

K.K.T.C
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLOHIYA (*Corchorus olitorius* L.) EKSTRAKTININ
KOLON KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE APOPTOTİK
ETKİLERİ

Uzman Günsu SOYKUT

Beslenme ve Diyetetik Doktora Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sevinç Yücecan

EŞ DANIŞMAN
Prof. Dr. Seda Vatansever

LEFKOŞA
2018

TEŞEKKÜR

Tez süreci boyunca desteklerini ve yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Sevinç Yücecan'a,

Çalışmanın en başından en sonuna kadar, konunun belirlenmesi ve uygulanması için elinden gelen tüm desteği ve emeği gösteren eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Seda Vatansever'e

Ekstraksiyon yöntemi ve içerik analizlerinde tüm desteği ve yardımı, anlayış ile gösteren Sayın Prof. Dr. İhsan Çalış'a

Çalışmanın tüm aşamalarında elimden tutup, tüm fedakarlığı ile bana hep destek ve yardımcı olan, yanımda olduğunu sürekli hissettiren Sayın Doç. Dr. Eda Becer'e,

Çalışmanın laboratuvar aşamasının yürütülmesi için bana kapılarını açan Eczacılık Fakültesi Farmakognozi ve DESAM hücre kültürü laboratuvarlar sorumluları ve çalışanlarına,

Hücrelerin fotoğraflanmasında desteklerinden ötürü Sayın Uzm. Hilal Kabadayı'ya,

Bana gösterdikleri destek ve anlayış için başta oda arkadaşlarım, tüm bölüm ve çalışma arkadaşlarıma,

Bu süreçte sürekli arayıp, destekleri ile kendimi iyi hissettiren çok sevgili aileme ve arkadaşlarıma,

Hayatımın tüm aşamalarında, maddi manevi her türlü destekle benim yanımda olan, üzerimde sonsuz emekleri olan, her zaman sırtımı güvenle dayadığım canlarım, annem, babam ve kardeşime,

Son olarak, bu süreçte bana gösterdiği sonsuz sevgi, sabır, anlayış ve desteği için, hayatımın her döneminde yanımda olan, hayat ve yol arkadaşım, canım eşim Hüseyin Çağsın'a,

Sonsuz teşekkürlerimle,

Günsu Soykut

ÖZET

Soykut, G. Molohiya (*Corchorus olitorius* L.) Ekstraktının Kolon Kanser Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkileri. Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Doktora Programı, Doktora Tezi, Lefkoşa, 2018.

Corchorus olitorius L., Kıbrıs ve diğer Doğu Akdeniz ülkelerinde çok tüketilen ve birçok kültürde tıbbi özellikleri olan bir bitki olarak bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, primer (Colo-320) ve metastatik (Colo-741) kolon adenokarsinom hücre hatlarında *Corchorus olitorius* L. yaprak diklorometan (DCM) ve su ekstraktlarının *in vitro* anti-kanser ve apoptotik etkilerini belirlemektir. Colo-320 ve Colo-741 hücre hatlarında, hücre canlılığı ve sitotoksitesi, MTT testi ile ekstraktın beş farklı konsantrasyonda ölçülmüştür (5, 10, 20, 50 ve 100 µg/ml). *Corchorus olitorius* L.'nin apoptotik aktiviteleri, kaspaz-3, sitokrom-c ve Fas Ligand'a (FasL) karşıt antikörler kullanılarak immünohistokimya yöntemi ile araştırılmıştır. Her iki hücre hattında DNA fragmentasyonunu tespit etmek için TUNEL testi kullanılmıştır. Her iki ekstrakt da diğer konsantrasyonlar ile karşılaştırıldığında 50 µg/ml ekstrakt dozu Colo-320 ve Colo-741 hücre canlılığının azalmasında daha etkili olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ve Colo-320 hücre hattı ile karşılaştırıldığında, Colo-741 hücrelerinde TUNEL pozitif hücrelerin sayısı anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. DCM ekstresi, kaspaz-3 immünoaktivitesini Colo-320 hücrelerinde anlamlı ölçüde artırırken, su fazı ekstresi aynı hücre hattında kaspaz-3'e ek olarak sitokrom-c ve FasL immünoaktivitelerini de anlamlı derecede artırmıştır. Her iki ekstrakt da, Colo-741 hücrelerinde kaspaz-3, sitokrom-c ve FasL immünoaktivitelerini önemli ölçüde arttırabilmiş ve her iki apoptotik yolağın da metastatik kanser hücrelerinde indüklendiğini göstermiştir. Sonuç olarak, *Corchorus olitorius* L., metastatik kolon adenokarsinoma hücre hatlarında daha etkili olmakla birlikte, her iki kanser hücre hattında da apoptozu indüklemeyi başarmıştır. Sonuçlar, *Corchorus olitorius* L.'in potansiyel anti-kanser etkilerinin olduğunu ve kolon kanseri tedavisinde kemoterapiye karşıt olarak kullanılabilecek potansiyel kemoterapötik ajan olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Corchorus olitorius* L., kolon kanser, apoptoz, bitki ekstraktı

Destekleyen Kurum: Yakın Doğu Üniversitesi, Center of Excellence (Proje no: 2016-04035)

ABSTRACT

Soykut, G. Apoptotic Effects of Molohiya (*Corchorus olitorius* L.) Extracts in Colon Adenocarcinoma Cell Lines. Near East University Institute of Health Sciences Nutrition and Dietetics PhD Program, PhD Thesis, Nicosia, 2018.

Corchorus olitorius L. is a highly consumed plant in Cyprus and other Eastern Mediterranean countries and known as a medicinal food in many cultures. The aim of the study is to determine *in vitro* anticancer and apoptotic induction effects of dichloromethane (DCM) and aqueous *Corchorus olitorius* L. leaf extracts in primary (Colo-320) and metastatic (Colo-741) colon adenocarcinoma cell lines.. Cell growth and cytotoxicity were measured with MTT assay with five different concentrations of extracts in Colo-320 and Colo-741 cell lines. Apoptotic activities of *Corchorus olitorius* L. were investigated by immunocytochemistry using antibodies directed against to caspase-3, cytochrome-c and FasLigand (FasL). TUNEL assay was used to detect DNA fragmentation in both cell lines. Both DCM and aqueous phase of extracts at 50 µg/ml concentration were more effective at inhibiting Colo-320 and Colo-741 cell growth when compared with other dilutions. The number of TUNEL positive cells was significant in Colo-741 cells when compared with both control group and Colo-320 cell line. DCM phase extract significantly increased caspase-3 immunoreactivity while aqueous phase extract significantly increased cytochrome-c and FasL immunoreactivities in Colo-320 cell lines. Both extracts were able to significantly increase caspase-3, cytochrome-c and FasL immunoreactivity in Colo-741 cells showing that both apoptotic pathways were triggered. Overall, *Corchorus olitorius* L. extracts induced apoptosis in both cancer cell lines while being more effective in metastatic colon adenocarcinoma cell lines suggesting that the extracts might have potential anticancer effects and possibility to be used as precursor to phytochemical colon cancer treatment as oppose to chemotherapy.

Keywords: *Corchorus olitorius*, colon cancer, apoptosis, plant extract

Supported by: Near East University, Center of Excellence (Grant no: 2016-04035)

İÇİNDEKİLER

ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1 Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam	1
1.2. Amaç	2
1.3. Hipotez	2
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kolorektal Kanser.....	4
2.1.1 Kolorektal Kanser Yönetimi.....	4
2.1.2 Kolorektal Kanser Risk Faktörleri.....	5
2.1.3 Kolorektal Kanserde Büyüme Faktörleri.....	6
2.1.4 Kolorektal Kanserdeki Moleküler Mekanizmalar	7
2.1.5 Kolorektal Kanserde Önemli Gen Mutasyonları	8
2.1.6 mTOR & PI3K/Akt Yolakları	9
2.1.7 Kolorektal Kanser ve Metastaz.....	12
2.2 Apoptoz	12
2.2.1 Kolon Kanserinde Apoptozun Önemi.....	15
2.2.2 Kolon Kanserinde Apoptoz İnhibisyonu	16
2.3 <i>Corchorus olitorus</i> L.	17
2.3.1 <i>Corchorus olitorus</i> L. Bitkisi ve Besin Ögesi İçeriği	17

2.3.2 <i>Corchorus olitorius</i> L. Taksonomisi.....	20
2.3.3 <i>Corchorus olitorius</i> L. ve Polifenoller.....	20
2.3.4 <i>Corchorus olitorius</i> L. ve İçeriğindeki Fenolik Bileşikler	22
2.3.5 Kersetin.....	23
2.3.5.1 Kersetin ve Antioksidan Özellikleri	24
2.3.5.2 Kersetin ve Anti-inflamatuvar Özellikleri	25
2.3.5.3 Kersetin ve Anti-kanser/Pro-Apoptotik Özellikleri.....	25
2.3.6 Klorojenik Asit	26
2.3.6.1 Klorojenik Asit ve Antioksidan Özellikleri	27
2.3.6.2 Klorojenik Asit ve Anti-inflamatuvar Özellikleri.....	27
2.3.6.3 Klorojenik Asit ve Anti-kanser Özellikleri.....	28
2.3.6.5 Klorojenik Asit ve Pro-Apoptotik Özellikleri	29
2.3.7 <i>Corchorus olitorius</i> L. ve İnflamasyon.....	29
2.3.8 <i>Corchorus olitorius</i> L. ve Oksidatif Stres.....	31
2.3.9 <i>Corchorus olitorius</i> L. ve Kanser	33
3.0 GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	35
3.1 Ekstraksiyon	35
3.2 <i>Corchorus olitorius</i> L. İçerik Analizi.....	36
3.3 Hücre Hattı ve Hücre Kültürü	36
3.3.1 Hücre Açma Protokolü	36
3.3.2 Hücreler ve Vasat Hazırlığı	36
3.3.3 Hücre Pasajlama Protokolü.....	37
3.3.4 Hücre Dondurma Protokolü.....	38
3.4 Çalışma Grupları	38
3.5 Hücre Canlılığı ve Büyüme Analizi	38
3.6 Hücre Canlılığı Testi, MTT	38

3.7 Hücre Fiksasyon Protokolü	39
3.8 Apoptoz için Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) Analizi	39
3.9 İmmunositokimya Protokolü	40
3.10 Verilerin İstatistiksel Analizi ve Yazılım Programları	41
4.0 BULGULAR	42
4.1 <i>Corchorus olitorius</i> L. İçerik Analizi	42
4.2 Hücre Canlılığı ve Sitotoksitesi	46
4.3 Hücre Morfolojisi	49
4.4 <i>Corchorus olitorius</i> L. Ekstraktlarının Colo-320 ve Colo-741 Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkileri	51
4.5 İmmunositokimyasal Değerlendirme	52
5.0 TARTIŞMA	59
6.0 SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	75
EKLER	89
TEZDEN YAPILAN YAYINLAR, POSTERLER VE SÖZEL SUNUMLAR	
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

Co	<i>Corchorus olitorius</i> L.
OH	Hidroksil grubu
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asidi
TLR4	Toll Benzeri Reseptör 4
NF-kB	Nükleer Faktör kappa B
IL	İnterlökin
APAF1	Apoptotik Proteaz Aktive edici Faktör
KJA	Klorojenik Asit
TNF α	Tümör Nekrizis Faktör alfa
COX	Siklooksigenaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
Endo-G	Endonükleaz G
NO	Nitrik oksit
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
ETC	Elektron Transport Zinciri
O ₂ ^{•-}	Süperoksit Radikali
HO [•]	Hidroksil Radikali
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
SOD	Süperoksit Dismutaz
CAT	Katalaz
GSH	Glutasyon
GSHpx	Glutasyon peroksidaz
GSSGR	Glutasyon reduktaz
KRK	Kolorektal kanser
MAPK	Mitojen ile aktive edilen protein kinazlar

EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
FGFR2	Fibroblast büyüme faktör reseptör 2
DCM	Diklorometan
FAP	Familyal Adenomatöz Polipozis
HNPCC	Kalıtsal Non-polipozis Kolorektal Kanser
APC	Adenomatöz Polipozis Coli
KZYA	Kısa zincirli yağ asitleri
TGFβ	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü
AA	Araşidonik asit
5-FU	5-Fluorourasil
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
PI3K	Fosfoinositid-3 kinaz
FADD	Fas-bağımlı ölüm domain proteini
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
IAP	Apoptoz inhibitörü proteinleri
FBS	Fetal Bovin Serum
ICAD	İnaktif kaspaz aktive edici Dnaz
PARP	Poli ADP riboz polimeraz
MTT	3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür
TNM	Tümör, Nod, Metastaz
N-3	Omega-3
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PBS	Phosphate Buffered Saline

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.6.1. PI3K/AKT yolağı.	11
Şekil 2.1.6.2. PI3K/AKT yolağının hücre proliferasyonu üzerine etkileri	11
Şekil 2.2.1. Ekstrinsik ve İnstrinsik apoptoz yolakları	15
Şekil 2.2.2.1. Kolon kansinom oluşum mekanizmaları	17
Şekil 2.3.3.1 Polifenollerin sınıflandırılması	21
Şekil 2.3.5.1 Kersetinin kimyasal formülü	24
Şekil 2.3.5.3.1. Kersetinin pro-apoptotik etkileri	26
Şekil 2.3.6.1. Klorojenik asidin kimyasal formülü	27
Şekil 2.3.6.3.1. Klorojenik asit ve anti-kanser özellikleri; Nfr2/ARE yolağı	28
Şekil 2.3.8.1. Enzimatik antioksidan sistem mekanizması ve polifenoller	32
Şekil 2.9.3.1. <i>Corchorus olitorius</i> L.'in HepG2'de apoptoz mekanizması	34
Şekil 4.1.1. <i>Corchorus olitorius</i> L. su fazı içerik analizi	44
Şekil 4.1.2. <i>Corchorus olitorius</i> L. DCM fazı içerik analizi	45
Şekil 4.2.1. <i>Corchorus olitorius</i> L. DCM ve su fazı ekstraterinin Colo-320 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri	47
Şekil 4.2.1. <i>Corchorus olitorius</i> L. DCM ve su fazı ekstraterinin Colo-741 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri	47
Şekil 4.3.1. Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinin farklı büyüklüklerde morfolojik görüntüleri	49
Şekil 4.3.2. Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinin ters mikroskoptaki görüntüleri	50
Şekil 4.4.1. <i>Corchorus olitorius</i> L. DCM ve su fazı ekstraktlarının Colo-320 ve Colo-741 hücre hatlarındaki apoptotik etkileri	52
Şekil 4.5.1. <i>Corchorus olitorius</i> L. DCM ve su fazı ekstraterinin Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde kaspaz-3 immünreaktivitesi	54
Şekil 4.5.2. <i>Corchorus olitorius</i> L. DCM ve su fazı ekstraterinin Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde sitokrom-c immünreaktivitesi	55
Şekil 4.5.3. <i>Corchorus olitorius</i> L. DCM ve su fazı ekstraterinin Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde FasL immünreaktivitesi	56

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.3.1.1. <i>Corchorus olitorius</i> L.'in besin ögesi içeriği	19
Tablo 2.3.2.1. <i>Corchorus olitorius</i> L.'in taksonomisi	20
Tablo 2.3.4.1. <i>Corchorus olitorius</i> L. içeriğindeki polifenoller	22
Tablo 4.1.1. <i>Corchorus olitorius</i> L. su fazı içerik analizi	42
Tablo 4.1.2. <i>Corchorus olitorius</i> L. DCM fazı içerik analizi	42
Tablo 4.2.1. Colo-320 hücrelerinin hücre canlılığı yüzdesi	48
Tablo 4.2.2. Colo-741 hücrelerinin hücre canlılığı yüzdesi	48
Tablo 4.4.1. <i>Corchorus olitorius</i> L. DCM ve su fazı ekstraktlarının Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde TUNEL pozitif hücrelerin yüzdesi	51
Tablo 4.5.1. <i>Corchorus olitorius</i> L. DCM ve su fazı ekstraktlarının Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde kaspaz-3, sitokrom-c ve FasL immünboyama yoğunluğu	57
Tablo 4.5.2. <i>Corchorus olitorius</i> L. DCM ve su fazı ekstraktlarının Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde kaspaz-3, sitokrom-c ve FasL immüno-etiketlemeye göre H-SKOR'u	58

1. GİRİŞ

1.1 Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam

Kolorektal kanser (KRK), kolon veya rektum bölgesinde gelişen kanser türüne verilen addır (WCRF 2018). Dünyada en fazla görülen üçüncü kanser türü olan KRK, mortalitesi en yüksek dördüncü kanserdir (GCO 2018). Kolon kanseri ise, kolon dokusunda malignant (kanser) hücrelerin oluşumu ile meydana gelen bir hastalıktır (NIH 2018). KRK en sık Avustralya ve Yeni Zelanda’da, en az ise Batı Afrika’da görülmektedir. Kadın ve erkeklerdeki görülme sıklığı birbirine yakındır (WCRF 2018). Değiştirilebilir veya değiştirilemez bazı risk faktörleri KRK oluşum ve gelişim sürecini hızlandırmaktadır. Fazla miktarda alkol tüketimi, sigara kullanımı, obezite, az posa tüketimi ve sedanter yaşam değiştirilebilir risk faktörlerine örnek gösterilebilirken, kalıtsal yatkınlık, kolonda bir santimetre (cm)’den büyük polip oluşumu, inflamatuvar barsak hastalıkları değiştirilemeyen risk faktörleri arasındadır (NIH 2018; WCRF 2018).

Corchorus olitorius Linn veya Kıbrıs Türkçesindeki ismi ile molohiya, botanikte Tiliaceae ailesinin Malvaceae cinsine ait çiçekli ve yapraklı bir bitkidir (İşeri ve diğerleri 2013, s. 766-770). Kıbrıs kültür ve mutfağında önemli bir yere sahip olan molohiya, başka ülkelerde de yetiştirmek ve o ülkelerin mutfaklarında da yer almaktadır (İşeri ve diğerleri 2013, s. 766-770). *Corchorus olitorus* L., yetiştiği bölgelerde tedavi edici özelliğinden ötürü tıbbi bir bitki olarak da bilinmektedir. Yatıştırıcı, diüretik ve laksatif etkiye sahip olduğu, ayrıca kas ve eklem ağrılarına, enterit, dizanteri ve yüksek ateşe iyi geldiği kültürel olarak söylenmektedir (Duke 1983). Yine halk arasında tümör, disüri, sistit ve gonoreye iyi geldiği belirtilmektedir (Adegoke ve Adebayo-Tayo 2009, s. 155-159). Bunlara ek yapılan çalışmalarda *Corchorus olitorius* L.’nin özellikle içeriğinde bulunan polifenollerin etkisine bağlı olarak potansiyel anti-obezite, anti-inflamatuvar, anti-oksidan ve anti-kanser etki gösterdiği saptanmıştır (Adegoke ve Adebayo-Tayo 2009, s. 155-159; Pal ve diğerleri 2006, s. 589-591; Wang ve diğerleri 2011, s. 127-133; Owoyele ve diğerleri 2015, s. 363-368; Handoussa ve diğerleri 2013, s. 1204-1216; Fukuda ve diğerleri

2016, s. 4227-4234; Li ve diğerkleri 2012, s. 9348-9360; Salawu ve diğerkleri 2011, s. 267-275).

Dünya Kanser Araştırma Fonu'nun raporuna göre 15 yıl içerisinde KKK vakaları %60 artış gösterecektir (2018). Bilim dünyası, kişi üzerinde olumsuz yan etkileri çok fazla olan kemoterapi yerine alternatif, hastaya daha az zarar verecek yöntem arayışındadır. *Corchorus olitorius* L. bitkisinin literatürde kolon kanseri üzerinde yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır ve bu araştırmanın bilime bu anlamda yenilik getireceği düşünülmüştür.

1.2. Amaç

Bu çalışmanın ana amacı, primer (Colo-320) ve metastatik (Colo-741) kolon adenokarsinom hücre hatlarında su (hidrofilik) ve diklorometan (DCM) (lipofilik) olmak üzere iki farklı *Corchorus olitorius* L. yaprak ekstraktlarının *in vitro* apoptotik indüksiyon etkilerini belirlemektir.

Çalışmanın ikinci amacı ise her iki hücre hattında da indüklenen moleküler apoptoz yolağının belirlenmesidir.

Bu çalışmada iki farklı *Corchorus olitorius* L. yaprak ekstraktının, iki farklı kolon adenokarsinom hücre hatlarındaki;

- I. Hücre canlılığına etkisi,
- II. Apoptotik etkisi ve,
- III. Apoptotik yolağın belirlenmesi değerlendirilmiştir.

1.3. Hipotez

Corchorus olitorius L. yaprak ekstraktları her iki kanser hücre hattında apoptoza sebep olacaktır. Ayrıca, doza bağlı kanser hücre canlılığını azaltacaktır. Ekstraktların farklı hücre hatlarında farklı apoptotik etkileri olacaktır. *Corchorus olitorius* L. yaprak ekstraktları, kanser hücrelerinde apoptotik etki göstereceğinden ötürü kolon kanser hücrelerinde potansiyel anti-kanser özelliğine sahip olacaktır.

Yapılan bu tez çalışması literatüre *Corchorus olitorius* L. ekstraktının kolon kanser hücre hattında yapılan ilk çalışma olarak geçecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser (KRK) erkeklerde en yaygın görülen üçüncü kanser olurken, kadınlarda ise en fazla görülen ikinci kanser türüdür. Görülen vakaların yaklaşık %55'i gelişmiş ülkelerde görülürken, Avustralya ve Yeni Zelanda kolorektal kanseri insidanslarının en sık görüldüğü ülkelerdendir (GCO 2018). Kolorektal kanser mortalite oranında da dünyada dördüncü sırada bulunmaktadır. Vaka görülme oranına zıt olarak, gelişmiş ülkelerde kolorektal kanser mortalitesinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir (GCO 2018). Bunun en önemli sebepleri olarak, gelişmiş ülkelerdeki yaygın erken tanı ve ileri tedavi yöntemleri gösterilebilir. KRK genetik ve epigenetik farklılıkların zaman içerisinde artarak normal kolonik mukozanın invazif bir kansere dönüşmesi ile gerçekleşmektedir. Çoğu KRK vakası adenokarsinomdan oluşmaktadır fakat neoplastik dönüşümün adenokarsinoma dönüşmesi 10 ile 15 yıl arasında bir zaman dilimini kapsamaktadır. Bu da dolayısı ile, erken teşhis tanının KRK için de önemli olduğunu vurgulamaktadır (Binefa 2014, s. 6786-6808).

Kolon adenokarsinoması kolon veya rektumun iç yüzeyinde, o bölgede lubrikasyonu sağlama amacı ile bulunan mukus üreten bezlerde başlayan veya oluşan kanser türüne verilen isimdir (ACS 2017). Kanser hücreleri büyür ve kolon mukozasına yayılırsa buna invazif adenokarsinoma adı verilir (ACS 2017). Kolorektal kanserlerin yaklaşık %95'i adenokarsinomalardan oluşmaktadır (WCRF 2018).

2.1.1 Kolorektal Kanser Yönetimi

KRK yönetimi; görüntüleme, evreleri tespit etme ve tedavi kısımlarını kapsamaktadır. Tedavi; operasyon, kemoterapi ve bölgesel radyoterapi olarak düşünülmektedir (Pabla ve diğerleri 2015, s. 133-141). Ulusal Kanser Enstitüsü'nün standart tedavi kılavuzuna göre tümör, nod, metastaz (TNM) sınıflandırılması kullanılmaktadır (NIH 2018). Buna göre 0-II evre KRK operasyon ile, III. evre KRK operasyon ve kemoterapi ile, IV. evrede ise metastaz olduğu için hem kolonda hem de metastaz olan bölgede operasyon ile malignant tümörün alınması, intra-arteriyal

kemoterapi ve kanser türüne ek olarak mutasyonuna yönelik hedeflenmiş tedavi ile uygulanmalıdır (NIH 2018). KRK'nden korunma, genelde düzenli görüntüleme kontrolü (gayta testi, kolonoskopi ve radyografik görüntüleme) olmaktan geçmektedir. Adenomatöz veya kolonik polipler bu yolla tespit edilebilir ve herhangi malignan bir oluşuma dönüşmeden önlem alınabilir (Pabla ve diğerleri 2015, s. 133-14; NIH 2018).

2.1.2 Kolorektal Kanser Risk Faktörleri

Bazı bireylerde daha yüksek olan kolorektal kanser riski, dört ana dala ayrılmaktadır. Bunlar; genetik mutasyonlar, çevresel faktörler, kolorektal kanser aile hikayesi ve demografik yapı olarak özetlenebilirler (Pabla ve diğerleri 2015, s. 133-141). Kolorektal kanser vakalarının %5-10'u kalıtsal mutasyona bağlı vakalardan oluşmaktadır. Bunlardan en yaygın görülenleri; Familial Adenomatöz Polipozis (FAP) ve Kalıtsal Non-polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC) veya Lynch Sendrom olarak bilinen herediter hastalıklardır (Pabla ve diğerleri 2015, s. 133-141; WCRF 2018). HNPCC, yanlış eşleşme onarım genlerinde (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*) meydana gelen bir veya birden fazla mutasyondan dolayı gelişirken, FAP ise *Adenomatöz Polipozis Coli (APC)* geninde olan mutasyonlardan dolayı gelişmektedir (Pabla ve diğerleri 2015, s. 133-141). Herediter hastalıklar kalıtsallık gösterdiğinden ve aile bireyleri aynı çevreyi paylaştığından, kolorektal kanserde, aile hikayesi ve demografik yapı da riski artıran faktörler arasına girmiştir. Kolon kanserinin gelişimi ve prognozunda yer alan çevresel risk faktörleri; radyasyon, sigara kullanımı ve beslenme alışkanlıkları olarak sıralabilir (Pabla ve diğerleri 2015, s. 133-141; WCRF 2018). Dünya Kanser Araştırmaları Fonu'nun kolorektal kanser raporuna göre işlenmiş et, alkol, vücut yağlanması ve yetişkinlik döneminde boy uzaması ikna edici kanıt seviyesinde kolorektal kanser riskini artırırken fiziksel aktivite ise kolorektal kanser riskini azalttığı bildirilmiştir (WCRF 2018).

Bunun yanı sıra, diyet posasını artırmak ise KRK riskini olası kanıt seviyesinde azalttığı bildirilmiştir (WCRF 2018). *Corchorus olitorius* L. diyet posa içeriği yüksek bir besin olarak sınıflandırılmaktadır (Abdalla ve diğerleri 2016, s. 1-10). Diyet posasının KRK üzerine potansiyel olumlu mekanizmaları arasında ise fermentasyon sırasında oluşan kısa zincirli yağ asidi (KZYA)'den bütiratın, kolonik

pH'yı düşürmesi yer alır. Aynı zamanda, bir tümör supresör proteini olarak bilinen p57 (sikline bağlı kinaz inhibitörü)'nin de translasyonunun artışı ile proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği belirlenmiştir (WCRF 2018; Guo ve diğerleri 2010 s. 1321-9). Ayrıca, barsak geçiş hızını ve fekal yükü artırıp kolon mukozası ile potansiyel karsinojen mutajenlerin ilişkisinin kesilmesine de neden olmaktadır (WCRF 2018; Pan 2017, s. 243-267). Günde avaraj olarak alınan 10 g diyet posasının KKK riskini %30'a kadar düşürdüğü belirlenmiştir (Dahm ve diğerleri 2010, s. 614-626). Batı tarzı yüksek yağlı beslenme modelinin ise proto-onkogen olan *c-myc* ve *Ras* ekspresyonlarını artırdığı dolayısı ile onkojenik etki yaratarak KKK ve diğer kanser türlerinin gelişimini hızlandırdığı bildirilmiştir (Pabla ve diğerleri 2015, s. 133-141; Wang ve diğerleri 2011, s. 57-67).

2.1.3 Kolorektal Kanserde Büyüme Faktörleri

Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) tüm epitelyal ve stromal hücrelerde bulunan ve hücre bölünmesi, apoptoz, hücre farklılaşması, migrasyon ve organojenezde rol oynayan bir reseptördür. EGFR, KKK vakalarının büyük bir çoğunluğunda artmış oranda ekprese olmuştur. EGFR'nin artışı proliferasyonu ve anjiyojenik aktiviteyi artırırken, apoptozu inhibe ettiği görülmüştür. Proliferasyonun artışı ile dönüştürücü büyüme faktörü β (Transforming Growth Factor, TGF β) de artış göstererek mitotik aktivitenin ve vasküler endotel büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) salınımının artmasına ve tümörün büyümesine neden olmaktadır (Pabla ve diğerleri 2015, s. 133-141). Ayrıca, EGFR sinyalizasyonu BRAF aracılığı ile mitojen ile aktive edilen protein kinazlar (MAPK) yolağını indükleyerek kanser hücrelerinde hücre büyümesini ve hayatta kalmayı artırmaktadır (Grady ve diğerleri 2014, s. 124-139).

Diğer taraftan, siklooksijenaz 2 (COX2) enziminin büyüme faktörlerini inflamasyon yolağını tetikleyerek artırdığı gösterilmiştir. Araşidonik asit (AA) elzem bir yağ asididir. Omega-6 yağ asidi grubuna bağlı olan AA, özellikle hayvansal kaynaklı besinlerde bulunmaktadır. AA özellikle COX2 enzimi yardımı ile pro-inflamatuvar bir sitokine dönüşebilmektedir. AA COX2'nin dönüştürmesi ile prostoglandin E₂ (PGE₂) son ürününü oluşturmaktadır. PGE₂'ler, vücutta aktif olarak

bulunan ve hormon benzeri etki gösteren lipidler olarak bilinmektedir. PGE₂ ise proliferasyonu indükleyip, immün sistemi baskılayarak ayrıca VEGF üretilmesini ve fibroblast büyüme faktörünü stimüle ederek anjiyogenezi artırdığı bildirilmiştir. KKK de ise COX2 aktivitesi ile birlikte PGE₂ seviyelerinde artış gözlemlenmektedir (Raskov ve diğerleri 2014, s. 18151-18164; Hagland ve diğerleri 2013, s. 12-25).

2.1.4 Kolorektal Kanserdeki Moleküler Mekanizmalar

KKK karsinogenezi için üç ana mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan ilki 1990 yılında Faeron ve Vogelstein'in ortaya koyduğu süpresör yolağı veya kromozomal instabilite yolağıdır. Bu yolakta bir onkogen olan *KRAS*'ın aktivasyonu ve tümör süpresör genlerinin (*APC*, *SMAD4*, *TP53*) baskılanması görülmektedir. Bu moleküler değişimler, neoplastik dönüşümlere sebep olmaktadır (Fearon ve diğeri 1990, s. 759-767; Binefa 2014, s. 6786-6808).

İkinci mekanizma aynı zamanda mutator yolağı veya mikro-satalit instabilite yolağı olarak bilinmektedir. KKK oluşumu, DNA replikasyonu sırasında meydana gelen hatalardan ve onarım genlerindeki oluşan mutasyonlardan (yanlış eşleşme onarım genlerinde) kaynaklanmaktadır. Tekrarlayan DNA fragmentlerinde (mikro-satalit) meydana gelen bu anomaliler, birçok kanser prognozunda görev alan birçok gende mutasyona neden olmakta ve tümör oluşumunu hızlandırmaktadır (Binefa 2014, s. 6786-6808).

KKK oluşumunda rol oynayan bir diğer mekanizma ise epigenetik yolağı içeren aberant hipermetilasyonu olarak bilinmektedir. Bu yolakta ise hipermetilasyon sonucu gen fonksiyonlarının değişmesi veya sessizleştirilmesi gözlemlenmektedir. Metilasyon yolağı tümörleri daha çok kadınları ve yaşlıları etkilemektedir (Binefa 2014, s. 6786-6808). Bu tümörlerin farklılaşması genelde zayıftır ve *BRAF* mutasyonu olma olasılıkları daha yüksektir. Eğer kişide metilasyon yolağı aktif ise KKK'de en önemli kemoterapi tedavi yöntemlerinden olan 5-Fluorourasil (5-FU)'ya yanıt vermemekle bilinmektedir (Binefa 2014, s. 6786-6808).

2.1.5 Kolorektal Kanserde Önemli Gen Mutasyonları

Kanser hücrelerinde *KRAS* ekspresyonu EGFR sinyalizasyonu ile artış gösterir. *KRAS* geni bir proto-onko gen olarak bilinmektedir. KRK vakalarının yaklaşık %30-50'sinde *KRAS* mutasyonu tespit edilmiştir (Raskov ve diğerleri 2014, s. 18151-64). *KRAS* mutasyonu pozitif olan KRK vakalarında guanezin trifosfataz (GTP) aktivasyonlarında farklılık görülmekte ve bununla beraber GTP'nin GDP'ye çevrimi azalmaktadır. Sonuç olarak GTP oranında artış izlenmekte ve bu durum sürekli sinyalizasyona sebep olmaktadır. (Raskov ve diğerleri 2014, s. 18151-18164).

APC KRK'de önemli rol oynayan bir tümör supresör genidir. *APC*'de meydana gelen mutasyonlar malignant dönüşümü hızlandırarak adenoma-karsinoma ilerleyişine katkı koyarlar (Raskov ve diğerleri 2014, s. 18151-18164). *APC* geninin hücre proliferasyonu, transkripsiyon ve hücre içi iletişimi sağlamak gibi birçok görevi bulunmaktadır. Bunlara ek olarak en önemli görevlerinden biri, β -katenin proteini ile birlikte Wnt-sinyalizasyon yolağının regülasyonudur (Raskov ve diğerleri 2014, s. 18151-18164). *APC* mutasyonu hem sporadik KRK'de hem de FAP'da görülmektedir. *APC* proteini kolonosit ve kaderin (kalsiyuma bağlı aderin) arasındaki birleşme yerlerindeki görevlerini sürdürmesi için gereklidir. *APC*, GSK3- β ve β -katenin ile birlikte kaderin molekülüne bağlanır. Bu bağlanma sonucunda birleşme yerlerindeki fonksiyonlar güvence altına alınır. Bu durumda sitoplazmada bulunan β -katenin miktarı düşüş gösterir. Sitoplazmadaki düşük β -katenin seviyeleri de, proliferasyonu artırıp hücre farklılaşmasını hasara uğratan ve apoptozu inhibe eden Wnt-sinyalizasyon yolağının baskılanmasına neden olur (Raskov ve diğerleri 2014, s. 18151-18164). Bunlara ek olarak *APC* mutasyonu, tümör başlatıcı faktörler ve sitokinler COX2 seviyelerini artırarak inflamasyon sürecinin başlamasına ve ayrıca neoplaziye neden olur. Dolayısı ile, hem Wnt-sinyalizasyon yolağı ile hem de EGF aktivitesini artırarak hücre proliferasyonu ile KRK adenomadan karsinomaya geçişini hızlandırmaktadır (Raskov ve diğerleri 2014, s. 18151-18164; Grady ve diğerleri 2014, s. 124-139; Hagland ve diğerleri 2013, s. 12-25).

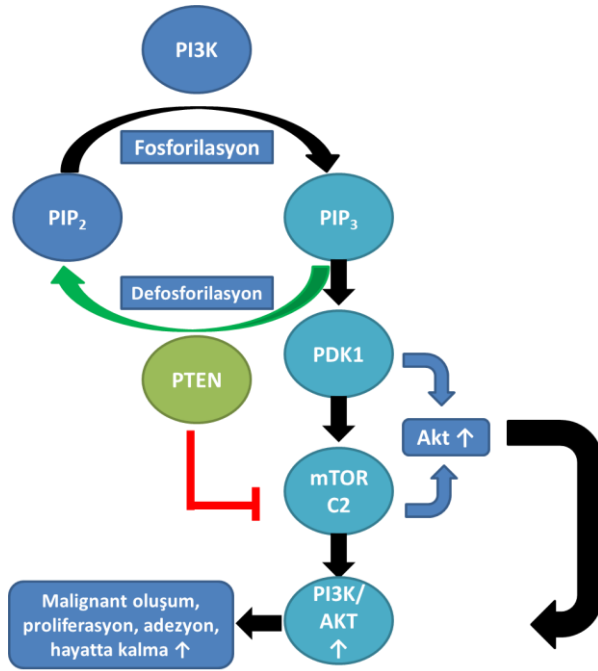
Bir tümör supresör geni olan *p53* KRK'de de olmak üzere birçok kanser türünde mutasyona uğramıştır (Li ve diğerleri 2015, s. 84-93; Grady ve diğerleri 2014, s. 124-139). Adenomadan malignant karsinomaya dönüşümünü *p53*

mutasyonlarının artırdığı bilinmektedir (Grady ve diğerleri 2014, s. 124-139; Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526). p53'ün apoptoza ek olarak hücre siklusu arresti ve senesense de neden olabileceği, bu işlemleri, özellikle hücre moleküler stres etmenleri ile başa çıkabilmek için yaptığı düşünülmektedir (Li ve diğerleri 2015, s. 84-93). Hücre siklusu arrestini, siklin kinaza bağlı hücre siklusu inhibitörü p21 aktivitesini artırarak başarmaktadır (Li ve diğerleri 2015, s. 84-93; Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526). Fakat, en önemli kemo-protetif etkisini ise hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptozu indükleyerek gerçekleştirmektedir. p53 pro-apoptotik Bcl-2 ilişkili X protein (Bax)'ı aktive ederek apoptozu indüklerken, anti-apoptotik B hücre lemfoma 2 (Bcl-2)'yi de baskılamaktadır (Li ve diğerleri 2015, s. 84-93). Bunların yanı sıra, p53 ölüm reseptörlerini de aktive ederek mutasyonlu hücrelerin apoptoza sürüklenmesini sağlamaktadır (Li ve diğerleri 2015, s. 84-93). p53 mutasyonlarına ek olarak mikroRNA (miRNA)'larda p53 regülasyonundan sorumludurlar. MiRNA 125, p53 seviyelerini azaltıp onkogen gibi görev yaparken miRNA 34 ailesi ise p53 aktive ederek Wnt-sinyalizasyon yolağını baskılayarak anti-proliferatif ve proapoptotik etkiler göstermektedir (Li ve diğerleri 2015, s. 84-93).

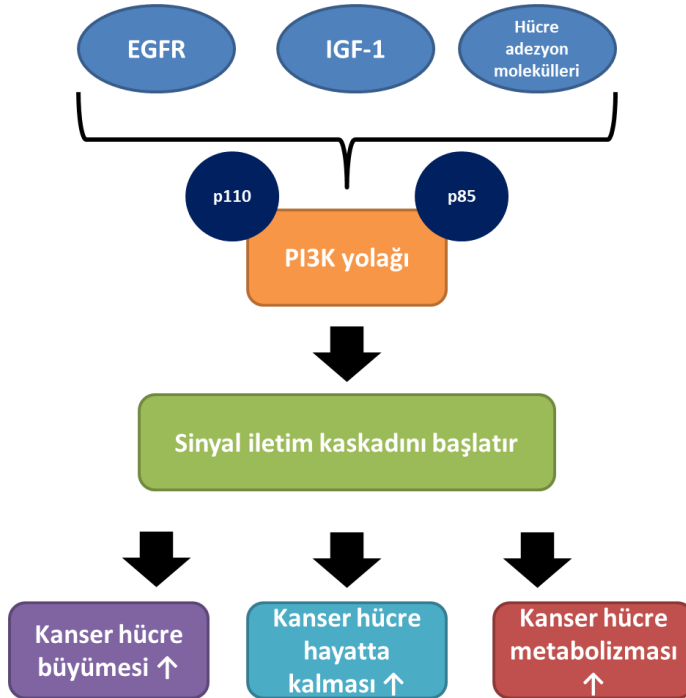
2.1.6 mTOR & PI3K/Akt Yolakları

Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (The mammalian/mechanistic target of rapamycin, mTOR) hücre büyümesini ve proliferasyonunu düzenleyen bir sinyalizasyon yolağı olarak bilinmektedir (Wang ve Zhang 2014, s. 4178-4188). mTOR fosfoinositid-3 kinaz (PI3K) ile ilgili kinaz ailesine bağlı serin/treonin protein kinazıdır (Laplane ve Sabatini 2012, s. 274-293). mTOR hücre içerisindeki anabolik olay dizinlerini, çevredeki besin öğelerinin ve büyüme faktörlerinin yardımı ile indükler (Wang ve Zhang 2014, s. 4178-4188). mTOR belirli proteinlerle iletişim ve etkileşime girerek iki farklı kompleks oluşturur. Bunlar mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve mTOR kompleks 2 (mTORC2)'dir (Wang ve Zhang 2014, s. 4178-4188; Laplane ve Sabatini 2012, s. 274-293). Raptor ve PRAS40 gibi proteinler mTORC1'e özgüken, rictor, mSin1 ve Protor1/2 mTORC2'ye aittirler (Wang ve Zhang 2014, s. 4178-4188). mTORC1 ana düzenleyicileri S6K1 ve 4E-BP1 ile birlikte protein ve nükleotid sentezine, de novo lipojenez ve hücresel metabolizmanın artmasına sebep olup ATP üretimini de artırmaktadır (Wang ve

Zhang 2014, s. 4178-4188). mTORC2 ise protein kinaz B (PKB), GSK1 ve PKC α 'yı fosforlayarak, hücrelerin hayatta kalmasını, metabolizmasını ve sitoskeletal organizasyonu artırmaktadır (Wang ve Zhang 2014, s. 4178-4188). Ras aktivasyonu, p53 mutasyonu, PI3K yolağının indüklenmesi ve Wnt yolağındaki bozulmalar, mTOR aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu durum ise kanser hücrelerinde proliferasyonu artırmakta, ayrıca apoptozun inhibe olmasını sağlamaktadır (Wang ve Zhang 2014, s. 4178-4188). mTOR, VEGF ve EGF inhibitörleri kolon kanser tedavisinde kullanılan bazı araçlar olarak bilinmektedir (Wang ve Zhang 2014, s. 4178-4188; Pandurangan 2013, s. 2201-2205). Anabolik sinyaller, örneğin insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), hücrelerin kullanabileceği herhangi bir besin ögesi PI3K yolağını aktive eder. Bu yolağın aktive olması PIP₃ üzerinden mTORC2'nin aktive olmasına, ve dolayısı ile hücrenin proliferasyonuna, büyümesine ve hayatta kalmasına yardımcı olur (Wang ve Zhang 2014, s. 4178-88; Laplante ve Sabatini 2012, s. 274-93). PIP₂'nin PIP₃'e fosforile olmasını sağlayan yolakta, PIP₃ mTORC2'nin aktive olmasına sebep olmaktadır. PTEN ise PIP₃'ü defosforile ederek, PIP₂'ye dönüşünü sağlamakta ve mTORC2'nin baskılanmasına yani hücre proliferasyonunun ve büyümesinin azalmasına neden olmaktadır (Wang ve Zhang 2014, s. 4178-4188) (Şekil 2.1.6.2). Bunlara ek olarak p53 de PTEN'in transkripsiyonunu artırarak hücre proliferasyonunu baskılamaktadır. Böylece PTEN'de mTOR ve PI3K yolağını sekteye uğrattığından, kolorektal kanser hücrelerinde tümör supresör olarak görev alır (Wang ve Zhang 2014, s. 4178-4188; Laplante ve Sabatini 2012, s. 274-293).



Şekil 2.1.6.1. PI3K/AKT yolağı (Wang ve Zhang 2014, s. 4178-4188; Laplante ve Sabatini 2012, s. 274-293)



Şekil 2.1.6.2. PI3K/AKT yolağının kanser hücre proliferasyonu üzerine etkileri (Pandurangan 2013, s. 2201-2205)

2.1.7 Kolorektal Kanser ve Metastaz

Metastatik kolorektal kanser hücreleri, diğer kanser hücreleri gibi ilk etapta malinant transformasyona uğramalıdır. Gelişen ve biriken mutasyonlar sonucu, proliferasyon ve immortalizasyonu, invazyon ve metastaz takip eder. Bu aşamadaki en önemli faktörlerden biri, epitel-mezenkimal geçiştir. Epitel hücrelerin, mezenkimal fenotip kazandığı bu evrede, sitoskeleton yapıları değişir, çevrelerindeki hücrelerle bağları zayıflar ve apikal-bazal polariteleri kaybolur. Bu değişimler, hücrelerin çevrelerindeki başka doku grubundan olan hücreleri, genelde vasküler ve lenfatik sistem hücreleri, invaze etmesine yardımcı bulunur. Sonuç olarak metastatik kaskadın başlangıcı olan, malignant kanser hücrelerinin, dolaşım yoluna girişi tamamlanır. Daha sonra, genelde karaciğer, akciğer ve beyne metastaz yine metastatik kolon kanser hücrelerinin, ulaştıkları dokudaki hücreleri invaze etmesi sonucu gerçekleşir (Vu ve Datta 2017, s. Epub).

2.2 Apoptoz

Apoptoz, normal hücrelerin ve kanser hücrelerinin kaderinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Hücrelerimiz dışarıdan gelen veya hücre içerisindeki belirli sinyallere göre organizmayı koruma amaçlı apoptoza girmektedir. Apoptoz Yunan kökenli bir kelimedir ve bir yaprağın ağacın dalından düşmesi gibi “düşmek/dökülmek” anlamına gelmektedir. Özellikle çok hücreli sistemler için elzemdir (Albert ve diğerleri 2015, s. 1021; Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526; Stoian ve diğerleri 2014, s. 160-164). Eğer hücre herhangi bir sorun veya hasar ile karşı karşıya kalırsa sisteme, yani organizmaya, daha fazla zarar vermemek adına apoptoza, programlı hücre ölümüne girer.

Apoptoz spontane gelişen bir olay değil tam aksine organizmal sistemi korumak için oluşan koruyucu, kalite kontrolü yapan ve programlı bir yoldur (Albert ve diğerleri 2015, s. 1021). Apoptoz, bozulmuş, malignant dönüşüme yatkınlığı olan, DNA hasarı olan hücrelerden kurtulmayı amaçlamakta ve dolayısı ile organizmayı kanserden ve kimerizmden korumaktadır (Albert ve diğerleri 2015, s. 1021; Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526). Apoptoza giren hücreler bazı morfolojik değişiklikler gösterirler. Örneğin hücre büzülür ve yoğunlaşır, ayrıca hücre iskeleti

dağılır, kromatin kondense olur ve DNA parçalara ayrılır. Bu parçalanma sonucu ortaya çıkan hücreye apoptotik cisimler adı verilir (Albert ve diğerleri 2015, s. 1021).

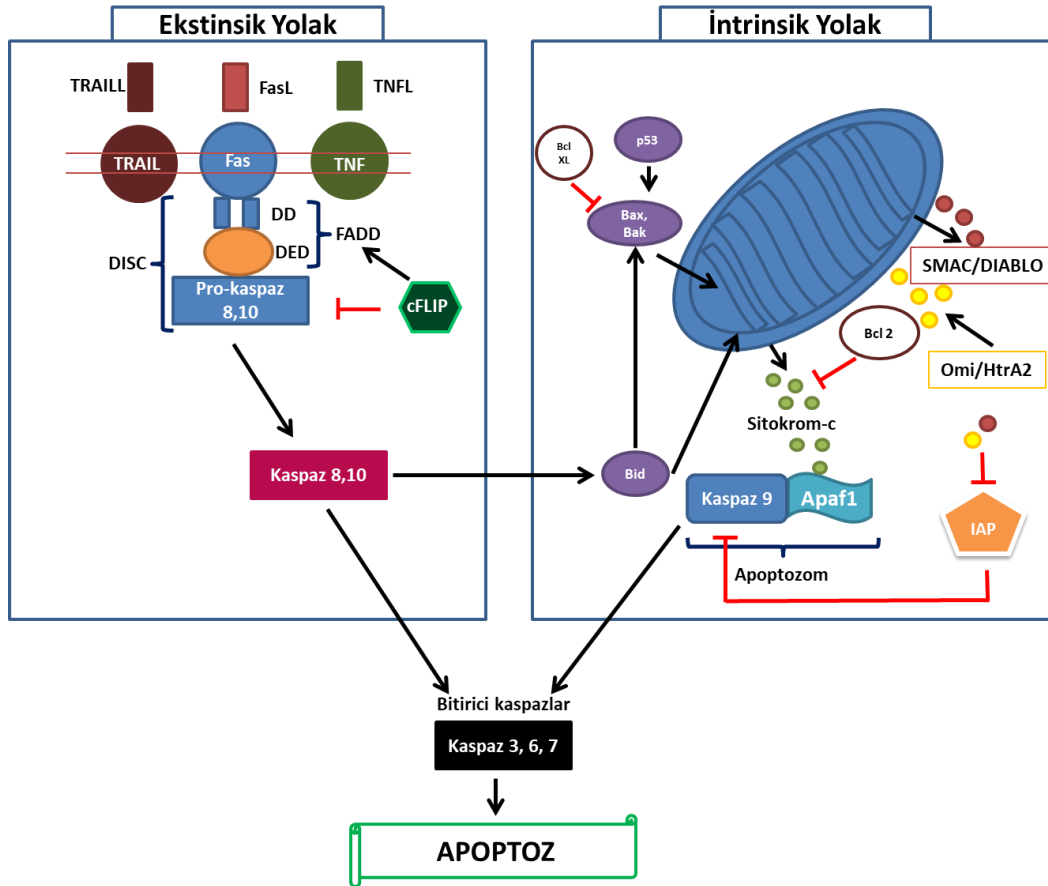
Apoptoz, hücre içi proteazlarının aktive olması ile tetiklenen bir yoldur. Bu özel proteazlara kaspaz adı verilmektedir. Kaspazlar öncü ve bitirici olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Öncü kaspazlar apoptozu başlatırken aynı zamanda bitirici kaspazları da tetiklemektedir. Ayrıca, bir öncü kaspazın aktif olması, proteolitik bir kaspaz kaskadına neden olmakta ve birden fazla bitirici kaspazı tetikleyebilmektedir (Albert ve diğerleri 2015, s. 1023).

Apoptozda iki ana yolak mevcuttur. Bunlar; ekstrinsik (ölüm reseptörü) ve intrinsik (mitokondriyel) yolak olarak bilinmektedir. Ekstrinsik yolak, ölüm reseptörleri aracılığı ile aktive edilir. Ölüm reseptörleri hücre membranında bulunan ve ekstraselüler altbirimine ligand bağlanan yeri mevcutken, hücre içinde ise apoptozu indükleyici ölüm altbirimi mevcut olan reseptörlerdir. Bu reseptörler tümör nekrozis faktör (TNF) ailesine bağlıdır ve TNF ile ilişkili apoptoz-uyarıcı ligand tedavisi (TRAIL), Fas ve TNF ekstrinsik yolağın başlamasına neden olan reseptörlerdir (Albert ve diğerleri 2015, s. 1024; Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526). Fas ligand (FasL)'ın Fas'a bağlanması ile Fas-bağımlı ölüm domain proteini (Fas-associated death domain, FADD) öncü kaspaz olan kaspaz 8'e bağlanarak ölüm indükleyici sinyal kompleksini (Death-inducing signalling complex, DISC) oluştururlar. DISC içerisinde aktive olan kaspaz 8 daha sonra bitirici kaspazları aktive eder (Albert ve diğerleri 2015, s. 1024; Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526).

İntrinsik veya mitokondriyel yolak ise hücre içi bir strese (DNA hasarı) yanıt amaçlı indüklenmektedir. İntrinsik yolakta elektron transport zincirine ait önemli bir protein olan sitokrom-c kilit rol oynamaktadır. Sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya geçişi ile birlikte Apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf1)'e bağlanmaktadır. Bunun sonucunda ise Apaf1, ATP ve pro-kaspaz 9, apoptozom denilen bir kompleks oluşturmakta ve pro-kaspaz 9 aktive olmaktadır. Aktive olmuş kaspaz 9, bitirici kaspazları aktive ederek apoptozu indüklemektedir (Albert ve diğerleri 2015, s. 1025; Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526). Ayrıca sitokrom-c salınımı diğer; SMAC/Diablo, Omi/HtrA2, endonükleaz ve apoptoz-indükleyici

faktör (AIF) gibi pro-apoptotik proteinleri de aktive eder. Bu aktivasyon sonucunda apoptoz inhibitörü proteinleri (IAP) baskılanır (Zhang ve Yu 2013, s. Epub).

İntrinsik yolakta apoptozu düzenleyici belirli proteinler mevcuttur. Bu proteinlerin esas görevi apoptozun gerçekten gerekli olduğu zamanda yapılmasını sağlamak ve spontane bir olay olmasını önlemektir. Bunlar Bcl2 ailesine ait proteinlerdir (Albert ve diğerleri 2015, s. 1026; Cairrao ve Domingos 2010, s. 1-8). Bcl2 proteinlerinin görevi mitokondriyal dış membran permeabilitesini düzenlemektir (Cairrao ve Domingos 2010, s. 1-8). Bcl2 proteinleri anti-apoptotik ve pro-apoptotik olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Bcl2 ve BclXL anti-apoptotik (apoptozu önleyici) proteinlerken Bak ve Bax pro-apoptotik (apoptozu indükleyici) proteinler olarak bilinmektedir (Cairrao ve Domingos 2010, s. 1-8). Bu proteinlere ek olarak bulunan BH-3 proteinleri ise herhangi bir apoptotik sinyale karşılık hücre içerisinde üretilen veya aktive edilen pro-apoptotik proteinlerdir. BH-3'ün pro-apoptotik özelliğini anti-apoptotik Bcl2'yi baskılayarak veya inhibe ederek elde ettiği düşünülmektedir. Bid, BH-3 proteinlerine örnek gösterilebilir (Albert ve diğerleri 2015, s. 1026; Cairrao ve Domingos 2010, s. 1-8). Bid proteini iki yolak arasında bulunan neredeyse tek ortak proteindir. Pro-kaspaz 8'in aktive olması ile birlikte Bid de aktive olur ve mitokondrinin dış bölümüne geçerek burada anti-apoptotik proteinleri (Bcl2) inhibe ederek apoptotik etkiyi artırır (Albert ve diğerleri 2015, s. 1027-1028).



Şekil 2.2.1. Ekstinsik ve intrinsik apoptoz yolları (Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526; Khan ve diğerleri 2016, s. Epub)

2.2.1 Kolon Kanserinde Apoptozun Önemi

Kolon kanserinin gelişmesinde apoptoz mekanizmasının tam işleyememesinin veya sekteye uğramasının moleküler önemi vardır. Kolon kanserinde, yenilenen hücre sayısı ile ölen hücre sayısı arasında bir dengesizlik söz konusudur. Bu dengesizlik proliferasyon artışı ile açıklanabilir (Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526). Hücre zaman içerisinde, mutasyonlar sonucu oluşan tehlikeli olan sinyallere, apoptoz ile cevap veremez ve bu malignant dönüşümlerin oluşmasına neden olur (Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526). KRK oluşumunda proliferasyon gerektiğinden fazla gerçekleşmekteyken, apoptoz ise daha az gerçekleşmektedir.

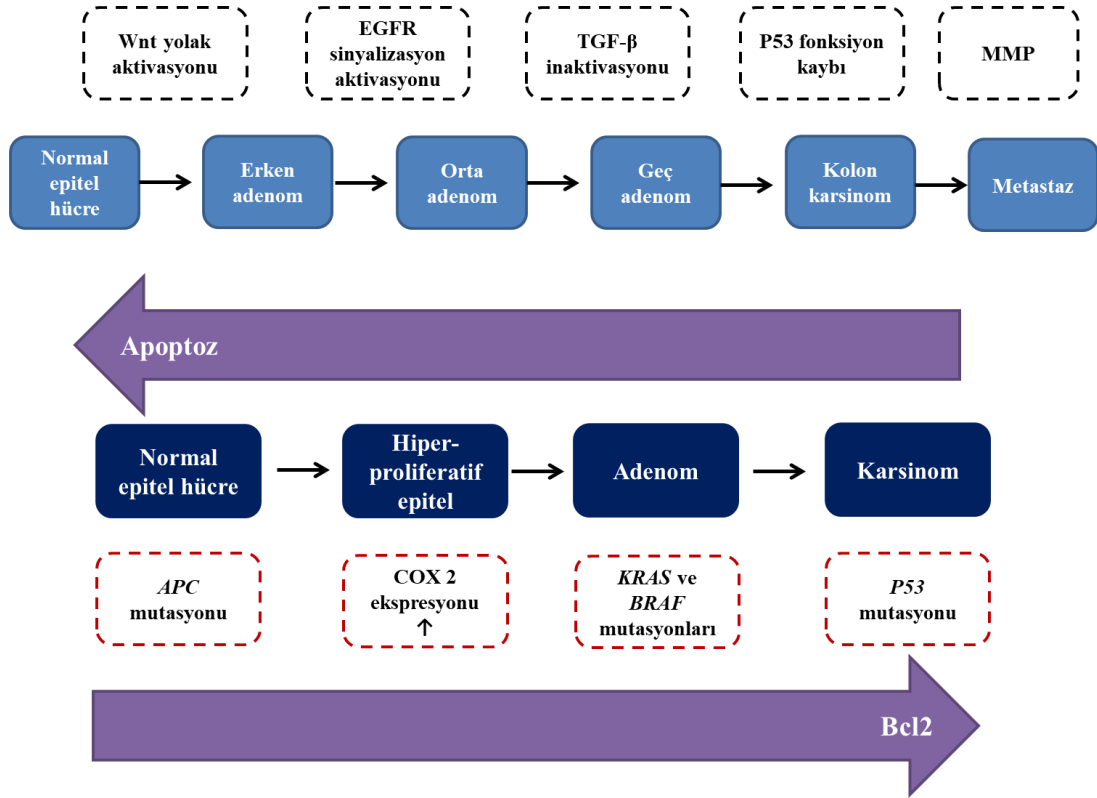
2.2.2 Kolon Kanserinde Apoptoz İnhibisyonu

Kolon kanserinin oluşması için kolonda bulunan kriptlerin öncelikle polibe dönüşmesi, daha sonra adenoma ve kanser hücreleri içeren adenoma dönüşmesi gerekmektedir. Daha sonra, adenokarsinoma dönüşümünün gerçekleşmesi kolon kanser oluşumunda gözlenir (Yang ve diğerleri 2009, s. 225-233). Hücrelerimizde gelişen bazı mekanizmalar sonucu anti-apoptotik etkiler meydana gelir. Bunlardan ilki APC’de meydana gelen mutasyonlardan dolayı sitoplazmada β -katenin yolağının aktive olması ve artan proliferatif ekspresyondur. Bu durum apoptozu baskımların kanser hücrelerinde proliferasyonu artırır. Özellikle KRK erken dönemlerinde *Bcl2* ekspresyonundan dolayı apoptoz inhibe olur. Ayrıca *Bax* ekspresyonu azalır.

Bunlara ek olarak *p53* “guardian of genome, genom gardiyanı” olarak bilinen gende meydana gelen mutasyonlar, apoptozu inhibe eder ve kanser hücrelerinin proliferasyonunu artırır (Yang ve diğerleri 2009, 225-233; Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526). COX2 ve PGE₂ birikimi ise *Bcl2* seviyelerini artırırken, *Bak* ve *Bax* salınımını azaltır ve dolayısı ile pro-apoptotik yolak inhibe edilir.

Normalde bir tümör supresör olarak görev alan TGF β ise, KRK hastalarının yaklaşık %30’unda mutasyona uğramıştır. Mutasyonun önlenmesi ekstrinsik yolağı uyarıp pro-apoptotik etki gösterebilmektedir. İnflamasyon göstergesi olan nükleer faktör κ B (NF κ B)’nın artışı ise yine apoptozu inhibe ederken inhibisyonu TRAIL yolağı aracılığı ile apoptozu indükleyebilme ihtimali tartışılmaktadır (Yang ve diğerleri 2009, 225-233; Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526).

Yukarıda bahsedilen tüm olası yolaklar kolon kanserinde apoptoz sisteminin bozulmasından kaynaklı bir gelişime ve malignant dönüşüm hızını artırmaya yardımcı olmaktadır. Özetlemek gerekirse; apoptoz çok hücreli sistemleri olası hasardan ve malignant dönüşümden koruyan önemli ve kompleks bir işlemdir.



Şekil 2.2.2.1. Kolon karsinom oluşum mekanizmaları (Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-26; Alam ve diğerleri 2018, s. Epub)

2.3 *Corchorus olitorus* L.

2.3.1 *Corchorus olitorus* L. Bitkisi ve Besin Ögesi İçeriği

Corchorus olitorus L., içerdiği polifenollerden dolayı KRK' hücrelerindeki inhibe olmuş apoptoz yollarının inhibisyonunu ortadan kaldıracı olduğu düşünülmektedir. Yaklaşık 50-60 *Corchorus* türünden bir tanesi olan *Corchorus olitorius* L., diğer yandaş türleri gibi yüksek oranda posa içermesi ile bilinir (IJS 2003). *Corchorus* türleri genelde ılık bölgelerde, tropik ve sub-tropik iklimlerde yetişmektedirler ama genelde izlerine en fazla Doğu ve Güney Afrika'da rastlanır (IJS 2003). *Corchorus olitorius* L. bitkisinin kökenlerinin Kuzey Avustralya ve Afrika olduğu bilinmekte, Hindistan ve Çin'e Mısır ve Suriye yolundan göç ettiği düşünülmektedir (IJS 2003). İlkbaharın sonlarını yaza bağlayan ve yaz dönemlerinde yetişen bu bitki, çok hızlı uzamakta ve eğer hasat edilmezse 3,5 m boyuna kadar ulaşabilmektedir (FAO 2015; PFAF 2015). Genelde Ağustos ayından

Ekim ayına kadar çiçeklidir. Çiçekleri açık sarı ve hermafrodit olup böcekler tarafından polen transferi yapılmaktadır. Yetişmek için nemli bir toprağa ve güneşli bir iklime ihtiyaç duymaktadır (PFAF 2015). Çok fazla dallanabilen *Corchorus olitorius* L., genel olarak 90-120 cm ulaştığında hasat edilmektedir. Yaprakları 6-10 cm uzunluğunda ve 3-5 cm genişliğindedir (Duke 1983). Genel olarak yaprakları taze veya kurutulmuş olarak tüketilir. Daha taze olan yapraklar salatalarda, kurutulmuşlar ise genelde çorbalarda kıvam artırıcı olarak kullanılabilirler (PFAF 2015).

Gövdesinde fazla miktarda selüloz ve lignin bulunur. Bu posa ürünleri çeşitli kimyasal yöntemler ile *Corchorus olitorus* L.'nin gövdesinden ayrılmakta ve tekstil sektöründe sıklıkla kullanılmaktadır. Pamuktan sonra doğal posası en kullanışlı bitki olarak adlandırılmakta, posasından çıkarılan ipliklerinden doğal elbiseler dikilmekte veya doğada yok olabilen alışveriş poşetleri üretilmektedir (FAO 2015; IJSG 2003). Özellikle Hindistan ve Bangladeş'te önemli bir ticari ürün olup, biyolojik olarak doğada parçalanabilir özellikliğinden kaynaklı ihracatta büyük rol oynamaktadır (FAO 2015; IJSG 2003).

Tablo 2.3.1.1 *Corchorus olitorius* L.'in besin ögesi içeriği (USDA 2015)

Besin Ögesi	Birim	Miktar/100 g
Su	g	87,72
Enerji	kcal/kJ	34/142
Protein	g	4,65
Total Lipit	g	0,25
Karbonhidrat	g	5,80
Kül	g	1,58
Kalsiyum	mg	208
Demir	mg	4,76
Magnezyum	mg	64
Fosfor	mg	83
Potasyum	mg	559
Sodyum	mg	8
Çinko	mg	0,79
Bakır	mg	0,255
Manganez	mg	0,123
Selenyum	µg	0,9
C vitamini	mg	37
Tiamin	mg	0,133
Riboflavin	mg	0,546
Niasin	mg	1,260
B ₆ vitamini	mg	0,600
Folat	µg	123
A vitamini (RE)	µg	278

2.3.2 *Corchorus olitorius* L. Taksonomisi

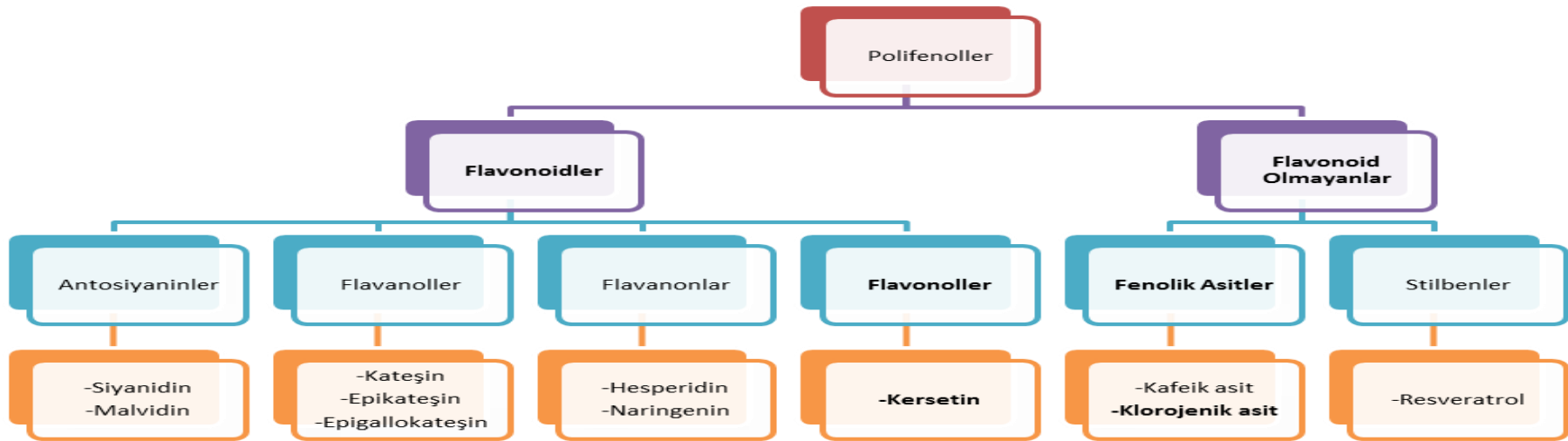
Tablo 2.3.2.1 *Corchorus olitorius* L.'in taksonomisi (Islam 2013, s. 35-44)

Sıralama	Bilimsel isim	Halk arasındaki ismi
Alem	Plantae	Bitki
Alt alem	Tracheobionta	Damarlı bitkiler
Üst şube	Spermatophyta	Tohum bitkisi
Şube	Magnoliophyte	Çiçekli bitkiler
Sınıf	Magnoliopsida	İki çenekli bitki
Alt sınıf	Dilleniidae	
Takım	Malvales	
Familya	Tiliaceae	İhlamur ağacı familyası
Cins	<i>Corchorus</i> L.	<i>Corchorus</i>
Tür	<i>Corchorus olitorius</i> L. <i>Corchorus capsularis</i> L.	Yeşil molohiya Beyaz molohiya
İngilizce ismi		Jute/Jew's Mallow
Türkçe ismi		Molohiya/mulihya/molehiya

2.3.3 *Corchorus olitorius* L. ve Polifenoller

Polifenoller fitokimyasalların içinde en büyük grup olup, bitkilerin içerisinde bulunurlar. Polifenollerden zengin diyetlerin sağlık üzerinde pozitif etkileri görüldüğünden, son yıllarda beslenme alanında çalışan kişilerin dikkatini çekmiş ve polifenoller üzerine yapılan araştırmaların sıklığında bir artış saptanmıştır (Tsao 2010, s. 1231-1246). Polifenoller çeşitli alt gruplara ayrılırlar. Farklı fenolik bileşenlerin sağlık üzerine farklı etkileri görülmektedir (Tsao 2010, s. 1231-1246).

Yapılan birçok araştırmada *Corchorus olitorius* L.'in polifenollerden zengin olduğu bildirilmiştir (Obob ve diğerleri 2009, s. 124-134; Wang ve diğerleri 2011, s. 127-133; Handoussa ve diğerleri 2013, s. 1204-1216; Adegoke ve Adebayo-Tayo 2009, s. 155-159). Bazı çalışmalar polifenollerini sadece mevcuttur (pozitif) olarak bildirmiş, (Adegoke ve Adebayo-Tayo 2009, s. 155-159) bazı araştırmalarda ise daha detaylı analizler sonucunda *Corchorus olitorius* L.'de bulunan polifenollerin hangileri olduğunu ve miktarlarını da açıklanmıştır (Handoussa ve diğerleri 2013, s. 1204-1216; Azuma ve diğerleri 1999, s. 3963-3966).



Şekil 2.3.3.1 Polifenollerin sınıflandırılması (Tsao 2010, s. 1231-1246).

2.3.4 *Corchorus olitorius* L. ve İçeriğindeki Fenolik Bileşikler

Azuma ve diğerlerinin yaptığı çalışmada (1999, s.3963-3966) *Corchorus olitorius* L.'in 100 gramında en fazla bulunan fenolik bileşiğin 5-kafeoil-kinik asit olduğu, buna ek olarak yedi antioksidan özelliği gösteren bileşiğin de *Corchorus olitorius* L. içeriğinde bulunduğu bildirilmiştir (Tablo 2.3.4.1).

Tablo 2.3.4.1 *Corchorus olitorius* L. içeriğindeki polifenoller (Azuma ve diğerleri 1999, s. 3963-3966)

Bileşen	Miktarı (mg/100g, taze bitki ağırlığında)
5-kafeoil-kinik asit	384 ± 20
3,5-dikafeoil-kinik asit	102 ± 8
Kersetin 3-galaktozit	53 ± 5
Kersetin 3-glukozit	377 ± 3
Kersetin 3-(6-malonilglukozit)	126 ± 10
Kersetin 3-(6-malonilgalaktozit)	16 ± 1
Askorbik asit	256 ± 15
Alfa-tokoferol	14 ± 1

Corchorus olitorius L., yukarıda ismi geçen antioksidan bileşenleri bol miktarda içermektedir. Örneğin Türkomp'un yaptığı araştırmalarda askorbik asitten en yüksek besinin yaklaşık olarak 189 mg/100 g'da ile maydanoz olduğu bildirilmiştir (Türkomp, 2018). Fakat Azuma ve diğerlerinin araştırmasında ise *Corchorus olitorius* L.'in neredeyse maydanozun 1,35 katı daha fazla askorbik asit içerdiği ve bundan dolayı antioksidan özelliğinin çok yüksek olabileceği söylenmektedir (Azuma ve diğerleri 1999, s. 3963-3966). Yine aynı şekilde Amerika Tarım Bakanlığı kersetin içeriği çok yüksek gösterdiği *Capparis spinosa* ile *Corchorus olitorius* L. kıyaslandığında, *Corchorus olitorius* L.'in kersetin içeriğinin *Capparis spinosa*'dan ortalama olarak 100 g'da 143 mg daha fazla olduğu gösterilmiştir (Bhagwat ve diğerleri 2011).

Handoussa ve diğerlerinin analizinde ise (2013, s. 1204-1216) *Corchorus olitorius* L.'in içeriğinde kinik asit ve kafeoil-kinik asit türevlerine rastlanırken, Azuma ve diğerlerinin (1999, s. 3963-3966) yaptığı çalışmada olduğu gibi kersetinin alt gruplarının da *Corchorus olitorius* L.'in fenolik bileşiklerinden olduğu bildirilmiştir (Handoussa ve diğerleri 2013, s. 1204-1216). Tüm bunlara ek olarak,

yine kersetin türevlerinden hiperozide de rastlanmıştır (Salawu 2011, s. 267-275). Ayrıca, *Corchorus olitorius* L. içeriğinde kersetin, kafeoil-kinik asit ve mirisidine de rastlanmış, fakat yıkama işlemine tabi tutulan *Corchorus olitorius* L. yapraklarının toplam fenolik içeriğinin daha düşük olduğu belirlenmiştir (Yan ve diğerleri 2013, s. 1008-1014). Dolayısı ile, *Corchorus olitorius* L. yapraklarının çok uzun süreli yıkama işlemine tutulmaması gerekmektedir. Bu işlem fenolik bileşen kaybına neden olabilir ve az miktarda bulunan bu bileşiklerin sağlık üzerine olumlu etkileri azalış gösterebilir.

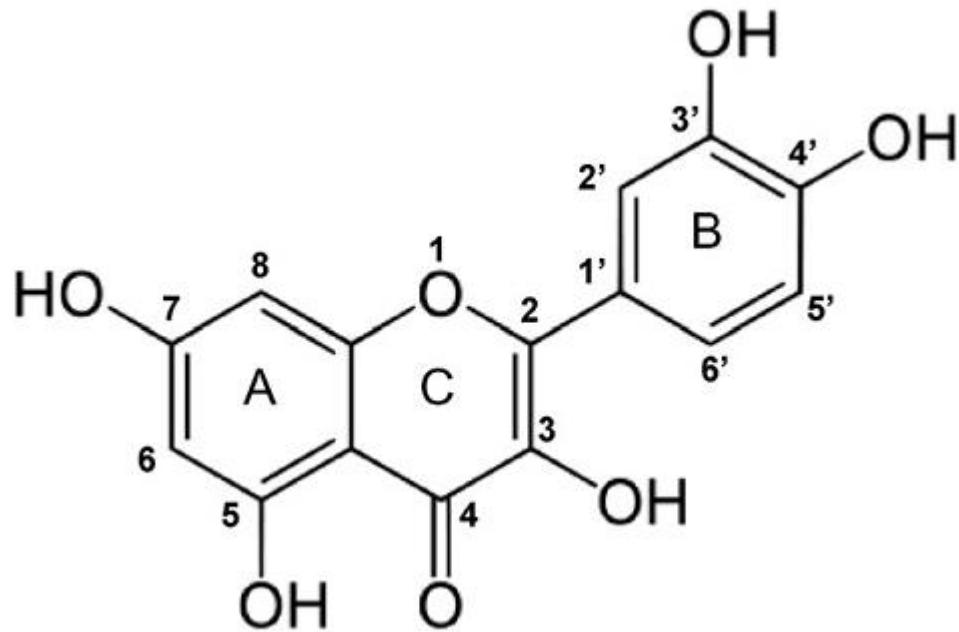
Corchorus olitorius L.'in ayrıca omega-3 (n-3) yağ asitlerinden de zengin olduğu, içeriğinde bulunan yağın %40'ını n-3 yağ asitlerinin oluşturduğu bildirilmiştir. N-3 yağ asitleri anti-inflamatuvar, anti-trombotik ve kardiyoprotektif olarak bilinmektedir (Mahmoud ve diğerleri 2016, s. Epub). Bunlara ek olarak zeytinyağında da bulunan oleanolik asidin de aynı zamanda içeriğinde bulunduğu ve anti-inflamatuvar etki gösterdiği, ayrıca lökositlerin adezyonunu önleyerek olası bir ateroskleroz durumunu önleyebileceği bildirilmiştir. *Corchorus olitorius* L.'in β -sitosterol içerdiği, β -sitosterolün de kanser hücrelerindeki büyüme faktörlerini inhibe ederek proliferasyonu azalttığı tespit edilmiştir (Ragasa ve diğerleri 2016, s. 2085-2089).

Corchorus olitorius L. karotenoidler bakımından da zengindir. Bu gruptan özellikle β -karoten ve luteinden zengin olan bu bitkinin toplam karotenoid içeriği, pişirme tekniklerine göre farklılık göstermekte, özellikle içeriğinde bulunan çift bağlardan dolayı oksijen ile temasa geçildiğinde toplam karotenoid içeriğinin azaldığı bildirilmiştir (Steiner-Asiedu 2014, s. 2064-2067).

2.3.5 Kersetin

Polifenollerin flavonol ailesine ait olan kersetin, güçlü antioksidan özellikleriyle bilinmektedir. Kersetin sarı renkte, suda, asetik asit ve alkali solüsyonlarda çözünebilen bir maddedir. Heterosiklik iki benzen halkası ile piron halkasının oluşturduğu bir flavon çekirdeği mevcuttur. Kersetin glikozit, kersetinin bitkilerde en fazla bulunan formudur fakat konjuge formu daha kolay absorbe olabilir (Darband ve diğerleri 2018, s. 6544-6560). Özellikle olgunlaşmış üzüm

meyvelerde, kırmızı ve beyaz soğanda bulunan kersetin, kersetin 3-glukozit alt sınıfı olarak *Corchorus olitorius* L.'in 100 gramında yaklaşık olarak 400 mg kadar bulunmaktadır (Rani ve diğerleri 2015, s. Epub; Azuma ve diğerleri 1999, s. 3963-3966). Kersetin, egzersiz ve sigara kullanımı sonucunda ortaya çıkan Reaktif Oksijen Türleri (ROS)'nin temizlenmesinde güçlü antioksidan özellikleri göstermesinden ötürü vücudu zararlı ajanlardan koruyucu özelliği ile de bilim dünyasının ilgisini çekmektedir (D'Andrea 2015, s. 256-271). Bu antioksidan etkileri ise kimyasal yapısından, yer değiştirme özelliğinden ve hidroksil grubunun varlığından dolayı gerçekleştirebildiği belirtilmiştir (Darband ve diğerleri 2018, 6544-6560).



Şekil 2.3.5.1. Kersetinin kimyasal formülü

2.3.5.1 Kersetin ve Antioksidan Özellikleri

Bir bileşiğin antioksidan özelliği içerisinde bulunan hidroksil (OH) gruplarının ve çift bağlarının pozisyonlarına bağlıdır (Rani ve diğerleri 2015, s. Epub). Kersetin de bu özelliklere uyduğundan dolayı yüksek bir serbest radikal temizleme özelliğine sahip fenolik bileşiktir (D'Andrea 2015, s. 256-271). Kersetin, lipoksigenaz izoenzim aktivitesini inhibe ederek Poli Unsature Yağ Asitlerinin (PUFA) deoksijenasyonunu engellemektedir. Bundan dolayı da hidroperoksi asitlerin oluşumu önlenir ve inflamasyonun önüne geçilmesi ihtimalini yükseltilmektedir (Rani ve diğerleri 2015, s. Epub). Lipid peroksidasyonunu önleme özelliği yanı sıra

kersetinin, antioksidan enzimlerin bileşğinde önemli rol oynayan glutatyon (GSH) seviyesinin de artışı ile antioksidan özellikler gösterebileceği üzerinde durulmuştur (Rani ve diğerleri 2015, s. Epub; D'Andrea 2015, s. 256-271).

2.3.5.2 Kersetin ve Anti-inflamatuvar Özellikleri

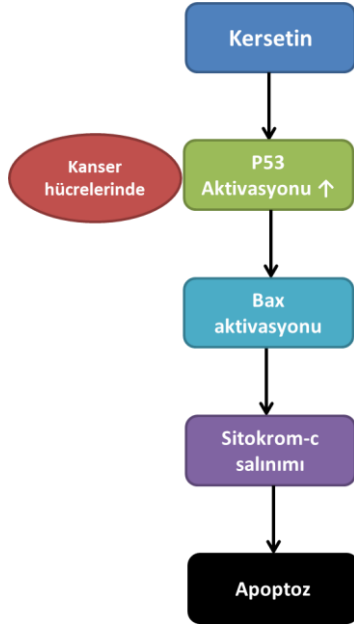
ROS'un vücuttaki aşırı birikiminden dolayı inflamasyon markerleri artış gösterebilir. Kersetin yukarıda bahsedildiği üzere antioksidan özellikler gösterdiği için inflamasyonu; dolaylı yoldan ROS üretimini veya verdiği hasarı azaltarak gösterebilmektedir (D'Andrea 2015, s. 256-271). Buna ek olarak inflamasyon faktörlerinin immün hücrelerindeki Toll benzeri reseptör (TLR4)'e bağlanması sonucunda NF-kB'nin aktifleşmesi tetiklenmektedir. Bu aktifleşme IL-6'nın transkripsiyonel seviyedeki aktivasyonuna ve IL-6 salgılanmasına neden olur. Bu olaylar vücudun inflamasyona verdi tepki olarak görülmektedir (Rani ve diğerleri 2015, s. Epub). Kersetinin ise IL-6 salgılanmasını transkripsiyon seviyesinde düşürdüğü, yine aynı şekilde NF-kB yolağını da baskılayarak anti-inflamatuvar bir etki gösterildiği Rani ve diğerleri tarafından tartışılmıştır (2015, s. Epub). Ayrıca kersetinin, COX2 ekspresyonunu azaltarak ve NFkB'nin DNA'ya bağlanmasını inhibe ederek inflamasyonu önlediği ve anti-inflamatuvar etki yarattığı belirtilmiştir (Darband ve diğerleri 2018, s. 6544-6560).

2.3.5.3 Kersetin ve Anti-kanser/Pro-Apoptotik Özellikleri

Kersetinin pro-apoptik özelliğinin, kanseri önlemede önemli bir rol aldığı düşünülmektedir. Bunu birkaç mekanizma ile gerçekleştirdiği, bunlardan ilkinin ise Bcl-2 protein (onkogen) ailesine ait olan ve pro-apoptotik etki gösteren Bax ve Bak proteinleriyle yaptığı öne sürülmüştür (Rani ve diğerleri 2015, s. Epub).

Bunun yanı sıra kersetin, p38/MAPK –strese yanıt veren kinazlar-aktivasyonunu stimüle eder. Ayrıca, hücre içi kalsiyum seviyelerini artırarak mitokondriyel membrandan sitokrom-c salınımını sağlar ve bitirici kaspazları indükler, bu da apoptoza neden olur (Rani ve diğerleri 2015, s. Epub; Darband ve diğerleri 2018, s. 6544-6560). Bunlara ek olarak, TRAIL aracılı apoptozun indüklenmesine sebep olarak hem intrinsik hem de ekstrinsik yoldan apoptozun başlamasına katkıda bulunur. Ayrıca, β -katenin transkripsiyonunu azaltarak, hücre

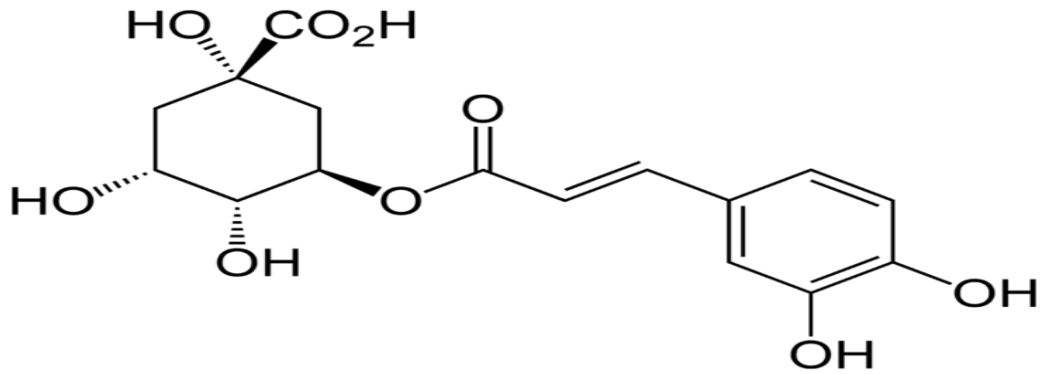
proliferasyonunu artıran Wnt/ β -katenin yolağını baskılayarak kanser hücrelerinde anti-proliferatif etki gösterir. (Darband ve diğerleri 2018, s. 6544-6560; Khan ve diğerleri 2016, s. Epub).



Şekil 2.3.5.3.1. Kersetinin pro-apoptotik etkileri (Alam ve diğerleri 2018, s. Epub)

2.3.6 Klorojenik Asit

Kahvenin içerisinde bulunan polifenol bir bileşik olan klorojenik asit (KJA), özellikle kafeinsiz kahvenin sağlık üzerine olumlu etkilerini ortaya çıkaran özelliği ile bilinmektedir (Butt ve Sultan 2011, s. 363-373). Antioksidan özellikleri oldukça yüksek olan bu bileşiğin, Çin’de alternatif tıp alanında kullanılan birçok bitkinin içerisinde bulunduğu da görülmüştür (Li ve diğerleri 2014, s. 12940-12948). Klorojenik asidin ana alt-sınıfları kafeoil-kinik asit, ferulol-kinik asit ve dikafeoil-kinik asitten oluşmaktadır (Zhao ve diğerleri 2012, s. 370-374). Tablo 2.3.4.1’de görüldüğü üzere *Corchorus olitorius* L.’de en fazla görülen KJA alt-sınıfları kafeoil-ve dikafeoil-kinik asittir. İnsanlarda en büyük tüketim kaynağının kahve olan KJA, yaklaşık 200 ml kahve tüketildiğinde, kahvenin cinsine göre 70 ile 300 mg arasında KJA alımının sağlandığı görülmektedir (Zhao ve diğerleri 2012, s. 370-374). 100 g ağırlığındaki *Corchorus olitorius* L.’in ise özellikle kafeoil-kinik asit içeriği açısından nerdeyse kahveden daha zengin olduğu görülmüştür (Azuma ve diğerleri 1999, s. 3963-3966).



Şekil 1.3.6.1 Klorojenik asidin kimyasal formülü

2.3.6.1 Klorojenik Asit ve Antioksidan Özellikleri

KJA ve antioksidan özelliği hidrojen atomunu her hangi bir serbest radikale bağışlayabilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu bağışlama sonucu zincirleme oksidasyon reaksiyonlarının önüne geçilip, serbest radikallerin hücreye daha fazla zarar vermesini önlenmektedir (Liang ve Kitts 2015, s. E-16). KJA bu işlemde sonra fenoksil radikale dönüşür ama bunun hemen akabinde rezonans – bir molekül içerisinde yer değiştirmiş ve bağları Lewis formülü ile gösterilemeyen elektronlara verilen isim- stabilizasyonu gerçekleşir ve böylece eski halini alır (Liang ve Kitts 2015, s. E-16). KJA aynı zamanda insan kolon kanseri hücrelerinde ROS üretimini indükleyerek pro-oksidan mekanizmasını başlatır. Bunun sonucunda apoptoz indüklenerek kolon kanser hücrelerinde canlılığı azalttığı bildirilmiştir (Hou ve diğerleri 2017, s. 59-65).

Yaklaşık 8 haftalık KJA tüketimi NADPH oksidaz enzimine bağlı super oksit üretimini azalttığı bildirilmiştir (Suzuki ve diğerleri 2006, s. 2317-2322; Zhao ve diğerleri 2012, s. 370-374). Bunun yanı sıra, diğer bir mekanizmada ise JAK/STAT sinyal kaskadını ve Ras/Raf-1/ERK1/2 yolağını kısmen bloke ederek hücre içi süper oksit üretimini inhibe ettiği de bildirilmiştir (Zhao ve diğerleri 2012, s. 370-374).

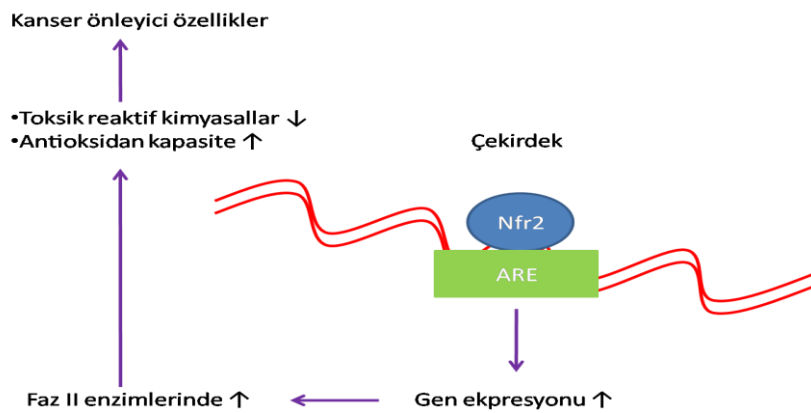
2.3.6.2 Klorojenik Asit ve Anti-inflamatuvar Özellikleri

KJA birçok farklı yolla güçlü anti-inflamatuvar etki göstermiştir. Bu etkilerden ilki, pro-inflamatuvar sitokinlerinden olan IL-8 ve IL-6 salgılanmasını

azaltmış olmasıdır. Bir diğeri ise IL-6, IL-1 β ve TNF- α seviyelerinde NF-kB yolağıını inhibe ederek azalış göstermesidir. Üçüncü ve bir diğeri önemli etkisi ise COX aktivitesini düşürerek eikosanoid sentezini önlemesidir. KJA, COX2 ekspresyonunu azaltarak NF-kB yolağıına ek olarak JNK/AP-1 sinyalizasyonunu da azaltmış ve pro-inflamatuvar etkilerin daha az görülmesine neden olmuştur (Liang ve Kitts 2015, s. E-16). Bunlara ek olarak KJA, hücrel antioksidan enzimlerini artırarak, ROS seviyelerinin azalmasına bağlı NFkB ve MAPK aktivasyonunun baskılanmasına neden olmakta ve anti-inflamatuvar etki göstermektedir (Hou ve diğeri 2017, s. 59-65).

2.3.6.3 Klorojenik Asit ve Anti-kanser Özellikleri

KJA, ilk olarak faz I enzimlerinin (oksidasyona neden olan enzimler) aktivite ve ekspresyonunun inhibisyonunu sağlayarak, vücutta olabilecek olası oksidasyon hasarını azaltmaktadır. Bunun yanı sıra faz II enzimlerini indükleyerek (antioksidan enzimleri) Nfr2/ARE sinyal yollarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Nfr2/ARE yolağı oksidasyona karşı endojen bir savunma mekanizması oluşturup oksidatif hasarı ve kimyasal stresi düşürücü özellik göstermektedir (Butt ve Sultan 2011, s. 363-373). Bunlara ek olarak hepatosellüler kanser hücrelerinde KJA'nın, fazla ROS üretilmesine karşı ERK1/2 yolağıını inhibe ettiği görülmüştür (Yan ve diğeri 2015, s. 540-546) (Şekil 2.3.6.3.1). Bu inhibasyon sonucunda kanser hücre proliferasyonu ve büyümesinde azalma görülmektedir (Hou ve diğeri 2017, s. 59-65).



Şekil 2.3.6.3.1. Klorojenik asit ve anti-kanser özellikleri; Nfr2/ARE yolağı (Yan ve diğeri 2015, s. 540-546).

2.3.6.5 Klorojenik Asit ve Pro-Apoptotik Özellikleri

Lösemi üzerine yapılan in vitro çalışmalarda ise KJA'nın apoptotik özelliklerine rastlandığı görülmüştür (Liu ve diğerleri 2013, s. 1106-1110; Yang ve diğerleri 2009, s. 225-233). Liu ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, KJA'nın hücre apoptozisini indüklediği, bunu da Bad'ın güçlü bir kinazı olan Akt ekspresyonunu azaltarak yaptığı görülmüştür (Liu ve diğerleri 2013, s. 1106-1110).

KJA kanser hücrelerinde proliferasyonu ve anti-apoptotik proteinleri azaltarak aynı zamanda da Bax ve Bak gibi pro-apoptotik proteinleri salınımını artırarak, kaspaz-3 aktivitesini tetiklemekte ve kanser gelişimini baskılamaktadır (Yamagata ve diğerleri 2018, s. 9-19). A549 akciğer kanser hücrelerinde KJA, *Bax* gen ekspresyonunu artırırken, *Bcl2* gen ekspresyonunu da baskılamaktadır. Ayrıca kanser kök hücre gen ekspresyonunu da baskılayarak olası metastazı önleyebileceği ve kanser kök hücrelerin eliminasyonuna neden olabileceği bildirilmiştir (Yamagata ve diğerleri 2018, s. 9-19). Bununla beraber, hücre siklusunda, özellikle S-faz ve G0/G1fazında arrest yaptığı ve dolayısı ile hücre büyümesini durdurarak, anti-proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Hou ve diğerleri 2017, s. 59-65; Murad ve diğerleri 2015, s. 532-542).

2.3.7 *Corchorus olitorius* L. ve İnflamasyon

İnflamasyon vücuttaki bir hasara immün sisteminin verdiği bir cevap olarak görülmektedir. Bu yaralanma veya hasar biyolojik, kimyasal veya çevresel olabilir. Hasarın sonucunda vücut sitokinler, TNF- α ve IL-1 β gibi inflamatuvar mediyatörlerini lökosit, monosit ve makrofajlardan salgılamaya başlar. Owoyele ve diğerlerinin ratlar üzerine yaptığı araştırmada *Corchorus olitorius* L. kök ekstraktının anti-inflamatuvar etkilerine rastlanmıştır. Carrageenan infüzyonunun yol açtığı akut inflamasyonun göstergesi olan ödem, *Corchorus olitorius* L. kök ekstaktı azalmıştır (Owoyele ve diğerleri 2015, s. 363-368). Yazarlar bu anti-inflamatuvar etkinin mekanizmal olarak incelemesini yapmasalar da; ortak görüş olarak *Corchorus olitorius* L.'in içerisindeki alkaloid ve saponinlerin immünoprotektif özelliklerinden kaynaklı NFkB, NO, COX, ROS üretiminin inhibesine yol açtığı düşünülmektedir (Owoyele ve diğerleri 2015, s. 363-368).

Vasküler geçirgenlik akut inflamasyonun ana öğelerinden biri olup, inflamasyonda artış göstermektedir. *Corchorus olitorius* L. ekstraktının anti-inflamatuvar etkilerinden bir tanesinin de vasküler geçirgenliği inhibe ederek, akut inflamasyonu bu şekilde azaltmasından kaynaklandığı ileri sürüldü (Handoussa ve diğerleri 2013, s. 1204-1216). Bunun yanı sıra *Corchorus olitorius* L.'in içerisinde bulunan KJA ve alt-sınıflarının da mast hücrelerinden histamin salgılanmasını azaltmasından ötürü de anti-inflamatuvar etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir (Handoussa ve diğerleri 2013, s. 1204-1216).

Corchorus olitorius L. içeriğinde bulunan polifenollerin de anti-inflamatuvar etkisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Owoyele ve diğerleri 2015, s. 363-368; Handoussa ve diğerleri 2013, s. 1204-1216). Örneğin kersetinin, hemoksigenaz 1 protein seviyelerini artırıp kronik inflamasyonu antagonize etmekte ve ayrıca pro-inflamatuvar etkiye sahip miRNA-155'i azaltmaktadır (Boesch-Saadatmandi ve diğerleri 2011, s. 293-299). Bunun yanı sıra, *Corchorus olitorius* L. GSH seviyelerinde artışa neden olduğu veya oksidatif stres seviyelerini düşürerek GSH seviyesinin azalmamasını sağlamasından dolayı inflamasyonu inhibe ettiği düşünülmektedir. Ayrıca bitkinin yüksek miktarda kersetin içermesinden ötürü COX1-2'nin inhibasyonuna, bunun sonucunda ise inflamasyonda önemli rol oynayan prostoglandin E₂'nin seviyelerinin azalmasında etmen olduğu bildirilmiştir (O'Leary ve diğerleri 2004, s. 245-254; Yan ve diğerleri 2013, s. 1008-1014). *Corchorus olitorius* L. ekstraktının süperoksit dismutaz (SOD) seviyelerinde referans ilaç olan indometazinden daha fazla artıcı özelliği bulunmuş, bu da *Corchorus olitorius* L. serbest radikalleri yok etmede referans ilaçtan daha fazla etkisi olduğunu göstermiştir (Handoussa ve diğerleri 2013, s. 1204-1216).

Corchorus olitorius L.'in içerisinde bulunan adenin maddesinin vazodilatör ve nöroprotektif etkisi bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca, adeninin inflamatuvar barsak hastalıkları (İBH) olan bireylerde intestinal hücrelerde fazla salgılanan ve inflamasyona yol açan pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını azalttığı gözlemlenmiştir. Bunu ise TNF α salınımını baskımlarken, aynı zamanda JNK ve NFkB yollarının da inhibe olmasını sağlayarak bir pro-inflamatuvar sitokin olan IL-8 salınımını azaltarak yaptığı bildirilmiştir. Dolaylı yoldan da olsa *Corchorus*

olitorius L.'in İBH hastalığında olası bir anti-inflamatuvar tedavisinde kullanılabileceği öngörülmüştür (Fukuda ve diğerleri 2016, s. 4227-4234).

2.3.8 *Corchorus olitorius* L. ve Oksidatif Stres

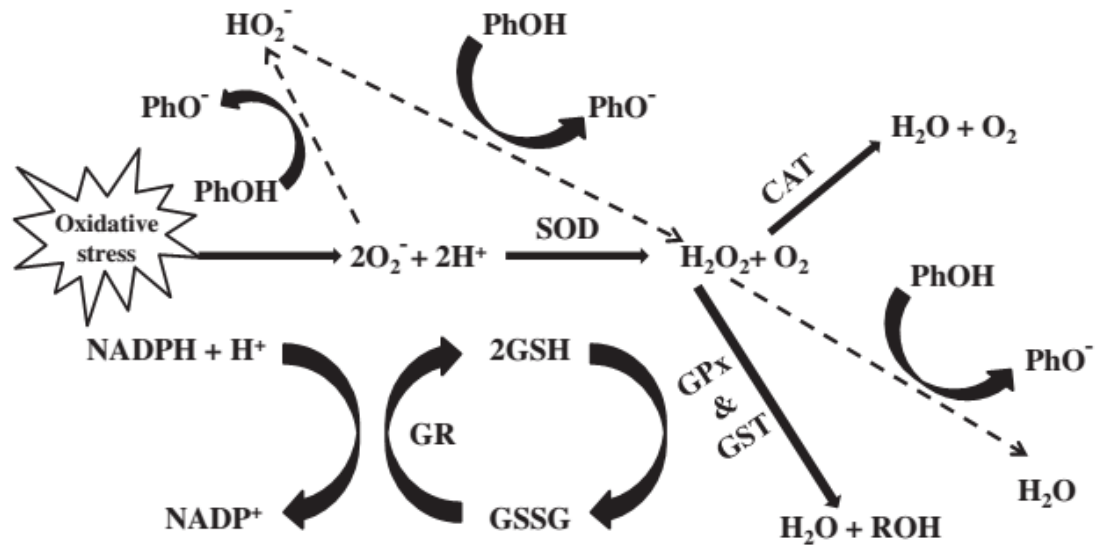
ROS, çoğu zaman serbest radikaller ile birlikte anılmakta ve aynı anlamda kullanılmaktadır. Ökaryotik hücrelerde ROS oluşumunun %90'ı mitokondride gerçekleşmektedir. Elektron taşıma zinciri (ETC) sırasında özellikle Koenzim Q bölümünden kaçan elektronlar, moleküler oksijen ile reaksiyona girerek süperoksit anyonunu ($O_2^{\cdot-}$) oluşturmaktadır. $O_2^{\cdot-}$ daha sonraları enzimatik reaksiyonlara girerek hidrojen peroksidi (H_2O_2) ve hidroksil radikalini ($HO^{\cdot}$) oluşturmaktadır. $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve $HO^{\cdot}$ kimyasal olarak oksijenden daha aktif olduklarından dolayı reaktif oksijen türleri olarak bilinmektedir (Lushchak 2014, s. Epub)

Oksidatif stres istikrarlı bir şekilde olan ROS konsantrasyonunun zaman içerisinde veya kronik olarak artışından kaynaklı olarak hücresel metabolizmaya, regülasyonuna ve bileşenlerine zarar vermesine denir (Lushchak 2011, s. 13-30). Vücut mekanizması ROS üretimini ve eliminasyonunu çok sıkı bir dengede tutarak oksidatif stresi önlemeye programlanmıştır. Vücuttaki fizyolojik değişiklik durumunda ise bu dengenin bozulduğu görülebilir. Söz konusu değişikliklerden bazıları; ekzojen ve endojen bileşiklerin otooksidasyona uğraması, antioksidan seviyelerindeki azalış, antioksidan enzimlerinin inaktivasyonu ve antioksidanların ve antioksidan enzimlerin üretimindeki düşüştür (Lushchak 2014, s. e-pub).

Vücudumuzda birçok antioksidan enzim bulunmaktadır. Bu enzimler (SOD, katalaz [CAT], glutatyon peroksidaz [GSHpx] ve glutatyon reduktaz [GSSGR]) vücudumuzdaki oksidatif strese karşı koruma geliştirmekte ve serbest radikallere elektron bağışlayarak zincir reaksiyonları durdurmaktadırlar (Marrazzo ve diğerleri 2014, s. 1599-1616). Bu endojen enzimlerin yanı sıra diyetle aldığımız antioksidanların vücudumuzdaki oksidatif stresle savaştığı görülmüştür. Diyetle aldığımız başlıca antioksidanlar, bitkilerdeki pigmentler (polifenoller ve biyoflavonoidler), vitaminler (C, E ve β -karoten) ve enzimlerde görev alan mikro besin öğeleridir (Selenyum, bakır, çinko). Bu antioksidanların hepsinin farklı serbest radikalleri veya ROS yok etme özelliği vardır. Dolayısı ile tüm bu antioksidanlardan

dengeli ve karışık bir diyetle birlikte tüketilmesi gerekmektedir (Marrazzo ve diğerleri 2014, s. 1599-1616).

Yukarıda açıklandığı üzere *Corchorus olitorius* L.'in içerisinde bulunan birçok polifenolün antioksidan özelliğine bağlı olarak, serbest radikalleri temizleme gücüne sahip olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.3.8.1) (Dawanjee ve diğerleri 2013a, s. 78-91; Yan ve diğerleri 2013, s. 1008-1014).



Şekil 2.3.8.1. Enzimatik antioksidan sistem mekanizması ve polifenollerin mekanistik olarak katkısı (Dawanjee ve diğerleri 2013b, s. 188-198).

Yapılan araştırmalarda, *Corchorus olitorius* L. laboratuvar ortamında yaratılan oksidatif stresi azaltmada önemli bir etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir (Dawanjee ve diğerleri, 2013a, s. 78-91; Dawanjee ve diğerleri 2013b, s. 188-198). Bu etkiyi yukarıda bahsedilen SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin seviyelerini anlamlı bir şekilde artırarak yapmıştır. Bunlara ek olarak, DPPH radikal temizleme testinde de, serbest radikalleri temizlemede önemli bir aşama kaydetmiş ve oksidatif stresin azalmasında rol oynamıştır (Boye ve diğerleri 2014, s. 2395-2406). Ayrıca, serbest radikal temizleme özelliğinden ötürü oksidatif stresi azaltıp, lipid peroksidasyonunun bir yan ürünü olan TBARS'ın seviyelerinde azalışa neden olmaktadır (Dawanjee ve diğerleri 2013b, s. 188-198). *Corchorus olitorius* L.'nin metanol ekstraktı da ağır metale bağlı ROS birikimini, oksidatif stresi ve DNA

hasarını önleyerek kromozomal instabiliteyi baskılamaktadır. Kromozomal instabilite *APC* ve *p53* gibi tümör suprasör genlerini baskılayarak kanser oluşumuna katkıda bulunur (Akinwumi ve diğerleri 2016, s. 457-465). *Corchorus olitorius* L.'nin, içerisindeki yüksek polifenol bileşenler sayesinde bu özelliğe sahip olduğu düşünülmektedir (Dawanjee ve diğerleri, 2013a, s. 78-91; Dawanjee ve diğerleri 2013b, s. 188-198).

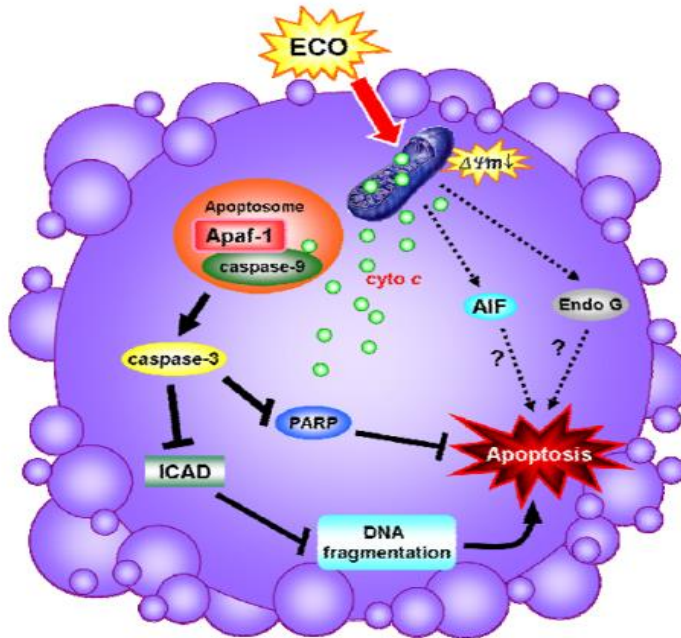
2.3.9 *Corchorus olitorius* L. ve Kanser

Bilim dünyasında uzun zamandır, bitkilerin anti-kanser etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Bitki özlü bazı bileşenlerin de anti-kanser ilacı olarak kullanıldığı bilinmektedir (İşeri ve diğerleri 2013, s. 766-770). *Corchorus olitorius* L.'in, kanser üzerindeki olumsuz etkileri birkaç kanser türü üzerinde incelenmiştir. Bunlardan biri lösemi kanser hücreleri olan ARH-77 ve bir diğeri de hepatosellüler kanser hücreleri olan HepG2'dir (İşeri ve diğerleri 2013, s. 766-770; Li ve diğerleri 2012, s. 9348-9360). ARH-77 hücre kültürü üzerinde yapılan araştırmada, *Corchorus olitorius* L.'in kanser hücrelerinde sitotoksik etkilerine rastlanmıştır. Bunun yanı sıra aynı hücre kültürlerinde yapılan çalışmada genotoksisitede DNA fragmentasyonuna bakılmış ve *Corchorus olitorius* L.'in DNA fragmentasyonunu artırdığı yani kanser hücre apoptozuna katkıda bulunduğu görülmüştür (İşeri ve diğerleri 2013, s. 766-770). Yazarların bu konuda mekanizma olarak ön görüşü *Corchorus olitorius* L.'in yüksek anti-oksidan aktivitesinin aynı zamanda pro-oksidan etki de gösterebileceği yönündedir (İşeri ve diğerleri 2013, s. 766-770).

Bunun yanı sıra Li ve diğerlerinin yaptığı araştırma da ise intrinsik yolak sonucunda *Corchorus olitorius* L.'in HepG2 hücrelerinde apoptoza neden olduğu görülmüştür (Şekil 2.3.9.2) (Li ve diğerleri 2012, s. 9348-9360). *Corchorus olitorius* L. ekstraktı kafeoil-kinik asit ve kersetinden zengin olduğu için HepG2 hücrelerinde peroksil radikal tarafından indüklenmiş oksidasyonu azaltmıştır. Aynı zamanda büyüme faktörlerini baskılayarak HepG2 hücrelerinde proliferasyonu azalttığı, kanser hücrelerinde pro-oksidan etki yaratarak apoptozu indükleyebileceği belirtilmiştir (Salawu ve diğerleri 2011, s. 267-275).

Ağır metaller hücrelerde oksidatif stresle birlikte DNA hasarına neden olmaktadır. DNA hasarı ise kromozal instabiliteyi tetiklemektedir. Kromozal instabilite ise vücudumuzda koruma mekanizması olarak bulunan tümör supresör genlerinde mutasyonların artmasına ve bu artışla birlikte normal hücrelerin malignan hücrelere dönüşmesine neden olmaktadır (Binefa 2014, s. 6786-6808; Akinwimu 2016, s. 457-465). *Corchorus olitorius* L. içerisinde bulunan polifenollerin güçlü antioksidan özelliği, oksidatif strese bağlı DNA hasarını azaltarak, kromozal instabiliteyi baskılayabileceği, dolayısı ile kanser hücrelerinde potansiyel olumlu etkileri olduğu düşünülmektedir (Akinwimu 2016, s. 457-465).

Corchorus olitorius L. içeriğinde tespit edilen diğer bileşenlerden olan fitol ve monogalaktozil diaçilgliserol Epstein-Bar virüsü tarafından indüklenen tümöre karşı inhibe edici etki göstererek, anti-tümör özelliği göstermiştir (Furumoto ve diğerleri 2002, s. 239-243). Buna ek olarak *Corchorus olitorius* L. içerisinde bulunan kaffeol kuinik asit ve kurkumin türevleri de aynı etki göstermiştir. Bu bileşiklerin fibroblast büyüme faktör reseptör 2 (FGFR2) ve epidermal büyüme faktör reseptörlerini (EGFR) baskılayarak olası potansiyel anti-tümör etkiler göstermektedir (Taiwo ve diğerleri 2016, s. 3404-3410).



Şekil 2.9.3.1 *Corchorus olitorius* L.'in HepG2'de apoptozis mekanizması (Li ve diğerleri 2012, s. 9348-9360).

3.0 GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Ekstraksiyon

Corchorus olitorius L. 2016 Temmuz ayında Girne bölgesinden toplanmış, yaprakları ayıklanmış ve etüvde kurutulmuştur. Toplanan bitki örneği 6904 Herbaryum numarasıyla Yakın Doğu Üniversitesi Herbaryumu'na kayıt edilmiştir. Kurutulmuş ve -80°C'de saklanmış 126 gram *Corchorus olitorius* L. yaprakları elle parçalandıktan sonra Waring Commercial blenderde toz haline getirilmiştir. Toplam kullanılan blenderize, kurutulmuş yaprak miktarı 100 gram olarak hassas tartıda ölçülerek tespit edilmiştir. 100 gram *Corchorus olitorius* L. yaprakları %80 etanol (%96 etil alkol, Aklar Kimya) ve %20 distile su ile 1 litre solüsyon haline getirilmiş ve plastik bir kapta gece boyunca ara ara karıştırılarak bekletilmiştir. Huninin içindeki filtre distile su ile doyurulmuş, ve huninin içinden basınçla süzülme işlemi gerçekleştirilmiştir. Kavanozun içindeki posa 250 ml distile su ve etanol ile yıkanmıştır. Alınan tüm süzüntü bir balona aktarılmış, ve balon BUCHI marka döner evaporatöre bağlanmıştır. 175 mbar basınç, 40°C ve 4,5 devirde etanol uçurulmuştur. Kalan ekstre huniden tekrar süzölmüştür. Dibe çöken lipofilik kısmına distile diklorometan eklenip bir gece beklemeye bırakılmıştır (DCM fazı) ve ayırma hunisi ile lipofilik maddeleri ayırmak için ekstre edilmiştir (x3). Konsantre edilmiş su fazı kısmı ayrılmıştır, ve toplam 200 ml olarak kayıt altına alınmıştır. Su fazı, döner evaporatörde 72 mbar basınç, 45°C ve 4 devirde uçurulmaya başlanmış, yarısı uçurulduğunda ise balon ağzı kapalı bir şekilde -80°C de şok dondurmaya bırakılmıştır. Donduktan sonra alınan su fazı Christ Alpha 1-4 LD Plus liyofiliz makinasına bağlanmış, ana kurutma programında 2 gün liyofilize makinasında bekletilmiştir. Distile diklorometan, DCM, fazı döner evaporatörde 72 mbar basınç, 50°C ve 6 devirde uçurulmuş daha sonra kalsiyum klorürlü desikatöre, nemini çekmesi için alınmıştır. Su fazı ekstreleri liyofiliz makinasından alınmış, ve içerisindeki net miktarlar hassas tartıda ölçölmüştür. DCM fazı da spatöl yardımı ile toplanmış ve hassas tartıda net miktarlar ölçölmüştür. Su fazı için toplam verim 14,8251 gram/ 100 g olurken, DCM fazı toplam verim 3,69 gram/ 100 g olarak tespit edilmiştir.

3.2 *Corchorus olitorius* L. İçerik Analizi

LC-MS/MS analizi Absciex 3200 Q tutucu MS / MS dedektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler, negatif iyon modunda çalışan, elektrosprey iyonizasyon kaynağı ile donatılmış, Applied Biosystems 3200 Q-Trap LC-MS/MS cihazına bağlı bir Shimadzu 20A HPLC sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırma için, 40°C'de çalışan 150 x 4.6 mm, 3 µm parçacık büyüklüğü olan, oktadesil silika jel analitik kolon kullanılmıştır. Solvent akış hızı 0.5 ml/dk'da tutulmuştur. İçerik tespiti photo-diode array (PDA) dedektörü ile yapılmıştır. Gradyan elüsyonu mobil fazlar içermektedir: (A) asetonitril:su:formik asit (10:89:1, v/v/v) ve (B) asetonitril:su:formik asit (89:10:1, v/v/v). B bileşimi 40 dakikada %10'dan %100'e çıkarılmıştır. LC-ESI-MS/MS verileri, Analyst 1.6 yazılımı tarafından toplanmış ve analiz edilmiştir.

3.3 Hücre Hattı ve Hücre Kültürü

3.3.1 Hücre Açma Protokolü

Açılacak flask sayısına göre, her bir flask için 2 ml vasat 15 ml'lik falkonlara eklenmektedir. -80°C'de dondurulmuş hücrelerin içerisinde bulunduğu viyal, 37°C'lik su banyosunda çözünmüş ve 4 ml vasatın üzerine eklenmiştir. Hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifuj edilmiştir. Hücre üstü süpernatant atılmıştır. Bu süreçte hücre ekimi yapılacak flasklara 3 ml vasat eklenmiştir. Hücreler, 4 ml vasat ile alt-üst edilerek karıştırılmış ve her bir flaska 2 ml eklenmiştir. Flasklar 37°C'de %5 CO₂, inkübasyona bırakılmıştır.

3.3.2 Hücreler ve Vasat Hazırlığı

Çalışma esnasında iki farklı hücre hattı kullanılmıştır. Bunlar; Colo-320 primer (ATCC: CCL-220.1) ve Colo-741 (ECACC: 93052621) metastatik kolon adenokarsinom hücre hatlarıdır.

Colo-320 (ATCC: CCL-220.1): Colo-320 hücreleri Duke C Tipi, kolon adenokarsinoması olan 55 yaşında beyaz bir kadından alınmıştır. Colo-320 hücreleri yuvarlak yapıda ve genelde flaskta süspansiyon olarak bulunmaktadır. Proje başlangıcında Colo-320 hücreleri 10. pasajda bulunmaktaydılar.

Colo-741 (ECACC: 93052621): Colo-741 hücreleri kolon karsinoması pelvik duvarına metastaz yapmış 69 yaşında bir kadından alınmıştır. Colo-741 hücreleri fibroblast benzeri yapıda ve flaska yapışık olarak bulunmaktadır. Proje başlangıcında Colo-741 hücreleri ise 2. pasajda bulunmaktaydılar.

Kontrol Hücreleri: Her iki hücre hattı, ekstrakt eklenmeden kontrol hücreleri olarak kullanılmıştır. Bu sayede ekstraktın kanser hücrelerindeki etkisine bakılması amaçlanmıştır. TUNEL ve immünohistokimya analizlerinde enzim ve antikorlar yerine phosphate-buffered saline (PBS) kullanılmıştır.

Her iki hücre hattı da RPMI-1640 ortamında (Biochrom, FG 1215), % 10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS) (Capricorn Scientific, FBS-11B), %1 penisilin-streptomisin (Biochrom, A2213) ve %1 glutamin (EMD) içinde muhafaza edilmiştir (Millipore, K0282). Her iki hücre hattının vasatları, iki günde bir değiştirilmiştir. Colo-741 hücrelerinin vasat değişimi, flastaki üst vasatın tamamen atılıp, yerine 5 ml vasat eklenerek yapılmıştır. Colo-320 hücreleri ise, üst vasat toplanıp, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılıp 5 ml kültür vasatı ile yıkama yapıldıktan sonra, tekrar flaska yerleştirilmiştir. Hücre sayım işlemi Thoma lamı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.3 Hücre Pasajlama Protokolü

Hücreler %80 yoğunluk oranına ulaştığında hücre pasajlama protokolü uygulanmıştır.

Colo-320 Hücreleri: Flastlardaki üst vasat toplanmıştır. Geriye kalan flaska 2.5 ml Tripsin-EDTA (Capricorn Scientific, FRY-1B) eklenmiş ve 37°C'de %5 CO₂, 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Toplanan üst vasatlar ve hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Hücrelerin üzerine 2 ml vasat eklenip, alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Her bir flaska 1 ml hücre ve üzerlerine 4 ml vasat eklenerek, 37°C'de %5 CO₂, inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelere 1:2 oranında pasajlama işlemleri uygulanmıştır.

Colo-741 Hücreleri: Flastlardaki üst vasat toplanmış ve atılmıştır. Geriye kalan flaska 2.5 ml Tripsin-EDTA (Capricorn Scientific, FRY-1B) eklenmiş ve 37°C'de

%5 CO₂, 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Toplanan hücreler 1000 rpm’de 5 dk santrifuj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Hücrelerin üzerine 2 ml vasat eklenip, alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Her bir flaska 1 ml hücre ve üzerlerine 4 ml vasat eklenerek, 37°C’de %5 CO₂, inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelere 1:2 oranında pasajlama işlemleri uygulanmıştır.

3.3.4 Hücre Dondurma Protokolü

Hücre pasajlama protokolünde süpernatant bölümün atılmasına kadar aynı olan hücre dondurma protokolünde, dondurma solüsyonu hazırlanmıştır. Dondurma solüsyonu 1:9 Dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich) ve FBS’den oluşmaktadır. İki viyal için 2 ml dondurma solüsyonu, 200 µl DMSO ve 1800 µl FBS oluşacak şekilde hazırlanmıştır. Hücreler dondurma solüsyonuna eklendikten hemen sonra -80°C’de dondurulmuştur.

3.4 Çalışma Grupları

Hücrelerdeki canlılık analizi MTT yöntemi, apoptotik hücrelerin sayısal değerlendirilmesi TUNEL yöntemi ve apoptoz yolağında bulunan antikorların karşıt boyaması immünohistokimya yöntemi ile belirlenmiştir.

3.5 Hücre Canlılığı ve Büyüme Analizi

Su ve DCM faz ekstraktları DMSO ile 100 mg/ml’ye çözülmüştür. Çözülen ekstraktlar daha sonra kültür vasatında beş farklı konsantrasyona seyreltilmiştir. Bu dozlar 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml olarak ekstraktların optimal dozunu bulmak için belirlenmiştir. Flasklardan toplanan hücreler vasat içinde süspanse edildi ve her gözde 100 µl vasat ile 5×10^3 /ml hücre yoğunluğunda olacak şekilde 96 gözlü kültür kaplarına ekilmiştir. Her iki hücre hattı da 24 ve 48 saat kültür kaplarında 37°C’de %5 CO₂’de inkübe edilmiştir.

3.6 Hücre Canlılığı Testi, MTT

MTT testi, hücre metabolik aktivitesini değerlendirmek için kullanılan kolorimetrik bir testtir. Canlı hücre yoğunluğu, MTT testi (Biotium, #30006), sarı renkli 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromürün mor formazan

ürününe indirgenmesiyle yapılmıştır. 96 gözlü kapların içerisine bir gün önceden hücre ekimleri yapılmıştır. Her hücre hattı için 4 göz negatif kontrol, 4 göz pozitif kontrol hazırlanmıştır. Negatif kontrol sütununda sadece vasat, pozitif kontrol sütununda ise sadece kolon kanser hücreleri mevcuttur. Bir gün sonra 48 saatlik, ertesı gün ise 24 saat inkübasyon yapılmıştır. MTT solüsyonu su banyosunda 37°C'de ısıtılmış ve berrak bir solüsyon elde edilene kadar hafifçe karıştırılmıştır. Her bir göze 10 µl MTT solüsyonu eklenmiş ve 37°C'de 4 saat boyunca %5 CO₂'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra her bir göze 200 µl DMSO eklenmiş ve alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Bu yöntemle formazan tuzlarının çözünmesi sağlanmıştır. Absorbans sinyali 570 nm'de ölçülmüştür (Versa Max, Molecular Device, Sunnyvale, USA).

3.7 Hücre Fiksasyon Protokolü

Her 100 cc su için bir tablet PBS behere eklenerek karıştırılmıştır. %4 konsantrasyonda paraformaldehid PBS'de çözülmüştür. Kullanılan 24 gözlü kaplar, deske çıkarılarak üst vasatları atılmış ve her göze 500 µl PBS eklenmiştir. Eklenen PBS toplandıktan sonra gözlere 500 µl paraformaldehid (%4) eklenerek inkübasyona bırakılmış, inkübasyondan sonra toplanıp atılmıştır. Her göze tekrardan 500 µl PBS eklenerek parafilmle +4°C'ye kaldırılmıştır.

3.8 Apoptoz için Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) Analizi

Hücrelerdeki DNA fragmentasyonu, apoptotik hücrelerdeki DNA fragmentasyonuna spesifik boyama olan ticari apoptoz tespit kiti ile yapılmıştır (Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, S7101, Millipore, USA). PBS içinde %4 paraformaldehid ile fikse edilen hücreler, PBS ile iki kere yıkandıktan sonra %3 H₂O₂ ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemden sonra hücreler PBS ile iki kere 5 dakika inkübe edilerek yıkanmış ve her göze 75 µl denge tamponu eklenmiştir. 5 dakikalık inkübasyondan sonra denge tamponu atılarak 55 µl çalışma gücü TdT enzimi kontrol hücreleri hariç hepsine eklenmiş ve 1 saat nemlendirilmiş odacıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra durdurma yıkama tamponu eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dk boyunca inkübe edilmiştir.

Hücreler, üç kez PBS ile yıkanmış ve yüzey örtülene kadar, 80 µl antidioksijenin peroksidaz eklenmiştir. Hücreler PBS ile tekrar yıkandıktan sonra her göze 100 µl diaminobenzidin (DAB) eklenmiş ve 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra bol distile su (dH₂O) ile yıkanmıştır. Mayer solusyonu ile karşıt boyama yapılmıştır. Hücreler 5 dakikalık inkübasyon süresinden sonra bol dH₂O ile yıkanmıştır.

3.9 İmmunositokimya Protokolü

Colo-320 ve Colo-741 hücreleri, kaspaz-3 (sc-7272, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), sitokrom-c (sc-13156, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) ve FasL'a (sc-834 Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) karşı antikorların bağlanması için immünositokimyasal olarak değerlendirilmiştir. %4 paraformaldehidle PBS içinde fikse edilen hücrelerin üzerlerinde bulunan PBS atılmıştır. 1:1000 PBS ile seyreltilerek Triton x 100 (Sigma-Aldrich), membran geçirgenliğini artırarak antikorun geçirgenliğini artırmak amacıyla hazırlanmıştır. Her göze yaklaşık 1:1000 Triton x 100, 10 damla solüsyon konulup buz üzerinde 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Triton x 100 solüsyon inkübasyondan sonra atılmış, her göze %3 H₂O₂ eklenmiş ve hücreler 5 dakika inkübe edilmiştir. Antikorlar 1:50 PBS dilüsyonu ile hazırlanıp +4°C'de bekletilmiştir. Daha sonra 3 x 5 dakika PBS yıkanması yapılmış ve her göze 10 damla bloklama tamponu (blocking buffer) eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bloklama tamponu ortamda bulunan diğer proteinleri bloklama ve antikorun istenilen antijene ulaşmasını sağlamak için kullanılmıştır. İmmunohistokimya kalemi ile lamelleri etrafı çizilmiştir. Kontrol sütunu hariç her göze 100 µl antikor, kontrol sütunlarına ise 100 µl PBS eklenerek 24 gözlü kaplar üzeri parafilmle kaplanarak nemli ortamda +4°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Bir gece buzdolabında bekletildikten sonra primer antikorlar atılmış ve 3 x 5 dakika PBS yıkaması yapılmıştır. Biotinlenmiş sekonder antikor (Histostain-Plus, IHC Kit, HRP, 859043, Thermo Fischer) (100 µl) eklenerek 30 dakika inkübasyona bırakılan hücreler daha sonra 3 x 5 dakika PBS ile yıkanmış ve 100 µl streptavidin peroksidaz ile ek olarak 30 dakika inkübe edilmiştir. PBS ile yıkanan hücrelere immuno-etiketlemenin geliştirilmesi için DAB eklenmiş ve 5 dakika inkübe edilmiştir. Kahverengi renk kaybolana kadar bol dH₂O ile yıkananan hücrelerin üzerine Mayer hematoksilen eklenmiş, 5 dakikalık

inkübasyondan sonra hücreler dH₂O ile yıkanmıştır. Son olarak 24 gözlü kapların içerisinde bulunan yuvarlak lameller, gömme ortamı ile (mounting medium, (Merck Millipore, 107961, Germany) lam üzerine ters kapatılmış ve mikropslopta incelenmek için uygun hale getirilmiştir (Olympus BX40, Tokyo, Japan).

Kaspaz-3, sitokrom-c ve FasL boyanması yarı kantitatif skorlama olan H-SKOR denklemi kullanılarak derecelendirilmiştir. Denklem: $HSKOR = \sum \pi (i+1)$. Denklemde bulunan 1, 2 veya 3 (sırasıyla zayıf, orta veya güçlü) boyama yoğunluğunu ve π , her bir yoğunlukla boyanan ve %0 ve %100 arasında değişen hücrelerin yüzdesini temsil etmektedir.

3.10 Verilerin İstatistiksel Analizi ve Yazılım Programları

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak ifade edilmiştir. Sonuçlar GraphPad Prism 7 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Grafiklerin çiziminde ise Microsoft Office, Excel, şekillerin oluşturulmasında da Word programlarının 2010 sürümü kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar Mann-Whitney U testleri ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yapılan bu çalışmada istatistiksel anlamlılık derecesi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4.0 BULGULAR

4.1 *Corchorus olitorius* L. İçerik Analizi

Tablo 4.1.1. *Corchorus olitorius* L. su fazı içerik analizi

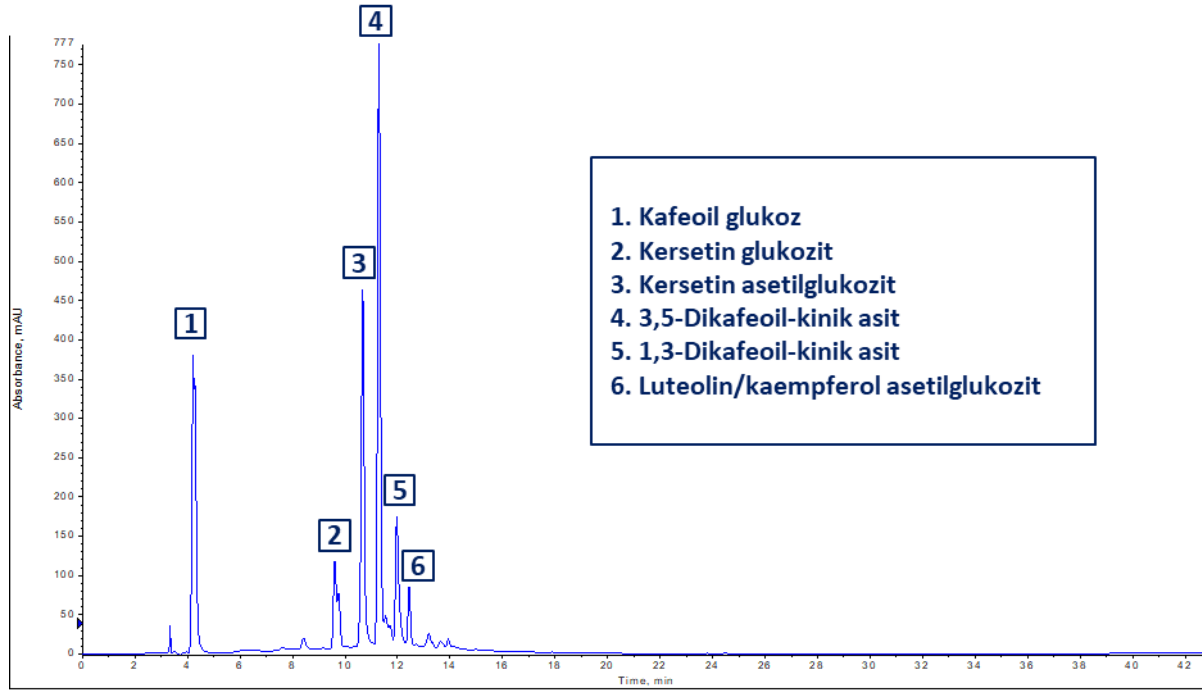
Rt	[M-H] ⁻	MS ²	İçeriğinde bulunan bileşik	Ekstrakt
4.1	341	179, 161	Kafeoil glukoz	Su
4.7	353	191, 179	3-Kafeoil-kinik asit	Su
9.9	463	299, 271, 255	Kersetin glukozit	Su
10.9	505	299, 271, 255	Kersetin asetilglukozit	Su
11.5	515	353, 191, 179, 173	3,5-Dikafeoil-kinik asit	Su
12.1	515	353, 191, 179, 135	1,3-Dikafeoil-kinik asit	Su
12.6	489	284, 255, 227	Luteolin / kaempferol asetilglukozit	Su

Tablo 4.1.2. *Corchorus olitorius* L. DCM fazı içerik analizi

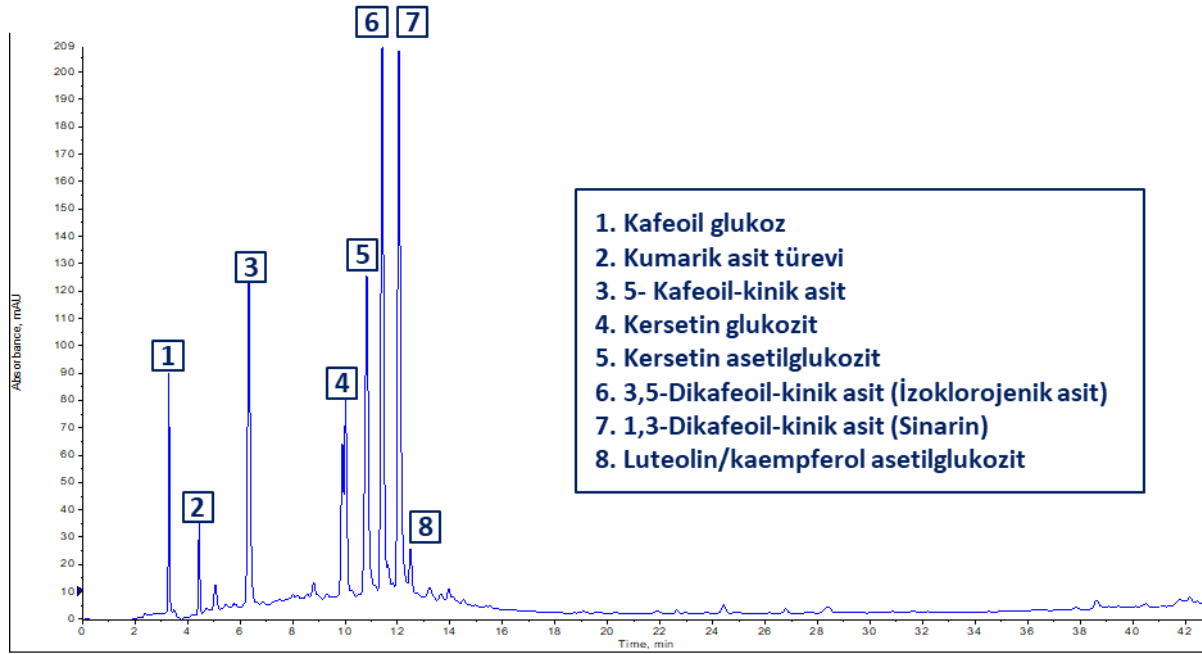
Rt	[M-H] ⁻	MS ²	İçeriğinde bulunan bileşik	Ekstrakt
4.1	341	179, 161	Kafeoil glukoz	DCM
4.4	198	163	Kumarik asit türevi	DCM
6.1	353	191, 173	5- Kafeoil-kinik asit	DCM
9.9	463	299, 271, 255	Kersetin glukozit	DCM
10.9	505	299, 271, 255	Kersetin asetilglukozit	DCM
11.5	515	353, 191, 179, 173	3,5-Dikafeoil-kinik asit	DCM
12.1	515	353, 191, 179, 135	1,3-Dikafeoil-kinik asit	DCM
12.6	489	284, 255, 227	Luteolin / kaempferol asetilglukozit	DCM

Corchorus olitorius L. LC/MS-MS içerik analizi, her iki ekstraktın içeriğinin benzer olduğunu göstermiştir. *Corchorus olitorius* L. ekstraktlarının polifenollerden flavonoidleri ve flavonoid olmayan polifenolleri içerdiği görülmüştür. Her iki faz ekstraktta da fenolik asit alt grubuna ait hidroksi sinamik asitlerden, kafeoil-kinik asit türevleri ve flavonol grubunda bulunan kersetin türevleri tespit edilmiştir. Su fazında yedi ana madde belirlenmiştir (Tablo 4.1.1, Şekil 4.1.1). DCM fazında ise toplamda sekiz bileşen tespit edilmiştir (Tablo 4.1.2, Şekil 4.1.2). DCM fazında su

fazına ek olarak kumarik asit türevi olan bir bileşene de rastlanmıştır. Sonuçlar bize *Corchorus olitorius* L. yapraklarından elde edilen ekstraktların hidroksi sinnamik asitlerden ve flavonollardan zengin olduğunu ve potansiyel anti-kanser etkisine katkı koyabileceğini göstermiştir.



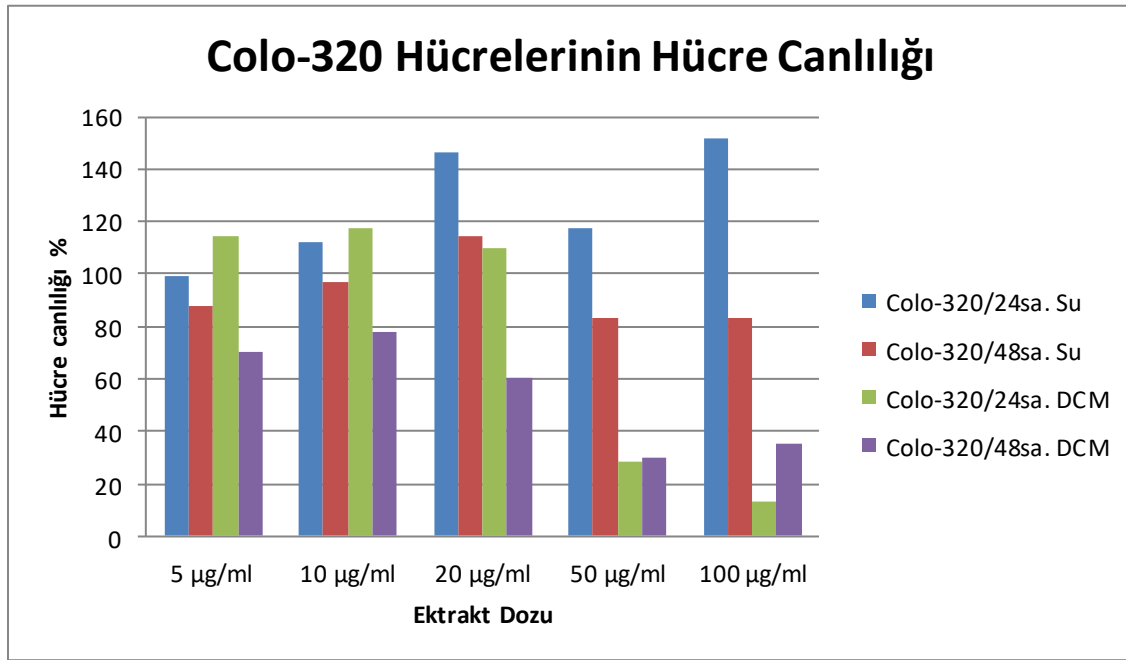
Şekil 4.1.1. *Corchorus olitorius* L. su fazi ekstraktı LC/MS-MS içerik analizi



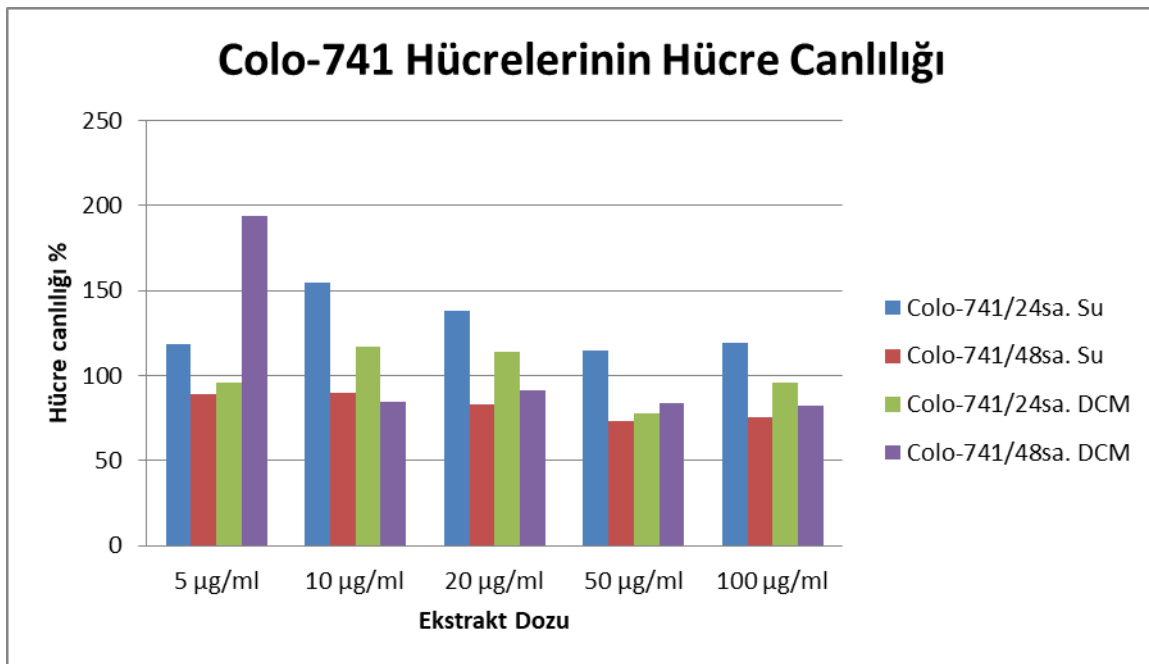
Şekil 4.1.2. *Corchorus olitorius* L. DCM faz ekstraktı LC/MS-MS içerik analizi

4.2 Hücre Canlılığı ve Sitotoksitesi

Colo-320 ve Colo-741 hücre hatları farklı konantrasyonlardaki *Corchorus olitorius* L. su ve DCM fazlarında 24 ve 48 saatlik süreler olmak üzere inkübe edilmişlerdir. Bu konantrasyonlar sırası ile 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/ml'dir. MTT sonuçlarına göre, Colo-320 hücrelerinde ekstrakt dozu yükseldikçe doza bağılı olarak hücre canlılığının azaldığı görülmüştür. Ayrıca, DCM fazı ile 24 ve 48 saat inkübe edilmiş Colo-320 hücrelerinde hücre canlılığının özellikle yüksek dozlarda (50-100 µg/ml) daha az olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2.1). Bunlara ek olarak su fazı ile inkübe edilen Colo-320 hücrelerinde özellikle, 50 µg/ml dozunda daha büyük etki gözlemlenmiştir. Her iki hücre hattında da 50 µg/ml ekstrakt dozunun kanser hücre canlılığını azaltmada daha etkili olduğu belirlenmiştir. Colo-741 hücrelerinde, ekstrakt dozlarının hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkilerinin birbirlerine daha yakın olduğu gözlemlenmiştir. Diğer dozlara kıyas ile Colo-320 hücrelerinde olduğu gibi, Colo-741 hücrelerinde her iki fazla da 50 µg/ml dozunun hücre canlılığını daha optimal derecede azalttığı görülmüştür (Tablo 4.2.1 ve 4.2.2, Şekil 4.2.2). Hücre canlılığının en düşük olduğu dozun, DCM fazının 100 µg/ml 24 saat inkübasyonu ile Colo-320 hücrelerinde görüldüğü (%13,5 canlılık), Colo-741 hücrelerinde ise 48 saat inkübasyon sonunda 50 µg/ml ekstrakt dozunda %73,5 ile görüldüğü belirlenmiştir (Tablo 4.2.2).



Şekil 4.2.1. *Corchorus olitorius* L. DCM ve su fazı ekstraktlarının Colo-320 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri. Colo-320 hücreleri farklı konsantrasyonlarda *Corchorus olitorius* L. DCM ve su fazı ekstraktları ile 24 ve 48 saat inkübe edilmişlerdir.



Şekil 4.2.2. *Corchorus olitorius* L. DCM ve su fazı ekstraktlarının Colo-741 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri. Colo-741 hücreleri farklı konsantrasyonlarda *Corchorus olitorius* L. DCM ve su fazı ekstraktları ile 24 ve 48 saat inkübe edilmişlerdir.

Tablo 4.2.1. Colo-320 hücrelerinin hücre canlılığı yüzdesi

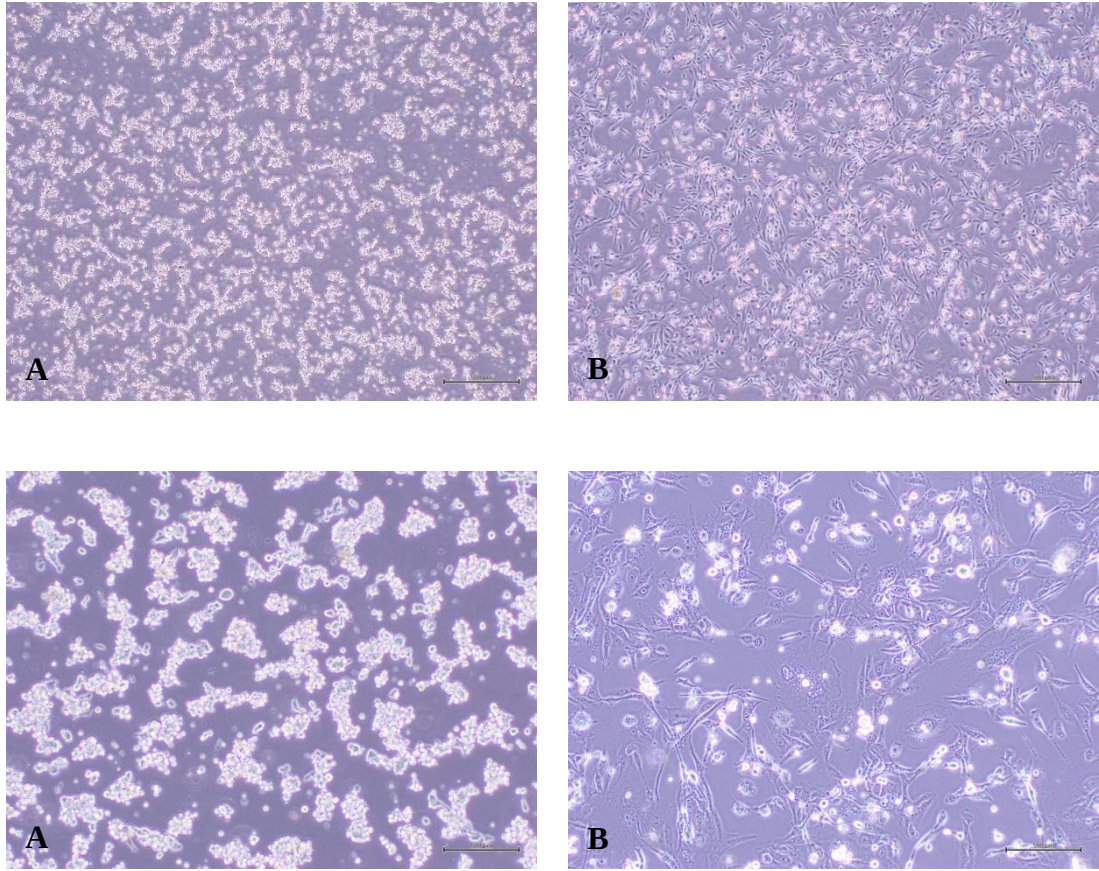
Colo-320 (%)	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Colo-320/24sa. Su	98,9	112,0	146,3	117,6	151,5
Colo-320/48sa. Su	87,8	96,7	114,1	83,3	82,9
Colo-320/24sa. DCM	114,2	117,2	109,7	28,7	13,5
Colo-320/48sa. DCM	70,0	77,9	60,1	30,0	35,1

Tablo 4.2.2. Colo-741 hücrelerinin hücre canlılığı yüzdesi

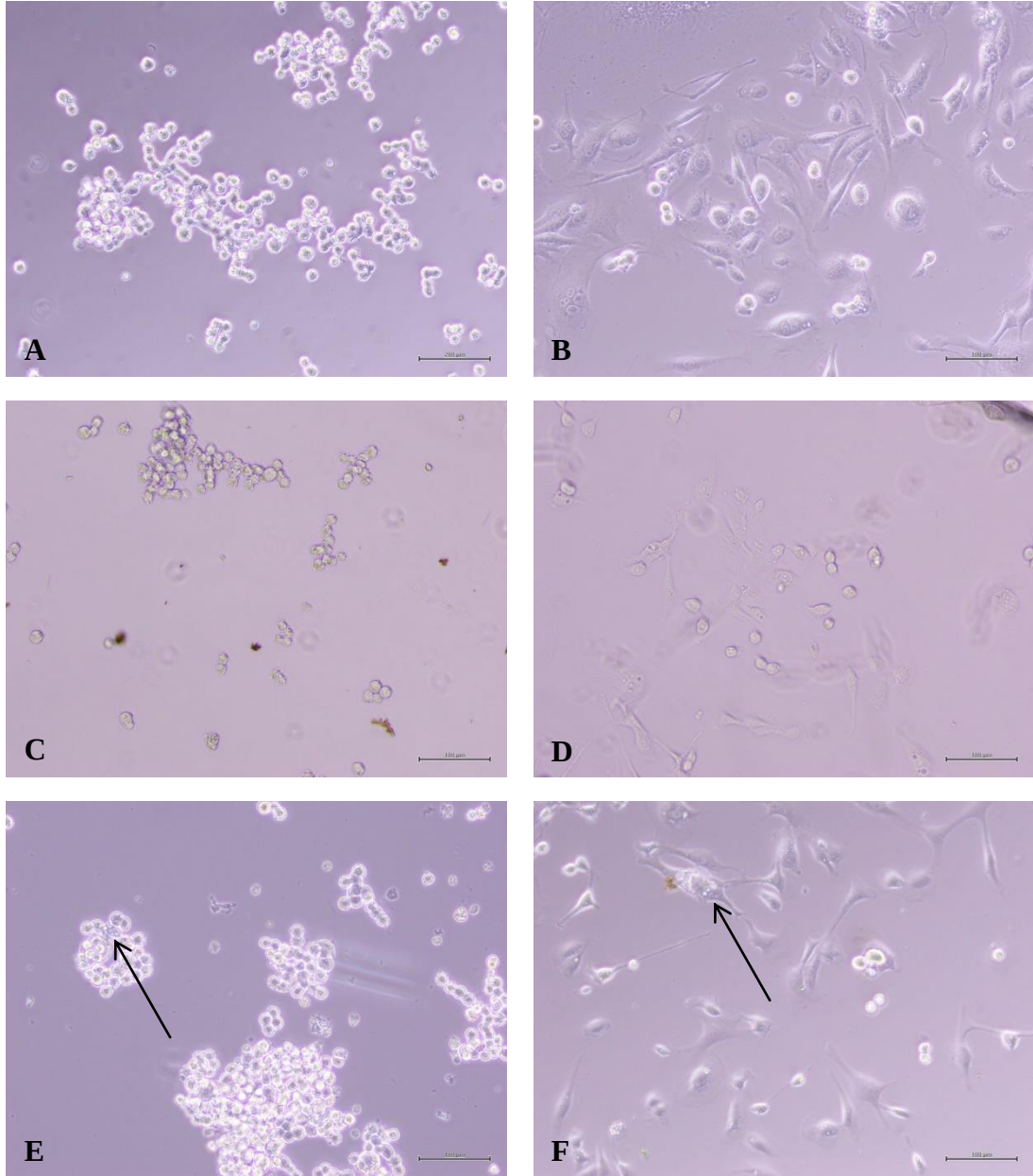
Colo-741 (%)	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Colo-741/24sa. Su	118,4	154,5	138,4	114,9	119,2
Colo-741/48sa. Su	89,5	89,7	83,1	73,6	75,8
Colo-741/24sa. DCM	95,7	117,3	113,7	77,6	95,7
Colo-741/48sa. DCM	194,1	84,8	91,2	83,9	82,4

4.3 Hücre Morfolojisi

Ekstraktlarla inkübe edilen hücrelerin morfolojik yapıları kontrol grubu ile kıyaslandığında benzer bulunmuştur (Şekil 4.3.1). Colo-741 hücre hattında her iki ekstrakt grubunda sitoplazmada vakuol oluşumu gözlemlenmiştir. Colo-320 hücrelerinde vakuol oluşumu görülmemiş ve morfolojik olarak kontrol grubuna kıyasla büyük farklılıklar izlenmemiştir (Şekil 4.3.2).



Şekil 4.3.1. Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinin farklı büyüklüklerde morfolojik görüntüleri (A) Colo-320, (B) Colo-741 hücreleri. Ölçek: 500 µm.



Şekil 4.3.2. Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinin ters mikroskoptaki görüntüleri: (A) Colo-320 hücreleri, (B) Colo-741 hücreleri, (C) DCM fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücreleri, (D) DCM fazı ile inkübe edilmiş Colo-741 hücreleri, (E) Su fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücreleri, (F) Su fazı ile inkübe edilmiş Colo-741 hücreleri. Ölçek: 100 μm .

4.4 *Corchorus olitorius* L. Ekstraktlarının Colo-320 ve Colo-741 Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkileri

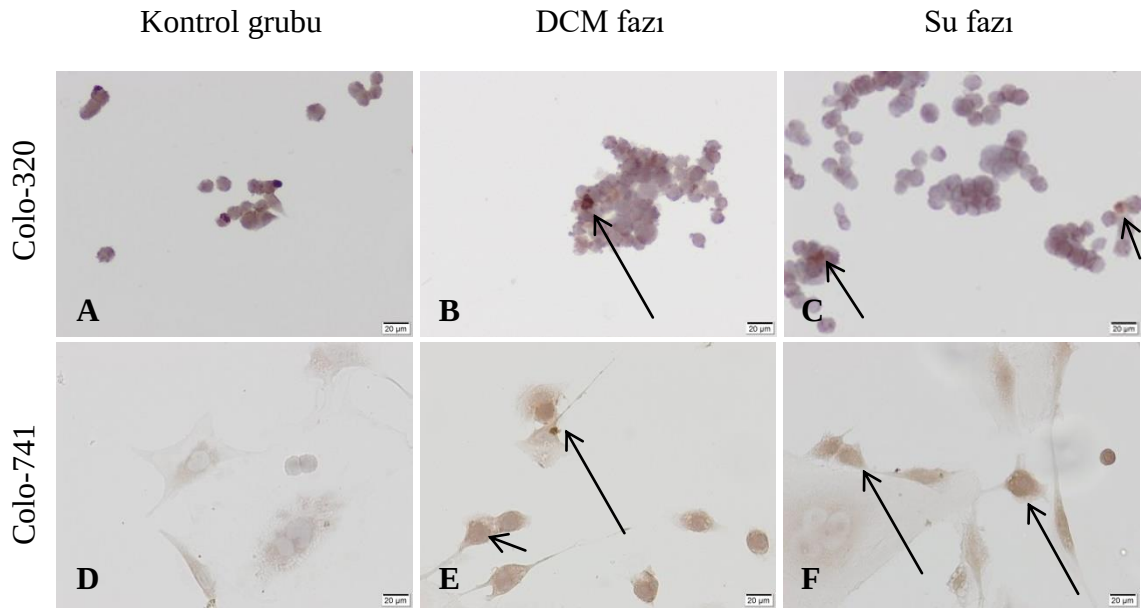
TUNEL analizi ile belirlenen apoptotik etkiler, her iki hücre hattının da 50 µg/ml dozunda DCM ve su ekstraktları ile 24 saatlik inkübasyondan sonra tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında her iki fazın, Colo-741 hücreleride anlamlı olarak apoptotik etki gösterdiği görülmüştür ($p < 0.01$, Tablo 4.4.1, Şekil 4.4.1). Colo-741 hücrelerinde ayrıca Colo-320 hücrelerine oranla anlamlı derecede daha fazla apoptotik etkiye rastlanmıştır ($p < 0.01$, Tablo 4.4.1, Şekil 4.4.1). Colo-320 hücrelerinde ise su fazında, DCM ve kontrol grubuna göre apoptotik etkinin rakamsal olarak daha yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$, Tablo 4.4.1, Şekil 4.4.2). Bu sonuçlara göre her iki ekstraktın da metastatik kolon kanseri hücre hattında daha büyük bir etki sağladığı gözlemlenmiştir.

Tablo 4.4.1. *Corchorus olitorius* L. 50 µg/ml DCM ve su fazı ile 24 saat inkübe edilmiş Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde TUNEL pozitif hücrelerin yüzdesi. Veriler ortalama $\pm$ SS olarak verilmiş ve Mann-Whitney testi ile karşılaştırılmıştır.

	Colo-320 hücreleri	Colo-741 hücreleri
DCM fazı	5.94 $\pm$ 2.19	72.5 $\pm$ 25.28 ^{a,b}
Su fazı	11.38 $\pm$ 6.68	70.43 $\pm$ 9.72 ^{a,b}
Kontrol	4.14 $\pm$ 4.25	4 $\pm$ 8.94

^a Veriler, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.01$)

^b Veriler, Colo-320 hücreleri ile karşılaştırıldığında ($p < 0.01$)



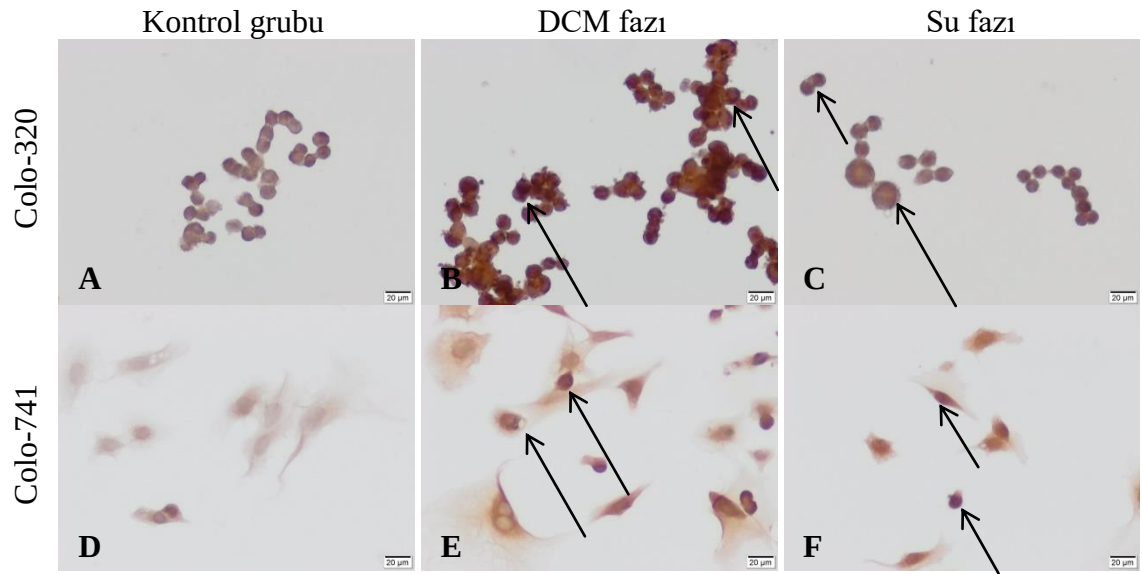
Şekil 4.4.1. *Corchorus olitorius* L. DCM ve su fazı ekstraktlarının Colo-320 ve Colo-741 hücre hatlarındaki apoptotik etkileri: . (A) Colo-320 kontrol hücreleri, (B) DCM fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücreleri, (C) Su fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücreleri, (D) Colo-741 kontrol hücreleri, (E) DCM fazı ile inkübe edilmiş Colo-741 hücreleri, (F) su fazı ile inkübe edilmiş Colo-741 hücreleri. Ölçek 20 µm.

4.5 İmmunositokimyasal Değerlendirme

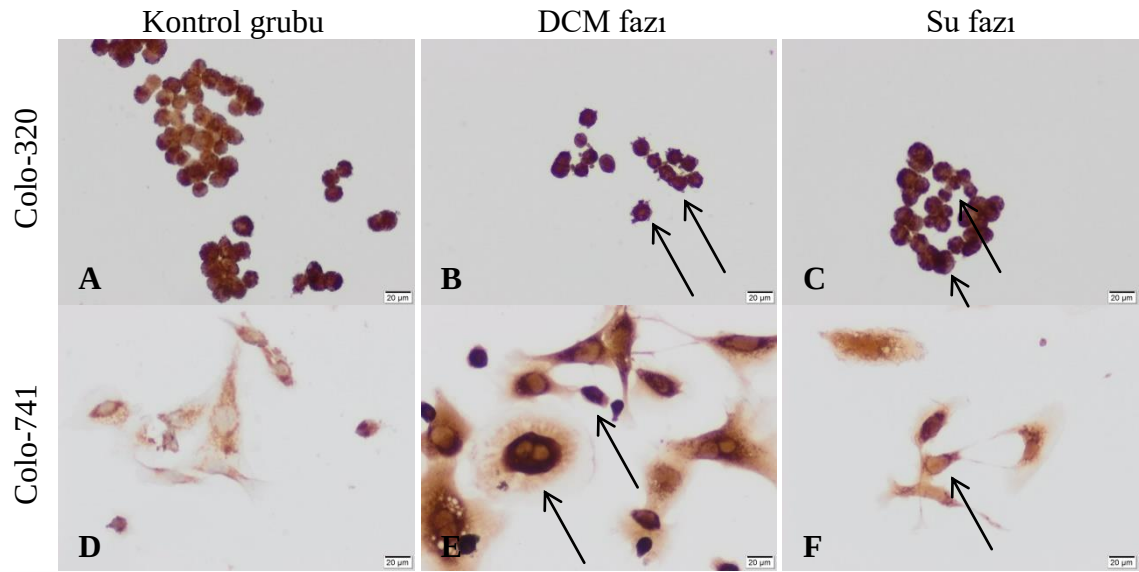
Kaspaz-3 immunoboyaması DCM faz uygulanan Colo-320 primer kolon adenokarsinom hücrelerinde güçlü iken, su fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücrelerinde orta-zayıf derecesinde görülmüştür (Tablo 4.5.1). H-SKOR ve immünreaktivite sonuçlarının da immunoboyama sonuçları ile paralel olduğu, DCM fazı uygulanan Colo-320 hücrelerinde kaspaz-3 için immünreaktivitenin anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$, Tablo 4.5.2) (Şekil 4.5.1). Bunun yanı sıra su fazında inkübe edilmiş Colo-320 hücreleri için H-SKOR, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$, Tablo 4.5.2). Colo-741 hücrelerinde ise kaspaz-3 immünoboyanması, DCM fazı için orta ile güçlü ve su fazı için zayıf-orta seviye olarak belirlenmiştir (Tablo 4.5.1). Şekil 4.5.1'de gösterildiği üzere, Colo-741 hücrelerinde kaspaz-3'ün immünoreaktivitesi, ekstraktlar ile inkübe edilen hücrelerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$, Tablo 4.5.2).

Sitokrom c'nin Colo-320 hücreleri üzerindeki immunoboyama yoğunluğu her iki ekstrakt için de orta-güçlü seviyede bulunmuştur (Tablo 4.5.1). Şekil 4.5.2'de görüldüğü üzere, sitokrom-c immünreaktivitesi her iki ekstraktta da Colo-320 hücrelerinde kontrol grubuna göre daha yüksek olmuştur. Su fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücrelerindeki H-SKOR'u, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir ($p<0.05$, Tablo 4.5.2). DCM fazı ile işlem görmüş hücrelerde H-SKOR kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlense de, bu artış istatistiki açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$, Tablo 4.5.2). Colo-741 hücrelerinde, sitokrom-c immünoboyama yoğunluğu DCM fazında güçlü, su fazında ise orta derecede olmuştur (Tablo 4.5.1). Bu hücrelerdeki DCM fazı immünreaktivitesi hem su fazına hem de kontrol grubu hücrelerine göre yüksek bulunmuştur (Tablo 4.5.2). Colo-741 hücrelerindeki H-skorlarına göre, her iki ekstrakt da kontrol grubundaki hücrelere göre daha fazla immün işaretlemiştir ($p<0.01$, Tablo 4.5.2).

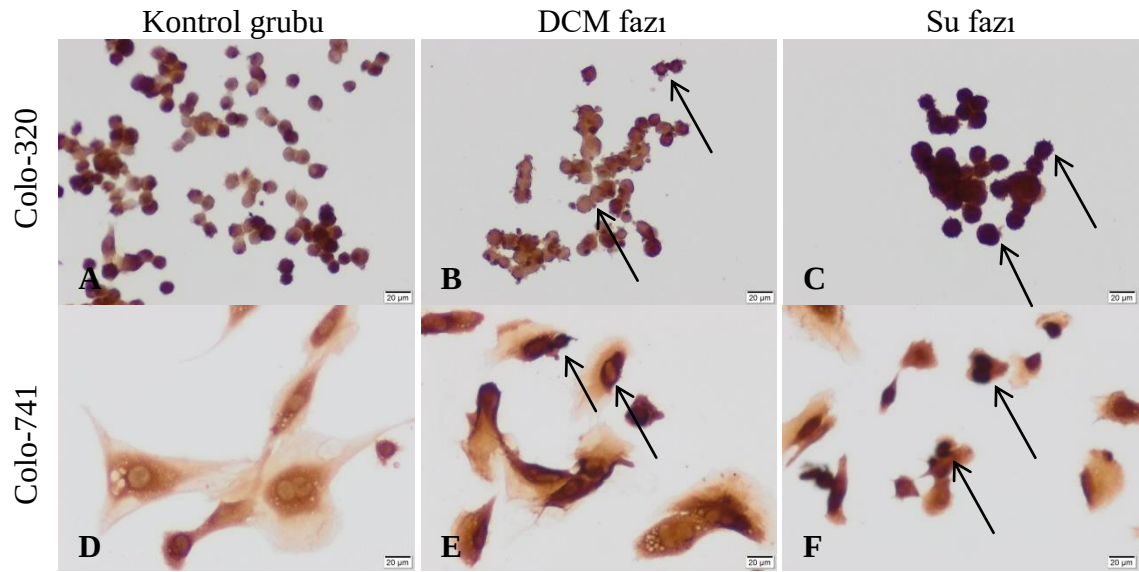
Colo-320 hücrelerinde FasL immünoboyaması DCM fazında zayıf ya da orta, su fazında ise orta-güçlü olarak görülmüştür (Tablo 4.5.1). Bunların yanı sıra, DCM ile inkübe edilmiş Colo-320 hücrelerinde H-SKOR'da düşüş saptanmıştır (Tablo 4.5.2). Su fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücrelerinde ise tam tersine anlamlı derecede artmış H-SKOR görülmüştür ($p<0.05$, Tablo 4.5.2). Colo741 hücrelerinde FasL immünoboyama yoğunluğu orta-güçlü olup (Tablo 4.5.1) immünreaktivite oranı ise her iki ekstrakt için de kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.5.3). Colo-741 hücrelerinde her iki ekstrakt H-SKOR'u kontrol grubuna göre anlamlı derecede fazla bulunmuştur ($p<0.05$, Tablo 4.5.2). Buna ek olarak, DCM fazı ile inkübe edilmiş Colo-741 hücrelerinin H-SKOR puanı, su fazı H-SKOR'una göre anlamlı derecede yükseliş göstermiştir ($p<0.05$, Tablo 4.5.2). Bunların yanı sıra, su fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücrelerinde FasL immün işaretlemesi aynı faz ile inkübe edilen Colo-741 hücrelerine göre istatistiki olarak anlamlı oranda daha yüksek olarak belirlenmiştir ($p<0.01$, Tablo 4.5.2). Bu durumda su fazı primer kolon adenokarsinom hücrelerinde FasL antikorunda daha fazla etki göstermiştir.



Şekil 4.5.1. 50 µg/ml *Corchorus olitorius* L. DCM ve su fazı ekstraktları ile 24 saat inkübe edilmiş Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde kaspaz-3 immünreaktivitesi: (A) Colo-320 kontrol hücreleri, (B) DCM fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücreleri, (C) Su fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücreleri, (D) Colo-741 kontrol hücreleri, (E) DCM fazı ile inkübe edilmiş Colo-741 hücreleri, (F) Su fazı ile inkübe edilmiş Colo-741 hücreleri. Ölçek 20µm.



Şekil 4.5.2. 50 µg/ml *Corchorus olitorius* L. DCM ve su fazı ekstraktları ile 24 saat inkübe edilmiş Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde sitokrom-c immünreaktivitesi: (A) Colo-320 kontrol hücreleri, (B) DCM fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücreleri, (C) Su fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücreleri, (D) Colo-741 kontrol hücreleri, (E) DCM fazı ile inkübe edilmiş Colo-741 hücreleri, (F) Su fazı ile inkübe edilmiş Colo-741 hücreleri. Ölçek 20µm.



Şekil 4.5.3. 50 µg/ml *Corchorus olitorius* L. DCM ve su fazı ekstraktları ile 24 saat inkübe edilmiş Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde FasL immünreaktivitesi: (A) Colo-320 kontrol hücreleri, (B) DCM fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücreleri, (C) Su fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücreleri, (D) Colo-741 kontrol hücreleri, (E) DCM fazı ile inkübe edilmiş Colo-741 hücreleri, (F) Su fazı ile inkübe edilmiş Colo-741 hücreleri. Ölçek 20µm.

Tablo 4.5.1. 50 µg/ml *Corchorus olitorius* L. DCM ve su fazı ekstraktları ile 24 saat inkübe edilmiş Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde kaspaz-3, sitokrom-c ve FasL immünboyama yoğunluğu: (+) zayıf, (++) orta, (+++) güçlü.

	Colo-320 hücreleri			Colo-741 hücreleri		
	Kontrol grubu	DCM faz grubu	Su fazı grubu	Kontrol grubu	DCM faz grubu	Su fazı grubu
Kaspaz-3	+	+++	+/++	-/+	++/+++	+/++
Sitokrom-c	++	++/+++	++/+++	-/+	+++	++
FasL	+	+/++	++/+++	+/++	++/+++	++/+++

Tablo 4.5.2. 50 µg/ml *Corchorus olitorius* L. DCM ve su fazı ekstraktları ile 24 saat inkübe edilmiş Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde kaspaz-3, sitokrom-c ve FasL immüno-etiketlemeye göre H-SKOR'u. Veriler ortalama ± SS olarak verilmiş ve Mann-Whitney testi ile karşılaştırılmıştır.

	Colo-320 hücreleri			Colo-741 hücreleri		
	Kontrol grubu	DCM faz grubu	Su fazı grubu	Kontrol grubu	DCM faz grubu	Su fazı grubu
Kaspaz-3	258.8 ± 41.23	355.3 ± 19.69 ^a	312.3 ± 41.99	218.3 ± 52.86	350.3 ± 18.94 ^a	320.3 ± 52.45 ^a
Sitokrom-c	317.7 ± 36.17	370.2 ± 30.29	366 ± 22.4 ^a	208.9 ± 19.87	371.3 ± 11.83 ^a	354.2 ± 22.5 ^a
FasL	372.5 ± 19.18	300.2 ± 52.43	397.1 ± 6.57 ^{a,b}	278.3 ± 45.49	382.3 ± 2.12 ^{a,c}	360.7 ± 16.77 ^a

a Veri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05)

b Veri, farklı hücre hatları ile karşılaştırıldığında (p<0.01)

c Veri, su fazı grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05)

5.0 TARTIŞMA

Yapılan bu tez çalışmasında, MTT sonuçlarına bakılarak Colo-320 hücrelerinde yüksek doz ekstrelerin daha fazla sitotoksik etki yarattığı görülmüştür. Her iki ekstre kıyaslandığında ise DCM faz ekstresinin 50 ve 100 µg/ml dozunda daha etkili olduğu saptanmıştır. Colo-741 hücrelerinde ise tüm dozların sitotoksik etkisinin birbirine daha yakın olduğu saptanmış, yine özellikle 50 ve 100 µg/ml dozlarında hücre canlılığının diğer dozlara oran ile daha az olduğu saptanmıştır. MTT sonuçlarına bakılarak, her iki hücre hattında da ileri histokimyasal araştırmanın 50 µg/ml dozunda devam edilmesine karar verilmiştir. Ayrıca, bu tercih yapılırken, 50 µg/ml konsantrasyonundan az olan ekstre dozlarının kanser hücrelerinde apoptozu indükleyemeyeceği veya fazla olan dozda ise normal hücrelere de sitotoksik etki yaratabileceği göz önünde bulundurulmuştur. Yapılan MTT sonuçlarında 24 ve 48 saatlik inkübasyonların sonucunda benzerlik görüldüğünden immunositokimyasal analizler 24 saatlik inkübasyon sonucu ile değerlendirilmiştir.

TUNEL, apoptotik hücrelerde DNA fragmentasyonunun tespit edilmesi için kullanılan bir testtir. Yapılan bu çalışmada *Corchorus olitorius* L. ekstrelerinin özellikle Colo-741 hücrelerinde anlamlı derecede apoptotik etki gösterdiği görülmüştür ($p<0,01$). DCM fazının Colo-741 hücrelerinde, Colo-320 hücrelerine kıyasla ~12 katı daha fazla, su fazının ise yine Colo-741 hücrelerinde primer kolon kanser hücrelerine göre yaklaşık 9 kat daha fazla apoptotik etki gösterdiği görülmüştür. Bu sonuçlara göre her iki ekstraktın da özellikle metastatik kanser hücre hattında etkili olduğu saptanmıştır.

Apoptozda rol oynayan bir çok protein ve iki ana yolak vardır. FasL ve kaspaz-8 gibi bazı proteinlerin varlığı, apoptozun ekstrinsik yolakla tetiklendiğini göstermektedir. Bunun yanı sıra, sitokrom-c, kaspaz-9 ve Apaf-1 gibi proteinler intrinsik yolağın göstergesidirler (Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526). Yapılan çalışmada sitokrom-c immünoaktivitesinin su fazı inkübasyonundan sonra hem Colo-320 hem de Colo-741 hücrelerinde anlamlı derecede artış gösterdiği saptanmıştır ($p<0,05$). Bununla birlikte, DCM fazı ekstraktının sadece Colo-741 hücrelerinde sitokrom-c'nin immünoaktivitesini anlamlı ölçüde arttırdığı gösterilmiştir ($p<0,05$). DCM fazı ile inkübe edilen Colo-320 hücrelerinde kontrol

grubuna kıyasla rakamsal olarak bir fark görülse de, DCM fazı primer hücrelerde sitokrom-c immünoreaktivitesini anlamlı derecede artırmamıştır. Bu sonuçlara göre, her iki ekstrakt Colo-741 hücrelerinde sitokrom-c artışı ile bağdaştırılabileceğimiz intrinsik yolağı indüklemeyi başarırken, Colo-320 hücrelerinde bu etkiyi sadece su fazı ekstresi göstermiştir.

FasL'nin immünoreaktivitesi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DCM fazı ekstresi ile inkübe edilen Colo-320 hücrelerinde bir düşüş göstermiştir. Bu sonuçlar, DCM fazı ekstraktının Colo-320 hücrelerinde ekstrinsik yolak apoptoz indüklediğini belirtmiştir. Bu sonuçların tam aksine Colo-741 hücrelerinde, hem kontrol hem de su fazı ekstraktına kıyas ile FasL immünoreaktivitesinde anlamlı bir farka rastlanmıştır ve bu da DCM fazının metastatik kanser hücrelerinde daha etkili olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, bu sonuçlar DCM faz ekstresinin ekstrinsik yolla sadece Colo-741 hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermiştir. Her iki hücre hattında da su fazı FasL immünoreaktivitesini anlamlı derecede artırabilmiş fakat Colo-320 hücrelerinde daha büyük etki yaratmıştır ($p<0,01$). Bu, özellikle su fazı ekstresinin, ekstrinsik yolak ile apoptozu indüklemek için bir aracı olabileceğini gösterebilir.

Kaspaz-3 immünoreaktivitesi DCM fazı ile inkübe edilmiş Colo-320 hücrelerinde anlamlı derecede yükselmiştir. Bu sonuç bize DCM fazının primer kanser hücrelerinde apoptozun son basamağı, bitirici kaspaz olan kaspaz-3 aktivasyonunun gerçekleştiğini göstermiştir (Huerta ve diğerleri 2006, s. 517-526). Fakat, DCM fazı ile muamele edilmiş Colo-320 hücrelerinde sitokrom-c ve FasL immünoreaktivitesi anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuçlar bize, apoptoz yolağında bulunan diğer proteinlerin yardımı ile primer hücrelerdeki apoptozun tetiklenebileceğini ve bunu belirlemek için daha detaylı değerlendirmeye ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak sitokrom-c aktivasyonu için 24 saatten fazla süreye de ihtiyaç duyulabilir. Su fazı ekstraktı ile inkübe edilen hücrelerde ise FasL ve sitokrom-c immünoreaktivitesinde anlamlı derecede artış gözlemlenirken ($p<0,05$) kaspaz-3 immünoreaktivitesi anlamlı bulunmamıştır. Hücrelerin 24 saatlik inkübasyonu intrinsik ve ekstrinsik yolakların tetiklenmesine neden olmuş fakat kaspaz-3 immünoreaktivitesini anlamlı derecede artıracak bir aktivasyona

ulaşılmamıştır. Hücrelerin ekstraktlar ile daha uzun süre inkübe edilmesi apoptozun bitirici kaspazı olan kaspaz-3'ün aktive olmasını sağlayabilir. Benzer sonuçlara bir diğer çalışmada da rastlanmıştır, hepatosellüler kanser hücrelerinin *Corchorus olitorius* L. ekstraktı ile daha uzun süre inkübe edilmesi membran permeabilitesinin zaman ile paralel azalmasına ve sitokrom-c'nin sitosole geçerek apoptozu indüklediği savunulmuştur (Li ve diğerleri 2012, s. 9348-9360). Bunlara ek olarak Colo-741 hücrelerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında her iki ekstraktın da kaspaz-3 immünoreaktivitesini artırdığı sonucuna varılmıştır. Buna göre, Colo-741 hücrelerinde her üç antikör da anlamlı derecede aktifleşmiş ve bitirici kaspaz-3'e ulaşmıştır. Bu sonuç ise bize metastatik kolon kanser hücrelerinde her iki ekstraktın da apoptozun indüklendiğini göstermiştir.

Çalışmanın içerik analizi sonuçlarına göre, *Corchorus olitorius* L. ekstraktlarının polifenollerden zengin olduğu görülmüştür. Özellikle flavonol grubuna ait kersetin ve türevlerini, ayrıca fenolik asit grubuna ait klorojenik asitlerini içeren *Corchorus olitorius* L. ekstraktlarının içerikleri birbirlerine yakın bulunmuştur. DCM fazı ekstresinde su fazı ekstresine oranla bir ek madde daha tanımlanmıştır. Bu madde kumarik asit türevidir. Yapılan diğer çalışmalarda da *Corchorus olitorius* L.'in polifenol içerdiği belirlenmiştir (Handoussa ve diğerleri 2013, s. 1204-1216; Azuma ve diğerleri 1999, s. 3963-3966; Oboh ve diğerleri 2009, s. 124-134). Handoussa ve diğerlerinin yaptığı çalışmada benzer sonuçlar bulunmuştur (2013, s. 1204-1216). Polifenoller ayrıca bitkilerde bulunan sekonder metabolitler olarak da bilinmektedirler. Wang ve diğerlerinin yaptığı çalışmada kahve polifenollerinin kolorektal kanser riskini azalttığı saptanmıştır (Wang ve diğerleri 2013, s. 2683-2690). Polifenoller güçlü antioksidan kapasitesine ve radikal süpürme özelliğine sahiptirler. Ayrıca, oksidasyona bağlı oksidatif stresi azaltıp, lipid peroksidasyonunu baskılayarak zincir reaksiyon oluşumunu engeller veya durdururlar (Tsao 2010, s. 1231-1246). Fakat polifenollerin bunlara ek olarak metal şelatör olma özellikleri de bulunmaktadır ve agresif serbest radikal üreten Fenton reaksiyonlarını önleyerek de antioksidan özellik göstermektedirler (Tsao 2010, s. 1231-1246). Örneğin, *Corchorus olitorius* L. ekstresinde de bulunan kersetinin yapısal özelliklerinden ötürü (konfigürasyon, hidroksil gruplarının varlığı vs.) serbest radikal süpürebilme ve ayrıca düşük redoks potansiyelinden dolayı lipid peroksidan inhibisyonu, ve tüm

bunlara ek olarak metal şelatörü olduğundan dolayı anti-kanser özellik gösterdiği bildirilmiştir (Darband ve diğerleri 2018, s. 6544-6560).

Corchorus olitorius L. ekstraktının özellikle kersetin türevlerinden zengin olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra kinik asit türevlerini de içerdiği belirlenmiştir (Handoussa ve diğerleri 2013, s. 1204-1216). Benzer sonuçlara bir diğer çalışmada da ulaşılmış, ekstraktın içeriğinde kafeik ve klorojenik aside ek olarak naringenin, kumarik asit ve kaempferole rastlandığı da belirtilmiştir (Yan ve diğerleri 2013, s. 1008-1014). Ayrıca, başka bir çalışmada ise *Corchorus olitorius* L. su fazı ekstraktının fenolik bileşenlerden zengin olduğu ama özellikle flavonoit olmayan polifenoller içerdiği belirlenmiştir. Fakat aynı çalışmada su fazı ekstresinin hekzan fazı ekstresine göre polifenolik bileşenlerden daha zengin olduğu gösterilmiştir (Obob ve diğerleri 2009, s. 124-134). Bir diğer çalışmada ise Obob ve diğerlerinin yaptığı çalışmayı doğrular nitelikte bulunmuştur. Flavonoit olmayan polifenollerin rakamsal olarak diğer polifenollere göre daha fazla miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (Das ve diğerleri 2010, s. 64-69). Yapılan bu tez çalışmasında ekstraktlar içerisinde bulunan polifenollerin miktar tayini yapılmamıştır fakat sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur. İçeriğinde bulunan tüm polifenollerin *Corchorus olitorius* L. bitkisinin sahip olduğu tıbbi özellikleri artırdığı ve potansiyel anti-kanser etkisinin içeriğinde bulunan zengin polifenol maddelerden geldiği daha önce de düşünülmüştür (Yan ve diğerleri 2013, s. 1008-1014; Obob ve diğerleri 2009, s. 124-134).

Yapılan bu çalışmada *Corchorus olitorius* L. ekstraktlarının içerik analizlerinde luteolin/kaempferol asetilglukozit maddelerinde de rastlanmıştır. Her iki bileşik de aynı moleküler ağırlığa sahip oldukları için LC-MS/MS yöntemi ile ayırt edilmesinin mümkün olmadığından, bu ayırımın nükleer manyetik rezonans (NMR) tekniği ile yapılması gerekmektedir. Literatürde ise *Corchorus olitorius* L. içeriğinde hem kaempferol hem de luteoline rastlanmıştır (Ademiluyi ve diğerleri 2015, s. 278-287; Phuwapraisian ve diğerleri 2009, s. 5864-5867). Ademiluyi ve diğerlerinin yaptığı çalışmada bitkinin kaempferol içeriğinin luteolin içeriğine göre daha fazla olduğu fakat her ikisini de içerdiği sonucuna varılmıştır (2015, s. 278-287). 2009 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise *Corchorus olitorius* L. içeriğinde

Corchorisade A isimli yeni bir flavonol keşfedilmiş bu flavonolun ise kaempferol molekülüne bağlı kafeik asit, glukoz ve metil glukoronat olduğu tespit edilmiştir (Phuwapraisian ve diğerleri 2009, s. 5864-5867).

Hem luteolinin hem de kaempferolün güçlü antioksidan özellikleri olduğu ve potansiyel anti-kanser etki gösterebileceği bildirilmiştir (Lin ve diğerleri 2008, s. 634-646; Chen ve Chen 2013, s. 2099-2107). Luteolinin kanser hücre apoptozunu indüklediği ve aynı zamanda hücre proliferasyonunu azaltarak potansiyel anti-kanser özellik gösterdiği bildirilmiştir (Lin ve diğerleri 2008, s. 634-646). Buna ek olarak kaempferolün de proto-onko gen olan *c-Myc* baskıladığı ve bir tümör baskılayıcı geni olan *p53* ekspresyonunu artırdığı saptanmıştır. Ayrıca VEGF'yi azaltarak anjiyogenezi dolayısı ile kanser büyüme potansiyelini azalttığı bildirilmiştir (Chen ve Chen 2013, s. 2099-2107).

Corchorus olitorius L. ve kanser hücre hattı üzerinde yapılan kısıtlı sayıda araştırma mevcuttur. Bunlardan bir tanesi etanolik *Corchorus olitorius* L. ekstraktı ile hepatosellüler karsinom hücre hattı (HepG2) üzerine yapılan bir çalışmadır (Li ve diğerleri 2012, s. 9348-9360). Bu çalışmada hem HepG2 hücreleri, hem de kontrol olarak normal hepatosellüler hücreler (FL83B) kullanılmıştır. Çalışmada ekstraktın anti-proliferatif ve apoptotik etkileri test edilmiştir. Li ve diğerlerinin sonuçlarına göre ekstrakt HepG2 hücrelerinde doza bağlı anti-proliferatif etki göstererek apoptozu indüklemiştir (2012, s. 9348-9360). Ayrıca, HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı 12,5 µg/ml dozunda ekstrakt 24 saatlik inkübasyondan sonra %52'ye düşerken FL83B hücrelerinde ise sitotoksik etki yaratmadığı görülmüştür. Ekstraktı kıyaslama amaçlı kullanılan kemoterapötik bir ilaç olan cisplatin ise FL83B hücrelerinde daha fazla toksik etkiye neden olmuştur. Bunlara ek olarak, flow sitometre sonuçlarına göre *Corchorus olitorius* L. HepG2 hücrelerinde SubG1 fazında hücre ölümünü indüke etmiş ve pro-kaspaz 9 ve İnaktif kaspaz aktive edici Dnaz (ICAD) ekspresyonlarını azaltarak, kesilmiş poli ADP riboz polimeraz (PARP) ile kaspaz 3 seviyelerini 24 saatlik inkübasyondan sonra artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada mitokondriyel membran potansiyeline da bakılmış ve sitosolde sitokrom-c birikimine rastlanmıştır. Tüm bunların sonucunda yazarlar; *Corchorus olitorius* L. ekstraktının hepatosellüler kanser hücrelerinde sitotoksik etki

yarattığını belirtmiş fakat bu etkinin normal hepatosellüler hücrelerde izlenmediği, içerisinde bulunan fitol ve monogalaktoyaçilgliserol maddelerinin potansiyel kemopreventif etki yaratabileceği üzerinde durmuşlardır (Li ve diğerleri 2012, s. 9348-9360). Yapılan bu tez çalışmasında da *Corchorus olitorius* L. ekstraktlarının, özellikle metastatik Colo-741 hücrelerinde apoptozu indüklediği düşünüldüğünde, Li ve diğerleri ile benzer sonuçlara ulaşılmıştır.

Bir başka çalışmada ise *Corchorus olitorius* L. metanol ekstraktından fitol ve monogalaktoyaçilgliserol izole edilmiş ve bu maddelerin Raji hücrelerinde Epstein Bar Virus (EBV) tümör başlatıcısına anti-tümör etkileri test edilmiştir (Furumoto ve diğerleri 2002, s. 239-243). İzole edilen fitol 15 µg/ml, monogalaktoyaçilgliserol ise 30 µg/ml dozunda kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda tümör indüklenmiş Raji hücrelerinin canlılığında %20 azalmaya rastlanırken, normal Raji hücrelerinde böyle bir azalma görülmemiştir. Dolayısı ile *Corchorus olitorius* L. potansiyel anti-tümör kapasitesine sahip bir bitki olduğu bildirilmiştir (Furumoto ve diğerleri 2002, s. 239-243). Fakat, bu tez çalışmasında kullanılan *Corchorus olitorius* L. ekstraktlarının içeriğinde fitol veya monogalaktoyaçilgliserola rastlanmamıştır. Bunun sebebi, kullanılan bitkinin yetiştiği iklim, toprak ve su koşullarının farklı olması gösterilebilir.

Corchorus olitorius L. üzerine yapılan bir diğer çalışmada ise bitkinin hem yaprak ekstraktı hem de tohum ekstraktları kullanılmıştır (İşeri ve diğerleri 2013, s. 766-770). Bu iki ekstraktın multipl miyelom kanser hücrelerinde (ARH-77) etkileri araştırılmış ve yaprak ekstraktının toplam fenol içeriğinin tohum ekstraktına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Fakat, ARH-77 hücrelerinde tohum ekstraktının daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Her iki ekstraktın da dozları iki katına çıkarıldığında ARH-77 hücrelerindeki DNA hasarı artmış dolayısı ile genotoksik etkiye rastlanmıştır. Yazarlar yaprak ekstraktının içeriğinde bulunan fenolik bileşenlerden ötürü güçlü antioksidan özelliğinin kanser hücrelerinde potansiyel bir prooksidan etki yaratabileceğini ve hücrelerin çoğalmasını bu yoldan engelleyebileceğini düşünmüştür. Ayrıca tohum ekstraktının da içerdiği biyoaktif bileşenlerden ötürü kanser hücrelerinde oldukça güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (İşeri ve diğerleri 2013, s. 766-770). Yazarlar ayrıca *Corchorus*

olitorius L. ile aynı aileye mensup *Corchorus acutangulus* Lam türünde bulunan saikosaponin benzeri Corchorusin-D maddesinin lösemik hücrelerde apoptozu indüklediğini ve Corchorusin'in miyelom hücrelerinde de aynı etkiyi göstererek sitotoksikite neden olabileceği öngörmüştür (İşeri ve diğerleri 2013, s. 766-770; Mallick ve diğerleri 2010, s. 709-719). Bunlara ek olarak iki çalışmanın da verdiği dip notlarda *Corchorus olitorius* L.'in yüksek miktarda polifenol içeriğinin de pro-apoptotik etkiler gösterebileceğini ve dolayısı ile kanser hücrelerinin apoptozunda önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir (İşeri ve diğerleri 2013 s. 766-770; Li ve diğerleri 2012, s. 9348-9360).

Yapılan çalışma sayısının azlığından dolayı kesin bir sonuca varılamamakla birlikte *Corchorus olitorius* L.'in yüksek ihtimalle kanser hücrelerinde pro-apoptotik etki gösterdiği düşünülmektedir (İşeri ve diğerleri 2013 s. 766-770; Li ve diğerleri 2012, s. 9348-9360). Bu konu üzerinde daha fazla yapılacak araştırmalarla birlikte kesin olarak *Corchorus olitorius* L.'in anti-kanser özelliklerinin kanıtlanması ve günümüzde kanser hastalığı bu kadar yaygınken kemoterapik bir ilaç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (İşeri ve diğerleri 2013 s. 766-770; Li ve diğerleri 2012, s. 9348-9360). Bilim dünyasının bu konuyu aydınlatma ile ilgili daha fazla araştırma yapması ve belki de potansiyel ve yan etkileri minimal olan bir kanser karşıtı ilaç geliştirmesi önerilmektedir.

Bu tez çalışmasında *Corchorus olitorius* L.'in içeriğinde 5-kafeoil-kinik asit de bulunmuştur. Kahvede fazla miktarda bulunan 5-kafeoil-kinik asidin meme kanser hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada, 5-kafeoil-kinik asidin 72 saat inkübasyondan sonra hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı ($p<0,01$) ayrıca proto-onko gen olan *Ras*'ın aktive eden bağlanma yerlerini bloklayabilme kapasitesi olduğu bildirilmiştir (Palmioli ve diğerleri 2017, s. 2457-2466). Bunlara ek olarak MAPK yolağını baskılayarak hücre büyümesini de azalttığı bildirilmiştir (Palmioli ve diğerleri 2017, s. 2457-2466).

Kafeik ve 5-kafeoil-kinik asidin, HT-29 kolon adenokarsinom hücre hattında yapılan bir diğer çalışmada ise kafeik asidin 24 saat içerisinde HT-29 hücre canlılığını azalttığı fakat 5-kafeoil kinik asidin bu etkiyi 96. saatte gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, yapılan apoptoz testinde ise 5 ve 10 μ M dozunda 5- kafeoil-

kinik asitle inkübe edilen hücrelerde apoptozun indüklendiği gözlemlenmiştir. Hücre siklusu arresti sonuçları ise bu fenolik asidin G0/G1 fazında arreste neden olduğu ve hücre bölünme ve büyümesini engellediği ortaya konulmuştur. 5-kafeoil kinik asit HT-29 hücre içerisine yaklaşık 30 dakika içerisinde alınmış ve metabolizasyon başlamıştır. Yazarlar bu olayın hücre apoptozunun indüklenmesinde rol oynayabileceğini göz önünde bulundurmuş ve 5-kafeoil-kinik asidin doza bağlı değil ama zamana bağlı etkili olabileceğini bildirmişlerdir (Murad ve diğerleri 2015, s. 532-542).

Yapılan bir diğer çalışmada ise iki farklı kolon kanser hücre hattı kullanılmıştır. Bunlar; HCT116 (kolon karsinom) ve HT-29 (kolon adenokarsinom) hücre hatlarıdır. Bu hatlarda klorojenik asidin etkilerine bakılmış ve klorojenik asidin doza bağlı olarak kolon kanser hücrelerinde hücre içi ROS seviyelerini artırarak hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. Hücre canlılığını azaltmada HCT116 hücrelerinde daha yüksek etli gösteren klorojenik asit ayrıca her iki hücre hattında da S fazında arreste sebep olmuştur. Diğer bir taraftan da klorojenik asit Nfr2 ve hem oksijenaz (HO-1) gibi antioksidan sistemleri aktive etmiş fakat buna rağmen kanser hücrelerinde ROS üretimi ile birlikte, hücre canlılığını azaltmayı başarmıştır. Hücre içi ROS birikimin DNA hasarına neden olup apoptozu indükleyebileceğini tartışan yazarlar, klorojenik asit ile birlikte fosforile olmuş p53 aktivitesinde de artışa rastlamışlardır (Hou ve diğerleri 2017, s. 59-65). *Corchorus olitorius* L.'in içeriğinde yüksek miktarlarda bulunan klorojenik asidin bu özellikleri, *Corchorus olitorius* L.'in antioksidan aktivitesini artırmaktadır. Dolayısı ile, bu tez çalışmasının sonuçlarına, klorijenik asit, antioksidan aktivitesi ile kolorektal kanser hücrelerinde pro-apoptotik etki görünmesine katkıda bulunmuştur.

Bir diğer çalışmada ise klorojenik asidin 30 ve 50 μ M dozunda A549 akciğer kanser hücre canlılığını %40 kadar azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada *Bax*, *Bcl2* ve *CASP3* gen ekspresyonları ile birlikte Western blotting tekniği ile aynı genlerin protein ekspresyonlarında da anlamlı derecede artış görülmüştür. Yüksek dozlarda (100-150 μ M) verilen klorojenik asidin ayrıca apoptozu da indüklediği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra p38 gen ekspresyonunu artırdığı ve bununla birlikte ROS apoptozda rol oynadığı yazarlar tarafından tartışılmıştır. Çalışmada kanser kök

hücre seviyelerinde de anlamlı bir azalış görülmüştür. Yazarlar, klorojenik asidin güçlü bir antioksidan olmasından ötürü anti-kanser özellikleri gösteren potansiyel bir polifenol olduğunu bildirmiştir (Yamagata ve diğerleri 2018, s. 9-19). Yapılan bu tez çalışmasında ise, *Corchorus olitorius* L. ekstraktlarının klorojenik asit alt grubuna ait kafeoil kinik asit türevlerini içerdiği gösterilmiş ve yukarıda tartışılan olası mekanizmalar sonucu ekstraktların kolon kanser hücrelerinde potansiyel anti-kanser etkiler gösterebileceği üzerinde durulmuştur.

Yapılan bir çalışmada manuka balının içeriğinde en fazla bulunan polifenolun kersetin olduğu belirlenmiş ve HCT116 ve metastatik kolon kanser hücre hattı olan LoVo hücrelerin üzerinde etkilerine bakılmıştır. Bu çalışmada doz ve zamana bağlı olarak Manuka balının her iki hücre hattında da sitotoksik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, balın hücreler üzerinde apoptotik etki yarattığı ve bizim sonuçlarımız ile paralel olarak metastatik kanser hücrelerinde daha fazla apoptoz görüldüğü bildirilmiştir. Bir tümör suprasör geni olan p53, kaspaz-3 ve apoptoza; kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonunu artırması ile katkı koyan, c-PARP ekspresyonlarının bal ile inkübasyondan sonra arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca anti-apoptotik protein olan Bcl2 mRNA ekspresyonu azalırken, Bax, FasL ve sitokrom-c protein ekspresyonlarında artış görülmüştür. Bu sonuçlar yapılan mevcut çalışma ile benzerdir. Kersetin içeriği yüksek Manuka balının hem intrinsik hem de ekstrinsik yolak ile apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Afrin ve diğerleri 2018, s. 2145-2157). Ayrıca, Hou ve diğerlerinin yaptığı çalışma sonucundaki gibi kersetinden zengin balın S fazında hücre siklu arrestine neden olduğu gözlemlenmiştir (2017, s. 59-65; Afrin ve diğerleri 2018, s. 2145-2157).

Bir diğer çalışmada kersetinin *in vitro* ve *in vivo* anti-kanser etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda kersetin doza ve zamana bağlı olarak CT-29 (fare kolon kanser) hücrelerinde apoptozu indüklemiştir (120 µM). Fakat devamında yapılan *in vivo* deneylerde kersetinin yüksek dozlarda verildiğinde (100-200 mg/kg) tümör büyümesini azalttığı ve hayatta kalma oranlarını artırdığı bildirilmiştir (Hashemzaei ve diğerleri 2017, s. 819-828). Yapılan bir diğer çalışmada ise kolorektal adenokarsinom hücre hattı HCT15 ve HT-29 kıyaslanmıştır. Kersetin ile inkübasyon sonucunda HT-29 hücrelerinin hücre canlılığı daha az bulunmuştur.

Yüksek dozlarda verilen kersetinin bile (80 μ M) normal kolon hücrelerine zarar vermeyeceği bildirilmiştir. Apoptoz sadece HT-29 hücrelerinde indüklenmiş ve ayrıca bizim çalışmamıza paralel olarak kaspaz-3 ve sitokrom-c aktivasyonu anlamlı derecede artış göstermiştir. Hücre içi ROS üretimi ve COX2 gen ekspresyonunun artışının da apoptozu indükleyebileceği üzerine yorum yapılmıştır.

Kersetinle ilgili yapılan bir diğer çalışmada ise benzer sonuçlara rastlanmış kersetin hüce içi ROS üretimini artırarak apoptozu indüklemiştir. Yazarlar iki farklı kolon kanser hücre hattını incelemiş ve kersetinin p53 mutasyonu olan HT-29 hücrelerinde apoptozu indüklemeyi başatabildiği bildirilmiştir. Yazarlar çalışmanın sonucunda kersetinin hücre içi ROS seviyelerini artırarak Sestrin 2 transkripyonunu ve AMPK fosforilasyonunu artırdığı ve mTOR yolağını inhibe ettiğini ve kanser hücrelerinde apoptozu neden olduğunu gözlemlemiştir (Kim ve diğerleri 2013, s. 264-270).

Yapılan bir diğer çalışmada ise yeni bir kersetin türevi olan TEF'in HCT116 hücrelerindeki apoptotik etkilerine bakılmıştır. Çalışmada, kersetinin 50 μ M dozunda normal kolonik hücrelerde sitotoksik etki yarattığı görülürken, türevi olan TEF'in yüksek dozlarda dahi sitotoksik etki yaratmadığı bildirilmiştir. Ayrıca yazarlar, TEF'in doza bağlı apoptotik etki gösterdiği ve bunu da endoplazmik retikulum (ER) aracılı yaptığı, salınan Ca^{+2} ile birlikte JNK yolağının aktive olduğu gözlemlenmiştir. Bu yolağın aktive olması Bcl2 anti-apoptotik ailesinin salınımı baskılarken, Bax ve mitokondriyel membran potansiyelinin kaybı ile sitokrom-c'nin salınımı artırmıştır. Kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün de aktive olduğunu gözlemleyen yazarlar, apoptozun intrinsik yolak ile gerçekleştiği sonucuna varmışlardır. Yazarların TEF'in elektron transport zincirine bağlı ROS üretimini artırma kapasitesi ile yolaklarda değişikliklere sebep olarak apoptozu indüklediğini, ayrıca TEF ile inkübe edilen hücrelerde lipid peroksidasyonun da fazla olduğunu bunun da ROS üretimine katkı koyduğunu bildirmişlerdir. TEF'in yapısal olarak kersetine göre lipofilitesi ve biyoyararlılığının daha fazla olduğunu belirten yazarlar, potansiyel bir kemoterapötik bir ajan olabileceği sonucuna varmıştır (Khan ve diğerleri 2016, s. 789-799). *Corchorus olitorius* L.'in yüksek kersetin içerdiği göz önüne alındığında, *Corchorus*

olitorius L. ekstraktlarının bu tez çalışmasında gösterdiği anti-tümör ve pro-apoptotik etkilerine kersetinin de katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan tez çalışmasında *Corchorus olitorius* L. ekstraktlarının 1,3-dikafeoilkinik asit içerdiği de görülmüştür. Bu bileşenin bir diğer adı sinarindir. Sinarin özellikle enginar da bol miktarda bulunan hidroksi sinammik asit grubunda bulunan bir fenolik bileşiktir (Pulito ve diğerleri 2015, s. 18134-18150). Enginar ekstraktı ile yapılan bir çalışmada, içeriğinin kafeik asitlerden zengin olduğu bildirilmiştir. Meme kanseri hücre hattında bakılan etkilerinde yüksek dozlarda 24 saat inkübasyon sonucunda enginar ekstraktı kaspaz-9 aktivitesini artırmıştır. Ayrıca araştırmacılar düşük dozlarda fakat sürekli olarak inkübe edilen hücrelerde de apoptotik etkiye rastlamışlardır. Ayrıca hücre içi süperoksit anyonlarının artışı gözlemlenmiş ve dolayısı ile ROS üretiminin artmış olduğu bildirilmiştir (Mileo ve diğerleri 2015, s. Epub). Bir diğer çalışmada ise sinarinden zengin enginar ekstraktının akciğer kanseri hücrelerinde doza bağlı olarak apoptozu indüklediğini ve kaspaz-3,7 ve PARP kırılmalarını anlamlı bir şekilde artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca düşük dozlarda uygulanan enginar ekstraktının (6-12 µg/ml) bile hücre migrasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı ve metastazı engelleyebileceği gösterilmiştir. Bunlara ek olarak p38 MAPK yolağını, p53 ve Bax proteinlerini aktive ederek kanser hücrelerinin apoptoza girmesini sağladığı bildirilmiştir (Pulito ve diğerleri 2015, s. 18134-18150).

Sadece DCM fazının içeriğinde bulunan kumarik asit türevinin de potansiyel anti-kanser etkileri olduğu görülmüştür (Jaganathan ve diğerleri 2013, s. 7726-7734; Roy ve diğerleri 2016, s. 4019-4023). Kumarik asit ve kolon kanser hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada HCT15 ve HT-29 hücre hatları kullanılmış ve 1400 µmol/l dozunda HCT15 hücrelerinde ve 1600 µmol/l miktarında 48 saat inkübe edilen kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca sub-G1 fazında hücre siklusu arrestine neden olduğu ve kanser hücrelerindeki ROS üretiminde artış yarattığı görülmüştür. Bunlara ek olarak yazarlar mitokondriyel membran potansiyelinde azalma da tespit etmiştir, fakat apoptozda görev alan diğer proteinlerin ekspresyonunu araştırmamışlardır (Jaganathan ve diğerleri 2013, s. 7726-34). HCT15 hücrelerinde yapılan bir diğer çalışmada ise 220 µg/ml dozunda kumarik asit ile inkübe edilen hücrelerde, hücre canlılığı %50 oranında azalmıştır. Buna ek

olarak 200 µg/ml EGFR ekspresyonunu azalttığı yazarlar tarafında bildirilmiştir (Roy ve diğerleri 2016, s. 4019-4023). Yapılan araştırmalara göre kumarik asidin apoptozu indüklenme kapasitesi olduğu belirlenmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında ise da her iki hücre hattında da DCM fazının kaspaz-3'ü aktive ettiği görülmüş ve *Corchorus olitorius* L. ekstraktının içerdiği fenolik asitlerin buna katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

Corchorus olitorius L.'in oksidatif stres üzerine etkileri, ratlara ağır metaller verilmesiyle birlikte birkaç farklı çalışmada incelenmiştir (Dewanjee ve diğerleri, 2013a, s. 78-91; Dewanjee ve diğerleri 2013b, s. 188-198; Das ve diğerleri 2010, s. 65-69). Dewanjee ve diğerlerinin yaptığı çalışmada kadmiyumun ratlar üzerinde yarattığı oksidatif stres ve *Corchorus olitorius* L. ekstraktının koruyucu rolü incelenmiştir (Dewanjee ve diğerleri 2013a, s. 78-91). Beş farklı gruba bölünen 30 ratın iki grubu 50 ve 100 mg/kg olmak üzere *Corchorus olitorius* L. yaprak ekstraktı gruplara kadmiyum verilemeye başlamadan beş gün önce verilmeye başlamıştır (Dewanjee ve diğerleri 2013a, s. 78-91). Sonuçlar, yine birçok çalışmada olduğu gibi doza bağlı olarak olumlu yanıt göstermiş ve *Corchorus olitorius* L. ekstraktı kadmiyum toksikasyonunu çeşitli mekanizmalar ile önlemeyi başarmıştır. Bu mekanizmalar yukarıda da bahsedildiği üzere oksidatif stresi önleyebilme özelliği ile elde edilmiştir. Yazarlar bunu TBAR seviyelerine bakarak ileri sürmüş ve özellikle 100 mg/kg grubunda TBAR seviyelerinin düşüş gösterdiği ve *Corchorus olitorius* L.'in kadmiyum intoksikasyonunu gerçekleştirme kapasitesi olduğunu bildirilmiştir. (Dewanjee ve diğerleri 2013a, s. 78-91). Çok benzer bir araştırma dizaynı aynı şekilde ağır metallerden bir tanesi olan kurşun üzerine yine Dewanjee ve ekibi tarafından yapılmıştır (2013b, s. 188-198). Bu çalışmada da 50 ve 100 mg/kg başına *Corchorus olitorius* L. ekstraktının doza bağlı olarak GSH seviyelerini artırdığı, ayrıca çeşitli organlarda kurşun seviyesini azalttığı da bildirilmiştir. TBAR seviyelerindeki azalış, *Corchorus olitorius* L. ekstraktının fenolik içeriğinden dolayı anti-oksidan özellik gösterdiği bildirilmiştir (Dewanjee ve diğerleri 2013b, s. 188-198). Buna ek olarak Das ve diğerlerinin yaptığı benzer bir çalışmada *Corchorus olitorius* L. yaprak ekstraktının arseniğin yarattığı oksidatif stresi engellediği görülmüştür (Das ve diğerleri 2010, s. 65-69). Bu çalışmada 30 rat kullanılmış ve sadece beyinlerindeki oksidatif stres, beynin oksidatif strese çok açık bir organ

olduğu için (içeriğindeki PUFA'dan ötürü) incelenmiştir. Araştırmanın sonucunda ise SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin seviyelerinde artış ve lipid peroksidasyonunda azalış saptanmıştır. Bu azalışın ise *Corchorus olitorius* L. ekstraktının içeriğindeki bileşenlerin oksidan temizleme özelliğinden ötürü olduğu yazarlarca doğrulanmıştır (Das ve diğerleri 2010, s. 65-69). Tüm bu çalışmaların sonucunda *Corchorus olitorius* L. ekstraktının doza bağlı olarak ağır metallerin verdiği özellikle oksidatif hasarı engelleyebileceği görülmüştür. Bu tez çalışmasında gösterilmese dahi, *Corchorus olitorius* L.'in bir diğer anti-tümör özelliği de oksidatif stresi azaltıp, DNA hasarını azaltarak, malignant transformasyonu engellemesi yönünde olabilir

Corchorus olitorius L.'in anti-inflamatuvar etkilerine bakıldığı çalışmalarda ise ekstraktın doza serbest radikal süpürme aktivitesinde artış görülmüştür. Bu da yine bitkinin içerisinde bulunan mevcut polifenollerin güçlü antioksidan etki göstermesinden dolayıdır (Yan ve diğerleri 2013, s. 1008-1014). Ayrıca, lipopolisakkarit ile inflamasyon indüklemiş makrofaj hücrelerinde doza bağlı olarak PGE₂ miktarında anlamlı bir azalış görülmüştür (50, 100, 200 µg/ml). Yazarlar *Corchorus olitorius* L.'in içerdiği fenolik bileşenlerin çok güçlü antioksidan etki göstererek, inflamatuvar yolakları baskıladığını ve anti-inflamatuvar olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir (Yan ve diğerleri 2013, s. 1008-1014).

Bir diğer ratlar üzerinde yapılan çalışmada ise *Corchorus olitorius* L.'un vasküler permeabiliteyi azalttığı ve ayrıca Carrageenan ile indüklenmiş ödemi 250 mg/kg dozunda azalttığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, antioksidan molekül olan glutatyon ve antioksidan enzim olan SOD seviyelerini anlamlı derecede artırmıştır. Güçlü bir pro-inflamatuvar göstergeç olan TNFα seviyelerinde de immunohistokimyasal analizden sonra orta derecede boyanma saptanmıştır. Ayrıca yine pro-inflamatuvar yolağın aktive olmasında ve pro-inflamatuvar prostoglandin türlerinin üretilmesinde rol oynayan COX1 ve 2 enzimlerinde de anlamlı derecede azalış saptanmıştır (Handoussa ve diğerleri 2013, s. 1204-1216). Bu yapılan çalışmaların tümü *Corchorus olitorius* L.'in hem antioksidan hem de anti-inflamatuvar özelliklere sahip bir bitki olduğunu ve bu özelliklerini içerisinde bulunan polifenollerden sağladığını bildirmiştir. Dolayısı ile *Corchorus olitorius* L.

hem anti-kanser, hem de kanser oluşumunu koruyucu mekanizmalar üzerinden sağlık üzerinde bir çok pozitif etkisinin olduğu yapılan tüm bu çalışmaların ışığında benimsenmiştir.

Tüm bu çalışmalar, *Corchorus olitorius* L. ekstraktlarında bulunan fitokimyasalların, farklı kolon kanseri hücre hatlarında apoptoz indüklenmesinde etkili olduğunu göstermiştir. Kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonu, yıllar boyunca kanser tedavisinin bir parçası olmuştur (Stoian ve diğerleri 2014, s. 160-164). Bununla birlikte, hücre ölümünü tetikleyen apoptotik yol, farklı kanser hücrelerinde farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin, *Corchorus olitorius* L., hepatoselüler karsinom hücrelerinde intrinsik yolla apoptozu indüklemiştir, ancak bizim sonuçlarımız, özellikle su fazı ekstrelerinin, her iki hücre hattında hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yolları tetiklediğini göstermiştir. Genel olarak, her iki ekstraktın da Colo-741, metastatik kolon adenokarsinom hücre hatlarında daha etkili olduğu görülmüştür. Metastatik kolorektal karsinomlarda apoptotik hücrelerin daha yüksek olması, metastatik hücrelerde mutasyonların primer tümörlerden daha fazla birikmesi beklendiği için ve bu hücrelerin daha fazla hücresel stres altında olması ile açıklanabilir (Zeitoun ve diğerleri 2008, s. 3609-3612). *Corchorus olitorius* L. ekstrelerindeki fitokimyasallarla birleştiğinde, primer kolorektal adenokarsinom hücrelerinin aksine daha büyük bir hücresel stres altında olan metastatik hücrelerde apoptoz daha kolay bir şekilde tetiklenebilir (Zeitoun ve diğerleri 2008, s. 3609-3612).

6.0 SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser insidansı ve mortalitesi dünyada oldukça yüksektir ve daha az invaziv ve daha az hasar verici olan bitkisel ilaçlar ile tedaviye yaklaşım fikri son dönemlerde oldukça öne sürülmektedir. Yapılan bu tez çalışmasında *Corchorus olitorius* L. DCM ve su fazı ekstraktlarının ilk kez olarak kolon adenokarsinom hücrelerinde *in vitro* pro-apoptotik aktivitesi araştırılmıştır. *Corchorus olitorius* L. yapraklarının iki farklı ekstraktının da her iki hücre hattında 50 µg/ml konsantrasyonda apoptozu indüklediği görülmüştür. Sonuç olarak, ekstraktlar, kolon kanser hücre hatlarında, özellikle de metastatik kolon adenokarsinom hücre hattında daha etkili olarak apoptoza neden olmuştur. Bu çalışma, *Corchorus olitorius* L. ekstraktlarının potansiyel anti-kanser etkilerine ve kolon kanseri tedavisine öncü olarak kullanılma olasılığına sahip olabileceğini göstermektedir. Yapılan bu tez çalışması, *Corchorus olitorius* L. ekstraktlarının apoptotik etkilerinin farklı kanser hücre hatları ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmelidir. Ayrıca, yapılan bu çalışma gelecekteki *Corchorus olitorius* L. ile ilgili çalışmalara bir rehber olacaktır.

Yapılan tez çalışmasının sonuçlarını güçlendirmek ve ileride konu ile ilgili araştırılabilecek adımlar aşağıdaki gibidir.

- Apoptotik yolda bulunan ve kullanılan antikorların, protein ekspresyonlarının araştırılması,
- Apoptozun hangi hücre siklusunda arreste neden olduğunun saptanması,
- TUNEL ve İmmunositokimya analizleri için hücrelerin farklı sürelerde ekstraktlar ile inkübe edilmesi ve sonuçların kıyaslanması,
- *Corchorus olitorius* L. bitkisinin içeriğindeki polifenollerin miktar tayini ve ekstraktlardan izole edilen polifenollerin, hücre hatları üzerinde ayrıca denenmesi ve biyo-aktivitelerinin bu yönde araştırılması,
- *Corchorus olitorius* L. bitkisinin anti-kanser etkisinin *in vivo* incelenmesi,

- Apoptozun indüklenmesinde önemli rol oynayan sinyalizasyon yollarının belirlenmesi, bilimsel kanıtları artırmak adına önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdalla, M.M., Yousef, A.M. ve Abd el-Aal, M.I. (2016). Effect of Cooking on Nutritive Value of Jew's Mallow (*Corchorus olitorius* L.) and Mallow (*Marva palviflora* L.) Leaves. *Alexandria Journal of Food Science & Technology*, 13(2), 1-10.
- ACS, American Cancer Society (2017) Colorectal Cancer. Erişim tarihi 29.05.2018 <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer.html>
- Adegoke, A.A. ve Adeboye-Tayo, B.C. (2009). Phytochemical composition and antimicrobial effects of *Corchorous olitorius* leaf extracts on four bacterial isolates. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(3), 155-159.
- Ademiluyi, A.O., Oboh, G., Aragbaiye, F.P., Oyeleye, S.I. ve Ogunsuyi, O.B. (2015). Antioxidant properties and in vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of phenolics constituents from different varieties of *Corchorus* spp. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 10, 278-287.
- Afrin, S., Giampieri, F., Gasparini, M., Forbes-Hernandez, T.Y., Cianciosi, D., Reboredo-Rodriguez, P. ve diğeri. (2018). The inhibitory effect of Manuka honey on human colon cancer HCT-116 and LoVo cell growth. Part 1: the suppression of cell proliferation, promotion of apoptosis and arrest of the cell cycle. *Food Function*, 9, 2145-2157.
- Alam, Md.N., Almoyad, M. ve Fazlul, H. (2018). Polyphenols in Colorectal Cancer: Current State of Knowledge including Clinical Trials and Molecular Mechanism of Action. *BioMed Research International*, Article ID 4154185, Epub.

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, P. (2015). *The Cell*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group
- Akinwumi, K.A., Osifeso, O.O., Jubril, A.J., Adedjoja, A.W., Ogunbiyi, E.T., Odebo, F.M. ve diğerleri. (2016). Potassium Dichromate Toxicities: Protective Effect of Methanol Extract of *Corchorus olitorius* in Albino Rats. *Journal of Medicinal Food*, 19, 457-465.
- Azuma, K., Nakayama, M., Koshioka, M., Ippoushi, K., Yamaguchi, Y., Kohata, K. ve diğerleri. (1999). Phenolic Antioxidants from the Leaves of *Corchorus olitorius* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3963-3966.
- Binefa, G., Rodriguez-Moranta, F., Teule, A. ve Medine-Hayas, M. (2014). Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 6786-6808.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D.B. ve Holden J.M. (2011). USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods (rapor no: 3). Beltsville Human Nutrition Research Center: United States Department of Agriculture.
- Boesch-Saadatmandi, C., Loboda, A., Wagner, A.E., Stachurska, A., Jozkowicz, A., Dulak J. ve diğerleri. (2011). Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(3), 293-299.
- Butt, M.S. ve Sultan, M.T. (2011). Coffee and its Consumption: Benefits and Risks. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 363-373.

- Cairrao, F. ve Domingos, P.M. (2010). Encyclopedia of Life Sciences. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Chen, A.Y. ve Chen, Y.C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 138, 2099-2107.
- Dahm, C.C., Keogh, R.H., Spencer, E.A., Greenwood, D.C., Key, T.J., Fentiman, I.S. ve diğerleri. (2010). Dietary Fiber and Colorectal Cancer Risk: A Nested Case-Control Study Using Food Diaries. *Journal of National Cancer Institute*, 102, 614-626.
- Darband, S.G., Kaviani, M., Yousefi, B., Sadighparvar, S., Pakdel, F.G., Attari, J.A. ve diğerleri. (2018). Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 233, 6544-6560.
- Das, A.K., Bag, S., Sahu, R., Dua, T.K., Sinha, M.K., Gangopadhyay, M. ve diğerleri. (2010). Protective effect of Corchorus olitorius leaves on sodium arsenite-induced toxicity in experimental rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 326-335.
- Das, A.K., Dewanjee, S., Sahu, R., Dua, T.K., Gangopadhyay, M. ve Sinha, M.K. (2010). Protective effect of Corchorus olitorius leaves against arsenic-induced oxidative stress in rat brain. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29, 64-69.
- Das, A.K., Sahu, R., Dua, T.K., Gangopadhyay, M., Sinha, M.K. ve Dwanjee, S. (2010). Arsenic-induced myocardial injury: Protective role of Corchorus olitorius leaves. *Food Chemical Toxicology*, 48, 1210-1217.

- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Sahu, R. ve Karmakar, S. (2013). Cadmium induced pathophysiology: Prophylactic role of edible jute (*Corchorus olitorius*) leaves with special emphasis on oxidative stress and mitochondrial involvement. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 188-198.
- Dewanjee, S., Sahu, R., Karmakar, S. ve Gangopadhyay, M. (2013). Toxic effects of lead exposure in Wistar rats: Involvement of oxidative stress and the beneficial role of edible jute (*Corchorus olitorius*) leaves. *Food Chemical Toxicology*, 55, 78-91.
- D'Andrea, G. (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?. *Fitoterapia*, 106, 256-271.
- Duke, J. A. (1983) Handbook of Energy Crops; *Corchorus Olitorus* L. Erişim tarihi 23.11.2015
https://hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Corchorus_olitorius.html
- FAO, Food and Agriculture Organizations of United Nations (2015) Future Fibres; Jute. Erişim tarihi 23.11.2015
<http://www.fao.org/economic/futurefibres/fibres/jute/en/>
- Fearon, E.R. ve Vogelstein B. (1990). A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767.
- Fukudo, T., Majumder, K., Zhang, H., Turner, P.V., Matsui, T. ve Mine, Y. (2016). Adenine Inhibits TNF- α Signaling in Intestinal Epithelial Cells and Reduces Mucosal Inflammation in a Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis Mouse Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 4227-4234.

Furumoto, T., Wang, R., Okazaki, K., Hasan, A.F.M.F., Ali, M.I., Kondo, A. ve diğerleri. (2002). Antitumor Promoters in Leaves of Jute (*Corchorus capsularis* and *Corchorus olitorius*). *Food Science and Technology Research*, 8, 239-243.

GCO, Global Cancer Observatory (2018) Cancer Today. Erişim tarihi: 31.05.2018
https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?mode=cancer&mode_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color_palette=default

Grady, W.M. ve Pritchard, C.C. (2014). Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicologic Pathology*, 42, 124-139.

Guo, H., Tian, T., Nan, K. ve Wang, W. (2010). p57: A multifunctional protein in cancer. *International Journal of Oncology*, 36, 1321-1329.

Gupta, M., Mazumder, U.K., Pal, D.K. ve Bhattacharya, S. (2003). Onset of puberty and ovarian steroidogenesis following administration of methanolic extract of *Cuscuta reflexa* Roxb. Stem and *Corchorus olitorius* Linn. seed in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 55-59.

Hagland, H.R., Berg, M., Jolma, I.W., Carlsen A. ve Soreide, K. (2013). Molecular Pathways and Cellular Metabolism in Colorectal Cancer. *Digestive Surgery*, 30, 12-25.

Handoussa, H., Hanafi, R., Eddiasty, I., El-Gendy, M., El-Khatip, A., Linscheid, M. ve diğerleri. (2013). Anti-inflammatory and cytotoxic activities of dietary phenolics isolated from *Corchorus olitorius* and *Vitis vinifera*. *Journal of Functional Foods*, 5, 1204-1216.

- Hashemzaei, M., Far, A.D., Yari, A., Heravi, R.E., Tabrizian, K., Taghdisi, S.M. ve diğeri. (2017). Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, 38, 819-828.
- Hou, N., Liu, N., Han, J., Yan, Y. ve Li, J. (2017). Chlorogenic acid induces reactive oxygen species generation and inhibits the viability of human colon cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, 28, 59-65.
- Huerta, S., Goulet, E.J. ve Livingston, E.J. (2006). Colon Cancer and Apoptosis. *The American Journal of Surgery*, 191, 517-526.
- IJSG, International Jute Study Group (2003) Jute, Kenaf & Roselle Plants. Erişim tarihi 22.11.2015. <http://jute.org/plant.html>
- Islam, M. (2013). Biochemistry, Medicinal and Food values of Jute (*Corchorus capsularis* L. and *C. olitorius* L.) leaf: A Review. *International Journal of Enhanced Research in Science Technology & Engineering*, 2(11), 35-44.
- İşeri, Ö.D., Yurtcu, E., Sahin, F.İ. ve Mehmet, H. (2013). *Corchorus olitorius* (jute) extract induced cytotoxicity and genotoxicity on human multiple myeloma cells (ARH-77). *Pharmaceutical Biology*, 51(6), 766-770.
- Jaganathan, S.K., Supriyanto, E. ve Mandal, M. (2013). Events associated with apoptotic effect of p -Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 19, 7726-7734.
- Khan, F., Niaz, K., Magbool, F., Hassan, F.I., Abdollahi, M., Venkata, K.C.N ve diğeri. (2016). Molecular Targets Underlying the Anticancer Effects of Quercetin: An Update. *Nutrients*, 8, e-pub.

- Khan, I., Paul, S., Jakhar, R., Bhardwaj, M., Han, J. ve Kang, S.J. (2016). Novel quercetin derivative TEF induces ER stress and mitochondria-mediated apoptosis in human colon cancer HCT-116 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 8, 789-799.
- Kim, G.T. Lee, S.H. ve Kim, Y.M. (2013). Quercetin Regulates Sestrin 2-AMPK-mTOR Signaling Pathway and Induces Apoptosis via Increased Intracellular ROS in HCT116 Colon Cancer Cells. *Journal of Cancer Prevention*, 18, 264-270.
- Laplane, M. ve Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149, 274-293.
- Li, G.J., Huang, S.Y., Wu, M.Y., Chen, Y.C., Tsang, S.F., Chyuan, J.H. ve diğerleri. (2012). Induction of Apoptosis by Ethanolic Extract of Corchorus olitorius Leaf in Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cells via a Mitochondria-Dependent Pathway. *Molecules*, 17, 9348-9360.
- Li, H., Habasi, M., Xie, L. ve Aisa, H.A. (2014). Effect of Chlorogenic Acid on Melanogenesis of B16 Melanoma Cells. *Molecules*, 19, 12940-12948.
- Li, X.L., Zhou, J., Chen, Z.R. ve Chng, W.J. (2015). p53 mutations in colorectal cancer- molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World Journal of Gastroenterology*, 21, 84-93.
- Li, Y.H., Niu, Y.B., Sun, Y., Zhang, F., Liu, C.X., Fan, L. ve diğerleri. (2015). Role of phytochemicals in colorectal cancer prevention. *World Journal of Gastroenterology*, 21(31), 9262-9272.

- Liang, N. ve Kitts, D.D. (2015). Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions [Elektronik Sürüm]. *Nutrients*, 8, E16.
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X. ve Shen, H.M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 8, 634-646.
- Liu, Y.J., Zhou, C.Y., Qiu, C.H., Lu, X.M. ve Wang, Y.T. (2013). Chlorogenic acid induced apoptosis and inhibition of proliferation in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Molecular Medicine Reports*, 8(4), 1106-1110.
- Lushchak, V.I. (2011). Environmentally Induced Oxidative Stress in Aquatic Animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13–30.
- Lushchak, V.I. (2014). Free Radicals, Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress and Its Classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, e-pub.
- Mahmoud, A.S., Thao, N. Ve Mario, A. (2016). Corchorus Olitorius Linn: A Rich Source of Ω 3-Fatty Acids. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 7, e-pub.
- Mallick, S., Ghosh, P., Samanta, S.K., Kinra, S., Pal, B.C., Gomes, A. ve diğerleri. (2010). Corchorusin-D, a saikosaponin-like compound isolated from Corchorus acutangulus Lam., targets mitochondrial apoptotic pathways in leukemic cell lines (HL-60 and U937). *Cancer chemotherapy and Pharmacology*, 66, 709-719.
- Marrazzo, G., Barbagallo, I., Galvano, F., Malaguarnera, M., Gazzolo, D., Frigiola, A. ve diğerleri. (2014). Role of dietary and endogenous antioxidants in diabetes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(12), 1599-1616.

- Mazumder, U.K., Gupta, M., Pal, D.K. ve Bhattacharya, S. (2003). Chemical and toxicological evaluation of methanol extract of *Cuscuta reflexa* Roxb. stem and *Corchorus olitorius* Linn. seed on hematological parameters and hepatorenal functions in mice. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 60(4), 317-323.
- Mileo, A.M., Di Venere, D., Abbruzzese, C. ve Miccadei, S. (2015). Long Term Exposure to Polyphenols of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Exerts Induction of Senescence Driven Growth Arrest in the MDA-MB231 Human Breast Cancer Cell Line. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, e-pub.
- Murad, L.D., Soares, N.C.P., Brand, C., Monteiro, M.C. ve Teodoro, A.J. (2015). Effects of Caffeic and 5-Caffeoylquinic Acids on Cell Viability and Cellular Uptake in Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Nutrition and Cancer*, 67, 532-542.
- NIH, National Cancer Institute (2018) Colorectal Cancer—Health Professional Version. Erişim tarihi: 31.05.2018.
<https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp>
- Oboh, G., Raddatz, H. ve Henle, T. (2009). Characterization of the antioxidant properties of hydrophilic and lipophilic extracts of Jute (*Corchorus olitorius*) leaf [Elektronik Sürüm]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60:sup2, 124-134.
- Owoyele, B.V., Owoyele, A.L., Alimi, M.L., Sanni, S.A. ve Oyoleke, S.A. (2015). Anti-inflammatory and antipyretic properties of *Corchorus olitorius* aqueous root extract in Wistar rats. *Journal of Basic Clinical Physiology and Pharmacology*, 26(4), 363-368.

- O'Leary, K.A., de Pascual-Teresa, S., Needs, P.W., Bao, Y.P., O'Brien, N.M. ve Williamson, G. (2004). Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation Research*, 511, 245-254.
- Pabla, B., Bissonnette, M. ve Konda, V.J. (2015). Colon cancer and the epidermal growth factor receptor: Current treatment paradigms, the importance of diet, and the role of chemoprevention. *World Journal of Clinical Oncology*, 6, 133-141.
- Pal, D.K., Mandal, M., Senthilkumar, G.P. ve Padhiari, A. (2006). Antibacterial activity of *Cuscuta reflexa* stem and *Corchorus olitorius* seed. *Fitoterapia*, 77, 589-591.
- Palmioli, A., Ciaramelli, C., Tisi, R., Spinelli, M., De Sanctis, G., Sacco, E. ve diğerleri. (2017). Natural Compounds in Cancer Prevention: Effects of Coffee Extracts and Their Main Polyphenolic Component, 5-O-Caffeoylquinic Acid, on Oncogenic Ras Proteins. *Chemistry:An Asian Journal*, 12, 2457-2466.
- Pan, P., Yu, J. ve Wang, L.S. (2018). Colon Cancer: What We Eat. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27, 243-267.
- Pandurangan, A.K. (2013). Potential Targets for Prevention of Colorectal Cancer: a Focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt Pathways. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14, 2201-2205.
- Phuwapraisirisan, P., Puksasook, T., Kokpol, U. ve Suwanborirux, K. (2009). Corchorusides A and B, new flavonol glycosides as α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Corchorus olitorius*. *Tetrahedron Letters*, 50, 5864-5867.

- Pulito, C., Mori, F., Sacconi, A., Casadei, L., Ferraiuolo, M., Valerio, M.C. ve diğ erleri. (2015). *Cynara scolymus* affects malignant pleural mesothelioma by promoting apoptosis and restraining invasion. *Oncotarget*, 6, 18134-18150.
- Ragasa, C.Y., Vivar, J.L.A., Tan, M.C.S. ve Shen, C. (2016). Chemical Constituents of *Corchorus olitorius* L. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8, 2085-2089.
- Rani, N., Velan, L.P.T., Viyajkumar, S. ve Arunachalam, A. (2015). An Insight into the Potentially Old-Wonder Molecule—Quercetin: the Perspectives in Foresee[Elektronik Sürüm]. *The Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine Press*.
- Raskov, H., Pommergaard, H.C., Burcharth, J. ve Rosenberg, J. (2014). Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 18151-18164.
- Roy, N., Narayanankutty, A., Nazeem, P., Valsalan, R., Babu, T.D. ve Mathew, D. (2016). Plant Phenolics Ferulic Acid and P-Coumaric Acid Inhibit Colorectal Cancer Cell Proliferation through EGFR Down-Regulation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17, 4019-4023.
- Salawu, S.O., Akindahunsi, A.A., Sanni, D.M., Decorti, G., Cvorovic, J., Tramer, F. Ve diğ erleri. (2011). Cellular antioxidant activities and cytotoxic properties of ethanolic extracts of four tropical green leafy vegetables. *African Journal of Food Science*, 5, 267-275.
- Steiner-Aseidu, M., Agbemafle, I., Setorglo, J., Danquah, A.O. ve Anderson, A.K. (2015). Carotenoids content of *Corchorus olitorius* and *Solanum*

macrocarpon - commonly used Ghanaian vegetables. *International Food Research Journal*, 21, 2063-2067.

Stoian, M., State, N., Stoica, V. ve Radulian, G. (2014). Apoptosis in colorectal cancer. *Journal of Medicine and Life*, 7, 160-164.

Suzuki, A., Fujii, A., Yamamoto, N., Yamamoto, M., Ohminami, H., Kameyama, A. ve diğerleri. (2006). Improvement of hypertension and vascular dysfunction by hydroxyhydroquinone-free coffee in a genetic model of hypertension. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 580, 2317-2322.

Taiwo, B.J., Taiwo, G.O., Olubiyi, O.O. ve Fatokun, A.A. (2016). Polyphenolic compounds with anti-tumour potential from *Corchorus olitorius* (L.) Tiliaceae, a Nigerian leaf vegetable. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26, 3404-3410.

Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.

Türkomp (2018). Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı, C Vitamini. Erişim tarihi 17.06.2018. http://www.turkomp.gov.tr/component_result-c-vitamini-32

USDA, United States Department of Agriculture (2015) National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28, Full Report (All Nutrients) 11231, Jute. Erişim tarihi 22.11.2015. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2981?fgcd=&manu=&lfacet=&format=Full&count=&max=35&offset=&sort=&qlookup=11231>

- Vu, T. ve Datta, P.K. (2017). Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers*, 9, Epub.
- Wang, C., Lisanti, M.P. ve Liao, D.J. (2011). Reviewing once more the c-myc and Ras collaboration: Converging at the cyclin D1-CDK4 complex and challenging basic concepts of cancer biology. *Cell Cycle*, 10, 57-67.
- Wang, X.W. ve Zhang, Y.J. (2014). Targeting mTOR network in colorectal cancer therapy. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 4178-4188.
- Wang, Z.J., Ohnaka, K., Morita, M., Toyomura, K., Kono, S., Ueki, T. ve diğerleri. (2013). Dietary polyphenols and colorectal cancer risk: The Fukuoka colorectal cancer study. *World Journal of Gastroenterology*, 19, 2683-2690.
- WHO, World Health Organization (2016). Obesity and Overweight. Erişim tarihi 06.01.2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- WCRF, World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (2018). Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer: A Global Perspective (Rapor no: 2018 update). [Dietandcancerreport.org](http://dietandcancerreport.org): World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research.
- Yagamata, K., Izawa, Y., Onodera, D. ve Tagami, M. (2018). Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 441, 9-19.
- Yan, Y., Li, J., Han, J., Hou, N., Song, Y. ve Dong, L. (2015). Chlorogenic acid enhances the effects of 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma

cells through the inhibition of extracellular signal-regulated kinases. *Anti-Cancer Drugs*, 26, 540-546.

Yan, Y.Y., Wang, Y.W., Chen S.L., Zhuang, S.R. ve Wang, C.K. (2013). Anti-inflammatory effects of phenolic crude extracts from five fractions of *Corchorus Olitorius* L. *Food Chemistry*, 138, 1008-1014.

Yang, S.Y., Sales, K.M., Fuller, B., Seifalian, A.M. ve Winslet, M.C. (2009). Apoptosis and colorectal cancer: implications for therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 15, 225-233.

Yen, G.C., Chen, H.Y. ve Peng, H.H. (2001). Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food and Chemichal Toxicology*, 39, 1045-1053.

Zeitoun, G., Mourra, N., Blache-Koch, H., Thomas, G. ve Olschwang, S. (2008). Genomic profile of colon cancer metastases. *Anticancer Research*, 28, 3609-3612.

Zhang, L. ve Yu, J. (2013). Role of apoptosis in colon cancer biology, therapy, and prevention. *Current Colorectal Cancer Reports*, 9, e-pub.

Zhao, Y., Wang, J., Ballevre, O., Luo, H. ve Zhang, W. (2012). Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. *Hypertension Research*, 35, 370-374.

EKLER

TEZDEN YAPILAN YAYINLAR, POSTERLER VE SÖZEL SUNUMLAR

Apoptotic Effects of *Corchorus olitorius* L. Leaf Extracts in Colon Adenocarcinoma Cell Lines

Günsu Soykut¹, Eda Becer², İhsan Çalış³, Sevinç Yücecan¹ and Seda Vatansever^{4,5}

¹Department of Nutrition and Dietetics, Near East University, Faculty of Health Sciences, Nicosia, Cyprus,

²Department of Biochemistry, Near East University, Faculty of Pharmacy, Nicosia, Cyprus,

³Department of Pharmacognosy, Near East University, Faculty of Pharmacy, Nicosia, Cyprus,

⁴Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Celal Bayar University, Manisa, Turkey,

⁵ Experimental Health Research Center of Health Sciences, Near East University, Nicosia, Cyprus

Abstract

Corchorus olitorius L. is a highly consumed plant in Cyprus and other Eastern Mediterranean countries and known as a medicinal food in many cultures. The aim of the study is to determine *in vitro* anticancer and apoptotic induction effects of dichloromethane (DCM) and aqueous *Corchorus olitorius* L. leaf extracts in primary (Colo-320) and metastatic (Colo-741) colon adenocarcinoma cell lines.. Cell growth and cytotoxicity were measured with MTT assay with five different concentrations of extracts in Colo-320 and Colo-741 cell lines. Apoptotic activities of *Corchorus olitorius* L. were investigated by immunocytochemistry using antibodies directed against to caspase-3, cytochrome-c and FasLigand (FasL). TUNEL assay was used to detect DNA fragmentation in both cell lines. Both DCM and aqueous phase of extracts at 50 µg/ml concentration were more effective at inhibiting Colo-320 and Colo-741 cell growth when compared with other dilutions. The number of TUNEL positive cells was significant in Colo-741 cells when compared with both control group and Colo-320 cell line. DCM phase extract significantly increased caspase-3 immunoreactivity while aqueous phase extract significantly increased cytochrome-c and FasLigand (FasL) immunoreactivities in Colo-320 cell lines. Both extracts were able to significantly increase caspase-3, cytochrome-c and FasL immunoreactivity in Colo-741 cells showing that both apoptotic pathways were triggered. Overall, *Corchorus olitorius* L. extracts induced apoptosis in both cancer cell lines while

being more effective in metastatic colon adenocarcinoma cell lines suggesting that the extracts might have potential anticancer effects and possibility to be used as precursor to phytomedicinal colon cancer treatment as oppose to chemotherapy.

Keywords: *Corchorus olitorius*, colon cancer, apoptosis, plant extract

Introduction

Corchorus olitorius L. is a plant which belongs to Tiliaceae family in botany. It is a dark green leafy vegetable, which is highly consumed in Cyprus, Eastern Mediterranean and Middle Eastern countries (1–3). *Corchorus olitorius* L. is known as a medicinal food in many cultures and has therapeutic effects such as being sedative, diuretic and laxative (4). In addition, according to folk remedy, *Corchorus olitorius* L. is beneficial for treatment of dysuria, cystitis and gonorrhoea (5).

Corchorus olitorius L. leaves contain macro and micronutrients as well as polyphenols (6–8). It is also found to be rich in antioxidant compounds such as caffeoylquinic acid, quercetin glycosides, vitamin E and omega-3 fatty acids (6–9). *In vivo* and *in vitro* studies had shown that *Corchorus olitorius* L. leaf extract has antioxidant properties and reduces oxidative stress due to its rich phytochemical content (7,8). Furthermore, ionone glycosides in *Corchorus olitorius* L. had shown to suppress histamine release and corchorifatty acids inhibited lipopolysaccharide-induced nitric oxide (NO) production in cultured mouse peritoneal macrophages (10).

It is estimated that colorectal cancer is the third most cause of cancer mortality in the world (11). The phytochemical constituents of ethnomedicinal edible plants in the maintenance of health and protection from cancer are also of interest in prevention and treatment of cancer (12,13). The use of traditional plants as anticancer drugs, by isolating potential bioactive molecules, is becoming a more popular side method than chemotherapy. (13). The previous studies had shown potential anticancer effect of *Corchorus olitorius* L. extract on human multiple myeloma and hepatocellular carcinoma cells (2,14). The specific effects of *Corchorus olitorius* L. extract in cancer cell viability and apoptosis in colon carcinoma cells still remains undefined. To the best of our knowledge, there are no reports addressing the effect of *Corchorus olitorius* L. extract in colon cancer.

Primary and metastatic forms of colon cancers might have different mutations. Some of the prominent mutations in primary colorectal cancers are also found in subsequent metastatic tumours.

However, there is also discordance between the primary tumour mutations and metastatic tumour mutations (15). Metastatic tumours have more p53, KRAS and BRAF mutations, which induce cell proliferation, differentiation and evasion of apoptosis (16,17). In addition, overexpression of growth factors might be a cause of transformation of primary into metastatic colon cancer (16).

Apoptosis plays key a role in final decision of cancer cell's fate. It is necessary for multicellular systems where the body gets rid of deteriorated cells that might transform into malignant cancerous formations (18,19). Activation of intrinsic pathway requires internal stimuli which increases mitochondrial permeability and causes release of cytochrome-c into the cytosol. The release of cytochrome-c triggers apoptosome, that activates caspase 9/3 signalling cascade and therefore initiates the final step of apoptosis (18,20). On the other hand, in extrinsic pathway, attachment of an external stimulus to death receptor, FasLigand (FasL) initiates apoptosis by causing formation of death inducing signalling complex (DISC). This process triggers the start of caspase activities including caspase 8 and 10 and finally the last caspase prior to apoptosis, caspase 3 (18,20,21).

The aim of the study is to determine *in vitro* apoptotic induction effects of dichloromethane (DCM) (lipophilic) and aqueous (hydrophilic) *Corchorus olitorius* L. leaf extracts in primary (Colo-320) and metastatic (Colo-741) colon adenocarcinoma cell lines. In addition, we aimed to determine the molecular apoptotic pathway that is triggered after treatment with both extracts in both cell lines.

Materials and Methods

Plant material and extraction

Mature *Corchorus olitorius* L. leaves were collected from Kyrenia, Cyprus in July 2016. The collected plant sample was registered with Near East Herbarium at Near East University under the Herbarium number 6904. The dry leaves of *Corchorus olitorius* L. (100 g) were powdered (Waring Commercial Blender, United States of America, USA) and extracted with 80% (800 ml) ethanol while incubated overnight at room temperature with occasional stirring. The extract was vacuum

filtered and concentrated to 200 ml by rotary evaporator (BUCHI Rotavapor R-210). Concentrated aqueous phase was then extracted with DCM to remove lipophilic compounds by using separation funnel (x3). DCM extract was evaporated to dryness and kept over CaCl_2 desiccator for 48 h. The aqueous phase was concentrated to its half and lyophilized (Christ Alpha 1-4 LD Plus, Germany) with freeze-dryer. The total yields for DCM and aqueous phase extracts were 3.7% and 14.8% respectively.

Cell line and cell culture

Cell lines, Colo-320 (ATCC: CCL-220.1) and Colo-741 (ECACC: 93052621) were maintained in RPMI-1640 medium (Biochrom, FG 1215), 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Capricorn Scientific, FBS-11B), 1% penicillin-streptomycin (Biochrom, A2213) and 1% glutamine (EMD Millipore, K0282). Cells were cultured in a humidified atmosphere at 37°C in 5% CO_2 . As the cultured cells reached confluency state, they were sub-cultured using 0.25% trypsin-EDTA solution (Biochrom, L 2143).

Cell viability and growth assay

DCM and aqueous phase extracts were dissolved with dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) to 100 mg/ml. The extracts were further diluted in culture medium (5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ and 100 $\mu\text{g/ml}$). The final concentration of DMSO in cell lines was less than 0.05%. Colo-320 and Colo-741 cells were collected, suspended in medium and seeded in 96-well culture dishes at a density of $5 \times 10^4/\text{ml}$ cells in each well with 100 μl medium. Extract dilutions were triplicated for both DCM and aqueous phases. Both cell lines were incubated for 24 and 48 h.

The cell viability was estimated by MTT assay. MTT solution (Biotium, #30006) was heated to 37°C and then 10 μl were added to the each well. After 4 h incubation at 37°C in 5% CO_2 , 200 μl

DMSO was added to dissolve the formazan salts. The absorbance was measured at 570 nm with spectrophotometer (Versa Max, Molecular Device, Sunnyvale, USA).

TUNEL assay for apoptosis

DNA fragmentation was detected by labelling apoptotic cells with specific staining while using commercial *in situ* apoptosis detection kit (Apoptag Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit, S7101, Millipore, USA). All cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) at 4°C for 30 minutes. After fixation, all cultured cells were washed twice with PBS and incubated with 3% H₂O₂ for 5 minutes at room temperature. In total, 75 µl of equilibrium buffer was added into the plates. Then, 55 µl of working TdT strength enzyme was added and the cells were incubated for 1 h at 37°C. After that, stop wash buffer was added, the cells were washed with PBS and 65 µl anti-digoxigenin peroxidase was added. The cells were washed by PBS and after incubated with 75 µl diaminobenzidine (DAB) for 5 minutes, the cells were re-washed with distilled water. The last step was counterstaining with Mayer's solution. The cells were washed with distilled water after 5 minutes of incubation.

Immunocytochemistry

Cultured Colo-320 and Colo-741 cells were assessed immunocytochemically for binding of antibodies against caspase-3, cytochrome-c and FasL. All cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS at 4°C for 30 minutes. Tween 20 (Sigma-Aldich) was added for permeabilization for 15 minutes. The cells were washed with PBS and endogenous peroxidase activity was quenched by incubation with 3% H₂O₂ for 5 minutes at room temperature. After washing cells with PBS three times for 5 minutes, primary antibodies caspase-3 (sc-7272, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), cytochrome-c (sc-13156, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) and FasL (sc-834 Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) were added and incubated overnight at

4°C. Biotinylated secondary antibody (Histostain-Plus, IHC Kit, HRP, 859043, Thermo Fischer) was added and incubated for 30 minutes followed by PBS wash (x3) for 5 minutes. Streptavidin-peroxidase complex (100 µl) was added to cultured cells. Cells were then washed by PBS and DAB was added and incubated for 5 minutes for enhancement of immuno-labelling. DAB was washed with distilled water. Cells were counterstained with Mayer's hematoxylien for 5 minutes and mounted with mounting medium (Merck Millipore, 107961, Germany). All specimens were examined using a light microscope (Olympus BX40, Tokyo, Japan).

Staining of caspase-3, cytochrome-c and FasL was also graded semi quantitatively using the H-SCORE that was calculated with the following equation: $HSCORE = \sum \pi (i+1)$, where i is the intensity of staining with a value of 1, 2 or 3 (mild, moderate, or strong, respectively) and π is the percentage of cells stained with each intensity, varying between 0 and 100%.

Analysis of the data

Results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The results were analyzed using GraphPad Prism 7 software. Differences among groups were analyzed statistically with Kruskal-Wallis and Mann-Whitney where appropriate. A p value of <0.05 was considered as significant and a p value of <0.01 was considered as highly significant.

Results

Cell viability and cytotoxicity

Colo-320 and Colo-741 cells were treated with different concentrations of (5-100 µg/ml) DCM and aqueous phase extracts of *Corchorus olitorius* L. for 24 and 48 hours. Both extracts at 50 µg/ml concentration were more effective at inhibiting Colo-320 and Colo-741 cell growth when compared

with other dilutions (Figure 1 and 2). DCM phase extract inhibited growth of Colo-320 and Colo-741 cells in a dose dependent manner (Figure 2).

Cell morphology

After treated with both DCM and aqueous phase of *Corchorus olitorius* L. extracts, the morphology of Colo-320 and Colo-741 cells were similar to control group (Figure 3 A-D). Larger vacuoles were observed in Colo-741 cells that were treated with both extracts (Figure 3 D, F) however no vacuole formation was detected in Colo-320 cells (Figure 3 C, E).

Apoptotic effects of Corchorus olitorius L. extracts in Colo-320 and Colo-741 cells

TUNEL assay was used in both cell lines that were incubated with 50 µg/ml concentration of extracts for 24 h. Unlike Colo 320 cells, the number of TUNEL positive cells that were treated with both extracts were highly significant in Colo-741 cells when compared with both control group ($p < 0.01$, Table 1) and Colo-320 cell lines ($p < 0.01$, Table 1) (Figure 4D-F).

Immunocytochemical evaluation

Caspase-3 immunostaining was strong in Colo-320 cells treated with DCM phase extract and weak to moderate in aqueous phase treated Colo-320 cells (Table 2). The H-SCORE and immunoreactivity results were in parallel with immunostaining intensity, where H-SCORE for caspase-3 was significantly higher in Colo-320 cells treated with DCM phase extract ($p < 0.05$, Table 3) (Figure 5A-C). On the other hand, H-SCORE for aqueous phase treated Colo-320 cells was not significant when compared with control group ($p > 0.05$, Table 3). Immunostaining of caspase-3 in Colo-741 cells was moderate to strong for DCM phase and weak to moderate for aqueous phase (Table 2). As shown in Figure 5, immunoreactivity of caspase-3 in Colo-741 cells was higher in extract treated cells than control group. H-SCORE results revealed that, immunolabelling was

significantly higher in both DCM and aqueous extracts in comparison with control group, respectively ($p < 0.01$, $p < 0.05$, Table 3) in Colo-741 cells.

Immunostaining intensity for cytochrome-c was moderate to strong for both extracts in Colo-320 cells (Table 2). As shown in Figure 6, cytochrome-c immunoreactivity was higher in both extracts treated Colo-320 cells than in control group. Aqueous phase treated Colo-320 cells had shown significant increase in H-SCORE than control group ($p < 0.05$, Table 3). Although DCM phase treated cells showed raise in H-SCORE, the increase was not statistically significant ($p > 0.05$, Table 3). Cytochrome-c immunostaining was strong for DCM phase and moderate for aqueous extract treated Colo-741 cells (Table 2). DCM phase extract had shown increased immunoreactivity than aqueous phase and control group in Colo-741 cells, (Figure 6 D-F). According to H-SCORE of Colo-741 cells, both extracts had shown highly significant increase in immunolabelling than control group ($p < 0.01$, Table 3).

FasL immunostaining intensity results showed that DCM phase was exerted weak to moderate effect whereas aqueous phase effect was moderate to strong in Colo-320 cells (Table 2) with similar patterns observed in immunoreactivity (Figure 7A-C). In addition, there was a decrease in H-SCORE in DCM treated Colo-320 cells (Table 3). Contrary to that, aqueous phase extract treated cells had shown significant increase in H-SCORE when compared with control group ($p < 0.05$, Table 3). FasL immunostaining intensity was moderate to strong for both extracts in Colo-741 cells (Table 2). In addition, immunoreactivity was higher in both extracts in Colo-741 cells than control group (Figure 7 D-F). Both extracts showed significant increase in FasL H-SCORE while DCM phase being significantly higher than aqueous phase extract treated Colo-741 cells ($p < 0.05$, Table 3). In addition, FasL immunolabelling highly significant in aqueous phase extract treated Colo-320 cells than Colo-741 cells ($p < 0.01$).

Discussion

Corchorus olitorius L. is known to have medicinal properties in Mediterranean and Asian culture due to its rich phytochemical content (4,5,22). The plant had shown to have anti-inflammatory, antioxidant, antitumor and anticancer activities (2,8,14,22). According to a study by Li et al. (2012), *Corchorus olitorius* L. leaf extract at 12.5 µg/ml concentration triggered apoptosis by increasing caspase-9 activity as well as cytochrome c leakage from mitochondria which showed that the extract induced apoptosis via intrinsic pathway in HepG2, hepatocellular carcinoma cells (14). Additionally, another study reported that *Corchorus olitorius* L. leaf extract at 150 µg/ml concentration had caused cytotoxic effects on human multiple myeloma cells (ARH-77) and stated that these cytotoxic effects increased in dose-dependent manner (2). In our study, 50 µg/ml concentrations of both extracts were further investigated as other concentrations of extracts might exert either cytotoxic effects to the normal cells or not be able to induce apoptosis in cancer cells. Both studies had only used ethanol extract unlike our study where two different extracts were used at the same time on different cell lines (2,14). Different extracts might have different phytochemical contents which might explain the amount of concentrations used as treatment might be different than other studies. The MTT results stated that 24 and 48 h incubation showed similarities for cytotoxicity therefore further immunocytochemical experiments were continued with 24 h incubation period.

TUNEL assay results showed that DCM extract of *Corchorus olitorius* L. was nearly 12-fold more effective in Colo-741 than Colo-320 cell lines. The same pattern was observed in aqueous phase where the extract was more effective in Colo-741 cell lines. Therefore, the extracts are found to be more effective in metastatic than primary cells in terms of apoptotic DNA fragmentation.

There are number of proteins and two main pathways, which play role in the process of apoptosis. Presence of some proteins in apoptosis such as FasL and caspase-8 show that apoptosis is triggered

by extrinsic pathway. On the other hand, cytochrome-c, caspase-9 and Apaf-1 are indicators of intrinsic pathway (19). Our results showed that immunoreactivity of cytochrome-c was significantly higher in both Colo-320 and Colo-741 cells incubated with aqueous phase extract than control group. However, DCM phase extract had shown to significantly increase immunoreactivity of cytochrome-c in only Colo-741 cells. The results indicate that both extracts were effective in triggering intrinsic pathway in Colo-741 cells however; only aqueous phase extract was able to induce apoptosis via intrinsic pathway in Colo-320 cells.

The immunoreactivity of FasL had shown a decrease in Colo-320 cells which were incubated with DCM phase extract when compared with control group. This might indicate that, DCM phase extract did not induce apoptosis through extrinsic pathway in Colo-320 cells. Contrary to Colo-320 cells, FasL immunoreactivity was significantly higher in Colo-741 cells treated with DCM phase. Therefore, these results suggest that DCM phase extract had shown to induce apoptosis in only Colo-741 cells through extrinsic pathway. In both cell lines, aqueous phase was able to significantly increase immunoreactivity of FasL being more effective in Colo-320 cells. This might indicate that aqueous phase extract might be a mediator to induce apoptosis via extrinsic pathway.

Caspase-3 immunoreactivity was significantly higher in DCM phase extract treated Colo-320 cells indicating that downstream of apoptotic pathway had been reached. On the other hand, immunoreactivity of cytochrome-c and FasL were not significant for DCM phase extract treated Colo-320 cells. This result might suggest that, apoptosis might be triggered with the help of other proteins which are found in the flow of apoptosis through different mechanisms that need further evaluation. Aqueous phase extract did not significantly increase in caspase-3 immunoreactivity in Colo-320 cells while the immunoreactivity of cytochrome-c and FasL in Colo-320 cells were significantly higher than control group. It should be stated that the cells were incubated with extracts for 24 h and incubation time might not be enough to trigger significant raise in caspase-3 immunoreactivity. Additionally, in Colo-741 cells, both extracts significantly increased caspase-3

immunoreactivity indicating that, apoptosis was triggered in metastatic colon adenocarcinoma cell lines.

DCM extract content is rich in carotenoids, α -tocopherols and polyunsaturated fatty acids (9,23). Carotenoids and omega-3 fatty acids had shown to suppress Nuclear Factor- κ B (NF κ B) activation and Bcl-2 expression and induced apoptosis in cancer cells (12,24). In addition, α -tocopherol is a lipophilic compound which can only be dissolved in organic solvents such as DCM. Therefore, α -tocopherol is expected to be more effective in DCM phase extract. However, it was stated that gamma and delta forms of tocopherol are rather more effective than alpha form in terms of inhibiting colon cancer cell growth and induction of apoptosis (25,26). The difference in the apoptotic effect of DCM phase might be due to different reactions of different cancer cell lines to extract and its phytochemical content.

The other extract that was used in the study was aqueous, which contains natural anticancer compounds such as quercetin and caffeoylquinic acid (6–8). Quercetin contains hydroxyl groups which act as electron acceptor thus has antioxidant properties. Its cancer preventive effects might be due to its reactive oxygen species (ROS) scavenging ability as well as induction of apoptosis in cancer cells by activating Bax and Bak proteins and increase in p53 expression (27,28). A study by Handoussa *et al.* (2013) stated that *Corchorus olitorius* L. extract significantly increased glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) activities in carrageenan-induced inflammation in rats (8). Quercetin had shown to induce apoptosis by increasing intracellular ROS in colon cancer (28). In addition, a derivative of quercetin caused cell death by inhibiting Bcl-2 and increasing Bax expression via intrinsic pathway in HCT-116 human metastatic colon cancer cells (29).

The other constituent of aqueous phase extract, caffeoylquinic acid, is a sub-group of chlorogenic acid, is known to be an antioxidant polyphenolic compound which is predominantly found in coffee (30). It is also regarded as one of the most abundant phytochemicals in *Corchorus olitorius* L. (7,8).

Chlorogenic acid had shown cytotoxic effects in HT-29 colon cancer cells by increasing caspase-3 and decreasing Bcl-2 activity. It was also stated that chlorogenic acid suppressed heat shock protein 70 and therefore decreased tumour growth (30). In addition, 5-caffeoylquinic acid showed decrease in cell viability and induced apoptosis in colon adenocarcinoma cells (31).

All of these studies suggest that phytochemicals that are found in aqueous phase extract is effective in induction of apoptosis in different colon cancer cell lines. Although aqueous phase extract had activated both intrinsic and extrinsic pathways it was not able to initiate caspase-3 activity in primary colon cancer cells. On the other hand, aqueous phase extract did activate all three apoptotic pathway proteins in metastatic colon cancer cells which triggered both intrinsic and extrinsic signalling pathways.

Induction of apoptosis in cancer cells has been a part of cancer treatment throughout the years (18). However, apoptotic pathway that triggers cell death might show difference in different cancer cells. For instance, *Corchorus olitorius* L. extract induced apoptosis through intrinsic pathway in hepatocellular carcinoma cells (14) however our results suggested that specifically aqueous phase extract triggered both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in both cell lines. Overall, both extracts were more effective in Colo-741, metastatic colon adenocarcinoma cell lines. The fact that apoptotic cells are higher in metastatic colorectal carcinomas may be explained by metastatic cells being under more cellular stress as they are expected to accumulate mutations more than the primary tumours (32). When coupled with phytochemicals in *Corchorus olitorius* L. extract, apoptosis might be triggered in a more readily manner in the metastatic cells that are already in a greater cellular stress as opposed to primary colorectal adenocarcinomas (32).

Conclusion

Cancer incidence and mortality is quite high and phytomedicinal approach to the treatment is increasing as the treatment is less invasive. In our study, *in vitro* proapoptotic activity of DCM and

aqueous extracts of *Corchorus olitorius* L. were investigated for the first time in colon adenocarcinoma cells. Two different extracts of *Corchorus olitorius* L. leaves had shown to induce apoptosis in both cell lines at 50 µg/ml concentration. In conclusion, extracts induced apoptosis in both cancer cell lines while being more effective in metastatic colon adenocarcinoma cell lines. This study indicates that extracts might have potential anticancer effects and possibility to be used as precursor to phytomedicinal colon cancer treatment. This study will be a guide to future studies where the apoptotic effects of *Corchorus olitorius* L. extracts might further be investigated with different cancer cell lines and *in vivo* studies.

Acknowledgements

The authors would like to thank Near East University, Experimental Health Research Center of Health Sciences laboratory for their support throughout the study. This work was supported by Near East University, Centre of Excellence [grant number 2016-04035].

Declaration of interest

Authors declare no conflict of interests.

References

1. Islam MM. Biochemistry, Medicinal and Food values of Jute (*Corchorus capsularis* L. and *C. olitorius* L.) leaf: A Review. *Int J Enhanc Res Sci Technol Eng* 2013;2(11):35–44.
2. Darcansov Iseri O, Yurtcu E, Sahni F, Haberal M. *Corchorus olitorius* (jute) extract induced cytotoxicity and genotoxicity on human multiple myeloma cells (ARH-77). *Pharm Biol* 2013;51(6):766–70.
3. Ilhan S, Savaroglu F, Colak F. Antibacterial and Antifungal Activity of *Corchorus olitorius* L.(Molokhia) Extracts. *Int J Nat Eng Sci* 2007;1(3):59–61.

4. Duke JA. Handbook of Energy Crops [Internet]. 1983. [cited 2017 Jun 17];Available from: https://hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Corchorus_olitorius.html
5. Adegoke AA, Adebayo-Tayo BC. Phytochemical composition and antimicrobial effects of *Corchorus olitorius* leaf extracts on four bacterial isolates. *J Med Plants Res* 2009;3(3):155–9.
6. Zeghichi S, Kallithraka S, Simopoulos AP. Nutritional Composition of Molokhiya (*Corchorus olitorius*) and Stammagathi (*Cichorium spinosum*). In: Simopoulos AP, Gopalan C, editors. *World Review of Nutrition and Dietetics*. Karger; 2003. p. 1–21.
7. Azuma K, Nakayama M, Koshioka M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, et al. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J Agric Food Chem* 1999;47(10):3963–6.
8. Handoussa H, Hanafi R, Eddiasty I, El-Gendy M, El Khatib A, Linscheid M, et al. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of dietary phenolics isolated from *Corchorus olitorius* and *Vitis vinifera*. *J Funct Foods* 2013;5(3):1204–16.
9. Mahmoud AS, Thao N, Mario A. *Corchorus Olitorius* Linn: A Rich Source of Ω 3-Fatty Acids. *Pharm Anal Acta* 2016;7(6).
10. Yoshikawa M, Murakami T, Shimada H, Yoshizumi S, Saka M, Yamahara J, et al. Medicinal foodstuffs. XIV. On the bioactive constituents of moroheiya. (2): New fatty acids, corchorifatty acids A, B, C, D, E, and F, from the leaves of *Corchorus olitorius* L. (Tiliaceae): structures and inhibitory effect on NO production in mouse perito. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1998;46(6):1008–14.
11. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Int. Agency Res. Cancer. 2013 [cited 2017 Jun 17];Available from: <http://globocan.iarc.fr>

12. Kuppusamy P, Yusoff MM, Maniam GP, Ichwan SJA, Soundharrajan I, Govindan N. Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: a review. *Acta Pharm Sin B* 2014;4(3):173–81.
13. Greenwell M, Rahman PKSM. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *Int J Pharm Sci Res* 2015;6(11):4103–12.
14. Li CJ, Huang SY, Wu MY, Chen YC, Tsang SF, Chyuan JH, et al. Induction of apoptosis by ethanolic extract of *Corchorus olitorius* leaf in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells via a mitochondria-dependent pathway. *Molecules* 2012;17(8):9348–60.
15. Mao C, Wu X-Y, Yang Z-Y, Threapleton DE, Yuan J-Q, Yu Y-Y, et al. Concordant analysis of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, and PTEN expression between primary colorectal cancer and matched metastases. *Sci Rep* 2015;5(1):8065.
16. Kanthan R, Senger J-L, Kanthan SC. Molecular Events in Primary and Metastatic Colorectal Carcinoma: A Review. *Patholog Res Int* 2012;2012:1–14.
17. Dienstmann R, Elez E, Argiles G, Matos I, Sanz-Garcia E, Ortiz C, et al. Analysis of mutant allele fractions in driver genes in colorectal cancer - biological and clinical insights. *Mol Oncol* 2017;11(9):1263-1272.
18. Stoian M, State N, Stoica V, Radulian G. Apoptosis in colorectal cancer. *J Med Life* 2014;7(2):160–4.
19. Huerta S, Goulet EJ, Livingston EH. Colon cancer and apoptosis. *Am J Surg* 2006;191(4):517–26.
20. Wu M, Ding H-F, Fisher DE. Apoptosis: Molecular Mechanisms. *Encycl Life Sci* 2001.
21. Hongmei Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review. *Apoptosis Med*

2012;3–22.

22. Dewanjee S, Gangopadhyay M, Sahu R, Karmakar S. Cadmium induced pathophysiology: Prophylactic role of edible jute (*Corchorus olitorius*) leaves with special emphasis on oxidative stress and mitochondrial involvement. *Food Chem Toxicol* 2013;60:188–98.

23. Oboh G, Raddatz H, Henle T. Characterization of the antioxidant properties of hydrophilic and lipophilic extracts of Jute (*Corchorus olitorius*) leaf. *Int J Food Sci Nutr* 2009;60(sup2):124–34.

24. Hofmanová J, Straková N, Vaculová AH, Tylichová Z, Safaříková B, Skender B, et al. Interaction of dietary fatty acids with tumour necrosis factor family cytokines during colon inflammation and cancer. *Mediators Inflamm* 2014;2014:848632.

25. Stone WL, Krishnan K, Campbell SE, Palau VE. The role of antioxidants and pro-oxidants in colon cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2014;6(3):55–66.

26. Dolfi SC, Yang Z, Lee M-J, Guan F, Hong J, Yang CS. Inhibitory effects of different forms of tocopherols, tocopherol phosphates, and tocopherol quinones on growth of colon cancer cells. *J Agric Food Chem* 2013;61(36):8533–40.

27. Rani N, Velan LPT, Vijaykumar S, Arunachalam A. An insight into the potentially old-wonder molecule?quercetin: the perspectives in foresee. *Chin J Integr Med* 2015

28. Kim GT, Lee SH, Kim YM. Quercetin Regulates Sestrin 2-AMPK-mTOR Signaling Pathway and Induces Apoptosis via Increased Intracellular ROS in HCT116 Colon Cancer Cells. *J cancer Prev* 2013;18(3):264–70.

29. Khan I, Paul S, Jakhar R, Bhardwaj M, Han J, Kang SC. Novel quercetin derivative TEF induces ER stress and mitochondria-mediated apoptosis in human colon cancer HCT-116 cells.

Biomed Pharmacother 2016;84:789–99.

30. Choi DW, Lim MS, Lee JW, Chun W, Lee SH, Nam YH, et al. The Cytotoxicity of Kahweol in HT-29 Human Colorectal Cancer Cells Is Mediated by Apoptosis and Suppression of Heat Shock Protein 70 Expression. *Biomol Ther (Seoul)* 2015;23(2):128–33.
31. Murad LD, Soares N da CP, Brand C, Monteiro MC, Teodoro AJ. Effects of Caffeic and 5-Caffeoylquinic Acids on Cell Viability and Cellular Uptake in Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Nutr Cancer* 2015;67(3):532–42.
32. Zeitoun G, Mourra N, Blanché-Koch H, Thomas G, Olschwang S. Genomic profile of colon cancer metastases. *Anticancer Res* 2008;28(6 A):3609–12.

Table 1. The percentage of TUNEL positive Colo-320 and Colo-741 cells treated with DCM and aqueous phase of *Corchorus olitorius* L. at 50 µg/ml concentration for 24h.

	Colo-320 cells	Colo-741 cells
DCM phase	5.94 ± 2.19	72.5 ± 25.28 ^{a,b}
Aqueous phase	11.38 ± 6.68	70.43 ± 9.72 ^{a,b}
Control	4.14 ± 4.25	4 ± 8.94

Data are expressed as means ± SD and were compared by Mann-Whitney.

a The data was significant when compared with control group (p<0.01)

b The data was significant when compared with Colo-320 cell lines (p<0.01)

Table 2. The intensity of caspase-3, cytochrome-c and FasL immunolabelling in Colo-320 and Colo-741 cells treated with DCM and aqueous phase of *Corchorus olitorius* L. at 50 µg/ml concentration for 24h.

	Colo-320 cells			Colo-741 cells		
	Control group	DCM phase group	Aqueous phase group	Control group	DCM phase group	Aqueous phase group
Caspase-3	+	+++	+/++	-/+	++/+++	+/++
Cytochrome-c	++	++/+++	++/+++	-/+	+++	++
FasL	+	+/++	++/+++	+/++	++/+++	++/+++

Table 3. The H-SCORE of caspase-3, cytochrome-c and FasL immunolabelling in Colo-320 and Colo-741 cells treated with DCM and aqueous phase of *Corchorus olitorius* L. at 50 µg/ml concentration for 24h.

	Colo-320 cells			Colo-741 cells		
	Control group	DCM phase group	Aqueous phase group	Control group	DCM phase group	Aqueous phase group
Caspase-3	258.8 ± 41.23	355.3 ± 19.69 ^a	312.3 ± 41.99	218.3 ± 52.86	350.3 ± 18.94 ^a	320.3 ± 52.45 ^a
Cytochrome-c	317.7 ± 36.17	370.2 ± 30.29	366 ± 22.4 ^a	208.9 ± 19.87	371.3 ± 11.83 ^a	354.2 ± 22.5 ^a
FasL	372.5 ± 19.18	300.2 ± 52.43	397.1 ± 6.57 ^{a,b}	278.3 ± 45.49	382.3 ± 2.12 ^{a,c}	360.7 ± 16.77 ^{a,b}

Data is expressed as means ± SD and were compared by Mann-Whitney.

a The data was significant when compared with control group (p<0.05)

b The data was significant when compared with different cell lines (p<0.01)

c The data was significant when compared with Aqueous phase group (p<0.05)

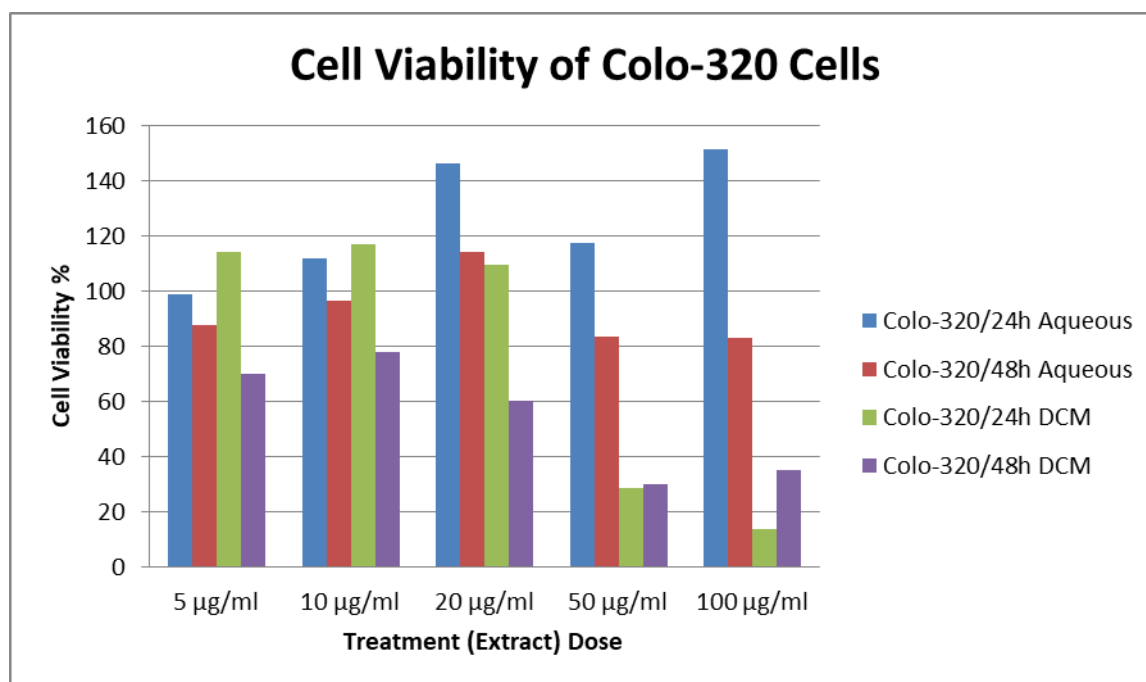


Figure 1. Effect of aqueous and DCM phase extracts of *Corchorus olitorius* L. on cell viability of Colo-320: Colo-320 cells were treated with different concentrations of aqueous and DCM phase extracts of *Corchorus olitorius* L. for 24 and 48 h. Negative control- no cells, positive control- non-treated cells.

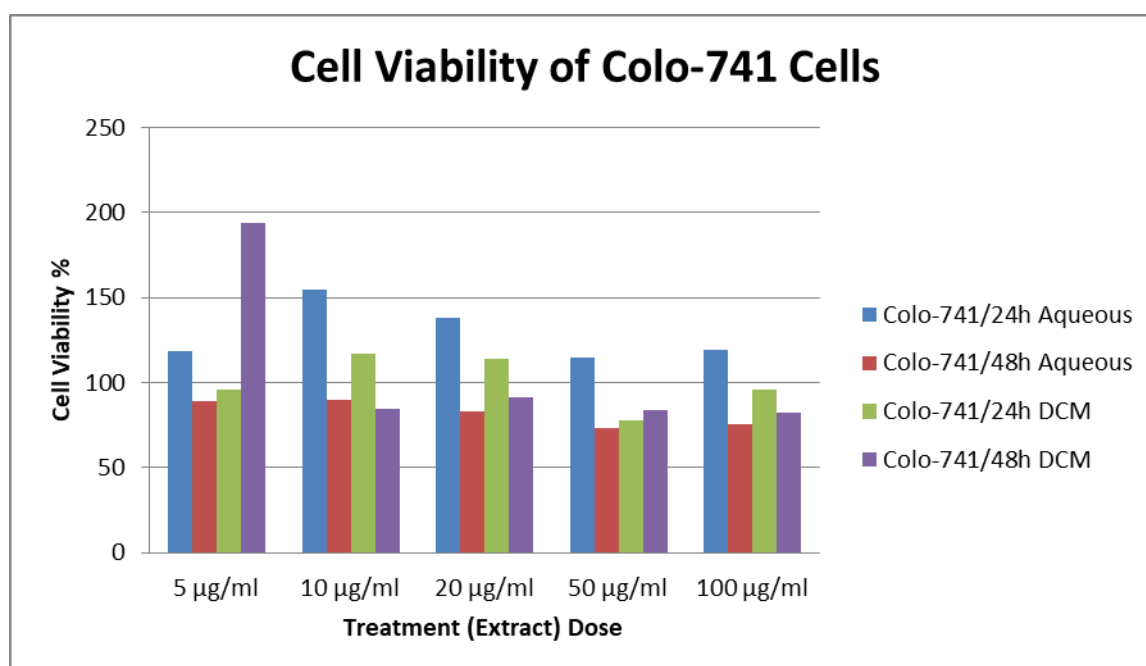


Figure 2. Effect of aqueous and DCM phase extracts of *Corchorus olitorius* L. on cell viability of Colo-741 cells: Colo-741 cells were treated with different concentrations of aqueous and DCM phase extracts of *Corchorus olitorius* L. for 24 and 48 h. Negative control- no cells, positive control- non-treated cells.

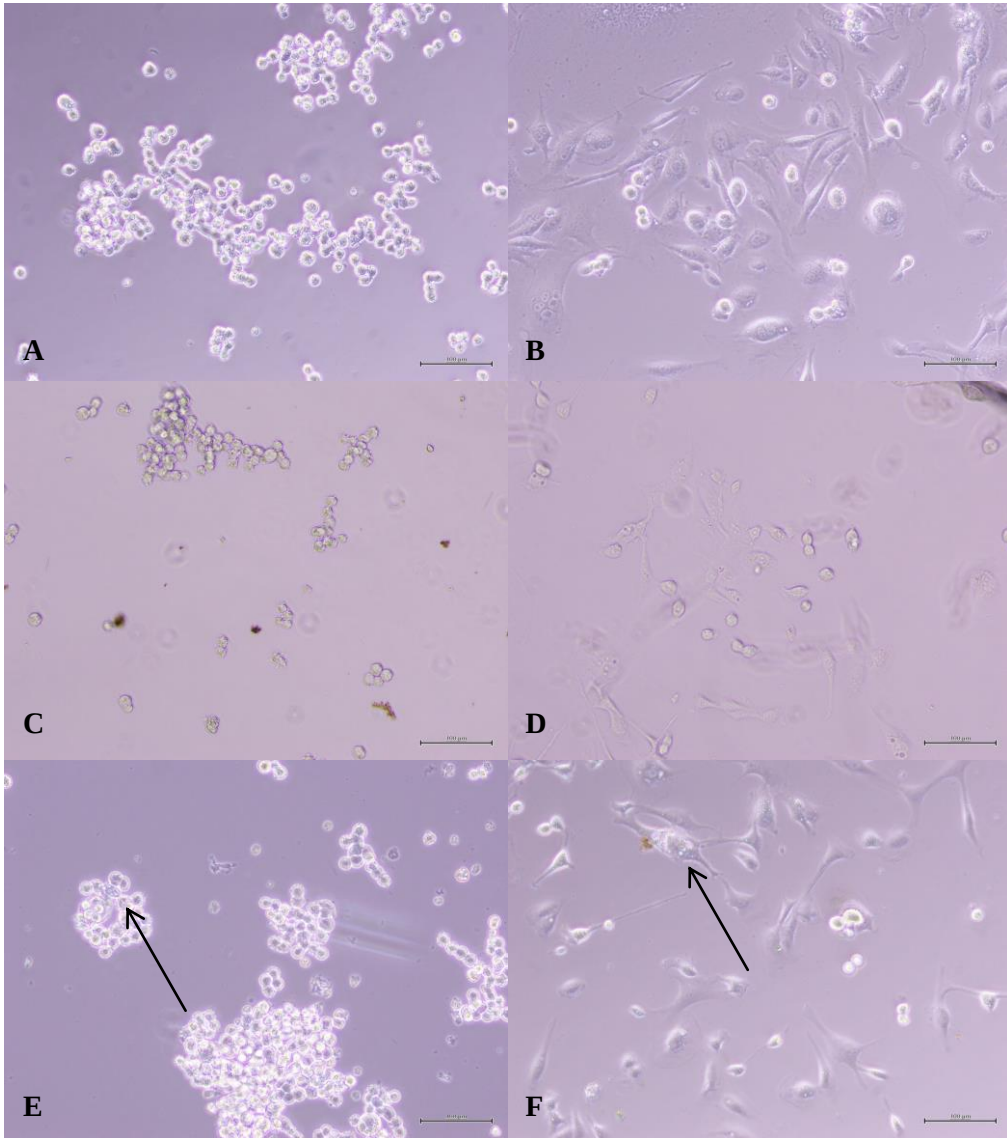


Figure 3. Colo-320 and Colo-741 cells imaged under the inverted microscope: (A) Colo-320 cells and (B) Colo-741 cells (C) DCM phase extract treated Colo-320 cells (D) DCM phase extract treated Colo-741 cells (E) Aqueous phase extract treated Colo-320 cells (F) Aqueous phase extract treated Colo-741 cells. Scale bars= 100 μ m.

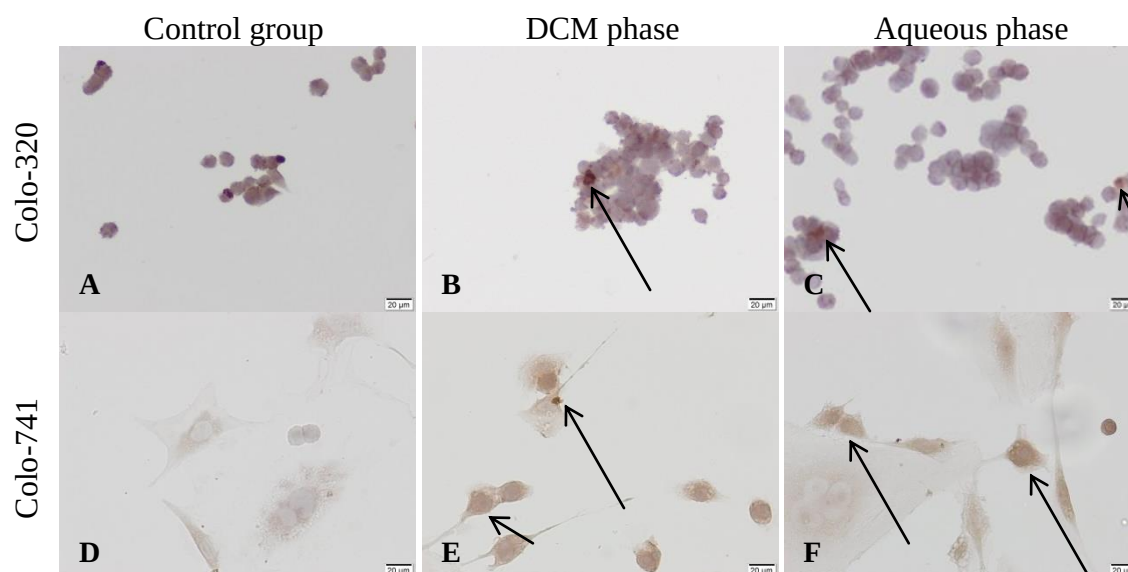


Figure 4. Apoptotic effects of *Corchorus olitorius* L. DCM and aqueous extracts in Colo-320 and Colo-741 cell lines: (A) Colo-320 control cells, (B) Colo-320 DCM phase extract treated cells, (C) Colo-320 aqueous phase extract treated cells, (D) Colo-741 control cells, (E) Colo-741 DCM phase extract treated cells, (F) Colo-741 aqueous phase extract treated cells. Scale bars= 20 μ m.

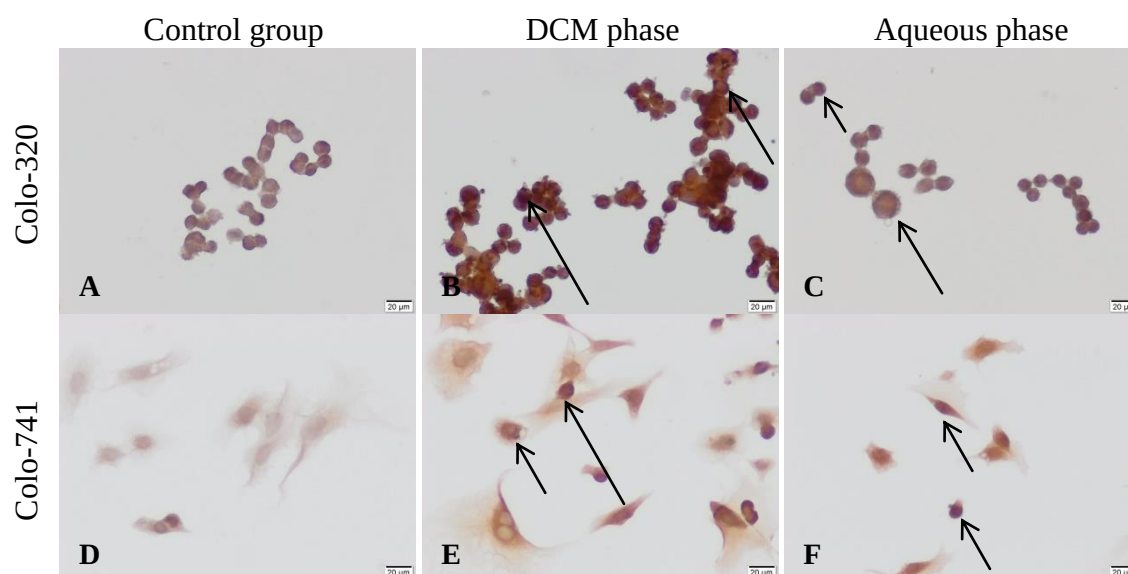


Figure 5. Immunoreactivity of caspase-3 in Colo-320 and Colo-741 treated with 50 μ g/ml DCM and aqueous extracts for 24h: (A) Colo-320 control cells, (B) Colo-320 DCM phase extract treated cells, (C) Colo-320 aqueous phase extract treated cells, (D) Colo-741 control cells, (E) Colo-741 DCM phase extract treated cells, (F) Colo-741 aqueous phase extract treated cells. Scale Bars=20 μ m.

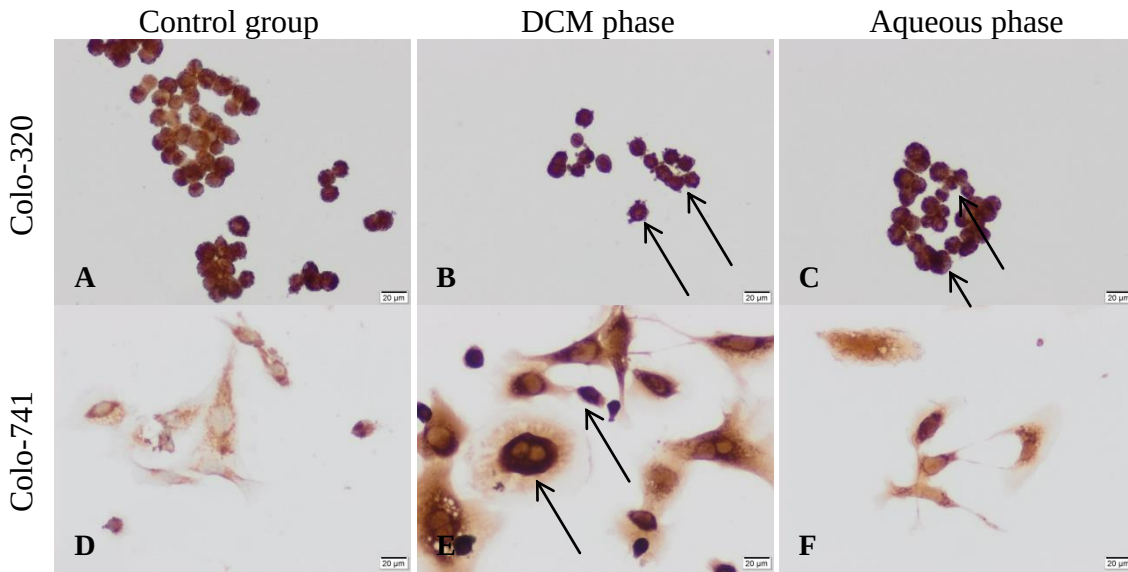


Figure 6. Immunoreactivity of cytochrome-c in Colo-320 and Colo-741 treated with 50 µg/ml DCM and aqueous extracts for 24h: (A) Colo-320 control cells (B) Colo-320 DCM phase extract treated cells (C) Colo-320 aqueous phase extract treated cells (D) Colo-741 control cells (E) Colo-741 DCM phase extract treated cells (F) Colo-741 aqueous phase extract treated cells. Scale Bars=20µm

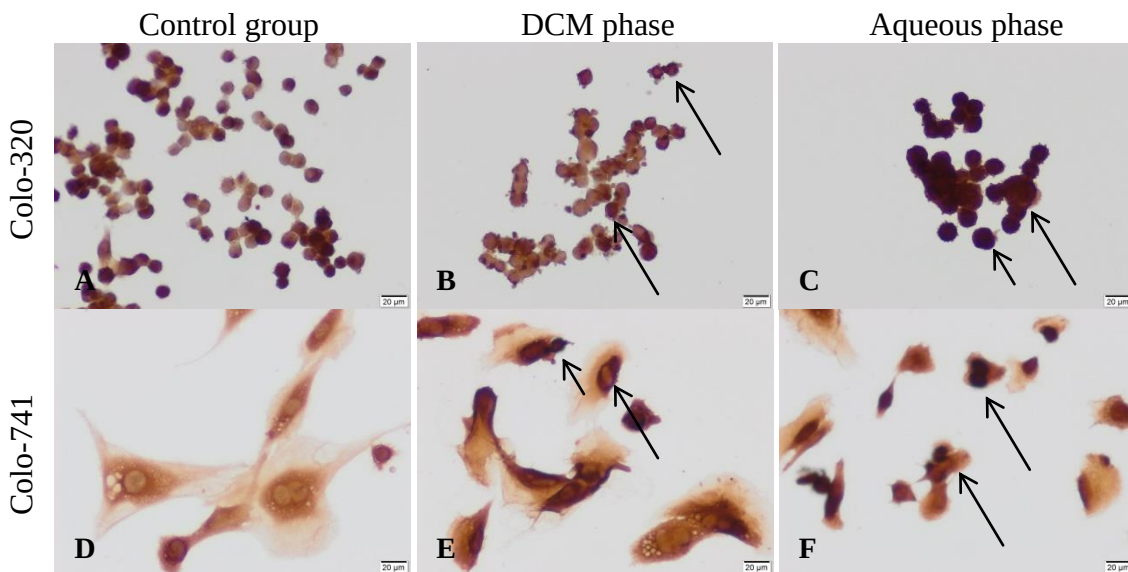


Figure 7. Immunoreactivity of FasL in Colo-320 and Colo-741 treated with 50 µg/ml DCM and aqueous extracts for 24h: (A) Colo-320 control cells, (B) Colo-320 DCM phase extract treated cells, (C) Colo-320 aqueous phase extract treated cells, (D) Colo-741 control cells, (E) Colo-741 DCM phase extract treated cells, (F) Colo-741 aqueous phase extract treated cells. Scale Bars=20µm

The 4th International Symposium on "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus"
19-21 April 2018 Kyrenia / Northern Cyprus

Traditional Fruit and Vegetable Foods

Abstract Reference : 619

ANTI-CANCER EFFECT OF CORCHORUS OLITORIUS DICHLOROMETHANE EXTRACT IN COLON ADENOCARCINOMA CELL LINES

Günay Soykur¹, Eda Becer², İhsan Çalıç³, Sevinç Yürecan¹, Seda Vatansever⁴

¹Department Of Nutrition And Dietetics, Faculty Of Health Sciences, Near East University, Nicosia, North Cyprus

²Department Of Biochemistry, Faculty Of Pharmacy, Near East University, Nicosia, North Cyprus; Experimental Health Research Center Of Health Sciences, Near East University, Nicosia, North Cyprus

³Department Of Pharmacognosy, Faculty Of Pharmacy, Near East University, Nicosia, North Cyprus

⁴Department Of Histology And Embryology, Faculty Of Medicine, Celal Bayar University, Manisa, Turkey; Experimental Health Research Center Of Health Sciences, Near East University, Nicosia, North Cyprus

Aim: The aim of the study was determine anti-cancer activities of *Corchorus olitorius* L. (*Co*) leaf dichloromethane (DCM) extract in Colo-320 primer and Colo-741 metastatic colon adenocarcinoma cell lines.

Material and Methods: Dry, powdered *Co* leaves (100 g) that were collected in Kyrenia, Cyprus were extracted with ethanol then filtered and concentrated. Concentrated ethanolic extract was then extracted with DCM to remove lipophilic compounds by using separation funnel. Different concentrations of *Co* extract were incubated for 24 and 48 h with Colo-320 and Colo-741 cells. Cell growth and cytotoxicity were measured with MTT assays. Apoptotic activities of *Co* were investigated by immunocytochemistry using antibodies directed against caspase-3, cytochrome-c and Fas ligand (FasL). TUNEL assay was used to detect DNA fragmentation in both cell lines.

Results: Caspase-3 expression was significantly higher in both Colo-320 cells and Colo-741 cells after 24 h incubation. On the other hand, immunoreactivity of cytochrome-c and FasL were not significant when compared with control group in Colo-320 cells. However, both cytochrome-c and FasL immunoreactivities were significantly higher in Colo-741 cells than control group. TUNEL results stated that DCM extract of *Co* was significantly more effective in Colo-741 cells than Colo-320 cells.

Discussion/Conclusion: DCM extract of *Co* leaf had shown more anti-cancer effect in Colo-741 cells. Increased caspase-3 immunoreactivity was observed in both cell lines whereas cytochrome-c and FasL was activated in only Colo-741 cells. This result suggested that *Co* leaf extract has shown anti-cancer effects in colon adenocarcinoma cell lines while being more effective in metastatic cells.

Keywords : *Corchorus olitorius*, Apoptosis, Colon cancer, Plant Extract

The 4th International Symposium on "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus"
19-21 April 2018 Kyrenia / Northern Cyprus

Traditional Fruit and Vegetable Foods

Abstract Reference : 603

Identification of Composition of *Corchorus olitorius* L. Leaf Extract

Günay Soykur¹, Eda Becer², İhsan Çalıç³, Sevinç Yücecan¹, Seda Vatansever⁴

¹Department Of Nutrition And Dietetics, Faculty Of Health Sciences, Near East University, Nicosia, North Cyprus

²Department Of Biochemistry, Faculty Of Pharmacy, Near East University, Nicosia, North Cyprus

³Department Of Pharmacognosy, Faculty Of Pharmacy, Near East University, Nicosia, North Cyprus

⁴Department Of Histology And Embryology, Faculty Of Medicine, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey

Introduction: *Corchorus olitorius* L. is a dark green leafy vegetable which belongs to Tiliaceae family in botany. It is a highly consumed traditional food in Cyprus. *Corchorus olitorius* L. is known as a medicinal food in folk culture and believed to have therapeutic effects such as being sedative, diuretic and laxative. Rich nutrient content may be one of the reasons that *Corchorus olitorius* L. has therapeutic effects.

Methods: Dry, powdered *Corchorus olitorius* L. leaves (100 g) that were collected in Kyrenia, Cyprus were extracted with ethanol then filtered and concentrated to 200 ml. H₂O phase was evaporated and lyophilized to yield 14.8 g of crude extract. *Corchorus olitorius* L. polyphenol analysis was done by LC/MS-MS. The equipment was run in negative ion mode.

Results: In total 7 components were identified in the extract, main groups being hydrocinnamic acids, flavonols and flavones. The LC/MS-MS results showed that H₂O phase extract of *Corchorus olitorius* L. is predominantly rich in caffeoylquinic acid, quercetin glycosides and luteolin.

Conclusion: Our results showed that Cypriot *Corchorus olitorius* L. extract is rich in polyphenols. The identified components of the extracts are known to show anti-oxidant, anti-cancer and pro-apoptotic properties. This shows that the plant exerts medicinal properties and its consumption might increase positive effects in the body.

Keywords : *Corchorus olitorius* L., Polyphenols, LC-MS

ORAL PRESENTATION - 68

APOPTOTIC EFFECT OF *CORCHORUS OLITORIUS* LEAF EXTRACT IN COLON ADENOCARCINOMA CELL LINES

Günsu Soykut¹, Eda Becer², İhsan Çalış³, Sevinç Yücecan¹ and Seda Vatansever^{4,5}

¹Department of Nutrition and Dietetics, Near East University, Faculty of Health Sciences, Nicosia, North Cyprus, gunsu.soykut@neu.edu.tr, sevinc.yucecan@neu.edu.tr

²Department of Biochemistry, Near East University, Faculty of Pharmacy, Nicosia, North Cyprus, eda.becer@neu.edu.tr

³Department of Pharmacognosy, Near East University, Faculty of Pharmacy, Nicosia, North Cyprus, ihsan.calis@neu.edu.tr

⁴Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Celal Bayar University, Manisa, Turkey, seda.vatansever@neu.edu.tr

⁵Experimental Health Research Center of Health Sciences, Near East University, Nicosia, North Cyprus

Objective: The objective of the study was to determine antiapoptotic activities of *Corchorus olitorius* L. (Co) leaf extract on Colo-320 primer and Colo-741 metastatic colon adenocarcinoma cell lines.

Material and Methods: Dry, powdered Co leaves (100 g) that were collected in July 2016 were extracted with ethanol then filtered and concentrated to 200 ml. H₂O phase was evaporated and lyophilized to yield 14,8 g of crude extract. Different concentrations of Co extract were incubated for 24 and 48 h on Colo-320 and Colo-741 cells. Cell growth and cytotoxicity were measured with MTT assays. Antiapoptotic activities of Co were investigated by immunocytochemistry using antibodies directed against to caspase-3, cytochrome-c and Fas ligand (FasL). TUNEL assay was used to detect DNA fragmentation in both cell lines.

Results: While the number of TUNEL positive cells were similar in both cell lines after incubation with extract, caspase-3 expression was higher in Colo-320 cells than Colo-741 cells after 24 h incubation. On the other hand, immunoreactivity of cytochrome-c and FasL were higher in Colo-741 cells. Caspase-3 expression was lower in both Colo-320 and Colo-741 cells when compared with cytochrome-c and FasL expression.

Discussion/Conclusion: H₂O phase extract of Co leaf had triggered apoptotic pathway in both cell types, but, Colo-741 cells were affected more than Colo-320 cells. This result suggested that, initiation of apoptotic pathway starts after 24 h and could not be terminated in 24 h. Therefore, longer incubation of Co extract in colon adenocarcinoma cell line might be more effective for treatment.

Researches on the biostimulating and antidehiscent effect of products based on fish collagen crosslinked to rape crop



Mihai Gidea^{1,*}, Emil Stepan², Cristina Emanuela Enascuta², Carmen Gaidau³, Doina Mihaela Niculescu³, Doru Gabriel Epure⁴, Marius Becheritu⁴, Emilia Brindusa Sandulescu¹, Iuliana Lenuta Epure¹

¹ University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine Bucharest, Romania

² National Research and Development Institute for Chemistry and Petrochemistry ICECHIM Bucharest, Romania

³ National Research and Development Institute for Textiles and Leather Bucharest, Romania

⁴ SC Probstdorfer Saatzucht Romania SRL, Bucharest, Romania

E-mail address: gideam@yahoo.com (M. Gidea).

Within this context, was noticed that at global level, during 1990–2010 the areas cultivated with rape tripled, the crop being an important biofuel resource. In order to control the dehiscence, rape crop with increased resistance to dehiscence is being used, but also treatments with antidehiscent products based on polymers (Elastiq). In order to evaluate the potential of using products based on fish-collagen and their impact on rape crop, a bifactorial experience was performed, where: factor A treatment with antidehiscent products: a1-Spotnam, a2-Elastiq; a3-collagen hydrolyzate obtained from fish waste and crosslinked glyoxal (HCR), a4-HCR+ carboxymethyl cellulose, a5-HCR+ amidine, a6-HCR+ amidine+ carboxymethyl cellulose; factor B rape crops varieties: b1-Pedro, b2-Harry, b3-Sammy, b4-Jolly, b5-PR44W29. The antidehiscent effect of products tested on siliques for the rape crops, was evaluated in the field, by determining the percent of open siliques, and in the laboratory by determining the percent of open siliques after using a Retsch S100 mill with balls. The biostimulating effect of products based on HCR has been evaluated by comparing the production differences against the untreated witness.

The results, it has been noticed that the applied treatments determined the obtaining of production increment, compared to the untreated witness, as well as a decrease of the rape siliques dehiscence degree.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1141>

Researches on the reaction of apple varieties to *Monilinia fructigena* fungus attack



Lucian Chitulescu^{1,*}, Stelica Cristea²

¹ Engineering and Management of Vegetal and Animal Resources Doctoral School, University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine, Bucharest, Romania

² Faculty of Agriculture, University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine, Bucharest, Romania

E-mail address: lucian_chitulescu@yahoo.com (L. Chitulescu).

The researches were performed at Hartesti town, Arges county, in the condition of year 2015 and aimed the attack of the fungus *Monilinia fructigena* at some varieties of apple, monitoring their reactions, in untreated variants. The biological material was represented by varieties: Florina, Generos, Goldrush, Idared and Topaz. In laboratory conditions, it has been identified by microscope, the

pathogen isolated by the attacked fruits. It has been used the Zeiss Primo Star microscope and the Zenn soft for microscopic measurements. Observations were made on the attack of the fungus on fruits, noting the frequency and intensity of the attack. The degree of attack was calculated with the formula: $GA = F \times I / 100$ (%), where: F – frequency of the attack (%), I – intensity of the attack (%), GA – the degree of attack (%). The intensity was denoted as a percentage. The attack on the fruit was: 6.5% on the Florina variety, 7% Goldrush and Generos varieties and 8.5% Idared and Topaz varieties. It was noted the reaction of different varieties of analyzed apple and the highest values of attack by the fungus *Monilinia fructigena* have recorded Idared and Topaz varieties.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1142>

Antibacterial and antifungal effects of *Corchorus olitorius* L. leaf extracts on ten standard strains



Gunsu Soykut^{1,*}, Meryem Guvenir², Serdar Susever³, Eda Becer⁴, Ihsan Çalis⁵, Kaya Suer⁶

¹ Department of Nutrition and Dietetics, Near East University, Nicosia, Cyprus

² Vocational School of Health Services, Near East University, Nicosia, Cyprus

³ Experimental Health Research Center of Health Sciences, Near East University, Nicosia, Cyprus

⁴ Department of Biochemistry, Near East University, Nicosia, Cyprus

⁵ Department of Pharmacognosy, Near East University, Nicosia, Cyprus

⁶ Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Near East University, Nicosia, Cyprus

E-mail address: gunsusoykut@gmail.com (G. Soykut).

Corchorus olitorius L. (COL) is a plant which is widely consumed by people living in Middle East and Asia. COL is known to have medicinal properties. Phytochemicals such as alkaloids and saponins are thought to give antimicrobial effects of COL.

COL leaves that were collected in North Cyprus were extracted with ethanol then filtered and concentrated to 200 ml. H₂O phase was evaporated and lyophilized. Concentrated H₂O phase was then extracted with dichloromethane (DCM).

Micro dilution method was used for antimicrobial susceptibility test. The extracts were prepared in different concentrations. Standard bacterial and fungal microorganisms: *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *C. dubliniensis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. neoformans* were used. The micro plates were incubated at 37 °C for 24 h. The turbidity reading was measured by spectrophotometer.

It was expected for extracts to exert antibacterial and antifungal activities however, COL extracts did not show any significant antibacterial and antifungal activities in ten standard strains.

Phytochemicals which exert antibacterial/antifungal properties like alkaloids and saponins, might not have been extracted in ethanolic and DCM extracts of COL. In addition, concentrations that were used might not been the optimal amount to show antimicrobial effects.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1143>

II. INTERNATIONAL BIOENGINEERING CONGRESS

EFFECT OF *Corchorus olitorius* L. LEAF EXTRACT ON FORESKIN STEM CELLS SPHEROIDS

Günsu Soykut^{1*}, Eda Becer^{2,3}, Hilal Kabadayi⁴, Emil Mammadov⁵, İhsan Çalış⁶, Seda Vatansever^{3,4}

^{1. *} Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Near East University, Nicosia, North Cyprus, gunsusoykut@gmail.com

^{2.} Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Near East University, Nicosia, North Cyprus, eda.becer@neu.edu.tr

^{3.} Experimental Health Research Center of Health Sciences, Near East University, Nicosia, North Cyprus

^{4.} Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey, hilal.kabadayi@cbu.edu.tr, sedavatansever@yahoo.com

^{5.} Department of Pediatric Surgery, Faculty of Medicine, Near East University, Nicosia, North Cyprus, emil.mammadov@neu.edu.tr

^{6.} Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Near East University, Nicosia, North Cyprus, ihsan.calis@neu.edu.tr

ABSTRACT

Circumcision is a ritual that has been done for centuries, where the foreskin of penis is removed and usually discarded. Foreskin has the potency to be used as a source of stem cell due to its multipotent properties especially if procedure was completed in early infancy. *Corchorus olitorius* L. (CoL) is a green leafy vegetable and highly consumed in Cyprus. The effect of CoL extract on foreskin stem cells spheroids was investigated in this study. CoL leaves were collected, extracted with ethanol then evaporated to yield crude extract. The foreskin stem cells (FSCs) were collected after enzymatic digestion of foreskin. The cells were cultured for 7 days and spheroids were obtained using hanging drop technique. The spheroids were either incubated with extract or culture medium for 48 h and distribution of ki67 and caspase-3 were done using indirect immunoperoxidase staining. Distributions of ki67 and caspase-3 were different in extract and control group. In addition, the center of spheroid cells were more stained than peripheral cells. The FSCs was used for the first time to make spheroids and using CoL extract may support stem cells to increase proliferation capacity.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Günsu	Soyadı	Soykut
Doğ.Yeri	Lefkoşa	Doğ.Tar.	1990
Uyruğu	KKTC	Email	gunsusoykut@gmail.com

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	Yakın Doğu Üniversitesi	2018
Yük.Lis.	University of Glasgow	2013
Lisans	Oxford Brookes University	2011
Lise	Türk Maarif Koleji	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Yakın Doğu Üniversitesi	2013-
2.	Öğretmen	Doğru Hedef Dersanesi	2011-2012

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
Graph Pad	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

- İskoçya'nın Glasgow şehrindeki yoksul ve zengin bölgelerinin paket servis, fiyat ve porsiyon boyutlarının kıyaslanması üzerine bir çalışma (2014), VI. Ulusal Obezite Kongresi, İstanbul, Türkiye.
- Apoptotic Effect of *Corchorus olitorius* Leaf Extract in Colon Adenocarcinoma Cell Lines (2017), MESMAP-3, Kyrenia, N. Cyprus
- Antibacterial and Antifungal Effects of *Corchorus olitorius* L. Leaf Extracts on Ten Standard Strains (2017), European Biotechnology Congress, Dubrovnik, Croatia.

4. Identification of Composition of *Corchorus olitorius* L. Leaf Extract (2018), 4th International Symposium on “Traditional Foods from Adriatic to Caucasus”, Kyrenia, N. Cyprus.
5. The Importance of Lifelong Learning of Traditional Foods and Nutrition and the Role of Real and Virtual Information Organizations (2018), 4th International Symposium on “Traditional Foods from Adriatic to Caucasus”, Kyrenia, N. Cyprus.
6. Anti-Cancer Effect of *Corchorus Olitorius* L. Dichloromethane Extract in Colon Adenocarcinoma Cell Lines (2018), 4th International Symposium on “Traditional Foods from Adriatic to Caucasus”, Kyrenia, N. Cyprus.
7. Effect of *Corchorus olitorius* L. Leaf Extract On Foreskin Stem Cells Spheroids (2018), Second International Biomedical Engineering Congress, Nicosia, N. Cyprus

