



KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ

YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KERSETİNİN KOLON KANSER HÜCRELERİ
SAĞ KALIMI VE ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİLERİ**

SERPİL ÖZSOY

DOKTORA TEZİ

BESLENME VE DİYETETİK DOKTORA PROGRAMI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. SEVİNÇ YÜCECAN

EŞ DANIŞMAN

Prof. Dr. SEDA VATANSEVER

2020 - LEFKOŞA

TEZ ONAYI (SAVUNMADAN SONRA EKLENECEKTİR)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Serpil ÖZSOY

TEŞEKKÜR

Lisans öğrencilik yıllarımdan bu yana olduğu gibi tez çalışması süresi boyunca da yardımlarını, desteklerini ve en önemlisi sevgisini hiçbir zaman esirgemeyerek daima yanımda olan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Sevinç Yücecan'a,

Akademik düşünce özgürlüğümü kazanmamda ve bakış açımı geliştirmemde yardımcı olan, eleştirel düşünme becerisi ve problem çözme yeteneğiyle bilgisini, tecrübesini ve tüm imkânlarını kullanarak desteklerini hiç esirgemeyen eş danışmanım Prof. Dr. Seda Vatansever'e,

Çalışma boyunca bıkmadan, usanmadan büyük bir sabır ve özveri ile yol gösteren, sorularımı yanıtlayıp çalışmanın her aşamasında yanımda olan Doç. Dr. Eda Becer'e,

Tez çalışmasının değerlendirilmesine ve geliştirilmesinde değerli katkılarından dolayı jüri üyeleri sayın Prof. Dr. İhsan Çalış, Prof.Dr. K. Hüsnü Can Başer ve Prof. Dr. Mine Yurttagül' e

Akademik gelişim ilerlememdeki emeklerini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim Prof. Dr. Emel Özer ve Prof. Dr. Semra Koçtürk' e

Çalışmanın laboratuvar aşamalarının yürütülmesinde destek veren DESAM Hücre Kültürü ve Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Laboratuvar sorumluları ve çalışanlarına,

Tez çalışması süresi boyunca her zaman yanımda olan ve manevi desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi eğitim hayatım boyunca yaşadığım bu en zorlu süreçte her zaman yanımda olan dostum Fulden Serinsu'ya

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu sürecin her aşamasında bana olan sevgilerini her daim hissettirerek motivasyon kaynağım olarak verdikleri manevi destek, anlayış ve sabır için ailem annem, babam, kardeşlerim ve eşim Ramadan Gökbilen' e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Serpil ÖZSOY

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
KISALTMALAR VE SİMGELER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLO DİZİNİ.....	xii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ	5
1.1.Kuramsal Yaklaşım ve Kapsam	5
1.2.Amaç.....	7
1.3.Hipotez	7
2.GENEL BİLGİLER.....	8
2.1.Kanser	8
2.1.1.Kanser ve Kanser Gelişimine Katkıda Bulunan Hücresel Mekanizmalar	8
2.1.2.Kolorektal Kanser Tanımı ve Oluşumu	11
2.1.3.Kolorektal Kanser Tanı ve Tedavi Yöntemleri	14
2.1.4.Kolorektal Kanser ve Risk Faktörleri	15
2.1.5.Kolorektal Kanser ve Beslenme İlişkisi	16
2.2.Apoptoz	17
2.3.Eksozomal mikro – Ribonükleik Asitler(miRNAlar) ve Karsinogenez	20
2.4.Hücresel Yaşlanma.....	23
2.5.Polifenoller.....	24
2.5.1.Kersetin ve Kersetinin Anti-Kanser Etkileri	26
3.MATERYAL ve METOD	31
3.1.Hücre Kültürü ve Optimizasyon	31

3.2.Kersetin Dilüsyonunun Hazırlanması	31
3.3.Hücre Canlılığı ve Büyümesi	31
3.4.İmmünohistokimya	32
3.5.Terminal Deoxynukleotidyl Transferase dUTP nick end Labeling(TUNEL) Testi	
33	
3.6.X-gal Boyama Protokolü	33
3.7.Eksozomal- mikro Ribonükleik Asit Analizi	34
3.8.Araştırma Yeri.....	34
3.9.İstatistiksel Analiz.....	34
4.BULGULAR	35
4.1.Hücre Canlılık Analizi Sonuçları	35
4.2.Apoptoz ve Hücrel Yaşlanma ile İlgili Proteinlerin İmmünohistokimyasal	
Değerlendirmesi	37
4.3.TUNEL Analiz Sonuçları.....	44
4.4.X- Gal Boyama Sonuçları	46
4.5.Eksozomal miRNA Analiz Sonuçları	47
5.TARTIŞMA	48
6.SONUÇ ve ÖNERİLER.....	54
7.KAYNAKÇA	56
8. EKLER.....	63
9. ÖZGEÇMİŞ.....	66

KISALTMALAR VE SİMGELER

KISALTMALAR VE SİMGELER

∅: Yüzde

± : Standart Hata

μL: Mikrolitre

μm: Mikrometre

APC: Adenomatöz polipoziscoli

Akt: Protein kinaz B

BAD: Bcl ilişkili ölüm düzenleyici

BAX: Bcl ilişkili X proteini

Bcl- 2: B-hücre lenfoma 2 (Bcell lymphoma 2)

Bcl- XL: B- hücre lenfoma ekstra büyük

Bid: BH3 ilişkili ölüm bölgesi

Bim: Bcl ilişkili mediyatör

BMPR1A: Kemik morfogenetik protein reseptörü, tip IA/bone morphogenetic protein receptor, type IA

c- FLIP: Hücresel FLICE inhibitör proteini (cellular FLICE inhibitory protein)

CIN: Kromozomal instabilite

CLA: Konjuge linoleik asit

ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri

DAB: Diaminobenzidin

DCC: Kolorektal Korsinomal Silme (Deleted in colorectal carcinomal)

DPC4: Pankreas Korsinomal Silme (Deleted in pancreatic carcinomal 4)

DISC: Ölüme neden olan sinyalleşme kompleksi (Death-inducing signalling complex)

DNA: Deoksiribonükleik asit

DY: Doymuş yağ

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EGFR: Epidermal büyüme faktör reseptörü (Epidermal growth factor receptor)

Elk-1: ETS benzeri protein 1 (ETS like protein 1)

ERK: Ekstra selüler regüle edici kinaz

FADD: Fas ile ilişkili ölüm bölgesi proteini (Fas-associated protein with death domain)

FasL: Fas Ligand

g: gram

GADPH: Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz

GPR109 α : G protein bağımlı reseptör α

GPR43: G protein bağımlı reseptör 43

GRB2: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2 (Growth factor receptor-bound protein 2)

HAA: Heterosiklik aromatik aminler

HSP: Isı şok proteinleri

IAPs: Apoptoz inhibitör proteinleri

IL-10 İnterlökin -10

KRK: Kolorektal kanser

KZYA: Kısa zincirli yağ asitleri

LncRNA: Uzun kodlanmayan ribonükleik asit

MAPK-Akt: Mitojen aktive edici- protein kinaz B

MEK: Mitojen aktive edici protein kinaz (mitogen-activated protein kinase)

mg: Miligram

MHC: Majör histon uyumluluk kompleksi

miRNA: mikro Ribonükleik asit

mL: Mililitre

MLH1: MutL homolog 1

MMP-2 Matrik Metalloproteinaz- 2

MMP-9Matriks Metalloproteinaz- 9

MMR: Uyumsuzluk onarım proteinleri

MNK: MAP kinaz etkileşimli serine/threonine-protein kinaz 1 (MAP kinase-interating serine/theonine-protein kinase 1)

MSH2: MutS Homolog 2

MSK: Mitogen and stress activated protein kinase

mTORC1:Rapamisin kompleksinin meneli hedefi 1 (mammalian target of rapamycin complex 1)

MTT: (3- (4,5-di-metiltiyazol-2-il) -2,5 DifeniltetrazoliumBromid

Nf-Kb: Nüklear faktör kapa beta

Nm: Nanometre

NOC: Nükleoid Oklüzyon proteini (Nucleoid occlusion protein)

Noxa: Phorbol-12-miristat-13-asetat ile indüklenen protein 1

PAH: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar:

PI3K: Fosfo inasitid 3 kinaz

pRb: protein retinoblastoma

PTEN: Fosfataz ve Tensin Homolog (Phosphatase and Tensin Homology)

PUMA: p53 regüle edici apoptoz modülatörü/p53 upregulated modulator of apoptosis

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif oksijen türleri

RSK: Ribozomal s6 kinaz (Ribosomal s6 kinase)

RTK: Reseptör Tirozin Kinaz

SOS: Son of sevenless

Src: Sitoplazmik tirozin kinaz

TSC1: Tübenoz Skleroz 1 (Tuberous Sclerosis 1)

TSC2: Tübenoz Skleroz 2

SMAD4/DPC4: Pankreas Kanserinde Silindi-4/ Deleted in Pancreatic Cancer-4

Sp1: Spesifik protein 1

DR5: Ölüm reseptörü 5

STK11: Serin/Treonin kinaz 11

TDYA: Tekli doymamış yağ asitleri

TGF- β :Dönüştürücü büyüme faktörü beta/ Transforming growth factor beta

TNF- α : Tümör nekroz faktör α

TRADD: TNFR1 ile ilişkili ölüm bölgesi proteini/ TNFR1-associated death domain protein

TRAIL: Tümör nekroz faktörü ile ilgili apoptozu indükleyen ligand(Tumour necrosis factor- related apoptosis-inducing ligand

TSG101:Tümör duyarlılığı geni 101 proteini/Tumor susceptibility gene 101 protein

UV: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Karsinogenez .	9
Şekil 2: Ras-ERK ve PI3K Yolağı	10
Şekil 3: Kolorektal Kanser Gelişimi	11
Şekil 4: APC Geninin Kolorektal Kanser Üzerine Etkileri	13
Şekil 5: Büyüme Faktörleri ve Karsinogenez	13
Şekil 6: Kolorektal Kanser ve Beslenme İlişkisi	17
Şekil 7: İntrinsik ve Ekstrinsik Apoptoz Yolakları	19
Şekil 8: Eksozomların Karsinogenetik Etkileri	21
Şekil 9: Hücresel Yaşlanmaya Genel Bakış	24
Şekil 10: Polifenollerin Sınıflandırılması	25
Şekil 11: Kersetinin Kimyasal Yapısı	27
Şekil 12: Kersetinin Sağlık Üzerine Potansiyel Etkileri	28
Şekil 13: Kersetinin Anti-kanser Etkileri	29
Şekil 14: Kersetinin miRNA'lar üzerine etkileri	30
Şekil 15: Kersetinin kolon adenokarsinom hücre dizilerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri	35
Şekil 16: Colo-320 ve Colo-741 hücreleri için kersetin IC50 değerleri	36
Şekil 17: Ters mikroskop altında görüntülenen Colo-320 ve Colo-741 hücreleri	36
Şekil 18: Colo-320 hücreleri 25 ug/ml kersetin uygulanan (B, D, F, H, J, L, N) ve kontrol grubundaki (A, C, E, G, I, K, M) B1 (M, N); Bax (A, B), Bcl-2 (C, D), Kaspaz-3 (E, F), Hsp27 (G, H), Lamin B1 (I, J), p16 (K, L), siklin B1 immünoreaktivitesi. Ölçek çubukları = 20µm.	40

Şekil 19: Colo-741 hücreleri 25 ug/ml kersetin uygulanan (B, D, F, H, J, L, N) ve kontrol grubundaki (A, C, E, G, I, K, M) B1 (M, N); Bax (A, B), Bcl-2 (C, D), Kaspaz-3 (E, F), Hsp27 (G, H), Lamin B1 (I, J), p16 (K, L), siklin B1 immünoreaktivitesi. Ölçek çubukları = 20µ	43
Şekil 20:TUNEL boyamasının değerlendirilmesi.....	46
Şekil 21: X- Gal boyamasının değerlendirilmesi.....	47

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Kolorektal Kanser Tarama Testleri	15
Tablo 2: Bazı Besinlerin Kersetin İçeriği(mg/100 g).....	27
Tablo 3: The intensity of Bax, Bcl-2, caspase-3, Hsp27, Lamin B1, p16 and cyclin B1 immunolabelling in Colo-320 and Colo-741 cells treated with 25µg/ml quercetin for 48 h.	38
Tablo 4 The H-SCORE of Bax, Bcl-2, caspase-3, Hsp27, Lamin B1, p16 and cyclin B1 immunolabelling in Colo-320 and Colo-741 cells treated with 25µg/ml quercetin for 48 h.	39
Tablo 5: 48 saat 25 ug / ml konsantrasyonda kersetin uygulanan Colo-320 ve Colo- 741 hücrelerinin TUNEL pozitif hücrelerinin yüzdesi,	45
Tablo 6 48 saat 25 µg / ml konsantrasyonda kersetin uygulanan Colo-320 ve Colo- 741 hücrelerinin X-Gal pozitif yüzdesinin kantitatif analizi.....	46
Tablo 7 48 saat 25 µg/ml konsantrasyonda kersetin uygulanan Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinin eksozomal miRNA izolasyon sonuçları.....	47

Kersetinin Kolon Kanser Hücreleri Sağ Kalımı ve Ölümü Üzerine Etkileri

Öğrencinin Adı: Serpil Özsoy

Danışmanı: Prof. Dr. Sevinç Yücecan

Eş Danışman: Prof.Dr. Seda Vatansever

Anabilim Dalı: Beslenme ve Diyetetik

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada kersetinin Colo-320 (primer) ve Colo-741(metastatik) kolon adenokarsinoma hücrelerinde hücre sağ kalımı, apoptoz ve hücre yaşlanma üzerine etkilerinin araştırılması ve kersetinin iki farklı kolon kanser hücresinden salınan eksozomlar ve eksozomal miRNA'lar üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hücre yaşlanma; Colo-320 ve Colo-741 hücre hatlarında MTT deneyi ile analiz edilmiştir. Kersetin uygulamasından sonra hücre yaşlanma, apoptoz, TUNEL boyaması, X-Gal boyaması ve Bax, Bcl-2, kaspaz-3, Hsp27, Lamin B1, p16, siklin B1 gibi ilgili proteinlerin immünohistokimyasal analizi dolaylı peroksidaz tekniği ile değerlendirilmiştir. Kersetin uygulamasının eksozomal total miRNA konsantrasyonlarına etkisi ise miCURY eksozom izolasyon kiti kullanılarak analiz edilmiştir.

Bulgular: Her iki hücre hattında hücre büyümesinin inhibisyonu için etkili dozun, 48 saat boyunca 25 ug/ml kersetin olduğu belirlenmiştir. Kersetin tedavisini takiben artan Bax immünoaktivitesi hem Colo-320 hem de Colo-741 hücre hatlarında anlamlı bulunmuştur, ancak azalmış Bcl-2 immünoaktivitesi sadece Colo-320 primer hücre hattında anlamlı olarak belirlenmiştir. Ek olarak, kersetin uygulamasından sonra, hem Colo-320 hem de Colo-741 hücrelerinde TUNEL pozitif hücre sayısı ve p16, Lamin B1 ve siklin B1 için immüno-aktiviteler anlamlı olmasa da artmıştır.

Sonuç: Sonuç olarak kersetin sadece Colo-320 primer kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indklemeyi başarmıştır. Bu bulgu polifenolik bileşiklerin hücre tipine ve kökenine göre etkilerinin farklı olabileceği hipotezini desteklemektedir. Ayrıca, kersetin kolon kanseri hücrelerinde yaşlanmayı da tetiklemiştir, ancak bazı hücreler canlı kalmıştır, bu da kolon kanseri hücrelerinin yaşlanmadan kaçmış olabileceğini düşündürmüştür. Kersetin uygulaması sonrası total miRNA konsantrasyonları her iki hücre hattında da artış göstermiştir, ancak değişiklik istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: kersetin, polifenol, apoptoz, hücresel yaşlanma, primer (Colo-320) kolon kanseri, metastatik (Colo-741) kolon kanseri.

Effects of Quercetin on Colon Cancer Cells Survival and Death

Name of Student: Serpil Özsoy

Advisor: Prof. Dr. Sevinç Yücecan

Co- Advisor: Prof.Dr. Seda Vatansever

Department: Beslenme ve Diyetetik

ABSTRACT

Objective: The flavonoid group of polyphenols has positive impacts on human health due to its anti-cancer, anti-inflammatory, anti-microbial and cardioprotective effects, and quercetin is one of the most attracted flavonol of this group. The influences of phenolic compounds, including quercetin, on programmed cell death and cellular senescence have been the subject of research in recent years. In this study, we aimed to investigate the effects of quercetin on cell viability, apoptosis and cellular senescence in primary (Colo-320) and metastatic (Colo-741) colon adenocarcinoma cell lines. Additionally, another aim of this study is to investigate the effects of quercetin treatment on exosomes and exosomal miRNAs released from two different colon cancer cells.

Methods: Cytotoxicity was analyzed via MTT assay in Colo-320 and Colo-741 cell lines. After quercetin treatment, cellular senescence and apoptosis were evaluated by *TUNEL* staining, X-Gal staining and indirect peroxidase technique for immunocytochemical analysis of related proteins such as Bax, Bcl-2, caspase-3, Hsp27, Lamin B1, p16, cyclin B1. The effect of quercetin treatment on exosomal total miRNA concentrations was analyzed using with miCURY exosome isolation kit.

Results: The effective dose for inhibition of cell growth in both cell lines was determined to be 25µg/ml quercetin for 48 hours. Increased Bax immunoreactivity following quercetin treatment was significant in both Colo-320 and Colo-741 cell lines, but decreased Bcl-2 immunoreactivity was significant only in the Colo-320 primary cell line. In addition, after quercetin administration, the number of TUNEL

positive cells and, immunoreactivities for p16, Lamin B1 and cyclin B1 in both Colo-320 and Colo-741 cells increased.

Conclusion: Our results suggest that quercetin may only induce apoptosis in primary colon cancer cells. Furthermore, quercetin also triggered senescence in colon cancer cells but some cells remained alive, suggesting that colon cancer cells might have escaped from senescence. Total miRNA concentrations increased in both cell lines after quercetin treatment, but the change was not statistically significant.

Keywords: quercetin, polyphenol, apoptosis, cellular senescence, primary (Colo-320) colon cancer, metastatic (Colo-741) colon cancer.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1.1 Kuramsal Yaklaşım ve Kapsam

Mutasyona uğramış anormal hücrelerin kolon veya rektumda kontrolsüz bir şekilde çoğalması kolorektal kanser olarak tanımlanmaktadır (American Cancer Society, Erişim tarihi: 11Mart 2020). 2018 yılı verilerine göre en sık yeni tanı alan 3. Kanser türünün kolorektal kanser olduğu bildirilirken, kansere bağlı ölümlerin %9,2'sinin kolorektal kansere bağlı ölümler olduğu belirtilmektedir (WHO, Erişim tarihi: 11 Mart 2020). Birinci dereceden aile yakınlarında kolorektal kanser olması, daha önceden kolorektal adenoma, kolorektal kanser veya yumurtalık kanseri geçirmiş olmak, uzun süreli ülseratif kolit veya Chron's hastalığı geçirmiş olmak, aşırı alkol tüketimi, sigara kullanmak, etnik köken ve obezite; kolorektal kanser gelişimine katkıda bulunan risk faktörleri arasındadır (National Cancer Institute, Erişim tarihi: 11 Mart 2020).

Polifenollerin anti- karsinojenik etkisi süre gelen yıllar içinde yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Scalbert ve ark., 2005). Kersetin anti- inflamatuvar ve anti- karsinojenik etki gösteren; soğan, elma, üzüm, yaban mersini, turuncgiller, maydanoz ve diğer yeşil yapraklı sebzeler gibi birçok sebze ve meyvede yaygın olarak bulunan flavanol grubu bir fitokimyasaldır (Shahifi, 2005). Kersetin' in NFk-B translokasyonunu ve TNF- α , IL- 6, IL- 1 β gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu baskılayarak anti- inflamatuvar etki gösterdiği yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Luca ve ark., 2019). Kersetinin anti-inflamatuvar etkisinin yanında anti-karsinojenik etkisi de oldukça ilgi gören bir araştırma konusudur.

Apoptoz normal gelişme ve yaşlanma sürecinde hücre sayısının kontrol altında tutulması için gerçekleşen, genetik olarak hücre eliminasyonunu sağlayan homeostatik bir mekanizma olarak bilinmektedir. Apoptoz iki yolak üzerinden aktifleşmektedir; ölüm – reseptör (ekstrinsik) yolağı ve mitokondriyal (intrinsik) yolak (Elmore,2007). Apoptoz diğer bir deyişle 'programlı hücre ölümü', mutasyona uğramış kanser hücrelerinin bu iki sinyal yolakları aracılığıyla ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır. Bu nedenle apoptoz karsinogenezde kritik bir rol üstlenmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

DNA hasarı, güçlü mitojenik sinyaller ve stres gibi onkojenik uyaranlara maruz kalan hücreler, hücre döngüsünü geri dönüşsüz olarak durdurur, bu olay hücrel yaşlanma (senesens) olarak tanımlanmaktadır (Schafer ve ark., 2017). Hücrel yaşlanma tümör baskılayıcı potansiyele sahiptir ve p53/p21 ve p16INK4a/pRB dahil olmak üzere iki ana tümör baskılayıcı yolu ile kontrol edilmektedir. DNA hasarı ve onkojenik sinyal, tümör baskılama proteini p53' ün DDR (DNA hasar yanıtı) yolu aktivasyonuna neden olur. p53 hücre döngüsü kontrol noktasının aktivasyonu üzerine, hasarlı hücreler bölünmeyi durdurur ve G1 veya G2 fazında hücre döngüsü durması meydana gelir (Pietrasik ve ark., 2020).

Eksozomlar, boyutları 30-100 nm arasında değişen endozom zarının içe doğru keseleşmesi ile oluşan ve ekzositoz yoluyla salınan yapılardır (Hood ve ark., 2011). Kan, tükürük, idrar gibi birçok vücut sıvısında bulunan eksozomlar taşıdıkları RNAlar, proteinler ve lipitler ile hücreler arası iletişimi sağlamaktadırlar (Wong ve Chen, 2019). Eksozom içeriği hem hücreden hücreye hem de hücrenin durumuna göre farklılık göstermektedir. Miyofibroblastlardan salınan eksozomal mikro ribonükleik asitlerin (miRNAlar) (miR-21, miR-409) kanserli hücrenin invazyonunu, proliferasyonunu, kemo-dirençliliğini ve metabolizmasını etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca taşıdıkları miRNAlar ile hücre canlılığı veya ölümü üzerine kontrol mekanizmalarını düzenlediği bilinmektedir. Kanserli hücrelerden salınan eksozomlarda bulunan immünomodülatör ajanlar (FasL, TGF- β , galactin-9, HSP72) aracılığı ile kanser hücrelerinin immün sistemden kaçısını regüle edebilmektedirler (Pan ve ar., 2017). Eksozomların kanser oluşumu ve gelişimindeki rolleri dolaşımda, göz yaşında, vücut sıvılarında vb. bulunabilmelerinden dolayı tanı ve tedavide kullanımları yeni hedefler arasında yer almaktadır (Wong ve Chen, 2019).

Bu araştırmada; günlük beslenmemizde sıklıkla yer alan elma, soğan, maydanoz, turunçgiller ve yaban mersini gibi meyve sebzelerde bulunan kersetinin kolon kanser hücreleri sağ kalımı ve ölümü üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Kersetinin hücre döngüsü ve apoptoz mekanizması üzerine olan etkileri yanında hücre kültüründen elde edilen eksozomlar ve miRNAlar üzerine olan etkilerinin araştırılmış olması projenin özgün değerini artırmaktadır. Kersetinin kolon kanser hücre dizisinde hücre

döngüsü ve apoptoz mekanizmasına olan etkileri ile eksozom ve miRNA analizini bir arada inceleyen bir çalışma henüz literatürde yer almamaktadır. Bu nedenle elde edilen verilerin literatüre yeni araştırmaların geliştirilmesi adına ışık tutacağı öngörülmektedir.

1.2 Amaç

Bu çalışmada kersetinin Colo-320 (primer) ve Colo-741 (metastatik) kolon adenokarsinoma hücrelerinde hücre sağ kalımı, apoptoz ve hücrel yaşlanma üzerine etkilerinin araştırılması ve kersetinin iki farklı kolon kanser hücresinden salınan eksozomlar ve eksozomal miRNAlar üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Kersetin primer (Colo-320) ve metastatik (Colo-741) kolon kanser hücrelerinde hücre canlılığını, apoptozu, hücrel yaşlanmayı ve eksozomal miRNAları doza ve inkübasyon süresine bağlı olarak etkileyecektir. Kersetinin karsinogeneizde önemli olan apoptoz, hücrel yaşlanma ve eksozomal miRNAlar üzerine etkileri hücre tipine ve kökenine göre farklılık gösterecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

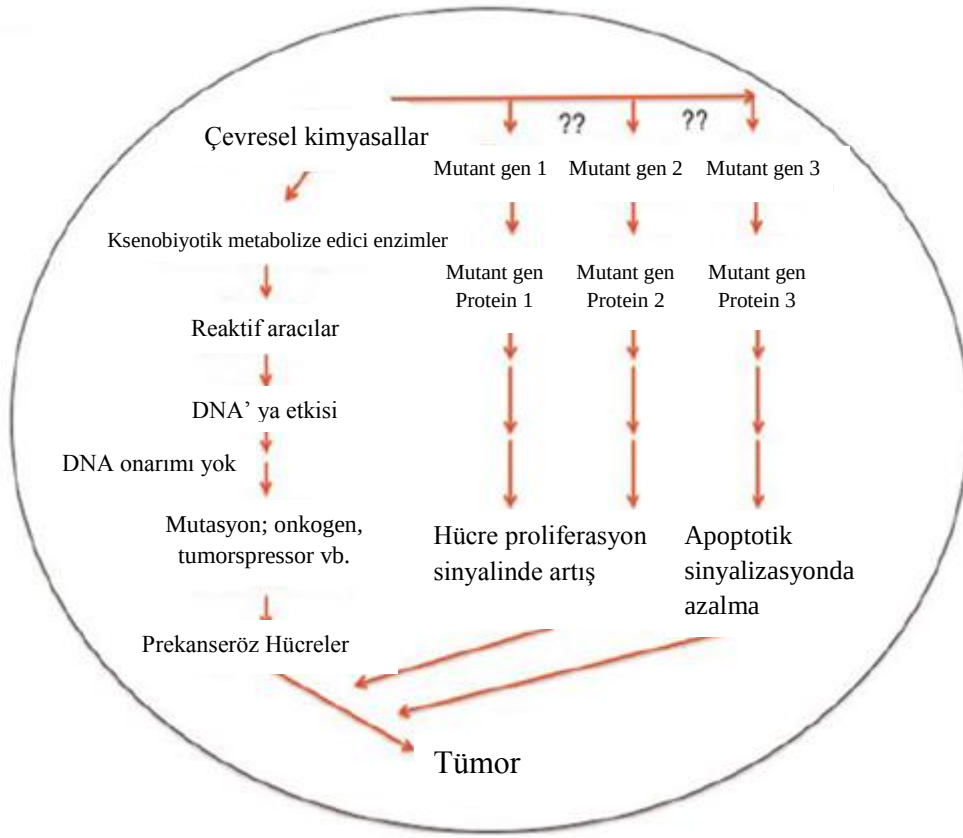
2.1.1 Kanser ve Kanser Gelişimine Katkıda Bulunan Hücresel Mekanizmalar

Kanser Amerika Birleşik Devletlerinde ikinci en yaygın ölüm nedenidir (NCD, Erişim tarihi:13.04.2020). Meme, servikal ve kolorektal kanserler erken tanı sayesinde önlenabilir kanser türleri arasındadır (NCD, Erişim tarihi:13.04.2020). Kanser gelişimine katkıda bulunan değiştirilebilir risk faktörlerinin; tütün kullanımı, UV ışınları ve radyasyon maruziyeti ve obezite olduğu bildirilmektedir (NCD, Erişim tarihi:13.04.2020).

Çevresel faktörlere bağlı olarak hücre içi sinyal yollarının ve genlerin mutasyona uğraması ve mutasyona uğramış hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması kanser olarak tanımlanmaktadır (Peters ve Gonzalez, 2018).

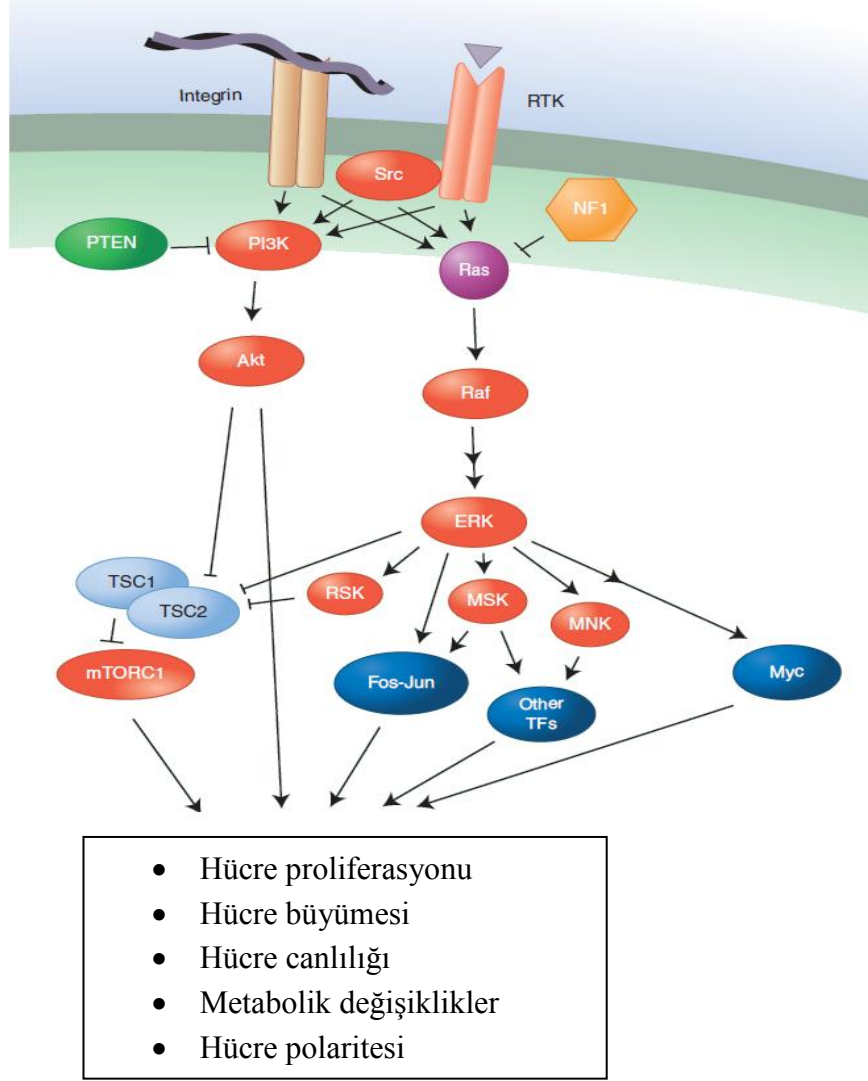
Kanser hücreleri proliferasyonunda etkili olan altı özellikle karakterize edilmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011);

- Proliferatif sinyalleri sürdürmek,
- Büyüme baskılayıcılardan kaçınmak,
- Hücre ölümüne direnmek,
- Replikatif ölümsüzlüğü sağlamak,
- Anjiyogenezi indüklemek.
- İnvazyon ve metastazı aktive etmek.



Şekil 1: Karsinogenez (Peters ve Gonzales, 2018).

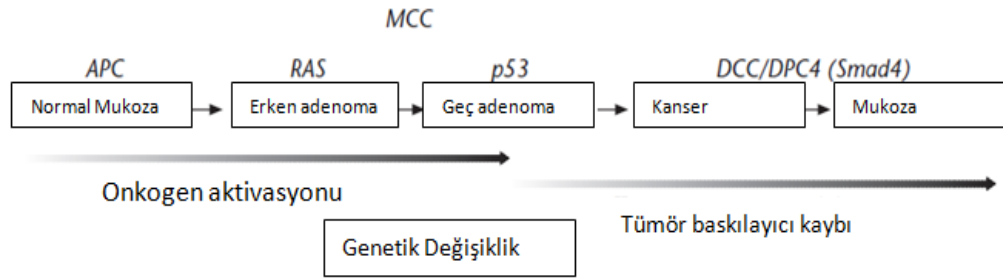
Kanserde MAPK (Mitojen - Activated Kinase) yolağı ve PI3K (Phosphoinositid 3-kinase) yolağı gibi yolakların mutasyona uğraması sonucu hücreler arası iletişim ve büyüme faktörlerine yanıt devam ettirilmektedir (Hanahanve Weinberg, 2011). Kanser hücreleri artmış proliferasyona ek olarak; genetik kararsızlıkları, anjiyogenezin indüksiyonu ve artan göç kapasiteleri ile canlılıklarını devam ettirmektedir (Sever ve Brugge, 2015). Kanser hücreleri sağ kalımı, proliferasyonu ve metastazında Ras-ERK (Ras- ekstraselüler sinyal regüle edici kinazlar) ve PI3K sinyal yolakları hücre bölünmesinin devam ettirilmesinde anahtar rol oynamaktadır (Sever ve Brugge, 2015) (Şekil 2).



Şekil 2: Ras-ERK ve PI3K Yolağı (Sever ve Brugge,2015) (RTK: reseptör tirozin kinaz, PTEN: Fosfataz ve Tensin Homolog/Phosphatase and Tensin Homolog, Src: Sitoplazmik tirozin kinaz/Cytoplasmic, PI3K:Fosfo inositid 3 kinaz/phosphatidylinositol 3-kinases, Akt: Protein kinaz B/Protein kinase B, ERK: ekstra selüler regüle edici/extracellular-signal-regulated kinase, TSC1: Tübero Skleroz 1/Tuberous Sclerosis 1, TSC2: Tübero Skleroz 2/Tuberous Sclerosis 2, mTOR1: Rapamisin kompleksinin memeli hedefi 1/mammalian target of rapamycin complex 1, MSK: Mitojen ve stres activated protein kinase/mitogen and stres activated protein kinase, MNK: MAP kinaz etkileşimli serine/threonine- protein kinaz 1/Map-kinase interacting serine/threonine protein kinase 1, RSK: Ribozomal S6 kinaz/ Ribosomal S6 kinase).

2.1.2 Kolorektal Kanser Tanımı ve Oluşumu

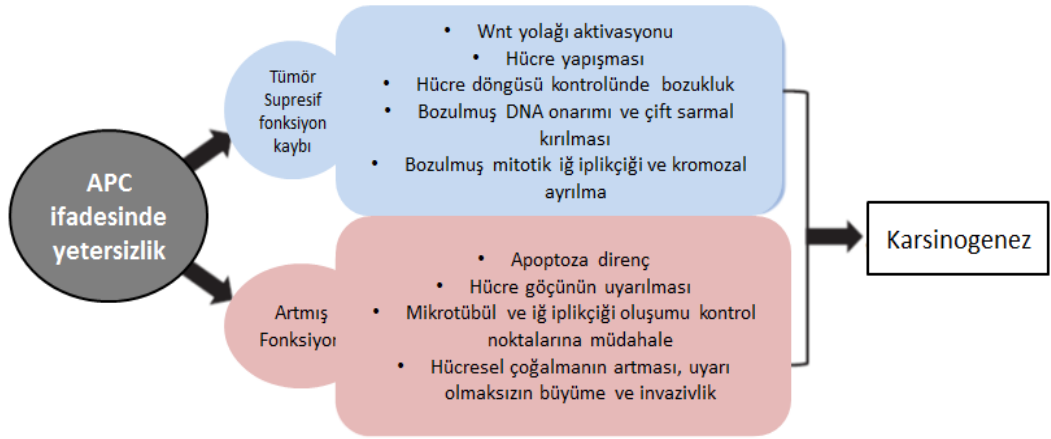
Kolorektal Kanserlerin (KRK) erkeklerde görülme oranı %10,2 iken, kadınlarda %9,5'tir (GLOBCAN,2018). Bu oranlara göre KRK erkeklerde 3., kadınlarda 2. en yaygın görülen kanser türüdür (Bray ve ark., 2018). Kolon kanseri; çekum ile başlayıp anüs ile sonlanan yaklaşık 1.5 m uzunluğunda olan kalın barsağın bir hastalığıdır (Yeatman, 2001). Barsak duvarı dıştan içe doğru; seroza, muskularis peopiya, submukoza ve mukozadan oluşur (Yeatman, 2001). KRK oluşumu; barsağın iç duvarındaki normal kolon epitelyumunun adenokarsinomlara ve tümöre dönüşmesiyle başlar (Aghabozorgi ve ark., 2019). Adenomatöz polipozis koli (APC), p53, MCC, DPC- 4 (Pankreas Karsinomal Silme- 4) gibi tümör baskılayıcı genlerin ifadesindeki eksiklik ve RAS, Src (sitoplazmik tirozin kinaz) gibi onkogenlerde meydana gelen mutasyon kolon kanser gelişiminde yer alan genetik değişikliklerdir (Yeatman,2001) (Şekil 3).



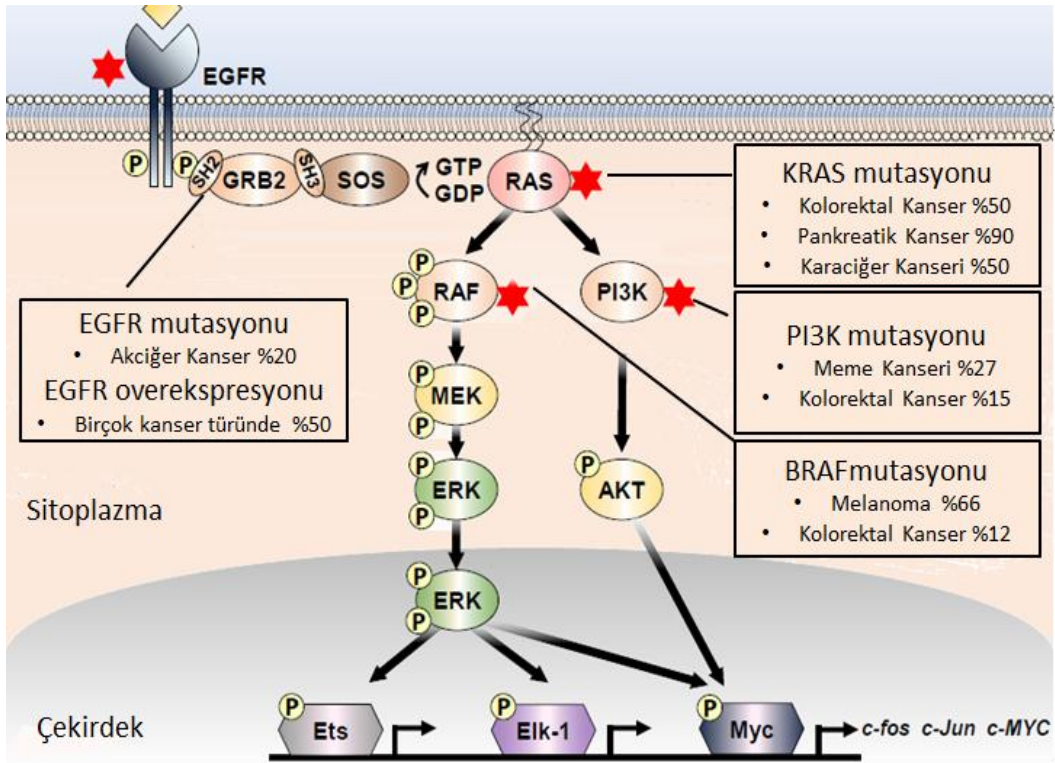
Şekil 3: Kolorektal Kanser Gelişimi (Fodde,2002) (APC: Adenomatöz polipozis koli, DCC: silinmiş kolorektal kanser/ deleted in colorectal cancer, DPC4: silinmiş pankreatik karinom 4/ deleted pancreatic carcinom 4).

APC geni hücre yapışması, yer değiştirmesi, sinyal iletimi, mikrotübül düzeneği ve kromozom ayrımı gibi birçok hücresel işleme katılan β - katenin'in kodlanmasından sorumludur (Fodde,2002). APC geninin tümör baskılayıcı kapasitesi β – katenin üzerine olan etkisiyle ilişkilidir (Fodde, 2002). Wnt/ β – katenin yolağı doku homeostazı ve morfogenezinde etkili olabilecek büyüme sinyallerinin etkin olduğu ve mutasyonu sonucu KRK dahil birçok kanser gelişimi ile ilişkili olan hücre içi sinyal yolağıdır (Aghabozorgi ve ark., 2019). Ayrıca, APC gen mutasyonu Familial Adenomatöz Polipozi (FAP) gelişmesiyle de yakından ilişkilidir

(Nallamilli, 2017). FAP kolon veya rektumda adenom veya polip gelişimi ile karakterize otozomal dominant kalıtsal bir hastalıktır (Wang ve ark., 2018). APC mutasyonu FAP ve Wnt/ β -katenin yolağına ek olarak hücre döngüsü ve farklı hücreyel olayları etkileyerek karsinogeneze katkıda bulunur (Zhang ve Shay, 2017) (Şekil 4). p53 (tümör protein 53), p21, pRb (retinoblastoma protein) gibi genlerdeki, mutasyon hücre bölünmesi üzerindeki kısıtlayıcıların azalmasına ve tümör oluşumuna neden olmaktadır (Nelson ve Cox, 2006). Fosforillenmiş pRb DNA (deoksiribonükleik asit) sentezi için gerekli olan proteinlerin sentezini uyararak E2F transkripsiyon faktörünün aktifleşmesini ve hücre bölünmesi için gerekli proteinlerin sentezlenmesini sağlar (Nelson ve Cox, 2006). Hücre döngüsü ve bölünmesi siklin bağımlı kinazlar tarafından regüle edilir (Nelson ve Cox, 2006). pRb fosforilasyonu siklin bağımlı kinaz- 2 ve siklin E kompleksi tarafından regüle edilir. DNA hasarının p53 genini aktifleştirmesi sonucu Siklin E- siklin bağımlı kinaz- 2 kompleksinin inhibitörü olan p21' in sentezini uyarır ve böylece DNA hasarı tespit edilen hasarlı hücre döngüsü inhibe edilir (Nelson ve Cox, 2006). p53 geni kanser hücresinin apoptozunu, hücre döngüsünden kaçmasını, hücreyel yaşlanmayı veya DNA onarımını etkilemektedir ve insan malignitelerinin %50' sinde mutasyona uğradığı düşünülmektedir (Duffy, 2017). Ras yolağı aktivasyonu hücrelerin farklılaşması, hareketi, canlılığını devam ettirmesi ve proliferasyonunu etkilemektedir (Lee ve ark., 2018). Epidermal büyüme faktörünün (EGF) reseptörü olan epidermal büyüme faktörü reseptörüne bağlanması (EGFR) hücre içinde bir dizi oto- fosforilasyona neden olarak Raf- MEK- ERK ve PI3K- Akt sinyalizasyonunu uyararak Ets, Elk- 1 (ETS benzeri protein 1), Myc gibi transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasına ve proliferasyonuna neden olmaktadır (Lee ve ark., 2018). KRK' lerin %90' ında KRAS geni mutasyona uğramıştır (Lee ve ark., 2018) (Şekil5).



Şekil 4: APC Geninin Kolorektal Kansere Etkileri (Zhang ve Shay, 2017).



Şekil 5: Büyüme Faktörleri ve Karsinogenez (Lee ve ark., 2018)(EGFR: Epidermal büyüme faktör reseptörü/ epidermal growth factor receptor, GRB2: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2/ Growth factor receptor- bound protein2, MEK: Mitojen aktive edici protein kinaz/Mitogen- activated protein kinase, Elk- 1: ETS benzeri protein 1/ ETS like protein 1, Akt: Protein kinaz B/Protein kinase B, PI3K:Fosfo inositid 3 kinaz/phosphatidylinositol 3-kinases).

2.1.3 Kolorektal Kanser Tanı ve Tedavi Yöntemleri

KRK taramasına bağılı olarak kanserin erken tanı ve tedavi edilebilir bir aşamada tanımlanarak prekanseröz adenomatöz poliplerin rezeksiyonu mortalite oranını düşürmektedir (Moreno ve ark., 2016; Ni ve ark., 2014). Lokalize ve erken aşamada teşhis edilen KRK vakalarında beş yıllık hayatta kalma oranı %90' a ulaşabilirken, kanserin başka doku ve organlara metastazı sonrası teşhis edilen vakalarda bu oran %5' e düşebilmektedir (Ni ve ark., 2014). KRK tarama metodları invazif ve non- invazif olarak iki gruba ayrılmaktadır (Issa ve Nouredine, 2017) (Tablo 1). Non- invazif testler vaskülarize polipler, adenomlar ve kanserli hücre döküntülerinin saptanmasına dayanmaktadır (Issa ve Nouredine, 2017). İnvazif testler ise patoloji örneği alma veya gelişmiş neoplazinin doğrudan görüntülenmesini sağlayabilmektedir (Issa ve Nouredine, 2017). TC Sağlık Bakanlığı 'Kolorektal Kanser Tarama Programı ve Ulusal Standartları', 50 yaş ve üzeri kadın ve erkek bireylerin her iki yılda bir gaitada gizli kan testi ve on yılda bir kolonoskopi ile tarama yapılmasını önermektedir (TC Sağlık Bakanlığı, Erişim Tarihi: 2 Mayıs 2020). Ayrıca birinci dereceden akrabalarında KRK veya adenomatöz polip, ülseratif kolit, Crohn' s hastalığı, kalıtsal polipozis veya polipozis dışı sendrom öyküsü olan yüksek risk grubundaki bireylerin 40 yaş ve sonrasında bu tarama programına dahil olmaları öngörülmektedir (TC Sağlık Bakanlığı, Erişim Tarihi: 2 Mayıs 2020).

Tablo 1: Kolorektal Kanser Tarama Testleri

İnvazif Testler	Non-invazif Testler
• Sigmoidoskopi • Kolonoskopi	• Dışkı Testi -Dışkıda gizli kan testi (gFOBT) -Dışkı İmmünokimyasal test(FIT) -Fekal DNA testi(MT- sDNA) • Kan Testi • Radyolojik testler -Baryum lavmanı -Kapsül endoskopi -Bilgisayarlı tomografik kolografi

2.1.4 Kolorektal Kanser ve Risk Faktörleri

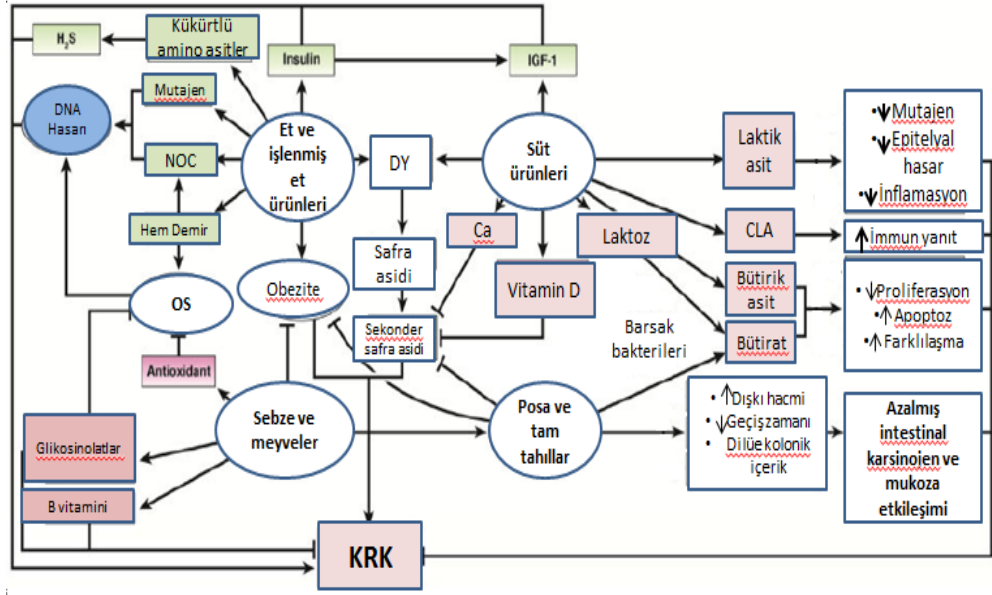
Obezite, fiziksel inaktivite, batı tarzı beslenme alışkanlıkları, alkol tüketimi, sigara kullanımı, yaş, inflamatuvar barsak hastalıkları öyküsü, ailede kolorektal kanser öyküsü, genetik yatkınlık, Lynch Sendromu (kalıtsal polipozis olmayan kolon kanseri), Familial adenomatöz polipozi (FAP), etnik köken ve tip 2 diyabet kolorektal kanser gelişimine katkıda bulunan risk faktörleridir (ACS, Erişim Tarihi: 2 Mayıs 2020). KRK vakalarının %25' inin aile öyküsünde KRK olduğu ve bunların %5- 6' sının KRK ile ilişkili genlerdeki mutasyonlardan kaynaklandığı öne sürülmektedir (Migilore ve ark., 2010). *APC*, *MUTYH*, *MLH1*, *MSH2*, *STK11*, *SMAD4*, *BMPR1A* ve *PTEN* gibi genlerde meydana gelen mutasyonlar bireyleri KRK gelişimine yatkın hale getirir (Migilore ve ark., 2010). KRK kanser gelişiminin genetik temeli; kromozomal kararsızlık ve mikrosatelit kararsızlık olmak üzere iki mekanizmayla ilişkilendirilmektedir (Müller ve ark., 2016). Kromozom sayısı silme, çoğaltma, yeniden düzenleme ve translokasyon gibi süreçleri etkileyen değişiklikler kromozomal kararsızlık (CIN) ile ilişkilidir. Mikrosatelit kararsızlık, uyumsuz DNA onarımı (MMR) ve p53, MLH1 gibi tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu sonucu susturulmaları ile ilişkilidir (Müller ve ark., 2016).

2.1.5 Kolorektal Kanser ve Beslenme İlişkisi

Beslenme alışkanlıkları, kolorektal kanser etiyolojisinde yer alan en önemli çevresel risk faktörüdür (Migilore ve ark., 2010). Yüksek miktarda işlenmiş et ve kırmızı et tüketimi, yüksek rafine karbonhidrat alımı ve düşük sebze- meyve tüketimine dayalı beslenme alışkanlıklarının KRK ile doğru orantılı ilişkisi olduğu belirtilmektedir (Haque ve ark., 2014). KRK ve anti-inflamatuar diyet bileşenleri; posa, tekli doymamış yağ asitleri (TDYA), çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA), omega-3, omega- 6, B grubu vitaminleri, Çinko (Zn), Magnezyum (Mg), vitamin A, vitamin C, vitamin D, folik asit ve polifenoller arasında ters yönlü bir ilişki vardır (Thanikachalam ve Khan, 2019).

Posa; bitki hücre duvarının yapısında bulunan ve insan sindirim enzimleri tarafından sindirilemeyen polisakkarittir. Posa alımı ve KRK arasındaki ters yönlü ilişkinin; dışkı kütlesini artırması, gastro intestinal geçiş süresini kısaltması ve kolonik fermentasyona bağlı oluşan KZYA (kısa zincirli yağ asitleri)’ nin (bütirat, asetat, propiyonat) etkilerinden ileri geldiği düşünülmektedir (Song ve ark., 2015) (Şekil 6). KZYA’ leri genetik- epigenetik düzenlemeler (histon deasetilaz inhibisyonu, miRNA, Wnt sinyalizasyonunun baskılanması, anti-proliferatif etkileri(p53, p21 aktivasyonu, hücre döngüsünün baskılanması, apoptoz) ve immünomodülatör etkileri (GPR43, GPR109 α aktivasyonu, IL-10 ekspresyonu, Nf-k β baskılanması) nedeni ile KRK riskinin düşürülmesinde etkili olabilmektedir (O’Keefe, 2018).

İşlenmiş etlerde bulunan N-nitrozo bileşikler ve yüksek ısıda pişirme, tutsüleme işlemine bağlı oluşan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) kolorektal kanser gelişimine katkıda bulunan beslenme ile ilişkili risk faktörleri arasındadır. Ayrıca kırmızı ette bulunan hem demir; endojen aminlerin oluşumunu ve lipit peroksidasyonunu katalize ederek pro- oksidatif etkiler oluşmasına neden olmaktadır. PAH, HAA (hetorsiklik aromatik aminler) ve N- nitroza bileşikler DNA hasarına ve mutasyona neden olarak KRK gelişimine katkıda bulunmaktadır (Turesky, 2018).



Şekil 6: Kolorektal Kanser ve Beslenme İlişkisi (Song ve ark., 2015) (DNA: Deoksiribonükleik asit, IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1/Insulin-like growth factor 1, DY: doymuş yağ, NOC: nükleoid oklüzyon proteini/nucleoid occlusion protein, OS: oksidatif stres, CLA: konjuge linoleik asit)

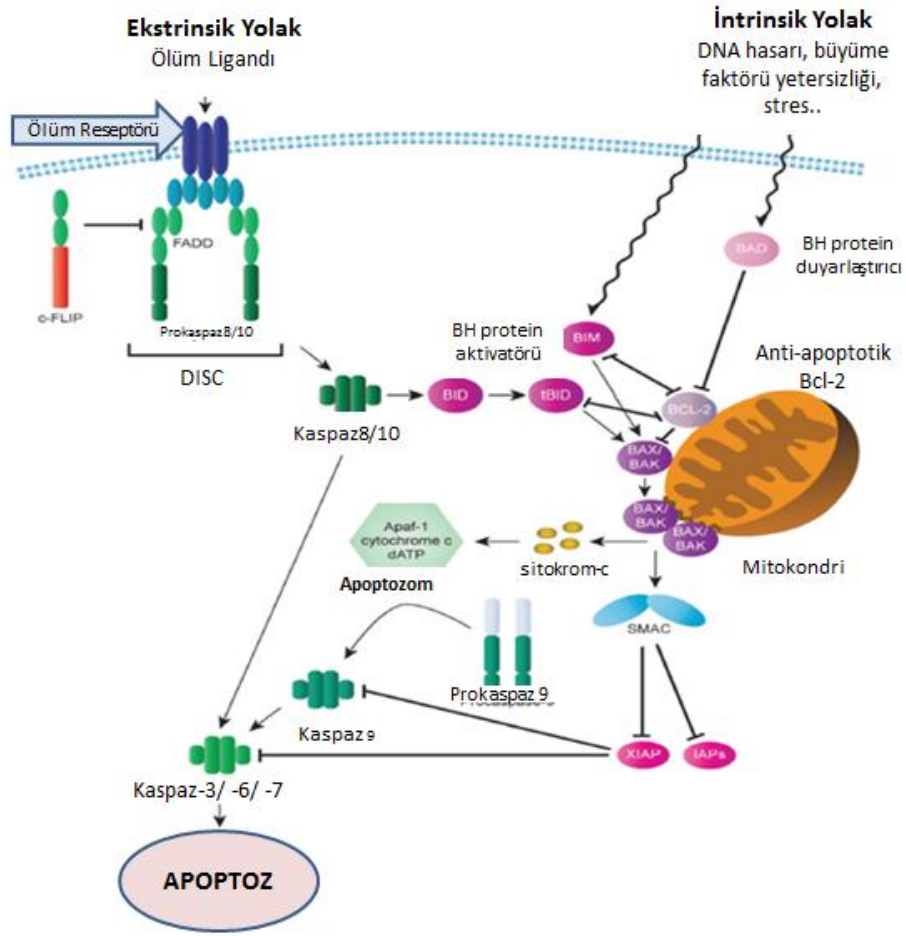
2.2 Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda mitoz bölünmeyle artan hücre sayısı ve hasarlı veya artık gereksinim duyulmayan hücre sayısı arasında homeostatik bir denge vardır (D'Arcy, 2019). Bu dengeyi sağlayan mekanizma hücresel anormalliklerin tespit edilmesi ile devreye giren apoptoz mekanizmasıdır (D'Arcy, 2019). Apoptoz; nematod *Caenorhabditis elegans*' in normal gelişimi sırasında somatik hücrelerinin bazılarında meydana gelen programlı hücre ölümü sonucu dikkatleri üzerine çekmiştir (Ellis ve Horvits, 1986). Apoptoz; kaspaz (sistenil, aspartata özgü proteazlar) olarak bilinen proteaz ailesi tarafından regüle edilmektedir (Plati ve ark., 2011). Programlı hücre ölümü olarakta bilinen apoptozu yöneten kaspazları; başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, -9) ve sonlandırıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) olmak üzere iki gruba ayırmak mümkündür (D'Arcy, 2019). Sonlandırıcı kaspazların aktivasyonu geri dönüşümsüz bir şekilde endonükleazların aktivasyonu, nüklear proteinlerin ve hücre iskeletinin yok edilmesini ve fagositik ligandların ekspresyonunu uyararak hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını indüklemektedir (Elmore, 2007;

D'Arcy,2019). Apoptoz birçok hücre içi ve hücre dışı sinyal yolağı üzerinde aktifleşmektedir (Pistritto ve ark., 2016). Bu yolaklardan biri mitokondriyal yolak olarak da bilinen intrinsik yolaktır, diğeri ise ölüm reseptör yolağı olarakta bilinen ekstrinsik yolaktır (Pistritto ve ark., 2016).

DNA hasarı, onkogenlerin aktivasyonu, büyüme faktörlerinin yetersizliğı veya oksidanların varlığı gibi durumlara yanıt olarak intrinsik (mitokondriyal) apoptotik yolak uyarılmaktadır. Mitokondriyal yolak BAX (Bcl ilişkili X proteini) ve BAK proteinlerinin oligemrizasyonu mitokondriyal membranın geçirgen hale gelmesine ve membran içi ikinci mitokondri türevi kaspaz aktivatörü (SMAC) olan sitokrom- c' nin membranlar arası boşluğa sızmasına neden olur. Sitokrom-c salınımı; sitokrom-c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1(APAF-1), dATP ve pro- kaspaz – 9 ile birlikte apoptozomu oluşturur. Apoptozomun da yapısında bulunan prokaspaz – 9' un kaspaz – 9' a çevrilmesi sonlandırıcı kaspazların (kaspaz – 3, -6 ve – 7) uyarılmasını ve hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlar (Pfeffer ve Singh,2018; Plati ve ark., 2011) (Şekil 7).

Ektrinsik ya da ölüm ligandı apoptotik yolakta yer alan ligandlar; Fas-ligand (Fas – L) ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen liganttır (TRAIL). Ligandların reseptöre bağlanması sitozolik kısımdaki ölüm bölgelerinin (FADD, TRADD) prokaspaz – 8 ve - 10' a bağlanmasına ve hücre içi ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) oluşuma neden olur. DISC sonlandırıcı kaspazlar olan kaspaz – 3, - 6 ve - 7' nin aktifleşmesine ve hücre ölümünün tetiklenmesine neden olur (Pfeffer ve Sing, 2018; Plati ve ark, 2011) (Şekil 7). Apoptozun intrinsik ve eksterinsik yolaklarına ek olarak Performin/ granizim yolu da T- hücre aracılı sitotoksisite ve duyarlaştırılmış CD8 + antijen taşıyan hücrelerin ortamdan uzaklaştırıldığı bir yolaktır. Sitotoksik T lenfositleri ekstrinsik yolak ve FasL/ FasR etkileşimi ile apoptozu indükleyebilmektedir (Elmore, 2007).



Şekil 7: İntrinsik ve Ekstrinsik Apoptoz Yolakları (Plati ve ark., 2011) (DISC: Ölüme neden olan sinyalleşme kompleksi/Death-inducing signaling complex, FADD: Fas ile ilişkili ölüm bölgesi proteini/ Fas-associated protein with death domain, c-FLIP: Hücresel FLICE inhibitör proteini/ cellular FLICE – inhibitory protein, Bcl-2: B-hücre lenfoma 2/ B- cell lymphoma 2).

Apoptoz; doku homeostazı, embriyonik gelişim ve immün regülasyonun sağlanması için gerekli hücre ölüm şeklidir (Ranjan ve Iwakuna,2016). Malignan hücrelerin ortadan kaldırılması ve tümörögenезin baskılanması için önemli olan apoptozun azalması veya apoptoza karşı direnç gelişmesi karsinogeneze katkıda bulunan en önemli faktördür (Wong, 2011). Genel olarak pro- apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin bozulmuş dengesi, azalmış kaspaz fonksiyonu ve bozulmuş ölüm reseptör sinyalizasyonu kanser hücrelerinde görülebilecek değişikliklerdir

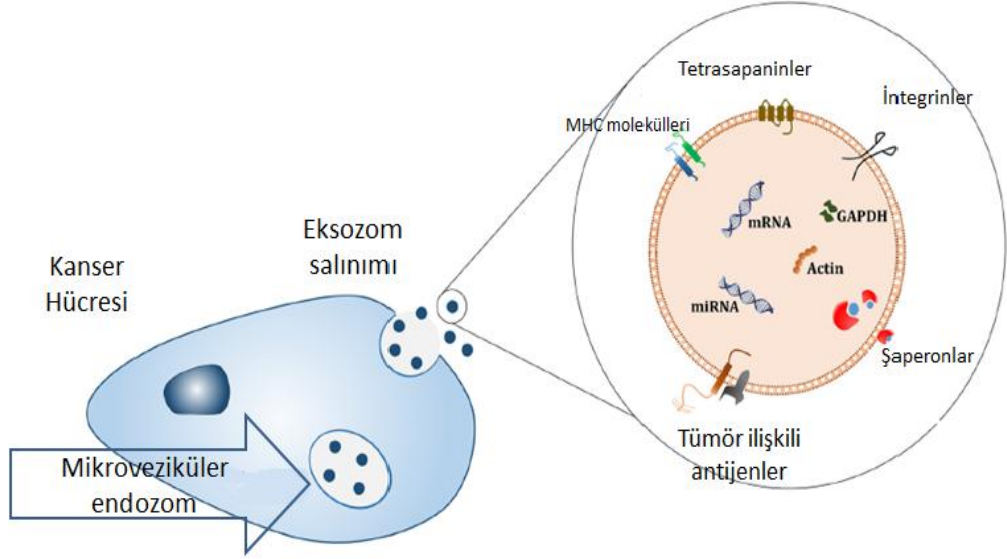
(Wong, 2011). Kanser gelişimine katkıda bulunan apoptozla ilişkili değişen mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir;

- Azalmış ölüm reseptörü ekspresyonu
- Azalmış ölüm sinyalizasyonu
- Bozulmuş Bcl-2 protein ailesi dengesi
 - Anti – apoptotik proteinlerin artışı (Bcl-2, Bcl- xL, Mcl-1, Bcl-w)
 - Pro –apoptotik proteinlerin azalması (Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bax, Bak)
- p53 mutasyonu
- Kaspaz ekspresyonunda azalma
- Artmış IAPs (Apoptotik protein inhibitörü) ekspresyonu (Wong, 2011).

2.3 Eksozomal mikro – Ribonükleik Asitler (miRNAlar) ve Karsinogenez

Eksozomlar, tüm hücre tipleri tarafından salınan yaklaşık 40- 150 nm büyüklüğünde, endozom zarının içe doğru keseleşmesi ile oluşan ve eksositoz yoluyla salınan yapılardır (Kalluri, 2016; Hood ve ark., 2011). Kan, tükürük idrar gibi birçok vücut sıvısında bulunan eksozomlar hücreler arası iletişimi sağlamaktadırlar (Wong ve Chen, 2019). Fizyolojik olarak normal hücrelerden de eksozom salınımı olsa da enfeksiyon, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi patolojik durumlarda salınımları artmaktadır (Gonzalez ve ark., 2018). Eksozomlar köken aldıkları hücre ile benzerlik göstermektedirler ve RNA, DNA gibi hücrenin bilinen tüm moleküler bileşenlerini içerebilmektedir (Kalluri, 2016) (Şekil 8). Eksozom içeriği hem hücreden hücreye hem de hücrenin durumuna göre farklılık göstermektedir. Farklı hücre kökenli eksozomlar ortak bazı proteinleri içermektedir; CD53, CD63, CD81 ve CD86 tetraspanin molekülleri öne çıkmaktadır. Eksozomlar ayrıca MVB (multi veziküler cisimcikler) oluşumunda rol alan Alix, TSG101, Rab11, HSP70, HSP90, Annexin I ve II, ICAM-1 proteinlerini de ifade etmektedir (Ersöz ve ark., 2016). Miyofibroblastlardan salınan eksozomal miRNAlar (miR-21, miR-409) kanserli hücrenin invazyonunu, proliferasyonunu, kemo- dirençliliğini ve metabolizmasını etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca taşıdıkları miRNAlar ile hücre canlılığı veya

ölümü üzerine kontrol mekanizmalarını düzenlediği bilinmektedir. Kanserli hücrelerden salınan eksozomlarda bulunan immünmodülatör ajanlar (FasL, TGF- β , galactin- 9, HSP72) aracılığı ile kanser hücrelerinin immün sistemden kaçışını regüle edebilirler (Pan ve ark., 2017).



Şekil 8: Eksozomların Karsinogenetik Etkileri (Gonzalez ve ark., 2018) (MRNA: mesajcı ribonükleik asit, MHC: majör histokompatibilite kompleksi, miRNA: mikro ribonükleik asit).

Tümörden türetilen eksozomlar, kanserlerin otokrin/parakrin indüksiyonunu, anjiyogenезin aktivasyonunu, bağışıklık sisteminin modülasyonunu, stromal hücrelerin yeniden düzenlenmesini, ve metastazına katkıda bulunan hücre dışı matriksin yeniden düzenlenmesini sağlayarak kanserin ilerlemesine ve metastaz yapmasını sağlar. Tümörden türetilmiş eksozomlar, kanser hücreleri arasında epidermal büyüme faktörü reseptörü (eEGFR) vIII onkojenik reseptörü veya ZFAS1 lncRNA' nın aktarımını sağlayarak kanserin ilerlemesine neden olur. Ayrıca tetraspaninler veya mikroRNA (miRNA) kümeleri gösteren tümör kaynaklı eksozomlar endotel göçünü indükler. Ek olarak tümörden türetilmiş eksozomlar, miR - 9, miR - 105 ve miR - 181c gibi miRNA' yı kanserlerden normal fibroblastlara veya vasküler endotelial bariyerlere kadar ileterek kanser malignitesini artırır. Ayrıca, integrinler tümör kaynaklı eksozomları spesifik farklı hedef organlara yönlendirerek

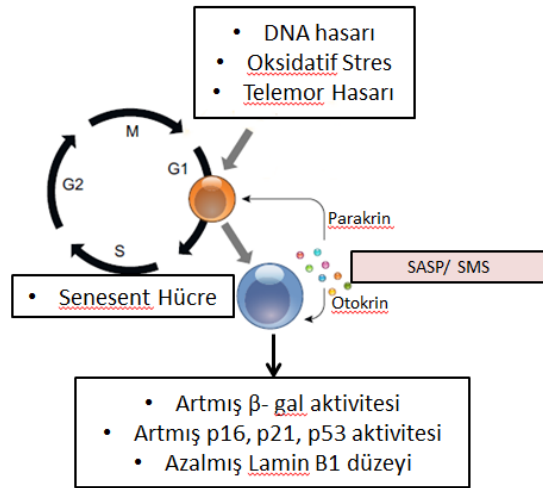
metastatik organotropizme yol açar. Hücre dışı matriks yeniden modelleme enzimlerinin verilmesi ile tümör kaynaklı eksozomlar kanser metastazına katkıda bulunur (Tai ve ark., 2018).

Metastaz kanser hücrelerinin bazal membrandan kan damarlarına invazyonu ve kan dolaşımında hayatta kalmayı, kan damarlarına migrasyonu ve son olarak kolonizasyon ve büyümeyi içeren çok aşamalı bir süreçtir. miRNA'lar RNA'nın dengesizleşmesine parçalanmasına ve kodlanmış proteinin azalmasına yol açan kodlayıcı olmayan RNA'lardır. miRNA'lar eksozomların ana RNA bileşenidir. TDE (tümörden türetilmiş eksozomlar) kanser hücrelerinin düzensiz miRNA profilini yansıtır ve eksozomal aktarımları aracılığıyla hedef hücrelerin gen ekspresyonunu etkileyerek pre- metastatik epigenetik değişikliklere neden olabilirler (Steinbicher ve ark.,2017). Eksozomların kanser oluşumu ve gelişimindeki rolleri, dolaşımda, göz yaşında ve diğer vücut sıvılarında bulunabilmelerinden dolayı tanı ve tedavide kullanımları yeni hedefler arasında yer almaktadır (Wong ve Chen, 2019).

Düzensiz miRNA ekspresyonu tümör supresör genlerin ve onkogenlerin ekspresyonunu etkileyerek KKK gelişimine ve metastazına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, miRNA'ların düzeyindeki değişiklik KKK gelişimi, metastazı, kemo-dirençliliği veya nüks etmesine katkıda bulunma potansiyeline sahiptir. miRNA'lar eksozomlar aracılığıyla tümör hücreleri ve tümör mikro çevresi bileşenleri arasında doğrudan hücre- hücre sinyalleşmesi veya parakrin sinyalleşmeyi sağlayarak metastaz gelişimine katkıda bulunmaktadır (Balacescu ve ark., 2018). miRNA'lar için kargo görevi üstlenen tümör türevi eksozomlar metastatik niş gelişimi için gerekli adımların her birinde görev almakta ve katkıda bulunmaktadır (Hoshino ve ark., 2016). KKK' de miRNA'ların epitelial mezenkimal geçişle ilişkili olduğundan tanı, tedavi yanıtı ve prognozda belirteç olarak işlev görebileceği düşünülmektedir (J.Yiu ve Y. Yiu ve ark., 2016).

2.4 Hücresel Yaşlanma

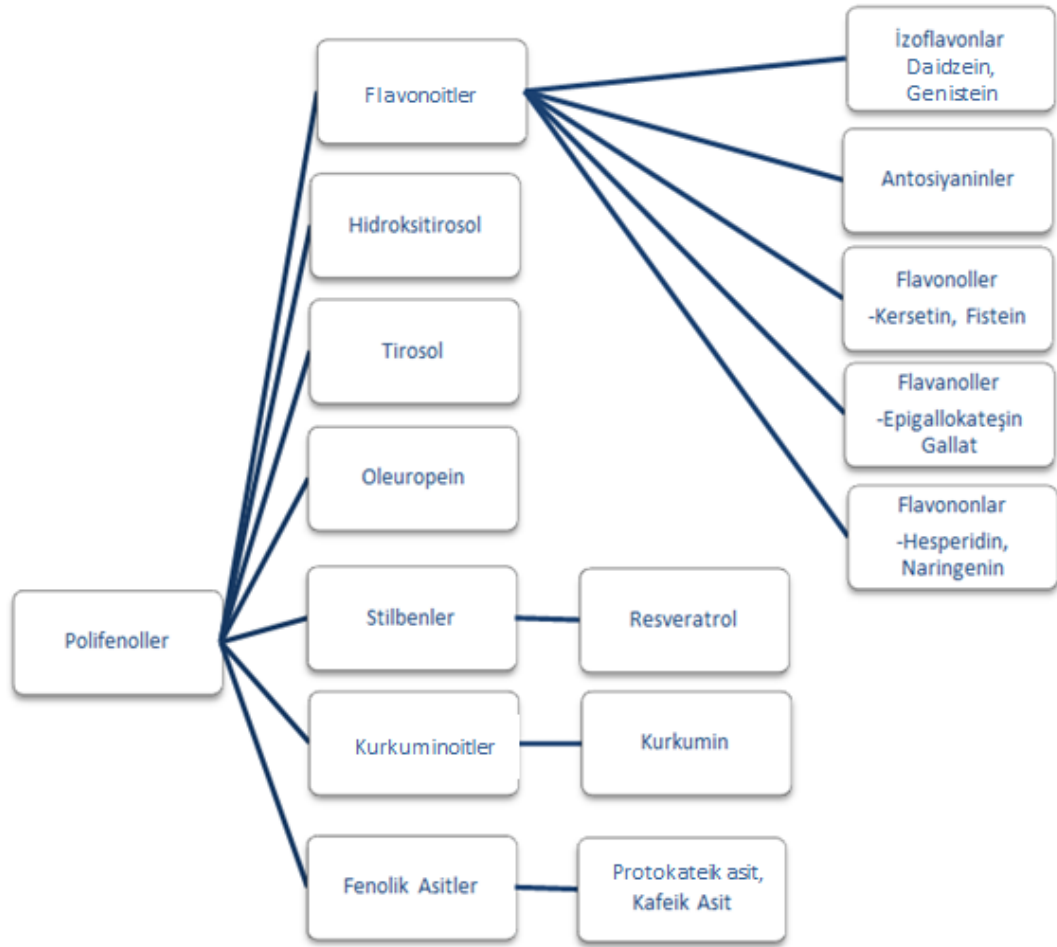
DNA hasarı, güçlü mitojenik sinyaller ve stres gibi onkojenik uyaranlara maruz kalan hücreler, hücre döngüsünü geri dönüşsüz olarak durdurur, bu da hücresel yaşlanma olarak tanımlanır. Hücresel yaşlanma tümör baskılayıcı potansiyele sahiptir ve p53/p21 ve p16INK4a/pRB dahil olmak üzere iki ana tümör baskılayıcı tarafından kontrol edilmektedir. DNA hasarı ve onkojenik sinyal, tümör baskılama proteini p53'ün DDR (DNA hasar yanıtı) yolu aktivasyonuna neden olur. p53 hücre döngüsü kontrol noktasının aktivasyonu üzerine, hasarlı hücreler bölünmeyi durdurur ve G1 veya G2 fazında hücre döngüsünün durması meydana gelir. Ayrıca, hücrenin koruyucusu olarak tanımlanan aktif p53, sikline bağlı kinazlar (CDK'ler) inhibitörleri olan pro- senesent proteinler p21 ve p16'nın aşırı ekspresyonunu indükler (Pietrasik ve ark., 2019). Siklinler, hücre döngüsünün düzenlenmesinden sorumludur. Siklin B1, hücre döngüsünde G2 fazından M fazına geçişte önemli bir rol oynar. Siklin B1'in azalmış aktivitesi, G2 tutulması ve mitozun kesilmesi için önemlidir. Nüklear zarfta bulunan lamina çekirdeğin boyutunu, şeklini ve stabilitesini korumaktadır. Lamin A (Lamin A ve C) ve Lamin B (Lamin B1 ve B2) olmak üzere iki farklı tipte lamin karakterize edilmiştir. Embriyonik farklılaşma ve hücre hayatta kalması için lamin B gereklidir. Çalışmalar, yaşlanan hücrelerde Lamin B1 kaybının meydana geldiğini göstermiştir (Campisi, 2012; He ve Sharpless, 2017; Freund ve ark., 2012). DDR (DNA hasar yanıtı), p21, p16 gibi sinklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin aşırı ekspresyonu, lizozomal protein olan senesens ilişkili β - galaktosidaz (SA- β gal) aktivitesindeki artış ve nüklear laminanın yapısal proteinlerinden olan Lamin B1' in azalması hücresel yaşlanmanın karakteristik özellikleri arasındadır (H. Segura ve ark., 2018).



Şekil 9: Hücresel Yaşlanmaya Genel Bakış (Calcinotto ve ark., 2019)(SASP: senesens ilişkili sekretuar fenotip, SMS: senesens mesajlaşma sekretomu, DNA: deoksiribonükleik asit, β -gal: beta galaktosidoz).

2.5 Polifenoller

Polifenoller; bitkisel kaynaklı besinlerin yapısında bulunan kompleks kimyasal yapıya sahip biyoaktif bileşenlerdir. Polifenollerin temel yapısını fenolik asit veya fenolik alkoller barındıran fenolik halkalar oluşturmaktadır (Abbas ve ark., 2016). Polifenoller içerdikleri fenolik halka sayısına ve bu halkaların bağlandığı yapısal elementlere göre sınıflandırılmaktadırlar. Sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan polifenoller glikozit, ester, polimer ve hidroksillenmiş formda bulunurlar. Polifenoller flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler ve kurkuminoitler olarak sınıflandırılmaktadır (Santangelo ve ark. 2016) (Şekil 9).



Şekil 10: Polifenollerin Sınıflandırılması (Satangelo ve ark.,2016)

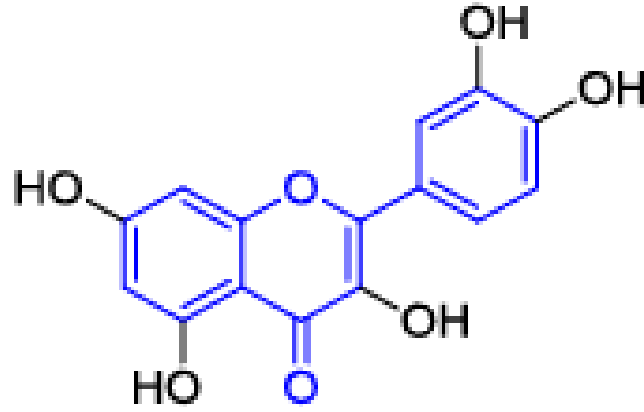
Diyetle alınan polifenollerin %5- 10' u ince barsaklardan emilirken, emilemeyip kolona geçen %90 – 95' lik kısım kolonik fermantasyona uğrayarak fizyolojik olarak aktif metabolitlerine dönüştürülür (Cordona ve ark., 2013). Polifenollerin anti-oksidadan, anti-inflamatuar, anti-viral, anti-anjiyogenik ve apoptozu indükleyici etkileri sayesinde astım, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet ve enfeksiyonel hastalıklardan koruyucu potansiyel etkileri olduğu bilinmektedir (Lall ve ark., 2015). Radyasyon veya kimyasal karsinojenlere bağlı oluşan serbest oksijen radikalleri DNA hasarına ve mutasyona neden olarak karsinogenezi başlatıcı etkiye neden olmaktadır. Polifenoller; serbest radikallerin karaciğerde Faz I ve Faz II enzim sistemi aracılığıyla detoksifiye edilmesini sağlayarak anti-oksidadan etki göstermektedir. Ayrıca fenolik bileşikler apoptozu indükleyerek ve Nf-kB yolunu

baskılayarak kanser proliferasyonunu ve metastazını inhibe etmektedir (Kondratyuk ve Pezzuto, 2004). Son yıllarda kemo-preventif ve kemo-teröpatik etkileri nedeni ile polifenoller anti-kanser çalışmaların güncel araştırma konusudur.

2.5.1 Kersetin ve Kersetinin Anti-Kanser Etkileri

Kersetin flavanoidlerin flavonol grubunda yer alan polifenolik bileşiktir. Soğan, elma, çilek, brokoli, çay ve kırmızı şarap gibi sebze, meyve ve içeceklerde yaygın olarak bulunan kersetin besinlerin içinde serbest (aglikon), karbonhidrat (kersetin glikozid) veya alkole (kersetin metil ester) bağlı olarak da bulunabilmektedir (Massi ve ark., 2017). Besin matriksi ve barsak bütünlüğü kersetin biyoyararlanımını ve emilimini etkilemektedir. α - glikozillenme kersetin biyoyararlanımını artırmaktadır. Dolaşımda konjuge formda bulunan kersetin dekonjugasyon sonrası metabolitleri aracılığıyla hedef hücrelerde etki gösterebilmektedir (Terao, 2017). Batı tarzı diyetlerde günlük tahmini 3- 40 mg arası kersetin alımı olduğu, bu oranın yüksek sebze- meyve tüketen toplumlarda 250 mg' a kadar yükselebileceği düşünülmektedir (Andres ve ark., 2018). Tablo 2' de günlük beslenmemizde yer alan bazı besinlerin kersetin içerikleri verilmiştir.

Kersetin katekol ve hidroksil grubu konfigürasyonu sayesinde serbest radikalleri temizleme ve metal iyonlarını bağlama kapasitesi sayesinde güçlü bir antioksidan ve lipid peroksidasyon inhibitörüdür (Andrea 2015; Khan ve ark., 2016). Kersetin COX-2 enzimi ve proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonundan sorumlu nüklear faktör kabba B (Nf-kB) transkripsiyon faktörünü baskılayarak anti- inflamatuvar etki göstermektedir. Kersetin MAPK, JAK- STAT, PI3K- Akt gibi karsinogenezde önemli sinyal yollarını inhibe ederek anti-kanser etki gösterme potansiyeline sahiptir. Ayrıca kanser hücrelerinde p53 aktivasyonunu indükleyerek kanser proliferasyonunu inhibe edici potansiyel etki gösterebilmektedir(Khan ve ark.,2016).

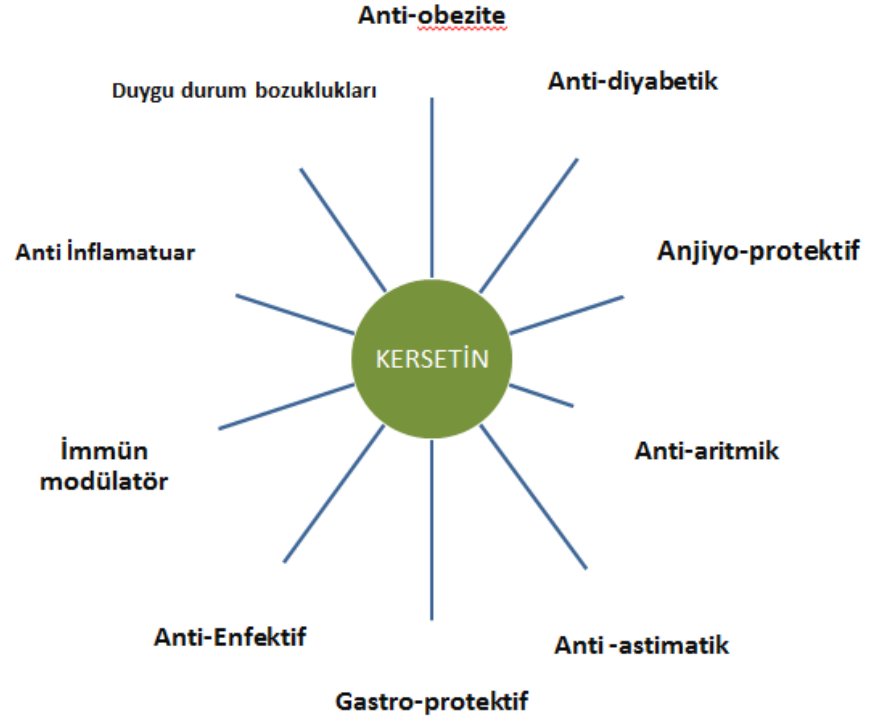


Şekil 11: Kersetinin Kimyasal Yapısı (Massi ver ark., 2017)

Kersetin, hücre zarını geçebilen ve kemo- prevensiyonda çoklu hücre içi sinyal yollarını aktive edebilen bir lipofilik bileşiktir (Shafabakhsh ve Asemi, 2019). Kersetinin bilinen en iyi etkileri pro-oksidan veya antioksidan olarak çift yönlü işlev görmesidir. ROS türlerinin sebep olduğu oksidatif stres, DNA hasarına ve mutasyon gelişimine neden olur. Mutasyonlar, malign tümör hücrelerinin hiperplazi ve proliferasyonunda etkilidir. Kersetin elektron alış- veriş yaparak ROS' u azaltabilir ve böylece ROS aracılı DNA hasarını önleyebilme potansiyeline sahiptir. Buna ek olarak kersetin, sitotoksik ve pro-oksidatif etki göstererek apoptotik yolları indükleyebilmektedir (Shafabakhsh ve Asemi, 2019;Khan ve ark., 2016).

Tablo 2: Bazı Besinlerin Kersetin İçeriği (mg/100 g) (Kim ve ark., 2019)

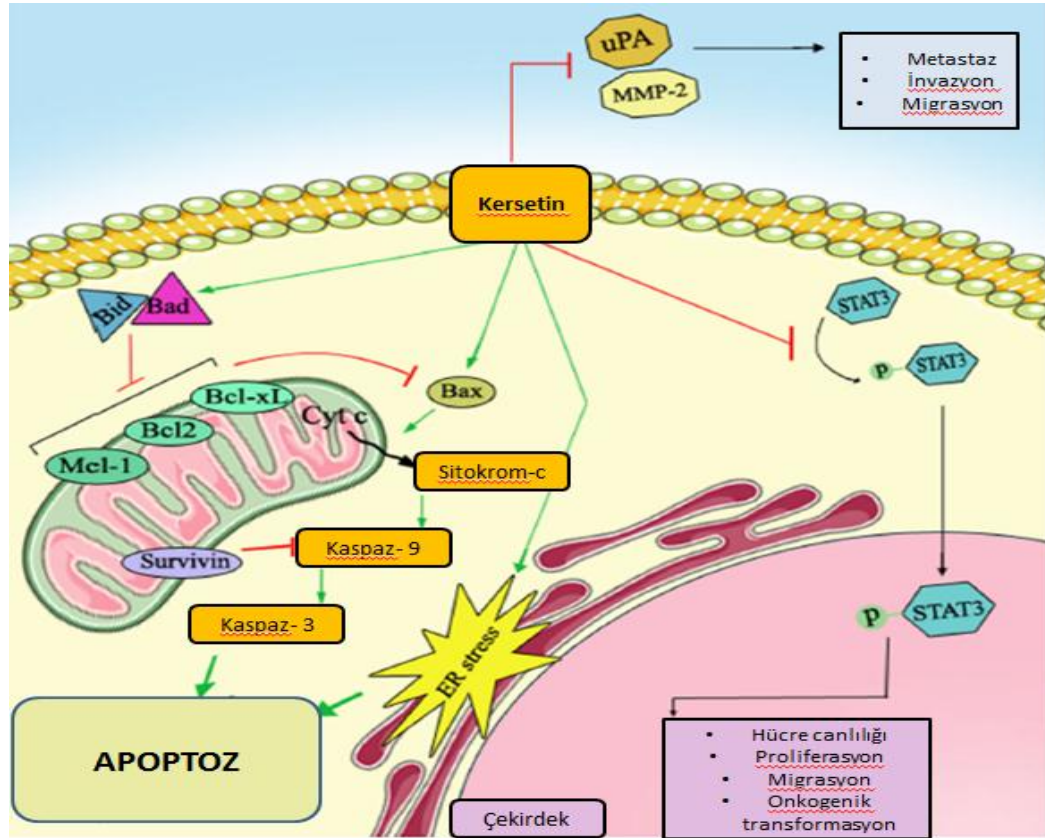
Besin	İçerik
Soğan	11- 41.90
Kırmızı Marul	40.27
Çay	2
Elma	2- 5
Kiraz	1- 3
Domates	1,6
Brokoli	4.25
Kuşkonmaz	7- 20



Şekil 12: Kersetinin Sağlık Üzerine Potansiyel Etkileri (Kim ve ark. , 2019)

Kersetin mitokondriyal membran potansiyelinde değişikliklere neden olarak mitokondriyal apoptotik yolak aracılığıyla apoptozu indüklemeye potansiyeline sahiptir. Ayrıca kersetin, p53'ün aktivasyonu, Bax, kaspaz- 3, kaspaz- 9 gibi pro- apoptotik moleküllerin ekspresyonun artırılması ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin inhibisyonu yoluyla da apoptozu indüklemektedir (R.Farias ve C.Rozo, 2019; Shafabakhsh ve Asemi, 2019) (Şekil 11). Kersetin hücre döngüsünde görevli olan siklin bağımlı kinazlar ve siklin B1' in inhibisyonunu sağlayan inhibitörleri p21, p27 ve tümör supresor gen olan p53' ün ekspresyonunu artırarak hücrenin G1 ve G2/M fazında döngüsünü durdurmasını indükleyerek kanser proliferasyonunu inhibe edici potansiyel etki gösterir (Shafabakhsh ve Asemi, 2019). HSP'ler (Isı şok proteinleri) yara iyileşmesi, doku onarımı ve karsinogenez gibi stresli koşullarda arttığı bilinen proteinlerdir. Çalışmalar, HSP'lerin, özellikle Hsp27' nin aşırı ekspresyonunun, birçok kanser türünde kötü prognoz ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu

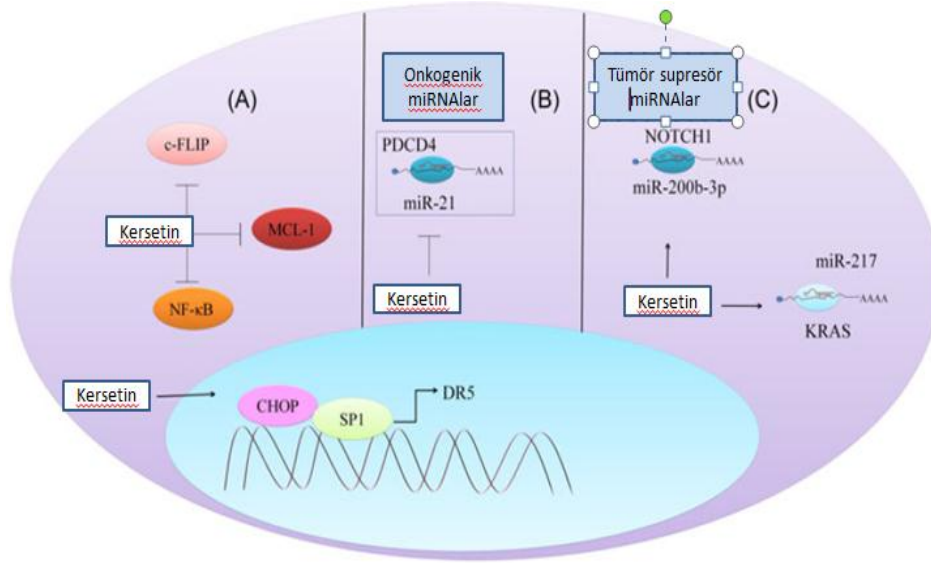
proteinler kanser hücresi çoğalmasını, istilasını, farklılaşmasını, metastazını ve hücre ölümünü etkileyebilmektedir (D. Lianos ve ark., 2015; J. Gil ve ark., 2002). Kersetin ısı şok proteinlerinin indüksiyonuna katkıda bulunan kinazları inhibe ederek protein şaperonlarını inaktive ettiği düşünülmektedir. Bu nedenle, kersetinin kanser tedavisinde mevcut kemoterapilerle kombinasyon halinde destek olarak uygulanabileceği düşünülmektedir (Shafabakhsh ve Asemi, 2019).



Şekil 13: Kersetinin Anti-kanser Etkileri (Shafabakhsh ve Asemi, 2019)(Bid: BH3 etkileşimli ölüm bölgesi agonisti, Bad: Bcl-2 antagonisti, Bcl-2: B hücre lenfoma 2, Bcl-XL:B hücre lenfoma ekstra büyük, STAT3:Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü 3,MMP-2: matriks metaloproteinaz protein- 2, uPA:Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü).

Kersetin intrinsik ve ekstrinsik apoptoz yollarını tetikleyerek anti-kanserojenik etki göstermesinin yanı sıra karsinogeneizde önemli rolleri olan miRNAların ekspresyonunu da etkileyerek anti- kanser etki gösterebilme

potansiyeline sahiptir. Kersetin hücre yüzeyi TNF reseptörlerinden ve TRAIL reseptör 2 olarak da bilinen apoptotik sinyallerin transdüksiyonundan sorumlu DR5' i (Death Receptör 5- Ölüm Reseptörü 5) , DNA hasarına karşı uyararak apoptozu indükleyen Sp1 (Spesifik Protein 1) transkripsiyon faktörünü artırarak apoptozu tetiklemektedir. Ayrıca kersetinin onkogenik miRNA olan miR-21' i baskımlarken tümör supresör etkisi olan miR-217 ve miR- 200b- 3p düzeylerini artırarak da anti-karsinojenik etki gösterdiği öngörülmektedir (Farooqi ve ark., 2018) (Şekil 13).



Şekil 14: Kersetinin miRNAlar üzerine etkileri (Farooqi ve ark., 2018) (c-FLIP: Hücresel FLICE inhibitör proteini, Nf-kB: Nüklear faktör- kapa beta, miRNA: mikro ribonükleik asit)

3. MATERİYAL ve METOD

3.1 Hücre Kültürü ve Optimizasyon

Bu çalışmada Colo-320 (ATCC: CCL-220.1) ve Colo-741 kolon (ECACC: 93052621) adenokarsinom hücre dizileri kullanılmıştır. -80°C den çıkartılan viyal içinde bulunan hücreler 37°C su banyosunda çözündürüldükten sonra RPMI-1640 (Biochrom, FG 1215), %1 L- Glutamine (EMD Millipore, K0282), %10 FetalSığır Serum (FBS) (Capricorn Scientific, FBS-11B), %1 penisilin/streptomisin (Biochrom, A2213), içeren ortamına alınarak ve 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra supernatant atılmış ve hücreler % 80 konfluensiye ulaştığında 24 kuyucuklu kültür kaplarına 0.5×10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 24 saat 37°C’ de %5 CO₂ içeren nemli ortamda kültüre edilmiştir. Konfluent kültürlenmiş hücreler, % 0.25 tripsin-EDTA çözeltisi (Biochrom, L 2143) kullanılarak alt kültürlenmiştir.

3.2 Kersetin Dilüsyonunun Hazırlanması

Kersetin(2- (3,4-dihidroksifenil) -3, 5, 7- trihidroksi- 4H- 1- benzopiran- 4-on, 3, 30, 40, 5, 6-pentahidroksiflavon; % 95 saf) (Sigma, Q4951) Dimetil Sülfoksit (DMSO) (PanReac AppliChem) içerisinde çözündürülmüştür. Deneyler için kullanılacak kersetin dilüsyonu RPMI-1640 besiyeri ile yapılmıştır. Protein analizi için yapılacak deneylerde kullanılacak kersetin dozu ve inkübasyon süresine karar vermek için beş farklı konsantrasyon (5, 10, 25, 50, 100 µg/ml) ve iki farklı inkübasyon süresi (24 saat ve 48 saat) uygulanmıştır.

3.3 Hücre Canlılığı ve Büyümesi

Hücre canlılığı analizi için MTT (3- (4,5-di-metiltiyazol-2-il) -2,5 DifeniltetrazoliumBromid) (Biotium, # 30006) deneyi kullanılmıştır. MTT suda çözünür sarı tetrasolium tuzdur. MTT deneyi, canlı hücrelerin tatrastolium tuzunu oksidatif enzimleri tarafından çözünmeyen mor formozan kristallerine dönüştürülmesine dayanmaktadır. Colo-320 ve Colo-741 kolon kanseri hücreleri, 96 kuyucuklu plakalarda her oyukta 5×10^3 hücre yoğunluğunda 100 µl kültür ortamı ile

kültürlenmiştir. Hücreler farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50, 100 µg/ml) kersetinle (2- (3,4-dihidroksifenil) -3, 5, 7- trihidroksi- 4H- 1- benzopiran- 4- on, 3, 30, 40, 5, 6-pentahidroksiflavon; % 95 saf) (Sigma, Q4951) 24 saat ve 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. RPMI-1640 ile dilüe edilmiş kersetin ile muameleden sonra, hücreler 10 uL MTT çözeltisi ile 4 saat süreyle 37°C'de % 5 CO₂ içinde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 200 µl DMSO (D8418, Sigma-Aldrich) ilave edilmiş ve absorbans, spektrofotometre ile (Versa max Molecular Devices, Sunnyvale, ABD) 570 nm'de ölçülmüştür. Tüm deneyler üçer kez yapılmıştır.

3.4 İmmünositokimya

Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde Bax, Bcl-2, kaspaz 3, Hsp27, Lamin B1, p16 ve siklin B1'in dağılımları, indirekt immünoperoksidaz tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücreler, 30 dakika boyunca 4°C'de fosfat tampon çözeltisi (Phosphate Buffer Saline, PBS) içerisinde %4 paraformaldehid (Sigma- Aldrich, 158127-25g) ile sabitlenmiş ve PBS ile yıkanmıştır. Geçirgenleştirme için, buz üzerinde 15 dakika süreyle hücreler üzerine % 0.01 Triton X-100 (Appllichem 4L003808) ilave edilmiştir. Hücreler PBS ile yıkanmıştır ve endojen peroksidaz aktivitesi, oda sıcaklığında %3 H₂O (Merck K31355100303) ile 10 dakika süreyle inkübe edilerek inhibe edilmiştir. PBS ile 5 dakika boyunca üç kez yıkandıktan sonra, oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloke edici çözelti (Histostain-Plus, HRP, 859043, Thermo Fischer) ile inkübe edilmiştir, supernatant atılmıştır ve birincil antikorlar (anti-Bax: Santa Cruz, sc-526, anti-Bcl-2: Santa Cruz sc-7382, anti-kaspaz 3: Santa Cruz sc-98785, anti-Hsp27: Santa Cruz, sc-514178, anti-Lamin B1: Proteintech 12987, anti-p16: Proteintech 10883 ve anti-siklin B1: Santa Cruz sc-245) ilave edilip ve gece boyunca 4°C' de inkübe edilmiştir. Yukarıdaki gibi PBS ile yıkandıktan sonra, biyotinlenmiş ikincil antikor (Histostain-Plus, HRP, 859043, Thermo Fischer) ilave edilmiştir ve 30 dakika süreyle inkübe edildikten sonra PBS (x3) ile 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Streptavidin- peroksidaz kompleksi, oda sıcaklığında 30 dakika süreyle hücrelere ilave edilmiştir. Daha sonra hücreler PBS ile yıkandı ve immüno- etiketlemeyi arttırmak için 5 dakika boyunca diaminobenzidin (DAB) (Scytec 36038) ile muamele edilmiştir. DAB distile su ile yıkanmıştır ve

hücreler 5 dakika boyunca Mayer' ın hematoksinin çözeltisi(Bio Optica 1213) ile karşı boyanmıştır. Distile su ile yıkandıktan sonra, slaytlar montaj ortamı(Merck Millipore, 107961, Almanya) kullanılarak monte edilmiştir. Tüm örnekler bir ışık mikroskobu altında incelenmiştir (Olympus BX40, Tokyo, Japonya).

Bax, Bcl-2, kaspaz 3, Hsp27, Lamin B1, p16 ve siklin B1'in boyanması da aşağıdaki denklemle hesaplanan H-SCORE kullanılarak yarı kantitatif olarak derecelendirilmiştir: $H-SCORE = \sum (i + 1)$, denklemde yer alan i, 1, 2 veya 3 değeriyle (sırasıyla hafif, orta veya güçlü) boyanma yoğunluğudur ve π , her yoğunlukta boyanan hücrelerin yüzdesidir ve % 0 ile % 100 arasında değişiklik göstermektedir.

3.5 TUNEL (Terminal Deoxynukleotidyl Transferase dUTP nick end Labeling) Testi

TUNEL testi, apoptotik hücreleri saptamak için bir Apoptoz Tespit Kiti (Apoptag Plus Peroksidaz In Situ tespit kiti, S7101, Millipore, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Hücreler, 30 dakika boyunca 4 ° C' de % 4 paraformaldehid ile sabitlenmiştir. Sabitlemeden sonra üç kez PBS ile yıkandı ve sonra % 3 H₂O ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. PBS ile yıkandıktan sonra, TdT enzimi ilave edilmiştir ve 1 saat 37 ° C' de inkübe edilmiştir. Daha sonra, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca durulama yıkama tamponu ile ve daha sonra 5 dakika boyunca üç kez PBS ile yıkanmıştır. Hücreler 45 dakika boyunca streptavidin- peroksidaz ile inkübe edilmiştir ve PBS ile yıkanmıştır. Boyamayı görselleştirmek için DAB ile 5 dakika inkübe edilmiştir. Hücreler, inkübasyondan sonra distile su ile yeniden yıkanmıştır.

3.6 X-gal Boyama Protokolü

Hücreler, oda sıcaklığında 30 dakika süreyle PBS ve 2 mM MgCl₂ içerisinde % 4 paraformaldehit ile sabitlenmiştir. PBS ile yıkadıktan sonra, 40 mM sitrik asit (Likitkimya., 77-92-9), 150 mM sodyum klorürb (Surechem, S0102 / R6), 5 mM

potasyum ferro siyanür (Surechem, S0102 / R6), 5 mM potasyum ferro siyanür (Surechem, S0102 / R6) içeren X-gal boyama tamponu ile boyandı. K₄Fe (CN) 6, Labshop41, 13746-66-2), 5 mM potasyum ferri siyanür (K₃Fe (CN) 6, Zag Chem., 14459-95-1), 2 mM MgCl (Fluka, 63063), monobaz sodyum fosfat 2 (NaH₂P0₄ (Merck, 10634) ve 1 mg / ml X-gal (C₁₄H₁₅BrClNNO₆, NZYtech, MB020501) ve gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün boyama çözeltisi aspire edildi ve tampon çözeltisi ile üç kez yıkanmıştır. Daha sonra hücreler, Mayer'in hematoksili ile boyandı ve bir kez distile su ile yıkanmıştır.

3.7 Eksozomal- mikro Ribonükleik Asit Analizi

Hücrelerin vasatları 4°C' de 30 dk. Boyunca 1500xg santrifüj edildikten sonra eksozom peleti elde edilmiştir. Elde edilen eksozom peleti miCURY™ (Exiqon 300102) eksozom izolasyon kiti kullanılarak qRT- PCR(Rotor- Gene Q) ile analiz edilmiştir.

3.8 Araştırma Yeri

Bu çalışmadaki tüm deneyler YDÜ- DESAM Hücre Kültürü ve MCBÜ Hücre Kültürü Laboratuvarları' nda yürütülmüştür.

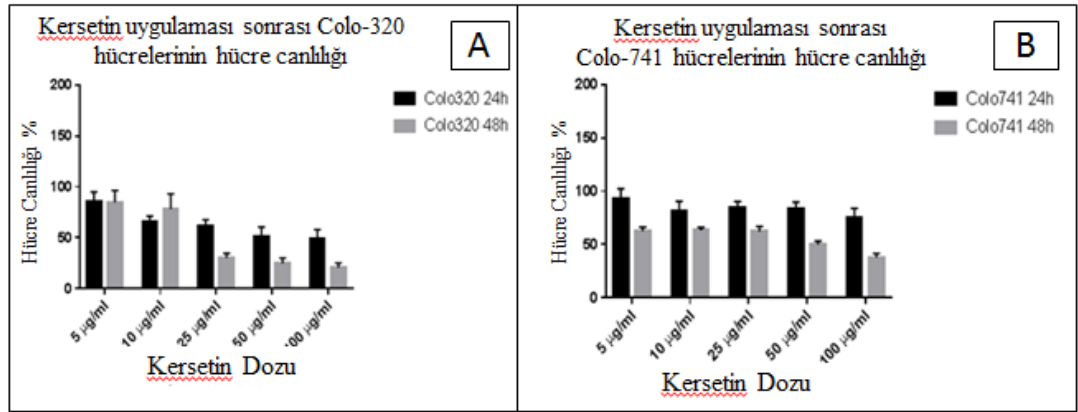
3.9 İstatiksel Analiz

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Çalışma verileri GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar, uygun olan durumlarda İki Yönlü ANOVA(Two Way Analysis of Variance, ANOVA) ve Mann-Whitney U ile istatistiksel olarak analiz edilmiş, p değeri <0,05'in altında ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

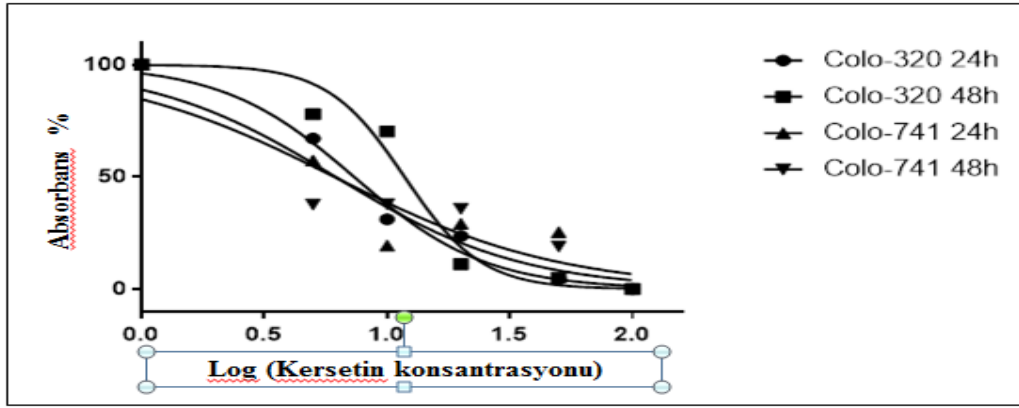
4.1 Hücre Canlılık Analizi Sonuçları

Bu araştırmada; Colo-320 ve Colo-741 kolon adenokarsinom hücrelerine, 24 ve 48 saat boyunca beş farklı (5, 10, 25, 50, 100 µg/ml) konsantrasyonda kersetin uygulanmıştır. Her iki hücre hattında hücre büyümesinin inhibisyonu için etkili dozun 48 saat boyunca 25 µg/ml kersetin olduğu belirlenmiştir (Şekil 15).

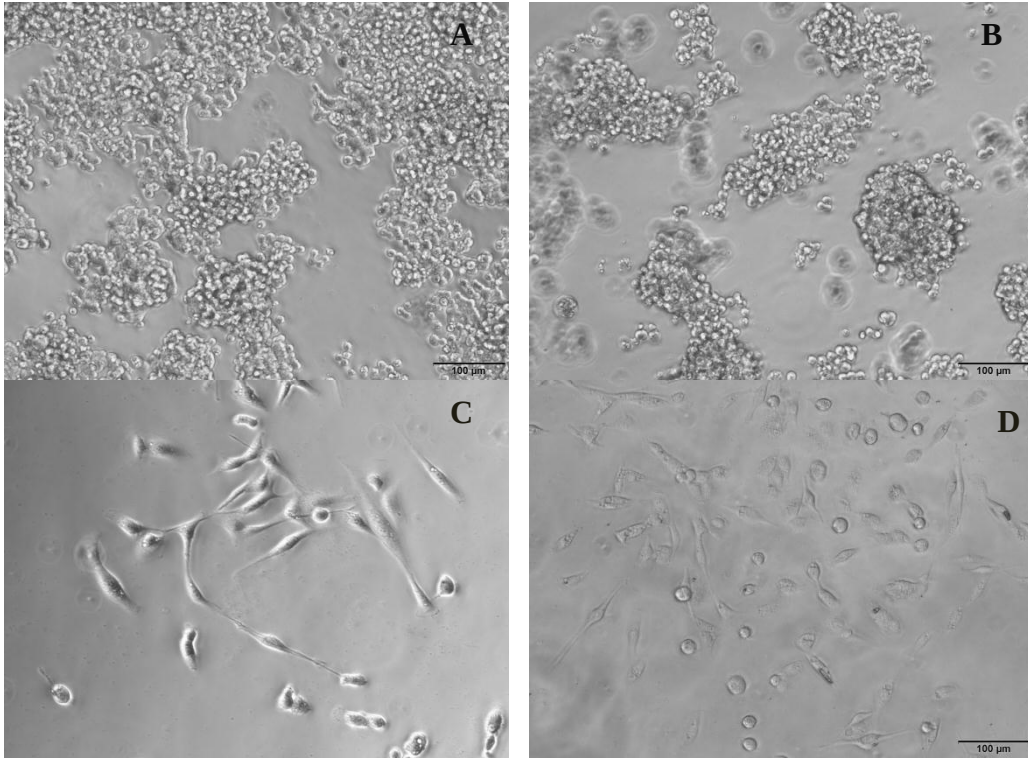


Şekil 15: Kersetinin kolon adenokarsinom hücre dizilerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri. A) Colo-320 hücreleri ve B) Colo-741 hücreleri MTT testi ile 24 saat ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda kersetin (5-100 µg / ml) uygulandı.

Kersetin; doza bağlı olarak Colo-320 primer ve Colo-741 metastatik kolon kanseri hücrelerinin büyüme hızını azaltmıştır (Şekil 16). Kersetin uygulaması sonrası Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde morfolojik ve kantitatif farklılıklar gözlemlenmiştir. Colo-320 hücreleri yuvarlak, refraktil ve yarı yapışkandır (Şekil 17A). Kersetin ile uygulandıktan sonra Colo-320 hücre sayısı azalmış ve morfolojileri büzüşmüş ve daralmış şekillere dönüşmüştür (Şekil 17B). Colo-741 hücreleri, standart kültür koşullarında fibroblast benzeri hücrelerdir (Şekil 17C). Bu hücrelerin de Kersetin ile uygulama sonrası şekillerinin oval olarak değişmiş ve sayılarının azalmış olduğu belirlenmiştir (Şekil 17D).



Şekil 16: Colo-320 ve Colo-741 hücreleri için kersetin IC50 değerleri. Canlılık analizi için MTT analiz yöntemi kullanıldı. Hem Colo-741 hem de Colo-320 hücreleri 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (5-100 µg/ml) kersetin uygulandı.



Şekil 17: Ters mikroskop altında görüntülenen Colo-320 ve Colo-741 hücreleri: (A) Colo-320 hücreleri kontrol grubu, (B) kersetin uygulanan Colo-320 hücreleri, (C) Colo-741 hücreleri kontrol grubu, (D) kersetin uygulanan Colo-741 hücreleri.

Colo-741 hücreleri kontrol grubu, (D) kersetin uygulanan Colo -741 hücre. Ölçek çubukları = 100 µm.

4.2 Apoptoz ve Hücresel Yaşlanma ile İlgili Proteinlerin İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

Bu araştırmanın sonuçları; Bax immüno boyama işleminin yoğunluğunun, kersetin uygulanan Colo-320 primer kolorektal kanser hücre hattında kuvvetli olduğunu göstermektedir (Tablo 3). Ek olarak, kersetin uygulamasından sonra Bax' ın Colo-320 hücre dizisindeki boyama yoğunluğu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı artış göstermiştir ($p < 0.0001$, Şekil 18A-18B, Tablo 4). Bcl-2 için ise immüno boyama; kersetin uygulanan Colo-320 hücrelerinde zayıftır (Tablo 3); boyama yoğunluğu ise kontrol grubundan önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur ($p < 0.0001$, Şekil 18C-18D, Tablo 4).

Bu çalışmada Kaspaz-3' ün dağılımı ve boyama yoğunluğu açısından, kersetin uygulanan Colo-320 hücreleri ile kontrol grubu arasında fark olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$, Şekil 18E-18F, Tablo 3, Tablo 4). Hsp27' nin immüno boyaması, hem kontrol grubunda hem de kersetin uygulanan Colo-320 hücrelerinde güçlüdür (Tablo 3). Ayrıca, kersetin ile muamele edilen Colo-320 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla düşük bir Hsp27 boyama yoğunluğu tespit edilmiştir, ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$, Şekil 18G-18H, Tablo 4). Lamin B1' in kersetin uygulanan Colo-320 hücrelerinde immüno boyama yoğunluğu ise orta yoğunlukta belirlenmiştir (Tablo 3). Lamin B1'in immünoaktivitesi, kersetin uygulanan Colo-320 hücrelerinde, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p = 0.0159$, Şekil 18I-18J, Tablo 4.). p16' nın immüno boyaması Colo-320 hücrelerinde güçlüdür (Şekil 18K-18L). Ancak kersetin uygulanan Colo-320'de p16' nın boyama yoğunluğunun, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır, buna karşın aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$, Tablo 4). Araştırma sonuçları; Colo-320 kanser hücre dizisinde 48 saat kersetin inkübasyonu sonrası siklin B1 immüno boyamasının zayıf olduğunu göstermektedir (Şekil 18M-18N, Tablo 3). Siklin B1'in boyama yoğunluğu ise, primer (Colo-320) kolorektal kanser hücre dizilerinde kontrol grubuna kıyasla

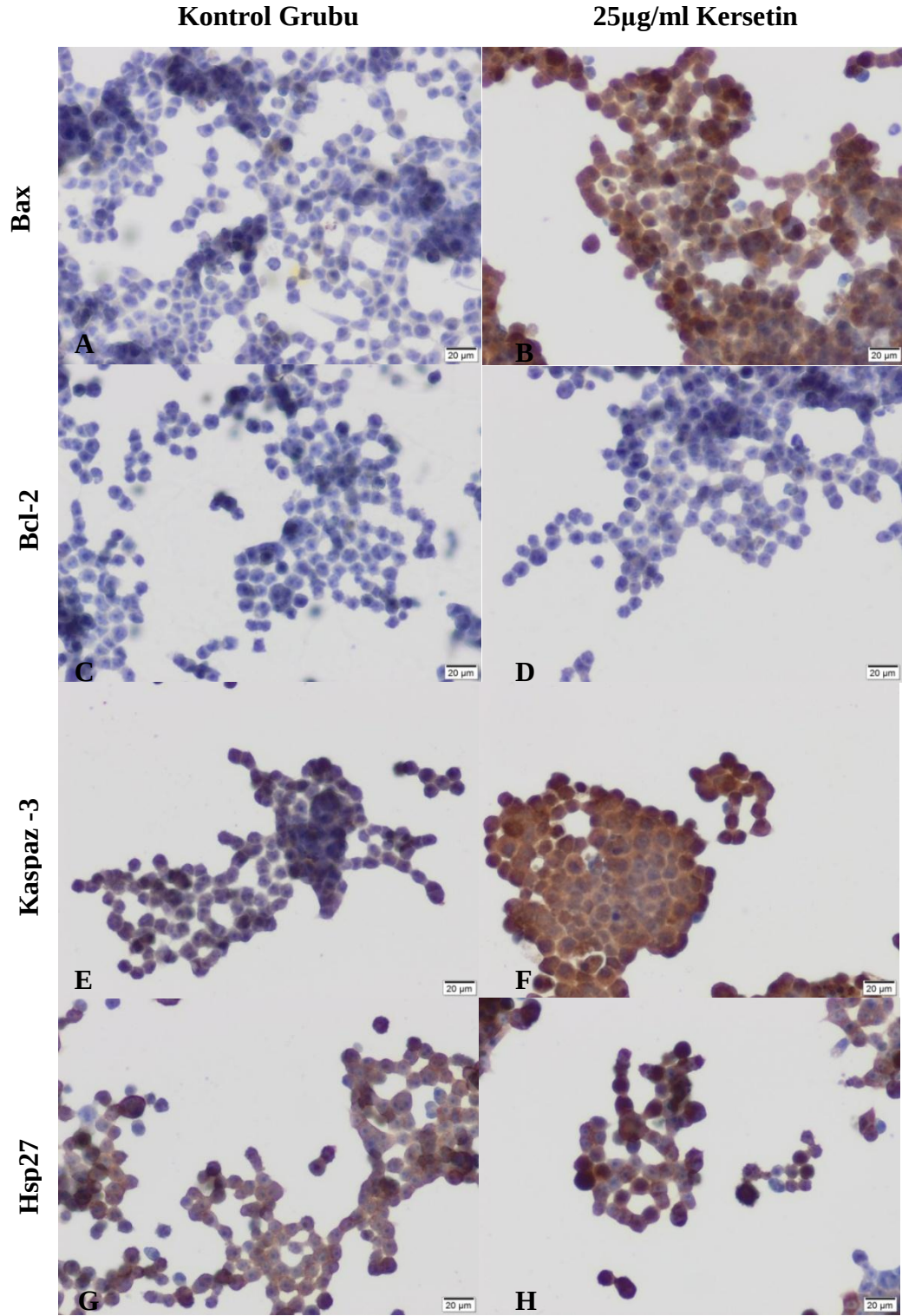
artış göstermiştir; ancak artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$, Tablo 4).

Tablo 3. 48 saat boyunca 25 µg/ml kersetin ile muamele edilmiş Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde Bax, Bcl-2, kaspaz-3, Hsp27, Lamin B1, p16 ve siklin B1 immüno-etiketleme yoğunluğu.

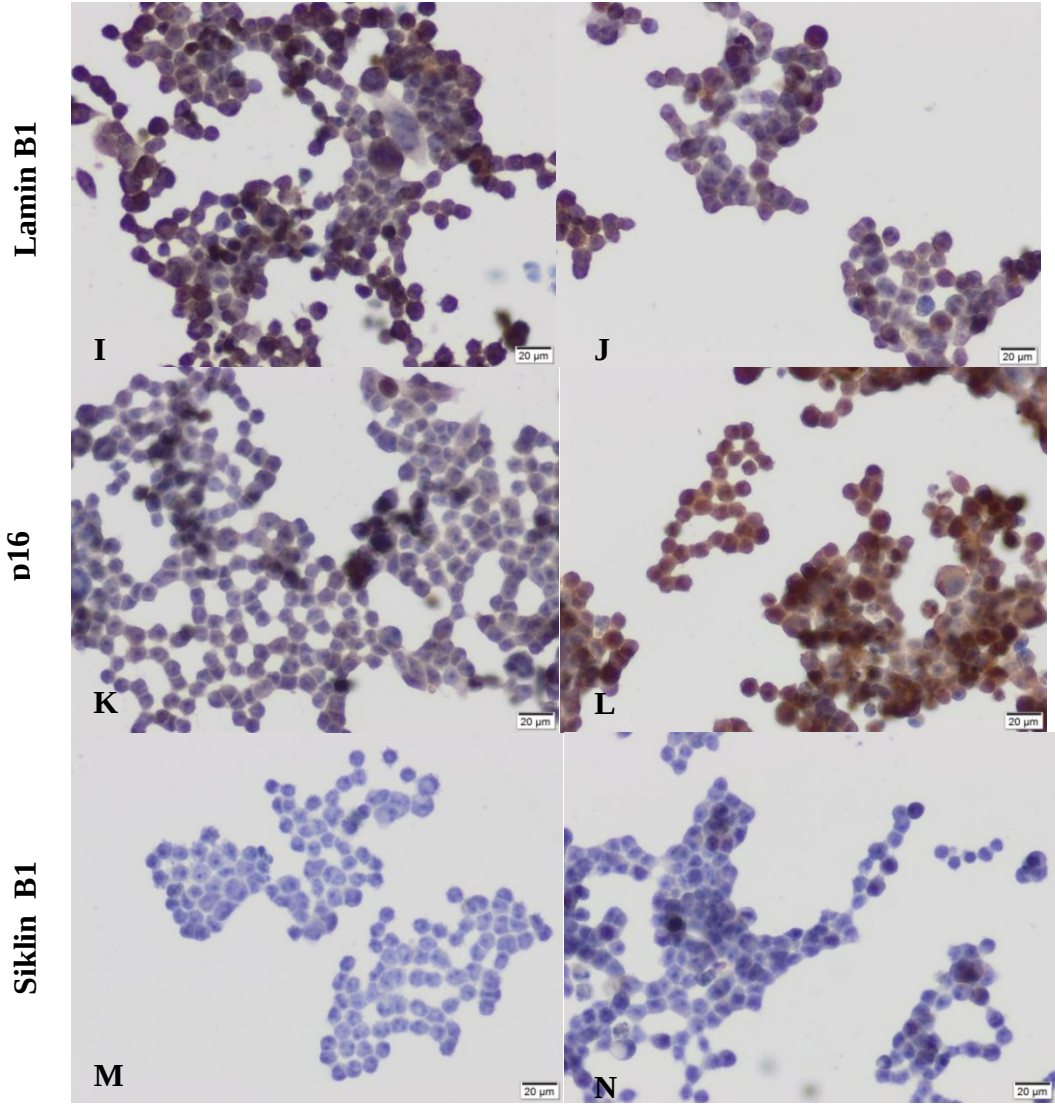
	Colo 320		Colo-741	
	Kontrol Grubu	Kersetin	Kontrol Grubu	Kersetin
Bax	+/-	+++	+++	+++
Bcl-2	+/-	+	-	+
Kaspaz-3	+/++	++++	+++	+++
Hsp27	+++	+++	-	+
Lamin B1	++++	++	++++	++++
p16	++	+++	++++	++
Siklin B1	-	+	-	+

Tablo 4. 48 saat boyunca 25 µg/ml kersetin ile muamele edilmiş Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde Bax, Bcl-2, kaspaz-3, Hsp27, Lamin B1, p16 ve siklin B1 immüno-etiketleme yoğunluğu H-SCORE değerleri.

	Colo 320		Colo-741	
	Kontrol Grubu	Kersetin	Kontrol grubu	Kersetin
Bax	203,33±4,08	293,93±13,38 ^a	194,43±23,41	292,5±21,79 ^a
Bcl-2	247,12±20	127,71±6,65 ^a	142,5±33	100±0
Kaspaz-3	307,57±14,44	307,51±15,36	275,17±11,02	241,66±164,15 ^a
Hsp27	266,91±23,39	258,99±48,94 ^b	100±0	126,78±31,06 ^b
Lamin B1	286,71±28,31	333,88±39,47 ^a	302,08±23,93	322,91±20,83
p16	289,38±7,3	302,72±30,72	303,64±24,99	312,5±25
Siklin B1	124,53±28,4	153,31±12,5	100±0	131,55±22,58
Veriler ortalama ± SD olarak ifade edildi ve 2-Yönlü ANOVA ile karşılaştırıldı				
^a Veriler, kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı(p<0.05)				
^b Veriler, Colo-741 hücre dizisi ile karşılaştırıldığında anlamlıydı (p<0.05)				



Şekil 18: Colo-320 hücreleri 25 ug/ml kersetin uygulanan (B, D, F, H, J, L, N) ve kontrol grubundaki (A, C, E, G, I, K, M) B1 (M, N); Bax (A, B), Bcl-2 (C, D), Kaspaz-3 (E, F), Hsp27 (G, H), Lamin B1 (I, J), p16 (K, L), siklin B1 immünoreaktivitesi. Ölçek çubukları = 20µm.

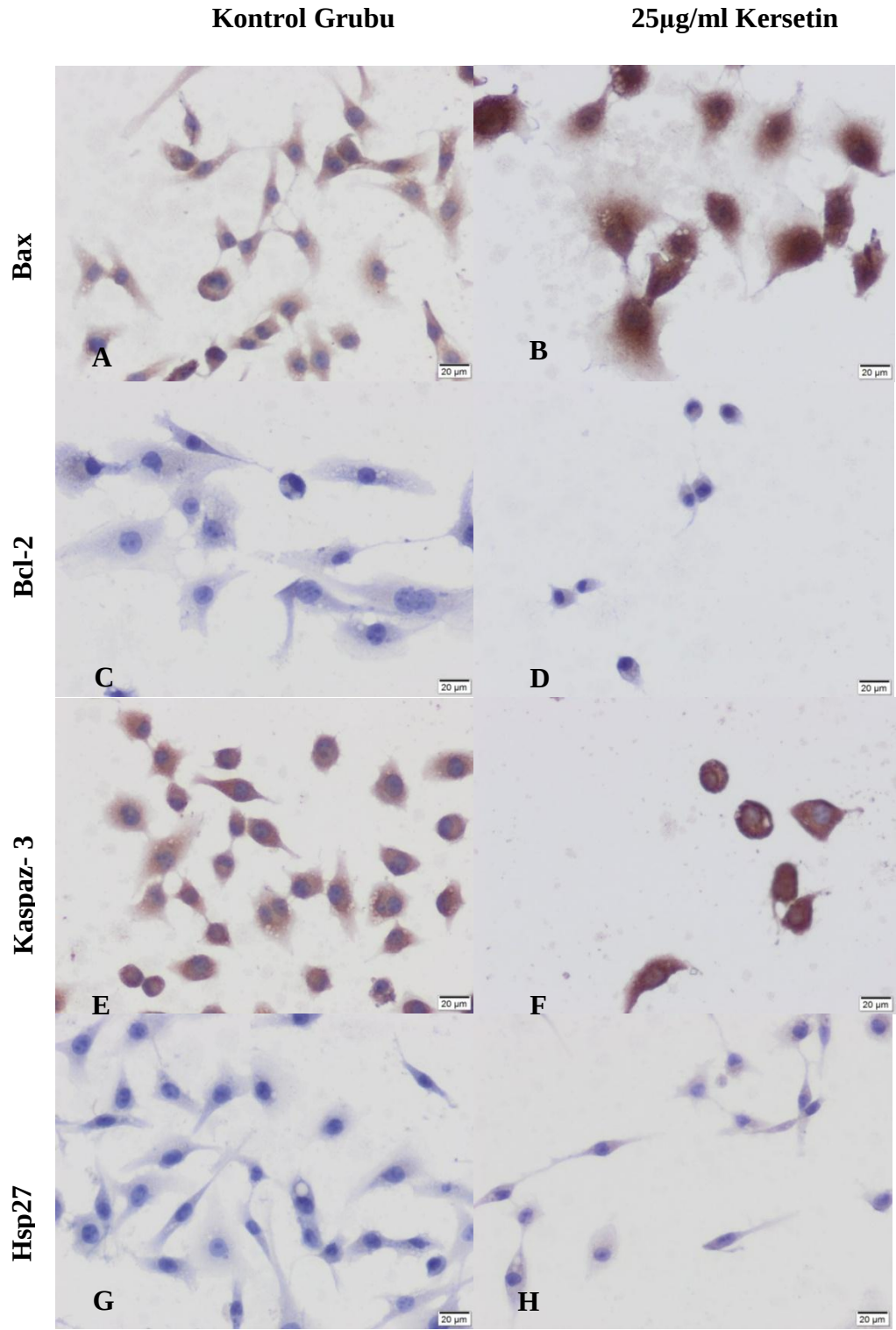


Şekil 18:Colo-320 hücreleri 25 ug/ml kersetin uygulanan (B, D, F, H, J, L, N) ve kontrol grubundaki (A, C, E, G, I, K, M) B1 (M, N); Bax (A, B), Bcl-2 (C, D), Kaspaz-3 (E, F), Hsp27 (G, H), Lamin B1 (I, J), p16 (K, L), siklin B1 immünoreaktivitesi. Ölçek çubukları = 20µm.(devamı)

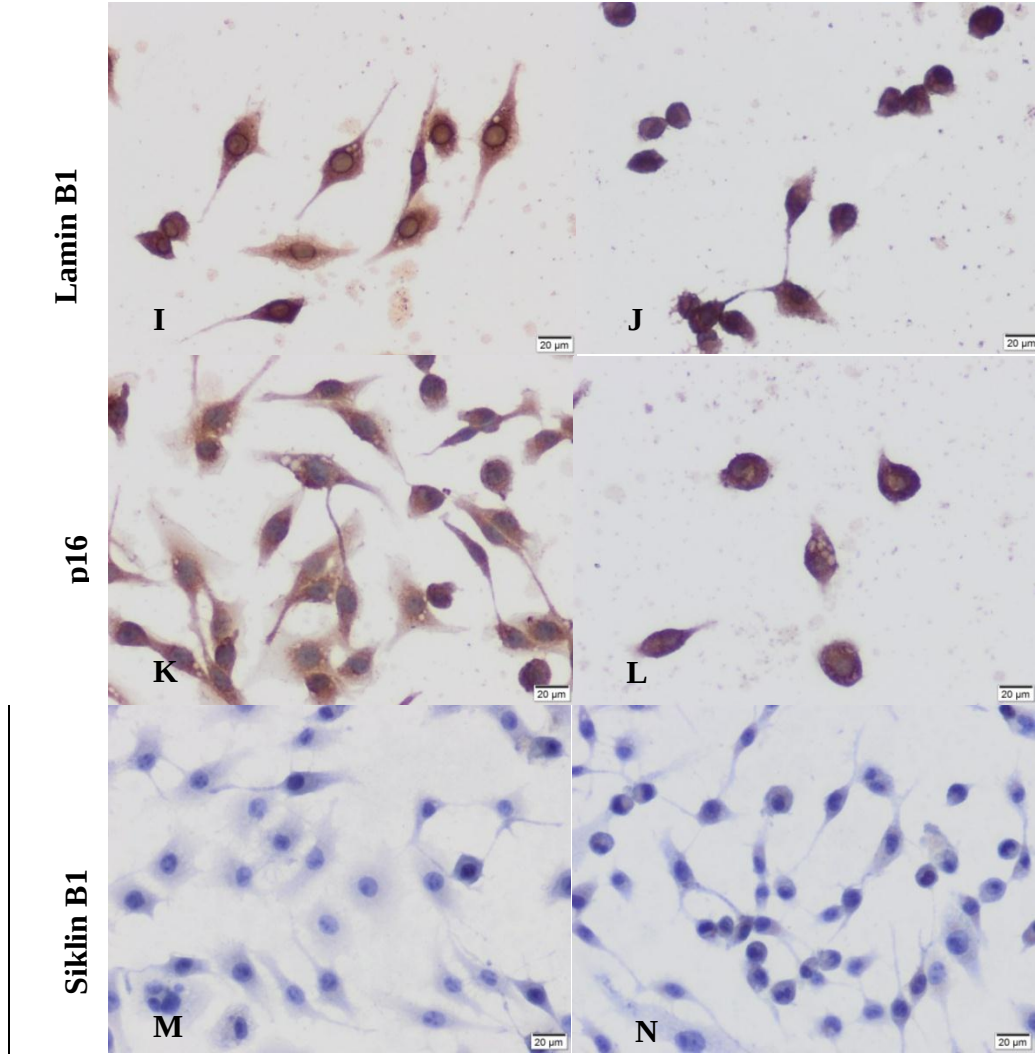
Araştırma sonuçları; Bax immüno boyama işleminin yoğunluğunun, kersetin ile muamele edilen Colo-741 metastatik kolon kanseri hücrelerinde güçlü olduğunu göstermektedir (Tablo 3). Colo-741 hücre çizgisindeki Bax' ın boyama yoğunluğu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kersetin uygulanan grupta anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır ($p < 0.0001$, Şekil 19A-19B). Bcl-2 için immüno boyama,

kersetin uygulanan Colo-741 hücrelerinde zayıftır (Tablo 3). Bununla birlikte, Bcl-2' nin boyama yoğunluğunun, kersetin uygulanan Colo-741 hücreleri ve kontrol grubu arasında farklı olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$, Şekil 19C-19D, Tablo 4). Kaspaz-3' ün boyama yoğunluğu ise kersetin uygulanan Colo-741 hücrelerinde; kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktür ($p = 0,0243$, Şekil 19E-19F, Tablo 4). Hsp27' nin immüno boyama sonuçlarının ise Colo-741 hücrelerinde zayıf olduğu görülmektedir (Tablo 3). Tablo 4' te gösterildiği gibi, Hsp27 boyama yoğunluğu kersetin uygulanan Colo-741 hücrelerinde kontrol grubuna göre daha güçlüdür, ancak değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$, Şekil 19G-19H, Tablo 4).

Bu araştırmada; Lamin B1' in immüno boyama yoğunluğunun kersetin uygulanan Colo-741 hücrelerinde güçlü olduğu görülmüştür (Tablo 3). Öte yandan, Lamin B1 immünoreaktivitesi kersetin uygulanan Colo-741 hücrelerinde ve kontrol grubunda benzerlik göstermiştir (Şekil 19I-19J). p16' nın immüno boyamasının Colo-741 hücrelerinde orta derecede olduğu saptanmıştır (Şekil 19K-19L). Kersetin ile muamele edilen Colo-741 hücrelerinde p16' nın boyama yoğunluğu, kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur, ancak bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$, Tablo 4). Siklin B1' in immüno boyamasının ise kersetin ile 48 saat inkübasyondan sonra Colo-741 hücrelerinde zayıf olduğu saptanmıştır (Şekil 19M-19N, Tablo 3). Siklin B1' in boyama yoğunluğu, metastatik (Colo-741) kolorektal kanser hücre hattında kontrol grubuna kıyasla artmıştır; ancak artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$, Tablo 4).



Şekil 19: Colo-741 hücreleri 25 ug/ml kersetin uygulanan (B, D, F, H, J, L, N) ve kontrol grubundaki (A, C, E, G, I, K, M) B1 (M, N); Bax (A, B), Bcl-2 (C, D), Kaspaz-3 (E, F), Hsp27 (G, H), Lamin B1 (I, J), p16 (K, L), siklin B1 immünoaktivitesi. Ölçek çubukları = 20µ



Şekil 19: Colo-741 hücreleri 25 ug/ml kersetin uygulanan (B, D, F, H, J, L, N) ve kontrol grubundaki (A, C, E, G, I, K, M) B1 (M, N); Bax (A, B), Bcl-2 (C, D), Kaspaz-3 (E, F), Hsp27 (G, H), Lamin B1 (I, J), p16 (K, L), siklin B1 immünoreaktivitesi. Ölçek çubukları = 20µm.(devamı)

4.3 TUNEL Analiz Sonuçları

Bu araştırmada her iki hücre hattında da TUNEL analizi kullanılmıştır. Hücreler 48 saat 25 µg/ml kersetin konsantrasyonu ile inkübe edilmiştir. Kersetin ile muamele edilen Colo-741 hücrelerinde, TUNEL pozitif hücre sayısı Colo-320 hücrelerinden daha fazla olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$, Şekil 20 A, C, Tablo 5). Ayrıca, kersetin uygulanan Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinde TUNEL pozitif hücre

sayısı, her iki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında oldukça anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$, Şekil 6, Tablo 3).

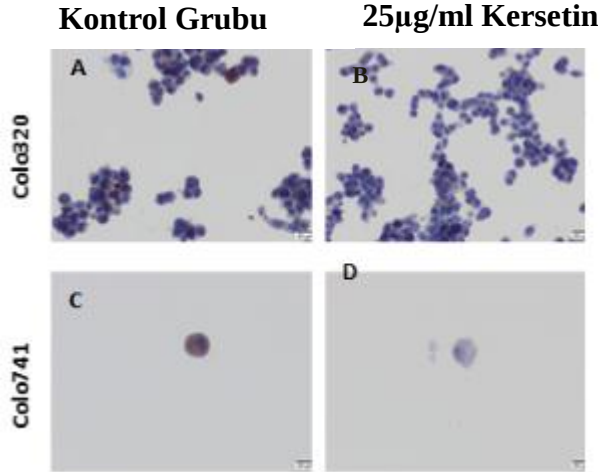
Tablo 5. 48 saat 25 ug / ml konsantrasyonda kersetin uygulanan Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinin TUNEL pozitif hücrelerinin yüzdesi,

	Kersetin	Kontrol Grubu
Colo-320 hücreleri	28.27± 25 ^{a,b}	2.88± 1.079
Colo-741 hücreleri	87.5 ± 14.43 ^a	37.5 ± 14.43

Veriler ortalama ± SD olarak ifade edildi ve Mann-Whitney ile karşılaştırıldı.

^aVeriler kontrol grubuna göre anlamlıydı ($p < 0.05$)

^bVeriler, Colo-741 hücre dizisi ile karşılaştırıldığında anlamlıydı ($p < 0.05$)



Şekil 20: TUNEL boyamasının değerlendirilmesi: (A) Colo-320 kersetin uygulanan hücreler, (B) Colo-320 kontrol hücreleri, (C) Colo-741 kersetin uygulanan hücreler, (D) Colo-741 kontrol hücreleri. Kersetin uygulaması sonrası TUNEL pozitif hücreler, metastatik kanser hücre dizisi ile karşılaştırıldığında primer kolon kanseri hücre dizisinde anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur ($p < 0.05$). Ölçek çubukları = 20µm.

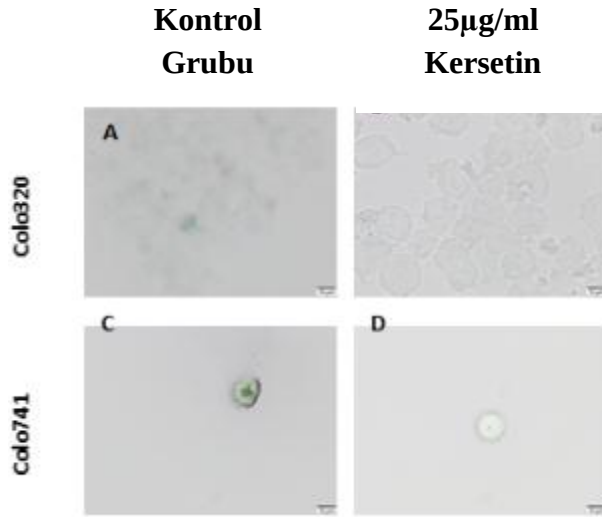
4.4 X- Gal Boyama Sonuçları

X-Gal boyama sonuçları ise; X-Gal pozitif hücrelerin yüzdesinin kersetin uygulanan Colo-320 ve Colo-741 kolon kanser hücre dizilerinin her ikisinde de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında artış gösterdiğine işaret etmektedir, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$, Şekil 21, Tablo 6).

Tablo 6. 48 saat 25 µg/ml konsantrasyonda kersetin uygulanan Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinin X-Gal pozitif yüzdesinin kantitatif analizi.

	Kersetin	Kontrol grubu
Colo-320 hücreleri	19.09± 8.67	11.97 ± 5.88
Colo-741 hücreleri	66.67 ± 28.87	58.33 ± 13.4

Veriler ortalama ± SD olarak ifade edildi ve Mann-Whitney ile karşılaştırıldı.



Şekil 21: X-Gal boyamasının değerlendirilmesi: (A) Colo-320 kersetin uygulanan hücreler, (B) Colo-320 kontrol hücreleri, (C) Colo-741 uygulanan hücreler, (D) Colo-741 kontrol hücreleri. Ölçek çubukları = 20µm.

4.5 Eksozomal miRNA Analiz Sonuçları

Eksozomal total miRNA izolasyon sonuçları; miRNA konsantrasyonlarının 48 saat boyunca 25µg/ml kersetin uygulama sonrası Colo-320 primer ve Colo-741 metastatik kolon adenokarsinoma hücrelerinde artış gösterdiğine işaret etmektedir ancak bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$, Tablo 7).

Tablo 7. 48 saat 25 µg/ml konsantrasyonda kersetin uygulanan Colo-320 ve Colo-741 hücrelerinin eksozomal miRNA izolasyon sonuçları

	Kersetin	Kontrol grubu
Colo-320 hücreleri	12,13 ng/µl	11 ng/µl
Colo-741 hücreleri	15,15 ng/µl	11,88 ng/µl

5. TARTIŞMA

Son yıllarda kemoteröpatik ilaçların yan etkileri ve direnç gelişimi düşünüldüğünde besinlerin bileşiminde doğal olarak bulunan fitokimyasalların anti-kanser ve kemo-preventif etkileri kanser araştırmalarının dikkat çeken konusu olmuştur (D'Andrea, 2015). Kersetin elma, soğan, çilek, kırmızı şarap ve çayda yaygın olarak bulunan flavanol grubu bir polifenoldür. Kersetinin anti-mikrobiyal, anti-inflamatuar, kardiyoprotektif, anti-kanserojen ve anti-oksidan etkileri güncel araştırma konusudur (D'Andrea, 2015).

Bu araştırmada hem Colo-320 (primer) hem de Colo-741(metastatik) kolon kanseri hücre dizilerinde etkili dozun 48 saat boyunca 25 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Farklı hücre dizileri üzerinde yapılan deneysel çalışmalar, kersetinin doza ve inkübasyon süresine bağlı olarak hücre canlılığını etkilediğini göstermiştir (J. Gil ve ark., 2002; Priyadarsini ve ark., 2010; Pan ve ark., 2015). Nitekim Langer ve arkadaşları (Langer ve ark., 2016); HT-29 adenokarsinom hücre dizisine 96 saat boyunca 25 uM kersetin uygulamasının, hücre canlılığı üzerinde bir etkisi olduğunu göstermişlerdir. Srivastava ve arkadaşları (Srivastava ve ark., 2019) da, 72 saat boyunca 25 uM kersetin uygulamasının, HCT-116 insan kolon kanseri hücre hattında hücre canlılığını etkilediğini bildirmiştir. Khan ve arkadaşları (Khan ve ark., 2016) ise, 24 saat boyunca 50 uM kersetin uygulamasının HCT-116 hücrelerinde hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir.

Kanser, mutasyona uğramış hücrelerin anormal çoğalması ile karakterizedir. Kanser hücreleri; proliferatif sinyalizasyonda kendi kendine yeterlilik, büyüme baskılayıcılarından kaçınma, doku istilası ve metastazının aktivasyonu, replikatif ölümsüzlük, sürekli anjiyogenez ve hücre ölümüne direnme gibi altı özelliğine bağlı olarak hızlı bir şekilde çoğalabilmektedir. Kanser tedavilerinde hücre döngüsünün durması ve apoptoz indüklenirken, proliferasyonun baskılanması hedeflenmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Hücre sayılarının kontrol edildiği homeostatik mekanizma olan apoptoz, kanserde mutasyona uğrar. Apoptozda yer alan iki yol vardır: ölüm ligandının (TRAIL, FasL, DISC) aktivasyonu ile karakterize edilen ekstrinsik yol ve mitokondriyal apoptotik sistemin aktivasyonu ile karakterize edilen

intrinsik yol. İntrinsik apoptotik yol pro-apoptotik (Bax, Bad, Bim) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Mcl 1) düzenleyiciler tarafından regüle edilmektedir (Sever ve ark., 2015).

Bu çalışmada kersetin tedavisini takiben Colo-320 primer kolon kanseri hücre hattında Bax yoğunluğu artmış ve Bcl-2 yoğunluğu önemli ölçüde azalmıştır. Metastatik kolorektal kanser hücre hattındaki Bax ve Bcl- 2 yoğunluklarındaki değişiklikler anlamlı olmasa da, hem Colo-320 hem de Colo-741 hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranının artış göstermesinin Aljofanet ve arkadaşlarının çalışmalarında da belirttiği gibi apoptotik yolları tetiklediği düşünülmektedir (Aljofen ve ark., 2019). Ayrıca istatistiksel sonuçlar kersetinin primer kanser hücresindeki apoptotik proteinler üzerinde daha büyük etkileri olabileceğini destekler niteliktedir. Kaspaz kaskadının (kaspaz-3,-6 ve -7) intrinsik veya ekstrinsik apoptotik yoldaki uyarılması hücreyi apoptoza yönlendirmektedir. Kaspaz - 3 aktivitesindeki artış p53' ten bağımsız apoptozun bir göstergesi olarak düşünülmektedir (Kaiser ve ark., 2007). Khorsendi ve arkadaşları (Khorsandi ve ark., 2017), MCF-7 primer meme kanseri hücre hattında 48 saatlik 50 uM kersetin tedavisinin Bax ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığını, Bcl-2 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Nie ve arkadaşları (Nie ve ark., 2011), kersetinin apoptotik etkilerini inceledikleri HL- 60 insan lösemi kanseri hücre dizisi ile yapmış oldukları çalışmada 48 saat boyunca 50 µM kersetin uygulamasının anti- apoptotik protein olan Bcl- 2 düzeylerini anlamlı bir şekilde azaltırken, pro- apoptotik protein olan Bax düzeylerini artırdığını saptamıştır. Wang ve arkadaşları (Wang ve ark., 2012), mide kanser hücre dizisi ile yürüttükleri çalışmalarında 24 saat boyunca 60 µmol/L kersetin uygulaması sonrasında BGC- 823 hücre dizisinde Bcl- 2 düzeylerinin düştüğünü ve buna bağlı olarak değişen Bcl- 2/Bax oranının mitokondriyal apoptotik yolağı tetiklediği bildirilmektedir. Chan ve arkadaşlarının (Chan ve ark., 2013) yaptığı bir çalışmada, 72 saat boyunca 5 uM kersetin uygulamasının, H1299 metastatik akciğer kanseri hücre hattında kaspaz-3 aktivitesini arttığını belirlemişlerdir. Benzer bir şekilde Seo ve arkadaşları (Seo ve ark., 2016), BT- 474 meme kanser hücre dizisi ile yapmış oldukları çalışmada 24 saat boyunca 60µM kersetin uygulamasının kaspaz- 8 ve kaspaz- 3 düzeylerini arttırdığını saptamışlardır. Yapılan çalışmada, hem Colo-320 hem de Colo-741 kolorektal kanser hücre dizilerinde 48 saatlik 25 µg/ml kersetin uygulamasından sonra kaspaz - 3 yoğunluğunda anlamlı bir değişiklik olmamıştır.

Araştırma sonuçları; kersetin uygulamasından sonra Bax immünoreaktivitesinin arttığını göstermektedir. Bu sonuç; apoptozun mitokondriyal proteinlerin salınmasından sonra tetiklendiğini ve kaspaz-3 ekspresyonu ile kaspaz kaskadını bloke etmeden Bax tarafından aracılık edildiğini göstermektedir. TUNEL test sonuçları ise kersetin'in hem Colo-320 hem de Colo-741 hücre hatlarında etkili olduğunu destekler niteliktedir. Kersetinin, hem primer hem de metastatik kolorektal kanser hücre hatlarında kaspazdan bağımsız yollar yoluyla apoptozu uyurabileceği düşünülmektedir. Isı Şok Proteinleri (HSP' ler) protein katlanması ve olgunlaşmasından sorumlu şaperonlardır. HSP' lerin inhibisyonunun, metastaz ve kötü prognoz üzerindeki etkileri nedeniyle kanser tedavisinde kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir (Chatterjee ve Burns, 2017).

Bu araştırmanın sonuçları, hem kaspaz-3 hem de Hsp27 yoğunluğunun, Colo-320 primer hücre hattında kersetin uygulaması sonrası kontrol grubundaki ile benzer olduğunu göstermiştir. Bu tutarsızlığın, kullanılan doz, inkübasyon süresi ve hücre çizgisindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ancak Colo-741 metastatik kolon adenokarsinoma hücre dizisinde Hsp27' nin kersetin uygulaması sonrası yoğunluğunun önemli ölçüde artarken, kaspaz-3 immünoreaktivitesinin azaldığını göstermiştir. Hsp27' nin pro- kaspaz- 3' ün kaspaz- 3' e dönüşümünü inhibe ettiği bilinmektedir (Chatterjee ve Burns, 2017). Colo-741 metastatik kolon kanser hücre hattında kersetin tedavisinden sonra kaspaz- 3 yoğunluğunun artması beklenirken, azalmasının Hsp27 aktivitesindeki artışla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Joanna ve arkadaşları (Gil ve ark., 2013) kersetin uygulamasından sonra T98G glioblastom hücre hattında Hsp27 aktivitesinin anlamlı derecede azaldığını göstermişlerdir.

Apoptoza ek olarak, hücre döngüsü durmasının kalıcı bir durumu olan hücresel yaşlanma, kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılanması için bir başka olası mekanizmadır (Malavolta ve ark., 2014). Lamin B1 nüklear zarfta bulunan bir proteindir. Hücresel yaşlanma olan hücrelerde lamin B1 düzeyleri azalmaktadır (Freund ve ark., 2012). Bu çalışma sonuçlarına göre, kersetin uygulamasından sonra Colo-741 metastatik kanser hücre hattında Lamin B1 immünoreaktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmazken, Colo-320 primer kolon kanseri hattında anlamlı bir artış

göstermiştir. Bu sonuç, kersetinin hücresel yaşlanma üzerindeki etkisinin hücre tipine ve kökenine göre değişebileceğini düşündürmektedir. Özellikle Colo-741 gibi metastatik kanser hücreleri, apoptoz ve/veya hücresel yaşlanmaya primer kanser hücrelerinden daha dirençli olabileceği düşünülmektedir. Siklin bağımlı kinazlar (CDK) hücre döngüsünün düzenlenmesinden sorumludur. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri olan p16 ve p21' deki artışın, hücre döngüsünün durmasına neden olabileceği ve böylece kanserli hücre proliferasyonunu önleyebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, p16 ekspresyonundaki artış hücresel yaşlanmanın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Campisi, 2013). Bu çalışmada p16 şiddeti anlamlı olmasa da her iki kolorektal kanser hücre hattında artmıştır. Ek olarak, x-gal boyamasından sonra elde edilen sonuçlara göre hem Colo-320 hem de Colo-741 hücre hatlarında kersetin tedavisinden sonra hücresel yaşlanma durumunda olan hücreler tespit edilse de pozitif boyama sonuçları anlamlı değildi. Kersetin tedavisinden sonra hem x-gal pozitif hücrelerde hem de p16 yoğunluğunda önemli bir artış gözlemlemek için inkübasyon süresinin uzatılması gerektiği düşünülmektedir. Buna ek olarak, kersetin tedavisinden sonra p16 dışındaki hücre döngüsü inhibitörleri aktive edilmiş olabileceği düşünülmektedir.

Siklin B1, hücre döngüsünün G2 fazından M fazına geçişinde önemli bir role sahiptir ve azalmış siklin B1 ekspresyonu, G2/M geçişinde gecikmeye katkıda bulunmaktadır (Campisi, 2013). Liu ve arkadaşlarına (Liu ve ark., 2017) göre, U251 glioblastom hücre hattında 30 µg/ml kersetin ile 48 saat tedavi sonrasında G2/M fazında hücre döngüsü durdurulduğu saptanmıştır. Catanzaro ve arkadaşları (Catanzaro ve ark., 2015), ovaryum kanseri (SKOV3) ve osteo sarkoma kanser (U2OS) hücre dizileri ile yapmış oldukları çalışmada 48 saat boyunca 50µM kersetin uygulamasının hücre döngüsünün G2/M fazında gerekli olan siklin B1 düzeylerini azalttığını ancak bu farkın her iki hücre dizisinde de anlamlı olmadığını saptamışlardır. Bu araştırmanın sonuçları; bu bulgunun aksine, 48 saatlik 25 µg/ml kersetin tedavisinden sonra Colo-320 ve Colo-741 hücre dizilerinin her ikisinde de siklin B1'in immünohistokimyasal boyama yoğunluğunda anlamlı olmasa da hafif bir artış olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, kersetinin kolon kanseri hücre dizilerinde hücre döngüsünün durulması yerine apoptozu tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

Kersetinin neden olduğu azalmış mitokondriyal potansiyel ve pro- oksidatif durum, kanser hücrelerinde apoptotik sinyal yollarını tetiklemektedir (Pietrasik ve ark., 2013). Öte yandan, kanser h creti pro- oksidatif duruma adapte olabilir ve hücre döngüsü organizasyonundan sorumlu proteinlerin ekspresyonunu artıracılabilmektedir. Bu nedenle, kanser h creti tedaviye bağlı yaşlanmaya karşı dirençli olabileceği düşünülmektedir (Gibellini ve ark., 2010).

miRNAlar yaklaşık 18-25 baz içeren kısa, kodlanmayan tek RNA iplikçikleri olarak tanımlanmaktadır. miRNAlar gen ekspresyonunun post- transkripsiyonel modülasyonunu etkileyebilmektedir. miRNAlar birden fazla gen ekspresyonunu m d le ederek hücre fenotipini etkileyebilmektedir. Bu etkilerinden dolayı son yıllarda özellikle kanserle ilgili yapılan araştırmalarda incelenmektedir. Ayrıca eksozomal kargolama sayesinde dolaşıma katılabilmelerinden dolayı kanser metastazı içinde önemli işlevleri olduğu düşünülmektedir. Yapılan  alışmalar bazı miRNA türlerinin spesifik tümör tipleri ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (Dostal ve Modriansky, 2019). Örneğin miR- 15 ve miR- 16 pro- apoptotik Bcl- 2 ve COX- 2 kodlayan genleri hedef alarak kolon kanserde tümör baskılayıcı etki gösterebilmektedir. Öte yandan miR- 17 ve miR- 92 gibi mikro ribon kleotidler akciğer kanserinde hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 ' yı hedef alarak onkogen gibi davranabilmektedirler (Kordkheyli ve ark., 2019). Li ve arkadaşları (Li ve ark., 2013), 789- O renal kanser hücre dizisiyle yaptıkları çalışmada 24 saat boyunca kersetin-hiperosid (1:1 oranında) farklı dozlarda uygulamasının (0-20 g/ml) apoptozu tetiklemesinin yanı sıra miRNA- 27a düzeylerini azalttığı saptanmıştır. Kersetin' in kolorektal kanserlerde onkogenik etki gösteren miR- 27a düzeylerini azaltıcı, tümör baskılayıcı etki yapan miR- 146a düzeylerini artırıcı potansiyel etkisi olduğu belirtilmektedir (Kim ve ark., 2019). İnsan papilloma virüs ilişkili endoservikal adeno karsinoma tip 18 (Tca8113) hücre dizisi ile farklı kersetin konsantrasyonları ile yürüttükleri çalışmada 48 saat boyunca 50  M kersetin uygulamasının miR-22 düzeylerini artırdığı gösterilmiştir. miR-22 ekspresyonunun Wnt/  - katenin yolağını inhibe ederek apoptozu tetiklediği ortaya konmuştur (Zhang ve ark., 2019). VK21E6E7 ve End1/E6E7 endo servikal kanser hücre dizileri ile yapılan çalışmada 20  M kersetin uygulamasının VK2/E6E7 hücre dizisinde hücre döngüsünün G1 fazında gerekli olan siklin D1' in inhibitörü olan miR-6867-5p, miR-

1283, miR3202, miR3714 ve miR503-5p düzeylerini anlamlı bir şekilde artırarak proliferasyonu ve hücre büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır (Park ve ark., 2018). Bu araştırmanın sonuçları; miRNA konsantrasyonlarının Colo-320 primer kolon kanser hücre dizisinde artarken, Colo-741 metastatik kolon kanser hücre dizisinde azaldığını göstermektedir. 48 saat boyunca 25µg/ml kersetin uygulaması sonrası Colo-320 ve Colo-741 kolon kanser hücre dizilerinde meydana gelen total miRNA konsantrasyon farkı da anlamlı bulunmamıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmanın sonuçları; kersetinin doza ve inkübasyon süresine bağlı olarak hem primer hem de metastatik kolon kanser hücrelerinin canlılığını azalttığını göstermektedir. Kersetin tedavisinden sonra artan pro- apoptotik protein Bax immünoaktivitesi her iki hücre hattında da anlamlı bulunmuştur, ancak anti-apoptotik protein Bcl- 2' nin immünoaktivitesindeki azalma sadece Colo-320 primer hücre hattında anlamlı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, kersetinin apoptoz üzerindeki etkisinin primer ve metastatik kanser hücrelerinde farklılık gösterebileceği hipotezini desteklemektedir. Ayrıca, bu araştırmanın sonuçlarına göre kersetinin hücre döngüsünü kontrol etmekten sorumlu olan p16, Lamin B1 ve siklin B1 immünoaktivitelerinin arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu da kersetin uygulamasının hem primer hem de metastatik kolon kanser hücre dizilerinde hücre yaşlanmayı etkilendiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, hem p16 hem de lamin B1'in artan immünoaktivitesi, hücre yaşlanmaya ilişkin bir sonucu destekler nitelikte bulunmamıştır. Bu, kolorektal kanser hücrelerinde hücre yaşlanmanın tetiklendiğini gösterebilir, ancak kalan canlı hücrelerin apoptozdan ve dormansiden kaçmış olabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, Hsp27 yaşlanmaya karşı bir savunma mekanizması ve kanser hücresinin pro- oksidatif durumuna bir cevap olarak artmış olabileceği düşünülmektedir.

Her iki hücre hattında da (Colo-320 ve Colo-741 kolon adenokarsinom hücre dizisi) kersetin uygulaması sonrasında miRNA konsantrasyonları değişiklik gösterse de sonuçlar anlamlı bulunmamıştır. Polifenolik bileşiklerin eksozomal miRNA konsantrasyonları üzerine etkilerinin ortaya konabilmesi için kanser tipi ile spesifik etkileşimi olabilen onkogenik ve/veya tümör baskılayıcı miRNAların analizleri birlikte değerlendirilmelidir.

Sonuç olarak, kersetinin her iki kolon kanser hücre dizisinde apoptozu ve hücre yaşlanmayı etkilediği görülmüştür. Bu nedenle, kersetinin kemoterapötik bir ajan olarak kullanılma potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma kersetinin anti- kanser etkilerinin araştırılacağı çalışmalara ışık tutabilir, bir rehber olabilir. Kersetinin apoptoz, hücre yaşlanma ve eksozomal miRNA

konsantrasyonları üzerindeki etkileri, farklı kanser hücre dizilerinde, daha uzun inkübasyon süresi ile araştırılmaya devam edilmelidir. Polifenolik bir bileşik olan kersetinin anti kanser etkileri in vivo deneysel kanser modelleri ve klinik çalışmalarla güçlendirilmeli ve daha geniş kapsamlı araştırılmalıdır.

7. KAYNAKÇA

Aghabozorgi AS, Bahreyni A, Soleimani A, Bahrami A, Khazaei M, Ferns GA, et al. Role of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives. *Biochimie*. 2019;157:64–71.

Aljofan, M., Riethmacher, D. Anticanceractivity of metformin: a systematic review of the literature. *FutureSci OA*. 2019; 5(8): FSO410.

Andres S, Pevny S, Ziegenhagen R, Bakhiya N, Schäfer B, Hirsch-Ernst KI, Lampen A. Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. *Mol Nutr Food Res*. 2018;62(1):1–15.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.

Campisi J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75(1):685–705.

Catanzaro D, Ragazzi E, Vianello C, Caparrotta L, Montopoli M. Effect of quercetin on cell cycle and cyclin expression in ovarian carcinoma and osteosarcoma cell lines. *Nat Prod Commun*. 2015;10(8):1365–8.

Chan ST, Yang NC, Huang CS, Liao, JW, Yeh SL. Quercetin enhances the antitumor activity of trichostatin A through upregulation of p53 protein expression in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2013; 8(1): e54255.

Chatterjee S, Burns TF. Targeting heat shock proteins in cancer: a promising therapeutic approach. *Int J MolSci*. 2017;18(9):1978.

D’Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019; 43(6):582–92.

Dostal Z, Modriansky M. The effect of quercetin on microRNA expression: A critical review. *Biomed Pap.* 2019; 163(2):95–106.

Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. *Eur J Cancer.* 2017; 83:258–65.

Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell.* 1986;44(6):817–29.

Elmore S, Apoptosis: A review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathology.* 2007; 35(4): 495- 516.

Ersöz E., Can B. O., Uzunoğlu S. Eksozomların Kanserdeki Rolü. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* 2016; 2(5): 144-152.

Farooqi AA, Jabeen S, Attar R, Yaylim I, Xu B. Quercetin - mediated regulation of signal transduction cascades and microRNAs : Natural weapon against cancer. *J Cell Biochem.* 2018;119(12):1-11.

Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2002;38:867–71.

Freund A, Laberge RM, Demaria M, Campisi J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell.* 2012;23(11):2066–75.

Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., De Biasi, S., Roat, E., Bertoncelli, L., & Cossarizza, A. Interfering with ROS metabolism in cancer cells: the potential role of quercetin. *Cancers.* 2010; 2(2):1288-1311.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.

Haque TR, Bradshaw PT, Crockett SD. Risk Factors for Serrated Polyps of the Colorectum. *Dig Dis Sci.* 2014;59(12):2874–89.

He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell.* 2017;169(6):1000–11.

Hood JL, San Roman S, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* 2011;71(11):3792–801.

Issa IA, NouredDine M. Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. *World J Gastroenterol.* 2017;23(28):5086–96.

Jakubowicz-Gil J, Langner E, Bądziul D, Wertel I, Rzeski W. Silencing of Hsp27 and Hsp72 in glioma cells as a tool for programmed cell death induction upon temozolomide and quercetin treatment. *ToxicolApplPharmacol.* 2013; 273(3):580-589.

Jakubowicz-Gil J, Rzymowska, Gawron A. Quercetin, apoptosis, heat shock. *BiochemPharmacol.* 2002; 64(11):1591-1595.

Khan F, Niaz K, Maqbool F, Hassan FI, Abdollahi M, Nagulapalli Venkata KC, et al. Molecular targets underlying the anticancer effects of quercetin: An update. *Nutrients.* 2016;8(9):1–19.

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. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2016; 8:789-799.

Khorsandi L, Orazizadeh M, Niazvand F, Abbaspour MR, Mansouri E, Khodadadi A. Quercetin induces apoptosis and necroptosis in MCF-7 breast cancer cells. *BratisLekListy.* 2017; 118(2):123-128.

Kim DH, Khan H, Ullah H, Hassan STS, Šmejkal K, Efferth T, Mahomoodally MF, Xu S, Habtemariam S, Filosa R, Lagoa R, Rengasamy KRR. MicroRNA targeting by quercetin in cancer treatment and chemoprotection. *Pharmacol Res.* 2019;147(April).

Kordkheyli VA, Tarsi K, Mishan MA, Tafazoli A, Bardania H, Zarpou S, Bagheri A. Effects of quercetin on microRNAs: A mechanistic review. *J Cell Biochem.* 2019;120 (8):1-15.

Langner E, Lemieszek MK, Rzeski W. Lycopene, sulforaphane, quercetin, and curcumin applied together show improved antiproliferative potential in colon cancer cells in vitro. *J FoodBiochem*. 2019;43(4):2802.

Lee SK, Hwang JH, Choi KY. Interaction of the Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways involving co-stabilization of both β -catenin and RAS plays important roles in the colorectal tumorigenesis. *Adv Biol Regul* [Internet]. 2018;68:46–54.

Li W, Liu M, Xu YF, Feng Y, Che JP, Wang GC, Zheng JH. Combination of quercetin and hyperoside has anticancer effects on renal cancer cells through inhibition of oncogenic microRNA-27a. *Oncol Rep*. 2014;31(1):117–24.

Lianos GD, Alexiou GA, Mangano A, Mangano A, Rausei S, Boni L, et al. The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 2015;360(2):114–8.

Liu Y, Tang ZG, Lin Y, Qu XG, Lv W, Wang G B, Li CL. Effects of quercetin on proliferation and migration of human glioblastoma U251 cells. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2017; 92:33-38.

Luca SV, Macovei I, Bujor A, Miron A, Skalicka-Woźniak K, Aprotosoiaie AC, et al. Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2020;60(4):626–59.

Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Piacenza F, Basso A, Pierpaoli E, Mocchegiani E. Modulators of cellular senescence: mechanisms, promises, and challenges from in vitro studies with dietary bioactive compounds. *Nutrition Research*. 2014; 34(12):1017-1035.

Massi A, Bortolini O, Ragno D, Bernardi T, Sacchetti G, Tacchini M, et al. Research progress in the modification of quercetin leading to anticancer agents. *Molecules*. 2017;22(8):1-27.

Migliore L, Migheli F, Spisni R, Copped F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2011.

Mikuła-Pietrasik J, Niklas A, Uruski P, Tykarski A, Książek K. Mechanisms and significance of therapy-induced and spontaneous senescence of cancer cells. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(2):213–29.

Moreno CC, Mittal PK, Sullivan PS, Rutherford R, Staley CA, Cardona K, et al. Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation. *Clin Colorectal Cancer.* 2016;15(1):67–73.

Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2016;469(2):125–34.

Nallamilli BRR, Hegde M. Detecting APC gene mutations in familial adenomatous polyposis (FAP). *Curr Protoc Hum Genet.* 2017;2017:10.8.1-10.8.16.

Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. Principles of biochemistry. 4th ed. New York Freeman; 2005, p: 473-475.

Ni Y, Xie G, Jia W. Metabonomics of human colorectal cancer: New approaches for early diagnosis and biomarker discovery. *J Proteome Res.* 2014;13(9):3857–70.

Niu G, Yin S, Xie S, Li Y, Nie D, Ma L, Wang X, Wu Y. Quercetin induces apoptosis by activating caspase-3 and regulating Bcl-2 and cyclooxygenase-2 pathways in human HL-60 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2011;43(1):30–7.

O’Keefe SJD. The Need to Reassess Dietary Fiber Requirements in Healthy and Critically Ill Patients. *Gastroenterol Clin North Am.* 2018;47(1):219–29.

Pan HC, Jiang Q, Yu Y, Mei JP, Cui YK, Zhao WJ. Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells. *NeurochemInt.* 2015;80:60-71.

Pan J, Ding M, Xu K, Yang C, Mao LJ. Exosomes in diagnosis and therapy of prostate cancer. *Oncotarget.* 2017;8(57):97693–700.

Park S, Lim W, Bazer FW, Whang KY, Song G. Quercetin inhibits proliferation of endometriosis regulating cyclin D1 and its target microRNAs in vitro and in vivo [Internet]. C. 63, Journal of Nutritional Biochemistry. Elsevier Inc. 2019; 63:87–100.

Peters JM, Gonzalez FJ. The Evolution of Carcinogenesis. Toxicol Sci. 2018;165(2):272–6.

Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A target for anticancer therapy. Int J Mol Sci. 2018;19(2):1-10.

Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Alessia Garufi, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. Aging. 2016;8(4):603–19.

Priyadarsini RV, Murugan RS, Maitreyi S, Ramalingam K, Karunagaran D, Nagini S. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- κ B inhibition. Eur J Pharmacol. 2010;649(1-3):84-91.

Ranjan A, Iwakuma T. Non-canonical cell death induced by p53. Int J Mol Sci. 2016;17(12):1-19.

Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C. The anti-cancer effect of quercetin: Molecular implications in cancer metabolism. Int J Mol Sci. 2019;20(13):1–19.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit Rev Food Sci Nutr. 2005;45(4):287–306.

Schafer MJ, Miller JD, LeBrasseur NK. Cellular senescence: Implications for metabolic disease. Mol Cell Endocrinol. 2017; 455:93–102.

Sever R, Brugge JS (2015). Signal transduction in cancer. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015;5(4):a006098.

Shafabakhsh R, Asemi Z. Quercetin: A natural compound for ovarian cancer treatment. J Ovarian Res. 2019;12(1):1–9.

Shahidi F. Nutraceuticals and Functional Foods in Health Promotion and Disease Prevention. Keynote Present IUFoST Conf. 2007; 6:13–24.

Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, Foods and Colorectal Cancer Prevention. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1244–60.

Srivastava NS, Srivastava RAK. Curcumin and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation in multiple cancer cells and modulate Wnt/ β -catenin signaling and apoptotic pathways in A375 cells. *Phytomedicine*. 2019; 52:117-128.

Terao j. Factors modulating bioavailability of quercetin- related flavonoids and the consequence of their vascular function. *Biochemical Pharmacology*. 2017; 139: 15-23

Thanikachalam K, Khan G. Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients*. 2019;11(1):1-11.

Turesky RJ. Mechanistic evidence for red meat and processed meat intake and cancer risk: A follow-up on the international agency for research on cancer evaluation of 2015. *Chimia (Aarau)*. 2018;72(10):718–24.

Wang D, Liang S, Zhang X, Dey SK, Li Y, Xu C, et al. Targeted next-generation sequencing approach for molecular genetic diagnosis of hereditary colorectal cancer: Identification of a novel single nucleotide germline insertion in adenomatous polyposis coli gene causes familial adenomatous polyposis. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(1):1–8.

Wong CH, Chen YC. Clinical significance of exosomes as potential biomarkers in cancer. *World J Clin Cases*. 2019;7(2):171–90.

Wong RSY. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res [Internet]*. 2011;30(87):1-14.

Yeatan TJ, Florida S. Colon Cancer. *Am Fam Physician*. 2018;97(10):1–6.

Zhang L, Shay JW. Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(8):1–10.

Wang P, Zhang K, Zhang Q, Mei J, Chen CJ, Feng ZZ, Yu D. Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells. *Toxicol Vitr* [Internet]. 2012;26(2):221–8.

Zhang C, Hao Y, Sun Y, Liu P. Quercetin suppresses the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma by regulating microRNA-22/WNT1/ β -catenin axis. *J Pharmacol Sci* [Internet]. 2019;140(2):128–36.

EKLER

EK-1: Proje ile ilgili yapılan sözel sunum



3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020)

19-20 March 2020, Ankara, Turkey
www.EurasianBioChem.org

➤ ORAL PRESENTATION

Kerşetin kolon kanser hücreleri sağ kalımı ve ölümü üzerine etkilerinin incelenmesi

Serpil Özsoy^{1*}, Eda Becer^{2,3}, Hilal Kabadayı⁴, H. Seda Vatansever^{3,4}, Sevinç Yücecan¹

¹Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik, Lefkoşa, Kıbrıs

²Yakın Doğu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Lefkoşa, Kıbrıs

³Yakın Doğu Üniversitesi, DESAM Enstitüsü, Lefkoşa, Kıbrıs

⁴Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye.

Özet

Kolon kanseri, kansere bağlı ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Mutasyona uğramış kolon ve rektum hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalması kolorektal kanserine neden olmaktadır. Diyetle alınan besinlerde bulunan bileşiklerin kanseri önlemede ve tedavisine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Kerşetin anti-inflamatuar ve anti-karsinojenik etki gösteren; soğan, elma, üzüm, yaban mersini, turuncgiller, maydanoz ve diğer yeşil yapraklı sebzeler gibi birçok sebze ve meyvede yaygın olarak bulunan flavanol grubu bir fitokimyasaldır. Yapmış olduğumuz çalışmada primer (Colo-320) ve metastatik (Colo-741) kolon kanseri hücre hatlarında kerşetin hücre yaşlanma ve apoptoz mekanizması üzerine etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Hücre canlılığı MTT analiz yöntemi ile, hücre sağ kalım ve ölümü ise Bax, Bcl-2, kaspaz-3, Lamin B1, p16, siklin B1 indirekt immunoperoksidaz yöntemi ile incelenmiştir. MTT analizi sonrası hücre büyümesini inhibe eden etkili doz ve inkübasyon süresi her iki hücre hattı için 48 saat 25µg/ml olarak belirlenmiştir. Kerşetin tedavisi sonrası pro-apoptotik protein olan Bax immunoreaktivitesi Colo-320 ve Colo-741 kolon kanser hücre hatlarında anlamlı bir şekilde artmıştır. Ancak anti-apoptotik protein olan Bcl-2 immunoreaktivitesi sadece primer (Colo-320) kolon kanser hücre hattında anlamlı bir şekilde azalmıştır. Apoptotik proteinlere ek olarak hücre yaşlanmada etkili Lamin B1, p16 ve siklin B1 gibi proteinlerin seviyelerinde de değişiklik olduğu saptanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, kerşetin apoptoz ve hücre yaşlanma üzerine etkilerinin olduğu ancak bu etkinin primer veya metastatik kanser hücre tipine göre farklılık gösterebileceği ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: kerşetin, apoptoz, hücre yaşlanma, kolon kanseri

EK- 2: Proje ile ilgili kabul alan yayın

Anticancer Agents Med Chem. 2020 Apr 7. doi: 10.2174/1871520620666200408082026.
Online ahead of print.

Quercetin – Mediated Apoptosis and Cellular Senescence in Human Colon Cancer

Serpil Özsoy¹, Eda Becer², Hilal Kabadayı³, Hafize S Vatansever³, Sevinç Yücecan¹

Affiliations + expand

PMID: 32268873 DOI: 10.2174/1871520620666200408082026

Abstract

Background: Quercetin is a flavonol from the flavonoid group of polyphenols which positively affects human health due to its anti-cancer, anti-inflammatory, anti-microbial and cardioprotective effects. The effects of phenolic compounds, including quercetin, on programmed cell death and cellular senescence have been the subject of research in recent years.

Objective: In this study, we aimed to investigate the effects of quercetin on cell viability, apoptosis and cellular senescence in primary (Colo-320) and metastatic (Colo-741) colon adenocarcinoma cell lines.

Methods: Cytotoxicity was analyzed via MTT assay in Colo-320 and Colo-741 cell lines. After quercetin treatment, cellular senescence and apoptosis were evaluated by TUNEL staining, X-Gal staining and indirect peroxidase technique for immunocytochemical analysis of related proteins such as Bax, Bcl-2, caspase-3, Hsp27, Lamin B1, p16, cyclin B1.

Results: The effective dose for inhibition of cell growth in both cell lines was determined to be 25µg/ml quercetin for 48 hours. Increased Bax immunoreactivity following quercetin treatment was

FULL TEXT LINKS

BenthamScience
Full-Text Article

ACTIONS

“ Cite

☆ Favorites

SHARE



PAGE NAVIGATION

< Title & authors

Abstract

Similar articles

LinkOut - more
resources

ÖZGEÇMİŞ

ADI, SOYADI:	Uzm. Dyt. Serpil Özsoy
DOĞUM TARİHİ ve YERİ:	12.03.1990
HALEN GÖREVİ: Araştırma Görevlisi	
YAZIŞMA ADRESİ: Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi	
Lefkoşa / KKTC Mersin 10 Türkiye	
TELEFON: 0392 2236464/3434	
E-MAIL: serpil.ozsoy@neu.edu.tr	

YILI	DERECESİ	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
2007-2012	Lisans	Yakın Doğu Üniversitesi	Beslenme ve Diyetetik
2012-2015	Yüksek Lisans	Yakın Doğu Üniversitesi	Beslenme ve Diyetetik
2015-...	Doktora	Yakın Doğu Üniversitesi	Beslenme ve Diyetetik

ÇALIŞMA ALANI	ANAHTAR SÖZCÜKLER
Beslenme ve Diyetetik	Tıbbi Beslenme Tedavisi

FAKÜLTE İÇİ YÜRÜTÜLEN GÖREVLER

- Beslenme ve Diyetetik Bölümü Son sınıf Öğrenci Danışmanlığı ve Mezuniyet Kontrolleri
- Beslenme ve Diyetetik Bölümü Son Sınıf Mesleki Uygulama Koordinatörlüğü
- Dışa Açık Ortak Ders Koordinatörlüğü- Sağlık Bilimleri Fakülte Temsilcisi 2015-2020.
- Yakın Doğu Üniversitesi Dersler Komisyonu- Sağlık Bilimleri Fakültesi Ders Koordinatörlüğü 2017-2020.

SORUMLU OLDUĞU DERSLER

Dersin adı

- BES 351 HASTALIKLARDA TIBBİ BESLENME TEDAVİSİ I
- BES 352 HASTALIKLARDA TIBBİ BESLENME TEDAVİSİ II(bahar)
- BES 413 HASTALIKLARIN TIBBİ BESLENME TEDAVİSİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR
- BES 414 HASTALIKLARIN TIBBİ BESLENME TEDAVİSİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR (bahar)
- BES 451 YDÜ DIŞI HASTANE VE KURUM STAJI
- BES 445- SEMİNER(MODÜLER DERS)
- BES 431- MEZUNİYET ÇALIŞMASI (MODÜLER DERS)
- NAD 351 MEDICAL NUTRITION THERAPY IN DISEASES I
- NAD 352 MEDICAL NUTRITION THERAPY IN DISEASES II(SPRING)

SON BEŞ YILDAKİ ÖNEMLİ YAYINLAR ve SUNUMLAR

1. Özsoy S., Susever S., Mikrobiyota ve Polifenoller, 1. Ulusal İnsan Mikrobiyotası ve Sağlığımıza Etkileri Kongresi, Poster Sunumu/Ankara, 8-10 Aralık 2016.
2. Özsoy S., Polifenoller, Mikrobiyota ve Diyabet. 53. Ulusal Diyabet Kongresi 19. Diyabet Diyetisyenliği Sempozyumu, Konuşmacı/Kıbrıs, 20-22 Nisan, 2017.
3. Özsoy S., Zeybek G., Determination Of Healthy Eating Index And Body Mass Index For Women Aged 19-65 Living In TRNC. The 4th International Symposium on “Traditional Foods from Adriatic to Caucasus”, Poster presentation, Kyrenia / Northern Cyprus, 19 - 21 April, 2018.
4. Zeybek G., Özsoy S., Determination Of Healthy Eating Index And Body Mass Index For Women Aged 19-65 Living In TRNC. The 4th International Symposium on “Traditional Foods from Adriatic to Caucasus”, Poster presentation, Kyrenia / Northern Cyprus, 19 - 21 April, 2018.
5. Özsoy S. Kuzey Kıbrıs Beslenme ve Sağlık Araştırması-2016. 55. Ulusal Diyabet Metabolizma ve Beslenme Hastalıkları Kongresi, 21. Diyabet Diyetisyenliği Sempozyumu, Sözel Sunum/Kıbrıs 24-25 Nisan, 2019.
6. Özsoy S., Polifenoller ve Diyabet. Beslenme ve Diyet Dergisi(2019); 47:102-109.
7. Özsoy S., Becer E., Kabadayı H., Vatansever H.S., Yücecan S., Kersetinin kolon kanser hücreleri sağkalımı ve ölümü üzerine etkileri. 3rd International Euroasian Conference on Biological and Chemical Sciences. Ankara/19-20 Mart 2020 (online oral presentation).

8. Özsoy S., Becer E., Kabadayı H., Vatansever H.S., Yücecan S. Quercetin-Mediated Apoptosis and Cellular Senescence in Human Colon Cancer. Anti-Kanser Agents in Medicinal Chemistry (2020); published online ahead of print.

Kongre/Konferans/Sempozyum

- 3rd INTERNATIONAL EUROASIAN CONFERENCE ON BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES. ANKARA/19-20 MART 2020(online katılım sağlanmıştır).
- CELL DEATH: DEGENERATION AND REGENERATION, MARMARA ÜNİVERSİTESİ, İSTANBUL, TÜRKİYE 2019.
- 55. ULUSAL DİYABET, METABOLİZMA ve BESLENME HASTALIKLARI KONGRESİ, CONCORDE HOTEL, BAFRA, 2019.
- KTDB, DİYABETTE GÜNCEL BESLENME TEDAVİLERİ, ACAPULCO HOTEL, GİRNE, KIBRIS, 2018.
- KIBRIS'IN KUZEYİNDE YAŞAYAN İNSANLARIN SU ÜRÜNLERİ TÜKETİM FARKINDALIĞININ ARTTIRILMASI, MERİT HOTEL, KIBRIS, 2018
- 1. ULUSAL İNSAN MİKROBİYOTASI ve SAĞLIĞIMIZA ETKİLERİ, ANKARA, TÜRKİYE, 2016.
- 3. BAĞIRSAK MİKROBİYOTASI VE PROBİYOTİKLER KONGRESİ, GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ, ANKARA, TÜRKİYE, 2016.
- 2015 KIBRIS DİYABET ÇALIŞTAYI, RAUF RAİF DENKTAŞ KÜLTÜR VE KONGRE SARAYI, MAĞUSA, 2015
- IX. ULUSLARARASI BESLENME VE DİYETETİK KONGRESİ, ANKARA, TÜRKİYE, 2014.