial Institute Medium

SDS **:** Sodyum Dodesil Sülfat

SDS-PAGE **:** SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SPS **:** Polipozis Sendromu

SRB **:** Sulforhodamine B

TCA Döngüsü **:** Trikarboksilik Asit Döngüsü

TME **:** Tümör Mikroçevre

TNF **:** Tümör Nekrozis Faktör

TSG **:** Tümör Baskılayıcı Gen

TSP1 **:** Trombozpondin-1

UV **:** Ultraviyole

VEGF **:** Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖZET

Malika Bezgrari. (2023). Flavanoid Türevleri Ganzalitosin-I ve Antraflavik Asit'in Kolon Kanser Hücre Hattındaki Stotoksik/Stostatik Etkilerinin Araştırılması. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Kolon kanseri kalın bağırsağın iç duvarlarında gelişir ve Dünya çapında en sık görülen üçüncü kanser türüdür. Kolon kanseri gıda, yaş, çevre ve kalıtımla bağlantılı olup önemli sayıda epidemiyolojik çalışma, kolonda Clostridium nucleatum enfeksiyonunun kolorektal kanser için olası bir risk faktörü olduğunu göstermiştir.

Flavonoidler, çevresel zorluklara direnmede ve bitkilerde hücre büyümesini kontrol etmede önemli bir rol oynayan hidroksillenmiş polifenolik bileşiğin büyük bir ailesidir. Flavonoidler yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir ve vücudun toksinlerle savaşmasına yardımcı olur. Tüm bunların yanında farklı flavonoid türlerinin çok çeşitli kanser tiplerinde reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyen enzim aktivitelerini modüle ettiği; hücre döngüsünün durdurulmasına katıldıkları, apoptozu, otofajiyi indükledikleri ve kanser hücresi çoğalmasını ve istilasını baskıladıkları yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, literatür bilgisi kısıtlı bulunan flavonoid türevlerinden Gonzalitosin-I (5-hidroksi-3',4',7-trimetoksiflavon) ve Antraflavik asitin (2,6-Dihidroksiantrakinon, Anthraflavin) kolon kanseri hücre hatları (HCT-116 ve HT-29) üzerine etkisini inceledik. İnsan akciğer epitel hücreleri (Beas-2B) kontrol hücreleri olarak kullanıldı. Sulforhodamine B (SRB) ve Adenozin Trifosfat (ATP) testleri kullanılarak hücre canlılığı ve IC50 değereri belirlendi. Tedavi edilen hücrelerin migrasyon kabiliyeti yara iyileşme testi kullanılarak değerlendirildi. Tedavi edilen hücrelerdeki ölüm şeklini belirlemek için DAPI/PI boyama yapıldı ve PARP, RIPK-1, Bax, Bcl2 ve Kaspaz 3 protein ekspresyonları western blot analizi ile incelendi.

Anahtar Kelimeler: Kolon kanseri, Flavonoid, Gonzalitosin-I (5-hidroksi-3',4',7-trimetoksiflavon; HTMF), Antraflavik asit (2,6-Dihidroksiantrakinon, Anthraflavin**)**

ABSTRACT

Malika Bezgrari. (2023). Investigation of the Stotoxic/Stostatic Effects of Flavanoid Derivatives Ganzalitocin-I and Anthroflavic Acid on the Colon Cancer Cell Line. Istinye University Institute of Health Sciences, Department of Cancer Biology and Pharmacology. Master's Thesis. Istanbul.

Colon cancer, which develops in the inner walls of the large intestine; is the third most common cancer worldwide, also linked to food, age, environment, and heredity. In addition, a significant number of epidemiological studies have shown that infection with Clostridium nucleatum in the colon is a possible risk factor for colorectal cancer.

Flavonoids are a vast family of hydroxylated polyphenolic compounds that play a significant role in plant resistance to environmental challenges and cell growth regulation. Flavonoids have significant antioxidant activity and can aid the body in its battle against toxins. Furthermore, various flavonoids alter the activities of enzymes that scavenge reactive oxygen species (ROS) in a wide range of cancer types; studies have shown that they engage in cell cycle arrest, cause apoptosis, autophagy, and suppress cancer cell proliferation and invasion.

In this thesis study, colon cancer cell lines (HCT-116 and HT-29) were treated with the flavonoid derivatives Gonzalitosin-I (5-hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone) and Anthraflavic acid (2,6-Dihydroxyanthraquinone, Anthraflavin). We examined the impact of these two compounds on human lung epithelial cells too (Beas-2B), which were utilized as control cells. SRB and ATP assays were applied to measure cell viability and IC50. The wound healing assay was used to assess the migratory capacity of the treated cells. DAPI/PI staining was performed to identify the death mechanism in the treated cells, and western blot analysis was carried out to investigate the protein expression of PARP, RIPK-1, Bax, Bcl2, and Caspase 3.

Keywords: Colon Cancer, Flavonoids, Ganzalitosin I (5-hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone; HTMF), Anthraflavic acid (2,6-Dihydroxyanthraquinone, Anthraflavin)

1. GİRİŞ

Günümüzde bireyler, hastalıkların tespiti ve tedavisinin önemli ölçüde geliştiği, sağlık hizmetlerine daha fazla erişimin sağlandığı bir çağda yaşamaktadırlar. Bu gelişmeler, dünya bölgelerinin çoğunda ortalama yaşam beklentisi üzerine olumlu etkilere sebep olmuş olup özellikle bulaşıcı hastalıklardan kaynaklı ölüm oranlarını azaltmıştır. Ancak tüm bunların yanında kanser vakalarına bağlı ölüm oranı son 40 yılda %40'ın üzerinde artmıştır. Kanser, vücut hücrelerinin çoğalmasının kontrol edilemediği bir durum olup dünyanın en ciddi sağlık sorunlarından biri olarak bilinir. Her yıl yaklaşık on milyon insanın ölümüne sebep olduğu bildirilmişitir (Piñeros., M ve ark., 2021; Ferlay, J ve ark. 2019). Yapılan çalışmalarda, 2030 yılına kadar 13 milyon insanın kanserden yaşamını yitirebileceği bildirilmiştir (Kuipers EJ ve ark., 2013).

Kanser, düzensiz hücre çoğalması, istilası ve hücrenin ana konumdan vücudun farklı bölgelerine yayılması ile ayırt edilen kronik ve heterojen bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Kanser, proliferatif sinyalleri sürdürme yeteneği, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümüne karşı direnç, sonsuz bölünme yeteneği, anjiyogenez, istila ve metastaz, enerji metabolizmasının yeniden programlanması, bağışıklık sisteminden kaçma yeteneği, inflamasyonu destekleyen tümör, genomik dengesizlik ve mutasyon yükü gibi özellikler ile ayıt edilebilir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Genetik faktörlere ek olarak, tütün ve alkol kullanımı, obezite, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, mesleki maruziyetler, Ultraviyole (UV) ve radyasyona maruz kalma, yetersiz fiziksel aktivite, bazı hormonlar, hava kirliliği, arsenik ve benzen maruziyeti gibi durumlar kanser oluşumunu tetikleyebilir (Nichols, H. B ve ark., 2009; Moore, M. M. ve ark., 2010; Wu, S ve ark., 2016; Hasan, SAW 2021).

Kolorektal kanser vakaları özellikle Batı ülkelerinde kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %10'unu oluşturan yaygın bir malignite haline gelmiştir. Nüfusun yaşlanması ve yanlış beslenme alışkanlıklarının yaygınlığı, sigara içmek, düşük fiziksel aktivite ve obezite bu insidansın artmasına katkıda bulunan faktörlerdir. İnsidanstaki değişim sadece sporadik hastalık oranlarında değil, aynı zamanda birçok ailesel kanser sendromunda da görülebilir. Ayrıca, *Helicobacter pylori* enfeksiyon oranları önemli ölçüde azalmış olsa da, kolorektal kanser günümüzde Lynch sendromunun en yaygın tezahürüdür, oysa bu hastalığın taşıyıcıları daha önce çoğunlukla mide kanserinden etkilenmiştir (Warthin AS., 1913; Vasen HFA ve ark., 2015).

Flavonoidler, genellikle glikozitler olarak bulunan önemli bir fenolik kimyasal ailesidir. Flavonoidler meyve, sebze ve meyvelerden yapılan içeceklerde bol miktarda bulunur. Flavonoidlerin sağlığı teşvik edici nitelikleri arasında antioksidan, antienflamatuar, anti-mutajenik ve anti-kanser yetenekleri bulunur. Flavonoidler kimyasal yapılarına, oksidasyon miktarlarına ve halka C ikame paternine (heterosiklik piran halkası) göre sınıflandırılır. Bir sınıf içindeki bireysel bileşikler, benzen halkalarının (A ve B halkaları) değiştirilmesiyle belirlenir (Al-Ishaq, R. K., ve ark., 2019; Kumar, S., ve Pandey, A. K. 2013). Antikanser tedavisi, kemoterapiye karşı gelişmiş direnç ve daha sonra metastatik yayılma olasılığı ile hastalığın nüksetmesi de dahil olmak üzere çeşitli zorluklara sahiptir. Bununla birlikte, flavonoidler geleneksel ilaçların etkinliğini artırmak için etkili bir strateji olabilir. İleri kanseri tedavi etmek için kullanılan kemoterapötik bir ilaç olan Docetaxel (DTX), zayıf bir yanıt oranına sahiptir (Li, X ve ark., 2019). Bununla birlikte, diğer kemoterapötik ilaçlarla birleştiğinde, DTX'in yanıt oranı artar. DTX'in bir flavonoid bileşikle birleştirilmesinin dosetakselin etkinliğini artırabileceği ve güçlü bir antikanser terapötik seçeneği sağlayabileceği gösterilmiştir (Li, X ve ark., 2019). Anthraflavic asit, C-3 ve C-7'de hidroksi grupları ve C-9 ve C-10'da okso grupları olan antrasenden oluşan bir dihidroksiantrakinondur. Bir antimutajenin yanı sıra bir bitki metaboliti olarak da işlev görür. Bir antrasen hidritten türetilmiştir (Basiuk, E ve ark., 2000; Ioannides, C ve ark.,1993). Bir flavonoid olan antraflavik asit, sitokrom P-448'in güçlü bir mutajenik ve seçici inhibitörüdür ve hem mikrozomal hem de sitozolik aktivasyon yollarını inhibe eder (Ayrton, A ve ark., 1988).

5-hidroksi-3',4',7-trimetoksiflavon; HTMF, Hemhidrofilik (hidroksil grubu) hem de hidrofobik (benzen halkaları) fonksiyonel grupları ile doğal olarak oluşan bir polifenolik moleküldür. Son yıllardaki çalışmalarda, radikal süpürme etkisi için yüksek antioksidan kapasitesi gösterilmiştir (Sudha, A. ve Srinivasan, P. 2014). HTMF'nin tüm antioksidan analizlerinde güçlü antioksidan aktivite sergilediği ve lipit peroksidasyonunu büyük ölçüde azalttığı gösterilmiştir ve HTMF'nin, Bax / Bcl-2 oranını artıran p53 ve duyarlı geni p21'i aktive ederek apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Balakrishnan G ve ark., 2010).

Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında ganzalitosin I ve antraflavik asit gibi literatürde henüz çalışılmamış farklı flavanoid türevlerinin kolon kanseri hücre hatlarındaki stotoksik/stostatik etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kanserde, sürekli proliferatif sinyalleme, büyüme baskılamadan kaçınma, genomik dengesizlik ve replikatif ölümsüzlük gibi çeşitli ayırt edici özellikler, kanser gelişimini başlatan ve sürdüren genetik anormalliklerdir. Diğer özellikler ise, anjiyogenezin başlatılması ve enerji metabolizmasının yeniden programlanması, apoptoza direnme, tümör enflamatuar yanıtını teşvik etme ve bağışıklık yıkımından kaçınma gibi konakçının savunma sistemleri tarafından ölüme karşı tümör direncini içerir.

Sürekli proliferatif sinyaller: Hücre proliferasyonu, bir hücrenin bölündüğü ve kendini kopyaladığı süreçle ilgilidir. Protein Kinaz B (AKT, PKB) sinyalizasyonu, Tümör Nekroz Faktörü (TNF) gibi birkaç sinyal molekülü (özellikle büyüme faktörleri) çoğalmanın etkili olması için hücre döngüsünü etkilemelidir. Fibroblast büyüme faktörler (FGF) hücre proliferasyonunu, göçünü ve farklılaşmasını düzenleyen pleiotropik büyüme faktörleridir. Sağlıklı hücrelerde yeni bir hücre döngüsünün başlatılması, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörleri tarafından düzenlenir (Yarden ve Ullrich, 1988). Kanserin ilk ve en belirgin özelliği kontrolsüz hücresel proliferasyondur. Bu yollar, büyüme faktörlerinin veya reseptörlerin ekspresyon seviyelerini artırarak ve ayrıca reseptör ve / veya alt hedef moleküllerdeki yapısal modifikasyonları artırarak kanser hücrelerinde bozulabilir. Kanser hücreleri, bu işlevsizliğin bir sonucu olarak sürekli olarak proliferasyon sinyalleri alırlar ve kontrolsüz bir şekilde bölünmeye devam ederler (Perona, 2006; Witsch ve ark., 2010). Onkogenler, kanserli hücrelerde mutasyona uğramış veya aşırı eksprese edilmiş proto-onkogenlerdir. Onkogenler normal düzenleyici sistemlere karşı bağışıktır, bu da hücrenin kontrolsüz hücre büyümesi durumuna girmesine ve proliferasyon sinyallerinin düzenlenmemiş kurucu ekspresyonuna neden olur. Onkogenler, EGF de dahil olmak üzere büyüme faktörü yolunun herhangi bir bölümünü etkileyebilir ve ayrıca hücre yüzey reseptöründen çekirdeğe sinyal kaskadının yapısal aktivasyonunu üretebilir.

Büyüme baskılayıcılardan kaçınma: Büyüme karşıtı sinyallerden kaçınma kanser hücrelerinin çok önemli bir özelliğidir. Anti-onkogen olarak da bilinen bir tümör baskılayıcı gen (TSG), hücre bölünmesini ve replikasyonunu baskılar. Hücre aşırı bölünmeye devam ederse kanser ortaya çıkabilir. Tümör hücreleri, genetik ve epigenetik

yollar yoluyla tümör baskılayıcılardan kaçınabilir. Kromozom delesyonu, mutasyon ve inaktivasyon veya yukarı veya aşağı akış efektörlerinin kaybı genetik yolaklara örnektir. Deoksiribonükleik Asit (DNA) metilasyonu, histon metilasyonu ve asetilasyonu epigenetik kaçınma örnekleridir (Amin ve ark., 2015). Kanser hücrelerinin, sağlıklı hücre büyümesini inhibe eden çeşitli tümör baskılayıcı yollardan kaçması gerekir (Sun ve Yang, 2010). Çok sayıda hücre dışı ve hücre içi sinyale yanıt olarak, retinoblastom proteini (PRB) ve P53 gibi tümör baskı proteinleri hücre döngüsünü kesintiye uğratabilir veya apoptoza neden olabilir (Harbour ve Dean, 2000; Kruiswijk ve ark., 2015). Bu proteinler kanser hücrelerinde hasar görebilir veya mutasyona uğrayabilir ve yeni kanserojen fonksiyonlar getirebilir (Deshpande ve ark., 2005; Sherr ve McCormick, 2002).

Hücre ölümüne karşı direnç: Hücre ölümü, biyolojik bir hücrenin işlevini yitirdiği süreçtir. Bu durum, eski hücrelerin öldüğü ve yenileriyle değiştirildiği normal süreçten kaynaklanıyor olabildiği gibi hastalık veya lokalize hasar durumlarından kaynaklanıyor olabilir (Hotchkiss ve ark., 2009). Çok hücreli bir türdeki her hücre apoptoz ile ölme yeteneğine sahiptir, ancak tümör hücreleri sıklıkla işlevsiz apoptotik yollara sahiptir. Bu anormallikler sadece tümör kitlesini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda tümörü tedaviye dirençli hale getirir. Kanser hücreleri, normal hücrelerden farklı olarak, onkojenik stres, genomik instabilite ve hücresel hipoksi gibi faktörler tarafından sürekli olarak vurgulanır. İntrinsik apoptotik yol genellikle bu tür iç apoptotik uyaranlara yanıt olarak tetiklenebilir. Öte yandan, kanser hücreleri, apoptotik yolları inhibe ederek sıklıkla bu biyolojik tepkiden kaçabilir. Farelerde yapılan bir çalışmada sadece BH3 proteininin veya bir kaspazın genetik inaktivasyonunun bazı pro-apoptotik uyaranlara dirençle sonuçlanmakla kalmayıp, aynı zamanda tümör büyümesini hızlandırdığı gösterilmiştir (Hübner ve ark. 2008; Parsons ve ark., 2013). Anti-apoptotik B Hücreli Lenfoma 2 (BCL-2) ailesi proteinlerinin zorla ekspresyonu, MYC gibi bir onkogenin neden olduğu tümörigenezi önemli ölçüde artırabilir. Ancak tek başına bir anti-apoptotik BCL-2 ailesi proteininin aşırı ekspresyonu, tek başına bir onkogen ile gözlemlenenle karşılaştırılabilir tümör oluşumuna neden olmayabilir (Strasser ve ark., 1990; Zhou ve ark., 1998; Wexler ve ark., 2005).

Genomik İnstabilite: Hücrelerin yaşam döngüsü boyunca genomda artan bir değişkenlik eğilimini ifade eder. Bazı kanserler genomik instabilite ile karakterizedir. Kalıtsal kanserlerde genomik instabilite, DNA onarım genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır ve tümörigenezi tetikler. Sporadik (kalıtsal olmayan) malignitelerde genomik

instabilitenin moleküler kökeni belirsizdir, ancak mevcut çalışmalar DNA onarım genlerindeki mutasyonların tedaviden önce nadir olduğunu ve bu tümörler için mutatör teorisine aykırı olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, tümör baskılayıcı TP53'ün (p53'ü kodlayan), ataksi telanjiektazi mutasyona uğramış (ATM) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2A'nın (CDKN2A; aynı zamanda p16INK4A ve p14ARF'yi de kodlayan) mutasyon dizileri, onkogen kaynaklı DNA replikasyon stresi kavramını desteklemektedir (Negrini ve diğerleri, 2010).

Sınırsız bölünme yeteneği: Bir kanser hücresinin ayırt edici özelliği, tükenmeden, nesilden nesile süresiz olarak bölünme yeteneğidir. Bunu, hücresel zaman tutucu olan telomere zarar vererek başarırlar. Hücrelerin kromozomal DNA'sı zamanla kısalır ve sonuç olarak hücre apoptozun bir sonucu olarak yaşlanır ve ölür. Telomerler bu kısalmayı sürdürmektedir (Blasco 2005). Telomerik DNA'nın korunması, tümörlerin süresiz olarak çoğalma yeteneğini destekler, bu da kanserin ayırt edici özelliklerinden biridir. Telomer uzunluğu ve yapısı, ters transkriptaz telomeraz ve shelterin multiprotein telomer kompleksi tarafından korunur. Telomeraz aktivitesi kanserlerin çoğunda artar ve tümörlerdeki telomerler normal dokulardan çok daha uzundur.

İnvazyon ve Metastaz: Kanser, metastaz oluşturmak için çevredeki dokuya sızma ve uzak yerlere tohum atma kapasitesi ile karakterizedir. Metastatik kanser, kansere bağlı mortalitenin %90'ından fazlasından sorumludur (Steeg 2006) ve "istila-metastaz kaskadı" olarak bilinen bir olaylar zincirinden kaynaklanır. Uzak bölgelerde meydana gelmek için, kanser hücreleri 1) bazal membran ve stromal hücreler de dahil olmak üzere hücre dışı matriks (ECM) yoluyla istila etmeli, 2) tümör vaskülatürüne intravazat yapmalı, 3) dolaşımda hayatta kalmalı, 4) uzak organ parankiminde ekstravaza olmalı, 5) yabancı mikro ortamları manipüle etmeli, daha sonra mikrometastazlar oluşturmaya çalışmalı ve 6) klinik olarak ilgili makrometastazlara dönüşmelidir (Massagué and Obenauf 2016; Valastyan ve Weinberg 2011).

Anjiyogenez: Yeni kan damarlarının oluşturulması anjiyogenez olarak bilinir. Kan arterlerinin iç duvarını kaplayan endotel hücreleri, bu süreç boyunca göç eder, çoğalır ve farklılaşır. Vücudun içindeki kimyasal sinyaller anjiyogenez sürecini etkiler. Bu sinyallerden bazıları, VEGF gibi normal endotel hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlere tepki gösterir. VEGF ve diğer endotel büyüme faktörleri endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlandığında, bu hücrelerin içinde yeni kan damarlarının oluşturulmasını ve geliştirilmesini uyaran sinyaller aktive edilir. Anjiyogenez inhibitörleri, kan damarı

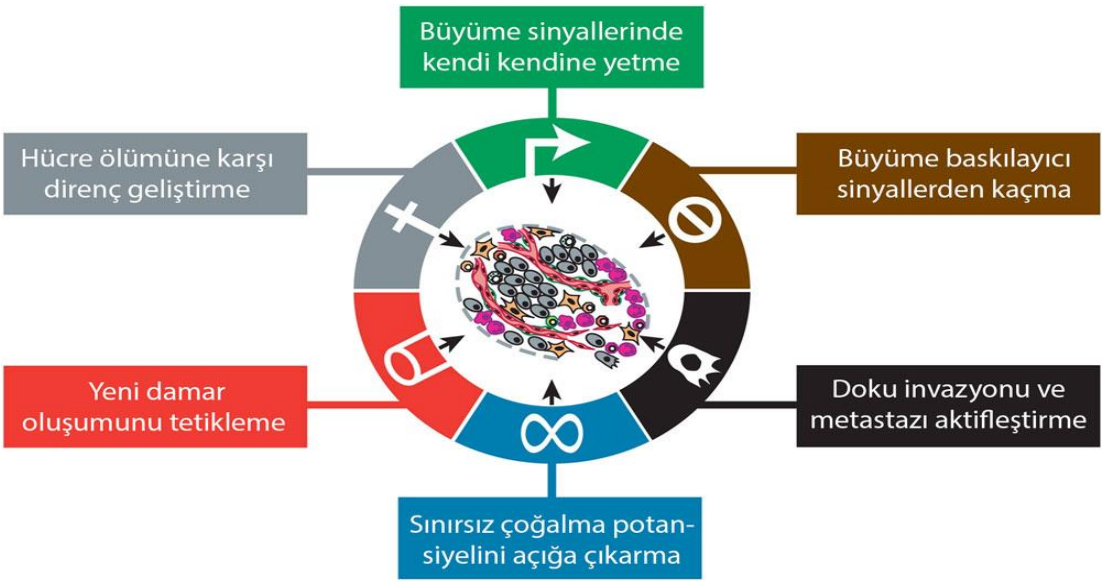
gelişimini önleyen kimyasal sinyallerdir. Anjiyogenez hem tümör büyümesi (progresyon) hem de yayılma (metastaz) için gereklidir. Bir tümörün boyutu birkaç milimetreden daha büyük olmadan önce hücrelere yeterli oksijen ve besin tedarikini garanti etmek için yeni kan damarları gereklidir. Kanser hücreleri, beslenmeyi sürdürmek ve metastaz için bir taşıma kanalı oluşturarar (VEGF, FGF ve Trombospondin 1 (TSP1) gibi pro-anjiyojenik büyüme faktörlerini kullanarak) anjiyogenezi sürekli olarak uyarır (Carmeliet 2005; Turner ve Grose 2010). Ayrıca, anjiyogenez yolu, bağışıklık sistemi hücresinin tümör dokusuna infiltrasyonu ile güçlendirilir (Zumsteg ve Christofori, 2009).

İmmün kaçış: Tümör hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanımlanması ve eliminasyonundan kaçınmak için edinilmiş kapasitesi, malign gelişimin (immün kaçış) çok önemli bir unsurudur. Bağışıklık sisteminin normal ve malign hücreler arasında ayrım yapma yeteneği, kısmen önemli antijeniteyi koruyan malign hücrelere bağlı olan kanser immünoterapisi için kritik öneme sahiptir. Tümörler, tümöre özgü immün yanıtları indükleyebilen çok çeşitli mutasyona uğramamış ve mutasyona uğramış antijenler üretebilir (Coulie ve ark., 2014). Kanser hücreleri, immünosüpresif maddeler üreterek veya immünosüpresif inflamatuar hücreleri tümör dokusuna çekerek tespit edilmekten kaçınabilir (Niederkorn 2009; Poschke ve ark., 2011).

Tümörü teşvik eden inflamasyon: Enflamasyon, çoğu kanserde gelişimin tüm aşamaları ve malign progresyonun yanı sıra anti-kanser tedavisinin etkinliği ile ilişkilendirilmiştir (Grivennikov ve ark., 2010; Crusz ve Balkwill. 2015). Enflamasyon, karsinogenezin tüm aşamalarını uyarır ve kanserin gelişimine ve ilerlemesine yatkınlık yaratır. Kanser hücreleri, çevreleyen stromal ve enflamatuar hücrelerle birlikte, iyi koordine edilmiş karşılıklı etkileşimler (TME) yoluyla inflamatuar bir tümör mikroçevresi oluşturur. TME hücreleri son derece esnektir ve fenotipik ve özelliklerini sürekli değiştirir.

Metabolik yeniden programlama: Yeniden programlanmış metabolizma, tümör başlatma ve geliştirme sırasında belirli bir seçici avantaj sunar (Cairns Ra ve Mak Tw. 2016; Deberardinis Rj ve Chandel Ns. 2016). Pavlova ve Thompson yakın zamanda kanser metabolik değişikliklerini altı kategoriye ayırmıştır: deregüle glikoz ve amino asit alımı, fırsatçı besin edinimi modları, glikoliz ve TCA döngüsü ara ürünlerinin kullanımı, artan azot talebi, metabolit güdümlü gen regülasyonundaki değişiklikler ve mikroçevre ile metabolik etkileşimler (Pavlova ve Thompson, 2016). Glikoz ve glutamin, büyüyen hücreler için iki önemli kaynaktır. Her ikisi de makromolekül montajı için bir karbon ara

ürün rezervuarı sağlamanın yanı sıra ATP sentezinde veya redoks dengesini korumada ihtiyaç duyulan ara ürünleri azaltır (Pavlova ve Thompson, 2016). Glutamin, çoğunlukla azot bağışı kabiliyeti nedeniyle başka rollere sahiptir; bunlar arasında amino asit havuzunun sürdürülmesi ve nükleotid biyosentezi için zorunlu azot donörü olarak hizmet edilmesi yer almaktadır (DeBerardinis ve Cheng, 2010; Altman ve ark., 2016). Ek olarak, hücre sinyalizasyonuna ve gen ekspresyonuna katılır (DeBerardinis ve Cheng, 2010).



Şekil 1: Kanserin İşaretleri (Hanahan ve Weinberg 2011)

2.1 Kolon Kanseri

Kolon kanseri, kanser kalın bağırsağın iç duvarlarında gelişen kolon veya rektumda başladığında ortaya çıkar. Dünya çapında üçüncü en yaygın kanserdir ve aynı zamanda gıda, yaş, çevre ve kalıtımla da bağlantılıdır. Kolorektal kanser (KRK) hastalarının %10'undan fazlası, KRK'ya karşı gerçek bir kalıtsal genetik eğilime sahiptir. Nedensel genetik olay bu vakaların büyük çoğunluğunda kabul edilmiştir. Bununla birlikte, vakaların%25'ine kadar KRK aile öyküsü vardır ve bilinen kalıtsal sendromlardan biriyle tutarlı değildir. Öte yandan, KRK vakalarının çoğunluğu sporadiktir, aile öyküsü veya genetik yatkınlığı yoktur. Ek olarak, önemli sayıda epidemiyolojik çalışma, kolondaki *Clostridium nucleatum* enfeksiyonunun kolorektal kanser için olası bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (Idrissi Janati ve ark., 2019).

Kolon kanseri, kanser mortalitesinin ana nedenlerinden biridir. Gelişmiş ülkelerde kolon kanseri taramasının yaygın olarak benimsenmesiyle, hedeflenen popülasyonda kolon kanserinin ölüm oranları azalmıştır. Bununla birlikte, 50 yaşın altındaki bireylerde KRK insidansı ve mortalitesi son 25 yılda artmaktadır. Yeni teşhis edilen hastaların yaklaşık yarısında metastatik kanser gelişir ve ortalama sağkalım süresi hastaların %50-60'ı için beş yıldır. Kolon kanserinde, metastazın hızlı oluşumu nedeniyle geç teşhis edilir ve kan dolaşımı yoluyla yüksek transfer oranı, daha uygun tedaviye ulaşmanın önündeki başlıca engellerden biridir. Prevalansı lokasyonel olarak değiştiğinden, bu varyantlar farklı popülasyonların genetik mirasındaki farklılıklardan ve yerel beslenme alışkanlıklarından kaynaklanıyor olabilir. Kişisel ve aile öyküsü, çevre ve beslenme alışkanlıkları bu nedenle önemli risk faktörleridir (Rocco ve ark., 2003; Watson ve Collins, 2011). Ailesinde bağırsağın iyi huylu veya kötü huylu tümörleri öyküsü olan kişiler (Rivera ve ark., 2011; Rubin ve ark., 2012); adenom veya kolorektal kanser tedavisi görenler (Oxentenko ve Smyrk, 2012); ve 45 yaşından önce yumurtalık, rahim ve meme kanserleri gibi epidemiyolojik olarak ilişkili bir kanser için tedavi edilen kadınlar (Wright ve ark., 2004; Banno ve ark., 2009) iki ila üç kat artmış kanser riski altındadır. KRK vakalarının en az %15'inin ailesel meydana geldiği bilinmektedir (Jasperson ve ark., 2010).

2.1.1 Kolon Kanseri Risk Faktörleri

Çevresel ve/veya genetik faktörler KRK olasılığını artırabilir. 50 yaş üstü, sosyoekonomik açıdan dezavantajlı sınıf, aşırı kilolu ve obezite, hareketsiz yaşam tarzı, sigara dumanı, aşırı alkol tüketimi, düşük lifli ve yüksek yağlı diyet, kırmızı et tüketimi, işlenmiş gıdalar ve yanmış veya kömürleşmiş et, diabetes mellitus ve insülin direnci, akromegali, uzun süreli immünsüpresyon ile böbrek nakli, uzun süreli androjen yoksunluğu tedavisi, kişisel veya ailede KRK veya kolorektal adenokarsinom (FAP) öyküsü, mutasyona uğramış MMR gen bozuklukları arasında Peutz-Jeghers sendromu, Cowden sendromu ve Juvenil polipozis sendromu gibi hamartomatöz polipozis sendromlarının yanı sıra tırtıklı polipozis sendromu (SPS) ve Cronkhite-Canada sendromu gibi kalıtsal olmayan polipozis sendromları da risk faktörleri arasında bulunmaktadır. KRK'lı genç erişkinlerin %35'inde bir tür genetik mutasyon görülürken, tüm KRK hastalarının %3-5'inde genetik mutasyon vardır. Ailede kolon kanseri öyküsü olmasa bile, genetik testler her zaman KRK ile genç erişkinlerde araştırılmalıdır (Mork

ve ark., 2015). KRK risk faktörleri hem çevresel hem de kalıtsal faktörleri içerir. KRK'nın sunum mekanizması, çeşitli risk faktörlerini yansıtan üç modelden birini izler: sporadik, kalıtsal veya ailesel:

1. Aile öyküsünün bulunmadığı sporadik hastalık, tüm KRK'ların yaklaşık %70'ini oluşturur. En sık 50 yaşın üzerindeki kişilerde görülür. Diyet ve çevresel faktörler bununla ilişkilidir. (Choi ve ark., 2019)

2. Hastaların %10'undan azı KRK için gerçekten kalıtsal bir yatkınlığa sahiptir. Tüm bu vakalar kolonik poliplerin majör bir hastalık belirtisi olup olmadığına bağlı olarak daha da bölünmüştür (Wirtzfeld ve ark., 2001; Lindor 2009; Choi YH ve ark., 2019).

3. Üçüncü ve tam olarak anlaşılamayan model, tüm vakaların %25'ini oluşturan "ailesel" KRK'dır. KRK'lı hastaların aile öyküsü vardır, ancak model yukarıda tarif edilen kalıtsal sendromlardan biriyle eşleşmemektedir. Bu ailelerden gelen bireylerin, kalıtsal sendromlardan gelenler kadar olmasa da, KRK geliştirme olasılığı daha yüksektir. Etkilenen tek bir birinci derece akrabaya (ebeveyn, çocuk veya kardeş) sahip olmak, KRK gelişme riskini genel popülasyonun 1,7 katı kadar artırır. İki birinci derece akrabada KRK varsa veya indeks vaka 55 yaşından önce teşhis edilirse, risk daha da artar (Macrae F. A., 2016).

2.1.2 Kolon kanseri kök hücreleri

Kanser kök hücreleri (KKH), malign fenotipik özellikler sergileyen tümörler içinde az sayıda farklılaşmamış tümörojenik hücrelerdir ve bunların varlığı 1990'larda bilimsel olarak gösterilmiştir (Najafi ve ark., 2019). Kolon kanseri kök hücreler (KKKH), diğer birçok KKH formu gibi, tedavilere dirençlidir ve in vitro klonlar oluşturma ve immün yetmezlikli farelerde ksenogreft tümörleri büyütme konusunda daha büyük bir yeteneğe sahiptir. KKKH'ler, özellikle onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlar biriktirerek, köklülük, aktif olarak çoğalan kanser progenitör hücreleri üretme yeteneği, çoklu ilaç direnci, radyodirenç, apoptoz direnci, gelişmiş DNA onarım kapasitesi ve izolasyonları için kullanılan özel hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonu gibi bazı fenotipik özellikler gibi çeşitli düzensiz yetenekler kazandırır (Zhou ve ark., 2018).

2.1.3 Kolon Kanseri Moleküler Biyolojisi

Kolorektal kanserler her yıl 1,2 milyondan fazla yeni vaka teşhis edilen küresel olarak üçüncü en yaygın kanserdir (Jemal ve ark., 2011). Bu nedenle ciddi bir sağlık sorunu olarak kabul edilir. Son yıllarda KRK'nın çok heterojen bir hastalık olduğuna, tümörün moleküler ve genetik özelliklerinin prognozu belirlediğine ve (hedeflenen) tedaviye yanıt verme yoluna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır (Prenen ve ark., 2013). Hem moleküler karsinogenez hem de morfolojik çok adımlı yollar açısından, kolorektal kanser heterojen bir hastalıktır (Bae Jm ve ark., 2016). Üç moleküler karsinogenez yolu vardır (Kanthan ve ark., 2012):

1. Kromozomal instabilite (CIN); kromozomların kararsız hale geldiği, kromozomların tamamının veya bir kısmının kopyalanmasına veya çıkarılmasına neden olan bir tür genomik kararsızlıktır. CIN daha spesifik olarak, tüm kromozomların veya bunların bir kısmının eklenmesi veya kaybedilmesi oranındaki artış olarak tanımlanır.
2. Mikrosatellit instabilitesi (MSI); hatalı DNA uyumsuzluk onarımının (MMR) neden olduğu genetik hipermütasyon (mutasyona yatkınlık) durumudur. MSI'ın ortaya çıkışı, MMR'nin düzgün çalışmadığının fenotipik kanıtıdır. MSI yüksekliğinde kolon kanseri, oldukça kararsız olan tümör hücreleri ile karakterizedir. Bu kanser hücreleri anormal şekilde ortaya çıkar ve davranır.
3. CpG ada metilatör fenotipi (CIMP); epigenetik destabilizasyon yolu ile ortaya çıkan ve promotör CpG ada bölgelerinin yaygın hipermetilasyonu ile tanımlanan, çeşitli tümör baskılayıcı veya tümörle ilişkili genlerin inhibisyonu ile sonuçlanan kolorektal kanserlerin bir alt kümesidir (Lao ve Grady, 2011).

CIN yolağı: CIN, KRK'da en sık görülen genetik instabilite türü gibi görünmektedir (Lengauer ve ark., 1998; Tsang ve ark., 2014). CIN, kromozomların tamamının veya büyük bölümlerinin yüksek oranda kazanılması veya kaybedilmesi olarak tanımlanır. Bu, hücreler arasında karyotipik değişkenliğe neden olur, bu da anöploidi, sub-karyotipik amplifikasyon, kromozomal yeniden düzenleme ve tümör baskılayıcı gen lokuslarında yüksek LOH sıklığı ile sonuçlanır (Lengauer ve ark., 1998; Markowitz ve Bertagnolli, 2009). Ayrıca, CIN tümörleri, KRAS proto-onkogen GTPaz (KRAS) ve B-Raf proto-onkogen serin / treonin kinaz (BRAF) gibi spesifik onkogenlerde mutasyonların yanı sıra KRK tümörogenezine katkıda bulunan APC ve tümör proteini

p53 (TP53) gibi tümör baskılayıcı genlerde mutasyonların birikmesi ile ayırt edilir (Markowitz ve Bertagnolli, 2009; Pino ve Chung, 2010). Fearon ve Vogelstein'ın kolorektal karsinogenezin çok aşamalı genetik modeli günümüzde yaygın olarak kabul edilmekte ve katı tümör progresyonu için bir paradigma olarak kullanılmaktadır (Fearon ve Vogelstein, 1990). Bu modele göre, ilk olay APC inaktivasyonu, ardından adenomatöz fazda onkojenik KRAS mutasyonları ve son olarak, kromozom 18q'nun silinmesi ve maligniteye dönüşüm sırasında kromozom 17p üzerindeki tümör baskılayıcı gen TP53'ün inaktivasyonudur (Fearon ve Vogelstein, 1990; Thiagalingam ve ark., 1996; Samuels ve ark., 2004).

18q kayıpları: Geç kanserojen fazda, kromozom 18q'daki allelik kayıp, primer KRK'nın %70'inde gözlenir (Jones ve ark., 2005; Ogino ve ark.,2009; Kanser Genom Atlası Ağı., 2012). KRK hastalarında sağkalım için kötü bir prognoz biyobelirteci olarak kabul edilmektedir (Sheffer ve ark., 2009; Jen ve ark., 1994). Kromozom 18q dahil olmak üzere allelik kayıpların yüksek prevalansı, inaktivasyonun KRK'de önemli bir rol oynayabileceği KKS/DCC, SMAD2 ve SMAD4 gibi potansiyel tümör baskılayıcı genlerin varlığını düşündürmektedir (Zauber ve ark., 2008). Kromozom 18q21.2 üzerinde bulunan ve nötrin-1 reseptörünün bir bileşenini kodlayan DCC, potansiyel bir tümör baskılayıcı gen olarak önerilmiştir (Fearon ve ark., 1990). Bununla birlikte, DCC kaybı ve inaktivasyonu üzerine yapılan araştırmaların çoğu durumsaldır ve DCC'nin bir tümör baskılayıcı gen olarak hareket ettiğine dair ikna edici bir kanıt sunmamaktadır (Mehlen ve Fearon, 2004). Germ hattı DCC mutasyonlarının kalıtsal kanserde rol oynadığına dair çok az gösterge vardır ve KRK'de sadece birkaç somatik DCC mutasyonu tanımlanmıştır (Mehlen ve Fearon, 2004). Kayıp alanında iyi bilinen iki tümör baskılayıcı genin (SMAD2 ve SMAD4'ün) varlığı, DCC'nin bir tümör baskılayıcı gen olarak rolünü sorgulamaktadır (Alazzouzi ve ark., 2005). İlginç bir şekilde, SMAD2 ve SMAD4 genleri, KRK'da 18q kaybının yaygın alanı olan 18q21.1'de bulunur (Thiagalingam ve ark., 1996). Bu SMAD genleri, büyüme faktörünü (TGF-) dönüştürmek için aşağı akış sinyal dönüştürücülerini kodlar ve içlerindeki mutasyonlar TGF direnci sağlayabilir ve kansere yol açabilir (Shi ve ark., 1997). SMAD4'ün pankreas kanseri vakalarının % 60'ında inaktif olduğu gösterilmiştir (Hahn ve ark., 1996).

APC / β-katenin: 5q22.2 üzerinde çok fonksiyonlu bir tümör baskılayıcı gen olan APC'nin mutasyonu ile Wnt sinyal yolunun aktivasyonu kritiktir ve KRK'nın

oluşumundaki ilk olaydır (Powell ve ark., 1992). APC proteini, Wnt / -katenin sinyal yolunun bozulması ve düzenlenmesinde rol oynayan -katenin yıkım kompleksinin önemli bir parçasıdır (MacDonald ve ark., 2009). Yıkım kompleksinin oluşturulması mutant APC tarafından bozulur ve sitoplazma içinde katenin proteininin bakımı ve birikmesi ile sonuçlanır. Birikmiş katenin proteini, TCF / LEF ile kompleksler oluşturduğu ve kanser hücresi proliferasyonunu, göçünü, istilasını ve metastazı teşvik eden Wnt aşağı akış efektörlerinin aşırı aktivasyonunu ürettiği çekirdeğe aktarılır (Stanczak ve ark., 2011). Benzer bir sonuç daha düşük seviyede katenin (Morin ve ark., 1997) ve AXIN2 (Stanczak ve ark., 2011) mutasyonlarında da görülür. Bunun yanında AXIN2 mutasyonları sadece KRK'de gözlenmiştir (Liu ve ark., 2000).

TP53: TP53, kromozom 17'nin kısa kolunda yer alan bir tümör baskılayıcı gendir ve kolorektal kanserde sıklıkla delesyona uğrar (Vogelstein ve ark., 1988). Çok çeşitli stres sinyallerine yanıt olarak DNA onarımı, hücre döngüsü durması, yaşlanma, apoptoz ve metabolizma gibi çoklu süreçlerle uğraşan yüzlerce genin transkripsiyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörünü kodladığından, TP53 "genomun koruyucusu" olarak adlandırılmıştır (Levine 1997).

KRAS: KRAS geni, hücresel proliferasyonu, farklılaşmayı ve hayatta kalmayı kontrol eden sinyal yolaklarında rol oynayan RAS gen ailesinin bir üyesidir. RAS, neredeyse tüm insan hücrelerinde bulunan içsel GTPaz aktivitesine sahip membrana bağlı GTP / GDP bağlayıcı bir proteindir. GTPaz aktive edici proteinler ve guanin nükleotid değişim faktörleri, aktif GTP'ye bağlı durum ile inaktif GDP'ye bağlı durum arasındaki geçişi kontrol eder (Vigil ve ark., 2010) KRAS mutasyonları, KRAS'ın içsel GTPaz fonksiyonunu azaltır, KRAS proteinlerinin GTP'ye bağlı aktif formda birikmesine ve daha sonra aşağı akış proliferatif sinyal yollarının yukarı regülasyonuna yol açar (Schubbert ve ark., 2007).

MSI: MSI, tümör dokusunda yaygın olan, sporadik KRK'nın %15-20'sinde ortaya çıkan başka bir genomik instabilite türüdür. Mikrosatellitler, genellikle bir ila beş baz çifti arasında, birlikte tekrarlanan DNA dizileridir. MSI fenotipli kişiler, özellikle tekrarlayan DNA bölgelerinde, DNA polimeraz kaymasına yol açan yüksek replikasyon hataları insidansına sahiptir (Abdel-Rahman ve Peltomäki, 2014). Nükleotidlerin mikrosatellit dizileri içine artan şekilde eklenmesi/silinmesi, aynı bireyin normal hücrelerinde keşfedilenlere kıyasla daha uzun veya daha kısa alellerin oluşumuna neden olur

(Thibodeau ve ark., 1993; Boland ve Goel, 2005.). Bethesda Kılavuzlarına göre, bir kanserin MSI durumunu belirlemek için iki mononükleotid (BAT26 ve BAT25) ve üç dinükleotid (D2S123, D5S346 ve D17S250) tekrarından oluşan beş mikrosatellit belirteçten oluşan geleneksel bir panel önerilmektedir (Boland CR ve ark., 1998). Tümörler daha sonra kararsız mikrosattelitlerin sayısına bağlı olarak kategorize edilir.

CIMP veya anormal DNA metilasyonu: Tümör baskılayıcı gen promotörü CpG adalarında DNA hipermetilasyonunun neden olduğu ve gen susturulmasıyla sonuçlanan transkripsiyon deaktivasyonu, günümüzde insan karsinogenezinde önemli bir faktör olarak tanımlanmaktadır (Toyota ve ark., 1999; Laird 2005). CpG adası metilatör fenotipi, kolorektal adenom hastalarının %30-35'inde keşfedilmiştir ve kolorektal karsinogenezin sinyal yolunun ilk olayını ve ayırt edici bir özelliğini temsil ettiği düşünülmektedir (Toyota ve ark., 1999; Jass 2005; Samowitz 2005). Bununla birlikte, Ogino ve ark. 2006'ya göre, niceliklendirilmiş bir DNA metilasyon analizi, CIMP, daha önce bildirilenden daha düşük olan CRC'nin %17'sini oluşturur ve CIMP'nin klinik özellikleri MSI ile ilişkili CRC'ninkilerle karşılaştırılabilir (Ogino ve ark., 2006).

2.1.4 Kolon Kanseri Tanı ve Tedavisi

Primer ve metastatik kolorektal kanser için tedavi seçenekleri günümüzde çok gelişmiştir (Papamichael ve ark., 2014; Heemskerk-Gerritsen ve ark., 2015). Ancak cerrahi ve farmasötik tedavideki ilerlemelere rağmen, kür oranları ve uzun süreli sağkalım oranları son birkaç on yılda nispeten sabit kalmıştır. Taramanın önümüzdeki 15 yıl içinde kolorektal kanser insidansı ve ölümü üzerinde önemli bir etkiye sahip olacağı tahmin edilmektedir (De Jonge ve ark., 2012; Valori ve ark.,2012).

Kolorektal kanser tanısı, semptomlarla başvuran bir hastanın muayenesi veya tarama yoluyla teşhis edilir. Hastalık, dışkıda kan, bağırsak alışkanlıklarındaki değişiklikler ve karın ağrısı gibi çeşitli semptomlara neden olabilir. Yorgunluk, solukluk ve nefes darlığı gibi anemiye bağlı semptomlar ve kilo kaybı diğer semptomlar arasındadır. Bu semptomların yaşlı bir hastada kolorektal kanser varlığı için prediktif yararlılığı sınırlıdır ve ek klinik değerlendirme gerektirmektedir. Kolorektal kanser taramasının genel toplumda yaygın olarak kullanılmasıyla, birçok birey erken dönemde tespit edilebilmektedir. Semptomatik hastalarda kolonoskopi önerilen araştırma şeklidir, ancak alternatif endoskopik modaliteler de mevcuttur veya geliştirilmektedir. Popülasyon

taraması için, ilk değerlendirme için çeşitli farklı yaklaşımlar kullanılabilir, ardından sonuçlar pozitifse kolonoskopi yapılabilir.

Kolonoskopi, kolorektal kanser tanısında altın standart gibi görünmektedir. Büyük tanısal doğruluğa sahiptir ve bu nedenle tümörün nerede bulunduğunu belirleyebilir. Ayrıca, prosedür eşzamanlı biyopsi örneklemesine izin verir, bu da hem tanının histolojik onaylarını hem de moleküler tanımlama için materyali sağlar. Kolonoskopi aynı zamanda hem tanısal hem de tedavi amaçlı kullanılabilecek tek tarama aracıdır. Adenomlar için endoskopik polipektomi kanser insidansını ve mortalitesini en aza indirebilir (Valori ve ark., 2012; Pox ve ark.,2012; Morris ve ark.,2014).

Kapsül endoskopisi, geleneksel endoskopiye ihtiyaç duymadan neredeyse tüm gastrointestinal sistemin incelenmesine izin veren, kablosuz bir kapsül cihazdır (Van Gossum ve ark., 2009; Spada ve ark., 2012). Adenomlar ve kolorektal kanser kapsül endoskopi ile teşhis edilebilir. İlk kapsül endoskopisinin, kabaca %60'lık bir duyarlılık ve %89'luk bir özgüllük ile 6 mm kadar küçük polipleri tespit edebildiği gösterilmiştir (Van Gossum ve ark., 2009).

BT kolonografi, düşük doz BT taraması kullanılarak kolonun iç resmini sağlar (Kim ve ark., 2007). BT kolonografinin, 49 farklı merkezden 11.000'den fazla katılımcıyı da içeren sistematik bir derleme ve meta-analizde kolorektal kanser tanısı için %96'lık bir duyarlılığa sahip olduğu kanıtlanmıştır (Pickhardt ve ark., 2011). Bu performans geleneksel kolonoskopi ile karşılaştırılabilir. Yapılan bir başka çalışmada, BT kolonografi ve kapsül endoskopinin, daha önce tamamlanmamış kolonoskopisi olan bireylerde benzer şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir (Spada ve diğerleri, 2015). Obstrüktif kanserli 411 katılımcının kapsamlı bir çalışması, BT kolonografisinin proksimal senkron lezyonları tespit etmede iyi performans gösterdiğini bulmuştur (Park ve ark., 2012).

Kolorektal kanserin moleküler tespiti, hem hastalar hem de doktorlar için çekici olan noninvaziv bir tanı sağlar. Böylece birkaç hastadan alınan örnekler gruplar halinde analiz edilebilir. İyi bir moleküler belirteç, kanseri ayırt edebilmelidir. Kan, dışkı ve idrardaki proteinlere, RNA'ya ve DNA'ya dayanan tahliller, farklı başarı seviyelerine sahiptir. SEPT9 bir GTPaz genidir ve promotör bölgesinin hipermetilasyonu kolorektal kanserle ilişkilendirilmiştir; SEPT9'un doku düzeyinde anormal metilasyonu, kolorektal neoplaziyi normal mukozadan ayırır. Sevk merkezlerinde yapılan erken vaka-kontrol çalışmaları, SEPT9 metilasyon testinin %85-90 özgüllük ile kolorektal kanser için %50-

70'lik bir duyarlılığa sahip olduğunu ortaya koymuştur (Grützmann ve ark.,2008). APC ve KRAS mutasyonları, epitel hücreleri tarafından dökülen DNA'da incelenmiş ve dışkı örneklerinden ekstrakte edilmiştir. Birinci nesil fekal DNA testleri, kolorektal kanser taraması için kabul edilebilir duyarlılıktadır. Ancak ileri kolonik adenomların tanımlanması için düşük duyarlılık gösterebilir (Ahlquist ve ark., 2008). Stabilize edici bir tamponun kullanılması, çok daha farklılaştırılmış belirteçlerin eklenmesi (KRAS mutasyonları, anormal NDRG ailesi üyesi 4 (NDRG4) metilasyonu ve -aktinin varlığı), daha hassas analitik tekniklerin kullanılması ve belirleme algoritmasının optimizasyonu gibi çeşitli teknolojik gelişmeler tahlilin doğruluğunu artırmaktadır (Imperiale ve ark., 2014). Dolaşımdaki tümör mRNA'sı, mikroRNA ve sitokeratinlerin hepsi potansiyel olarak yararlı göstergeler olarak değerlendirilmektedir (Bosch ve ark., 2011).

Kolon kanseri tedavisi çoğunlukla hastalığın evresine göre belirlenmekle beraber diğer koşullar da rol oynayabilir. Cerrahi yöntem, genellikle uzak bölgelere ilerlememiş kolon kanseri olanlar için temel veya ilk tedavidir. Kemoterapi ameliyattan sonra verilebilir (adjuvan tedavi olarak adlandırılır). Çoğu adjuvan tedavi yaklaşık 6 ay sürer.

Endoskopik Tedavi: Kolon kanserinin erken teşhisinin avantajı, hastaların endoskopik mukozal rezeksiyon, düşük maliyetli, düşük morbiditeli ve düşük mortaliteli bir replasman ile tedavi edilebilmesidir. Endoskopik polipektomi veya segmental rezeksiyon, düşük lenf nodu metastazı ve lokal nüks riski olan kolon kanserini tedavi etmek için kullanılabilir. Sadece tam rezeksiyon (R0) sonrası lenfatik damar invazyonu olmayan (pT1 'düşük riskli') G1 ve G2 dereceli pT1 karsinomları için geçerlidir (Nivatvongs 2000; Nishi ve Moriyasu. 2002).

Genel tedavi planı: Tedavi edilebilir kolorektal kanseri olan bireyler için, cerrahi yöntem birincil terapötik seçenektir. Adjuvan tedavi, nüks ve mortalite riskini azaltmak için kullanılan sistemik bir tedavidir. Patolojik evreleme nüks oranını gösterebilir [Sobin ve ark., 2011; van de Velde ve ark., 2014]. Adjuvan kemoterapi, evre III hastalarda ana tedavidir. Kemoterapi, metastatik kanser için sağkalımı uzatmak ve yaşam kalitesini artırmak ve sürdürmek amacıyla ilk hat tedavisidir.

Kriyocerrahi: Tümörleri küçük bir metal prob ile dondurarak ortadan kaldırır. Ultrason, probu deriden ve tümörden yönlendirmek için kullanılır. Tümör daha sonra probun ucundan çok soğuk gaz geçirerek dondurulur ve kanser hücrelerini yok eder (Ravikumar ve ark., 1991; Seager ve ark., 2021).

Radyasyon tedavisi: kanser hücrelerini öldürmek veya gelişmesini önlemek için yüksek enerjili x-ışınları veya diğer radyasyon biçimlerini kullanan kanser tedavisidir.

Radyasyon tedavisinin uygulanma şekli, tedavi edilen kanserin türü ve evresi ile belirlenir. Palyatif radyasyon tedavisi semptomları azaltmayı ve yaşam kalitesini artırmayı amaçlamaktadır (Mezgit ve ark. 2003; Martenson ve ark., 2004; Mezgit ve ark., 2011).

Kemoterapi: kanser hücrelerini yok etmek için ilaçların kullanılmasıdır. Kolon kanseri için kemoterapi, kanser çok büyükse veya lenf düğümlerine yayılmışsa ameliyattan sonra sıklıkla uygulanır. Kemoterapi böylece vücutta devam eden kanser hücrelerini ortadan kaldırabilir ve kanser nüks şansını azaltmaya yardımcı olabilir. Kemoterapi, büyük bir kanseri azaltmak için ameliyattan önce de verilebilir, böylece ameliyatla çıkarılabilir. Kemoterapi, cerrahi olarak çıkarılamayan veya vücudun diğer bölgelerine göç eden kolon kanseri semptomlarını tedavi etmek için de kullanılabilir. Bazen radyasyon tedavisi ile birlikte kullanılır. Düşük riskli evre III kolon kanseri olan bazı kişiler için ameliyattan sonra daha kısa bir kemoterapi kürü elde edilebilir (Wolmark ve ark., 2000). Metastatik kanserin birinci basamak tedavisi için, 5-florourasil, lökovorin ve oksaliplatin (FOLFOX prosedürü) veya irinotekan kombinasyonu genellikle kullanılır (FOLFIRI protokolü). Kapesitabin, FOLFOX rejiminde 5-florourasilin yerini alabilir, ancak kapesitabin ve irinotekan kombinasyonu FOLFIRI'den daha toksiktir. 5-florourasil, lökovorin, oksaliplatin ve irinotekan (FOLFOXIRI protokolü) kemoterapi tedavilerinin etkili olduğu gösterilmiştir (Van Cutsem ve ark., 2014).

Hedefe yönelik ilaç tedavisi: günümüzde sadece evre IV metastatik kolon kanseri olan bireylerde kullanılmaktadır. Tek başına kemoterapiye iyi yanıt vermeyen hastalar, bu aşamada hedefe yönelik tedavinin eklenmesinden fayda görebilirler. Bu nedenle, tedavi seçeneği kanserin tedavi edilebilir olup olmadığına göre belirlenebilir. Hedefe yönelik tedaviler, kemoterapinin aksine, kanser gelişimini ve sağkalımı artırabilecek spesifik reseptörleri hedef alır. Günümüzde, ileri kolon kanserini tedavi etmek için altı hedefli tedavi kullanılmaktadır: bevacizumab, cetuximab, panitumumab, regorafenib (Stivarga), ramucirumab (Cyramza) ve ziv-aflibercept (Zaltrap) (Denlinger ve ark., 2017; Benson ve ark., 2018).

İmmünoterapi: yeni ve umut verici bir kanser tedavi yöntemidir. Gastrointestinal kanserlerdeki etkisi, özellikle ileri evre hastalıklarda umut vericidir. İlerlemiş kolorektal kanserin tedavisi için birçok ilacın bulunmasına rağmen, bu bireyler için hayatta kalma oranları nispeten düşük kalmaktadır. İmmünoterapi, tümörlerinde uyumsuzluk-onarım-eksik mutasyonlar veya mikrosatellit instabilitesi olan kolorektal kanser hastalarının bir alt kümesinde istisnai etkiler göstermiştir (Stein ve ark., 2018). Kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için bağışıklık sistemini kullanır. Bazıları bağışıklık sistemini güçlendirir ve kanserle daha etkili bir şekilde savaşmasını sağlar. Bazıları ise, bağışıklık sisteminin kanseri tespit etmesini kolaylaştırmak için tümör hücrelerini etiketler.

Destekleyici (palyatif) bakım: bireye sadece hastalıklarından ziyade bir bütün olarak odaklanan bir bakım türüdür. Amaç, hastalığın semptomlarını ve yan etkilerini ve tedavisini mümkün olduğunca erken önlemek, ayrıca bağlantılı psikolojik, sosyal ve manevi sorunları önlemek veya tedavi etmektir (Temel ve ark., 2010).

2.2 Apoptoz

Apoptoz, Yunanca bir terimdir ve elektron mikroskobu tarafından ortaya konan hücresel nekrozun aksine, düzenlenmiş hücre ölümü (apoptoz) yaşayan hücrelerdeki belirgin değişiklikleri ifade eder (Cummings ve ark., 1997). Genellikle programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, dikkatle kontrol edilen, enerjiye bağımlı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptozun indüklenmesi, hücresel şekil ve ölümdeki değişikliklerle sonuçlanan bir dizi çeşitli biyokimyasal reaksiyona neden olur. Hücre büzülmesi, nükleer parçalanma ve DNA parçalanması apoptozun belirtileridir. Apoptotik hücreler, nekrozun aksine, hücre içi bileşenlerin kaybı olmadan çevreleyen hücreler tarafından fagositize edilen apoptotik cisimler üretir. Apoptozis fizyoloji ve patolojide çok önemlidir. İskemi, hipoksi, ilaç, kimyasal maruziyet, immünolojik yanıtlar, viral enfeksiyon ajanları, yüksek sıcaklıklar, radyasyon ve birçok hastalık durumu dahil olmak üzere çeşitli uyaranlarla aktive edilebilir.

Apoptoz, çok çeşitli genlerin aktivasyonunu, ekspresyonunu ve modülasyonunu içeren, istenmeyen veya hastalıklı hücreleri ortadan kaldırmak ve istikrarlı bir iç ortamı korumak için organizmalarda programlanmış hücre ölümüyle sonuçlanan özerk bir süreçtir. Apoptoz, programlanmış hücre ölümüne aracılık eden kaspaza bağımlı veya kaspazdan bağımsız bir süreçtir. İlk olarak 1972 yılında Kerr ve ark. tarafından

tanımlanan apoptozis (Kerr ve ark., 1972), son 50 yılda kanser tedavisi için olası bir strateji olarak büyük ilgi görmüştür. Tümör hücrelerinde apoptoz yetmezliği malign potansiyel ve kemoterapi toleransı ile sonuçlanır. Apoptoz, hücre tipinden ve hasar tipinden büyük ölçüde etkilenen yukarı ve aşağı düzenleyici yeteneklere sahip çok sayıda maddenin dinamik bir etkileşimidir. Apoptoz makinelerinde tek bir faktör yalnızlık içinde çalışmaz. Tek bir bileşenin aktivasyonunun veya inaktivasyonunun hücrenin kaderini değiştirmesi ve planlı hücre ölümüyle sonuçlanması olası değildir.

Apoptoz tipik olarak sisteinil aspartat spesifik proteazlar (kaspazlar) olarak bilinen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Kaspazlar, uzun süreli N-terminaline sahip başlatıcı kaspazlar (8 ve 10) ve daha kısa bir N-terminaline sahip yürütme kaspazları (3, 6 ve 7) olarak sınıflandırılır. Kaspaz 3, 6 ve 7 iki farklı yolla tetiklenir: dışsal (ölüm reseptörü) ve içsel (mitokondriyal) (Wexler ve ark., 2005). TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand tedavisinin (TRAIL) veya Fas ligandlarının, Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) veya TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı gibi adaptör moleküleriyle ilişkili olarak reseptörlerine bağlanması, kaçınılmaz olarak, başlatıcı kaspaz 8 ve 10'un bölünmesine ve aktivasyonuna yol açar. Bu da anahtar yarıklarında kaspazları (3, 6 ve 7'yi) aktive eder, apoptozla sonuçlanır (Krammer 2000; Walczak ve Krammer, 2000).

Proapoptotik proteinler, intrinsik (mitokondriyal) yolakta serbest sitozolik sitokrom c'yi artırır. Apoptozom, sitokrom c, apoptozu aktive eden faktör-1 (Apaf-1), adenozin trifosfat ve prokaspaz 9 ile birleştiğinde oluşur. Apoptozom, kaspaz 3, 6 ve 7'yi aktive ederek apoptozu uyaran kaspaz 9'u parçalara ayırır ve aktive eder (Adrain ve Martin, 2001).

Apoptoz sırasında meydana gelen farklı morfolojik değişiklikler ışık ve elektron mikroskobu kullanılarak belgelenmiştir (Hacker 2000). Işık mikroskobu, apoptozun erken evrelerinde hücre büzülmesini ve piknozu tespit edebilir (Kerr ve ark., 1972). Hücre büzülmesi, hücrelerin küçülmesine, sitoplazmanın yoğunlaşmasına ve organellerin daha sıkı bir şekilde paketlenmesine neden olur. Diknoz, kromatin yoğuşmasından kaynaklanır ve apoptozun en ayırt edici yönüdür. Apoptozis histolojik incelemede hematoksilin ve eozin boyası kullanılarak tek hücrelerde veya küçük hücre kümelerinde görülür. Apoptotik hücreler, siyah eozinofilik sitoplazma ve bol miktarda mor nükleer kromatin fragmanı ile yuvarlak veya oval şekillidir.

2.3 Nekroz

Nekroz, lokal hücre ölümünü takiben hücresel değişikliklerin birikmesi ve otosindirim veya otoliz olarak bilinen hücresel kendi kendine sindirim sürecidir. Apoptoz ve nekroz hücre ölümünün iki farklı tipidir. Nekroz fizyolojik koşulların dışında meydana gelirken, apoptoz fizyolojik veya patolojik olarak ortaya çıkabilir. Apoptoz hem normal hem de enfekte olmuş hücrelerde ortaya çıkar. Apoptozun kendine özgü morfolojik özellikleri vardır. Nekrozda, aşırı hücreye sıvı akışı malzemenin büyümesine neden olur, ancak apoptozda hücre küçülmesi meydana gelir. Nekroz, patolojik durumların neden olduğu geri dönüşümsüz hücresel hasar ve nihai hücre ölümü olarak tanımlanır. İntrinsik sinyallerin neden olduğu apoptozun aksine, nekroz hücre dışından gelen ezici bir zararlı uyarandan kaynaklanır ve genellikle ısı şoku proteinleri, ürik asit, ATP, DNA ve nükleer proteinlerin deşarjı nedeniyle enflamatuvar yanıtlarla ilişkilidir. Bu da enflamatuar aktivasyonu ve proinflamatuar sitokin interlökin-1 beta'nın (IL1) salgılanmasını indükler (Ruffolo 1964; Festjens ve ark., 2006).

Genel olarak, nekroz kaspaz aktivasyonu veya normal gelişim ile ilişkili değildir. Ancak nekroptoz, pirotoks ve ferroptoz dahil olmak üzere birçok kontrollü nekroz türü keşfedilmiştir. Nekroptoz ve pirotozis, apoptoz gibi, öncelikle kaspazlar, kinazlar ve poliubikitin sistemi gibi enzimatik yollar tarafından aracılık edilir (Lockshin ve Williams, 1965; Lockshin ve Zakeri, 2001; Tonnus ve ark., 2019). Özellikle nekroptoz, hem apoptoz hem de otofaji ile ortak çok sayıda kritik mekanizmaya sahiptir (Kroemer G ve ark., 2005; D'Arcy., 2019) Ferroptoz da, seçici lipid peroksidasyonu senkronize kontrollü nekroz üretir (Tonnus W., 2019).

Hücre hasarı hem görünür hem de hücre içi anormallikleri içerebilir (Ruffolo, 1964). Hipoksi, fiziksel ajanlar, kimyasal ajanlar, biyolojik ajanlar, immünolojik reaksiyonlar bu uyaranlar arasında sayılabilir. Nekrozu indükleyen biyolojik mekanizma, zararlı uyaranlara maruz kalmanın bir sonucu olarak hücre zarı bütünlüğünün bozulmasıdır. Bu durum hücre dışı iyonların hücre içinde göç etmesine, ardından sıvının gelmesine izin verir, bu da hücrenin ve organlarının genişlemesine neden olur. Başka bir biyolojik süreç, proteazlar, RNAazlar, DNAazlar ve fosfatazlar gibi proteolitik enzimlerin hücreye girmesine izin veren lizozomal membranın tahrip edilmesidir. Sitozolde tetiklendiğinde, DNA, RNA ve protein bozulmasına neden olurlar (Guicciardi ve Gores, 2013). Bu enzimler hücresel bileşenleri sindirerek hücre ölümünü tetikler. Bu

yöntemlerin her ikisi de plazma zarının yırtılmasına neden olur ve hücre içi materyallerin çevredeki tisse içine akmasına izin verir (Ruffolo, 1964).

Morfoloji: Nekroz, hücrelerde farklı mikroskobik ve makroskobik morfolojiler üretir (Tonnus ve ark., 2019). Aşağıda nekroz varyasyonları gösterilmiştir:

1. Koagülatif nekroz: İskemi, beyin hariç tüm organlarda pıhtılaştırıcı nekrozu indükleyebilir. Hücre yapısı bu tür nekrozlarda korunur. Hücreler anükleat, eozinofilik ve mikroskop altında hasarsız morfolojiye sahip görünmektedir. Fagositoz ve lökositler sonunda ölü hücreleri uzaklaştırır (Marunouchi ve Tanonaka, 2015).

2. Sıvıaktif nekroz: santral sinir sisteminde en sık görülen bir morfoloji gibi görünmektedir (Chung ve ark., 2018). Ölmekte olan hücreler hidrolitik enzimler tarafından parçalanır ve yapısal bütünlüğü kaybetmelerine ve sıvı karmaşası haline gelmelerine neden olur. Bu şekil bakteriyel enfeksiyonların çoğunda da görülür ve nekrotik materyalin birikmesi irin olarak bilinir.

3. Kazeöz nekroz: Kazeöz terimi, nekrotik bölgenin beyaz rengiyle ilgilidir ve "peynir benzeri" anlamına gelir. Bu nekroz tüberküloz enfeksiyonu sırasında ortaya çıkar ve nekrotik bölge granülom olarak bilinir (Adışen ve Önder, 2017).

4. Gangrenöz nekroz: morfolojik bir paternden ziyade ekstremitelerin iskemik nekrozu için klinik bir terminolojidir. Kuru (pıhtılaştırıcı nekroza neden olan iskemi) veya ıslak (sıvılaştırıcı nekroza yol açan üst üste binmiş bakteriyel enfeksiyonlu iskemi) olarak sınıflandırılır (Taj-Aldeen ve ark., 2006).

5. Yağ nekrozu: Bu tür nekroz, akut pankreatitin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Pankreas enzimlerinin boşalması, periton boşluğundaki yağ hücrelerini sıvılaşmaya zorlar. Bu sıvılaştırılmış yağ hücreleri daha sonra tebeşirli beyaz bölgeler oluşturmak için kalsiyum ile etkileşime girer. Saponifikasyon bu sürece verilen isimdir. Bu, mikroskop altında, nekrotik yağ hücrelerinin sınırlarında bazofilik kalsiyum birikintileri olarak belirgindir. Yağ nekrozu, yağ sabunlaşmasının bir sonucu olarak meme dokusunda ortaya çıkar (Vasei ve ark., 2019).

6. Fibrinoid nekroz: Bu nekroz çeşidi, kan damarı duvarlarında bağışıklık kompleksi birikiminin bir sonucu olarak kan damarlarında gelişir ve fibrin

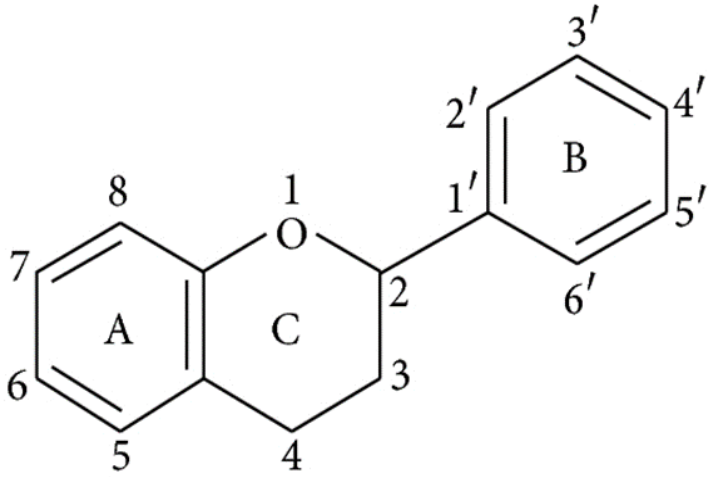
sızıntısına neden olur. Bu lekeler parlak pembe amorf bir partikül olarak görülebilir (Jog ve Caricchio., 2014).

2.4 Flavonoidler

Flavonoidler, çevresel zorluklara direnmede ve bitkilerde hücre büyümesini kontrol etmede önemli bir rol oynayan yaklaşık 5000 hidroksillenmiş polifenolik bileşiğin büyük bir ailesidir (Kumar ve Pandey, 2013). Flavonoidler ve diğer fenolik bileşikler, en az bir hidroksil grubuna sahip aromatik bir halkaya sahip bitki ikincil metabolitleridir. Bitkilerde 8000'den fazla doğal olarak oluşan fenolik bileşik tanımlanmıştır (Kumar ve Pandey, 2013; Ahmed ve ark., 2016). Flavonoidler hem shikimik asit hem de asetik asit yolları aracılığıyla sentezlenebilen bir tür düşük moleküler ağırlıklı polifenolik moleküldür. Flavonoidler, oksijen içeren bir piren halkası gibi üç karbonlu bir birim ile bağlanmış iki benzen halkasından oluşan temel bir çekirdek (C6-C3-C6) oluşturmak için üç malonil-CoA biriminin (C-2) ve bir P-kumarik asit biriminin (C-9) yoğuşmasıyla üretilir. Yapısal özellikleri, A-halkasında (genellikle bir phloroglucinol veya resorsinol hidroksilasyon paterni) ve B-halkasında (tipik olarak katekol, pirogalol veya 4'-hidroksillenmiş) çeşitli ikame modellerine sahip bir 2-fenil kromon iskeletini içerir (Aherne and O'Brien 2002; Havsteen 2002). Üç karbonlu birimin (C-halkası) oksidasyon hızı, flavanlar, flavanonlar, flavonlar, flavanoller, flavanoller, kateşinler, antosiyanidinler ve izoflavon gibi çeşitli flavonoid kategorileri oluşturur.

Flavonoidler olarak bilinen polifenolik bileşikler altı farklı türe ayrılır: flavonoller, flavanonlar, flavanoller, flavanovlar, flavonlar, antosiyanidinler ve izoflavonoidler. Her tip insan vücudu tarafından farklı şekilde ayrıştırılır (Kumar ve Pandey, 2013; Ahmed ve ark., 2016). Flavonoidler yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir ve vücudun toksinlerle savaşmasına yardımcı olabilir. Flavonoidler, bitkileri olumsuz çevresel koşullardan koruyan güçlü antioksidanlar olduğundan (Nabavi ve ark., 2018) (Vrhovsek ve ark., 2004), bu özelliklerle çok dikkat çekmişlerdir. Flavonoidler, in vitro ve in vivo olarak anti-enflamatuar, immünomodülatör (Yahfoufi ve ark., 2018) ve güçlü antikanser özelliklerini (Abotaleb ve ark., 2018; Chirumbolo ve ark., 2018 Rodriguez-Garcia ve ark., 2019) birçok epidemiyolojik ve deneysel araştırmada kullanılmışlardır (Rodriguez-Garcia ve ark., 2019). Farklı flavonoid türevleri ile yapılan çalışmalarda, DNA da dahil olmak üzere makromoleküllere zarar verebilecek serbest radikalleri

temizlediği (Delgado ve ark., 2008; Erba ve ark., 2012); biyotransformasyon enzimleri ve efflux taşıyıcıları ile etkileşime girerek, potansiyel olarak prokanserojen kimyasal bileşiklerin aktivasyonunu önlemeye ve vücuttan atılımlarını artırmaya yardımcı oldukları (Delgado ve ark., 2008); apoptoza neden olan yolakların proliferasyonunu, DNA onarımını veya aktivasyonunu düzenledikleri (programlanmış hücre ölümü) (Suh ve ark., 2009; Ravishankar ve ark., 2015); kanserin yayılmasını ve büyümesini engelledikleri bildirilmiştir (Ravishankar ve ark., 2015; Santos ve ark., 2015).



Şekil 2: Temel flavonoid yapısı. (Atınç M ve Kalkan İ, 2018)

Flavonoidlerin Biyomoleküler Aktiviteleri

1. Oksijen radikallerinin inaktivasyonu
2. Elektrofillerin bağlanması
3. Koruyucu enzimlerin indüksiyonu: konjuge edici aktivitelerle faz 2 (GST, glutatyon S-transferazlar; GT, glukuronosil transferazlar; GSH, glutatyon)
4. Apoptoz oranı artışı
5. Hücre proliferasyon inhibisyonu
6. Lipid peroksidasyon inhibisyonu
7. Anjiyogenez inhibisyonu
8. H-Donasyonu (GSH-peroksidazlar)
9. DNA oksidasyon inhibisyonu

Narenciye flavonoidlerinin biyolojik özellikleri (Manthey ve ark., 2001) ve çaydaki polifenoliklerin kanser önleme ve apoptotik indüksiyondaki etkinliği (Galati ve ark., 2000) kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Elektrofiller, serbest radikaller ve ROS GST, GT gibi koruyucu enzimler tarafından inaktive edilir ve mutajen haline gelmeleri önlenir. Brüksel lahanasındaki flavonoller ve flavonların, konjuge edici enzimler ve idrar 5′-difosfo (UDP)-GT ve GST gibi koruyucu enzimleri bağırsaklarda ve karaciğerde aktive ettiği bildirilmiştir. (Steele ve ark., 2000; Van der Logt ve ark., 2003)

Antioksidan Etki: Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS), hücrelere enerji sağlamak için ATP sentezi sırasında hücresel redoks reaksiyonunun yan ürünleri olarak oluşur. ROS ve RN, dengedeyken hücresel süreçler ve immünolojik tepkiler için yararlı kimyasallardır, ancak dengesiz bir ROS ve RNS konsantrasyonu, kronik ve dejeneratif sorunlara neden olabilecek oksidatif stres üretir (Valko ve ark., 2005; Pham-Huy ve ark., 2008). Birçok doğal antioksidan bileşik, tıbbi ve farmasötik uygulamalarda, karsinogenezin önde gelen nedenlerinden biri olduğu düşünülen üretilen antioksidan bileşiklerin yerine geçen bileşenler olarak kullanılmıştır (Carocho ve ark., 2014).

Antibakteriyel Etki: Yüksek antibakteriyel özelliklere sahip birkaç flavonoid vardır. Bu bileşikler hem çiçeklenmeyen hem de çiçek açan şifalı bitkilerde bulunabilir. Eğrelti otu, *Aspleniumnidus nidus L., Proteus mirabilis Hauser, Proteus vulgaris Hauser* ve *Pseudomonas aeruginosa* (*Schroeter*) *Migula* (Jarial ve ark., 2016) gibi üç enfeksiyonla mücadele edebilen gliricidin 7-O-heksozid ve quercetin-7-O-rutinosid içerir. Ayrıca flavonoid maddeler, geleneksel tıpta veya gıda tüketimi için kullanılan birçok şifalı bitki türü de dahil olmak üzere çeşitli bitki gruplarından üretilir. Hindistan cevizi veya Myristica fragrans Houtt., bu duruma bir örnektir. Bu bitki uzun zamandır Endonezya ve diğer Güney Doğu Asya ülkelerinde tatlandırıcı bir bileşen olarak kullanılmaktadır (Nagja ve ark., 2016; Dzotam ve ark., 2018).

Anti-Kanser Etki: Flavonoidlerin etkilerini empoze ettiği en önemli mekanizmalar arasında, hücresel nükleofiller ile etkileşime girebilecek ve sonunda karsinogenezi tetikleyebilecek ara ürünleri yeniden aktive etmek için çok sayıda prokanserojeni metabolik olarak aktive eden faz I metabolize edici enzimlerle (sitokrom P450) etkileşimleri vardır. Flavonoidler, CYP1A1 ve CYP1A2 gibi bazı P450 izozimlerinin aktivitesini baskılar (Le Marchand ve ark., 2000). Kanserojen aktivasyonu ile hücresel hasarın indüksiyonuna karşı koruyabileceklerini düşündürmektedir.

Bir başka etki yöntemi, kanserojenleri vücuttan detoksifiye eden ve uzaklaştıran faz II metabolize edici enzimlerin (GST, kinon redüktaz ve UDP-GT) (Sun ve ark., 1998) aktivasyonudur. Bu, flavonoidlerin karsinogeneze karşı kemopreventif faydalarını açıklamaya yardımcı olur. ROS ve RNS gibi dengesizlik ve yüksek miktarda serbest radikaller de mutajenik veya kanserojen ajanlar haline gelebilir ve bu da kanser gelişimine yol açabilir. Kemoterapi, birtakım sınırlamaları olmasına rağmen, dünya çapında kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İstenmeyen yan etkiler, örneğin, kemoterapi tedavisi sırasında ortaya çıkabilir. Sonuç olarak, yan etkisi olmayan ve engelleyici derecede pahalı olmayan alternatif kanser tedavileri bulmak önemlidir. Flavonoidlerin anti-proliferatif etkisi, kolon kanseri için farklı flavonoid tipleri ile literatür çalışmalarında gösterilmiştir (Kuo 1996). Özellikle apigenin ve kuersetagetinin anti-proliferatif etkileri olduğu gösterilmiştir. Quersetagatetin'in Bax / Bcl2 oranını ve Caspase3'ü artırarak apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir (Murthy ve ark., 2012). Turktekin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kolon kanserinin apigenin ile tedavisinden sonra mTOR ve CCND1 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Turktekin ve ark., 2011). Kolon kanseri üzerindeki etkileri araştırılan başka bir flovonoid türevi olan morin ile yapılan bir çalışmada, NF-κB'nin inhibisyonu yoluyla inflamatuar mediatörlerin üretimini azalttığı gösterilmiştir (Sharma ve ark., 2018). Zhao ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, brozimon-I'in hücre döngüsü G1 fazını durdurduğu ve kolon kanseri hücrelerinde apoptoza neden olduğu bildirilmiştir. Bunun ROS aracılı artmış sitozolik Ca^{2+}, ER stresi ve CaMKK-AMPK yolunun aktivasyonunun azaltılması yoluyla olabileceği belirtilmiştir (Zhao ve ark., 2019). Flavopiridol, flavonoid Dysoxylum binectariferum'dan (Roxb.) üretilen bir ilaç olup lenfoma ve lösemi tedavisinde kullanılan fitokimyasal bir maddeden türetilen antikanser ilacına örnektir (Cragg ve Newman, 2005; Shah ve ark., 2013). Ayrıca, besin takviyeleri çeşitli kanser türlerinin önlenmesinde ve tedavisinde önemli bir role sahiptir. Özellikle flavonoidler, kanser tedavisinde kemopreventif ajanlar olarak uzun zamandır tanınmaktadır (Mishra ve ark., 2013; Brusselmans ve ark., 2003; Ahmed ve ark., 2016).

Anti-kolinesteraz Aktivite: Asetilkolinesteraz (AChE), merkezi sinir sisteminde kritik bir enzimdir ve inhibe edilmesi, hafif ila şiddetli Alzheimer hastalığı semptomlarının tedavilerinden biri olan nöronal asetilkolin seviyelerini yükseltir (Perry ve ark., 1978). Sonuç olarak, Alzheimer hastalığını tedavi etmek için terapötik gelişimin birincil hedeflerinden biri, kolinesterazların baskılanmasıdır. Çeşitli flavonoidlerin anti-

kolinesteraz etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Kuersetin, rutin, kaempferol 3-O-d-galaktozid ve makluraksanton gibi flavonoidler üzerinde yapılan in vitro inhibitör araştırmalar, kuersetin ve makluraksantonun AChE ve bütirilkolinesterazı (BChE) konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Khan ve ark., 2009).

Hepatoprotektif Aktivite: Kateşin, apigenin, kuersetin, naringenin, rutin ve venoruton dahil olmak üzere çok sayıda flavonoidin hapatoprotektif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Tapas ve ark., 2008). Diyabet ve diğer kronik bozukluklar hepatik klinik semptomların gelişmesine neden olabilir. Glutamat-sistein ligaz katalitik alt birim (Gclc) ekspresyonu, glutatyon ve ROS seviyelerinin hepsinin diyabetik farelerin karaciğerinde daha düşük olduğu bulunmuştur. Antosiyaninler, çeşitli rahatsızlıkları önleme yetenekleri nedeniyle popülerlik kazanmaktadır. Zhu ve arkadaşları, antosiyanin siyanidin-3-O-glukozid (C3G), protein kinaz A'yı (PKA) aktive eden cAMP seviyelerini yükselterek hepatik Gclc ekspresyonunu teşvik ettiğini ve daha sonra CREB-DNA bağlanmasını ve Gclc transkripsiyonunu kolaylaştırmak için CREB fosforilasyonunu yükselttiğini bulmuşlardır (Zhu ve ark., 2012). Silimarin, üç yapısal bileşene sahip süt devedikeni *Silybum marianum*'un tohumlarından ve meyvelerinden elde edilen bir flavonoiddir: silibinin, silidianin ve silikristin. Silimarin'in DNA'ya bağımlı RNA polimeraz 1'in enzimatik aktivitesini artırdığı ve ardından RNA ve protein üretimini artırdığı, DNA biyosentezi ve hücre proliferasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu durumun karaciğer rejenerasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Sonnenbichler ve ark., 1999).

Anti-Enflamatuar Aktivite: Enflamasyon, doku hasarına, mikrobiyal patojen enfeksiyonuna ve kimyasal alerjenlere reaksiyonda ortaya çıkan temel bir biyolojik süreçtir. Enflamasyon, kan damarlarından bağışıklık hücresi göçü ve yaralanma bölgesinde mediatörlerin salınması ile başlar. Bunu takiben, enflamatuar hücreler işe alınır. İstilacı patojenleri yok etmek için ROS, RNS ve proinflamatuar sitokinler salınır ve yaralı dokular onarılır. Normal inflamasyon sıklıkla hızlı ve kendi kendini sınırlayan, ancak anormal çözünürlük ve uzun süreli inflamasyon çeşitli kronik hastalıklara neden olur (Pan ve ark., 2010).

Hesperidin, apigenin, luteolin ve kuersetin dahil olmak üzere çeşitli flavonoidlerin anti-enflamatuar ve analjezik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Flavonoidler, enflamatuar süreçlerin, özellikle tirozin ve serin-treonin protein kinazlarının üretiminde çok önemli olan enzim sistemlerinin çalışmasını doğrudan etkileyebilir (Nishizuka 1988;

Hunter 1995). Dolaşımdaki lökositlerin hasar bölgelerine yapışmasına aracılık eden protein sitokinlerinin üretimi, flavonoidin anti-enflamatuar aktivitesinin çoğunluğunu oluşturur. Bazı flavonoidler, güçlü proinflamatuar sinyal kimyasallarının bir sınıfı olan prostaglandin sentezinin etkili inhibitörleridir (Manthey 2000). In vitro kuersetin çalışmalarında, IgG, IgM ve IgA izotiplerinin mitojen ile uyarılmış immünoglobulin üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Cumella ve ark., 1987). Ayrıca bazı flavonoidlerin trombosit yapışmasını, agregasyonunu ve sekresyonunu güçlü bir şekilde azaltığı gösterilmiştir (Beretz ve Cazenave, 1988). Flavonoidin trombositler üzerindeki etkisi, karbon monoksitin araşidonik asit metabolizmasını baskılamasıyla ilişkilendirilmiştir (Corvazier ve Maclouf, 1985).

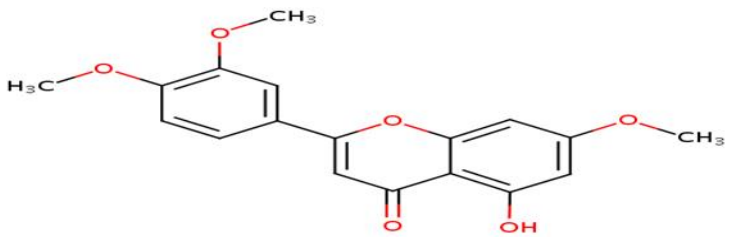
Antiviral Aktivite: Kullanılabilirlikleri ve beklenen düşük yan etkileri nedeniyle, doğal bileşikler yeni antiviral ilaçların keşfi ve geliştirilmesi için gerekli bir kaynaktır. 1940'lardan bu yana, antiviral aktiviteye sahip doğal olarak oluşan flavonoidler keşfedilmiştir ve farklı flavonoidlerin antiviral aktivitesi hakkında çeşitli veriler mevcuttur. Antiviral kimyasal araştırmaların çoğu, viral yaşam döngüsünde yer alan çeşitli enzimlerin inhibisyonuna odaklanmaktadır. Flavonoidler ve enzim inhibitör etkileri arasında bir yapı-fonksiyon bağlantısı vardır (Pan ve ark., 2010).

2.4.1 Gonzalitosin-I

5-hidroksi-3',4',7-trimetoksiflavon; HTMF, *Clausena lenis, Lantana monteviensis* (Moleküler Formül: C18H16O6, Moleküler Ağırlık: 328.3) doğal bir üründür. Hemhidrofilik (hidroksil grubu) hem de hidrofobik (benzen halkaları) fonksiyonel grupları ile doğal olarak oluşan bir polifenolik moleküldür. Son yıllardaki çalışmalarda, radikal süpürme etkisi için yüksek antioksidan kapasitesi gösterilmiştir (Sudha, A. ve Srinivasan, P. 2014).

Lippia nodiflora bitkisinden elde edilen HTMF'nin in-vitro anti-enflamatuar aktivitesi araştırıldığında, sonuçların umut verici olduğu gözlenmiştir (Al-Snai, A. E., 2019). HTMF'nin tüm antioksidan analizlerinde güçlü antioksidan aktivite sergilediği ve lipit peroksidasyonunu büyük ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Balakrishnan G ve ark., 2010). Sudha ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmaya göre, HTMF'nin zamana bağlı bir yaklaşımla hücre içi ROS üretimini uyardığı ve DNA hasarına neden olduğu ortaya çıkmıştır. HTMF'nin, Bax / Bcl-2 oranını artıran p53 ve duyarlı geni p21'i aktive ederek apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Sudha, A ve ark., 2018).

Literatürde HTMF'nin sadece meme kanseri hücreleri MCF-7 üzerindeki etkisi araştırılmış, başka bir kanser türü üzerindeki etkisi ise henüz araştırılmamıştır. Buna göre, HTMF'nin meme kanseri hücrelerinde Bcl-2'yi aşağı regüle ederek ve p53, Bax ve PARP bölünmesini yukarı regüle ederek intrinsik apoptotik yolu kontrol ettiği bildirilmiştir (Sudha, A ve ark., 2018). HTMF ile ilgili literatürdeki bir diğer bilgi, K562 / BCRP hücrelerinde HTMF'nin SN-38 direnci üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğu ve ayrıca BCRP aracılı taşıma akışını inhibe ettiği ve BCRP ekspresyonunu baskıladığıdır (Tsunekawa, R ve ark., 2019).

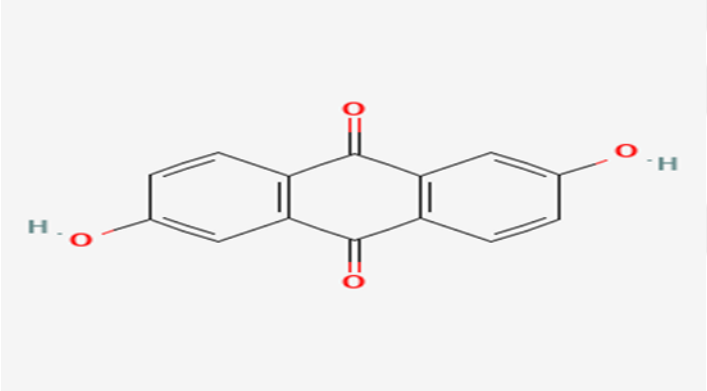


Şekil 3: Gonzalitosin-I'in Kimyasal Yapısı (Pubchem.ncbi)

2.4.2 Antraflavik Asit

2,6-Dihidroksiantrakin, Antraflavin (Moleküler Formül: C14H8O4, Moleküler Ağırlık: 240.21), C-3 ve C-7'de hidroksi grupları ve C-9 ve C-10'da okso grupları olan antrasenden oluşan bir dihidroksiantrakinondur. Anti-mutajen ve bitki metaboliti olarak işlev görür.

Bir flavonoid olan antraflavik asit, sitokrom P-448'in güçlü bir mutajenik ve seçici inhibitörüdür. Hem mikrozomal hem de sitozolik aktivasyon yollarını inhibe eder (Ayrton, A ve ark., 1988). Bir araştırmaya göre, antraflavik asit, P-450 aktivitesinin bir indükleyicisidir (Ayrton, A ve ark., 1988). Nguyen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, antraflavik asidin mide, rahim ağzı ve karaciğer kanserlerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Nguyen T ve ark., 2018).



Şekil 4: Antraflavik asidin Kimyasal Yapısı (Ruyck ve ark., 2006)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1 Kimyasal

- Gonzalitosin-I (5-hidroksi-3',4',7-trimetoksiflavon; HTMF), MCE, Malta
- Anthraflavik asit (2,6-Dihidroksiantrakinon, Antraflavin), Sigma, ABD
- Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA, %0,05), Gibco, ABD
- Bovine Serum Albumin, Sigma, ABD
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma, ABD
- ECL Prime W.B. Detection, Amersham, ABD
- Fetal sığır serumu (FBS), Wisent Bioproducts, Kanada
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco, İngiltere
- Glycine, Sigma, ABD
- Halt Protease Inhibitor Cocktail 100 X, Sigma, ABD
- Hidroklorik asit, Tekkim
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo, ABD
- Naftakinon bileşiği, İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü
- PageRuler Plus Prestained protein ladder, Thermo, ABD
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco, İngiltere
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Sigma, ABD
- RIPA solüsyonu, Thermo, ABD
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Wisent Bioproducts, Kanada
- Sulforhodamine B sodium salt, Chemcruz, Hollanda
- Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries, ABD
- PARP antikoru, Cell Signaling Technology, ABD
- RIPK1 antikoru, Cell Signaling Technology, ABD
- Cleaved Kaspaz-3 antikoru, Cell Signaling Technology, ABD
- Bax antikoru, Cell Signaling Technology, ABD
- Bcl2 antikoru, Cell Signaling Technology, ABD
- GAPDH, Cell Signaling Technology, ABD

3.1.2 Sarf Malzemeler

- Santrifüj tüpleri (0,5-1,5-2 ml), Isolab, Almanya
- Pipet uçları (10-200-1000µl), Isolab, Almanya
- Cam pastör pipet (2 ml), Isolab, Almanya
- Flask (25cm^2, 75cm^2 ve 175cm^2'lik), Sunub, Şangay, Çin
- Enjektör (5ml ve 10ml), Genject, Türkiye
- Plak (6 kuyulu), Sunub, Şangay, Çin
- Plak (96 kuyucuklu), Sunub, Şangay, Çin
- Hemasitometri lamı, Neubauer improved, Isolab, Almanya
- Kriyovial tüp, ATS, Almanya
- Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab, Almanya
- Steril santrifüj tüpleri (15ml), Nest, Çin
- Steril santrifüj tüpleri (50ml), Nest, Çin
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Millex, Millipore, ABD

3.1.3 Cihazlar

- Pipet seti (10 µl-200 µl -1000 µl), Brand, Almanya
- Buzdolabı (-80°C), Panasonic, MDF-U5386S-PE, Japonya
- Buzdolabı (2-8 °C), Panasonic, MPR-721-PE, Japonya
- CO_2 inkübatörü, Panasonic, MCO-230AIC-PE, Japonya
- Dikey elektroforez, Bio-Rad, ABD
- Hassas terazi, KERN, ABJ-NM/ABS-N, İsviçre
- Inverted mikroskop, Nikon, Eclipse Ts2, Japonya
- Jel görüntüleme sistemi, General Electric, ImageQuant LAS 500, ABD
- Kuru sterilizatör, Panasonic, MOV-212-PE, Japonya
- Laminer hava kabini class II, Telstar, Biovanguard, Çin
- Orbital çalkalayıcı, Lab companion, Kore
- Otoklav, Nüve, OT90L, Türkiye
- Pipetör, Isolab, Almanya
- Plak okuyucu-Spektrofotometre, BMG Labtech, Spectrostar, Almanya
- Santrifüj, Hitachi, CF16RN, Japonya

- Soğutmalı santrifüj, Hitachi, CT15RE, Japonya
- Vorteks, Scilogex, MX-F, ABD

3.2. METOD

3.2.1 Hücre Kültürü

Laboratuvarımızda HCT116 (ATCC® CCL-247TM), HT29 kolon kanseri hücre hatları ve Beas-2B meme hücre hatları kriyoviyal tüplerde -80°C'de muhafaza edilmiştir. HCT 116 hücre hattı (ATCC® CCL-247TM), kolon kanseri yetişkin bir erkek hastanın kolonundan izole edilmiştir. HCT116 hücreleri, KRAS proto-onkogen kodonu 13'te bir mutasyon içerir ve gen terapisi çalışmaları için transfeksiyon hedefleridir (Lee, ve ark., 2018). Ksenogreft modellerinde, hücreler epitel görünümü geliştirir ve yayılabilir (Rajput, A ve ark., 2008). HCT116 hücreleri, p53 genini içeren viral vektörler kullanılarak dönüştürüldüğünde, G1 fazında devam ederler (Kaeser, ve ark., 2004). 5-Fu / P85 kopolimer misellerinin HCT116 kolonilerinin büyümesini engellediği gözlenmiştir (Zhu P ve ark., 2016). Ayrıca, MARCH2 delesyonunun endoplazmik retikulum stresi yoluyla HCT116 hücre proliferasyonunu inhibe ettiği keşfedilmiştir (Xia, D ve ark., 2017).

HT-29, 1964 yılında kolorektal adenokarsinomu olan 44 yaşındaki kadın hastanın primer tümöründen türetilen bir epitel hücre hattıdır. Bu hücre hattı bir transfeksiyon konakçısı olup kanser ve toksikoloji araştırmalarında kullanılabilmektedir.

BEAS-2B hücre hattı başlangıçta insan akciğer dokusundan elde edilen bir insan tümörojenik olmayan akciğer epitel hücre hattı olarak oluşturulmuştur ve 30 yılı aşkın bir süredir çeşitli akciğer karsinogenezi araştırmalarında in vitro tümörojenik olmayan akciğer epitel modeli olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

3.2.2 Hücrelerin Depolanması

Flasklardaki hücreler çıkarıldı ve 1x PBS ile yıkandı. Yapışkan hücreler, yüzeyden ayırmak için %0,05'lik bir Tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak 5 dakika boyunca inkübatörde bekletildi. Hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine transfer edildi ve 5 dakika boyunca 800 x rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantlar uzaklaştırıldı ve hücreler 1 ml dondurmak için hazırlanan mediuma (%5-10 DMSO +%10 FBS +%80 DMEM) konuldu. Hücre süspansiyonu daha sonra kriyoviyallere yerleştirildi ve -80 ° C'de saklandı.

3.2.3. Besiyerlerinin Hazırlanması

HCT116, HT-29 ve Beas-2B hücre ortamı; RPMI, %10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin streptomisin çözeltisi eklenerek hazırlandı.

3.2.4. Bileşiklerin Stok Hazırlığı

Antraflavik asit ana stoğundan 50 mM antraflavik asit elde etmek için 1,20 mg, 10ml DMSO'da çözüldü.

Gonzalitosin-I ana stoğundan 4 mM Gonzalitosin-I çözeltisi elde etmek için 5mg Gonzalitosin-I tozu 3,8 ml DMSO içinde çözüldü.

3.2.5. Hemositometre Kullanarak Hücre Sayımı

Tripsin kullanılarak ekstrakte edilen hücrelerin 10 µl'sini alındı ve 96 kuyucuklu bir plakta 10 µl %0,5 Tripan mavisi ile birleştirildi. Bu kombinasyonun 10 µl'sini beş hemasitomerte bölgesine pipetlendi ve daha sonra mikroskop altında incelendi. 1 ml'lik ortamdaki toplam hücre sayısı, toplam hücre sayısının seyreltik katsayısı ile çarpılmasıyla tahmin edildi.

3.2.6. Sülfrodamin B (SRB) Testi ile Canlılığın Belirlenmesi

SRB suda çözünür pembe-kırmızı bir boyadır (Skehan ve ark., 1990). Test prensibi, bir protein boyası olan SRB'nin, trikloroasetik asit veya asetik asit ile sabitlenmiş hücrelerdeki amino asit kalıntılarına elektrostatik ve pH'a bağımlı bağlanmasına dayanır. Boya, hafif asidik bir çözelti içinde hücrelerden çıkarılabilir ve çözücünün ve boyanın renk yoğunluğu kolorimetrik olarak 540 nm'de belirlenebilir. SRB ile florometrik ölçümler ayrıca uyarma = 565 nm ve emisyon = 586 nm olarak da yapılabilir. Geçmiş yıllarda, SRB testinin MTT'ye göre çok daha kısa sürede yapıldığı, daha ucuz olduğu ve daha doğrusal bulgular ürettiği için bilimsel çalışmalarda daha sık tercih edildiği bildirilmiştir (Da Costa ve ark., 1999; Van ve ark., 2015).

SRB prosedürü dört ana aşamaya ayrılır:

- Tedavi hazırlığı
- Seçilmiş tedavi ile hücrelerin inkübasyonu
- Hücre fiksasyonu ve SRB boyama
- Absorbans ölçümü

SRB boya % 0,4 (kütle/hacim) asetik asit çözeltisi ile hazırlandı. Stok boya çözeltisi 4°C'de tutuldu. TCA (Trikoloroasetik asit) % (kütle / hacim) konsantrasyonda damıtılmış su kullanılarak hazırlandı ve 4 °C'de tutuldu.

Gonzalitosin-I ve antraflavik asit bileşik konsantrasyonları (160-2,5 µM) ve (500-7,81 µM) hazırlandı ve SRB testi için 96 kuyucuklu plağa yerleştirildi. Her kuyucuğa, besiyerinin 100 µl'sinde 5 x 10^3 HCT-116, HT-29 ve Beas-2B hücreleri şeklinde ekildi. Kontrol grubu sadece besiyerinde büyütülen hücrelerden oluşuyordu. Kör (blank) görevi görecek kuyucuklara sadece 200 µl besiyeri konuldu. Hücreler, Gonzalitosin-I ve Antraflavik asit ile muamele edilmeden önce %5 CO_2'de 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. Hücreler daha sonra 37 ° C'de 24, 48 ve 72 saat boyunca %5 CO2 ile inkübe edildi. 24, 48 ve 72 saatlik tedavi süresinin sonunda, her bir kuyucuğa 50 µl TCA ilave edildi ve plak 1 saat boyunca 4 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardan TCA alındı ve distile su ile 5 kez yıkandı. Yıkamadan sonra, her bir kuyucuğa 50 µl SRB boyası uygulandı ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Boya, inkübasyondan sonra kuyucuklardan çıkarıldı ve kuyucuklar %1 asetik asit çözeltisi ile 5 kez yıkandı. Plaklar tamamen kuruduktan hemen sonra, boyayı çözmek için her bir kuyucuğa 150 µl (10 mM, pH 10) tris baz döküldü. Zamanın tamamlanmasıyla, hücrelerde üretilen renk yoğunluğu, 564 nm dalga boyunda bir spektrofotometrede (Plak Okuyucu-Spektrofotometre, BMG Labtech, Spektrostar, Almanya) ölçüldü.

Kontrol grubundaki hücrelerin canlılığı %100 olarak alındı ve kimyasal olarak işlenmiş hücrelerin yaşayabilirliği aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi. Her kimyasal konsantrasyon üç farklı kuyucukta üç kez tekrarlandı.

% canlılık = [100 (kimyasal olarak uygulanan grubun absorbans ortalaması - kör absorbans ortalaması) / (kontrol grubunun absorbans ortalaması - kör absorbans ortalaması)]

3.2.7. ATP Testi

Yüksek Verimli Tarama (HTS) uygulamalarında canlı hücrelerin sayısını ölçmek için en sık kullanılan yaklaşım, ateşböceği lusiferaz kullanılarak ATP ölçümüdür (Wang, Y ve ark., 2014). ATP, canlı hücrelerde oksidatif fosforilasyon tarafından üretilen ve biyosentez, sinyalleşme, taşıma ve hareketlilik gibi çok sayıda biyolojik aktiviteden sorumlu olan kimyasal bir enerji rezervuarıdır. ATP, apoptoz veya nekroz ile ölen hücrelere düşer ve bu azalma, apoptozda daha yavaş ilerlemesine rağmen, nekrozda son

derece hızlı gerçekleşir. Sonuç olarak, hücrelerdeki toplam ATP miktarını ölçmek, hücrenin yaşayabilirliği hakkında bilgi sağlar. Lusiferinin oksilüsiferine Mg^{+2} iyonlarının varlığında reaksiyonu, günümüzün ATP test yöntemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. ATP konsantrasyonunun yanı sıra bunu takip eden lüminesans sinyali; ATP miktarı ve hücre canlılığı doğrusal bir ilişkiye sahiptir. Bu yaklaşım tipik olarak, her küçük kuyucuğa ekilen $3x10^3$ hücreli 96 kuyucuklu plakaları kullanır. Son reaktifin eklenmesi Lüminesans sinyali 10 dakika içinde stabilize olduktan sonra, lüminesans yoğunluğu ölçülmelidir (Maehara, Y ve ark., 1987; Andreotti, P ve ark., 1995)

ATP tekniğinin faydaları:

- Son derece hassastır.
- Kuluçka süresi gerektirmez.
- Hücrelerin canlılığını ölçen daha hızlı yaklaşımdır.

ATP tekniğinin sakıncaları ise:

Kuyucuklara çok hassas hücre sayımı eklenmelidir. Aksi takdirde, güvenilirlik azalır.

Gonzalitosin-I (160-80-40 µM) ve Antraflavik asit (500-250-125 µM) bileşikleri hazırlandı. ATP testi için 96 kuyucuklu plaklara yerleştirildi. Her kuyucuğa 100 µl'sinde 5×10^3 HCT-166, HT-29 ve Beas-2B hücreleri ekildi. Negatif kontrol görevi görecek kuyucuklara sadece 200 µl besiyeri konuldu. Hücreler daha sonra Gonzalitosin-I ve Antraflavik asit ile muamele edilmeden önce %5 CO_2'de 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. ATP testi için bir tane FLSAR alikot çözüldü (5 mL ultrasaf su ile çözüldü). Tüm kuyucuklardan, hücrelere zarar vermeden 150 µl besiyeri atıldı. Her kuyucuğa 50 µl FLSAR eklendi. Köpük oluşturmadan, yavaşça 3-5 kez pipetaj yapıldı ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında, birer tane FLAAM ve FLAAB alikotları çözüldü. Karıştırılıp, oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. İnkübasyon sonunda, kuyucuklar içeriklerinden 50 µL beyaz plaklara transfer edildi. FLAAM+FLAAB karışımından her bir kuyucuğa 50 µL pipetlendi. Luminesans okuma, Luminometre (Bio-Tek, USA) ile 5 dakika içerisinde yapıldı.

% canlılık = [100 (kimyasal olarak uygulanan grubun absorbans ortalaması - kör absorbans ortalaması) / (kontrol grubunun absorbans ortalaması - kör absorbans ortalaması)]

3.2.8. Yara İyileştirme Testi

Gonzalitosin-I ve antraflavik asidin hücre migrasyon yeteneği üzerindeki etkisini görmek ve karşılaştırmak için yara iyileşmesi testi yapıldı. Hücre süspansiyonunu $12x10^4$ hücre/ml'ye ayarlandı ve kültür plaklarının her bir kuyucuğuna 500µL eklendi. Kültür plakları, hücreler tek katmanlı bir tabaka ürettikten sonra çıkarıldı. HCT 116 için antraflavik asit 193 µM ve HT 29 için 128 µM, HT 29 için Gonzalitosin-I 51 µM ve HCT 116 hücreleri için 194 µM ile muamele edilmeden önce hücreler PBS ile yıkandı. Çeşitli zaman aralıklarında, göç eden hücreler mikroskop (Leica, ABD) kullanılarak (24, 48, 72 saat) fotoğraflandı. Yara kapanma bölgesini incelemek için Image J yazılımı kullanıldı.

3.2.9 DAPI/PI Boyama

PI; 4,6-diamidino-2-fenilindol, DAPI; 5, (6)-karboksifloresein diasetat, hücrelerin canlı mı yoksa ölü mü olduğunu tanımlamak için kullanılan iki boyadır. PI sadece hasarlı bir zara sahip hücrelere nüfuz ettiğinden, PI tarafından boyanan hücreler açıkça ölü hücreler olarak karakterize edilir. Öte yandan DAPI, sağlam bir zara sahip olsalar bile hücrelere nüfuz eder. Ölü hücreler hem DAPI hem de PI ile boyanabilir. Aradaki fark, iki rengin DNA'ya farklı şekillerde bağlanmasıdır. DAPI tercihen DNA'nın A-T-bakımından zengin bölgelerine bağlanırken, PI, bazlar arasında çok az veya hiç dizi tercihi olmadan interkalasyon yaparak DNA'ya bağlanır.

HCT-116, HT-29 ve Beas-2B hücreleri, IC90 dozlarında antraflavik asit ve gonzalitosin-I bileşiği ile 24 ve 48 saat boyunca tedavi edildi. Hücrelerin ölüm mekanizması çift boyama DAPI/PI testi kullanılarak fotoğraflandı. Bu deneyin amacı, iki bileşiğin IC90 dozlarını kullanarak hangi hücre ölüm modunu etkilediğini belirlemek idi. HCT-116, HT-29 ve Beas-2B hücreleri, her bir kuyucuğa $5x10^3$ hücre/100 µL olarak 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Ekim ile eş zamanlı olarak antraflavik asit ve gonzalitosin-I bileşiği IC 90 (hücre canlılığını %90 azaltan doz) dozlarında ilgili kuyucuklara uygulandı. Hücreler inkübatörde 24 ve 48 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda antraflavik asit ve gonzalitosin-I ile muamele edilen kuyucukların 180 µL süpernatantı uzaklaştırıldı ve 75 µL PBS, 2,75 µL DAPI ve 2 µL PI karışımı ilave edildi. Hücreler karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra Nikon Eclipse Ts2 immünofloresan mikroskobu kullanılarak fotoğraflandı.

3.2.10 Western Blot Analizi

Log büyüme fazındaki HCT-116 ve HT-29 hücreleri, RIPA tamponu eklenmeden önce antraflavik asit ve gonzalitosin-I ile 48 saat boyunca tedavi edildi. Lizat, 4 °C'de 10 dakika boyunca 13.000 x g'de santrifüj edilmeden önce 30 dakika boyunca 4 °C'de inkübe edildi. Örneklerdeki total protein miktarı BCA (bikinkoninik asit) yöntemi ile ölçüldü (Taylor, S., ve Posch, A. 2014). BCA analizi için örnekler 1:10 oranında dilue edildi. Sığır serum albümin (BSA) standartları hazırlandı (2-0,0625 mg/ml).

- Kitin içerisinden çıkan Working solution, Reagent A ve Reagent B oranı 1:50 olacak şekilde hazırlandı.
- Örnekler ve standartlardan 25 µL, working solutiondan 175 µL 96 kuyucuklu mikroplaklara pipetlendi.
- Plak, 37°C de 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Sonuçlar 562 nm dalga boyunda plak okuyucuda (Thermo Scientific Microplate Reader, ABD) okundu.
- Sonuçlar lineer grafik çizilerek hesaplandı ve her örneğin 35 µg olacak şekilde sulandırılması yapıldı.

Örneklerin hazırlanması; jellerdeki her bir kuyu örnek için 13,5 µL örnek + 13,5 µL 2x Laemmli sample buffer ependorf içine konuldu. Ağzı parafilme kapatılarak 95°C'de 5-10 dk inkübe edildi ve daha sonra örnekler en az 10 dk buz üstünde bekletildi.

- Jeller, Bio-Rad TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit'inin hazırlanış şekline göre hazırlandı.
- Hazırlanan jellerdeki kuyucuklara, her bir örnek için 17 µL, protein ladder (BLUltra Prestained Protein Ladder, BIO-HELIX - PM001-0500) için ise 4 µL yükleme yapıldı.
- Yüklenen örnekler Biorad western blot sisteminde 120 mV akımda 1 saat yürütüldü.
- Jeldeki protein örneklerinin yürümesi tamamlandıktan sonra jel aparatındaki camlar birbirinden ayrılarak ve jel kısa süreliğine distile suda bekletildi.
- Transfer işlemi için PVDF (polivilinilden diflorür) membran metonal içerisinde 30 saniye bekletilerek aktive olması sağlandı.
- Daha sonra PVDF membran sırasıyla, distile suda 3 dakika, transfer bufferda 5 dakika bekletilerek hazır hale getirildi.
- Transfer aşaması için kasetin en altına; pad ve onun üstüne gelecek şekilde sırasıyla PVDF membran, jel ve pad konuldu ve 30 dakikalık transfer protokülü seçilerek blotlama işlemi gerçekleştirildi.

- Transfer sonrası membran %5'lik BSA içeren TBS-T içerisinde 37°C'de 1 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi.
- 1 saatin sonunda membran TBS-T ile 5'er kez 5 dakika yıkandı.
- Yıkama işleminden sonra %2,5'luk BSA içeren TBS-T içerisine 1:300 olacak şekilde primer antikor ilave edildi ve karışım membranın üzerine konuldu. (Çalışmada kullanılan her bir antikor için bu işlemler tekrar edildi. Kullanılan primer antikorlar: (PARP, RIPK1, Kaspiz 3 ve Bax / Bcl2)
- Membranlar primer antikorlar ile +4°C'de bir gece inkübe edildi.
- Bir gece inkübasyonun ardından membranlar TBS-T ile 3'er kez 10 dakika yıkandı.
- Ardından %2,5'luk BSA içeren TBS-T içerisine 1:1000 olacak şekilde sekonder antikor (anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG antikor, Cell signaling Tech., ABD) içeren karışım membranların üzerine konuldu ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildiler.
- İnkübasyonun ardından membranlar 3 kez 10'ar dakika TBS-T ile yıkandı.
- Görüntüleme işlemi için Western Blotting Luminol Reagent kitindeki (Thermo Fisher, ABD) reagentlardan 3'er ml alınarak falkonda karıştırıldı. Karışım daha sonra, yıkanmış membranlar ile en az 1 dakika karanlıkta inkübe edildi.
- Antikorlara ait oluşan bantlar, Vilbert Laurmart Fusion Fx5 cihazında görüntülendi ve değerlendirildi.

3.2.11. İstatistiksel Analiz

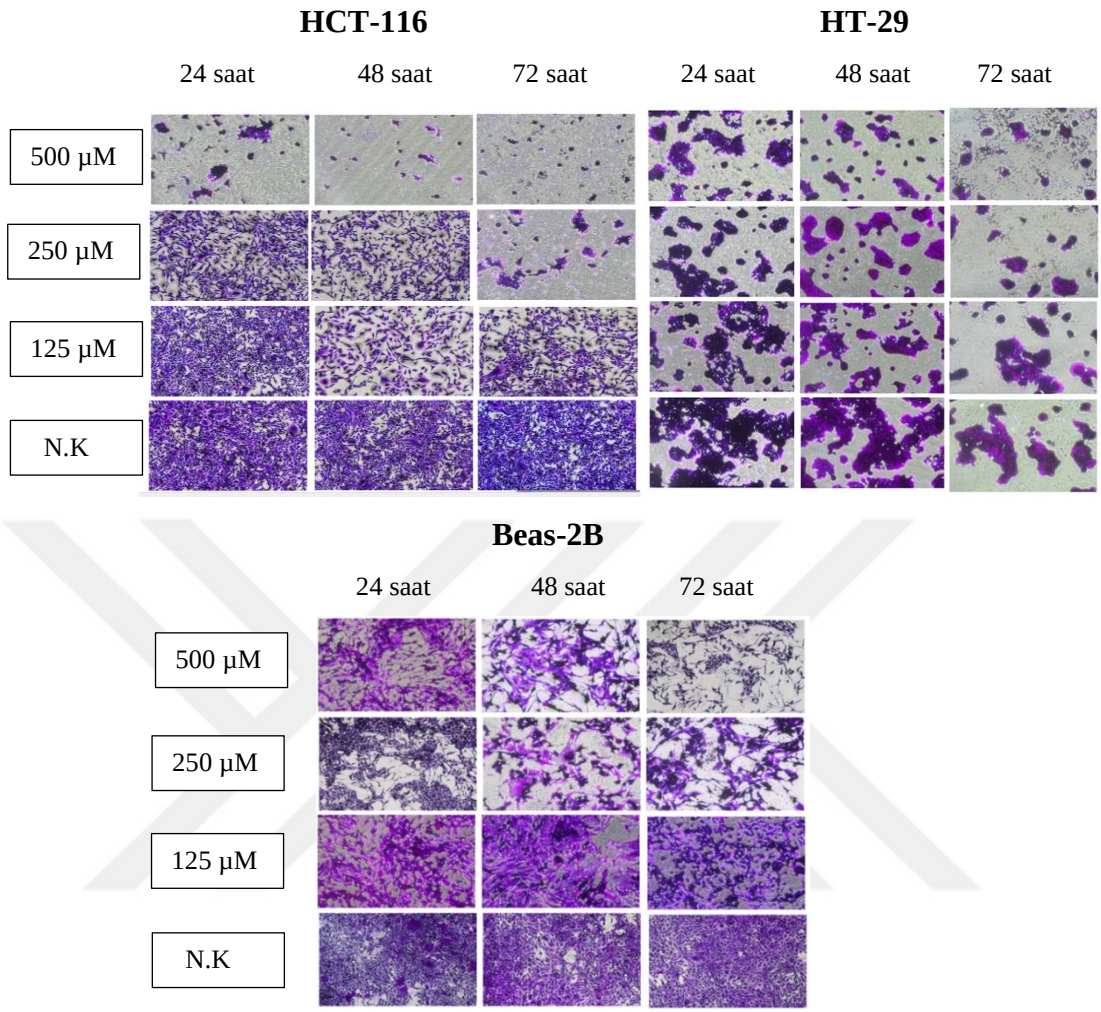
SRB ve ATP testleri ile canlılık deneylerinin verileri "GraphPad Prism" aracı kullanılarak değerlendirildi. Grafik, Beas-2B'nin kontrol işlevi gördüğü HCT-116 ve HT-29 ile işlenmiş kolon kanseri hücre hatlarında üç tekrarlı SRB ve ATP testi verilerinin ortalamasını temsil eden deneysel sonuçlarla yapılmıştır. Verileri incelemek için "Graph Pad Prism 9" istatistiksel uygulaması kullanıldı. Grupları karşılaştırmak için 2 yönlü ANOVA testi kullanıldı ve Bonferroni doğrulama tekniği kullanılarak anlamlı değişiklikler için p değeri 0,05 olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. SRB Canlılık Testi Bulguları

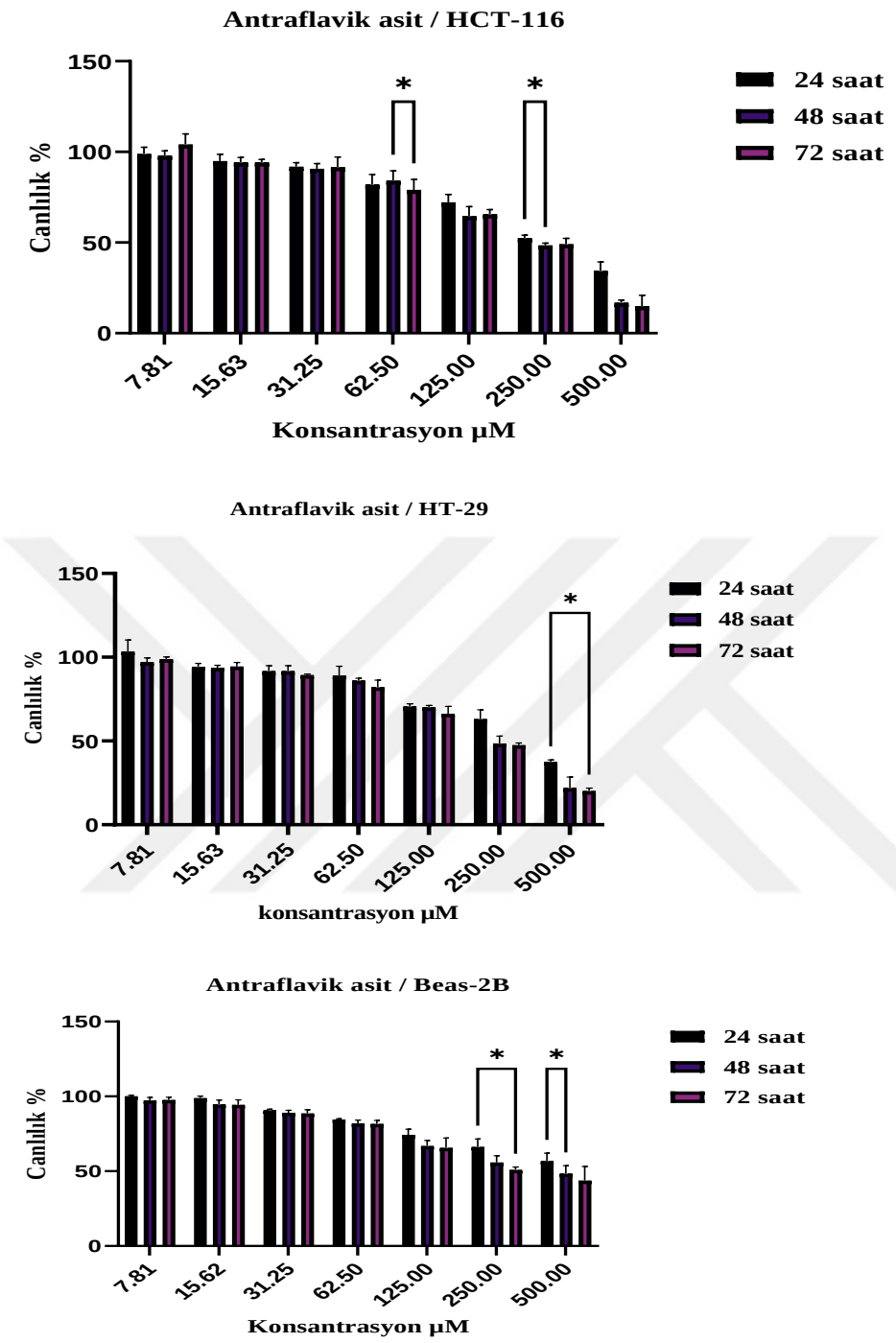
HCT-116, HT-29 ve Beas-2B hücreleri, 24, 48 ve 72 saat boyunca çeşitli dozlarda antraflavik asit (7,81-500 μM) ve gonzalitosin-I bileşiği (2,5-160 μM) ile tedavi edildi. SRB testi kullanılarak hücre canlılığı ölçüldü. SRB analizi, antraflavik asit ve gonzalitosin-I bileşiğinin, her üç hücre hattındaki doza bağlı olarak ters bir oranda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 5-8). Bu deneyin amacı, kolon kanseri hücre hatlarında %50 canlılığı indükleyen dozu bulmak idi. Her iki hücre hattında %50 canlılığa sebep olan en yakın dozlar, antraflavik asit için 125, 250 ve 500 μM iken Gonzalitosin-I için 40, 80, 160 μM idi.

Tüm hücre hatları, hücre canlılığında doz ve zamana bağlı bir şekilde bir azalma gösterdi. SRB testleri, gonzalitosin-I veya antraflavik asit ile tedavinin antiproliferatif bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Gonzalitosin-I, bu hücrelerin yaşayabilirliği üzerinde antraflavik asitten çok daha büyük bir etkiye sahip idi. Beas-2B hücre hattı, iki bileşikten diğer iki hücre hattından daha az etkilendi. SRB testi sonuçlarına göre, hücre canlılığındaki en büyük düşüş, 80 μM ve 160 μM'de gonzalitosin-I ile tedaviden sonra; ayrıca yüksek bir doz olan Antraflavik asit ile tedaviyi takiben 250 μM ve 500 μM'de meydana geldi. HT 29 ile karşılaştırıldığında, HCT 116 hücreleri hem Antraflavik asit hem de gonzalitosin-I'e karşı daha zayıf duyarlılık gösterdi.



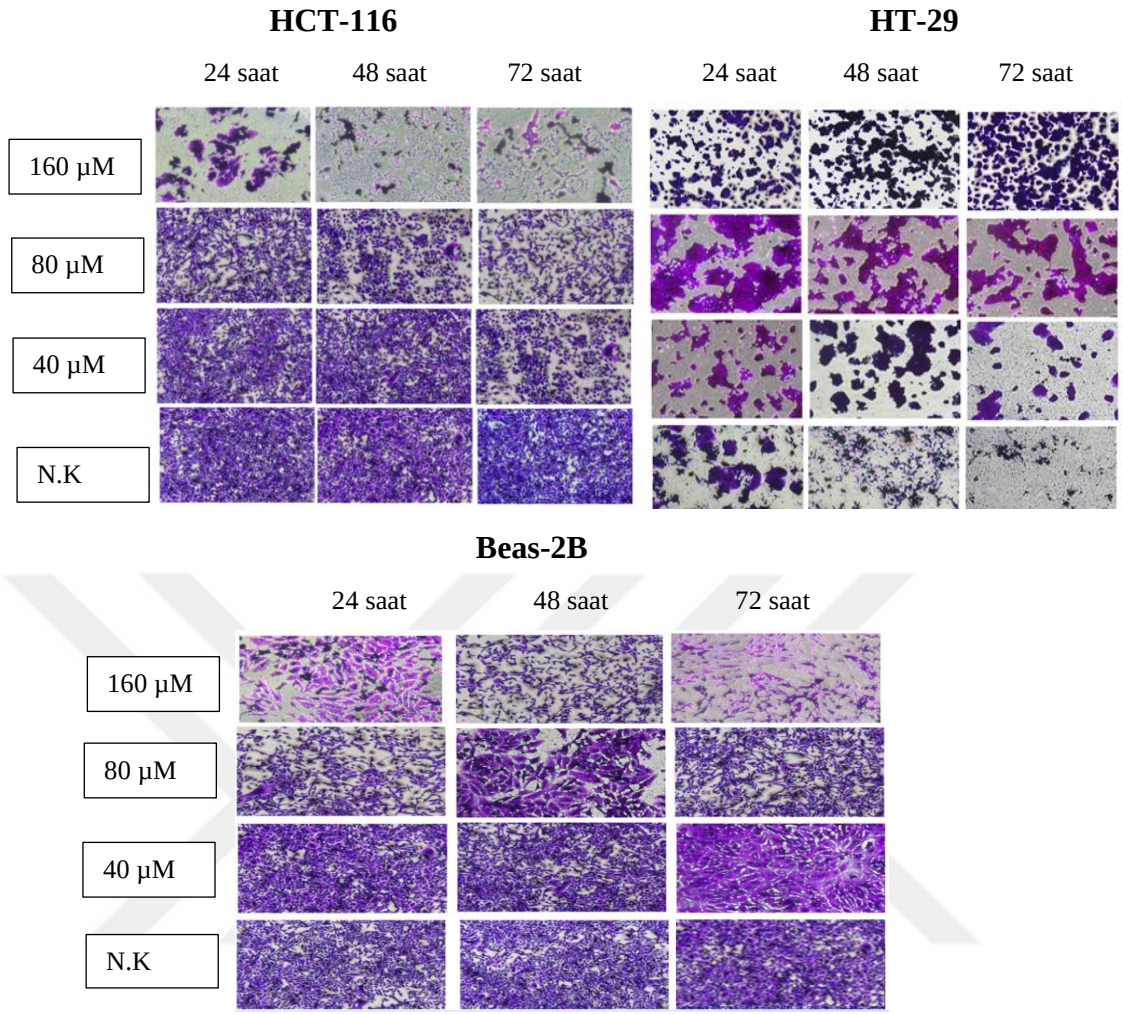
Şekil 5: Doza bağımlı antraflavik asit bileşiği tedavisinin hücre hattı sağkalımı üzerindeki etkisini gösteren SRB test sonuçları.

24, 48, 72 saat boyunca Negatif Kontrol (N.K), 125, 250, 500 µM dozlarında antraflavik asit tedavisi, HCT-116, HT-29 ve Beas-2B hücre hatlarında hücre canlılığı ölçümleri ile sonuçlanmıştır. Görüntüler mikroskop (Nikon, Eclipse Ts2) kullanılarak elde edilmiştir.



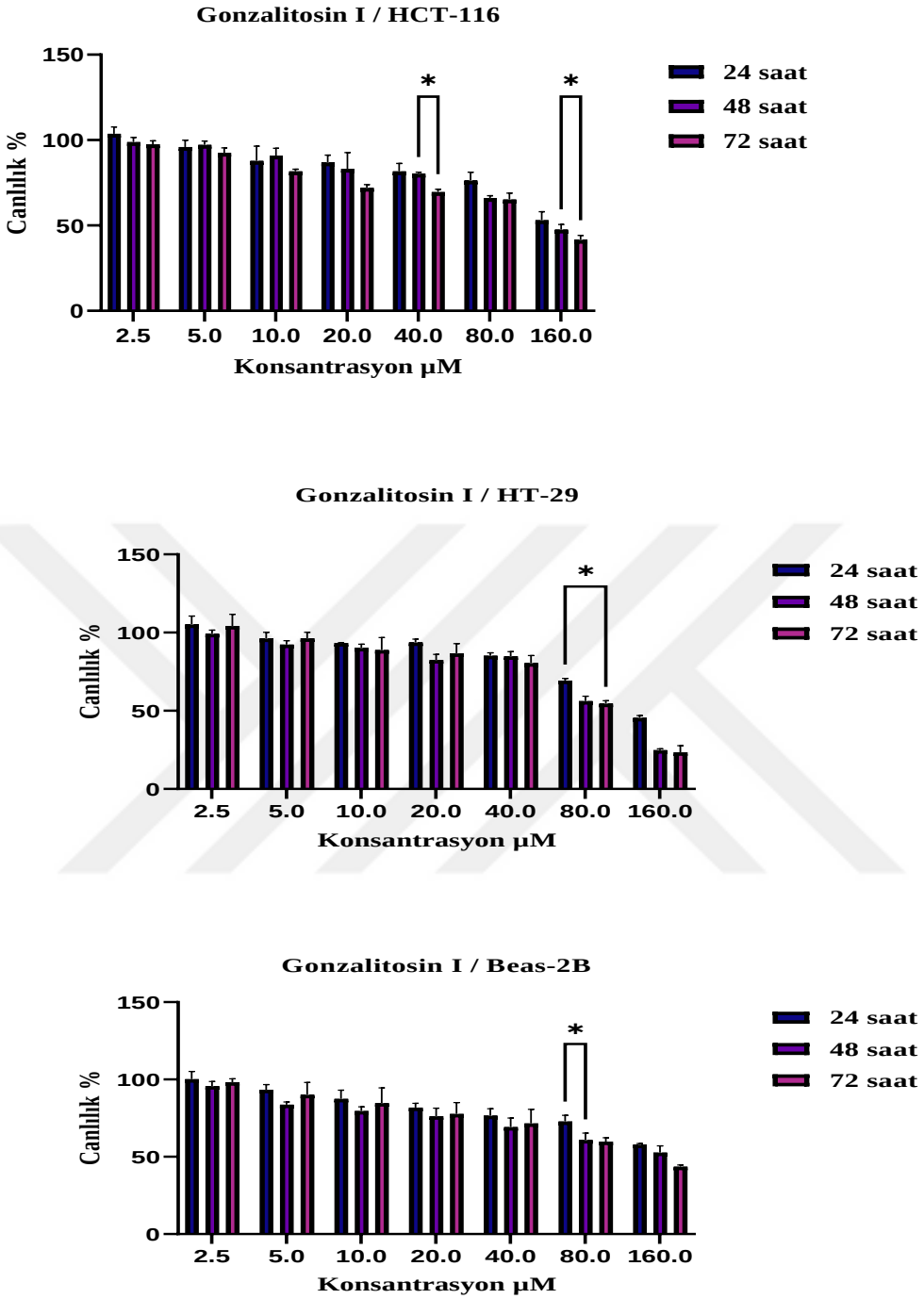
Şekil 6: Doza bağımlı antraflavik asit bileşiği tedavisinin hücre hattı sağkalımı üzerindeki etkisini gösteren SRB test sonuç grafikleri.

24, 48, 72 saat boyunca 0, 7.81, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 M dozlarında antraflavik asit tedavisi, HCT-116, HT-29 ve Beas-2B hücre hatlarında hücre canlılığı ölçümleri ile sonuçlanmıştır (*: $p<0,05$; **:$p<0,01$; ***:$p<0,001$; ****:$p<0,0001$).



Şekil 7: Doza bağımlı gonzalitosin-I bileşiği tedavisinin hücre hattı sağkalımı üzerindeki etkisini gösteren SRB test sonuçları.

24, 48, 72 saat boyunca Negatif Kontrol (N.K), 40, 80, 160 µM dozlarında gonzalitosi I tedavisi, HCT-116, HT-29 ve Beas-2B hücre hatlarında hücre canlılığı ölçümleri ile sonuçlanmıştır. Görüntüler mikroskop (Nikon, Eclipse Ts2) kullanılarak elde edilmiştir.



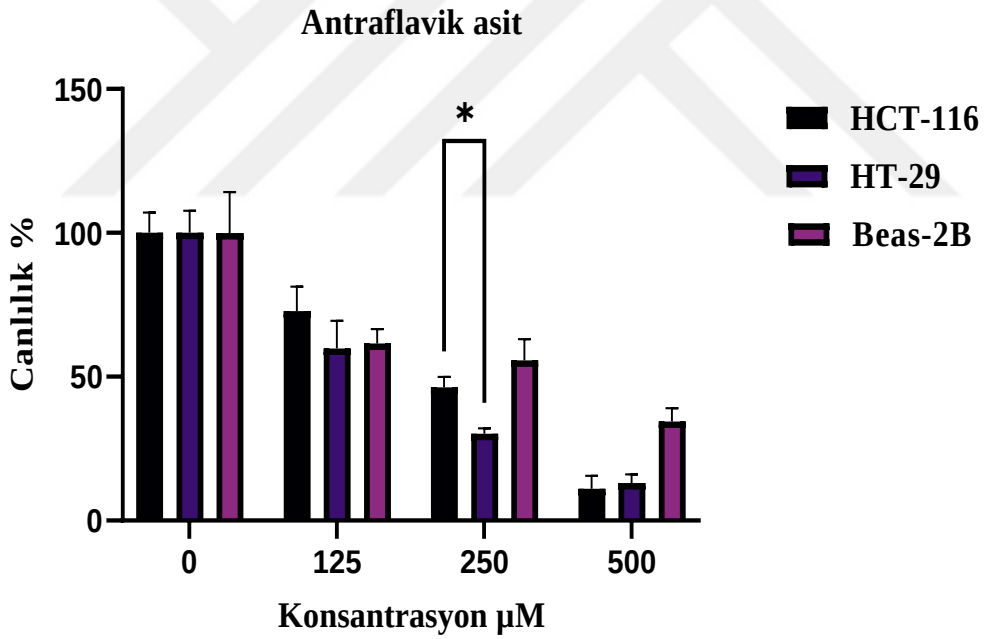
Şekil 8: Doza bağımlı gonzalitosin-I bileşiği tedavisinin hücre hattı sağkalımı üzerindeki etkisini gösteren SRB test sonuç grafikleri.

24, 48, 72 saat boyunca 0, 2.5, 5,10, 20, 40, 80, 160 µM dozlarında gonzalitosin-I tedavisi, HCT-116, HT-29 ve Beas-2B hücre hatlarında hücre canlılığı ölçümleri ile sonuçlanmıştır (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$; ****: $p<0,0001$).

4.2. ATP Canlılık Testi Bulguları

ATP deneyi, en hassas, en hızlı hücre canlılık deneyidir. Diğer canlılık tahlili yöntemlerine gore sonuçların eldesi, oluşabilecek artefaktlardan daha az etkilenme eğilimindedir. Tez çalışmamızda kullanılan bileşikler artefakta sebep olabilen flavonoid türevleri olduğundan, daha güvenilir ve doğru sonuçlar elde etmek aynı zamanda SRB sonuçlarımızdan emin olabilmek için ATP canlılık testi hücrelerimizde yapılmıştır.

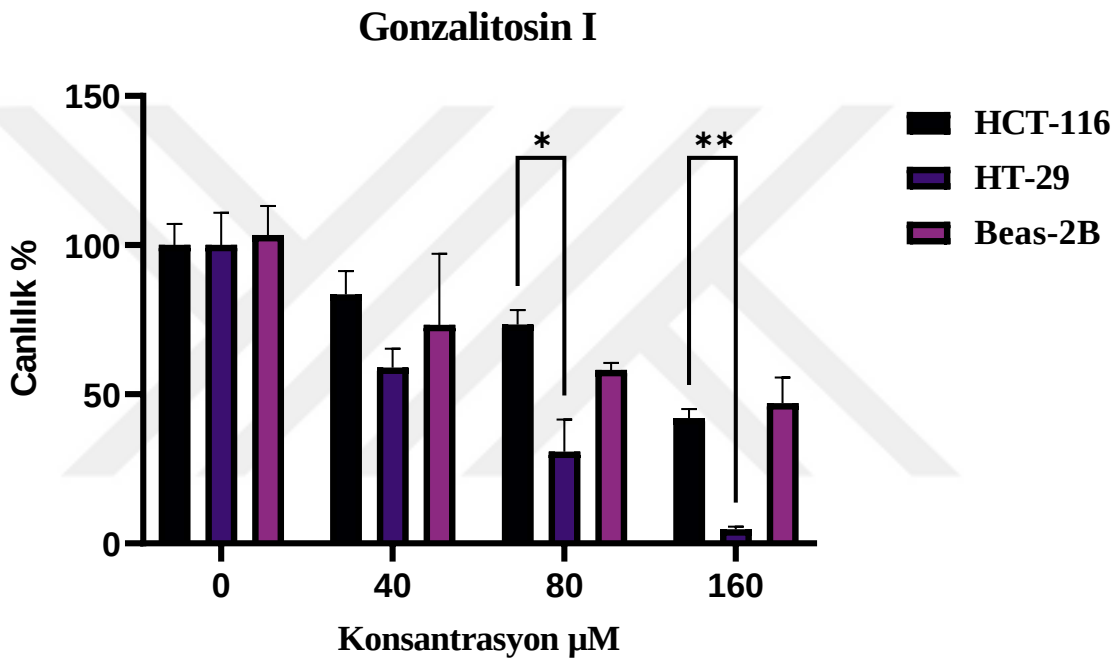
HCT-116, HT-29 ve Beas-2B hücreleri 48 saat boyunca çeşitli dozlarda Antraflavik asit (125-500 µM) ve gonzalitosin-I bileşiği (40-160 µM) ile tedavi edildi ve ATP testi kullanılarak hücre canlılığı ölçüldü. ATP analizi, antraflavik asit ve gonzalitosin-I bileşiğinin, her üç hücre hattındaki doza bağlı olarak ters bir oranda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 9-10).



Şekil 9: Doza bağımlı antraflavik asit bileşiği tedavisinin hücre hattı sağkalımı üzerindeki etkisini gösteren ATP test sonuçları.

48 saat boyunca 125, 250, 500 µM dozlarında antraflavik asit, HCT-116, HT-29 ve Beas-2B hücre hatlarında hücre canlılığı ölçümleri ile sonuçlanmıştır (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001; ****:p<0,0001).

Doza bağımlı bir şekilde, tüm hücre hatları canlı hücrelerde önemli bir azalma gösterdi. Tüm tedavi dozları için, HT 29 hücre hattı, HCT 116 hücre hattından önemli ölçüde daha az sayıda canlı hücre ile sonuçlanan önemli ölçüde daha düşük absorbans değerlerine sahip idi. Diğer iki hücre hattına kıyasla, HT 29, 125µ M ve 250 µM antraflavik asit tedavisinden sonra hücre canlılığında en büyük düşüşü gösterdi. HT 29'un aksine, HCT 116 hücreleri antraflavik aside daha az duyarlı idi. 250 µM'den sonra ortalama canlı HCT 116 hücre sayısı %46 idi. Antrafilavik asit tedavisinden sonra IC50, HCT 116'da 193 µM HT 29'da 128 µM şeklinde hedaplandı.



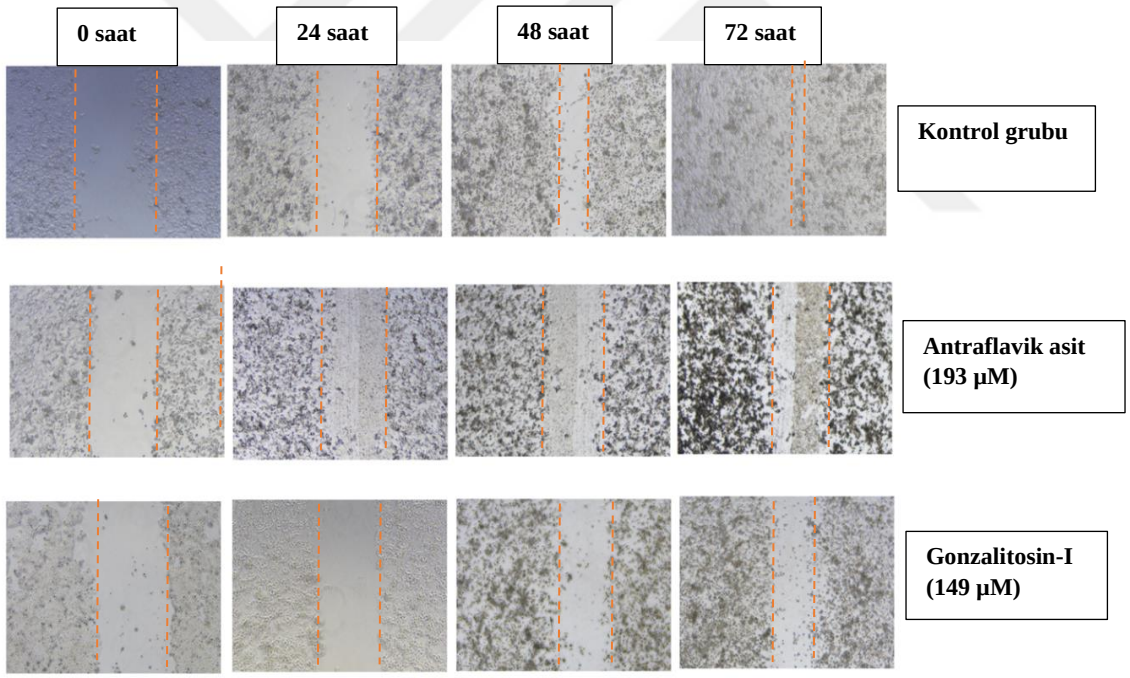
Şekil 10: Doza bağımlı gonzalitosin-I bileşiği tedavisinin hücre hattı sağkalımı üzerindeki etkisini gösteren ATP test sonuçları.
48 saat boyunca 40, 80, 160 µM dozlarında gonzalitosin-I tedavisi, HCT-116, HT-29 ve Beas-2B hücre hatlarında hücre canlılığı ölçümleri ile sonuçlanmıştır (*: p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001; ****:p<0,0001).

Tüm hücre hatları, doza bağımlı bir şekilde canlı hücrelerde önemli bir azalma olduğunu göstermiştir. Tüm tedavi dozaları için, HT 29 hücre hattı, HCT 116 hücre hattından önemli ölçüde daha düşük sayıda canlı hücre ile sonuçlanan absorbans değerlerine sahipti (p<0,001). HT 29 ve HCT 116, 40 µM, 80 µM ve 160 µM dozlarıyla 48 saatlik tedavinin ardından karşılaştırılabilir hücre sağkalımı sergilemedi. Diğer iki

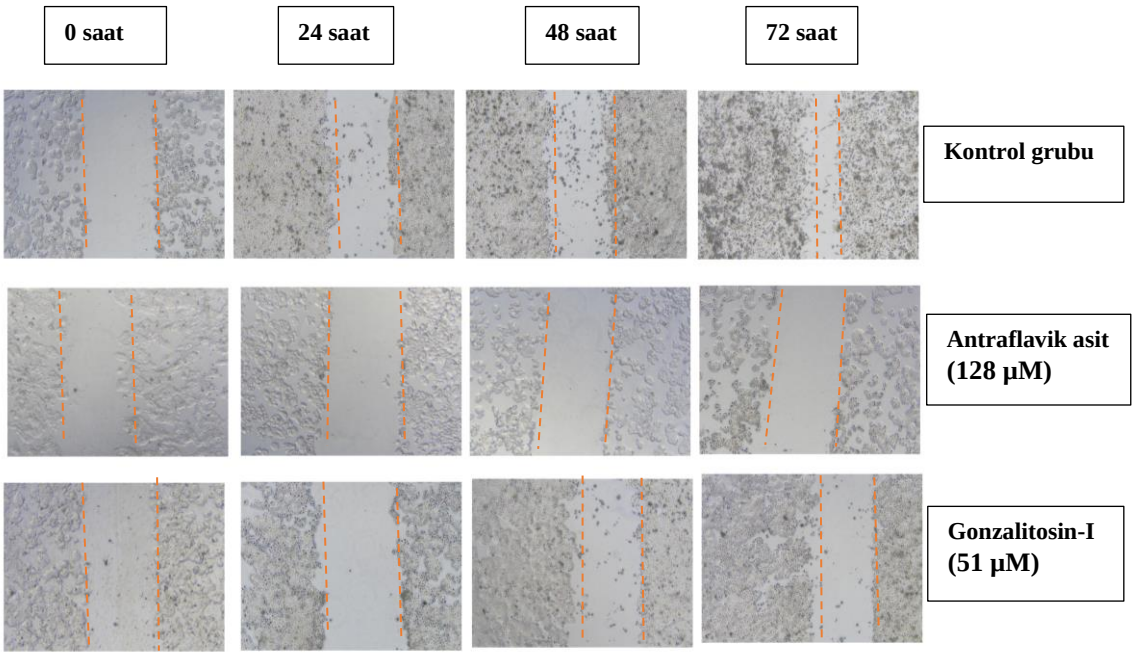
hücre hattına kıyasla, HT 29, 80 µM ve 160 µM gonzalitosin-I tedavisinde hücre canlılığında en büyük kaybı gösterdi. Gonzalitosin-I'in HCT 116 hücreleri üzerinde az bir etkisi olduğu görüldü. 160 µM sonrası ortalama canlılık, HCT 116 hücrelerinde %39,1 idi. Gonzalitosin-I tedavisinden sonra IC50 değerleri HCT-116 için 149 µM, HT-29 hücreleri için 51 µM elde edildi.

4.3. Yara İyileştirme Testi

Yara iyileştirme testinde, gonzalitosin-I ve antraflavik asidin, metastatik süreçte ve tümör yayılımında kritik bir aşama olan HCT 116 ve HT 29 hücrelerinin göç kapasitesine müdahale edip edemeyeceğini araştırdık. Değişimler 3 farklı zamanda gözlemlendi. Kontrole kıyasla herhangi bir migrasyon gözlenmedi.



Şekil 11: Antraflavik asit ve gonzalitosin-I bileşikleri tedavisinin HCT-116 hücre hattı göçü üzerindeki etkisini gösteren yara iyileştirme testi sonuçları.
Antraflavik asit dozu 193 µM, gonzalitosin-I dozu 149 µM idi. Hücrelerin (24, 48 ve 72. saatlerde) mikroskop (Nikon, Eclipse Ts2) kullanılarak fotoğrafları çekildi. Yara kapanma bölgesini incelemek için Image J yazılımı kullanıldı.



Şekil 12: Antraflavik asit ve gonzalitosin-I bileşikleri tedavisinin HT-29 hücre hattı göçü üzerindeki etkisini gösteren yara iyileştirme testi sonuçları.
Anthradavilik asit dozu 128 µM, gonzalitosin-I dozu 51 µM idi. Hücrelerin (24, 48 ve 72. saatlerde) mikroskop (Nikon, Eclipse Ts2) kullanılarak fotoğrafları çekildi. Yara kapanma bölgesini incelemek için Image J yazılımı kullanıldı.

Kolon kanseri hücre hatlarını tedavi etmek için iki bileşiğin IC50 değerleri kullanıldı. HCT 116 hücreleri için 193 µM antraflavik asit ve 149 µM gonzalitosin-I kullanıldı. HT 29 hücreleri için 128 µM antraflavik asit ve 51 µM gonzalitosin-I kullanıldı. Antraflavik asit ve gonzalitozin I ile tedaviden sonra kolon kanseri hücrelerinin göç kabiliyetini test etmek için yara iyileştirme deneyleri yapıldı. İki bileşiğin de büyük bir anti-göç etkisine sahip olduğunu gözlemledik. Sonuç olarak, antraflavik asit ve gonzalitozin I kolon kanseri hücrelerinin (HCT 116 ve HT 29) göç yeteneğini inhibe ettiği söylenebilir.

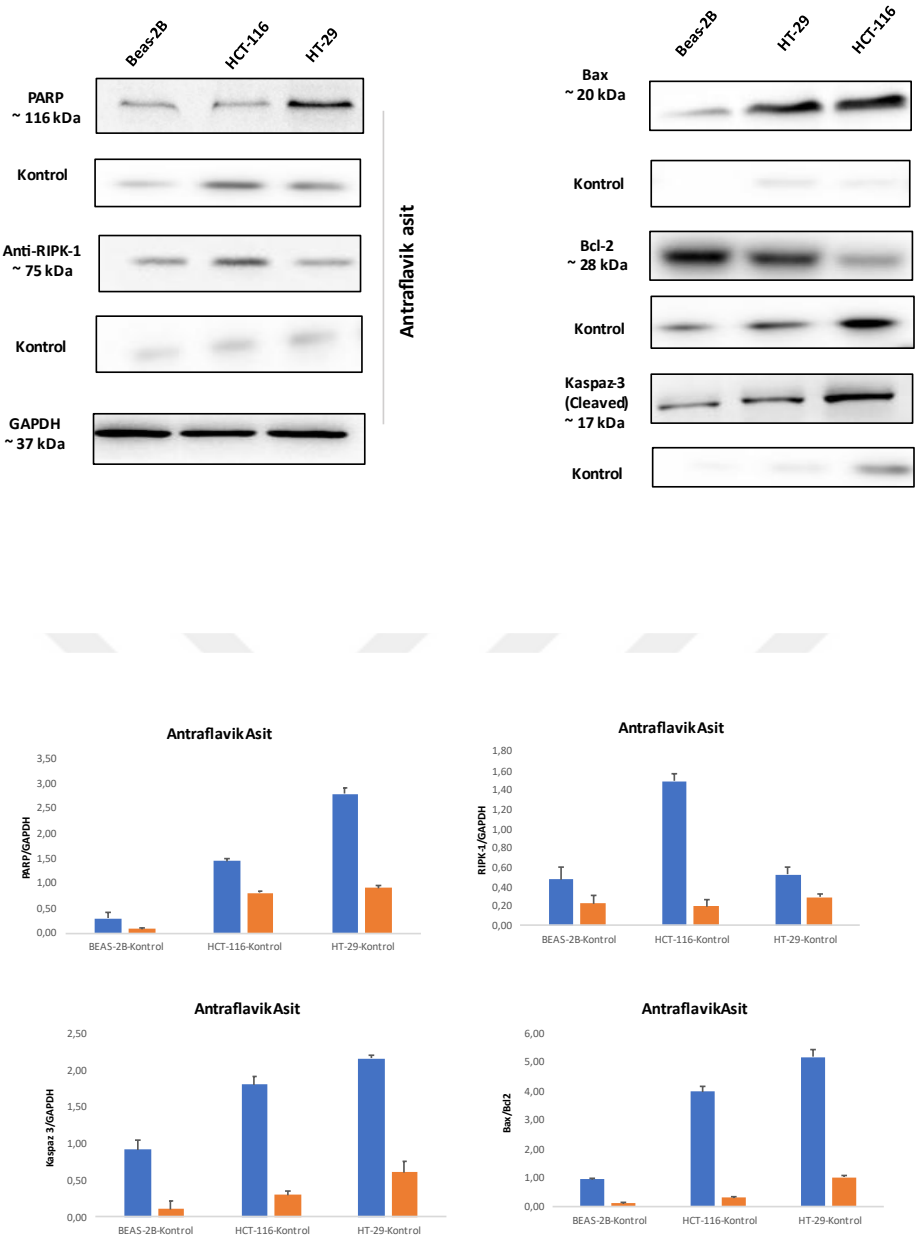
4.4. DAPI/PI Boyaması

Çift boyama DAPI/PI'de, 2 bileşiğin IC90'ı (antraflavik acid ve gonzalitosin-I) kullanıldı Farklı hücre hattlarında kontrol grubuna kıyasla etkisi 48 saat sonra gözlemlendi ve ölüm şekli belirlendi. Sonuçlara göre, DAPI/PI deneyi sırasında antraflavik asitin üç hücre hattında nekroza neden olduğu, gonzalitosin-I ile tedavi edilen hücrelerin çoğunlukla apoptotik ve nekroptotik hücre ölümüne gittiği tespit

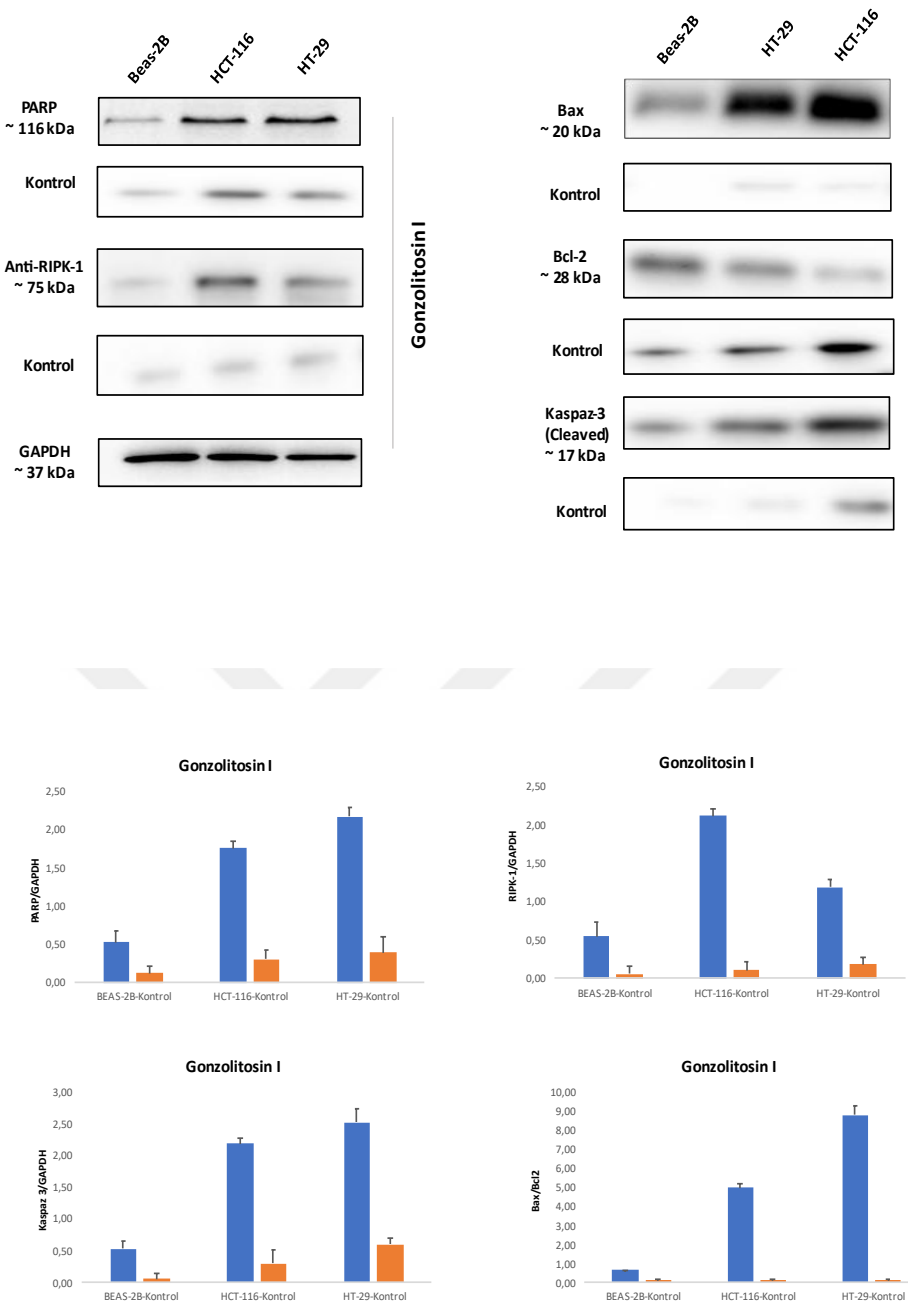
edildi. Bu bulguların bir sonucu olarak, bu iki maddenin etki mekanizmasını ve burada kullanılan sinyal yolunu daha iyi anlamak için farklı bir antikorlala (PARP, RIPK1, Bax/Bcl2 ve Kaspaz 3) bir Western Blot analizi yapılmaya karar verildi.

4.5 Western Blot Testi

Nekroz ile bağlantılı RIPK1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri, antraflavik asit ve gonzalitosin-I bileşiklerinin IC90 dozları ile tedavisinden sonra HCT-116, HT-29 ve Beas-2B hücre hatlarında incelenmiştir. Aynı zamanda, apoptozis ile ilişkili olan PARP, Bax /Bcl2 proteini ve parçalanmış Kaspaz 3 protein seviyeleri ölçüldü. Kontrol olarak GAPDH kullanıldı. Nekrotik hücre ölümü ile ilişkili olan RIPK1'in, hem antraflavik asit hem de gonzalitosin-I ile tedaviyi takiben HCT-116 hücre hattında spesifik olarak arttığı gözlenmiştir. Bax/Bcl2'nin varlığı apoptotik sinyal yolaklarının aktivasyonunu işaret eder. Sonuçlar, Bax proteini seviyesinin, gonzalitosin-I ile muamele edilen hücre hatlarında, antraflavik asit ile muamele edilen hücre hatlarından daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bax miktarının HT-29 hücrelerinde diğer iki hücre hattından daha yüksek olduğu da elde edildi. Antraflavik asit ve gonzalitosin-I ile yapılan tedavinin, HT-29 hücrelerindeki Bcl2 seviyelerini düşürüdüğünü bulduk. Parçalanmış Kaspaz 3'ün, her iki bileşik için tedavi sonrasında üç hücre hattında da geel olarak arttığı, ancak gonzalitosin-I ile tedavi edilen HT-29 hücrelerinde bir miktar daha fazla ekspresyona sebep olduğu gözlendi. PARP protein seviyeleri, antraflavik asit ile tedaviyi takiben HT-29 hücre hattında daha yüksekti, ancak gonzalitosin-I ile tedaviden sonra HCT-116 ve HT-29'da neredeyse aynıydı (Şekil 13).



Şekil 13. Antraflavik asit IC90 tedavisi sonrasında PARP, RIPK1, parçalanmış Kaspaz-3 ve Bax/Bcl2 protein ifade düzeylerinin Western Blot yöntemiyle alınan sonuçları. IC90 dozları: Beas-2B, 597µM; HCT-116, 524µM; HT-29, 499µM



Şekil 14. Gonzalitosin-I, IC90 tedavisi sonrasında PARP, RIPK1, parçalanmış Kaspaz-3 ve Bax/Bcl2 protein ifade düzeylerinin Western blot yöntemiyle alınan sonuçları. IC90 dozları: Beas-2B, 250µM; HCT-116, 235µM; HT-29, 142µM

5. TARTIŞMA

Flavonoidler, bitkilerde biyoaktif ikincil metabolitler olarak üretilen ve bu nedenle bitkilerin renginden, tadından ve farmakolojik aktivitesinden sorumlu olan polifenolik maddelerdir (Nabavi, S ve ark., 2020). Flavonoidlerin anti-proliferatif etkisi, kolon kanseri için farklı flavonoid tipleri ile yapılan çalışmalarda literatürde gösterilmiştir (Kuo 1996). Özellikle, apigenin ve kuersetageninin anti-proliferatif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Kuersetageninin Bax/Bcl2 oranını ve Kaspaz-3'ü artırarak apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir (Murthy ve ark., 2012). Turktekin ve arkadaşlarının çalışmasında, apigenin ile kolon kanseri tedavisinde mTOR ve CCND1 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Turktekin ve ark., 2011). Kolon kanseri üzerindeki etkileri araştırılan başka bir flavonoid türevi olan morin ile yapılan bir çalışmada, NF-κB'nin inhibisyonu yoluyla inflamatuar mediatörlerin üretimini azalttığı gösterilmiştir (Sharma ve ark., 2018). Zhao ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, brozimon-I'in hücre döngüsü G1 fazını durdurduğu ve kolon kanseri hücrelerinde apoptoza neden olduğu bildirilmiştir. Bunun ROS aracılı artmış sitozolik Ca^{2+}, ER stresi ve CaMKK-AMPK yolunun azalmış aktivasyonu yoluyla olabileceği belirtilmiştir (Zhao ve ark., 2019).

Bu tezde iki ayrı flavonoidin türevi olan antraflavik asit ve gonzalitosin-I'in insan kolon kanseri hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi incelenmiştir. Araştırma, söz konusu bileşiklerin sitotoksik özelliklere sahip olduğunu keşfetti. Antraflavik asit ve gonzalitosin-I bileşiklerinin anti-kanser özellikleri literatürde sınırlı sayıda araştırılmıştır. Bu çalışma bu iki bileşiğin kolon kanseri hücre hatları üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösteren ilk araştırmadır.

Kanser şu anda dünyanın en ciddi hastalıklarından biridir ve kanser hücreleri tedaviye direnç geliştirebilir. Sadece salgıladıkları maddeleri kullanarak gelişimlerini düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda bağışıklık sisteminden de kaçabilirler (Jones ve ark., 2016; Shaffer ve ark., 2017). Kanser tedavisinde kemoterapi ve/veya hedefe yönelik ilaçların kullanılmasına rağmen, amaçlanan terapötik sonuç belirsizliğini korumaktadır. Bunun iki ana faktörü vardır: kanser hücreleri moleküler olarak birbirlerinden farklıdır ve tedavi direnci kazanırlar.

Bu çalışmanın amacı, iki flavonoid bileşiği olan gonzalitosin-I ve antraflavik asidin, iki tip kolon kanseri hücresi (HT 29 ve HCT 116) üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olup olmadığını keşfetmek idi. Bu iki maddenin inhibitör etkilerinin hücre hattına bağlı olarak değiştiğini belirtmek gerekir. Daha hızlı çoğalan hücreler (HCT 116), iki bileşiğin tedavisine, daha yavaş çoğalan hücrelerden (HT 29) nispeten yavaş yanıt verdi. Bu bilgiye göre, antraflavik asit ve gonzalitosin-I bileşiklerinin olası bir yeni kanser tedavisi ilacı olup olmadığı araştırılmıştır. SRB testi, kolon kanseri hücre hatları üzerinde çeşitli dozlarda kullanılmış ve etkisi incelenmiştir. Antraflavik asit ve gonzalitosin-I bileşikleri tarafından indüklenen hücre ölümü araştırıldığından, IC50 olarak iki farklı dozaj (Antraflavik asit için 250 μM ve gonzalitosin-I için 160 μM) seçildi. Bu ayrım, hücrelerin ve bileşiklerin moleküler özelliklerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu tez çalışmasında, doza bağımlı SRB deneyleri sonucunda antraflavik asit bileşiğine kıyasla gonzalitosin-I bileşiğine hücrelerin daha duyarlı olduğu bulundu. SRB testi sonuçlarını doğrulamak ve daha doğru sonuçlar elde etmek için bir ATP testi gerçekleştirildi. İki bileşik için yeni IC50 değerleri elde edildi, bu değerler yara iyileştirme testlerinde kullanıldı.

Metastaz, malign hücrelerin ana tümörden hareketini, hedef doku ve organlara infiltrasyonu ve yeni tümörlerin oluşumunu içeren karmaşık bir süreçtir. Gonzalitosin-I ve antraflavik asidin HCT 116 ve HT 29 hücrelerinin göç etme kabiliyeti üzerindeki etkisini incelemek için, yara iyileştirme deneyleri gerçekleştirdik. Tedavi edilen ve edilmeyen hücre gruplarının sonuçlarını karşılaştırdık. Göç deneyi, her iki maddenin de hücrelerin göç etme kapasitesini azaltabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, antraflavik asit, kolon kanseri hücreleri üzerinde gonzalitosin-I'den daha yüksek bir antimigrasyon etkisine sahipti.

İki bileşiğin de doza bağımlı bir şekilde apoptozu veya nekrozu destekleyip desteklemediğini görmek için DAPI/PI boyamasını kullandık. Kontrolleri ile karşılaştırıldığında, tüm kolon kanseri hücre tipleri, IC90 gonzalitosin-I ve antraflavik asit ile tedaviyi takiben önemli ölçüde daha yüksek oranda ölü hücreye sahipti. Hücre döngüsü ve hücre sayısının iki katına çıkma süresi, hücrelerin gonzalitosin-I ve antraflavik asit tedavisine karşı belirgin duyarlılıklarını açıklayabilir. DAPI / PI testinin bulgularına göre, iki bileşiğin kolon kanseri hücreleri üzerinde farklı davrandığını, antraflavik asit tarafından tedavi edilen hücrelerde daha fazla nekrotik hücre ve gonzalitosin-I tarafından tedavi edilen hücrelerde daha fazla apoptotik veya nekrototik

hücre olduğunu tahmin ettik. Bu iki bileşikle tedaviden sonra hücre ölümüne yol açan mekanizma hakkında daha fazla bilgi edinmek için, Western Blot analizi yaptık.

Apoptoz, radyasyon da dahil olmak üzere bir dizi faktörün neden olduğu hücre ölümü sürecidir. Apoptoz, enzimatik bölünme tarafından üretilen DNA parçalanması ile ayırt edilir. Bcl-2 ailesi genleri tarafından kodlanan proteinler, programlanmış hücre ölümü ve apoptozda kritik rol oynar. Apoptozu düzenleyen genlerin ekspresyonundaki değişiklikler, hem kanserin kökenlerine katkıda bulunabilir hem de tedavideki tümör yanıtları üzerinde ciddi bir etkiye sahip olabilir. Bax, programlanmış hücre ölümünü kontrol eden Bcl-2 gen ailesinin pro-apoptotik bir üyesidir. Bax ekspresyonu, apoptotik uyaranlara yanıt olarak bazı dokularda artar ve doğrudan p53 tarafından kontrol edilir (Oberhammer, F. ve ark., 1993). Bir Bcl-2 ailesi proapoptoz geni olan Bax, Bcl-2 ile önemli amino asit benzerliğine sahiptir ve Bcl-2 aktivitesine karşı çıkan ve hücre ölümüne yol açan Bcl-2 ile homodimerler ve heterodimerler oluşturabilir (Kirkin, V. ve ark., 2004). Özofagus skuamöz hücreli karsinom, meme kanseri, hepatosellüler karsinom ve yumurtalık kanserinde Bax ekspresyonu önemli ölçüde azalır (Beerheide, W. ve ark., 2000). Azalmış Bax ekspresyonu, hepatosellüler kanser hastalarında daha kısa bir sağkalım ile bağlantılıdır (Garcia, E. Ve ark., 2002). Bax eksikliği olan insan kolon kanseri hücreleri HCT116'nın hücre ölümüne dirençli olduğu gösterilmiştir (LeBlanc, H. Ve ark., 2002). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, Bax aşırı ekspresyonunun eritrolösemi hücrelerinde apoptoza önemli ölçüde neden olabileceğini göstermiştir (Kobayashi, T. Ve ark., 1998). Ayrıca insan baş ve boyun skuamöz karsinom hücrelerini çeşitli kemoterapötik ajanlara duyarlılaştırır (Guo, B. Ve ark., 2000). Bunun yanındada Bax ekspresyon eksikliği tedaviye zayıf bir yanıt ile bağlantılıdır (Panaretakis, T. ve ark., 2002). Bax/Bcl2 ekspresyonu, antraflavik asit ve gonzalitosin-I ile tedavi edilen kolon kanseri hücre hatlarında hücre ölümünün nedenleri hakkında ışık sağlayabilir. Hem antraflavik asit hem de gonzalitosin-I ile tedaviden sonra, Bcl-2 seviyesi düşerken, Bax seviyesi HT-29 hücre hattında diğer iki hücre hattına kıyasla önemli ölçüde artmıştır. Proapoptotik bir Bcl-2 ailesi geni olan Bax, Bcl-2 aktivitesine doğrudan karşı çıkar ve hücre ölümüne yol açar. İki madde ile tedaviyi takiben western blot deneyinde bildirilen Bax ekspresyonundaki artışlar, HT-29 hücrelerinde apoptozun indüklenmesi olarak görülebilir. Tüm bunların yanında hücredeki diğer anti- ve pro-apoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri de bu konuda çok önemlidir. Ek olarak, gonzalitosin-I ile tedavi edilen HCT-116'da, antraflavik asit ile muamele edilen aynı hücre hattına kıyasla daha

yüksek bir Bax ekspresyonu seviyesi gözlemledik. Ayrıca antraflavik asit ile muamele edilmiş HCT-116 ve Beas-2B'de yüksek düzeyde Bcl2 ekspresyonu fark ettik. Bcl-2'nin artan ekspresyonu, apoptoza karşı direnç gösterir. Diğer pro-apoptotik proteinlerin hücre düzeyinde ekspresyonu da bu yaklaşım için çok önemlidir.

Kaspazlar, programlı hücre ölümü ve inflamasyonunda önemli rol oynayan 15 üyeli bir sistein proteaz ailesidir. (Eckhart, L. ve ark., 2005) Bunlar arasında, kaspaz-3, başlatıcı kaspaz-8 veya kaspaz-9 tarafından aktive edildikten sonra, hücre içinde diğer birçok fonksiyonel olarak kritik proteinileri parçalayan ve apoptozise yol açan apoptotik bir cellattır (Galluzzi, L. ve ark., 2016). Sitotoksik ilaçlar, radyoterapi veya immünoterapi dahil olmak üzere birçok antikanser tedavisi, kaspaz-3'ü aktive ederek tümör hücresi ölümüne neden olabilir. Bu nedenle, kaspaz-3 aktivasyonu (aktive olan kaspaz 3 artık parçalanmış kaspaz 3 olarak tanımlanır) çok sayıda araştırmacı tarafından kanser tedavisinin etkinliği için bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Artmış kaspaz-3 aktivitesi yaygın olarak apoptozun bir belirtisi ve kanser tedavisi başarısının iyi bir göstergesi olarak görülmektedir. Kaspaz-3 aktivitesinin incelenmesi, antraflavik asit ve gonzalitosin-I tarafından üretilen kolon kanseri hücre hatlarının ölüm yolları hakkında fikir verebilir. Parçalanmış kaspaz-3 miktarı, hem antraflavik asit hem de gonzalitosin-I ile tedaviyi takiben HT-29 hücre hattında önemli ölçüde artmıştır. Parçalanmış kaspaz-3'ün tespiti ölmekte olan veya apoptozis sonucu ölen hücreler için güvenilir bir belirteç olarak kabul edilir (Galluzzi, L. ve ark., 2016). İki bileşik ile tedaviyi takiben western blot deneyinde görülen parçalanmış kaspaz-3 ekspresyonundaki artış, HT-29 hücrelerinde apoptozun indükleyicisi olarak yorumlanabilir. Ayrıca, gonzalitosin-I ve antraflavik asit ile muamele edilen HCT-116'da yaklaşık olarak aynı miktarda parçalanmış Kaspaz-3 ekspresyonu gözlendi. Bununla birlikte, HT-29 ve HCT-116 hücre hatları ile karşılaştırıldığında, Beas-2B hücre hattı, iki madde ile tedaviyi takiben daha düşük düzeyde parçalanmış Kaspaz-3 ekspresyonuna sahipti ve bu da apoptoza karşı direnci gösterir.

PARP ailesi, hücrelerde farklı yapılara ve çeşitli işlevlere sahip 17 üyeden oluşmaktadır. PARP, DNA onarımında ve kromatin yapısının transkripsiyonu ve modülasyonu dahil olmak üzere diğer birçok hücresel süreçte rol oynayan kritik bir enzimdir. PARP, NER ve BER'de merkezi bir rol oynar ve alkilleyici ajanların ve kemoterapötik ilaçların neden olduğu DNA hasarının onarılmasını sağlar (Amé, J. C. ve ark., 2004). Apoptoz sırasında, PARP'ın 89 ve 24 kDa'lık fragmanlarda bölünmesi, bu tip

hücre ölümünün yararlı bir özelliği haline gelmiştir. Bu bölünme iyi çalışılmıştır ve apoptoz sırasında aktive olan proteazlar olan 3 ve 7 kaspazları tarafından üretilir. Yüksek DNA hasarı seviyeleri, PARP aşırı aktivasyonu yoluyla apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümüne yol açabilir (Albadawi, H. ve ark., 2006). PARP, apoptozu indükleyen faktör (AIF) aktivasyonu ve nekroz yoluyla apoptozu indükleyebilir. Kontrolsüz bırakılırsa, bu eylem her zaman pasif nekrotik hücre ölümü ile sonuçlanacaktır (Lemaire, C. ve ark., 1998). Tüm bu sebeplerden dolayı, antraflavik asit ve gonzalitosin-I ile tedavi edilen kolon hücre hatlarında apoptoz ya da nekroz varlığını tespit etmek western blot analizinde PARP antikoru kullandık. Hem antraflavik asit hem de gonzalitosin-I ile tedavi edilen HT-29 hücrelerinde anlamlı bir PARP ekspresyonu bulduk. Bu da nekrotik bir sürecin olabileceğini bize gösterdi. Parçalanmış PARP, apoptoz tarafından tahrip edilen hücreler için bir sinyal olarak kabul edilir (Albadawi, H. ve ark., 2006). İki flavonoid ile tedaviyi takiben western blot deneyinde görülen PARP ekspresyonundaki artış, HT-29 hücrelerinde nekroz indükleyicisi olarak yorumlanabilir. Ayrıca, gonzalitosin-I ile tedavi edildiğinde HCT-116'da HT-29 ile kabaca aynı PARP ekspresyonu seviyesini bulduk. Buna karşılık, aynı hücre hattı antraflavik asit ile muamele edildiğinde, PARP seviyeleri azaldı. Beas-2B hücre hattı, iki flavonoid ile tedaviyi takiben PARP'ın ekspresyonunda azalma gösterdi ve bu durum da bize apoptotik bir sürecin olabileceğini bize gösterdi. Tüm bunların yanında hücrelerin nekroz ya da apoptoz yolundaki tercihlerinin net belirlenmesi için parçalanmış PARP ekspresyon seviyelerinin western blot analizi ile tespit edilmesi gerekmektedir.

Nekroz, enfeksiyon, yaralanma, toksinler veya enfarktüs gibi dışsal faktörlerin neden olduğu kazara ve kontrolsüz travmatik bir hücre ölümü şekli olarak tanımlanmıştır. Nekrotik hücre ölümü dış stres üzerine hızlı bir şekilde meydana gelir, bunu bir dizi ayırt edici olay izler: hücre şişmesi, plazma zarı bütünlüğünün kaybı, organel çöküşü, DNA hidrolizi ve hücre lizisi. Plazma zarı rüptürünün bir sonucu olarak, hücre içi içerikler dışarı sızar ve lokal inflamasyona neden olur (Galluzzi ve ark., 2011). Serin-treonin kinazların reseptörle etkileşen protein (RIP) ailesi (RIP 1, RIP2, RIP3 ve RIP4), NF-κB'nin aktivasyonu ve pro-apoptotik yolakların yanı sıra pro-sağkalım ve enflamatuar yanıtları tetikleyen hücresel stresin önemli düzenleyicileridir (Meylan, E., ve Tschopp, J. 2005). Kinaz alanına ek olarak, RIP, ölüm alanı reseptörü Fas ile etkileşimden ve TRADD ile etkileşim yoluyla TNF-R1'e alımdan sorumlu bir ölüm alanı içerir (Stanger, B. ve ark.,1995; Hsu, H. ve ark., 1996). RIP eksikliği olan hücreler TNF aracılı NF-κB

aktivasyonunda başarısızlık göstererek hücreleri apoptoza karşı daha duyarlı hale getirir (Ting, A. ve ark., 1996; Kelliher, M. Ve ark., 1998). RIP ayrıca TNF-reseptör ile ilişkili faktörlerle (TRAF'lar) etkileşime girer ve IKK'ları NEMO ile etkileşim yoluyla TNF-R1 sinyal kompleksine dahil ederek IκB fosforilasyonuna ve bozulmasına yol açabilir (Devin, A. ve ark., 2000). RIP'in aşırı ekspresyonu hem NF-κB aktivasyonunu hem de apoptozu indükler (Stanger, B. ve ark.,1995; Hsu, H. ve ark., 1996). RIP ölüm alanının kaspaz-8'e bağımlı bölünmesi, RIP'in apoptotik aktivitesini tetikleyebilir (Lin, Y. ve ark., 1999). RIPK1 aktivitesini incelemek, antraflavik asit ve gonzalitosin-I tarafından tetiklenen kolon kanseri hücre hatlarında hücre ölümünün nedenleri hakkında potansiyel olarak ışık sağlayabilir. Tez çalışmamızda hem antraflavik asit hem de gonzalitosin-I ile tedavi edilen HCT-116 hücrelerinde anlamlı fosforile RIPK1 ekspresyonu bulduk. Bu nedenle, fosforile RIPK1'in keşfi, apoptoz veya nekroptoz tarafından tahrip edilen ve RIPK3 ve Kaspaz-8 gibi diğer sinyal moleküllerinin varlığına bağlı olan hücreler için bir sinyal olarak kabul edilir. İki bileşik ile tedaviyi takiben western blot deneylerinde görülen RIPK1 ekspresyonundaki artış, HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarında apoptozun indükleyicisi olarak yorumlanabilir. Ayrıca, gonzalitosin-I veya antraflavik asit ile tedavi edildiğinde HCT-116'da HT-29 ile kabaca aynı RIPK1 ekspresyonu seviyesi gözlendi. Buna karşılık, Beas-2B hücre hattı, tedaviden sonra yüksek RIPK1 ekspresyonu göstermedi. Gonzalitosin I'nin tüm antioksidan analizlerinde güçlü antioksidan aktivite sergilediği ve lipit peroksidasyonunu büyük ölçüde azalttığı gösterilmiştir.

6. SONUÇ, ÖNERİLER VE TOPLUMA KATKI

Flavonoidler, in vitro ve in vivo olarak anti-enflamatuar, immünomodülatör ve güçlü antikanser özelliklerini birçok deneysel araştırmada kullanılmışlardır. Farklı flavonoid türevleri ile yapılan çalışmalarda, DNA da dahil olmak üzere makromoleküllere zarar verebilecek serbest radikalleri temizlediği biyotransformasyon enzimleri ve ATP bağlayıcı kaset taşıyıcıları ile etkileşime girerek, potansiyel olarak prokanserojen kimyasal bileşiklerin aktivasyonunu önlemeye ve vücuttan atılımlarını artırmaya yardımcı oldukları, apoptoza neden olan yolakların proliferasyonunu, DNA onarımını veya aktivasyonunu düzenledikleri, kanserin yayılmasını ve büyümesini engelledikleri bildirilmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda antraflavik asidin mide, rahim ağzı ve karaciğer kanserlerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, sitokrom P-448'in güçlü mutajenik bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Gonzalitosin-I için yapılan çalışmalarda ise meme kanseri hücreleri MCF-7 üzerindeki etkisi araştırılmış ve meme kanseri hücrelerinde Bcl-2'yi aşağı regüle ederek ve p53, Bax ve PARP bölünmesini yukarı regüle ederek intrinsik apoptotik yolu kontrol ettiği bildirilmiştir.

Kanser tedavilerinde, kemoterapi, hedefe yönelik ilaçlar ya da alternatif uygulamaların kullanılmasına rağmen, amaçlanan terapötik sonuç belirsizliğini halen korumaktadır. Tez çalışmamızda, flavonoid bileşikler olan gonzalitosin-I ve antraflavik asidin, kolon kanseri hücreleri (HT 29 ve HCT 116) üzerindeki sitotoksik etkileri araştırıldı. Çalışmada SRB ve ATP testlerinden elde ettiğimiz sonuçlara göre iki bileşiğin de, doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını etkileyebildiği gösterilmiş olup, HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin HCT-116 hücrelerine göre daha fazla olduğu bulundu. Bunun yanında yara iyileştirme deneyi sonuçlarına göre, gonzalitosin-I ve antraflavik asidin HCT-116 ve HT-29 kolon kanseri hücre hatlarında, hücre göçünü azaltabileceği gösterildi. DAPI/PI ve Western Blot tahlilinden elde ettiğimiz sonuçlar, iki bileşiğin de mitokondriyal yol yoluyla apoptotik hücre ölümüne neden olabileceği şeklinde idi. Çalışmada flavonoid bileşiklerin kullanımlarındaki dezavantajlardan biri olan yüksek doz kullanımlarının, ileriki çalışmalar ile hedefe yönelik tedavilerle kombinasyon halinde uygulamasıyla ortadan kaldırılabileceği düşüncesindeyiz.

Bu çalışma, gonzalitosin-I ve antraflavik asidin kolon kanseri hücre hatları üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve hücreyi ölüm sinyal yolunu gösteren ilk araştırma olup literatüre önemli katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKÇA

Abdel-Rahman, W., & Peltomäki, P. (2004). Molecular basis and diagnostics of hereditary colorectal cancers. Annals of medicine, 36(5), 379-388.

Abotaleb, M., Samuel, S.M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A. ve ark. (2018). Flavonoids in Cancer and Apoptosis. Cancers, 11, 28.

Adışen, E. & Önder, M. (2017). Acral manifestations of viral infections. Clinics in Dermatology, 35(1), 40-49.

Adrain, C. & Martin, S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. Trends Biochem Sci., 26:390–7.

Aherne, S.A. & O´Brien, N.M. (2002). Dietary Flavonols: chemistry, food content, and metabolism. Nutrition, ,18, 75-81.

Ahlquist, D. A., Sargent, D. J., Loprinzi, C. L., Levin, T. R., Rex, D. K., Ahnen, D. J. ve ark. (2008). Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia. Annals of internal medicine, 149(7), 441-450.

Ahmed S.I., Hayat M.Q., Tahir M., Mansoor Q., Ismail M., Keck K., ve ark. (2016). Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of Cassia angustifolia Vahl. BMC Complement. Altern. Med. 16:460.

Ahmed, S. I., Hayat, M. Q., Tahir, M., Mansoor, Q., Ismail, M., Keck, K. ve ark. (2016). Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of Cassia angustifolia Vahl. BMC complementary and alternative medicine, 16(1), 1-9.

Alazzouzi H., Alhopuro P., Salovaara R., Sammalkorpi H., Järvinen H., Mecklin JP., ve ark. (2005). SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer. Clin Cancer Res. 11:2606–2611.

Albadawi, H., Crawford, R. S., Atkins, M. D., & Watkins, M. T. (2006). Role of poly (ADP-ribose) polymerase during vascular reconstruction. Vascular, 14(6), 362-365.

Al-Ishaq, R. K., Abotaleb, M., Kubatka, P., Kajo, K., & Büsselberg, D. (2019). Flavonoids and their anti-diabetic effects: cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels. Biomolecules, 9(9), 430.

Al-Snai, A. E. (2019). Pharmacological and therapeutic effects of Lippia nodiflora (Phyla nodiflora). IOSR Journal of Pharmacy, 9(8), 15-25.

Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. Nature Reviews Cancer, 16(10), 619-634.

Amé, J. C., Spenlehauer, C., & de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. Bioessays, 26(8), 882-893.

Amin, A. R., Karpowicz, P. A., Carey, T. E., Arbiser, J., Nahta, R., Chen, Z. G., ve ark. (2015). Evasion of anti-growth signaling: a key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. In Seminars in cancer biology (Vol. 35, pp. S55-S77). Academic Press.

Anderberg, C., Li, H., Fredriksson, L., Andrae, J., Betsholtz, C., Li, X., ve ark. (2009). Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. Cancer research, 69(1), 369-378.

Andreotti, P. E., Cree, I. A., Kurbacher, C. M., Hartmann, D. M., Linder, D., Harel, G., ve ark. (1995). Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. Cancer research, 55(22), 5276-5282.

ATINÇ, M., & KALKAN, İ. (2018). Flavonoidler ve sağlık üzerine etkileri. Aydın Gastronomy, 2(1), 31-38.

Axe EL., Walker SA., Manifava M., Chandra P., Roderick HL., Habermann A., ve ark. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. J Cell Biol. 182:685–701.

Ayrton, A. D., Ioannides, C., & Walker, R. (1988). Anthraflavic acid inhibits the mutagenicity of the food mutagen IQ: mechanism of action. Mutation Research Letters, 207(3-4), 121-125.

Bae JM., Kim JH., & Kang GH. (2016). Molecular subtypes of colorectal cancer and their clinicopathologic features, with an emphasis on the serrated neoplasia pathway. Arch Pathol Lab Med. 140:406–13.

Balakrishnan, G., Janakarajan, L., Balakrishnan, A., & Lakshmi, BS. (2010). Molecular basis of the antiinflammatory property exhibited by cyclopentano phenanthrenol isolated from Lippia nodiflora. Immunol Invest. 39(7):713-739.

Banno, K., Yanokura, M., Kobayashi, Y., Kawaguchi, M., Nomura, H., Hirasawa, A., ve ark. (2009). Endometrial cancer as a familial tumor: pathology and molecular carcinogenesis. Current genomics, 10(2), 127-132.

Beerheide, W., Tan, Y. J., Teng, E., Ting, A. E., Jedpiyawongse, A., & Srivatanakul, P. (2000). Downregulation of proapoptotic proteins Bax and Bcl-Xs in p53 overexpressing hepatocellular carcinomas. Biochemical and biophysical research communications, 273(1), 54-61.

Benson, A. B., Venook, A. P., Al-Hawary, M. M., Cederquist, L., Chen, Y. J., Ciombor, K. K., ve ark. (2018). NCCN guidelines insights: colon cancer, version 2.2018. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 16(4), 359-369.

Beretz, A., & Cazenave, J. P. (1988). The effect of flavonoids on blood-vessel wall interactions. Progress in clinical and biological research, 280, 187-200.

Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. Nature Reviews Genetics, 6(8), 611-622.

Board, P. A. T. E. (2021). Rectal Cancer Treatment (PDQ®). In PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. National Cancer Institute (US).

Boland, CR., & Goel, A. (2005). Somatic evolution of cancer cells. Semin Cancer Biol. 15:436–450.

Boland, CR., Thibodeau, SN., Hamilton, SR., Sidransky, D., Eshleman, JR., Burt, RW., ve ark. (1988). A national cancer institute workshop on microsatellite instability for

cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res. 58:5248–5257.

Bosch, L. J., Carvalho, B., Fijneman, R. J., Jimenez, C. R., Pinedo, H. M., Van Engeland, M., ve ark. (2011). Molecular tests for colorectal cancer screening. Clinical colorectal cancer, 10(1), 8-23.

Brusselmans, K., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2003). Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. International Journal of Cancer, 106(6), 856-862.

Cai, X., Lu, W., Yang, Y., Yang, J., Ye, J., Gu, Z., ve ark. (2013). Digitoflavone inhibits Iκ Bα kinase and enhances apoptosis induced by TNFα through downregulation of expression of nuclear factor κB-regulated gene products in human pancreatic cancer cells. PLoS One, 8(10)e77126

Cairns, R. A., & Mak, T. W. (2016). The current state of cancer metabolism. Nat. Rev. Cancer, 16(10), 613-614.

Cancer Genome Atlas Network (2012): Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 487:330–337.

Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature, 438(7070), 932-936.

Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 13:377–399. doi: 10.1111/1541-4337.12065.

Chirumbolo, S., Bjorklund, G., Lysiuk, R., Vella, A., Lenchyk, L., Upyr, T. (2018). Targeting Cancer with Phytochemicals via Their Fine Tuning of the Cell Survival Signaling Pathways. Int. J. Mol. Sci. 19, 3568, doi:10.3390/ijms19113568.

Choi, Y. H., Lakhal-Chaieb, L., Kröl, A., Yu, B., Buchanan, D., Ahnen, D., ve ark. (2019). Risks of colorectal Cancer and Cancer-related mortality in familial colorectal

Cancer type X and Lynch syndrome families. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 111(7), 675-683.

Chung, AG., Frye, JB., Zbesko, JC., Constantopoulos, E., Hayes, M., Figueroa, AG. (2018). Liquefaction of the Brain following Stroke Shares a Similar Molecular and Morphological Profile with Atherosclerosis and Mediates Secondary Neurodegeneration in an Osteopontin-Dependent Mechanism. eNeuro. 5(5).

Corvazier, E., & Maclouf, J. (1985). Interference of some flavonoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs with oxidative metabolism of arachidonic acid by human platelets and neutrophils. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 835(2), 315-321.

Coulie, PG., Van den Eynde, BJ., van der Bruggen, P., Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 14:135–46.

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. Journal of ethnopharmacology, 100(1-2), 72-79.

Crusz, S. M. & Balkwill, F. R. (2015). Inflammation and cancer: advances and new agents. Nat. Rev. Clin. Oncol. 12, 584–596.

Cumella, J. C., Faden, H., & Middleton, E. (1987, January). Selective activity of plant flavonoids on neutrophil chemiluminescence (CL). In Journal of Allergy and Clinical Immunology (Vol. 79, No. 1, pp. 157-157). 11830 WESTLINE INDUSTRIAL DR, ST LOUIS, MO 63146-3318: MOSBY-YEAR BOOK INC.

Cummings, MC., Winterford, CM., Walker, NI. (1997). Apoptosis. Am J Surg Pathol 21:88–101.

Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. International journal of antimicrobial agents, 26(5), 343-356.

D'Arcy MS. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis, and autophagy. Cell Biol Int. 43(6):582-592.

De Jonge, V., Nicolaas, J. S., Cahen, D. L., Moolenaar, W., Rob, J. T., Tang, T. J., ve ark. (2012). Quality evaluation of colonoscopy reporting and colonoscopy performance in daily clinical practice. Gastrointestinal endoscopy, 75(1), 98-106.

DeBerardinis, R. J., & Cheng, T. (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology, and cancer. Oncogene, 29(3), 313-324.

DeBerardinis, RJ., Chandel, NS. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. Sci Adv. 2:e1600200.

Delgado, ME., Haza, AI., Arranz, N., Garcia, A., & Morales, P. (2008). Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. Eur J Nutr. 47(8):479-490.

Denlinger, C. S., Sanft, T., Baker, K. S., Baxi, S., Broderick, G., Demark-Wahnefried, W. ve ark. (2017). Survivorship, version 2.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 15(9), 1140-1163.

Deter, RL., & De Duve, C. (1967). Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. J Cell Biol. 33:437–449.

Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., & Liu, Z. G. (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. Immunity, 12(4), 419-429.

Dzotam, J.K., Simo, I.K., Bitchagno, G., Celik, I., Sandjo, L.P., Tane P., ve ark. (2018). In vitro antibacterial and antibiotic modifying activity of crude extract, fractions and 3′,4′,7-trihydroxyflavone from Myristica fragrans Houtt against MDR Gram-negative enteric bacteria. BMC Complement. Altern. Med. 18:15. doi: 10.1186/s12906-018-2084-1.

Eckhart, L., Ballaun, C., Uthman, A., Kittel, C., Stichenwirth, M., Buchberger, M., ve ark. (2005). Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity. Journal of Biological Chemistry, 280(42), 35077-35080.

Erba, D., Casiraghi, MC., Martinez-Conesa, C., Goi, G., & Massaccesi, L. (2012). Isoflavone supplementation reduces DNA oxidative damage and increases O-β-N-acetyl-D-glucosaminidase activity in healthy women. Nutr Res. 32(4):233-240.

Fearon, ER., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 61:759–767.

Fearon, ER., Cho, KR., Nigro, JM., Kern, SE., Simons, JW., Ruppert, JM. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science. 247:49–56.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., ve ark. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. International journal of cancer, 144(8), 1941-1953.

Festjens, N., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators, and concomitant immune response. Biochim Biophys Acta. 1757(9-10):1371-87.

Galati, G., Teng, S., Moridani, M. Y., Chan, T. S., & O'Brien, P. J. (2000). Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. Drug metabolism and drug interactions, 17(1-4), 311-350.

Galluzzi, L., Berghe, T. V., Vanlangenakker, N., Buettner, S., Eisenberg, T., Vandenabeele, P., ve ark. (2011). Programmed necrosis: from molecules to health and disease. International review of cell and molecular biology, 289, 1-35.

Galluzzi, L., López-Soto, A., Kumar, S., & Kroemer, G. (2016). Caspases connect cell-death signaling to organismal homeostasis. Immunity, 44(2), 221-231.

Garcia, E. J., Lawson, D., Cotsonis, G., & Cohen, C. (2002). Hepatocellular carcinoma and markers of apoptosis (bcl-2, bax, bcl-x): prognostic significance. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 10(3), 210-217.

Gerdin, B., & Svensjö, E. (1983). Inhibitory effect of the flavonoid O-(beta-hydroxyethyl)-rutoside on increased microvascular permeability induced by various agents in rat skin. International journal of microcirculation, clinical and experimental, 2(1), 39-46.

Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. The Journal of pathology, 221(1), 3-12.

Grinstein, E., & Wernet, P. (2007). Cellular signaling in normal and cancerous stem cells. Cellular signalling, 19(12), 2428-2433.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. Cell 140, 883–899.

Grützmann, R., Molnar, B., Pilarsky, C., Habermann, J. K., Schlag, P. M., Saeger, H. D., ve ark. (2008). Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. PloS one, 3(11), e3759.

Guicciardi, ME., Gores, GJ. (2013). Complete lysosomal disruption: a route to necrosis, not to the inflammasome. Cell Cycle. 01;12(13):1995.

Guo, B., Cao, S., Tóth, K., Azrak, R. G., & Rustum, Y. M. (2000). Overexpression of Bax enhances antitumor activity of chemotherapeutic agents in human head and neck squamous cell carcinoma. Clinical cancer research, 6(2), 718-724.

Haddock, M. G., Miller, R. C., Nelson, H., Pemberton, J. H., Dozois, E. J., Alberts, S. R., ve ark. (2011). Combined modality therapy including intraoperative electron irradiation for locally recurrent colorectal cancer. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 79(1), 143-150.

Haddock, M. G., Nelson, H., Donohue, J. H., Taylor, W. E., Devine, R. M., Nagorney, D. M., ve ark. (2003). Intraoperative electron radiotherapy as a component of salvage therapy for patients with colorectal cancer and advanced nodal metastases. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 56(4), 966-973.

Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., ve ark. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. Nature, 400(6743), 464-468.

Hall, M. P. (1998). Stabilization of firefly luciferase using directed evolution. In Proceedings of the 10th international symposium on bioluminescence and chemiluminescence (pp. 392-395). John Wiley & Sons Ltd.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. cell, 144(5), 646-674.

Hasan, S. A. W. (2021). Risk factors for cancers. Cancer.

Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol. Ther. 96, 67-202.

He, L., Wu, Y., Lin, L., Wang, J., Wu, Y., Chen, Y., ve ark. (2011). Hispidulin, a small flavonoid molecule, suppresses the angiogenesis and growth of human pancreatic cancer by targeting vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Cancer Sci. 102(1), 219-225.

Heemskerk-Gerritsen, B. A., Rookus, M. A., Aalfs, C. M., Ausems, M. G., Collée, J. M., Jansen, L., ve ark. (2015). Improved overall survival after contralateral risk-reducing mastectomy in BRCA1/2 mutation carriers with a history of unilateral breast cancer: a prospective analysis. International journal of cancer, 136(3), 668-677.

Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V., & Goeddel, D. V. (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. Immunity, 4(4), 387-396.

Hübner A, ve ark. (2008). Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. Mol Cell. 30:415–425.

Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. Cell, 80(2), 225-236.

Idrissi Janati, A., Karp, I., Sabri, H., & Emami, E. (2019). Is a fusobacterium nucleatum infection in the colon a risk factor for colorectal cancer?: a systematic review and meta-analysis protocol. Syst. Rev. 8(1), 114.

Imperiale, T. F., Ransohoff, D. F., Itzkowitz, S. H., Levin, T. R., Lavin, P., Lidgard, G. P., ve ark. (2014). Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. New England Journal of Medicine, 370(14), 1287-1297.

Ioannides, C., Ayrton, A. D., Lewis, D. F. V., & Walker, R. (1993). Extrapolation of in vitro antimutagenicity to the in vivo situation: the case for anthraflavic acid. Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III, 103-110.

Ioannides, C., Ayrton, A. D., Lewis, D. F. V., & Walker, R. (1993). Extrapolation of in vitro antimutagenicity to the in vivo situation: the case for anthraflavic acid. Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III, 103-110.

Jarial, R., Thakur, S., Sakinah, M., Zularisam, A.W., Sharad A., Kanwar S.S. (2016). Potent anticancer, antioxidant and antibacterial activities of isolated flavonoids from Asplenium nidus. J. King Saud Univ.-Sci. 2018;30:185–192. doi: 10.1016/j.jksus.11.006.

Jass, JR. (2005). Serrated adenoma of the colorectum and the DNA-methylator phenotype. Nat Clin Pract Oncol. 2:398–405.

Jemal, A., Bray, F., Center, MM., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011).Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 61:69–90.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., & Ward E. (2010). Cancer statistics 2010. CA Cancer J Clin. 60(5):277–300. doi: 10.3322/caac.20073.

Jen, J., Kim, H., Piantadosi, S., Liu, ZF., Levitt, RC., Sistonen, P., ve ark. (1994). Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. N Engl J Med. 331:213–221.

Jog, NR. & Caricchio, R. (2014). The role of necrotic cell death in the pathogenesis of immune mediated nephropathies. Clin Immunol. 153(2):243-53.

Jones, AM., Douglas, EJ., Halford, SE., Fiegler, H., Gorman, PA., Roylance, RR. ve ark. (2005). Array-CGH analysis of microsatellite-stable, near-diploid bowel cancers and comparison with other types of colorectal carcinoma. Oncogene. 24:118–129.

Kaeser, M. D., Pebernard, S., & Iggo, R. D. (2004). Regulation of p53 stability and function in HCT116 colon cancer cells. Journal of Biological Chemistry, 279(9), 7598-7605.

Kanthan, R., Senger, JL., & Kanthan, SC. (2012). Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. Pathol Res Int. 2012:597497.

Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z., & Leder, P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-κB signal. Immunity, 8(3), 297-303.

Kerr, JF., Wyllie, AH., & Currie, AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239–57.

Khan, M. T. H., Orhan, I., Şenol, F. S., Kartal, M. U. R. A. T., Şener, B., Dvorská, M., ve ark. (2009). Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. Chemico-Biological Interactions, 181(3), 383-389.

Kim, D. H., Pickhardt, P. J., Taylor, A. J., Leung, W. K., Winter, T. C., Hinshaw, J. L., ve ark. (2007). CT colonography versus colonoscopy for the detection of advanced neoplasia. New England journal of medicine, 357(14), 1403-1412.

Kirkin, V., Joos, S., & Zörnig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1644(2-3), 229-249.

Kobayashi, T., Ruan, S., Clodi, K., Kliche, K. O., Shiku, H., Andreeff, M., ve ark. (1998). Overexpression of Bax gene sensitizes K562 erythroleukemia cells to apoptosis induced by selective chemotherapeutic agents. Oncogene, 16(12), 1587-1591.

Kory, W. (2010). Jasperson Hereditary and Familial Colon Cancer/Kory W. Jasperson [et al.]. Gastroenterology, 138(6), 2044-2058.

Krammer, PH. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. Nature 407:789–95.

Kroemer, G., El-Deiry, WS., Golstein, P., Peter, ME., Vaux, D., Vandenabeele, P., ve ark. (2005). Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death Differ. 12 Suppl 2:1463-7.

Kuipers, EJ., Rösch, T., & Bretthauer, M. (2013). Colorectal cancer screening--optimizing current strategies and new directions. Nat Rev Clin Oncol. 10:130–42. Review of current state of art of colorectal cancer screening.

Kumar, S., & Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. Sci. World J. 2013:162750. doi: 10.1155/2013/162750.

Kuo, S. M. (1996). Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. Cancer letters, 110(1-2), 41-48.

Laird, PW. (2005). Cancer epigenetics. Hum Mol Genet. 14:R65–R76.

Le Marchand, L., Murphy, S. P., Hankin, J. H., Wilkens, L. R., & Kolonel, L. N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. Journal of the National Cancer Institute, 92(2), 154-160.

LeBlanc, H., Lawrence, D., Varfolomeev, E., Totpal, K., Morlan, J., Schow, P., ve ark. (2002). Tumor-cell resistance to death receptor–induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. Nature medicine, 8(3), 274-281.

Lee, Y. S., Chin, Y. T., Shih, Y. J., Nana, A. W., Chen, Y. R., Wu, H. C., ve ark. (2018). Thyroid hormone promotes β-catenin activation and cell proliferation in colorectal cancer. Hormones and Cancer, 9(3), 156-165.

Lemaire, C., Andréau, K., Souvannavong, V., & Adam, A. (1998). Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. FEBS letters, 425(2), 266-270.

Lengauer, C., Kinzler, KW., & Vogelstein, B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. Nature. 396:643–649.

Levine, AJ. (1997). P53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell. 88:323–331.

Li, X., Zhang, Z. S., Zhang, X. H., Yang, S. N., Liu, D., Diao, C. R., ve ark. (2019). Cyanidin inhibits EMT induced by oxaliplatin via targeting the PDK1–PI3K/Akt signaling pathway. Food & function, 10(2), 592-601.

Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., & Liu, Z. G. (1999). Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. Genes & development, 13(19), 2514-2526.

Lindor, NM. (2009). Familial colorectal cancer type X: the other half of hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome. Surg Oncol Clin N Am 18:637.

Liu, J., Wang, H., Wang, J., Chang, Q., Hu, Z., Shen, X., ve ark. (2019). Total flavonoid aglycones extract in Radix Scutellariae induces cross-regulation between autophagy and apoptosis in pancreatic cancer cells. Journal of ethnopharmacology, 235, 133-140.

Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, RS., Taniguchi, K., Krishnadath, KK. ve ark. (2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair. Nat Genet. 26:146–147.

Lockshın, RA., & wılliams, CM. (1965). Programmed cell death -- Degeneration cytology of intersegmental muscles of I. Pernyi silkmoth. J Insect Physiol. 11:123-33.

Lockshin, RA., & Zakeri, Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. Nat Rev Mol Cell Biol. 2(7):545-50.

Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A. ve ark. (2002). Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. Mol Biol Cell. 13:978–988. doi: 10.1091/mbc.01-05-0272.

Luthringer, M., & Marziale, J. Colon Cancer Treatment (PDQ®): Treatment-Health Professional Information [NCI].

MacDonald, BT., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. Dev Cell. 17:9–26.

Macrae, F. A. (2016). Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. Uptodate com [ažurirano 9. lipnja 2017.

Maehara, Y., Anai, H., Tamada, R., & Sugimachi, K. (1987). The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. European Journal of Cancer and Clinical Oncology, 23(3), 273-276.

Manthey, J. A. (2000). Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. Microcirculation, 7(sup1), S29-S34.

Manthey, J. A., Guthrie, N., & Grohmann, K. (2001). Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. Current medicinal chemistry, 8(2), 135-153.

Markowitz, SD., & Bertagnolli, MM. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. N Engl J Med. 361:2449–2460.

Martenson Jr, J. A., Willett, C. G., Sargent, D. J., Mailliard, J. A., Donohue, J. H., Gunderson, L. L., ve ark. (2004). Phase III study of adjuvant chemotherapy and radiation therapy compared with chemotherapy alone in the surgical adjuvant treatment of colon cancer: results of intergroup protocol 0130. Journal of clinical oncology, 22(16), 3277-3283.

Marunouchi, T., & Tanonaka, K. (2015). Cell Death in the Cardiac Myocyte. Biol Pharm Bull. 38(8):1094-7.

Massagué, J., & Obenauf, AC. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. Nature. 529:298–306.

Mehlen, P., & Fearon, ER. (2004). Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. J Clin Oncol. 22:3420–3428.

Metodiewa, D., Kochman, A., & Karolczak, S. (1997) Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N, diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action. Biochem Mol Biol Int 41, 1067–1075.

Meylan, E., & Tschopp, J. (2005). The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. Trends in biochemical sciences, 30(3), 151-159.

Mishra, A., Sharma, A. K., Kumar, S., Saxena, A. K., & Pandey, A. K. (2013). Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. BioMed Research International, 2013.

Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. Genes Dev. 21:2861–2873.

Moore, M. M., Chua, W., Charles, K. A., & Clarke, S. J. (2010). Inflammation and cancer: causes and consequences. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 87(4), 504-508.

Moreau, M., Ibeh, U., Decosmo, K., Bih, N., Yasmin-Karim, S., Toyang, N., ve ark. (2019). Flavonoid derivative of cannabis demonstrates therapeutic potential in preclinical models of metastatic pancreatic cancer. Frontiers in oncology, 9, 660.

Moreau, M., Ibeh, U., Decosmo, K., Bih, N., Yasmin-Karim, S., Toyang, N., ve ark. (2020). Corrigendum: Flavonoid Derivative of Cannabis Demonstrates Therapeutic Potential in Preclinical Models of Metastatic Pancreatic Cancer. Frontiers in oncology, 10, 1434.

Morin, PJ., Sparks, AB., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., ve ark. (1997). Activation of β-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science. 275:1787–1790.

Mork, ME., You, YN., Ying, J., Bannon, SA., Lynch, PM., Rodriguez-Bigas, MA., ve ark. (2015). High Prevalence of Hereditary Cancer Syndromes in Adolescents and Young Adults With Colorectal Cancer. J Clin Oncol. 33(31):3544–3549. doi: 10.1200/JCO.2015.61.4503.

Morris, E. J., Rutter, M. D., Finan, P. J., Thomas, J. D., & Valori, R. (2015). Post-colonoscopy colorectal cancer (PCCRC) rates vary considerably depending on the method used to calculate them: a retrospective observational population-based study of PCCRC in the English National Health Service. Gut, 64(8), 1248-1256.

Murthy, K. C., Kim, J., Vikram, A., & Patil, B. S. (2012). Differential inhibition of human colon cancer cells by structurally similar flavonoids of citrus. Food Chemistry, 132(1), 27-34.

Nabavi, S.M. (2018). Samec, D.; Tomczyk, M.; Milella, L.; Russo, D.; Habtemariam, S.; Suntar, I.; Rastrelli, L.; Daglia, M.; Xiao, J.; et al. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. Biotechnol. Adv. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.005.

Nagja, T., Vimal, K., & Sanjeev, A. (2016). Myristica Fragrans: A comprehensive review. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 8:27–30.

Najafi, M., Farhood, B., & Mortezaee, K. (2019). Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. Journal of cellular physiology, 234(6), 8381-8395.

Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. Nature reviews Molecular cell biology, 11(3), 220-228.

Nguyen, T. T. H., Pandey, R. P., Parajuli, P., Han, J. M., Jung, H. J., Park, Y. I., & Sohng, J. K. (2018). Microbial synthesis of non-natural anthraquinone glucosides displaying superior antiproliferative properties. Molecules, 23(9), 2171.

Nichols, H. B., Trentham-Dietz, A., Egan, K. M., Titus-Ernstoff, L., Holmes, M. D., Bersch, A. J., ve ark. (2009). Body mass index before and after breast cancer diagnosis: associations with all-cause, breast cancer, and cardiovascular disease mortality. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 18(5), 1403-1409.

Niederkorn, J. Y. (2009). Immune escape mechanisms of intraocular tumors. Progress in retinal and eye research, 28(5), 329-347.

Nishi, M., & Moriyasu, F. (2002). Clinicopathological study for reevaluation of the depth of submucosal invasion and histological classification of early colorectal cancer. Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi= The Japanese Journal of Gastro-enterology, 99(7), 769-778.

Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. Nature, 334(6184), 661-665.

Nivatvongs, S. (2000). Surgical management of early colorectal cancer. World journal of surgery, 24(9), 1052-1055.

Oberhammer, F., Wilson, J. W., Dive, C., Morris, I. D., Hickman, J. A., Wakeling, A. E., ve ark. (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. The EMBO journal, 12(9), 3679-3684.

Ogino, S., Cantor, M., Kawasaki, T, Brahmandam, M., Kirkner, GJ., Weisenberger, DJ., ve ark. (2006). CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. Gut. 55:1000–1006.

Ogino, S., Nosho, K., Irahara, N., Shima, K., Baba, Y., Kirkner, G. J., ve ark. (2009). Prognostic significance and molecular associations of 18q loss of heterozygosity:

a cohort study of microsatellite stable colorectal cancers. Journal of Clinical Oncology, 27(27), 4591-4598.

Oxentenko, A. S., & Smyrk, T. C. (2012). Interval colon cancer in a Lynch syndrome patient under annual colonoscopic surveillance: a case for advanced imaging techniques?. BMC gastroenterology, 12(1), 1-6.

Pan, M. H., Lai, C. S., & Ho, C. T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. Food & function, 1(1), 15-31.

Panaretakis, T., Pokrovskaja, K., Shoshan, M. C., & Grandér, D. (2002). Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. Journal of Biological Chemistry, 277(46), 44317-44326.

Pandurangan, A. K., Kumar, S. A. S., Dharmalingam, P., & Ganapasam, S. (2014). Luteolin, a bioflavonoid inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis: Involvement of iNOS and COX-2. Pharmacognosy magazine, 10(Suppl 2), S306.

Papamichael, D., Audisio, R. A., Glimelius, B., de Gramont, A., Glynne-Jones, R., Haller, D., ve ark. (2015). Treatment of colorectal cancer in older patients: International Society of Geriatric Oncology (SIOG) consensus recommendations 2013. Annals of oncology, 26(3), 463-476.

Park, S. H., Lee, J. H., Lee, S. S., Kim, J. C., Yu, C. S., Kim, H. C., ve ark. (2012). CT colonography for detection and characterisation of synchronous proximal colonic lesions in patients with stenosing colorectal cancer. Gut, 61(12), 1716-1722.

Parsons, M. J., McCormick, L., Janke, L., Howard, A., Bouchier-Hayes, L., & Green, D. R. (2013). Genetic deletion of caspase-2 accelerates MMTV/c-neu-driven mammary carcinogenesis in mice. Cell Death & Differentiation, 20(9), 1174-1182.

Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The emerging hallmarks of cancer metabolism. Cell metabolism, 23(1), 27-47.

Perry, E. K., Tomlinson, B. E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P. H., & Perry, R. H. (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. Br Med J, 2(6150), 1457-1459.

Pham-Huy L.A., & He H., Pham-Huy C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. Int. J. Biomed. Sci. 4:89–96.

Pickhardt, P. J., Hassan, C., Halligan, S., & Marmo, R. (2011). Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection—systematic review and meta-analysis. Radiology, 259(2), 393-405.

Piñeros, M., Mery, L., Soerjomataram, I., Bray, F., & Steliarova-Foucher, E. (2021). Scaling up the surveillance of childhood cancer: a global roadmap. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 113(1), 9-15.

Pino, MS., & Chung, DC. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. Gastroenterology. 138:2059–2072.

Poschke, I., Mougiakakos, D., & Kiessling, R. (2011). Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. Cancer Immunology, Immunotherapy, 60(8), 1161-1171.

Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., ve ark. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature, 359(6392), 235-237.

Prenen, H., Vecchione, L., & Van Cutsem, E. (2013). Role of targeted agents in metastatic colorectal cancer. Targeted oncology, 8, 83-96.

Rajput, A., San Martin, I. D., Rose, R., Beko, A., LeVea, C., Sharratt, E., ve ark. (2008). Characterization of HCT116 human colon cancer cells in an orthotopic model. Journal of Surgical Research, 147(2), 276-281.

Ravikumar, T. S., Steele, G., Kane, R., & King, V. (1991). Experimental and clinical observations on hepatic cryosurgery for colorectal metastases. Cancer Research, 51(23 Part 1), 6323-6327.

Ravishankar, D., Watson, K. A., Boateng, S. Y., Green, R. J., Greco, F., & Osborn, H. M. (2015). Exploring quercetin and luteolin derivatives as antiangiogenic agents. European journal of medicinal chemistry, 97, 259-274.

Rivera, B., González, S., Sánchez-Tomé, E., Blanco, I., Mercadillo, F., Letón, R., ve ark. (2011). Clinical and genetic characterization of classical forms of familial adenomatous polyposis: a Spanish population study. Annals of oncology, 22(4), 903-909.

Rocco, A., Staibano, S., Ottini, L., Mezza, E., Somma, P., Mariani-Costantini, R., ve ark. (2003). Is there a link between environmental factors and a genetic predisposition to cancer? A lesson from a familial cluster of gastric cancers. European Journal of cancer, 39(11), 1619-1624.

Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C., & Gaforio, J. J. (2019). Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: An updated review of human studies. Antioxidants, 8(5), 137.

Rubin, D. C., Shaker, A., & Levin, M. S. (2012). Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. Frontiers in immunology, 3, 107.

Ruffolo, P. R. (1964). The Pathogenesis of Necrosis: I. Correlated Light and Electron Microscopic Observations of the Myocardial Necrosis Induced by the Intravenous Injection of Papain. The American Journal of Pathology, 45(5), 741.

Ruyck, J. D., Preat, J., Perpete, E. A., Jacquemin, D., & Wouters, J. (2006). 2, 6-Dihydroxyanthraquinone: an isomer of the well known alizarin dye. Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online, 62(10), o4503-o4505.

Saftig, P., Beertsen, W., & Eskelinen, E. L. (2008). LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. Autophagy, 4(4), 510-512.

Samowitz, WS., Albertsen, H., Herrick, J., Levin, TR., Sweeney, C., Murtaugh, MA., ve ark. (2005). Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. Gastroenterology. 129:837–845.

Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., ve ark. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. Science, 304(5670), 554-554.

Santos, B. L., Oliveira, M. N., Coelho, P. L., Pitanga, B. P., Da Silva, A. B., Adelita, T., ve ark. (2015). Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by

inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. Chemico-Biological Interactions, 242, 123-138.

Schreuders, E. H., Ruco, A., Rabeneck, L., Schoen, R. E., Sung, J. J., Young, G. P., ve ark. (2015). Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes. Gut, 64(10), 1637-1649.

Schubbert, S., Shannon, K., & Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nature Reviews Cancer, 7(4), 295-308.

Seager, M. J., Jakobs, T. F., Sharma, R. A., & Bandula, S. (2021). Combination of ablation and embolization for intermediate-sized liver metastases from colorectal cancer: what can we learn from treating primary liver cancer?. Diagnostic and Interventional Radiology, 27(5), 677.

Shah, U., Shah, R., Acharya, S., & Acharya, N. (2013). Novel anticancer agents from plant sources. Chinese journal of natural medicines, 11(1), 16-23.

Sharma, S. H., Kumar, J. S., Chellappan, D. R., & Nagarajan, S. (2018). Molecular chemoprevention by morin–A plant flavonoid that targets nuclear factor kappa B in experimental colon cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy, 100, 367-373.

Sheffer, M., Bacolod, M. D., Zuk, O., Giardina, S. F., Pincas, H., Barany, F., ve ark. (2009). Association of survival and disease progression with chromosomal instability: a genomic exploration of colorectal cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(17), 7131-7136.

Shi, Y., Hata, A., Lo, R. S., Massagué, J., & Pavletich, N. P. (1997). A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. Nature, 388(6637), 87-93.

Simonsen, A., & Tooze, S. A. (2009). Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. Journal of cell biology, 186(6), 773-782.

Singh, K. E., Taylor, T. H., Pan, C. J. G., Stamos, M. J., & Zell, J. A. (2014). Colorectal cancer incidence among young adults in California. Journal of adolescent and young adult oncology, 3(4), 176-184.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., ve ark. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 82(13), 1107-1112.

Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2011). TNM classification of malignant tumours. John Wiley & Sons.

Sonnenbichler, J., Scalera, F., Sonnenbichler, I., & Weyhenmeyer, R. (1999). Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle Silybum marianum on kidney cells. Journal of Pharmacology and experimental therapeutics, 290(3), 1375-1383.

Spada, C., Hassan, C., Barbaro, B., Iafrate, F., Cesaro, P., Petruzziello, L., ve ark. (2015). Colon capsule versus CT colonography in patients with incomplete colonoscopy: a prospective, comparative trial. Gut, 64(2), 272-281.

Spada, C., Hassan, C., Galmiche, J. P., Neuhaus, H., Dumonceau, J. M., Adler, S., ve ark. (2012). Colon capsule endoscopy: European society of gastrointestinal endoscopy (ESGE) guideline. Endoscopy, 44(05), 527-536.

Stanczak, A., Stec, R., Bodnar, L., Olszewski, W., Cichowicz, M., Kozlowski, W., ve ark. (2011). Prognostic significance of Wnt-1, β-catenin and E-cadherin expression in advanced colorectal carcinoma. Pathology & Oncology Research, 17, 955-963.

Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E., & Seed, B. (1995). RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. Cell, 81(4), 513-523.

Steeg, P. S. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. Nature medicine, 12(8), 895-904.

Steele, V. E., Kelloff, G. J., Balentine, D., Boone, C. W., Mehta, R., Bagheri, D., ve ark. (2000). Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. Carcinogenesis, 21(1), 63-67.

Stein, A., Moehler, M., Trojan, J., Goekkurt, E., & Vogel, A. (2018). Immuno-oncology in GI tumours: Clinical evidence and emerging trials of PD-1/PD-L1 antagonists. Critical reviews in oncology/hematology, 130, 13-26.

Stein, C. J., & Colditz, G. A. (2004). Modifiable risk factors for cancer. British journal of cancer, 90(2), 299-303.

Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L., & Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. Nature, 348(6299), 331-333.

Sudha, A., & Srinivasan, P. (2014). Bioassay-guided isolation and antioxidant evaluation of flavonoid compound from aerial parts of Lippia nodiflora L. BioMed research international, 2014.

Sudha, A., Srinivasan, P., Kanimozhi, V., Palanivel, K., & Kadalmani, B. (2018). Antiproliferative and apoptosis-induction studies of 5-hydroxy 3′, 4′, 7-trimethoxyflavone in human breast cancer cells MCF-7: an in vitro and in silico approach. Journal of Receptors and Signal Transduction, 38(3), 179-190.

Suh, Y., Afaq, F., Johnson, J. J., & Mukhtar, H. (2009). A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-κB-signaling pathways. Carcinogenesis, 30(2), 300-307.

Sun, X. Y., Plouzek, C. A., Henry, J. P., Wang, T. T., & Phang, J. M. (1998). Increased UDP-glucuronosyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin A in prostate cancer cells. Cancer Research, 58(11), 2379-2384.

Taj-Aldeen, S. J., Gene, J., Bozom, I. A., Buzina, W., Cano, J. F., & Guarro, J. (2006). Gangrenous necrosis of the diabetic foot caused by Fusarium acutatum. Medical Mycology, 44(6), 547-552.

Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., & Kakde, R. B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. Tropical journal of Pharmaceutical research, 7(3), 1089-1099.

Taylor, S. C., & Posch, A. (2014). The design of a quantitative western blot experiment. BioMed research international, 2014.

Temel, J. S., Greer, J. A., Muzikansky, A., Gallagher, E. R., Admane, S., Jackson, V. A., ve ark. (2010). Early palliative care for patients with metastatic non–small-cell lung cancer. New England Journal of Medicine, 363(8), 733-742.

Thiagalingam, S., Lengauer, C., Leach, F. S., Schutte, M., Hahn, S. A., Overhauser, J., ve ark. (1996). Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. Nature genetics, 13(3), 343-346.

Thibodeau, S. N., Bren, G., & Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science, 260(5109), 816-819.

Ting, A. T., Pimentel-Muiños, F. X., & Seed, B. (1996). RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. The EMBO journal, 15(22), 6189-6196.

Tonnus, W., Meyer, C., Paliege, A., Belavgeni, A., von Mässenhausen, A., Bornstein, S. R., ve ark. (2019). The pathological features of regulated necrosis. The Journal of pathology, 247(5), 697-707.

Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., & Issa, J. P. J. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(15), 8681-8686.

Tsang, A. H. F., Cheng, K. H., Wong, A. S. P., Ng, S. S. M., Ma, B. B. Y., Chan, C. M. L., ve ark. (2014). Current and future molecular diagnostics in colorectal cancer and colorectal adenoma. World Journal of Gastroenterology: WJG, 20(14), 3847.

Tsunekawa, R., Katayama, K., Hanaya, K., Higashibayashi, S., Sugimoto, Y., & Sugai, T. (2019). Synthesis of 5-Hydroxy-3′, 4′, 7-trimethoxyflavone and Related Compounds and Elucidation of Their Reversal Effects on BCRP/ABCG2-Mediated Anticancer Drug Resistance. ChemBioChem, 20(2), 210-220.

Turktekin, M., Konac, E., Onen, H. I., Alp, E., Yilmaz, A., & Menevse, S. (2011). Evaluation of the effects of the flavonoid apigenin on apoptotic pathway gene expression on the colon cancer cell line (HT29). Journal of medicinal food, 14(10), 1107-1117.

Turner, N., & Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. Nature Reviews Cancer, 10(2), 116-129.

Urquiaga, I. N. E. S., & Leighton, F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biological research, 33(2), 55-64.

Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. Cell, 147(2), 275-292.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology, 39(1), 44-84.

Valori, R., Rey, J. F., Atkin, W. S., Bretthauer, M., Senore, C., Hoff, G., ve ark. (2012). European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. –Quality assurance in endoscopy in colorectal cancer screening and diagnosis. Endoscopy, 44(S 03), SE88-SE105.

Van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., & Arnold, D. (2014). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology, 25, iii1-iii9.

van de Velde, C. J., Boelens, P. G., Borras, J. M., Coebergh, J. W., Cervantes, A., Blomqvist, L., ve ark. (2014). EURECCA colorectal: multidisciplinary management: European consensus conference colon & rectum. European journal of cancer, 50(1), 1-e1.

Van der Logt, E. M. J., Roelofs, H. M. J., Nagengast, F. M., & Peters, W. H. M. (2003). Induction of rat hepatic and intestinal UDP-glucuronosyltransferases by naturally occurring dietary anticarcinogens. Carcinogenesis, 24(10), 1651-1656.

Van Gossum, A., Munoz-Navas, M., Fernandez-Urien, I., Carretero, C., Gay, G., Delvaux, M., ve ark. (2009). Capsule endoscopy versus colonoscopy for the detection of polyps and cancer. New England Journal of Medicine, 361(3), 264-270.

Vasei, N., Shishegar, A., Ghalkhani, F., & Darvishi, M. (2019). Fat necrosis in the Breast: A systematic review of clinical. Lipids in health and disease, 18(1), 1-9.

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature protocols, 1(3), 1112-1116.

Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?. Nature Reviews Cancer, 10(12), 842-857.

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., ve ark. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. New England Journal of Medicine, 319(9), 525-532.

Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., & Mattivi, F. (2004). Quantitation of polyphenols in different apple varieties. Journal of agricultural and food chemistry, 52(21), 6532-6538.

Walczak, H., & Krammer, P. H. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. Experimental cell research, 256(1), 58-66.

Walker, E. H., Pacold, M. E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P. T., Wymann, M. P., & Williams, R. L. (2000). Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. Molecular cell, 6(4), 909-919.

Wang, Y., Suzek, T., Zhang, J., Wang, J., He, S., Cheng, T., ve ark. (2014). PubChem bioassay: 2014 update. Nucleic acids research, 42(D1), D1075-D1082.

Warthin, A. S. (1913). Heredity with reference to carcinoma: as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. Archives of internal medicine, 12(5), 546-555.

Watson, A. J., & Collins, P. D. (2011). Colon cancer: a civilization disorder. Digestive diseases, 29(2), 222-228.

Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., & Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. Molecular cell, 30(6), 678-688.

Wexler, P., Anderson, B. D., Gad, S. C., Hakkinen, P. B., Kamrin, M., De Peyster, A., ve ark. (2005). Encyclopedia of toxicology (Vol. 1). Academic Press.

Wirtzfeld, D. A., Petrelli, N. J., & Rodriguez-Bigas, M. A. (2001). Hamartomatous polyposis syndromes: molecular genetics, neoplastic risk, and surveillance recommendations. Annals of surgical oncology, 8, 319-327.

Wolmark, N., Wieand, H. S., Hyams, D. M., Colangelo, L., Dimitrov, N. V., Romond, E. H., ve ark. (2000). Randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol R-02. Journal of the National Cancer Institute, 92(5), 388-396.

Wright, J. D., Powell, M. A., Mutch, D. G., Rader, J. S., Gibb, R. K., Huettner, P. C., ve ark. (2004). Synchronous ovarian metastases at the time of laparotomy for colon cancer. Gynecologic oncology, 92(3), 851-855.

Wu, S., Powers, S., Zhu, W., & Hannun, Y. A. (2016). Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. Nature, 529(7584), 43-47.

Xia, D., Ji, W., Xu, C., Lin, X., Wang, X., Xia, Y., ve ark. (2017). Knockout of MARCH2 inhibits the growth of HCT116 colon cancer cells by inducing endoplasmic reticulum stress. Cell death & disease, 8(7), e2957-e2957.

Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. Nutrients, 10(11), 1618.

Yin, X. M., Ding, W. X., & Gao, W. (2008). Autophagy in the liver. Hepatology, 47(5), 1773-1785.

Youns, M., & Abdel Halim Hegazy, W. (2017). The natural flavonoid fisetin inhibits cellular proliferation of hepatic, colorectal, and pancreatic cancer cells through modulation of multiple signaling pathways. PLoS One, 12(1), e0169335.

Yu, L., Chen, M., Zhang, R., & Xu, T. (2019). Antitumor effects of glychionide-a flavonoid in human pancreatic carcinoma cells are mediated by activation of apoptotic and autophagic pathways, cell cycle arrest, and disruption of mitochondrial membrane potential. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 25, 962.

Zauber, P., Sabbath-Solitare, M., Marotta, S. P., & Bishop, T. (2008). Loss of heterozygosity for chromosome 18q and microsatellite instability are highly consistent across the region of the DCC and SMAD4 genes in colorectal carcinomas and adenomas. Journal of Applied Research, 8(1), 14-24.

Zhao, Y., Zhou, Y., & Wang, M. (2019). Brosimone I, an isoprenoid-substituted flavonoid, induces cell cycle G 1 phase arrest and apoptosis through ROS-dependent endoplasmic reticulum stress in HCT116 human colon cancer cells. Food & function, 10(5), 2729-2738.

Zhou, P., Qian, L., Bieszczad, C. K., Noelle, R., Binder, M., Levy, N. B., & Craig, R. W. (1998). Mcl-1 in transgenic mice promotes survival in a spectrum of hematopoietic cell types and immortalization in the myeloid lineage. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 92(9), 3226-3239.

Zhou, Y., Xia, L., Wang, H., Oyang, L., Su, M., Liu, Q., ve ark. (2018). Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. Oncotarget, 9(70), 33403.

Zhu, P., Zhao, N., Sheng, D., Hou, J., Hao, C., Yang, X., ve ark. (2016). Inhibition of growth and metastasis of colon cancer by delivering 5-fluorouracil-loaded pluronic P85 copolymer micelles. Scientific reports, 6(1), 1-11.

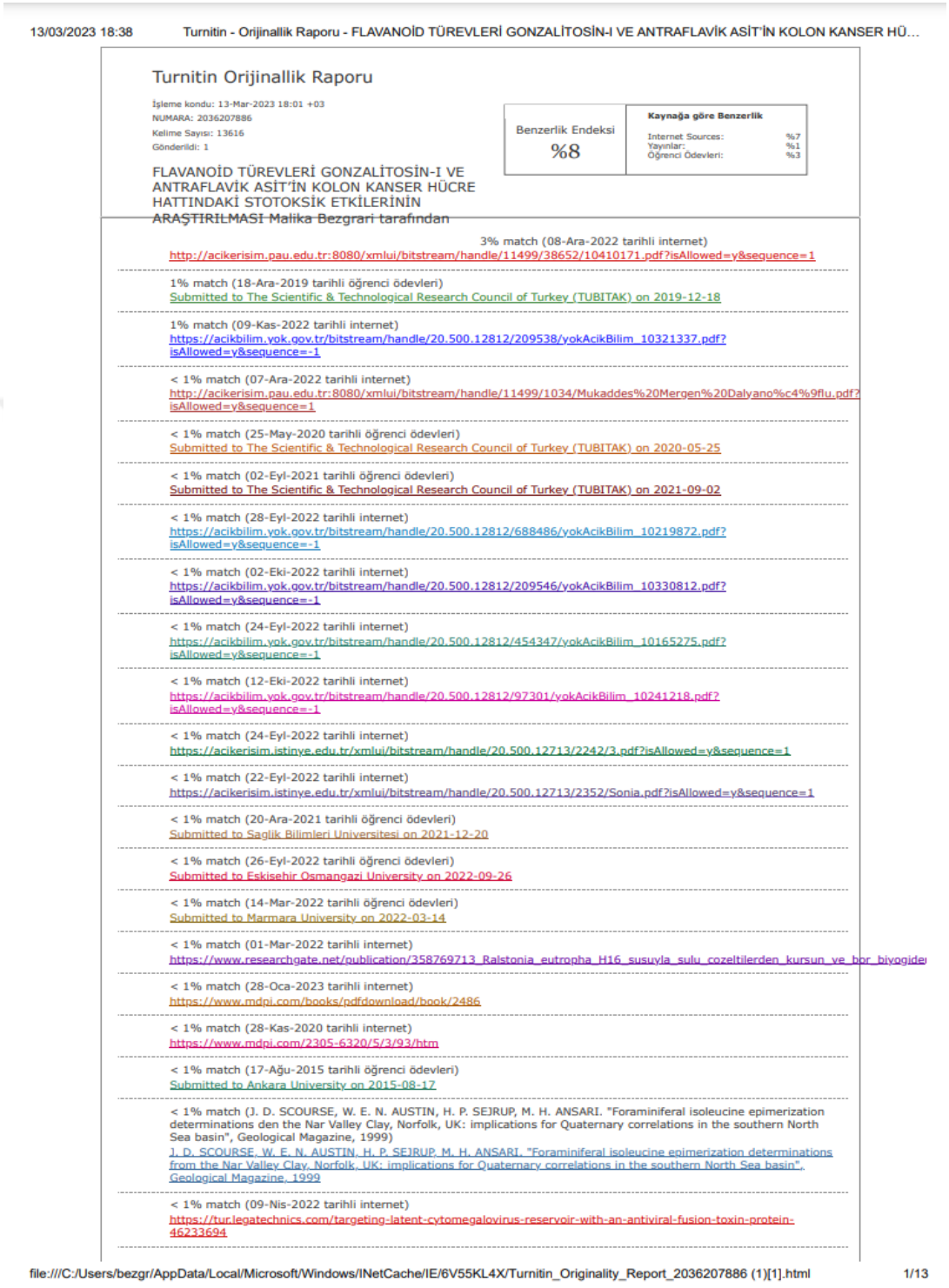
Zhu, W., Jia, Q., Wang, Y., Zhang, Y., & Xia, M. (2012). The anthocyanin cyanidin-3-O-β-glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP–PKA-dependent signaling pathway. Free Radical Biology and Medicine, 52(2), 314-327.

Zumsteg, A., & Christofori, G. (2009). Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis. Current opinion in oncology, 21(1), 60-70.

EKLER

EK-1: İNTİHAL RAPORU
EK-2: ÖZGEÇMİŞ

EK-1: İNTİHAL RAPORU



13/03/2023 18:38 Turnitin - Orijinallik Raporu - FLAVANOİD TÜREVLERİ GONZALİTOSİN-I VE ANTRAFLAVİK ASİT'İN KOLON KANSER HÜ...

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme kondu: 13-Mar-2023 18:01 +03
NUMARA: 2036207886
Kelime Sayısı: 13616
Gönderildi: 1

FLAVANOİD TÜREVLERİ GONZALİTOSİN-I VE ANTRAFLAVİK ASİT'İN KOLON KANSER HÜCRE HATTINDAKİ STOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI Malika Bezgrari tarafından

Benzerlik Endeksi %8

Kaynağa göre Benzerlik
Internet Sources: %7
Yayınlar: %1
Öğrenci Ödevleri: %3

3% match (08-Ara-2022 tarihli internet)
http://acikerisim.pau.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11499/38652/10410171.pdf?isAllowed=y&sequence=1

1% match (18-Ara-2019 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) on 2019-12-18

1% match (09-Kas-2022 tarihli internet)
https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/209538/yokAcikBilim_10321337.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

< 1% match (07-Ara-2022 tarihli internet)
http://acikerisim.pau.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11499/1034/Mukaddes%20Mergen%20Dalyano%c4%9flu.pdf?isAllowed=y&sequence=1

< 1% match (25-May-2020 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) on 2020-05-25

< 1% match (02-Eyl-2021 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) on 2021-09-02

< 1% match (28-Eyl-2022 tarihli internet)
https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/688486/yokAcikBilim_10219872.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

< 1% match (02-Eki-2022 tarihli internet)
https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/209546/yokAcikBilim_10330812.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

< 1% match (24-Eyl-2022 tarihli internet)
https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/454347/yokAcikBilim_10165275.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

< 1% match (12-Eki-2022 tarihli internet)
https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/97301/yokAcikBilim_10241218.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

< 1% match (24-Eyl-2022 tarihli internet)
https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/2242/3.pdf?isAllowed=y&sequence=1

< 1% match (22-Eyl-2022 tarihli internet)
https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/2352/Sonia.pdf?isAllowed=y&sequence=1

< 1% match (20-Ara-2021 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi on 2021-12-20

< 1% match (26-Eyl-2022 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Eskisehir Osmangazi University on 2022-09-26

< 1% match (14-Mar-2022 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Marmara University on 2022-03-14

< 1% match (01-Mar-2022 tarihli internet)
https://www.researchgate.net/publication/358769713_Ralstonia_eutropha_H16_susuyla_sulu_cozeltilerden_kursun_ve_bor_biyogide

< 1% match (28-Oca-2023 tarihli internet)
https://www.mdpi.com/books/pdfdownload/book/2486

< 1% match (28-Kas-2020 tarihli internet)
https://www.mdpi.com/2305-6320/5/3/93/htm

< 1% match (17-Ağu-2015 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Ankara University on 2015-08-17

< 1% match (J. D. SCOURSE, W. E. N. AUSTIN, H. P. SEJRUP, M. H. ANSARI. "Foraminiferal isoleucine epimerization determinations den the Nar Valley Clay, Norfolk, UK: implications for Quaternary correlations in the southern North Sea basin", Geological Magazine, 1999)
J. D. SCOURSE, W. E. N. AUSTIN, H. P. SEJRUP, M. H. ANSARI. "Foraminiferal isoleucine epimerization determinations from the Nar Valley Clay, Norfolk, UK: implications for Quaternary correlations in the southern North Sea basin", Geological Magazine, 1999

< 1% match (09-Nis-2022 tarihli internet)
https://tur.legatechnics.com/targeting-latent-cytomegalovirus-reservoir-with-an-antiviral-fusion-toxin-protein-46233694

file:///C:/Users/bezgr/AppData/Local/Microsoft/Windows/INetCache/IE/6V55KL4X/Turnitin_Originality_Report_2036207886 (1)[1].html 1/13

EK-2: ÖZGEÇMİŞ



Malika Bezgrari

yüksek lisans öğrencisi

bezgrarimalak@gmail.com 05318156911
Bağlar mahallesi mimar Sinan caddesi G plus K 15 D 213 Bağcılar Istanbul, Apartment213 , ...

Profil

Eğitimler

Biyolojide kalite kontrol Mühendisliği Diploması. Kesin bilimler ve doğa ve yaşam bilimleri fakültesinden

İstinye Üniversitesi, İstanbul
öğrendim: kanser hücresi kültürü, PCR testi, MTT testi, ATP testi, hücre kültürü, western blot testi, SRB testi, Tripen bleu testi, DC50, EC50, EC90, Annexin V, Yara İyileştirme testi..... vb.

İş deneyimi

Kalite Kontrol ve Endüstriyel Hijyen Daire Başkanı Mar 2016 - Nis 2019
EURL KAISRAN , ithalat / ihracat tarım şirketi, Biskra
Hammaddeden nihai ürüne kadar tarımsal gıda ürünleri üzerinde çalışmak. Üretim hattını kontrol ederken, bu süre zarfında tedavi için en iyi ürünleri seçmeyi öğrendim. gıda ürünlerinin kimyasal muamelesi. Tüketicilere söz verme sorumluluk duygumu geliştirdim. bilgimi artırmak için yabancı alıcılarla uğraşıyorum.

Engellilerin sağlık ve güvenliğinden sorumlu biyoloji mühendisi Merkezler Şub 2014 - Oca 2016
Sosyal Eylem Müdürlüğü, Adrar
engellilerle çalışan bir dernekle işbirliği içinde çalışır. Konut kalitesinin hizmet ve yemek durumunu kontrol ediyorum. Benim için bu deneyim bana, bu insanların bizim gibi olduğu ancak daha fazla ilgi ve bakıma ihtiyaçları olduğu konusunda bir ders verdi. Toplumun bu kesiminin çıkarlarını korumak için katı kurallara uymayı öğrendim.

Kişisel bilgiler

Beceriler

- liderlik
- Microsoft Office
- baskı altında çalışmak
- çizim
- giden kutusu düşünme

Diller

- Arapça
- Fransızca
- İngilizce
- Amazighca
- Türkçe