

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GENİSTEİNİN DNA HASARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN  
KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE TEK HÜCRE JEL  
ELEKTROFOREZ (COMET) YÖNTEMİYLE  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Uzm. Ecz. Tuğbagül ÇAL DOĞAN**

**Farmasötik Toksikoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2021**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GENİSTEİNİN DNA HASARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN  
KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE TEK HÜCRE JEL  
ELEKTROFOREZ (COMET) YÖNTEMİYLE  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Uzm. Ecz. Tuğbagül ÇAL DOĞAN**

**Farmasötik Toksikoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT**

**ANKARA**

**2021**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**GENİSTEİNİN DNA HASARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN KOLON**  
**KANSERİ HÜCRELERİNDE TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ**  
**(COMET) YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Tuğbagül ÇAL DOĞAN**

**Danışman: Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT**

Bu tez çalışması 25.11.2021 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji Doktora Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

- Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN*  
*(Hacettepe Üniversitesi)*
- Üye:** *Prof. Dr. Pınar ERKEKOĞLU*  
*(Hacettepe Üniversitesi)*
- Üye:** *Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ*  
*(Ankara Üniversitesi)*
- Üye:** *Prof. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ*  
*(Hacettepe Üniversitesi)*
- Üye:** *Doç. Dr. Merve BACANLI*  
*(Sağlık Bilimleri Üniversitesi)*

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

09 Aralık 2021

*Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN*  
**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

25/11/2021

Tuğbagül ÇAL DOĞAN

i

<sup>i</sup> “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.  
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Ülkü NDEĞER BUCURGAT danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

*Uzm. Ecz. Tuğbagül ÇAL DOĞAN*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitim sürecim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, fikirlerimi destekleyerek kendime güvenle akademik yolumda ilerlememi sağlayan, her konuda yardımına başvurduğum ve örnek aldığım kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT'a,

Akademik hayatımın şekillenmesi ve eğitim sürecimi verimli şekilde değerlendirmem konusundaki tavsiyeleriyle bilimsel kimliğime önemli katkılar sağlayan kıymetli hocam Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca bilimsel birikimlerinden yararlandığım ve tavsiyeleriyle her zaman çalışmalarına destek olan kıymetli hocam Prof. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ'e,

Eğitim sürecimdeki emeklerinden dolayı anabilim dalımızdaki değerli hocalarıma,

Samimiyetleri ve her konuda yardımlarıyla yanımda olan araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Attığım her adımda yanımda olan, destekleyen ve yol gösteren sevgili aileme,

Karşılaştığım sıkıntıları paylaşan, çözüm yolları arayan, desteğini ve güvenini her zaman hissettiğim sevgili eşim Semih DOĞAN ve kardeşi Sema DOĞAN HİTALOĞLU'na,

Eğitim sürecinin en kıymetli hediyelerinden dostum Uzm. Ecz. Merve BAYSAL'a,

TDK-2019-18077 proje koduyla araştırmamızı destekleyen Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Birimine ve 219S200 proje koduyla projemizi destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Çal Doğan, T., Genisteinin DNA Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Kolon Kanseri Hücrelerinde Tek Hücre Jel Elektroforez (Comet) Yöntemiyle Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Doktora Tezi, Ankara, 2021.** Günümüzde, kolorektal kanser kalp hastalıklarından daha fazla ölüme yol açmaktadır ve kanser türleri içinde yaygın görülen kanserlerden biridir. Bununla birlikte, uygulanan cerrahi müdahale ve kemoterapi, hastaların iyileşme ve sağ kalım sürecinde sınırlı fayda sağlamaktadır. Beklenen tedavi etkinliğinin görülememesindeki en önemli faktörler ise, hastalarda gelişen ilaç direnci ve yan etkileri azaltarak hasta uyumuna olanak sağlayabilecek hedefli tedavi ihtiyacıdır. Kolorektal kanser tedavi etkinliğini arttırmaya yönelik yapılan çalışmalara katkı sağlamak amacıyla, bu tez kapsamında genistein, antikanser ilaç 5 – florourasil ve Tümör Nekroz Faktör-Apoptoz indükleyici ligandın (TRAIL) subtoksik konsantrasyonlarda tek başlarına ve kombinasyon halindeki SW480 ve SW620 (kolon adenokarsinoma) hücre hatlarında sitotoksik etkilerini değerlendirdik. Sitotoksisite MTT yöntemiyle, genotoksik etkileri Comet yöntemiyle değerlendirildi. Ayrıca, reaktif oksijen türleri (ROS), mitokondriyel membran potansiyeli ve kaspaz 3-8-9 aktiviteleri değerlendirildi. Apoptotik etkileri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT – PCR) yöntemiyle incelenmiştir. Genisteinin 5-florourasil ve TRAIL’in her iki hücre hattında da sitotoksik etkili olduğu ve DNA hasarını arttırdığı belirlenmiştir. Bu maddeler kombinasyon halinde sinerjistik apoptotik etki göstermişlerdir, ROS ve kaspaz 3-8-9 düzeylerindeki artış ve mitokondriyel membran potansiyelindeki düşüş apoptoz indüksiyonunda etkili olabilir. Ayrıca, TRAIL’in hücrelerde Ölüm reseptörü 5 (DR5) - aracılı apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. Uygulanan maddelerin ikili ve üçlü kombinasyonlarında ise, Tuzak reseptörü (DcR1) ve X-bağlı apoptoz inhibitör proteini (XIAP) antiapoptik gen ekspresyonlarında TRAIL ligandının tek uygulandığı gruba göre her iki hücre hattında da azalmanın olduğu saptanmıştır. Bu etkiler TRAIL direnci problemini inceleyen çalışmalara katkı sağlayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Genotoksisite, kolon kanseri, genistein, 5 – florourasil, TRAIL



## ABSTRACT

**Çal Doğan, T., Evaluation of The Effects of Genistein on DNA Damage by Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) in Colon Cancer Cells, Hacettepe University Institute of Health Sciences Doctor of Philosophy Thesis on Pharmaceutical Toxicology , Ankara, 2021.** Today, cancer causes more deaths than heart diseases and colorectal cancer is one of the most common cancers. However, surgical intervention and chemotherapy provide limited benefit in the recovery and survival of patients. The most important factors in not observing the expected treatment efficacy are the drug resistance that develops in patients and the need for targeted treatment that can reduce side effects and allow patient compliance. In order to contribute to the studies conducted to increase the efficacy of colorectal cancer treatment, in this thesis we investigated the exposure cytotoxic effects of SW480 and SW620 (colon adenocarcinoma cells) to genistein, anticancer drug 5-fluorouracil and TRAIL (Tumor Necrosis Factor-related apoptosis inducing ligand). Cytotoxicity was investigated by MTT method, genotoxic effects were investigated by Comet method. Also, reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential and caspase 3-8-9 activities were investigated. The apoptotic effects were determined real time polymerase chain reaction (RT – PCR) method. It has been found that genistein, 5-fluorouracil and TRAIL had cytotoxic effects and caused increases in DNA damage in both cell lines. These substances showed synergistic apoptotic effects in combination and the increases in ROS and caspase 3-8-9 levels and decreases in mitochondrial membrane potential might be effective in apoptosis induction. In addition, TRAIL was found to induce Death receptor 5 (DR5) - mediated apoptosis in cell lines. In the double and triple combinations of the applied substances, there were decreases in Decoy receptor 1 (DcR1) and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) antiapoptotic gene expressions in both cell lines compared to the group in which TRAIL ligand was applied alone. Such effects may contribute to the studies that investigate TRAIL resistance problem.

**Key Words:** Genotoxicity, colon cancer, genistein, 5 – fluorouracil, TRAIL

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xix
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Kolon Anatomisi ve Fizyolojisi	3
2.2. Kolorektal Kanser	4
2.2.1. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi	4
2.2.2. Kolorektal Kanser Etiyolojisi	5
2.2.3. Kolorektal Kanser Risk Faktörleri	6
2.2.4. Kolorektal Kanser Teşhisi ve Tedavisi	11
2.3. Genistein	16
2.3.1. Genisteinin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	16
2.3.2. Genisteinin Biyolojik Etkileri	16
2.4. Tümör Nekroz Faktör (TNF) Reseptörü, Fas ligandı, TNF-ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) ve Kolorektal Kanser	18
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	21
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	22
3.3. Kullanılan Çözeltiler	24
3.3.1. Çalışılan Etkin Madde Çözeltileri	24
3.3.2. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	25

3.3.3. Tek Hücre Jel Elektrophrez (COMET) Yöntemi ile Genotoksisite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	25
3.3.4. Hücre Yüzey Reseptör Proteinleri DR4 ve DR5'in Yüzey Ekspresyon Tayininde Kullanılan Çözeltiler	27
3.3.5. Hücre Siklusu Tayininde Kullanılan Çözeltiler	27
3.3.6. Apoptoz Tayininde Kullanılan Çözeltiler	27
3.3.7. İntraselüler Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Tayininde Kullanılan Çözeltiler	27
3.3.8 Mitokondriyal Membran Potansiyeli Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	28
3.3.9. Kaspaz 3, 8 ve 9 Aktivitelerinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	28
3.3.10. RT-PCR Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	28
3.4. Yöntemler	29
3.4.1. SW480 ve SW620 Hücre Hatlarında 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi	29
3.4.2. SW480 ve SW620 Hücrelerinde Yenilenme (Recovery) 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi	32
3.4.3. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerindeki DNA Hasarına Etkilerinin Tek Hücre Jel Elektrophrez (COMET) Yöntemi ile İncelenmesi	32
3.4.4. Genistein ve 5-florourasil'in Hücre Yüzey Reseptör Proteinleri DR4 ve DR5'in Yüzey Ekspresyonları Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	34
3.4.5. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerinde Hücre Siklusu Üzerindeki Etkilerinin Akım Sitometrisi Cihazıyla Tayini	34
3.4.6. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin Akım Sitometrisi Cihazıyla Tayini	35

3.4.7. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerindeki Reaktif Oksijen Türleri Üzerindeki Etkilerinin Tayini	36
3.4.8. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerindeki Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerindeki Etkilerinin Tayini	36
3.4.9. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerindeki Kaspaz 3, 8 ve 9 Aktiviteleri Üzerindeki Etkilerinin Tayini	37
3.4.10. SW480 ve SW620 Hücrelerinde Apoptotik Proteinler (DR4, DR5) ve Antiapoptotik Proteinler (Bcl – xL, BcL-2, XIAP, DcR1, DcR2)'in Gerçek Zamanlı PCR Yöntemiyle Belirlenmesi	37
3.5. İstatistiksel Yöntem	41
<b>4. BULGULAR</b>	42
4.1. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular	42
4.2. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerinde Comet Yöntemi ile DNA Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular	49
4.3. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerinde Hücre Siklusu, DR4 ve DR5 Yüzey Ekspresyonları ile Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular	50
4.4. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerinde Kaspaz 3-8-9 Aktiviteleri, Mitokondriyal Membran Potansiyeli ve ROS Düzeylerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular	55
4.5. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL'ın Gen Ekspresyon Analizine Ait Bulgular	58
4.5.1. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL'ın SW480 Hücrelerinde Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Gen Ekspresyon Analizlerine Ait Bulgular	59

4.5.2. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL’in SW620 Hücrelerinde 48 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Gen Ekspresyon Analizlerine Ait Bulgular	73
<b>5. TARTIŞMA</b>	89
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	95
<b>7. KAYNAKLAR</b>	96
<b>8. EKLER</b>	108
<b>EK 1: Tez Çalışması Orjinallik Raporu</b>	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	110

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>μL</b>	Mikrolitre
<b>μM</b>	Mikromolar
<b>5-FU</b>	5-florourasil
<b>A549</b>	İnsan akciğer adenokarsinoma hücre hattı
<b>Apo2L</b>	TNF-ilişkili apoptoz indükleyen ligand
<b>AsPC-1</b>	İnsan pankreas adenokarsinoma hücreleri
<b>ABC</b>	Adenozin trifosfat bağlayıcı kaset taşıyıcılar
<b>AGS</b>	İnsan gastrik adenokarsinoma hücre hattı
<b>ANOVA</b>	Varyans Analizi
<b>APC</b>	Adenomatöz polipozis koli
<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat
<b>Bak</b>	Bcl-2 Antagonist/Öldürücü gen
<b>Bax</b>	Bcl-2 ilişkili X geni
<b>Bcl-2</b>	B hücre lenfoma-2
<b>Bcl-XL</b>	B hücre lenfoma-XL
<b>BEL-7402</b>	İnsan hepatoselüler kanser hücre hattı
<b>Bid</b>	BH3-etkileşimli hücre ölümü agonisti
<b>BLM</b>	Bloom Syndrome RecQ Like Helicase
<b>BRAF</b>	V-Raf Murin Sarkoma Viral Onkogen Homolog B
<b>BSA</b>	Sığır Serum Albumini
<b>CARP</b>	Kardiyak Adriyamisin Duyarlı Protein
<b>CDKN2A</b>	Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
<b>cDNA</b>	Tamamlayıcı Deoksiribo Nükleik Asit
<b>cFLIP</b>	FLICE benzeri inhibitör protein
<b>Chk1</b>	<i>Checkpoint kinaz 1</i>
<b>CI</b>	Kombinasyon İndeksi
<b>CIMP</b>	CpG adası metilatör fenotipi
<b>CIN</b>	Kromozomal İnstabilite
<b>cm</b>	Santimetre
<b>cm<sup>2</sup></b>	Santimetre kare
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit

<b>COMET</b>	Tek Hücre Jel Elektroforez yöntemi
<b>CYP2E1</b>	Sitokrom P450 2E1
<b>DCC</b>	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
<b>DcR1</b>	Tuzak Reseptörü 1
<b>DcR2</b>	Tuzak Reseptörü 2
<b>DISC</b>	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
<b>dk</b>	Dakika
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	Deoksiribo Nükleik Asit
<b>DNaz</b>	Deoksiribonükleaz
<b>DPBS</b>	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
<b>DPD</b>	Dihidropirimidin dehidrojenaz
<b>DR4</b>	Hücre ölüm reseptörü 4
<b>DR5</b>	Hücre ölüm reseptörü 5
<b>ERK1/2</b>	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
<b>EtBr</b>	Etidyum Bromür
<b>FADD</b>	Fas ile ilişkili ölüm bölgesi
<b>FAK</b>	Fokal Adezyon Kinaz
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>G</b>	Genistein
<b>GAPDH</b>	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
<b>GLOBOCAN</b>	<i>Global Cancer Observatory</i>
<b>HAT</b>	Histon Asetiltransferaz
<b>HeLa</b>	İnsan serviks kanseri hücre hattı
<b>Hep3B</b>	İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
<b>HepG2</b>	İnsan hepatoselüler karsinom hücre hattı
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>HCT116</b>	İnsan kolon kanseri hücre hattı
<b>HDAC</b>	Histon Deasetilaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen Peroksit
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Hidrojen Sülfür

<b>HSP</b>	Isı şoku proteinleri
<b>IAP</b>	Apoptoz inhibitör proteinleri
<b>IC<sub>50</sub></b>	İnhibitör Konsantrasyon 50
<b>IgG2B</b>	İzotip Kontrol
<b>IGFIIR</b>	İnsülin Büyüme Faktörü Tip II Reseptörü
<b>KRAS</b>	Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-Onkogen
<b>LMPA</b>	Düşük Erime Noktalı Agar
<b>LOH</b>	Heterozigosite Kaybı
<b>LoVo</b>	İnsan kolorektal kanser hücre hattı
<b>mA</b>	Miliamper
<b>MAPK</b>	Mitojen aktive protein kinaz yolağı
<b>MDR1</b>	Çoklu ilaç direnci proteini-1
<b>mg</b>	Miligram
<b>MINT1</b>	<i>Methylated Tumor 1</i>
<b>mL</b>	Mililitre
<b>MLH</b>	MutL homolog protein
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMP</b>	Matriks Metalloproteinaz
<b>MMR</b>	Yanlış eşleşme onarım mekanizması
<b>mRNA</b>	Mesajcı ribonükleik asit
<b>MSH</b>	MutS Homolog DNA yanlış eşleşme onarım proteini
<b>MSI</b>	Mikrosatellit instabilitesi
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
<b>MUTHY</b>	MutY DNA glikozilaz
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	Etilen Diamin Tetraasetik Asit Disodyum tuzu
<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür
<b>NaOH</b>	Sodyum Hidroksit
<b>nm</b>	Nanometre
<b>NMPA</b>	Normal Erime Noktalı Agar
<b>NF-κB</b>	Nükleer faktör – kappa B
<b>Ort</b>	Ortalama
<b>PARP</b>	Poli (ADP-Riboz) polimeraz



<b>PBS</b>	Fosfat Tamponu
<b>PI</b>	Propidyum İyodür
<b>PIK3CA</b>	Fosfoinositid 3-Kinaz Alfa
<b>PMS1</b>	<i>Postmeiotic Segregation Increased 1</i>
<b>qPCR</b>	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RNase</b>	Ribonükleaz
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>rpm</b>	<i>Revolutions per Minute</i>
<b>RT-PCR</b>	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>S</b>	Saat
<b>SLC</b>	<i>Solute carrier</i> proteinler
<b>SNU-423</b>	İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
<b>SNU-449</b>	İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for The Social Sciences</i>
<b>SW480</b>	İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı
<b>SW620</b>	İnsan metastatik kolon adenokarsinoma hücre hattı
<b>T</b>	TNF-ilişkili apoptoz indükleyen ligand
<b>TBHP</b>	Tersiyer Bütil Hidrojen Peroksit
<b>TET1</b>	<i>Ten Eleven Translocation 1</i>
<b>TNF</b>	Tümör Nekroz Faktörü
<b>TNM</b>	Tümör – Nod- Metastaz evreleme sistemi
<b>TP53</b>	Tümör protein 53
<b>TRAIL</b>	TNF-ilişkili apoptoz indükleyen ligand
<b>V</b>	Volt
<b>VEGF</b>	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
<b>XIAP</b>	X-Bağlı Apoptoz İnhibitör proteini

## ŞEKİLLER

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Kolon anatomisi.	<b>3</b>
2.2. 2012 verilerine göre gelişmiş ve az gelişmiş ülkelerdeki erkeklere (a) ve kadınlara (b) ait kolorektal kanser insidansı ve mortalitesi.	<b>5</b>
2.3. Kolorektal kanser gelişimindeki genetik ve epigenetik değişiklikler.	<b>7</b>
2.4. CIMP, MSI mekanizmalarına göre kolorektal kanser sınıflandırması.	<b>9</b>
2.5. Genisteinin kimyasal yapısı.	<b>16</b>
2.6. TRAIL apoptoz mekanizması.	<b>19</b>
4.1. Genistein (G), 5-florourasil (5-FU) ve TRAIL'ın SW480 (A-C) ve SW620 (D-F) hücre canlılıkları üzerindeki etkileri.	<b>45</b>
4.2. Genistein (G), 5-florourasil (5-FU) ve TRAIL'ın ikili ve üçlü kombinasyonlarının SW480 (A) ve SW620 (B) hücre canlılıkları üzerindeki etkileri.	<b>46</b>
4.3. Genistein (G), 5-florourasil (F) ve TRAIL (T)'in ikili ve üçlü kombinasyonlarına ait kombinasyon indeksine (CI) karşı etkilenen faktör (Fa) grafikleri.	<b>47</b>
4.4. Genistein (G), 5-florourasil (5-FU) ve TRAIL'ın SW480 (A) ve SW620 (B) madde inkübasyonu sonrasındaki yenilenme/çoğalma kabiliyetleri üzerindeki etkileri.	<b>48</b>
4.5. Genistein (G), 5-florourasil (5-FU), TRAIL ve bu maddelerin ikili, üçlü kombinasyonlarının SW480 (A) ve SW620 (B) hücrelerinde kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarı üzerindeki etkileri.	<b>50</b>
4.6. Genistein (G), 5-florourasil (5-FU), TRAIL ve bu maddelerin ikili, üçlü kombinasyonlarının SW480 (A) ve SW620 (B) hücrelerinde hücre siklusu üzerindeki etkileri.	<b>51</b>
4.7. Genistein (G) ve 5-florourasil (5-FU)'in SW480 hücrelerinin DR4 ve DR5 yüzey ekspresyonları üzerindeki etkisi.	<b>52</b>
4.8. Genistein (G) ve 5-florourasil (5-FU)'in SW620 hücrelerinin DR4 ve DR5 yüzey ekspresyonları üzerindeki etkisi.	<b>53</b>

- 4.9.** Genistein (G) ve 5-florourasil (5-FU)'in SW480 (A) ve SW620 (B) hücrelerindeki apoptotik etkileri. **54**
- 4.10.** Genistein, 5 - florourasil ve TRAIL'in negatif kontrole kıyasla SW480 (A) ve SW620 hücrelerindeki Kaspaz 3-8-9 aktiviteleri üzerindeki etkileri. **56**
- 4.11.** Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'in SW480 (A) ve SW620 (B) hücrelerindeki JC-1 agregatlarının JC-1 monomerlerine oranı şeklindeki mitokondriyal membran potansiyelleri üzerindeki etkileri. **57**
- 4.12.** Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'in SW480 (A) ve SW620 (B) hücrelerindeki ROS düzeyleri üzerindeki etkileri. **58**
- 4.13.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki kontrol gruplarına kıyasla kat değişimi değerleri A) Bcl – XL ekspresyonu, B) Bcl – 2 ekspresyonu, C) XIAP ekspresyonu, D) DR4 ekspresyonu, E) DR5 ekspresyonu, F) DcR1 ekspresyonu, G) DcR2 ekspresyonu. **73**
- 4.14.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki kontrol gruplarına kıyasla kat değişimi değerleri. A) Bcl – XL ekspresyonu, B) Bcl – 2 ekspresyonu, C) XIAP ekspresyonu, D) DR4 ekspresyonu, E) DR5 ekspresyonu, F) DcR1 ekspresyonu, G) DcR2 ekspresyonu. **88**

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> Dukes Evrelendirmesi.	<b>12</b>
<b>2.2.</b> TNM Sınıflandırmasında yer alan kriterler.	<b>12</b>
<b>3.1.</b> Bir reaksiyon için PCR karışım bileşenleri.	<b>40</b>
<b>4.1.</b> Genistein (G), 5 – florourasil (5 - fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait ortalama Ct değerleri.	<b>61</b>
<b>4.2.</b> Genistein (G), 5 – florourasil (5 - fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait ortalama Ct değerleri.	<b>62</b>
<b>4.3.</b> Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait ortalama $\Delta$ Ct değerleri.	<b>63</b>
<b>4.4.</b> Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait ortalama $\Delta$ Ct değerleri.	<b>64</b>
<b>4.5.</b> Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait ortalama $2^{-\Delta$ Ct değerleri.	<b>65</b>
<b>4.6.</b> Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait ortalama $2^{-\Delta$ Ct değerleri.	<b>66</b>
<b>4.7.</b> Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait kat değişimi değerleri.	<b>67</b>
<b>4.8.</b> Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait kat değişimi değerleri.	<b>68</b>
<b>4.9.</b> Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait kat regülasyonu değerleri.	<b>69</b>
<b>4.10.</b> Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait kat regülasyonu değerleri.	<b>70</b>

- 4.11.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait ortalama Ct değerleri. **75**
- 4.12.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait ortalama Ct değerleri. **76**
- 4.13.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait ortalama  $\Delta$ Ct değerleri. **77**
- 4.14.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait ortalama  $\Delta$ Ct değerleri. **78**
- 4.15.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait ortalama  $2^{-\Delta$ Ct değerleri. **79**
- 4.16.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait ortalama  $2^{-\Delta$ Ct değerleri. **80**
- 4.17.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait kat değişimi değerleri. **81**
- 4.18.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait kat değişimi değerleri. **82**
- 4.19.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait kat regülasyonu değerleri. **83**
- 4.20.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait kat regülasyonu değerleri. **84**

## 1. GİRİŞ

Kolorektal kanser, kanser insidansı içindeki %9'luk payı ile morbidite ve mortalite sebebi olmaya devam etmektedir. Dünya genelinde üçüncü en yaygın kanser ve dördüncü en yaygın ölüm sebebidir (1). Obezite, fiziksel inaktivite, meyve ve sebzeden fakir diyet, sigara içmek gibi risk faktörlerinin yaygın olduğu gelişmiş ülkelerde sık görülürken son yıllarda gelişmekte olan ülkelerde de kolorektal kanser görülme yüzdesi artmıştır (2). Ülkemizde ise kadınlarda ve erkeklerde görülme sıklığı en fazla olan kanserler arasında yer almaktadır (3).

Kolorektal kanser tedavisinde prognostik indikatörler, önceden Dukes sistemi, günümüzde ise yaygın olarak kullanılan Tümör – Nod- Metastaz (TNM) evreleme sistemi aracılığıyla hastalığın derecesini saptamak ve tedavi şeklinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Tedavinin omurgası ise, pirimidin nükleotid sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan timidilat sentazı inhibe ederek etki gösteren fluorourasil'dir. Fluorourasilin yer aldığı FOLFIRI, FOLFOX gibi ilaç kombinasyonları kullanılmaktadır (4). Kemoterapötik tedavi rejimleri kanser tedavisinde temel basamak olmakla birlikte, tedavide ortaya çıkan ilaç direnci nedeniyle tümörün yeniden gelişimi ve ilerlemesi, kemoterapötik ilaçların sadece kanser hücrelerinde değil normal hücrelerde de apoptoz veya hücre siklusunu durdurma gibi mekanizmalarla hücre hasar oluşturması, bulantı, kusma, anemi, yorgunluk gibi yan etkiler oluşturması farklı tedavi prensiplerinin geliştirilmesine duyulan ihtiyacı arttırmıştır. Bu nedenle mevcut kemoterapötik ilaçların birtakım ajanlarla kombine edilerek etkinliklerinin artırılması ve ilaç direnci problemine çözüm bulunması önemlidir (5). Bu amaçla, kemoterapötiklerin fitoterapötiklerle kombine etkilerinin değerlendirildiği çalışmaların yanı sıra (6, 7), apoptoz indüksiyonu ile selektif hücre ölümüne aracılık eden TNF-ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) gibi ligandların kombinasyon halinde kullanıldığı çalışmalar da yapılmaktadır (8-10).

Bu proje kapsamında, kolorektal kanser tedavisindeki ilaç direnci problemine alternatif çözüm yolu bulma çalışmalarına katkı sağlamak amacıyla tedavinin temel parçalarından biri olan 5 – fluorourasil'in, antikanser etkisiyle bilinen genistein (11) ve TRAIL ligandıyla kombinasyon halindeki sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi, ilgili mekanizmanın apoptotik sürecinde yer alan gen

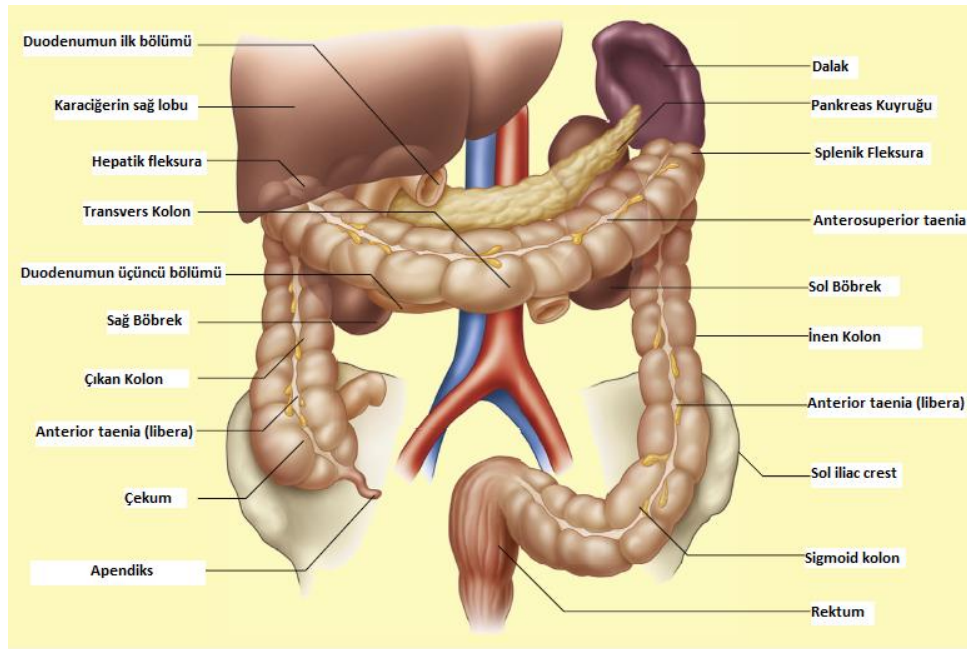
ekspresyonlarının RT-PCR yöntemi ile değerlendirilerek aydınlatılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kolon Anatomisi ve Fizyolojisi

Kalın barsak ileoçekal valften anüse kadar uzanır ve ince barsağın yaklaşık dörtte biri olan ortalama 1,5 m uzunluğundadır (12-14). Çekum, apendiks, çıkan kolon, inen kolon, hepatik fleksura, sigmoid kolon, transvers kolon, rektum, splenik fleksura ve anal kanal olmak üzere çeşitli kısımlardan meydana gelmektedir (13). Kalın barsak duvarı mukoza, submukoza, mükülaris ile seroza tabakalarından oluşur ve ince barsaktan farklı olarak villus taşımayan bu duvar mukozayı koruyucu ve kayganlaştırıcı mukus salgılar (15).

Kolonun başlıca görevleri, kimustan su ve elektrolitlerin emilimi ile fekal maddenin dışarı atılınca kadar depolanmasıdır. Kolonun üst yarısı emilim alt yarısı ise depolamada görevlidir. Kolonda bulunan sirküler ve longitudinal (tenya coli) kasların birlikte kasılmaları haustrasyon (karıştırıcı hareketler) adı verilen kasılmaları meydana getirir. Bu kasılmalar çekum ve çıkan kolonda yavaşça ilerler. Kolon içeriğinin transvers kolondan sigmoid kolona iletilmesinde ise, kütle hareketleri (ilerletici) rol alır. Karıştırıcı ve ilerletici hareketlerle kolon içeriğindeki sıvı ve çözülmüş maddeler emilerek günde 80-200 mL feçes atılımı gerçekleşir (16).



Şekil 2.1. Kolon anatomisi (13).



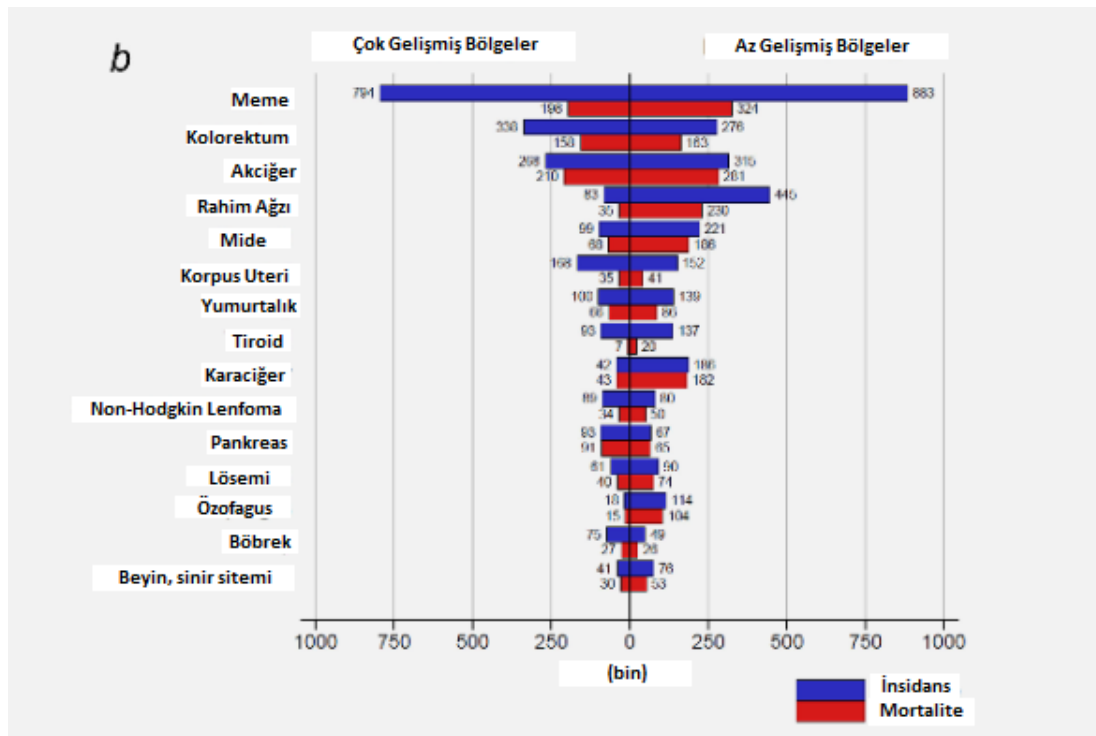
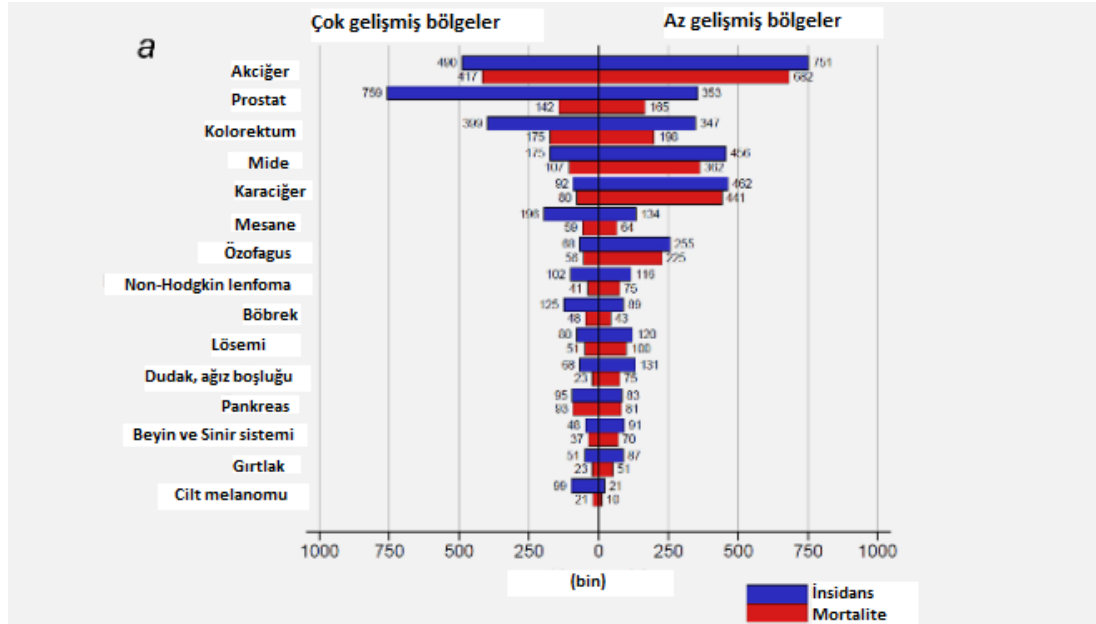
## **2.2. Kolorektal Kanser**

### **2.2.1. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi**

Kolorektal kanser, normal kolon epitelinin DNA onarım mekanizmalarıyla ilgili genler, onkogenler veya tümör baskılayıcı genlerde meydana gelebilecek genetik mutasyonların birikimi sonucunda, 10-15 yıllık süreç içinde karsinom dokuya dönüşmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (17, 18). Gastrointestinal sistemin en sık görülen ve görüldüğü vakaların yaklaşık yarısı için ölümcül olan malign hastalıklarından biridir (19, 20).

Kolorektal kanser insidansı ve mortalitesi dünya genelinde değişiklik göstermekle birlikte, GLOBOCAN (2018) verilerine göre dünya genelinde erkeklerde teşhisi konulan kanserler arasında üçüncü sırada ve kadınlarda ikinci sıradadır (21, 22). Kolorektal kanser insidansı ve mortalitesinin ülkelerin ekonomik gelişmişliği ile orantılı olarak arttığı ve kanser vakalarının %55'inin gelişmiş ülkelerde görüldüğü bilinmektedir (Şekil 2.2.) (23, 24). Ülkemizde ise kolorektal kanser, erkek ve kadınlarda görülme sıklığı açısından sırasıyla dördüncü ve üçüncü sırada yer almaktadır (25).

Son yıllarda kolonoskopi yardımıyla prekanseröz dokuların erken teşhisi nedeniyle 50 – 75 yaş aralığındaki kişilerde kanser insidansında azalma olduğu gözlenmektedir (26). Bununla birlikte 20 – 34 yaş aralığındaki kişilerde kolon ve rektum kanseri insidansının obezite, sedanter yaşam, kötü beslenme alışkanlıkları ve sigara gibi sebeplerle 2030 yılında sırasıyla %90 ve %124,2 artacağı tahmin edilmektedir (26, 27).



Şekil 2.2. 2012 verilerine göre gelişmiş ve az gelişmiş ülkelerdeki erkeklere (a) ve kadınlara (b) ait kolorektal kanser insidansı ve mortalitesi (24).

### 2.2.2. Kolorektal Kanser Etiyolojisi

Kolorektal kanser; sporadik (%70), ailesel (%20) ve kalıtsal (%10) kökenli olmaktadır (17). Kalıtsal sendromlarla veya inflamatuvar barsak hastalığı ile ilişkili olmayan, 50 yaşın üstündeki kişilerde yaygın olarak görülen, çevresel faktörlerin

etkisiyle ortaya çıkan, sadece bireyi ve sonraki neslini etkileyen nokta mutasyonlardan köken alan kolorektal kanser sporadik olarak nitelendirilmektedir (18, 28, 29). Sporadik kolorektal kanser gelişiminde, adenomatöz polipozis koli (APC - tümör supresör gen) gen mutasyonunun yol açtığı poliplerin (malign olmayan adenom) KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-Onkogen), TP53 (Tümör protein 53) ve DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) genlerindeki mutasyonlarla birlikte zaman içinde karsinom oluşturması rol almaktadır (18).

Ailesel kökenli kolorektal kanser, kalıtsal mutasyonlardan da kaynaklanabilmekte; ancak herhangi bir kalıtsal kanser grubuna dahil edilememekte ve belli bir kalıtsal sendromdan kaynaklanmamaktadır (17, 30, 31). Ailesel kolorektal kanser çevresel ve genetik faktörlerin (polimorfizmler) etkisiyle ortaya çıkmaktadır. Birinci derece akrabaları içerisinde 50 yaş üstü ve kolorektal kanser teşhisi konan bir hastanın bulunduğu kişilerde kanser görülme riskinin 2 – 3 kat artabileceği ve bu riskin akraba sayısındaki çoklukla doğru orantılı olduğu belirlenmiştir (31, 32).

Kalıtsal kökenli kolorektal kanser ise, alel genlerden birini etkileyen kalıtsal mutasyonun meydana gelmesi ve diğer alel genin etkilendiği nokta mutasyonu sonucunda kanser oluşumunun tetiklenmesinden kaynaklanmaktadır (18). Kalıtsal kolorektal kanserden sorumlu sendromlar polipozis ve nonpolipozis sendromlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Polipozis sendromlar; ailesel adenomatöz polipozis sendromu, MUTHY (MutY DNA glikozilaz) veya MHY ilişkili polipozis sendromu, hiperplastik polipozis sendromu, Peutz – Jeghers sendromu ve juvenil polipozis sendromlarıdır. Lynch sendromu ise nonpolipozis sendromdur (33). Bu sendromlardan MHY ilişkili polipozis sendromu (otozomal resesif) dışındaki sendromlar otozomal dominant sendromlardır. Hiperplastik polipozis sendromu ise nadir kalıtsal sendromdur (32).

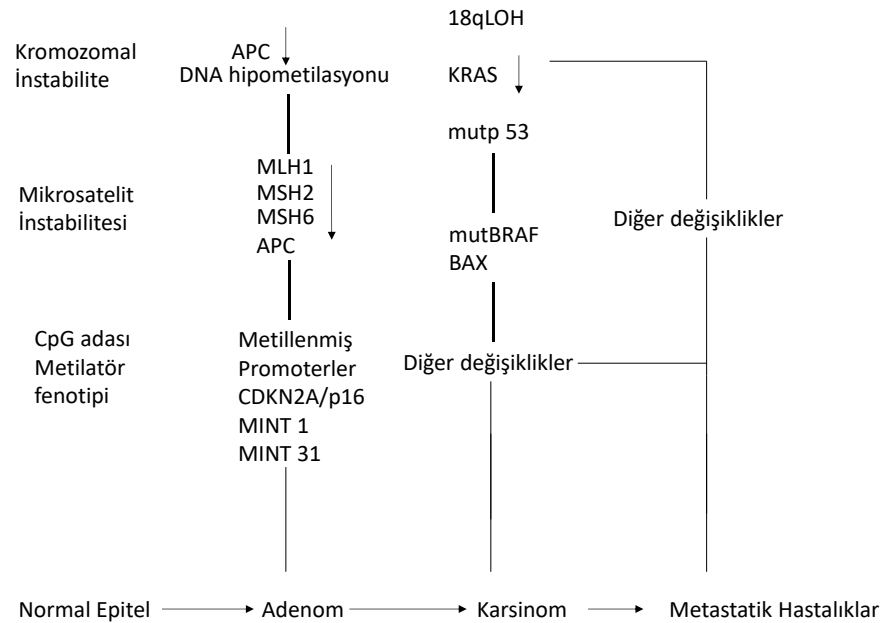
### **2.2.3. Kolorektal Kanser Risk Faktörleri**

Genetik faktörler, çevresel faktörler ve prekanseröz hastalıklar kolorektal kanser etiolojisinde rol almaktadır (34). Kolorektal kanser insidansının yüksek olmasının batı tipi beslenme alışkanlıkları ile ilgili olduğu; şeker ve hayvansal yağ içerikli yüksek kalorili besinlerin, lif açısından fakir diyetin, alkol - sigara tüketiminin

ve sedanter yaşamın kanser gelişiminde önemli rolü olan çevresel faktörler arasında yer aldığı bilinmektedir (34, 35). Kronik inflamatuvar barsak hastalığı, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, diabetes mellitus ve akromegali hastalığı da kolorektal kanser görülme riskini arttırmaktadır (17, 35). Bununla birlikte epidemiyolojik çalışma sonuçları; fiziksel aktivite, balık, sebze ve meyve bakımından zengin diyet, vitamin takviyesi, kahve tüketimi, non steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar, postmenopozal dönemdeki hormon replasman tedavisi ve statinlerin kolorektal kansere karşı koruyucu olduğunu göstermektedir (17, 34).

### Genetik Faktörler

Kolorektal kanserin ortaya çıkmasında genetik değişiklikler önemlidir (34). Karsinogenezde mutasyonların neticesindeki tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonunun rol aldığı düşünülmektedir (36). Kolorektal epitel dokunun tümör dokusuna dönüşmesinde temel olarak; kromozomal instabilite (CIN), mikrosatellit instabilitesi (MSI) ve CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) olmak üzere 3 mekanizma rol almaktadır (Şekil 2.3.) (37).



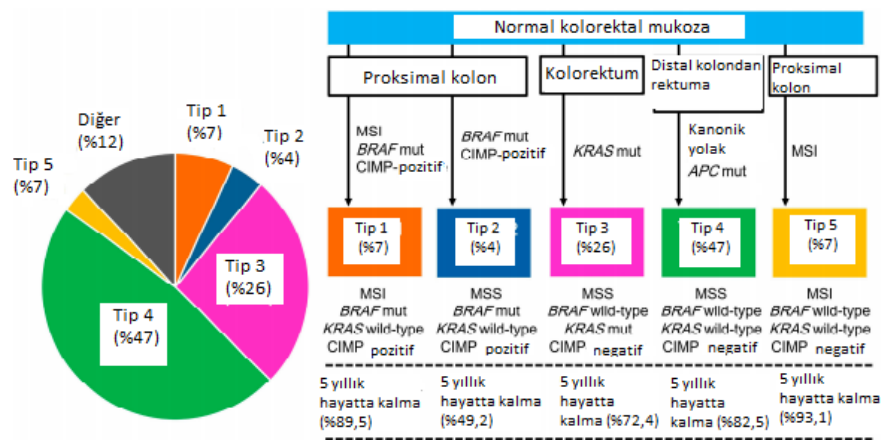
**Şekil 2.3.** Kolorektal kanser gelişimindeki genetik ve epigenetik değişiklikler (38).

Kromozomal instabilite; Fearon ve Vogelstein tarafından (1990) kolorektal kanser mekanizması olarak tanımlanmıştır (39). Anöploidi, heterozigosite kaybı (LOH), mitoz kontrol noktalarındaki ve DNA hasar cevabındaki anormallikler ve telomer disfonksiyonu ile karakterize, %60-70 oranında sporadik kolorektal kanserle ilişkili bir mekanizmadır (37, 38). Bir tümör baskılayıcı gen olan adenomatöz polipozis koli (APC), Wnt sinyal yolağının bir parçası olarak  $\beta$  – katenin aracılı hücre çoğalmasını kontrol etmektedir. APC mutasyonu ve devamındaki mitojen aktive protein kinaz yolağının (MAPK) bir parçası olan KRAS geni, serin – treonin kinaz olan BRAF geni ve son basamağı oluşturan p53 geni mutasyonları sonucu artan sitoplazmik  $\beta$ -katenin düzeyi c-myc faktöründe (hücre çoğalması) artışa, hücre-hücre adezyonunun zayıflamasına ve hücre göçüne yol açmaktadır. Bu süreç, hücrelerin kript tabanında birikmesi ve neoplastik poliplerin oluşması ile sonuçlanmaktadır (39-43). Familyal Adenomatöz Polipozis sendromu, gastrointestinal sistemdeki adenomatöz poliplerle karakterize otozomal dominant bir sendromdur ve APC genindeki germline mutasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Gardner ve Turcot sendromları da APC germline mutasyonu ile ilişkilidir. Gardner sendromunda kolondaki adenoma eşlik eden kafatası osteomu, dermoid tümörler, glioblastoma gibi belirtiler iken, Turcot sendromunda ise merkezi sinir sistemi tümörleridir (34, 41).

Mikrosatellitler, genom boyunca dağılmış tekrarlı nükleotid dizileridir. Mikrosatellit instabilitesi ise, DNA replikasyon hatalarının düzeltilmesinde görevli DNA yanlış eşleşme onarım mekanizmasının (MMR) inaktivitesinden kaynaklanan genomik instabilitedir (38-40, 42). Mikrosatellit instabilitesi (MSI), normal dokudan farklı olarak tümörde mikrosatellit içindeki tekrarlayan ünitelerin insersiyon veya delesyonları nedeniyle mikrosatellit uzunluğunun değişime uğraması şeklinde de tanımlanır. Kolorektal kanser kaynaklandığı MSI yüzdesine göre; MSI > %30 – 40 ise yüksek düzey MSI (MSI – H), MSI < %30 – 40 ise düşük düzey MSI (MSI – L) ve MSI görülmeyenler MSI stabil olarak sınıflandırılmaktadır (44). MMR sistemi, insan MutS homolog (MSH) ve insan MutL homolog (MLH) (MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 (*Postmeiotic Segregation Increased 1*), PMS2) olarak bilinen ve birbirleriyle etkileşim halindeki proteinleri içermektedir (40, 42). Bu proteinlerin mutasyonu sporadik kolorektal kanserin %15'i (MLH1 ve PMS2 proteinlerinin yokluğu) ve herediter nonpolipozis sendromunun (MLH1 ve MSH2 genlerindeki

mutasyonlar) %95'inden sorumludur (38, 43, 44). MSI-H kanser patojenezinde MSH3, MSH6, İnsülin Büyüme Faktörü Tip 2 Reseptörü (IGFIIR), BLM (*Bloom Syndrome RecQ Like Helicase*), PIK3CA (Fosfoinositid 3-Kinaz Alfa), siklin-D1, BRAF (V-Raf Murin Sarkoma Viral Onkogen Homolog B) ve BAX gen mutasyonları da rol almaktadır. BRAF mutasyonu kötü prognozlu MSI-H kanserinin sebebidir (39, 40).

CpG adaları, yüksek oranda guanin-sitozin dinukleotidleri içeren ve genin promotor kısmında yer alan, hücre siklusu, anjiyojeniz, DNA onarımı, invazyon ve adezyonda görev alan genom bölgeleridir (37, 39, 43). CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) ise, promoter CpG adası bölgelerinin DNA metiltransferazlar aracılığıyla hipermetilasyonuna bağlı tümör baskılayıcı genlerin ve diğer tümör ilişkili genlerin inaktivasyonudur (37, 42, 45). Hücre bölünmesiyle aktarılan epigenetik bir mekanizmadır (46). Kanser patojenezindeki metillenen gen sayısına göre kolorektal kanser, CIMP-yüksek, CIMP-düşük ve CIMP-normal olarak sınıflandırılmaktadır (40). CIMP yolağının başlangıç evresinde BRAF (V600E) ve TET1 (*ten eleven translocation 1*) mutasyonu yer almaktadır. MLH1, CDKN2A (Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A), MINT1 (*methylated tumor 1*), MINT2 ve MINT31 promoter genlerinin hipermetilasyonu CIMP-yüksek için tümör belirteçleri olarak kullanılmaktadır (38). KRAS mutasyonu ise CIMP-düşük için tümör teşhisinde önemlidir (40).



Şekil 2.4. CIMP, MSI mekanizmalarına göre kolorektal kanser sınıflandırması (47).

## Çevresel Faktörler

Çalışmalarda yüksek kalorili, kırmızı et ve yağ ağırlıklı, düşük lif içerikli diyet, sigara ve alkol kullanımı, obezite, sedanter yaşam gibi batı tarzı yaşam biçimi olarak tanımlanan faktörlerin kolorektal kanser riskini arttırdığı belirlenmiştir (48, 49).

İşlem görmüş kırmızı et tüketimi nitrit içeriği nedeniyle DNA hasarına yol açtığı bilinen N-nitrozo bileşiklerine bağlı kolorektal kanser riskini arttırmaktadır. Ayrıca, yüksek sıcaklıkta pişirilmiş etlerin heterosiklik amin ve polisiklik aromatik hidrokarbon içeriğinin safra asitleri ve barsak florasını değiştirerek kolorektal kanser riskini arttırabileceği görülmüştür (50). Amerika’da yapılmış bir prospektif kohort çalışmada haftada 5 defadan fazla et tüketen erkeklerin ayda 1 defadan az et tüketenlere göre kolorektal kanser riskinin 3 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (51). Kohort çalışmalardan elde edilen meta-analiz verilerine göre ise, işlem görmüş etin (50 g/gün) ve kırmızı etin (50 g/gün) sırasıyla kolorektal kanser riskini %21 ve %15 arttırdığı görülmüştür (52).

Doymuş yağ asitlerince zengin hayvansal yağların prostaglandin E2 senteziyle inflamasyona yol açması ve safra asitlerinin artışı (deoksikolik asit) ile kolorektal kanser riskini arttırabileceği belirlenmiştir (50, 52). Bununla birlikte, yağın barsak mikrobiyotasının değişimine aracılık etmesi ve H<sub>2</sub>S üreten bakterilerin (*Bilophila wadsworthia*) artışı da barsak bariyerinin zarar görmesine neden olmaktadır (53).

Glisemik indeks, karbohidrat içeren besinlerin kan glukoz düzeyi üzerindeki etkilerine göre gruplandırılmasında kullanılan bir belirteçdir. Glisemik indeksi yüksek besinlerin tüketimi ile artan insülin salınımı, insülin benzeri büyüme faktörü-1’in artışına, mitoz ve hücre proliferasyonunun indüksiyonu ile apoptoz inhibisyonuna aracılık etmektedir. *Woman Health’s Study* kohort çalışma verilerine göre kadınlarda glisemik yük artışı kolorektal kanser riskini arttırmıştır (54). Erkeklerde yapılan bir çalışmada da yüksek kan glukoz düzeyinin kolon kanseri riskini arttırdığı görülmüştür (55). Kolorektal kanser hastalarında ise tatlandırıcı-şeker içeren içeceklerin tüketiminin mortaliteyi arttırdığı belirlenmiştir (56, 57).

Alkol metabolizması oksidatif ve nonoksidatif olmak üzere iki şekilde gerçekleşmekle birlikte çoğunlukla oksidatif metabolizma aracılığıyla (alkol

dehidrogenaz, sitokrom P450 2E1 (CYP2E1- Sitokrom P450 2E1), bakteriyel katalaz) asetaldehite, sonrasında aldehit dehidrogenaz, CYP2E1, ksantin oksidaz ve aldehit oksidaz kombinasyonu ile asetik asite dönüştürülmektedir. Etanol metabolitlerinin (asetaldehit-deoksinükleotid) DNA katım ürünleri oluşturması, DNA metilasyonunu azaltması, folat metabolizmasına katılarak DNA bütünlüğünü bozması, B6 ve B12 vitamini eksikliğinin DNA sentezini etkilemesi, oksidatif stres (CYP2E1) ve inflamasyon mekanizmalarında rol alması nedeniyle kolorektal kanser riskini arttırabileceği tespit edilmiştir (21).

### **Prekanseroz hastalıklar**

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olarak iki majör sınıfa ayrılan inflamatuvar barsak hastalıkları, kolorektal mukozanın kripta tabanındaki prekanseroz veya tümoral hücrelerin hiperproliferasyonu ile ilişkili olabilmektedir. İnflamatuvar barsak hastalarının %10 – 15'inin ölüm sebebinin kolorektal kanser olduğu bilinmektedir (34, 58). Kolorektal kanser görülme riski hastalığın süresi ve anatomik boyutuyla doğru orantılıdır. Bu riskin 25 yıllık inflamatuvar barsak hastalarında %7 – 14 arasında olduğu, hastalığın 35 yıldan daha uzun sürdüğü kişilerde ise %30 yükseldiği belirlenmiştir (41).

#### **2.2.4. Kolorektal Kanseri Teşhisi ve Tedavisi**

Kolorektal kanserin mortalitesi son yıllarda gelişen (2009'dan itibaren) ve sigmoidoskopi, kolonoskopi gibi yaygınlaşan tarama yöntemleri ile yeni tedavi alternatiflerinin uygulanmaya başlaması nedeniyle azalmıştır (36, 59, 60). Kolorektal kanser teşhisinde rektal kanama, barsak alışkanlıklarında değişiklik, demir eksikliği anemisi, intestinal obstrüksiyon, abdominal veya rektal kitleler, kilo kaybı, halsizlik, karın ağrısı, rektal ağrı gibi klinik belirtiler değerlendirilmektedir (34, 61). Hastalığın derecesini saptamak ve tedavi şeklini belirlemek amacıyla, 1932 yılında Cuthbert E. Dukes tarafından ilk hali yapılmış (Tablo 2.1.) ve geliştirilerek günümüzde kullanılan hali olan TNM sistemi isimli evreleme sistemi (Tablo 2.2.) kullanılmaktadır (34, 62). Bu sistem; histoloji, makroskopi, metastaz kriterleri göz önünde bulundurularak kanser evrelendirmesi yapılmasını sağlamaktadır (63). Tümör yayılım derecesi T ile T4 arasında değişmekte ve derece tümör yayılım derecesi arttıkça kanserin metastaz riski artmaktadır. Barsak perforasyonu, T4 tümör penetrasyonu, lenfovasküler



invazyon, perinöral invazyon, artan preoperatif plazma karsinoembriyonik antijen seviyesi ve klinik barsak obstrüksiyonu gibi belirtilerin tümörün yeniden görülme riski artışıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir (64).

**Tablo 2.1.** Dukes Evrelendirmesi (62).

<b>Evre</b>	<b>Yayılım</b>
<b>A</b>	Sadece mukozada
<b>B</b>	Tüm duvar (+), lenf ganglionu (-)
<b>C</b>	Tüm duvar(+), lenf ganglionu (+)
<b>D</b>	Uzak metastaz (+)

**Tablo 2.2.** TNM Sınıflandırmasında yer alan kriterler (63).

<b>Primer Tümör (T):</b>	
Tx	Primer tümör bilinmeyen
T0	Primer tümör olmayan
Tis	In situ karsinoma
T1	Tümör mukoza ve submukozadadır.
T2	Tümör muskularis propriadadır.
T3	Tümör tüm barsak duvarını tutmuştur.
T4	Tümör serozayı aşmış çevre dokuları tutmuştur.
<b>Bölgesel Lenf Nodu (N):</b>	
Nx	Lenf nodu bilinmeyen
N0	Lenf nodu metastazı olmayan
N1	Perikolik veya perirektal 1-4 lenf nodu metastazı
N2	Perikolik veya perirektal 5 ve daha fazla lenf nodu metastazı
N3	Damar boyunca lenf nodu metastazı
<b>Uzak Metastaz (M):</b>	
Mx	Uzak metastazı bilinmeyen
M0	Uzak metastazı olmayan
M1	Uzak metastazı olan

**Tablo 2.2.** (Devam) TNM Sınıflandırmasında yer alan kriterler (63).

<b>Evre (TNM)</b>	
0	Karsinoma in situ - <b>Tis, N0, M0</b>
I	Muskularis propriaya kadar yayılım - <b>T1,T2, N0, M0</b>
II	Tüm barsak duvarı tutulumu - <b>T3,T4, N0, M0</b>
III	Lenf nodu metastazı - <b>T, N1,N2,N3, M0</b>
IV	Uzak metastaz varlığı - <b>T, N, M1</b>

Kolorektal kanser tedavisinde; birinci ve ikinci evre kolon kanserleri için cerrahi müdahale, üçüncü evre için takiben adjuvan kemoterapi ve metastaz durumunda tek başına veya hedefli biyolojiklerle kombinasyon halinde sistemik kemoterapi uygulanmaktadır. Rektal kanser tedavisi için, ilk evre hastaların tedavisinde ameliyat ve kısa süreli radyoterapi veya cerrahi rezeksiyonlu kemoradyoterapi, ikinci ve üçüncü evre hastalarda ise adjuvan kemoterapi uygulanmaktadır (65).

#### **Adjuvan tedavi ve 5-florourasil**

Kolorektal kanser tedavisinde; 5-florourasil, oksaliptin gibi ilaç kombinasyonlarının (FOLFOX, FOLFIRI) kullanıldığı adjuvan tedavi; büyüme faktörleri, monoklonal antikörlerin yer aldığı hedefe yönelik tedavi seçenekleri bulunmaktadır (66, 67). Yaklaşık 40 yıl önce kolorektal kanser kemoterapisinde temel unsur olarak tanımlan ve halen sistemik tedavinin temel taşı, bir florlu pirimidin türevi olan olan 5 – florourasil, pirimidin nükleotid sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan timidilat sentez enzim inhibisyonu ve kanser hücrelerinin DNA ve RNA'larına katılarak da sitotoksik etki oluşturmak yoluyla etki göstermektedir. Kolon kanserinde karaciğer metastaz insidansını azaltmak amacıyla 5-florourasilin yer aldığı postoperatif dönemde uygulanmış klinik denemelerde hastaların sağ kalımını orta düzeyde iyileştirdiği görülmüştür (66, 68).

Tedavide bir immün sistem düzenleyici olan levamizol, sınıf I insan lökosit antijenini arttırarak ve lökoverin ise enzim ile 5-florourasil etkileşimini stabilize ederek kombinasyonları halinde kullanıldığında 3. evre kolon kanseri ve 2/3. evre

rektal kanser hastalarının sağ kalımlarını arttırmaktadır (28, 64, 69). Ayrıca, tedavi etkinliği açısından fluorourasilin lökovorin ile kombinasyon halinde 6 ay süre ile kullanılmasının levamizol ile kombinasyon halinde 12 ay boyunca kullanılmasıyla eşdeğer olduğu belirlenmiştir. İlacın oral uygulamalarında ise, dihidropirimidin dehidrogenaz (DPD) enziminin farklı mukozal konsantrasyonlarından kaynaklanan düzensiz intestinal absorpsiyon problemi ilacın DPD tarafından katabolize edilmeyen öncü ilaç formları veya ilacın DPD inhibitörleri ile birlikte kullanımıyla çözülmüştür. Kapesitabin ve Tegafur urasil ilacın oral formları olan ve bolus uygulamalarına benzer toksikolojik profildeki örnekleridir (66). Fluorourasilin farklı ilaç uygulamalarına göre yan etki profili değişmektedir. Fluorourasil ve lökovorin birlikte bolus olarak 5 gün ile 5 hafta süre ile uygulandığında en sık görülen yan etkisi nötropeni ve stomatit iken, 6 – 8. haftalarda diyare görülme sıklığı artmakta, infüzyon şeklinde ise el ve ayaklarda eritematöz döküntüler görülmektedir (64).

Uzun süredir kolorektal kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan 5 - fluorourasilin kullanımı, gelişen ilaç direncine bağlı olarak ortaya çıkan kolorektal kanser hastalarındaki tedavi yanıtının azalması nedeniyle sınırlıdır. Cerrahi müdahale ve kemoterapi tedavisi ile hastaların yaklaşık %75'inde iyileşme sağlanırken, %30'undan fazlasında yeniden neoplastik polip gelişimi gözlenmektedir. Metastatik kolon kanseri hastalarında ise, kötü prognoz nedeniyle 5 yıllık sağ kalım oranı %10'un altındadır. Uygulanan kemoterapötik tedavi rejimi kaynaklı ilaç direnci nedeniyle tümörün yeniden gelişimi ve ilerlemesi, kemoterapötik ilaçların sadece kanser hücrelerinde değil normal hücrelerde (kemik iliği, barsak kriptleri) de apoptoz veya hücre siklusunu durdurma gibi mekanizmalarla hücre hasar oluşturması farklı tedavi prensiplerinin geliştirilmesine duyulan ihtiyacı arttırmıştır (5).

İlaç direnci gelişimine çeşitli mekanizmalar neden olmaktadır. Timidilatın timidin kinazın etkisiyle timidinden ayrılması veya timidilat sentaz gen ekspresyonundaki mutasyonlar timidilat sentaz ekspresyonundaki artış yoluyla 5-fluorourasile karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır. Dihidropirimidin dehidrogenaz enzim aktivitesindeki artış 5-fluorourasil katabolizmasında rol aldığı için direnç mekanizmasında yer almaktadır. Ayrıca, mikrosatellit instabilitesinin görüldüğü tümör hücrelerinin de 5-fluorourasile daha dirençli olduğu bilinmektedir

(68). Bunların yanında, kemokin ligand 13 ekspresyonundaki artışın (70), membran transporter proteinlerinin (ABC (*Adenozin Trifosfat-Binding Casette*) proteinleri ve SLC (*Solute carrier*) proteinleri)) yüksek düzeyde ekspresyonunun, apoptoz ve programlanmış hücre ölüm mekanizmalarının inhibisyonunun (71), Bcl-2 (B hücre lenfoma-2) ; Bcl-XL ( B hücre lenfoma-XL) genlerinin aşırı ekspresyonu ve ilaç hedef bölgelerinin mutasyonunun (68) ilaç direncinde rol aldığı görülmüştür.

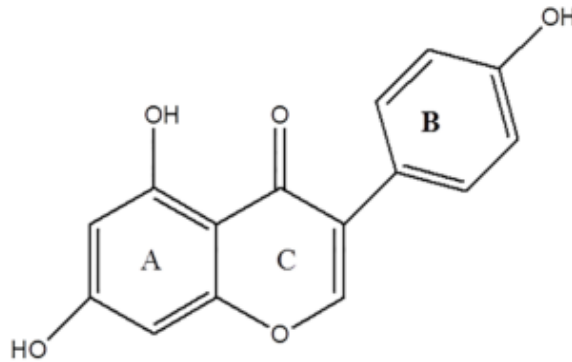
Kombine tedavi prensibiyle tek tek kullanımlarındaki etkin tedavi dozunun azaltılarak kemoterapide uygulanan ilaçların ölümcül olabilecek toksik sonuçlarının iyileştirilmesi, farklı mekanizmaların bir araya gelmesi ve farklı hedef bölgeleriyle etkileşim sonucu çoklu ilaç direncinin baskılanması, sinerjistik antikanser etki elde etmek adına nontoksik maddelerin tedavi rejimine dahil edilmesi ve bu tedavinin validasyonu önemlidir (72-76). Bu konuda literatürde 5-florourasilin yer aldığı in vitro ve in vivo çalışmalar mevcuttur. Wang ve ark. tarafından yapılmış in vivo ve in vitro bir çalışmada 5-florourasilin salinomisin ile kombinasyon halinde hepatoselüler karsinoma hücrelerinde sinerjistik antikanser etki gösterdiği belirlenmiştir (77). Başka bir çalışmada, düşük molekül ağırlıklı bir polipeptid olan tiroservatid'in 5-florourasil dirençli insan hepatoselüler hücrelerinde (BEL-7402) çoklu ilaç direnci gen (MDR1) ekspresyonunu azaltarak ilaç direncini azalttığı belirlenmiştir (78). Direnç gelişiminde rol alan Bcl-XL gen ekspresyonunu azaltmanın da ilaç direnci problemi için alternatif çözüm olabileceği görülmüştür (79). Gastrik karsinoma hastalarında yapılan bir çalışmada ise, paklitaksel, 5-florourasil ve sisplatin içeren tedavi rejiminin cerrahi müdahale öncesi faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır (80). Metforminin de meme kanseri kök hücrelerinde ATP üretimini engelleyerek hücreleri 5-florourasil, epirubisin ve siklofosfamid kombinasyon kemoterapisine duyarlı hale getirdiği tespit edilmiştir (81).

Kemoterapide görülen ilaç direnci problemine çözüm bulmak adına; fitoöstrojenik özelliği olan, soya fasulyesinde zengin diyet özelliğine bağlı düşük kolorektal kanser insidansı bulunan Asya diyetinden yola çıkılarak seçilmiş, antikanser ilaç potansiyeli bilinen genistein (82) ile sadece tümör hücrelerinde etki göstererek hedefli tedaviye olanak sağlayan TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) (83) potansiyel kombinasyon ajanlarındandır.

## 2.3. Genistein

### 2.3.1. Genisteinin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Genistein (5,7-dihidroksi-3-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on) ilk olarak *Genista tinctoria* L. 'dan izole edilmiştir ve Leguminosae familyası bitkilerinde, özellikle soya fasulyesinde, bol miktarda bulunmaktadır. Genistein, 3-fenilkromen-4-on iki halkalı çekirdek yapı (A-B) ve bu halkalara bağlı piran halkasından (C) oluşan 15 karbonlu iskelet yapısına sahip (Şekil 2.5.) izoflavonoid yapısında bir bileşiktir. Kimyasal yapısı östradiola benzemekte ve fitoöstrojenik etkinlik göstermektedir. Aseton, dimetilsülfoksit gibi polar çözücülerde çözünürlüğü iyi olmakla birlikte sudaki çözünürlüğü iyi değildir (11, 84, 85).



Şekil 2.5. Genisteinin kimyasal yapısı (85).

### 2.3.2. Genisteinin Biyolojik Etkileri

Vücutta dihidrojenistein ve 6 – hidroksi – O - desmetilangolensin bileşiklerine metabolize edilen genistein başlıca östrojenik etkisiyle bilinmektedir (86). Bu etkisinin yanında kardiyovasküler hastalık insidansının azalmasına, post-menopozal problemlerin iyileştirilmesine ve osteoporozun önlenmesine katkı sağlayabileceği ileri sürülmüştür (87). Soya fasulyesi tüketiminin azalan kanser insidansı ile ilişkili olduğunu gösteren epidemiyolojik çalışmalar nedeniyle genistein antikanser etkisiyle de dikkat çekmiştir (11, 88). Genistein doksorubisin, paklitaksel, sisplatin gibi ilaçların hücre büyümesi inhibisyonu ve apoptotik etkilerini arttırmıştır (87).

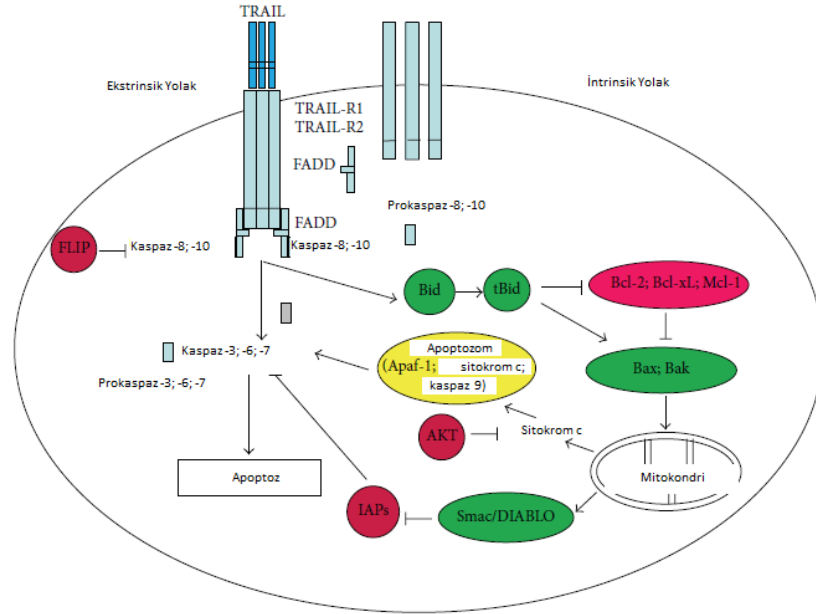
Genisteinin, Akt (protein kinaz B) ve Nf-κB (nükleer faktör κB) gibi hücre bölünmesi ve hücre ölümü mekanizmalarında görev alan proteinleri etkileyebileceği,

hücre canlılığında önemli olan Akt ve Nf- $\kappa$ B sinyalizasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (86, 89). Hücre siklusunun düzenlenmesinde görevli siklin bağımlı kinazları (Cdk) etkileyerek kanser hücrelerinin G2/M fazında birikimine neden olmaktadır (89). Genistein fitoöstrojen olarak da bilinmekte ve 17- $\beta$  östradiol ile yarışarak hücrede doza bağlı östrojenik ( $\leq 1 \mu\text{M}$ ) ya da antiöstrojenik ( $\geq 5 \mu\text{M}$ ) aktivite göstermektedir (86). Yapılan çalışmalarda bu etkinin Alzheimer hastalığı (90), endometriyum kanseri (91) ve meme kanseri (92) tedavisinde faydalı olabileceği görülmüştür. Kanser metastazı ve anjiogenezinde yer alan VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü), matriks metalloproteinazlardan (MMP) MMP-2 ve MMP-9'un; hücre migrasyonunda görevli FAK (fokal adezyon kinaz) proteininin genistein tarafından inhibe edildiği; apoptotik yolaktaki proapoptotik kaspaz-3, kaspaz-9 ve Bax protein ekspresyonlarının genistein tarafından indüklendiği tespit edilmiştir (93, 94).

Genisteinin TRAIL ligandının indüklediği apoptozu arttırdığına dair veriler de bulunmaktadır. Genistein ve TRAIL kombinasyon etkilerinin AGS gastrik adenokarsinom hücrelerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada bu kombinasyonun DR5 (Hücre ölüm reseptörü 5) ekspresyonunu artırarak, insan hepatom hücrelerinde (HepG2 (İnsan hepatoselüler karsinom hücre hattı), Hep3B (İnsan karaciğer kanseri hücre hattı), SNU-423 (İnsan karaciğer kanseri hücre hattı), SNU-449 (İnsan karaciğer kanseri hücre hattı)) ise Bid (BH3 etkileşimli ölüm agonisti) bölünmesi ve p38- $\beta$  mitojen aktive protein kinaz inhibisyonu (Hep3B) aracılığıyla apoptozu indüklediği sonucuna varılmıştır (95-97). Genisteinin HeLa hücrelerinde, tirozin kinazı inhibe ederek Bcl-2 indüksiyonu yapan ERK1/2 (hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz)'yi inhibe ettiği ve apoptozu arttırdığı belirlenmiştir (98, 99). Başka bir çalışmada ise Indol-3 karbinol ve genistein TRAIL ile kombine edildiğinde DR4 (Hücre Ölüm Reseptörü 4) – DR5, bölünmüş kaspaz-3, kaspaz-8 ve PARP (poli (ADP-riboz) polimeraz) ekspresyonlarındaki artışa bağlı olarak apoptoz üzerinde sinerjistik etki göstermişlerdir (10). İnsan akciğer adenokarsinom (A549) (100), insan pankreas kanseri (AsPC-1) hücrelerinde ve glioblastoma hücrelerinde (101) de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

#### **2.4. Tümör Nekroz Faktör (TNF) Reseptörü, Fas ligandı, TNF-ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) ve Kolorektal Kanser**

İntrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki farklı sinyal yolağı üzerinden gerçekleşen apoptoz mekanizmasında; intrinsik yolak mitokondri kaynaklı hücre içi sinyalizasyonu aracılığıyla gerçekleşirken, ekstrinsik yolak ise hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar (Tümör Nekroz Faktör (TNF) Reseptörü, Fas ligandı, TNF-ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) reseptörü) aracılığıyla gerçekleşmektedir (102, 103). Konvansiyonel kemoterapi aracılığıyla intrinsik yolağın aktivasyonu; p53 proteinindeki post-translasyonel modifikasyonlar ve p53 hedef genlerindeki epigenetik değişiklikler gibi faktörler nedeniyle başarısız olmaktadır (104, 105). Bununla birlikte ekstrinsik yolağın normal hücrelere sitotoksik etki göstermeyen TRAIL ligandı (normal hücrelerdeki tuzak reseptörlerin fazla olması nedeniyle) aracılığıyla indüksiyonu kanser tedavisinde potansiyel bir alternatif olarak dikkat çekmiştir (103, 106). TRAIL ya da diğer adıyla Apo2L ligandı TNF süper ailesine ait 281 aminoasitlik transmembran proteinidir (105, 107). TRAIL ligandı DR4 ve DR5 ölüm reseptörleri üzerinden apoptoza aracılık ederken DcR1 (Tuzak Reseptörü 1), DcR2 (Tuzak Reseptörü 2) ve osteoprotegerin antagonistik reseptörler üzerinden de etki gösterebilmektedir (108). Ölüm reseptörlerinin TRAIL ile indüksiyonu kaspaz - 8 ve FADD (Fas ile ilişkili ölüm bölgesi) aracılığıyla DISC (ölüm indükleyici sinyal kompleksi)' in oluşmasına, devamında aktive olan kaspaz – 3, 6 ve 7 aracılığıyla da apoptoza yol açmaktadır (105). Ayrıca, kaspaz – 8'in rol aldığı Bid'in bölünmesi ve tBid'in mitokondri üzerinde proapoptotik Bax (Bcl-2 ilişkili X geni) ve Bak (Bcl-2 Antagonist/Öldürücü gen) ile etkileşimi aracılığıyla da apoptoz gerçekleşmektedir. Bu yolak apoptoz inhibitör proteinleri (IAP) tarafından inhibe edilebilmektedir (Şekil 2.6.) (109).



**Şekil 2.6.** TRAIL apoptoz mekanizması (109).

TRAIL ligandı aracılı kanser tedavi yaklaşımı için yapılan in vitro ve in vivo deney sonuçları (110-114) umut vadeci olmakla birlikte çeşitli kanser hücrelerinin TRAIL tarafından indüklenen apoptoza karşı direnç kazanabildiği de belirlenmiştir (108). Kanser hücrelerinin direnç kazanmasında, hücre yüzeyinde bulunan DR4/DR5 reseptörlerinin oranı ile DcR1 ve DcR2 reseptörleri varlığının, bununla birlikte TRAIL ligandının hücre membranına bağlanmasından sonraki aşamada reseptörlerin hücre içinde yeniden dağılımının etkili olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (107, 115, 116). Kanser hücrelerindeki Fas promotör bölgesinin metilasyonu, DR4-DR5 reseptörlerinin mutasyonu, başlatıcı kaspazların (kaspaz -8, 10) downregülasyonu, aktif kaspaz - 8'in CARP (Kardiyak Adriyaminin Duyarlı Protein) bağımlı degradasyonu, FLICE inhibitör proteinin ekspresyonu, DNA yanlış eşleşme onarımı (MMR) yetersiz hücrelerdeki Bax mutasyonu, survivin ve apoptoz inhibitör proteinlerin (IAP) ekspresyonu da TRAIL direncinin gelişmesine yol açan mekanizmalardandır (107, 115).

TRAIL direncine sahip kanser hücrelerinin, TRAIL ve kemoterapötik / fitoterapötik ilaçlarla yapılan in vitro kombinasyon uygulamalarında TRAIL aracılı apoptoza duyarlı hale geldiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (106, 117-120). Bu kombinasyon stratejilerinden histon deasetilaz inhibitörleriyle yapılan



kombinasyonlarda DR4, DR5 ve Bcl-2 upregulasyonu, kaspaz-3, 8, 9 aktivasyonu aracılığıyla sinerjistik apoptoz yanıtı sağlanmaktadır. Protein degradasyonu ile apoptoza neden olan proteozom inhibitörleri de DR4, DR5 yüzey ekspresyonlarını arttırarak hücreyi TRAIL ligandı aracılı apoptoza duyarlı hale getirmektedir (121). TRAIL ligandının rapamisin gibi başka ilaçlarla kombinasyonu yapılarak da TRAIL dirençli hücrelerin apoptoza duyarlılığının arttırılabileceği görülmüştür (122). Isı şoku proteinleri (HSP) inhibitörleriyle TRAIL kombinasyonu, tümör hücrelerinin canlılığının sürdürülmesinde rolü olan HSP90 gibi proteinlerin inhibisyonunu sağlayarak (123) veya epidermal büyüme faktörü reseptör antagonistlerinden genistein gibi maddelerle kombinasyon sonucu AKT yolağının aktivasyonu azaltılarak hücrelerin TRAIL ligandı aracılı apoptoza duyarlı hale geldiği belirlenmiştir (124).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

$\beta$ – merkaptoetanol	Amresco
Akım Sitometrisi Annexin V Apoptoz Tayin Kiti	BD Pharmamingen
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma -Aldrich
Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA)	Boehringer
	Mannheim
Dulbecco's Erime Noktalı Agar (DMEM)	Wisent
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Ca&amp;Mg</i> (DPBS)	Wisent
Etidyum Bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich
Etil Alkol	Sigma -Aldrich
Etilen Diamin Tetraasetik Asit, Disodyum Tuzu (Na <sub>2</sub> EDTA)	Merck
Fetal Sığır Serumu ( <i>Fetal Bovine Serum</i> , FBS)	Capricorn
Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS) tablet	Sigma
5 - florourasil	Sigma -Aldrich
Genistein	LKS
Hidrojen Peroksit (%30)	Merck
Hidroklorik Asit (%37)	Sigma
İnsan TNF-Related Apoptoz - İndükleyici Ligand	Cell Applications
JC-1 Mitokondriyal Membran Potansiyeli Ölçüm Kiti	Cayman
Kaspaz 3, 8 ve 9 Çoklu Aktivite Tayin Kiti	Abcam
L - glutamin	Wisent
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)	Sigma
N-Lauril Sarkosinat Sodyum Tuzu	Sigma
Normal Erime Noktalı Agar (NMPA)	Sigma
Penisilin-Streptomisin Çözeltilisi	Wisent
Reaktif Oksijen Türleri (ROS) tayin kiti	Biovision
Sığır serum albumini	Capricorn
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma

SW480 (insan kolon adenokarsinoma) hücre hattı	American Type Cultre Collection
SW620 (insan kolon adenokarsinoma) hücre hattı	American Type Cultre Collection
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen
RT <sup>2</sup> First Strand Kit	Qiagen
RT <sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix - 2	Qiagen
RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay	Qiagen
Tripan Mavisi	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
Tris	Sigma
Triton x-100	Sigma

### 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Akım Sitometri Cihazı	Beckman Coulter EPICS XLMCL
Akım Sitometri Yazılım Programı	Phoenix System
Biyogüvenlik Kabini	Holten
Buzdolabı	Hotpoint
Comet Bilgisayarlı Görüntüleme Sistemi	Comet Analysis Software, version 3.0 Kinetic Imaging
Derin Dondurucu (-20°C)	Ariston
Derin Dondurucu (-80°C)	Revco
Distile Su Cihazı	MES ultrapure
Elektroforez	Biometra Analitik
Elektroforez Güç Kaynağı	Power Pack P 25
Etüv	Dedeoğlu
Floresan Mikroskop	Leica
Hücre Kültürü Uyumlu Flask (25/75 cm <sup>2</sup> )	Nest
Hücre Kültür Plağı (6/12/96-kuyucuklu)	Corning
Pipet (1- 25 mL)	Nest

Santrifüj Tüpü (15, 50 mL)	Nest
Isıtıcı	Multi-Blok, Lab-Line
Inverted Mikroskop	Leica
İnkübatör (CO <sub>2</sub> 'li)	Heraeus Instruments
Kapaklı tüpler (0,1 mL)	Qiagen
Karıştırıcı-Isıtıcı	Jankel&Kunkel, Ikamag
Kırık Buz Makinası	Scotsman AF100
Lam (26x76 mm)	Marienfeld
Lamel (24x60 mm)	Marienfeld
Laminar Flow	Heraeus
Mikrodalga Fırın	Vestel
Mikropipet (8 kanallı)	Eppendorf, Capp
Mikropipetler (0,5-1 µL, 1-5 µL, 5-10 µL, 10-200 µL, 200-1000 µL, 1-5 mL)	Finnpipette, Discovery Confort
Mikrosantrifüj	Hettich Micro 12-24
Mikrosantrifüj tüpü (1,5 mL)	Eppendorf
Nanodrop Cihazı	Maestrogen Spectrophotometer
Neubauer Camı (Hücre sayım camı)	Marienfeld
Otoklav	Nüve
Örnek Tüpleri (2 mL)	Qiagen
PCR Tüpleri (0,2 mL)	Qiagen
PCR Veri Analiz Programı	QIAGEN Analytics Software
pH metre	Cyberscan
Pipet ucu (0,5-10, 10-200, 100-1000 µL'lik)	HTL
Propidyum iyodür (PI)	Sigma Aldrich
Real Time PCR Cihazı	Corbett
Santrifüj	Heraeus, Hettich
Sisplatin	Koçak Farma®
Spektrofotometre	SpektraMax M2
Su Banyosu	Termal® Laboratory Tools
Terazi	Schimadzu Libror
Vakum Pompası	Welch Vacuum

Vorteks

Heidolph Reax 2000

Yatay çalkalayıcı

Edmund Bühler

### 3.3. Kullanılan Çözeltiler

#### 3.3.1. Çalışılan Etkin Madde Çözeltileri

##### 1 mM Genistein Çözeltisi

Genistein belirli miktarda tartılarak dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülüp çalışmada kullanılacak en yüksek DMSO konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde besiyeri ile son hacme tamamlandı. Analiz günü, ana stok çözeltisi taze hazırlandı.

##### 50 µM Genistein Çözeltisi

1 mM genistein ana stok olarak hazırlandı. Ana stoktan 50 µL alınıp besiyeri ile 5 mL'ye tamamlandı. Analiz günü taze olarak hazırlanan ara stok çözeltilerden gerekli derişimlerde hazırlanarak hücrelere uygulandı.

##### 1 mM 5 - florourasil Çözeltisi

5 - florourasil belirli miktarda tartılarak dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülüp en yüksek DMSO konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde besiyeri ile son hacme tamamlandı. Analiz günü, ana stok çözeltisi taze hazırlandı.

##### 50 µM 5 - florourasil Çözeltisi

1 mM 5-florourasil ana stok olarak hazırlandı. Ana stoktan 50 µL alınıp kültür vasatı ile 5 mL'ye tamamlandı. Analiz günü taze olarak hazırlanan ara stok çözelti kullanılarak gerekli derişimlerde hazırlanarak hücrelere uygulandı.

##### 20 ng/mL TRAIL Çözeltisi

Viyal açılmadan önce santrifüj edildi ve liyofilize tozun steril su ile 0,1 mg/mL (100000 ng/mL) konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı. Uzun süre kullanım için %0,1 sığır serum albümini (BSA) eklendi. Hazırlanan çözelti alikotlar halinde – 20 °C'de saklandı ve deney günü çözdürülerek kullanıldı. Ana stoktan 4 µL alınıp 20 mL'ye tamamlanarak hazırlanan 20 ng/mL'lik ara stok kullanıldı.

#### Hücreler ve Hücre Kültür Ortamı

SW480 (insan kolorektal adenokarsinom) hücre hattı Dr. Serkan İsmail Göktuna (Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bilkent Üniversitesi, Türkiye)'dan temin edildi. SW620 (metastatik insan kolorektal adenokarsinom) hücre hattı (ATCC® CCL-227) ATCC'den sağlandı.

Hücreler, %1 penisilin-streptomisin (Wisent) ve %10 fetal sığır serumu (FBS - Capricorn) içeren DMEM (Wisent) besiyerinde, 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarında çoğaltıldı. Hazırlanan besiyeri +4°C’de saklandı.

### **3.3.2. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)**

#### **Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

#### **3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Çözeltisi**

10 mL Dulbecco’s Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik içersinde çözülen 50 mg MTT sitotoksitate değerlendirmesinde kullanıldı. Hazırlanan MTT çözeltisi membran filtreden steril ve ışık geçirmeyen bir tüpe süzüldü. Hazırlanan MTT çözeltisi 4°C’de ve ışıktan korunarak muhafaza edildi (Uzun süre saklanması için gerekli olduğu durumlarda -20°C’de saklanabilir).

#### **Çözme Çözeltisi**

Dimetil sülfoksit (DMSO)

#### **100 µM Sisplatin Çözeltisi**

10 mg/20 mL konsantrasyonundaki enjeksiyonluk sisplatin preparatından 600,6 µL alınarak son hacmi besiyeri ile 1 mL’ye tamamlandı. Elde edilen 1 mM’lık çözeltiden 100 µL alınarak besiyeri ile son hacim 1 mL’ye tamamlandı.

### **3.3.3. Tek Hücre Jel Elektrofrez (COMET) Yöntemi ile Genotoksitate Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

#### **200 mM Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit (Na<sub>2</sub>EDTA) Çözeltisi**

14,89 g Na<sub>2</sub>EDTA 200 mL distile suda çözülerek pH 10’a ayarlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

#### **Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA) Çözeltisi**

312,5 mg LMPA 25 mL PBS içerisinde ve sıcak su banyosu kullanılarak çözüldü. Hazırlanan çözelti küçük hacimler halinde buzdolabında saklandı.

#### **Elektrofrez Tampon Çözeltisi**

Deney günü taze olarak, 52,8 mL 10 N NaOH ve 8,8 mL 200 mM EDTA 1705 mL soğuk distile su içerisinde çözülerek tampon çözelti hazırlandı.

#### **Etanol Çözeltisi (%50)**

%99,8’lik mutlak etanol çözeltisinden 150,3 mL alınarak distile suyla son hacim 300 mL’ye tamamlandı.

### **Etanol Çözeltisi (%75)**

%99,8'lik mutlak etanol çözeltisinden 225,5 mL alınarak distile suyla son hacim 300 mL'ye tamamlandı.

### **Etidiyum Bromür (EtBr) Çözeltisi**

10 mg EtBr 50 mL distile suda çözüldü ve 200 µg/mL'lik stok EtBr çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiden 1 mL alınıp, distile suyla 10 mL'ye tamamlanarak 20 µg/mL'lik EtBr çözeltisi boyama sırasında hazırlandı. Elde edilen EtBr çözeltisi oda sıcaklığında saklandı.

### **Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS)**

1 PBS tableti 200 mL distile suda çözüldü. 4 °C'de saklandı.

### **Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Çözeltisi**

%30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinden 11,3 µL alındı, 988,7 µl distile su ile 1 mL'ye tamamlanarak 0,1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi elde edildi. Çözeltiden (1 hafta süresince 4°C'de saklanabilir) deney günü 20 µl alınıp 1980 µl PBS ilave edilerek 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi hazırlandı. Daha sonra, 15 µL 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üzerine 985 µL PBS ilave edilerek 15 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi hazırlandı.

### **10 N NaOH**

200 g NaOH 500 mL distile suda çözüldü. Oda sıcaklığında saklandı.

### **Normal Erime Noktalı Agar (NMPA) Çözeltisi**

50 mL PBS içerisinde 625 mg NMPA sıcak su banyosu kullanılarak çözüldü. Hazırlanan çözelti küçük hacimler halinde 4°C'de saklandı.

### **Nötralizasyon Tampon Çözeltisi**

48,5 mg Tris 750 mL distile suda çözüldükten sonra çözelti pH'sı 7,5'a ayarlandı. Hazırlanan çözeltinin son hacmi distile su ile 750 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

### **Stok Lizis Çözeltisi**

146,1 g NaCl, 37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA ve 1,2 g Tris 500 mL distile su içerisinde çözüldü. Çözeltiye 10 g NaOH eklenip pH'sı 10'a ayarlandıktan sonra 10 g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklendi. Çözelti hacmi distile su ile 890 mL'ye tamamlandı homojen karışım elde edinceye kadar karıştırılarak stok lizis çözeltisi hazırlandı. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

### **Lizis Çözeltisi**

178 mL stok lizis çözeltisi 2 mL Triton X-100 ve 20 mL DMSO ile karıştırılarak deney günü taze olarak hazırlandı. Deney sırasında soğuk çözelti kullanılacağı için çözelti kullanılma zamanına kadar 4°C'de bekletildi.

### **3.3.4. Hücre Yüzey Reseptör Proteinleri DR4 ve DR5'in Yüzey Ekspresyon Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Hücre Boyama Tamponu**

Hazır olarak bulunmaktadır.

#### **%4 Paraformaldehit İçeren PBS Çözeltisi**

4 mL paraformaldehit çözeltisi PBS ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmaktadır.

### **3.3.5. Hücre Siklusu Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Propidyum iyodür (PI) hazırlanması**

50 mg PI 100 mL distile su içinde magnetik karıştırıcıda 8-9 saat içinde karıştırılarak çözüldü. Şişe öncesinde alimünyum folyo ile ışıktan korunması için iyice sarıldı. Daha sonra filtreden süzülen çözelti +4 C°'de saklandı.

#### **RNaz Hazırlanması**

100 mg RNaz 100 mL distile su içinde karıştırılarak çözüldü. Enzim olduğu için küçük miktardaki 1,5 mL'lik eppendorf tüplere bölünerek -20 C° 'de saklandı.

### **3.3.6. Apoptoz Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

#### **FITC Annexin V**

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

#### **Propidyum İyodür**

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

#### **1X Annexin V Bağlayıcı Tampon**

Kit içerisine hazır olarak bulunan 10X Annexin Bağlayıcı Tampon 1/9 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlandı.

### **3.3.7. İntraselüler Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

#### **ROS Analiz Tamponu**

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.



### **ROS Label Çözeltisi (1000X)**

Stok çözelti 37 °C'ye ısıtılmış ROS analiz tamponu ile 1X çalışma konsantrasyonuna seyreltildi.

### **ROS İndükleyici Çözelti (250X)**

Stok çözelti 37 °C'ye ısıtılmış ROS analiz tamponu ile 1X çalışma konsantrasyonuna seyreltildi.

### **200 µM Tersiyer Bütil Hidrojen Peroksit Çözeltisi (TBHP)**

55 mM TBHP stok çözeltisinden fenol kırmızısı içermeyen besiyeri ile dilüe edilerek hazırlandı.

## **3.3.8 Mitokondriyal Membran Potansiyeli Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

### **Analiz Tamponu**

3 adet hücre analiz tamponu tabletleri 300 mL distile suda çözülerek hazırlandı.

### **JC-1 Boyama Çözeltisi**

Fenol kırmızısı içermeyen besiyeri ile 1/10 oranında seyreltilerek kullanıldı.

## **3.3.9. Kaspaz 3, 8 ve 9 Aktivitelerinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

### **Analiz Tamponu**

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

### **200X Kaspaz 3, 8, 9 substratları**

1:200 oranında analiz tamponu ile seyreltilerek hazırlandı.

## **3.3.10. RT-PCR Yönteminde Kullanılan Çözeltiler**

### **RNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler**

#### **Etanol Çözeltisi (%70)**

%99,8'lik mutlak etanol çözeltisinden 3,5 mL alındı, 5 mL'ye DNaz/RNaz içermeyen suyla tamamlanarak deney günü hazırlandı.

#### **RPE Tampon Çözeltisi**

Tampon çözelti kit içerisinde hazır halde yer alan RPE ve %70'lik etanol kullanılarak hazırlandı. 2 mL RPE üzerine 8 mL etanol çözeltisi (%99,8) eklenerek deney günü hazırlandı.

### **RLT + $\beta$ -merkaptoetanol Tampon Çözeltisi**

Kit içerisinde hazır halde yer alan RLT çözeltisi ve  $\beta$ -merkaptoetanol kullanılarak hazırlandı. 4 mL RLT çözeltisine 40  $\mu$ L  $\beta$ -merkaptoetanol eklenerek deney günü hazırlandı.

### **RW1 Yıkama Çözeltisi**

Kit içerisinde hazır halde bulunmaktadır.

### **cDNA Çevrilmesi İşleminde Kullanılan Çözeltiler**

#### **GE Tampon Çözeltisi**

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

#### **Ters Transkripsiyon Karışım Çözeltisi**

Kit içerisinde hazır olarak bulunan 5x BC3 tamponu, Kontrol P2, RE3 Ters Transkriptaz Karışımı, RNaz içermeyen su kullanılarak hazırlandı. 36  $\mu$ L 5x BC3 tamponu, 9  $\mu$ L Kontrol P2, 18  $\mu$ L RE3 Ters Transkriptaz Karışımı, 27  $\mu$ L RNaz içermeyen su eklenerek deney günü taze olarak hazırlandı.

### **Gen Ekspresyonunda Kullanılan Çözeltiler**

#### **SYBR Green Master Mix Çözeltisi**

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

#### **Bcl – xL, Bcl-2, XIAP, DR4, DR5, DcR1, DcR2 Primerleri**

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

### **3.4. Yöntemler**

#### **3.4.1. SW480 ve SW620 Hücre Hatlarında 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi**

1. SW480 ve SW620 hücreleri %10 DMSO içeren besiyeri ve -80°C koşullarında donmuş halde muhafaza edilmiştir. Planlanan deney basamaklarını yürütmek amacıyla başlangıçta donmuş halde bulunan hücrelerin 37°C'lik su banyosunda 1 dakika süre ile bekletilmesiyle oda sıcaklığına getirilmesi sağlandı. Hücre kültürü basamakları hücre kültür kabini içerisinde ve steril koşullarda gerçekleştirildi.

2. 1 mL hacmindeki çözdürülen hücreler steril bir tüp içerisinde 1 mL hücre ve 9 mL besiyeri olacak şekilde karıştırıldıktan sonra 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanarak süpernatant kısmı atıldı. Hücre dondurma karışımındaki DMSO'nun uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla santrifüjleme işlemi uygulanmıştır.

3. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra tüp içinde kalan hücre pelleti, gerekli hacimlerdeki besiyeri ile karıştırılarak 25 cm<sup>2</sup> 'lik yatay kültür kapları içerisine aktarıldı.
4. Besiyeri içindeki hücrelerin belirli aralıklarla hücre besiyeri değiştirilerek inkübatör içerisinde yeterli doygunluğa ulaşmaları sağlandı.
5. Deney için yeterli hale gelen hücreler 5 mL 37°C'lik PBS ile 2-3 kez yıkandı.
6. Kültür ortamındaki hücrelere 2 mL Tripsin-EDTA çözeltisi ilave edildikten sonra hücreler 3-5 dakika süreyle inkübatörde bekletildi. Böylece, kültür kabının zemininden uzaklaşmaları sağlanan hücrelerin üzerine 4 mL besiyeri ilave edildi ve hücre karışımı steril bir tüpe aktarıldı.
7. Süpernatant kısmı uzaklaştırmak amacıyla hücre süspansiyonu 25°C'de 1200 devir/dakika hızda 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Tüpte kalan hücre pelleti 2 mL besiyeri ile süspande edildi.
8. Hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak hücre sayısını belirlemek amacıyla steril ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 90 µL tripan mavisi çözeltisi (% 0,4) eklenerek süspande edildi.
9. 10 µL hacimdeki hücre süspansiyonu Neubauer hücre sayım lamı (hemasitometre) üzerinde incelendi. Neubauer sayım lamının dört karelik alanı içindeki parlak ve renksiz olarak görülen hücreler (canlı hücreler) kenar çizgileri üzerindeki hücreler hariç olmak üzere soldan sağa ve yukarıdan aşağıya gidilerek sayıldı. İdeal olarak her işlemde 200 ve üzeri hücre sayılarak hücre sayımının doğru ve kesin bir şekilde yapılabilmesi sağlandı. Canlı hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki Formül 3.1. kullanıldı:

$$\text{mL'deki canlı hücre sayısı} = \frac{\text{Toplam hücre sayısı}}{4} \times 10.000 \times 10 \quad (3.1.)$$

10. Hücre süspansiyonu hesaplanan canlı hücre konsantrasyonuna göre yeterli miktarda besiyeri ile seyreltilerek hazırlandı.

11. Hücre ekimi 96 kuyucuklu plağa her bir kuyucukta (200 µL hacim) 10000 hücre olacak şekilde yapıldı.
12. Hücre ekiminden sonra hücrelerin kuyucuklar içinde tutularak çoğalmaları için 24 saat inkübasyon uygulandı.
13. Steril koşullarda besiyerinin uzaklaştırılmasının ardından, hücreler genistein (LKS) (5 –200 µM), 5 – florourasil (Sigma – Aldrich) (5 – 800 µM) ve TRAIL (Cell Applications) (50 – 200 ng/mL) ile 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir.
14. Hücreler negatif kontrol ve pozitif kontrol olarak sırasıyla %0,5 DMSO içeren besiyeri ve 100 µM sisplatin içeren besiyeri ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi.
15. İnkübasyon süresi tamamlandığında deney maddelerini içeren besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 90 µl hücre kültür ortamı ve hazırlanan 5 mg/mL MTT çözeltisinden 10 µL eklenerek 4 saat inkübe edildi.
16. İnkübasyon süresinin ardından MTT çözeltisi uzaklaştırıldı. MTT varlığında kuyucuklarda meydana gelen formazan kristallerini çözmek amacıyla her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklendi. Yatay çalkalayıcıda plak 1-2 dakika süreyle çalkalandı.
17. Örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede 570 nm’de ölçüldü.
18. MTT ışığa duyarlı olduğu için deneyin her aşamasının mümkün olduğunca karanlık ortamda yapılması sağlandı.
19. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL’in uygulanan konsantrasyonları için belirlenen absorbans değerlerinin kontrol absorbans değerlerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı ve IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.
20. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL’in ikili ve üçlü kombinasyonlar halindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla elde edilen sonuçlar CompuSyn software (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, USA) programıyla değerlendirildi. Kombinasyon indeksi (CI) olarak ifade edilen sonuçlara göre, CI < 1 değerler sinerjistik, CI > 1 değerler antagonistik, CI değeri 1’den istatistiksel anlamlı olarak farklı olmayanlar ise aditif etkileşimi göstermektedir.
21. Sinerjistik etkisi belirlenen genistein, 5-florourasil ve TRAIL’in ikili ve üçlü kombinasyonları seçildi. SW480 hücreleri için 1 µM genistein, 1 µM 5-florourasil, 10 ng/mL TRAIL konsantrasyonları; SW620 hücreleri için 0,5 µM genistein, 1 µM 5-florourasil, 5 ng/mL TRAIL konsantrasyonları ikili ve üçlü kombinasyonlar şeklinde

48 saat inkübasyon süresiyle ve MTT yöntemiyle sitotoksik etkileri yönünden değerlendirildi.

20. Çalışmalar üç kez tekrarlanan deney sonuçlarının ortalaması olarak ifade edildi.

### **3.4.2. SW480 ve SW620 Hücrelerinde Yenilenme (Recovery) 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi**

1. 3.4.1. başlığı altında anlatıldığı şekilde kültürü yapılan ve MTT yöntemine uygun şekilde ekilen hücreler 48 saat süreyle genistein (0,25 – 7,5  $\mu$ M), 5-florourasil (1  $\mu$ M) ve TRAIL (SW480 hücreleri için 10 ng/mL ve SW620 hücreleri için 5 ng/mL)'ın ikili ve üçlü kombinasyonlarına maruz bırakıldı.

2. İnkübasyon süresi sonunda hücreler Tripsin – EDTA ile plak kuyucuklarından toplanarak ve her bir inkübasyon grubu ayrı ayrı ependorflara alınarak hücre sayımı yapıldı.

3. Kuyucuk başına 20000 hücre olacak şekilde yeniden 96 kuyucuklu plaklara ekilen hücreler 48 saat süreyle besiyeri ortamında inkübasyona bırakıldı.

4. Hücrelerin madde inkübasyonu sonrasında test maddesiz ortamda kendilerini yenileme dereceleri MTT yöntemiyle değerlendirildi.

5. Çalışmalar üç kez tekrarlanan deney sonuçlarının ortalaması olarak ifade edildi.

### **3.4.3. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerindeki DNA Hasarına Etkilerinin Tek Hücre Jel Elektrofrez (COMET) Yöntemi ile İncelenmesi**

1. Hücreler sitotoksitenin değerlendirilmesi başlığında anlatıldığı gibi sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu plağa 15000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

2. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra genistein (0,25 – 7,5  $\mu$ M), 5-florourasil (1  $\mu$ M) ve TRAIL (SW480 hücreleri için 10 ng/mL ve SW620 hücreleri için 5 ng/mL)'ın ikili ve üçlü kombinasyonlarına 48 saat süreyle maruz bırakıldı.

3. Negatif kontrol olarak %0,5 DMSO ve pozitif kontrol olarak 15  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı.

4. İnkübasyon sonunda hücrelerin içinde buldukları besiyeri ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, 500  $\mu$ L PBS ile yıkama aşamasından sonra 20  $\mu$ L Tripsin – EDTA ile 5 dk inkübasyona bırakıldı. Üzerine 160  $\mu$ L besiyeri eklendikten sonra her bir gruba ait hücre süspansiyonları ependorflara aktarıldı. Ependorflar 1200 rpm'de 5

dk santrifüj edildikten sonra dipte 50 µL besiyeri bırakacak şekilde üst fazlar uzaklaştırıldı.

6. Hücre besiyerleri atıldıktan sonra son konsantrasyon 15 µM olacak şekilde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pozitif kontrol olarak uygulandı. Ependorflara 985 µL PBS ve 15 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) ilave edildikten sonra -20°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitiminde 1200 rpm'de 5 dk santrifüj uygulanarak PBS ile yıkama işlemi yapıldı.

7. 50 µL hücre süspansiyonu ile 37°C ± 0,5°C'de eritilmiş 100 µL %0,5'lik LMPA karıştırıldıktan sonra, önceden % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılarak kaplanmış haldeki lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldı.

8. Lamaların buzlu yüzey üzerinde 5 dakika bekletilmesiyle agarın katılaşması sağlandı ve lam üzerindeki lamel agarı zedelemekten alındı.

9. Lamalar buzdolabında soğutulmuş lizis çözeltisine daldırılıp en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi. Madde grupları ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan gruplar ayrı ayrı şalelerde 1 saat süreyle lizise bırakıldı.

10. Lizis süresi sonunda lam üzerindeki lameller alındı ve lamlar tanka dizildi.

11. Tank soğuk elektroforez çözeltisi ile doldurularak elektroforez işlemi uygulandı.

12. Lamelleri alınmış lamalar lizis işleminin ardından düzgün ve aralarında aralık kalmayacak şekilde agar yayılan kısımların üstte kalmasına dikkat edilerek elektroforez tankına yerleştirildi.

13. Lamalar akım uygulamadan 20 dakika süre ile elektroforez tankında bekletildi.

14. Bekleme süresinin ardından 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dakika süre ile elektroforez uygulandı.

15. Elektroforez işleminin ardından elektroforez tankından alınan lamalar 5 dakika distile suda, sonrasında 15 dakika nötralizasyon tampon çözeltisi içerisinde bekletildi.

16. Nötralizasyon tampon çözeltisindeki bekleme süresinin sonunda lamalar sırasıyla 5'er dakika %50'lik, %75'lik ve %99'lük etanol çözeltisinde tutuldu. Kurumaları için en az 1 gün bekletilerek okumaya hazır hale getirildi.

17. Okuma sırasında lamaların üzerine 60 µL 20 µg/mL etidiyum bromür çözeltisi ilave edildi.

18. Floresan mikroskopunda bilgisayar programı yardımıyla her lamda 100 hücre değerlendirildi. DNA hasar derecesi kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak belirlendi.

19. DNA hasarı değerlendirme basamakları ilave bir DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık ortam koşullarında gerçekleştirildi.

20. Çalışmalar üç kez tekrarlanarak sonuçlar bu tekrarların ortalaması şeklinde ifade edildi.

#### **3.4.4. Genistein ve 5-florourasil'in Hücre Yüzey Reseptör Proteinleri DR4 ve DR5'in Yüzey Ekspresyonları Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi**

1.  $5 \times 10^6$  hücre/25 cm<sup>2</sup> flask olacak şekilde hücre ekimi yapıldıktan sonra hücrelerin kültür ortamına uyum sağlamaları için 24 saat süreyle 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarında inkübasyon uygulandı. İnkübasyondan sonra genistein (SW480 hücreleri için 1 µM ve SW620 hücreleri için 0,5 µM), 5 – florourasil (1 µM) ve kombinasyonları ile 48 saat süreyle inkübe edildi. (Hücre sayısı en az  $1 \times 10^6$ /mL olmalı)

2. İnkübasyon sonunda hücreler tripsinlendi ve 15 mL'lik tüplerde 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı.

3. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra serumsuz besiyerinde 30 dk +4 °C'de bekletildi.

4. Besiyeri 1200 rpm 5 dk santrifüj yapılarak çöktürüldü.

5. 2 mL hücre boyama tamponu (cell staining buffer) ile 2 kez yıkama yapıldı.

6.  $5 \times 10^6$  hücre, 1530 µL hücre boyama tamponu eklenerek DR4, DR5 ve IgG2B (izotip kontrol) için tüp başına en az  $1 \times 10^6$ /500 µL hücre olacak şekilde üçe bölündü.

7. Her tüpe 10'ar µL antikor (fikoeritrin konjuge anti – insan DR4, DR5 ve IgG2B) eklenerek vortekslenildikten sonra karanlıkta 30 dakika +4 °C'de bekletildi.

8. 2 mL hücre boyama tamponu ile 2 kez yıkama yapıldı ve 1 mL hücre boyama tamponu içinde süspande edilerek okumaya hazır hale getirildi.

9. %4 paraformaldehit içeren PBS'den tüp başına 20 µL eklenerek fiksasyon yapıldı.

10. Akım sitometri cihazında değerlendirme yapıldı.

#### **3.4.5. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerinde Hücre Siklusu Üzerindeki Etkilerinin Akım Sitometrisi Cihazıyla Tayini**

1.  $2 \times 10^6$  hücre / 25 cm<sup>2</sup> flask olacak şekilde ekilen SW480 ve SW620 hücreleri 24 saat inkübasyon süresinden sonra genistein (0,5 – 1 µM), 5 – florourasil (1 µM) ve TRAIL (5 - 10 ng/mL), bu maddelerin ikili ve üçlü kombinasyonları ile 48 süre boyunca inkübe edildi.

2. 15 mL'lik tüplere aktarılan hücreler 1 mL PBS çözeltisi ile yıkayıp, 1 mL Tripsin – EDTA çözeltisi ile 3 dk inkübe edilerek tutundukları yüzeyden kaldırıldı.
3. Hücre süspansiyonu üzerine 3 mL besiyeri ilave edildikten sonra hücreler tüplere aktarıldı.
4. 1200 rpm ve 5 dk santrifüj uygulandıktan sonra üst faz uzaklaştırılıp hücreler 1 mL PBS içinde süspande edildi.
5. 1 mL soğuk etanol (%96) ilave edilerek fiksasyon yapıldı.
6. Akım sitometrisi cihazı ile hücreler incelendi.

#### **3.4.6. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin Akım Sitometrisi Cihazıyla Tayini**

1. SW480 ve SW620 hücreleri  $2 \times 10^6$  hücre/25 cm<sup>2</sup> flask olacak şekilde ekildikten sonra 24 saat süreyle inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrası hücrelerin genistein (0,5 – 1  $\mu$ M), 5 – florourasil (1  $\mu$ M) ve TRAIL (5 - 10 ng/mL), bu maddelerin ikili ve üçlü kombinasyonları ile 48 saat süreyle inkübasyonları sağlandı.
3. Hücreler inkübasyon sonunda 1'er mL PBS ile yıkandıktan sonra 3'er mL Accutase çözeltisi ilave edilerek tutundukları yüzeyden uzaklaştırıldı.
4. Hücrelerin üzerine 5 mL besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu santrifüj tüplerine alındı.
5. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj uygulanark 2 mL soğuk PBS çözeltisi ile yıkama işlemi uygulandı.
6. 1X Annexin V bağlayıcı tampon çözelti ilavesi ile  $1 \times 10^6$  hücre/mL olacak şekilde seyreltildi.
7. Süspansiyondan 100  $\mu$ L alınarak 5 mL'lik kültür tüplerine aktarıldı.
8. Üzerine her madde ilavesinden sonra vortekslenmek üzere 5  $\mu$ L FITC Annexin V çözeltisi ve 5  $\mu$ L PI ilave edildi.
9. Hücreler 15 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
10. Her tüpe 400  $\mu$ L 1X Annexin V bağlayıcı tampon çözeltisi ilave edildikten sonra akım sitometrisi cihazı ile analiz edildi.



### **3.4.7. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerindeki Reaktif Oksijen Türleri Üzerindeki Etkilerinin Tayini**

1.  $2,5 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekimi yapılan SW480 ve SW620 hücreleri 24 saat süreyle inkübe edildi.
2. Kültür besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 100  $\mu$ L ROS analiz tamponu ile yıkandı.
3. Hücreler 100  $\mu$ L ROS label çözeltisi ile 45 dakika, 37 °C ve karanlıkta inkübe edildi.
4. ROS label çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra 100  $\mu$ L fenol kırmızısı içermeyen besiyeri içinde test maddeleriyle inkübe edildi.
5. Test maddeleri ve kontrol grubu (genistein (0,5 – 1  $\mu$ M), 5 – florourasil (1  $\mu$ M) ve TRAIL (5 - 10 ng/mL), bu maddelerin ikili ve üçlü kombinasyonları) varlığında 48 saat sonuna kadar belirli aralıklarla Ex/Em: 495/529 nm'de floresans ölçümü yapıldı.

### **3.4.8. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerindeki Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerindeki Etkilerinin Tayini**

1.  $5 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekilen SW480 ve SW620 hücreleri 24 saat süreyle inkübe edildi.
2. Hücreler genistein (0,5 – 1  $\mu$ M), 5 – florourasil (1  $\mu$ M) ve TRAIL (5 - 10 ng/mL), bu maddelerin ikili ve üçlü kombinasyonları ile 90  $\mu$ L besiyeri içinde ve 48 saat süreyle inkübe edildi.
3. Her kuyucuğa 10  $\mu$ L JC-1 boyama çözeltisi eklendi ve 1 dk yatay çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. 96 kuyucuklu plaklar 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı aspire edildi.
6. Her kuyucuğa 200  $\mu$ L analiz tamponu ilave edildi ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj uygulandı. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Bu basamak iki kez tekrarlandı.
7. Her kuyucuğa 100  $\mu$ L analiz tamponu ilave edildi. Sağlıklı hücreler Ex/Em: 535/595 nm'de, apoptotik hücreler Ex/Em: 485/535 nm'de ölçülerek bu değerlerin oranı sağlıklı hücre göstergesi olarak kullanıldı.

### **3.4.9. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 Hücrelerindeki Kaspaz 3, 8 ve 9 Aktiviteleri Üzerindeki Etkilerinin Tayini**

1.  $2 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 90  $\mu\text{L}$  besiyeri içinde 96 kuyucuklu plaklara ekilen hücreler 24 saat inkübe edildi.
2. 96 kuyucuklu plaklar 800 rpm'de 2 dk santrifüj edildikten sonra besiyeri değiştirildi.
3. 100  $\mu\text{L}$  fenol kırmızısı içermeyen besiyeri içinde genistein (0,5 – 1  $\mu\text{M}$ ), 5 – florourasil (1  $\mu\text{M}$ ) ve TRAIL (5 - 10 ng/mL), bu maddelerin ikili ve üçlü kombinasyonları ile 48 saat süreyle inkübe edildi.
4. Her kuyucuğa kaspaz 3, 8 ve 9 substratı içeren analiz tamponu çözeltisinden 100'er  $\mu\text{L}$  eklendi.
5. Plaklar oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edildi.
6. Spesifik dalga boylarında Ex/Em: 535/620 nm (kaspaz 3), Ex/Em: 490/525 nm (kaspaz 8) ve Ex/Em: 370/450 nm (kaspaz 9) ölçüm yapıldı.

### **3.4.10. SW480 ve SW620 Hücrelerinde Apoptotik Proteinler (DR4, DR5) ve Antiapoptotik Proteinler (Bcl – xL, Bcl-2, XIAP, DcR1, DcR2)'in Gerçek Zamanlı PCR Yöntemiyle Belirlenmesi**

1. 25  $\text{cm}^2$  flask başına 1 milyon hücre olacak şekilde ekilip genistein (0,5 – 1  $\mu\text{M}$ ), 5 – florourasil (1  $\mu\text{M}$ ) ve TRAIL (5 - 10 ng/mL) uygulanan hücreler 48 saatlik maruziyet süresi sonunda inkübatörden çıkarıldı.
2. Besiyerlerinin aspirasyonu için RNaz içermeyen pipet ucu kullanıldı.
3. Aspirasyon işleminden sonra hücreler 1 mL PBS ile 2 kere yıkandı.
4. Hücreleri tutundukları yüzeyden kaldırmak için flasklara 0,5 mL tripsin ilave edildi.
5. Tripsin aktivitesini durdurarak hücrelerin zarar görmesini önlemek amacıyla 3 mL besiyeri ilave edildi.
6. 15 mL'lik steril tüpler örnek sayısı adedince numaralandırılarak hazır hale getirildi.
7. Hücrelerin 3'er kez süspande edilmesinin ardından hücre süspansiyonu tüplere aktarıldı. 1200 devir/dakika hızda 5 dk santrifüj edildi ve üst fazlar aspirasyon işlemiyle uzaklaştırıldı.
8. Besiyerinin uzaklaştırmak amacıyla 1 mL PBS ile 2 kez yıkama işlemi uygulandı. (PBS ilavesi yapıldıktan sonra sert bir yüzeye vurularak veya tırnakla hafifçe vurularak hücreler dağıtılması sağlandı).
9. mRNA izolasyonu aşamasına devam edildi.

10. mRNA izolasyonu için RNeasy Plus Mini Kit© kullanıldı.
11. Deney basamağından önce gerekli çözeltiler hazırlandı:
  - %70'lik etanol (RNaz içermeyen su içinde hazırlanmıştır)
  - RPE Çalışma Çözeltisi
  - RLT-β-merkaptoetanol Tampon Çözeltisi
12. 350'şer µL RLT-β-merkaptoetanol çözeltisi çöken hücrelerin üzerine köpürmemesine dikkat edilerek eklendi. Pipetaj yapıldıktan sonra 30 saniye vorteks uygulandı. Böylece gDNA eliminator spin kolonundan geçirilmeye hazır hale getirildi.
13. Vorteksten alınan hücre lizatının tamamı (350 µL) 3 kez süspande edilerek gDNA eliminator spin kolonuna (2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş) köpürmemesine dikkat edilerek ilave edildi. Her işlem aşamasında pipet ucu değiştirildi.
14. gDNA eliminator spin kolonlu ependorflara 30 saniye 11 bin devir/dk hızda santrifüj uygulandı ve kolonlar atıldı.
15. Kolon membranlarında sıvı veya köpük kalmamasına özen gösterildi, membranda köpük veya sıvı varsa santrifüj tekrar uygulandı.
16. Toplama tüpünün içerisindeki elüat üzerine 1:1 (350 µL) %70'lik etanol ilavesi yapıldı ve son hacim 700 µL oldu. Köpük oluşmamasına özen gösterilerek pipetaj uygulandı.
17. 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş haldeki RNeasy spin kolonlar standaya yerleştirildi.
18. Pipetajdan sonra hücreler RNeasy spin kolonlarına yavaşça tüp cidarlarından aktarıldı ve kolonların kapakları kapatıldı.
19. Kolonun üst kısmında köpük ve son kısmında da damla kalmayacak şekilde 20 saniye, 11 bin devir/dk hızda santrifüj uygulandı.
20. Sıvı veya köpük kalan kolonlar tekrar 30 saniye santrifüj edildi.
21. Böylece RNA'nın kolonlara tutulması sağlandı. Kolonların altında yer alan sıvı içeren toplama tüpleri atıldı.
22. Kolonlar 2 mL'lik ve numaralandırılmış steril toplama ependorflarına aktarıldı.
23. Kolonlara 700 µL RW1 yıkama çözeltisi ilave edildi. Kapaklar kapatılarak 20 saniye 11 bin devir/dk hızda santrifüj edildi ve dipte kalan yıkama suları uzaklaştırıldı.
24. Kolonlar 2 mL'lik temiz toplama tüplerine aktarıldı.

25. Hazır haldeki RPE Tampon çözeltisinden 500 µL RNeasy spin kolonlarına eklendi. Ardından, 20 saniye 11 bin devir/dk hızda santrifüj uygulandı ve sıvı kısımlar uzaklaştırıldı.
26. 500 µL RPE tampon ile bir kez daha yıkanarak 3 dk 10 bin devir/dk hızda santrifüj uygulandı. Etanolün kolondan uzaklaşmasını sağlamak için kolonlar 2 kez yıkandı.
27. Sıvı kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla 2 mL'lik steril toplama ependorflarına kolonlar yerleştirildi ve 1 dk 10 bin devir/dk hızda santrifüj uygulandı.
28. RNeasy spin kolonlar başka 1,5 mL'lik toplama tüplerine yerleştirildi.
29. Kolonlardan 40 µL RNaz içermeyen su geçirildi ve her aşamada pipet ucu değiştirildi.
30. Kolon kapakları kapatıldıktan sonra 1 dk 11 bin devir/dk hızda santrifüj uygulanarak RNA elüe edildi. (Bu işlem 2 kez tekrar edildi.)
31. Altta toplanan sıvı kısımlar ile RNA izolasyonu tamamlanmış oldu. Santrifüj sonrasında pipetaj uygulanarak RNA içeren sıvı kısım homojen hale getirildi.
32. Nanodrop cihazı kullanılarak RNA kalite ölçümleri değerlendirildi.
33. Ölçüm sonucunda RNA kaliteleri ve miktarlarının uygun değerler arasında olduğu belirlendi. Bu değerlendirmeye göre;
- $A_{260}/A_{280} = 1,9 - 2,1$
  - RNA miktarı = 25 ng - 5 µg aralığında yer almaktadır.
34. Ölçülen sonuçlar ng/µL cinsinden ifade edilmektedir.
35. cDNA eldesi için RT2 First Strand Kit© kullanıldı.
36. Deney düzeneğinde çalışılacak örneklerden elde edilen RNA'ların miktarları en düşük sonuca göre eşitlendi.
37. cDNA sentezi için 8 µL'lik toplam hacimde 500 ng RNA ile çalışıldı.
38. En düşük RNA miktarı bulunan örneğe göre hesaplamalar yapıldı.
39. 0,2 mL'lik steril tüpler etiketlendikten sonra hesaplanan RNA ve su miktarları önce sular sonra RNA'lar olacak şekilde tüplere eklendi ve homojen karışım elde etmek için birkaç defa pipetaj uygulandı.
40. Her bir tüpe 2'şer µL GE tampon çözeltisi ilave edildi ve pipetaj uygulandı.
41. Örnek tüpleri RT-PCR cihazında 42°C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı.
42. Daha sonra tüpler aniden soğumalarını sağlamak amacıyla -20°C'de 1 dk bekletildi.

43. Soğuk blok üzerindeki tüplere 10'er  $\mu\text{L}$  ters transkripsiyon karışım çözeltisinden eklendikten sonra yaklaşık 10 kere pipetaj uygulandı.
44.  $42^\circ\text{C}$ 'de 15 dk,  $95^\circ\text{C}$ 'de 5 dk koşullarında termal döngü cihazında inkübasyona bırakıldı.
45. İnkübasyondan sonra 91'er  $\mu\text{L}$  RNaz içermeyen su eklenerek 10 kere pipetaj uygulandı. Böylece her bir örnek için 111  $\mu\text{L}$  cDNA'lar elde edildi.
46. RT-PCR için "RT2 qPCR Primer Assay" ve "RT2 SYBR Green Mastermixes" kitleri kullanıldı.
- 47 Her bir örnek ve primerler için ayrı ayrı mastermix karışımları 0,2 mL'lik tüplere hazırlandı.
48. SW480 ve SW620 hücreleri ayrı ayrı çalışıldı.
49. 8 örnek + 1 (NTC) = 9 örnek ve 8 primer için hesaplama yapılarak çalışıldı.
50. Gen sayısı kadar mastermix 0,2 mL'lik tüplere hazırlandı. Toplam örnek sayısı için gerekli miktar mastermix Tablo 3.1.'e göre hesaplandı.

**Tablo 3.1.** Bir reaksiyon için PCR karışım bileşenleri.

<b>Bileşen</b>	<b>Hacim</b>
RT2 SYBR Green Mastermix	12,5 $\mu\text{L}$
cDNA sentez reaksiyonu	5 $\mu\text{L}$
RT2 qPCR Primer Assay	1 $\mu\text{L}$
RNaz içermeyen su	6,5 $\mu\text{L}$
<b>Toplam hacim</b>	<b>25 <math>\mu\text{L}</math></b>

51. Önce hazırlanan mastermix'ler (20'şer  $\mu\text{L}$ ) daha sonra da her bir cDNA (5'er  $\mu\text{L}$ ) 0,1 mL'lik tüplere eklendi.
52. Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra 72'lik mavi rotora 1 numaradan başlayarak dizildi. Rotordaki boş kısımlar boş tüplerle dolduruldu. Sonrasında, üzerine kelepçesi takılarak RT-PCR cihazına yerleştirildi.
53. RT-PCR cihazı  $95^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika,  $95^\circ\text{C}$ 'de 15 saniye ve  $60^\circ\text{C}$ 'de 30 saniye koşullarında ayarlandı ve 40 döngü olacak şekilde çalıştırıldı.

### 3.5. İstatistiksel Yöntem

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma ve ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. SPSS 10.5 Windows programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro – Wilk testiyle yapıldı. Varyans homojenliği Levene testiyle belirlendi. Normal dağılım gösteren verilerin grup ortalamaları arasındaki fark tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Post hoc analizi ise, varyansın homojen olduğu durumda Tukey testi, homojen olmadığı durumda ise Dunnett's T3 testi ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen verilerde Kruskal Wallis testini takiben Mann – Whitney U testi kullanılarak gruplar arasındaki farklılık değerlendirildi.  $p<0,05$  ve  $p<0,001$ , istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

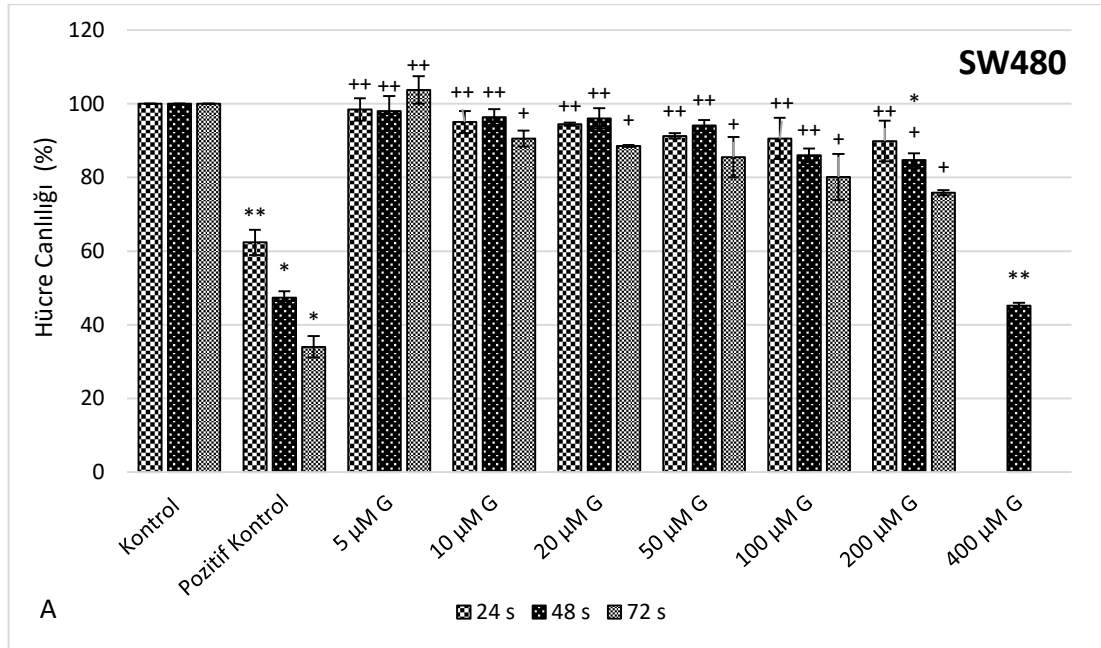
Gen ekspresyon analizinde örneklerin Ct değerleri negatif kontrol grubu ile QIAGEN Analytics Software Online Yazılım Programında değerlendirildi. Ortalama Ct,  $\Delta Ct$ ,  $2^{-\Delta Ct}$ , kat değişimi (fold change) ve kat regülasyonu (fold regulation) değerleri hesaplanarak karşılaştırıldı.  $p<0,05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

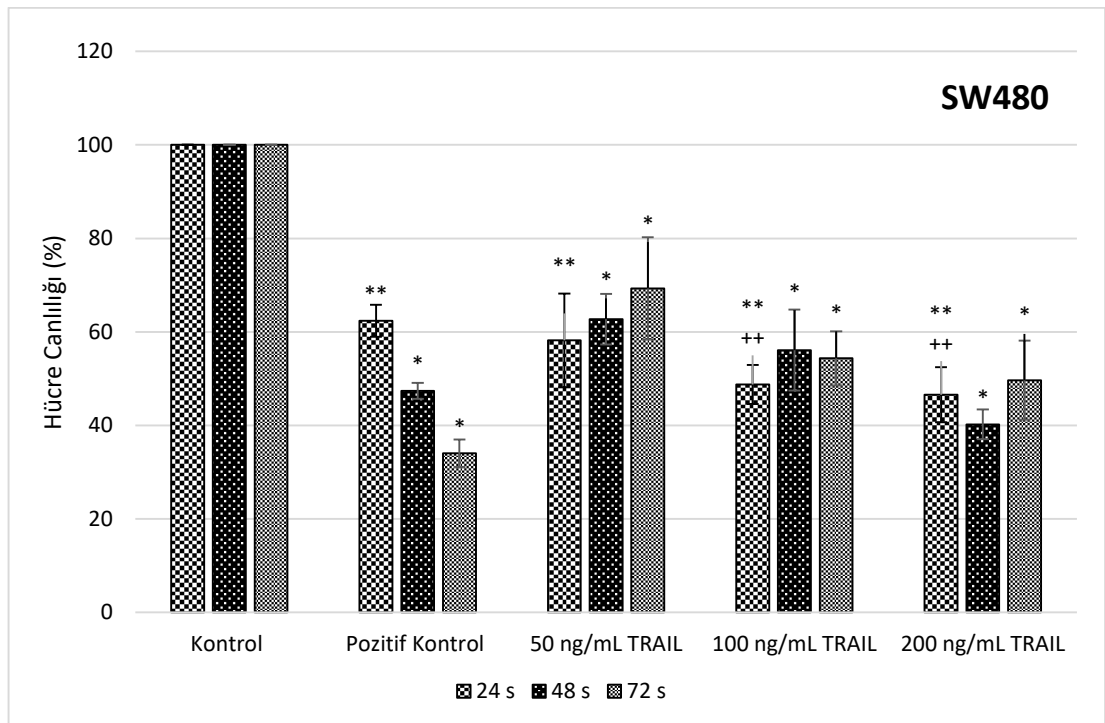
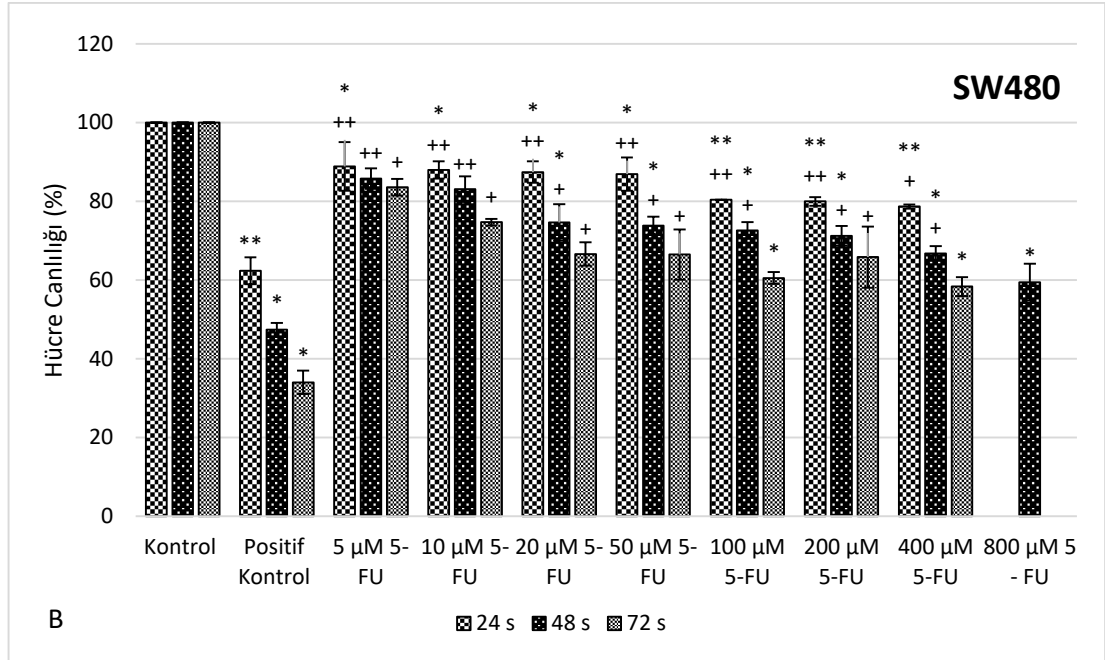
## 4. BULGULAR

### 4.1. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL’in SW480 ve SW620 Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

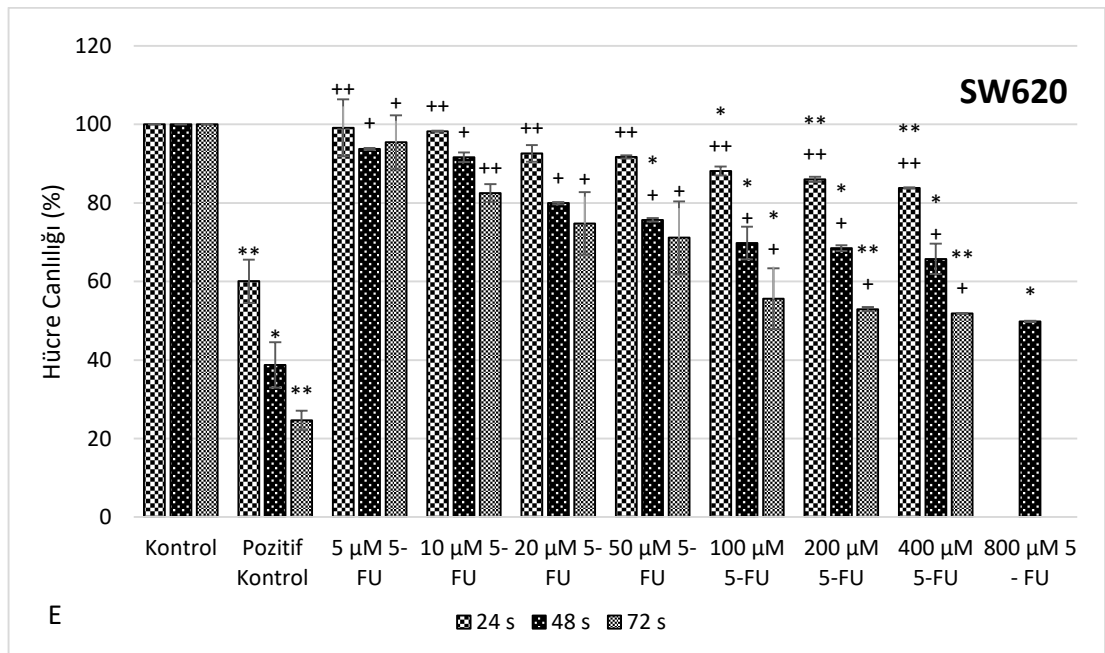
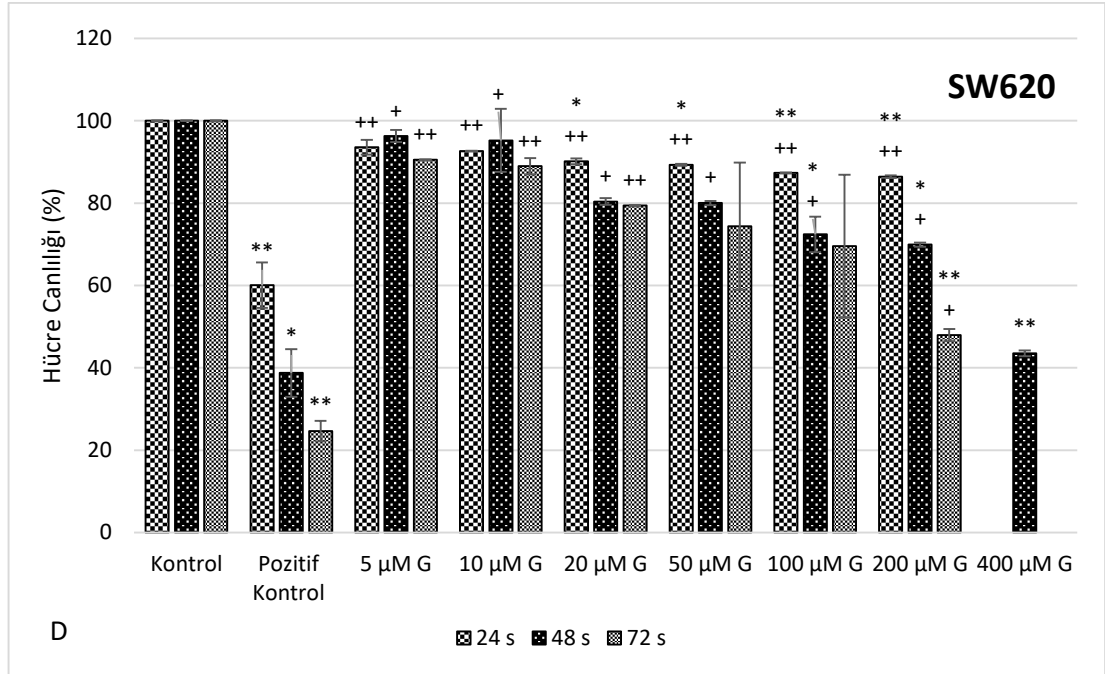
Genistein, 5-florourasil ve TRAIL’in SW480 ve SW620 hücre canlılıklarını 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerine ait MTT verilerine göre doz bağımlı olarak inhibe ettiği görülmüştür. Bununla birlikte, 5-florourasil her iki hücre hattının hücre canlılığını zaman bağımlı olarak inhibe etmiştir. Genistein ve 5-florourasil’in 24 ve 72 saat için SW480 hücrelerinde IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanamamıştır. Genistein’in 48 saat inkübasyon süresi için SW480 hücrelerinde IC<sub>50</sub> değeri 375,83 µM olarak belirlenmiştir. TRAIL’in 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyon için IC<sub>50</sub> değerleri 93,35 ng/mL, 138,45 ng/mL ve 192,99 ng/mL olarak bulunmuştur.

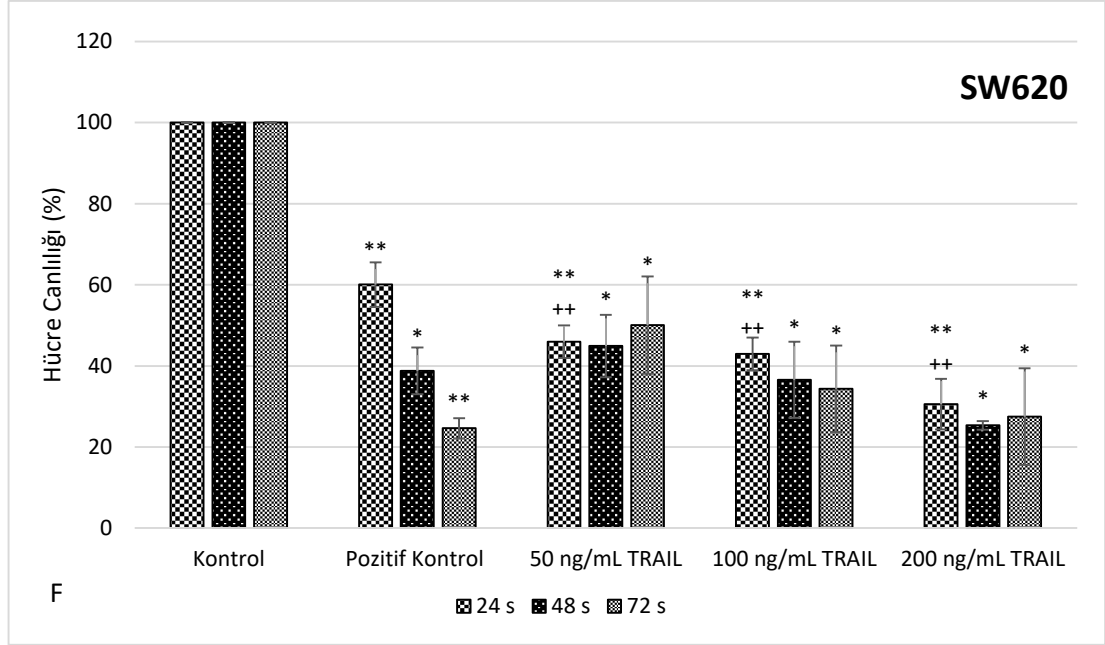
Genistein’in SW620 hücrelerindeki 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 351,14 µM ve 190,64 µM olarak bulunmuştur. 5-florourasil’in 48 saat inkübasyon süresi için IC<sub>50</sub> değeri 794,41 µM olarak tespit edilmiştir. TRAIL’in SW620 için ve 24, 48, 72 saat inkübasyon sürelerine ait IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 20 ng/mL, 19,43 ng/mL ve 50,16 ng/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.).







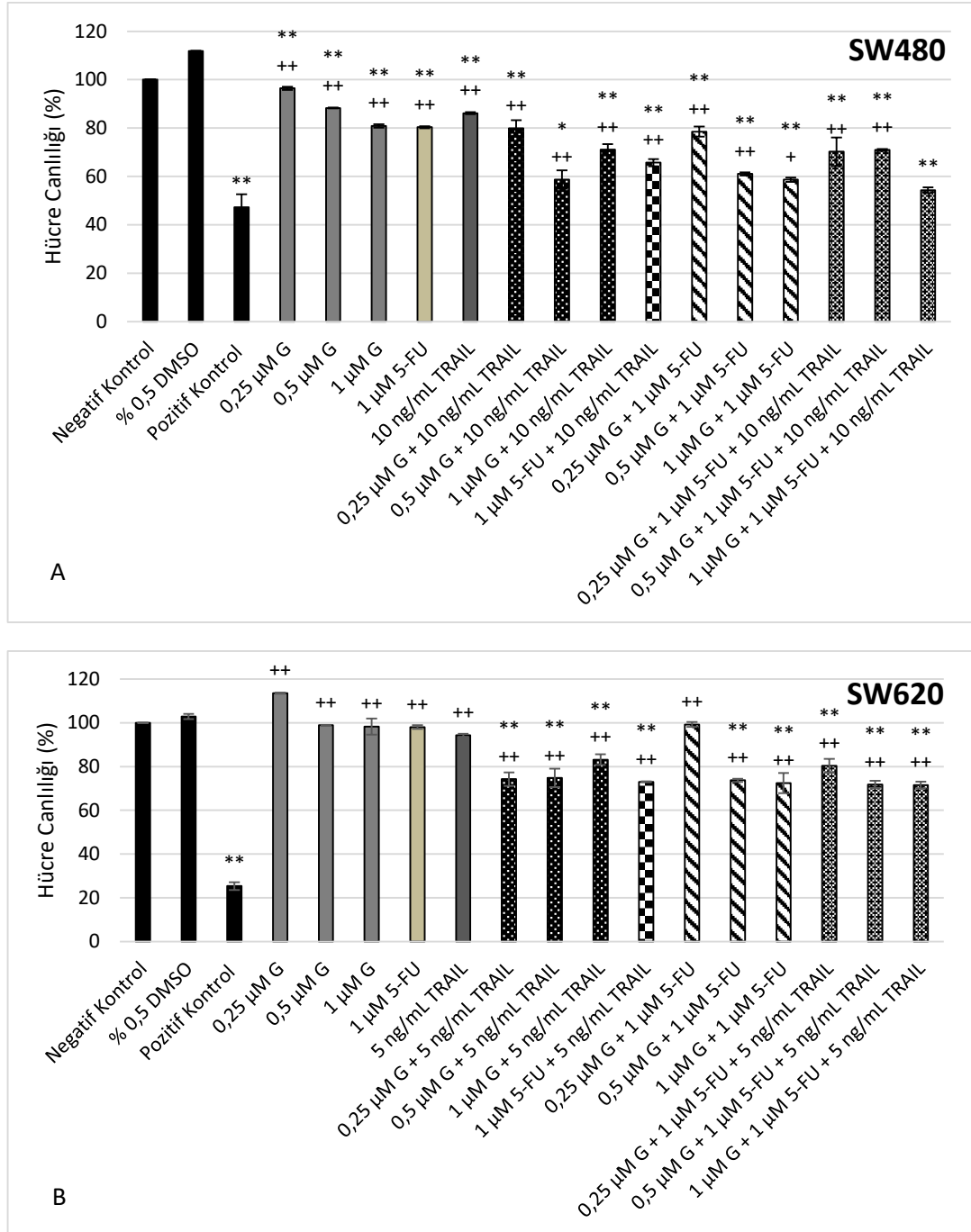




**Şekil 4.1.** Genistein (G), 5-florourasil (5-FU) ve TRAIL'in SW480 (A-C) ve SW620 (D-F) hücre canlılıkları üzerindeki etkileri.\*

\*Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalaması olarak ve ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,001$ , pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

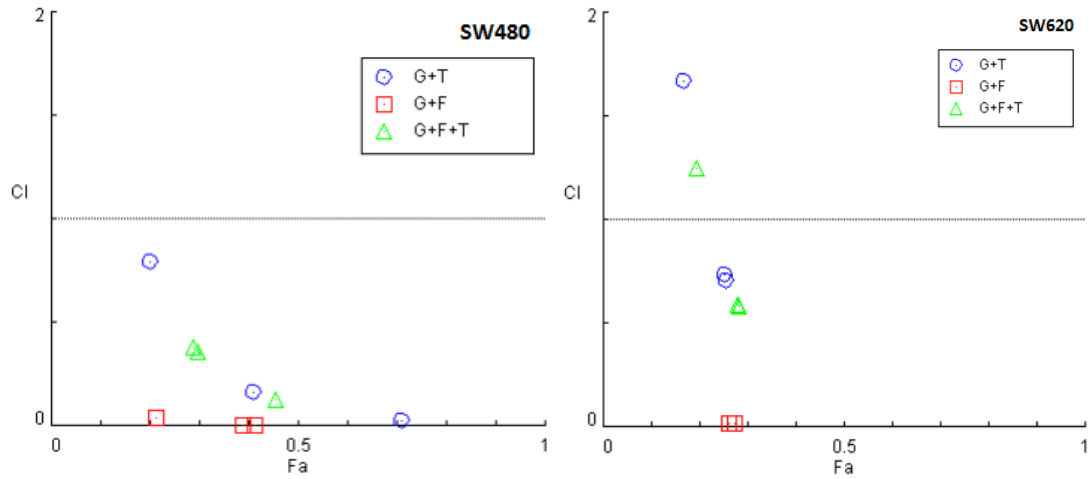
Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'in ikili ve üçlü kombinasyonlarına ait sitotoksik etkiler değerlendirildiğinde kombinasyonların tek uygulanan madde gruplarına göre hücre canlılıklarını daha fazla inhibe ettikleri görülmüştür. (Şekil 4.2.) Ayrıca, üçlü kombinasyonlar ikili kombinasyonlara göre daha sitotoksik bulunmuştur.



**Şekil 4.2.** Genistein (G), 5-florourasil (5-FU) ve TRAIL'ın ikili ve üçlü kombinasyonlarının SW480 (A) ve SW620 (B) hücre canlılıkları üzerindeki üzerindeki etkileri.\*

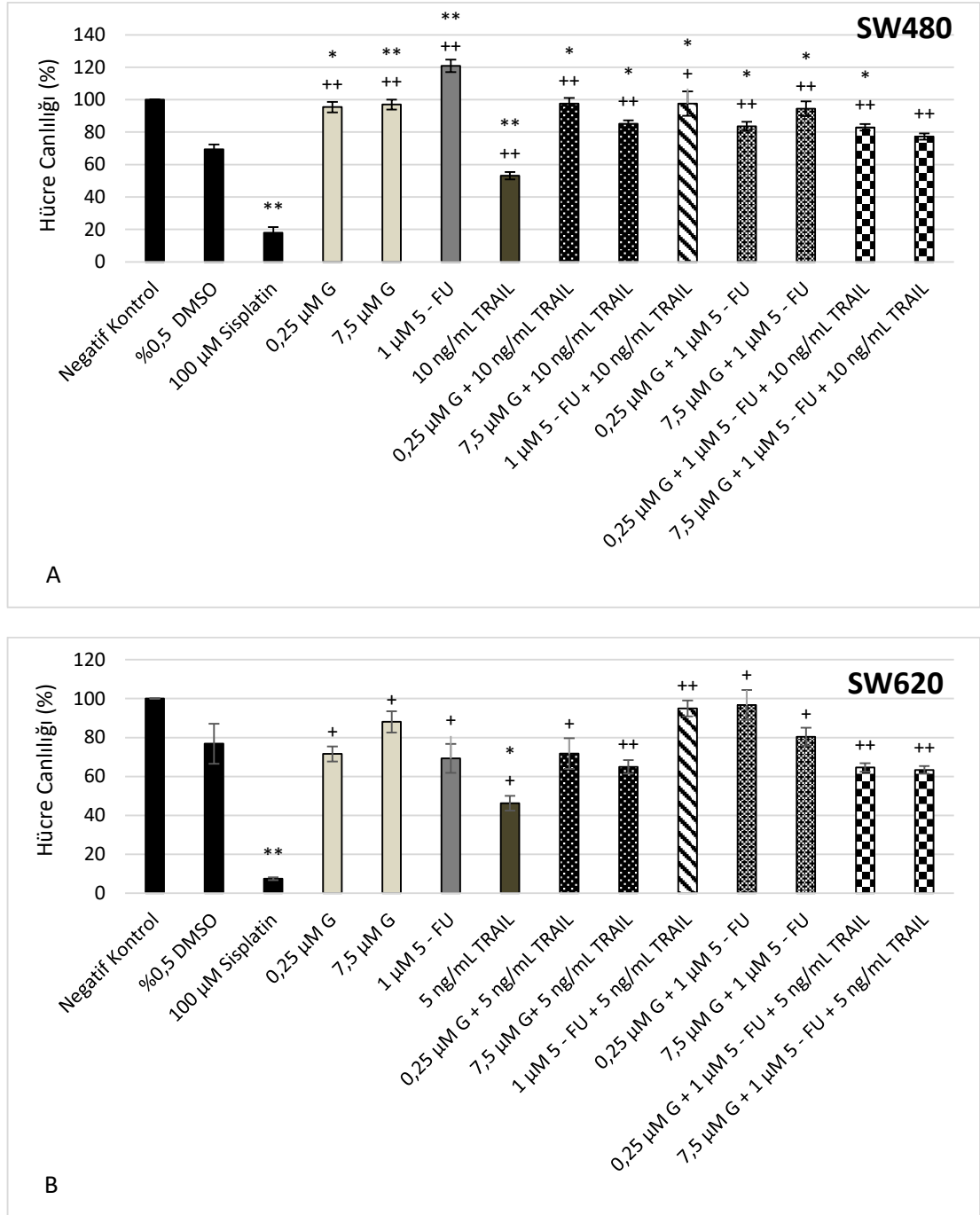
\*Sonnular üç bağımsız deneyin ortalaması olarak ve ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,001$ , pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Uygulanan kombinasyon gruplarından hücre canlılığının inhibisyonu etkisi açısından sinerjistik etkili olanların belirlenmesi amacıyla kombinasyon indeksi temelli analiz uygulanmıştır. Bu analiz sonuçlarına göre; kombinasyon indeksi değerleri genistein (G), 5-florourasil (F) ve TRAIL (T) olmak üzere SW480 hücrelerinde 1  $\mu$ M genisteine ait G+T için 0,02; G+F için 0,003 ve G+F+T için 0,123 olarak; SW620 hücrelerindeki 0,5  $\mu$ M genisteine ait G+T için 0,73; G+F için 0,015; G+F+T için 0,59 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3.).



**Şekil 4.3.** Genistein (G), 5-florourasil (F) ve TRAIL (T)'in ikili ve üçlü kombinasyonlarına ait kombinasyon indeksine (CI) karşı etkilenen faktör (Fa) grafikleri (Yatay çizgi altındaki değerler sinerjistik etkiyi, üzerindeki değerler antagonistik etkiyi ifade etmektedir).

Hücrelerin madde inkübasyonları sonrasındaki yenilenme kabiliyetleri yenilenme (recovery) MTT yöntemiyle değerlendirilmiştir. TRAIL'ın her iki hücre hattında da hücrelerin yenilenme kabiliyetlerinin kaybında daha etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, üçlü kombinasyonlar ikili kombinasyonlara göre hücre yenilenme kabiliyetlerini inhibe etmekte daha etkilidir (Şekil 4.4.).

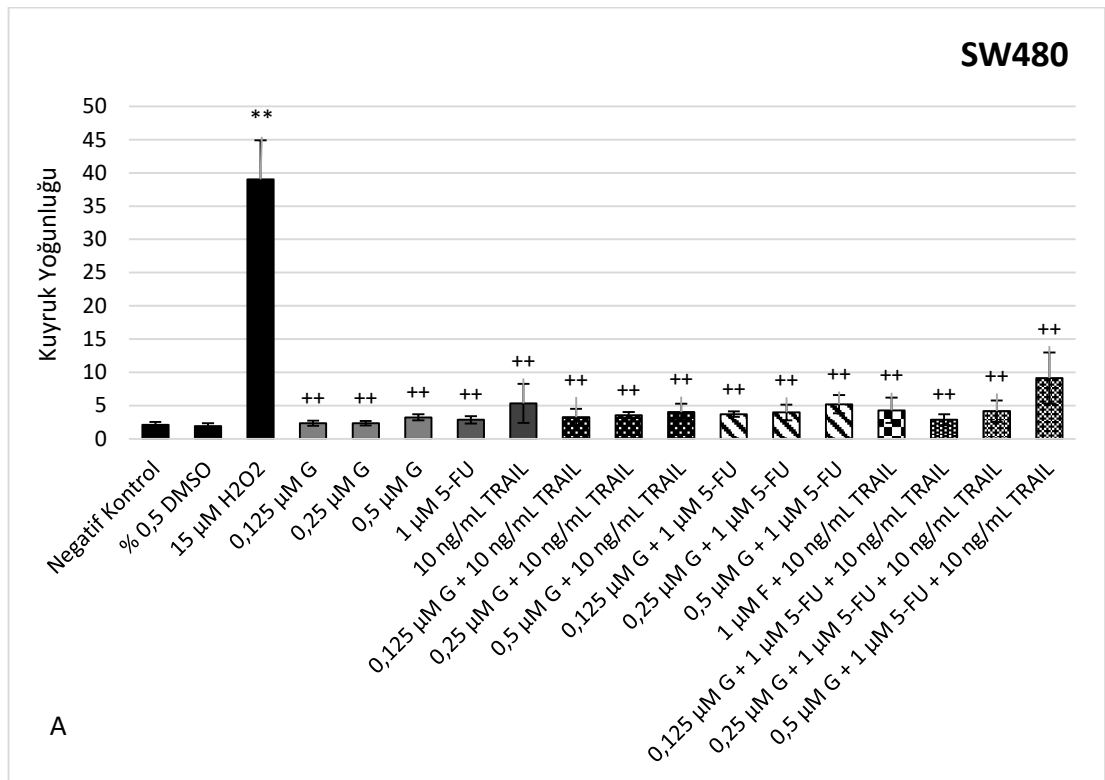


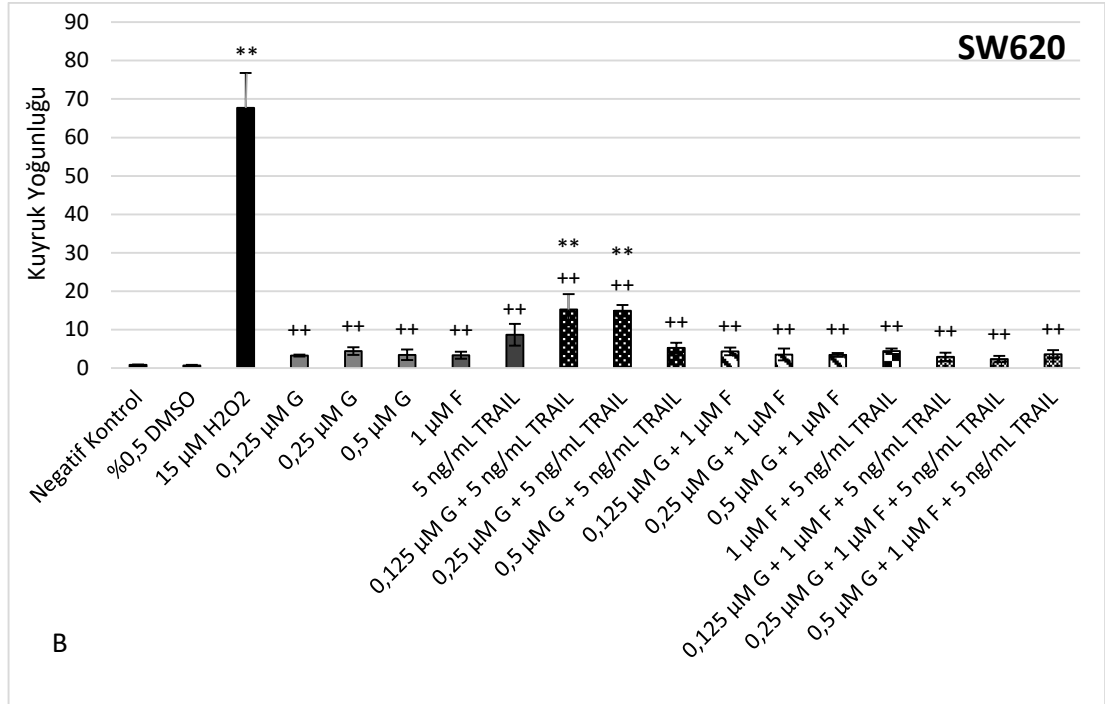
**Şekil 4.4.** Genistein (G), 5-florourasil (5-FU) ve TRAIL'ın SW480 (A) ve SW620 (B) madde inkübasyonu sonrasındaki yenilenme/çoğalma kabiliyetleri üzerindeki üzerindeki etkileri.\*

\*Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalaması olarak ve ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,001$ , pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

#### 4.2. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL’ın SW480 ve SW620 Hücrelerinde Comet Yöntemi ile DNA Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

Genistein, 5-florourasil ve TRAIL’ın SW480 ve SW620 hücrelerinde kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarının negatif kontrole kıyasla arttığı görülmüştür (Şekil.4.5.). Ayrıca, uygulanan ikili ve üçlü kombinasyonların TRAIL grubu hariç maddelerin tek uygulandığı gruplara göre negatif kontrole kıyasla DNA hasarını arttırmakta daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, SW620 hücrelerinde “0,125  $\mu$ M G + 5 ng/mL TRAIL” ve “0,25  $\mu$ M G + 5 ng/mL TRAIL” gruplarındaki DNA hasarı negatif kontrole kıyasla anlamlı şekilde artmıştır ( $p < 0,001$ ).



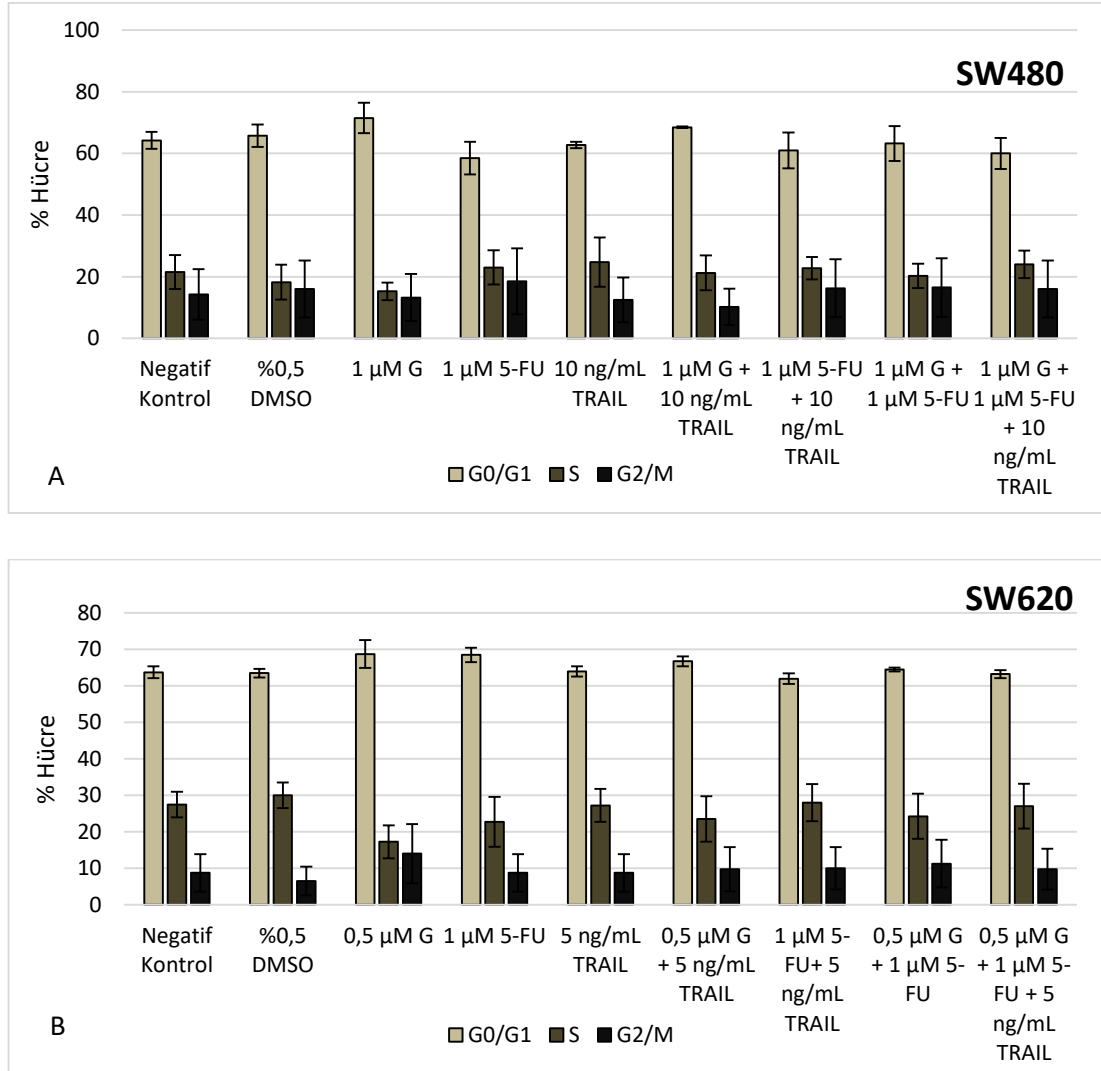


**Şekil 4.5.** Genistein (G), 5-florourasil (5-FU), TRAIL ve bu maddelerin ikili, üçlü kombinasyonlarının SW480 (A) ve SW620 (B) hücrelerinde kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarı üzerindeki etkileri.\*

\*Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalaması olarak ve ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,001$ , pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

### 4.3. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL’ın SW480 ve SW620 Hücrelerinde Hücre Siklusu, DR4 ve DR5 Yüzey Ekspresyonları ile Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

Genistein, 5-florourasil, TRAIL ve bu maddelerin kombinasyonlarının hücre siklusu üzerindeki etkileri akım sitometrisi ile belirlenmiştir (Şekil 4.7.). Negatif kontrole kıyasla SW480 hücrelerinde 1  $\mu$ M genistein ve SW620 hücrelerinde 0,5  $\mu$ M genistein ile inkübe edilmiş hücrelerde G0/G1 fazındaki hücre yüzdesi artışı en fazladır. SW620 hücrelerinde 1  $\mu$ M 5-FU + 5 ng/mL TRAIL ile inkübe edilmiş hücrelerde ve SW480 hücrelerinde 10 ng/mL TRAIL ile inkübe edilmiş hücrelerde S fazındaki hücre yüzdeleri negatif kontrole kıyasla en fazla bulunmuştur. SW480 hücrelerindeki G2/M fazındaki birikim artışı 1  $\mu$ M 5-florourasil, SW620 hücrelerinde 0,5  $\mu$ M genistein ile inkübasyon sonrasında gözlenmiştir (Şekil 4.6.).

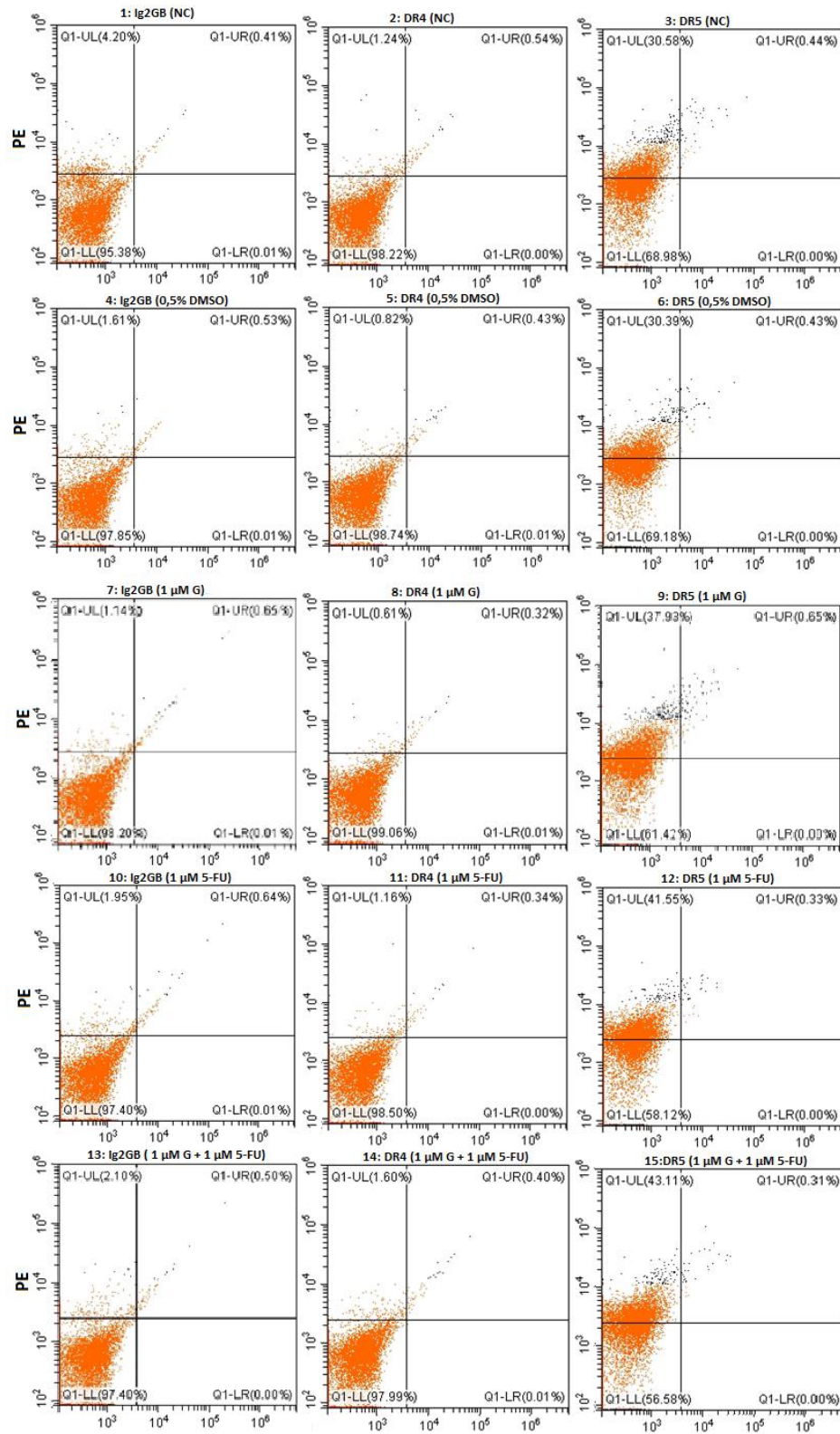


**Şekil 4.6.** Genistein (G), 5-florourasil (5-FU), TRAIL ve bu maddelerin ikili, üçlü kombinasyonlarının SW480 (A) ve SW620 (B) hücrelerinde hücre siklusu üzerindeki etkileri.\*

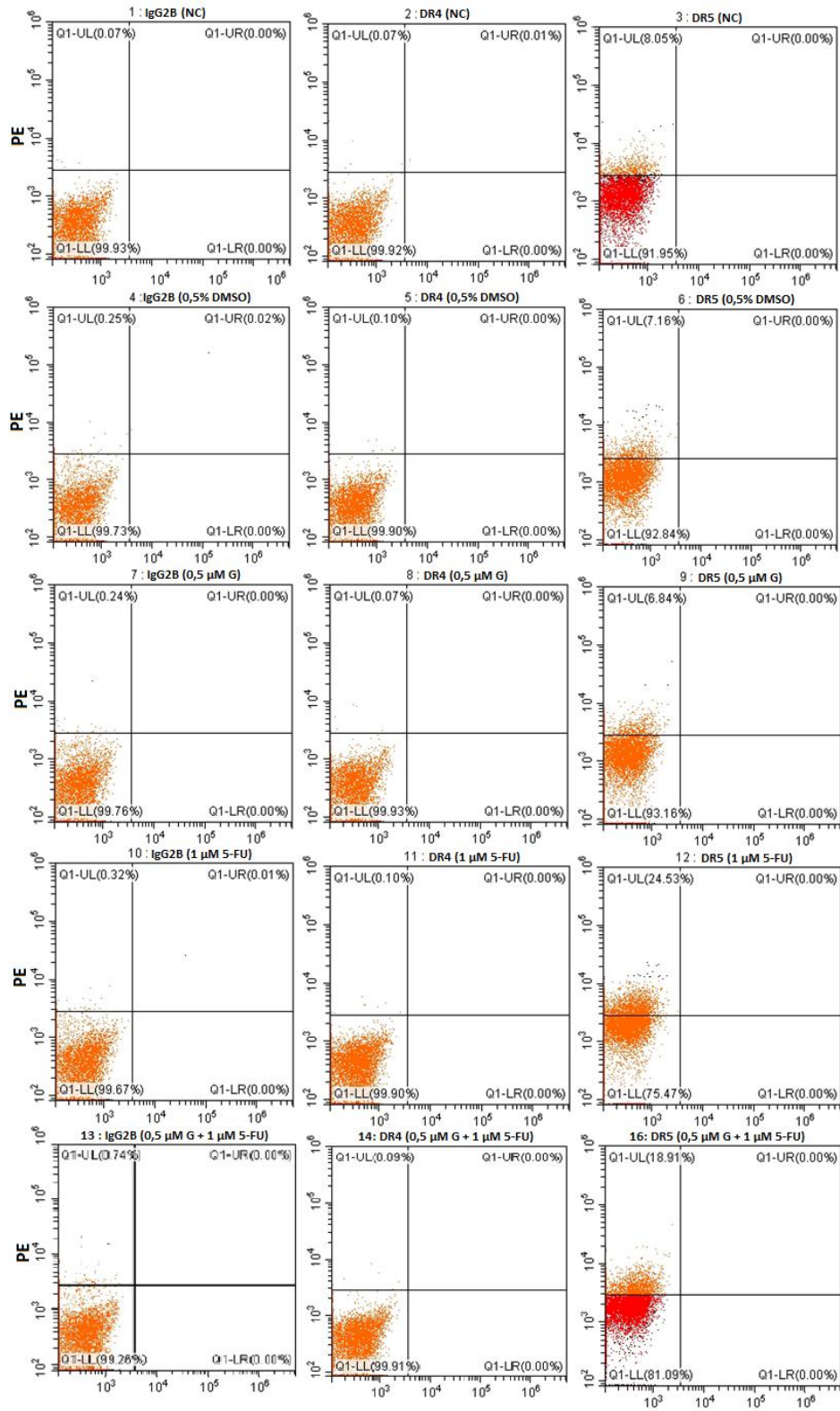
\*Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalaması olarak ve ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,001$ , pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın DR4 ve DR5 TRAIL agonistik yüzey reseptörlerinin ekspresyonları üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, genistein ve 5-florourasil'in TRAIL aracılı apoptozu DR5 yüzey reseptörünün ekspresyonunu artırarak kolaylaştırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, genistein ve 5-florourasil'in apoptotik etkilerine SW480 hücrelerinin SW620 hücrelerinden daha duyarlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.).



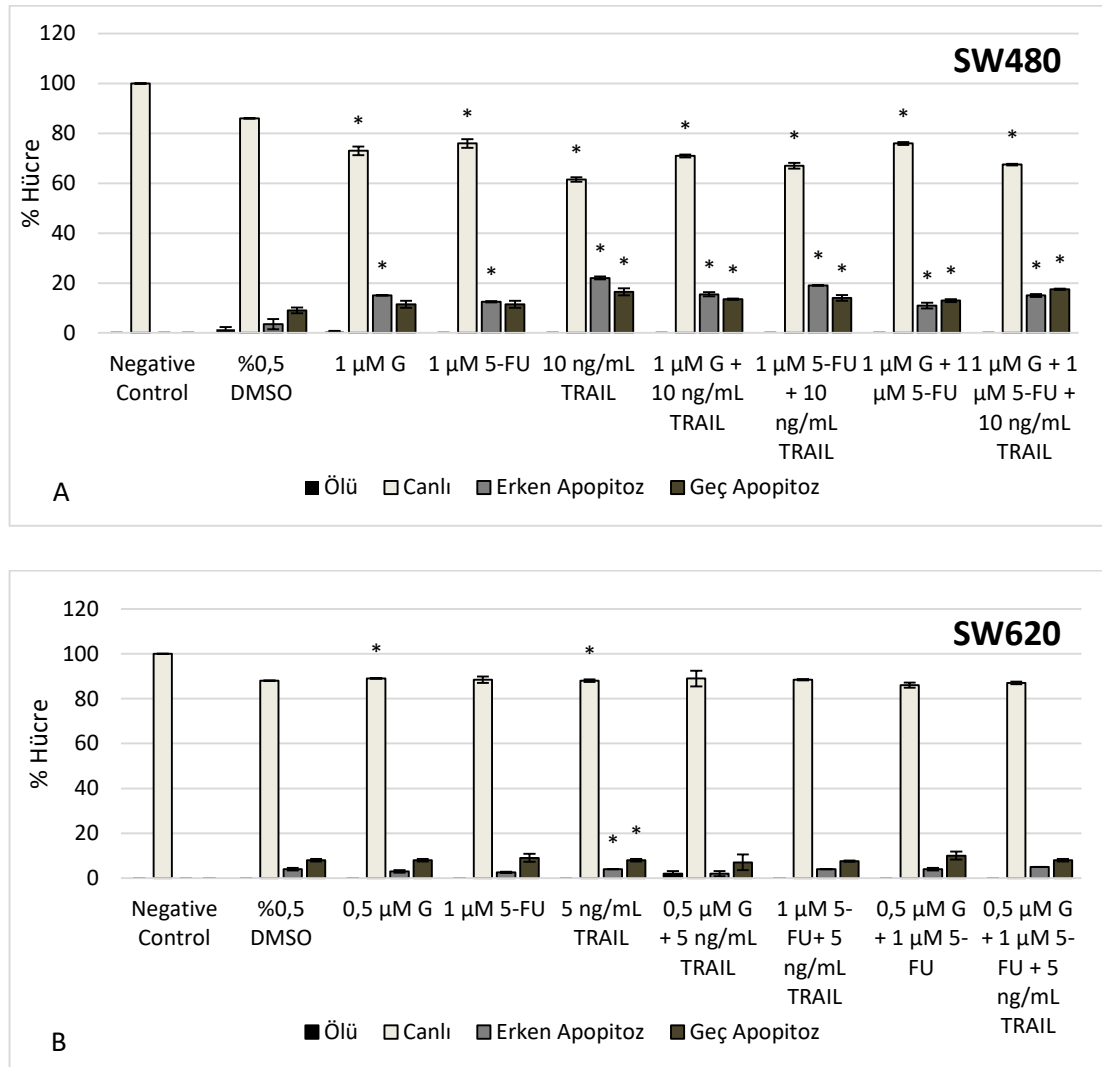


Şekil 4.7. Genistein (G) ve 5-florourasil (5-FU)'in SW480 hücrelerinin DR4 ve DR5 yüzey ekspresyonları üzerindeki etkisi.



**Şekil 4.8.** Genistein (G) ve 5-florourasil (5-FU)'in SW620 hücrelerinin DR4 ve DR5 yüzey ekspresyonları üzerindeki etkisi.

Anneksin V FITC apoptoz tayin analizi sonuçları DR5 ekspresyon düzeyleri ile uyumludur. Genistein, 5-florourasil, TRAIL ve kombinasyonlarının SW480 hücrelerindeki apoptotik hücre yüzdesini negatif kontrole kıyasla arttırdığı belirlenmiştir. SW620 hücrelerinde ise, 0,5  $\mu$ M genistein + 1  $\mu$ M 5-florourasil'in geç apoptotik hücre yüzdesini, 0,5  $\mu$ M genistein + 1  $\mu$ M 5-florourasil + 5 ng/mL TRAIL kombinasyonunun erken apoptotik hücre yüzdesini negatif kontrole kıyasla daha fazla arttırdığı görülmüştür (Şekil 4.9.).

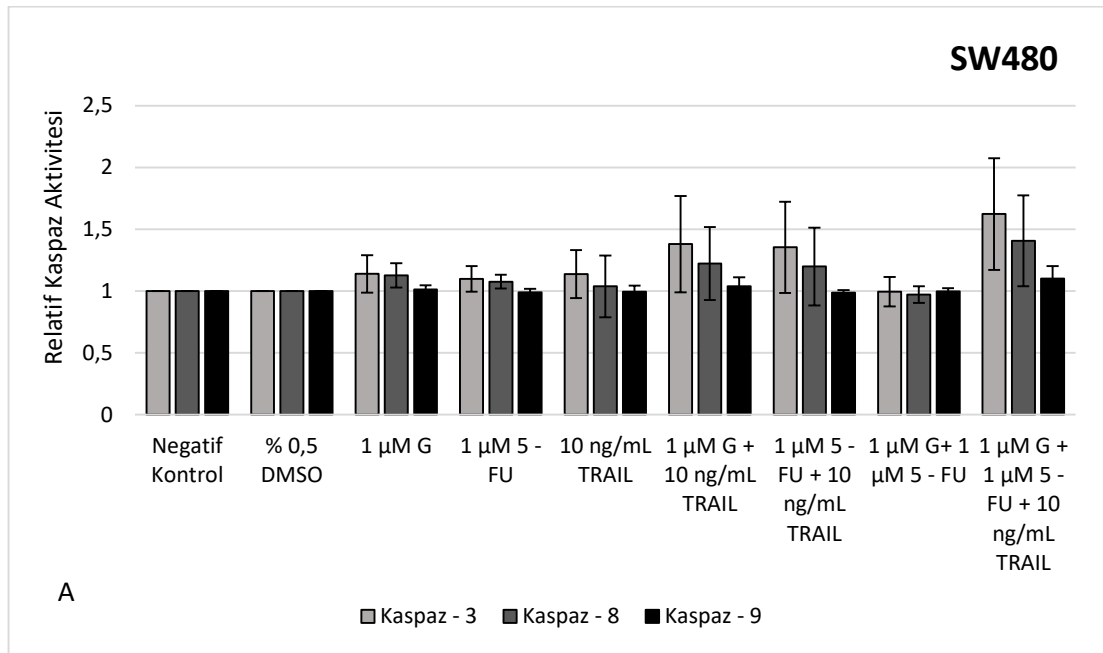


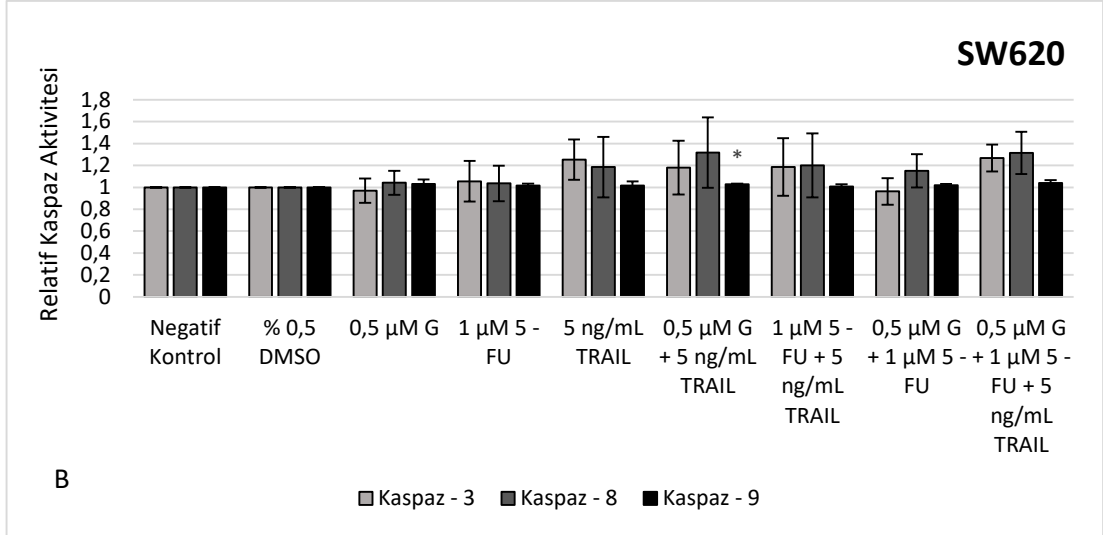
**Şekil 4.9.** Genistein (G) ve 5-florourasil (5-FU)'in SW480 (A) ve SW620 (B) hücrelerindeki apoptotik etkileri.\*

\*Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalaması olarak ve ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde ifade edilmiştir. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,001$ , pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

#### 4.4. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL’ın SW480 ve SW620 Hücrelerinde Kaspaz 3-8-9 Aktiviteleri, Mitokondriyal Membran Potansiyeli ve ROS Düzeylerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

Genistein, 5-florourasil ve TRAIL’ın SW480 ve SW620 hücrelerindeki apoptotik etki mekanizmasını belirlemek amacıyla kaspaz 3-8-9 aktiviteleri, mitokondriyal membran potansiyelleri ve ROS düzeyleri belirlenmiştir. Kaspaz 3-8-9 aktiviteleri değerlendirildiğinde, her iki hücre hattında da uygulanan üçlü kombinasyonların negatif kontrol ve tek uygulanan madde gruplarına göre kaspaz aktivitelerinin daha fazla arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, SW480 hücrelerinde genistein ve TRAIL kombinasyonunun kaspaz aktivitesini en fazla arttırdığı görülmüştür (Şekil 4.10.).

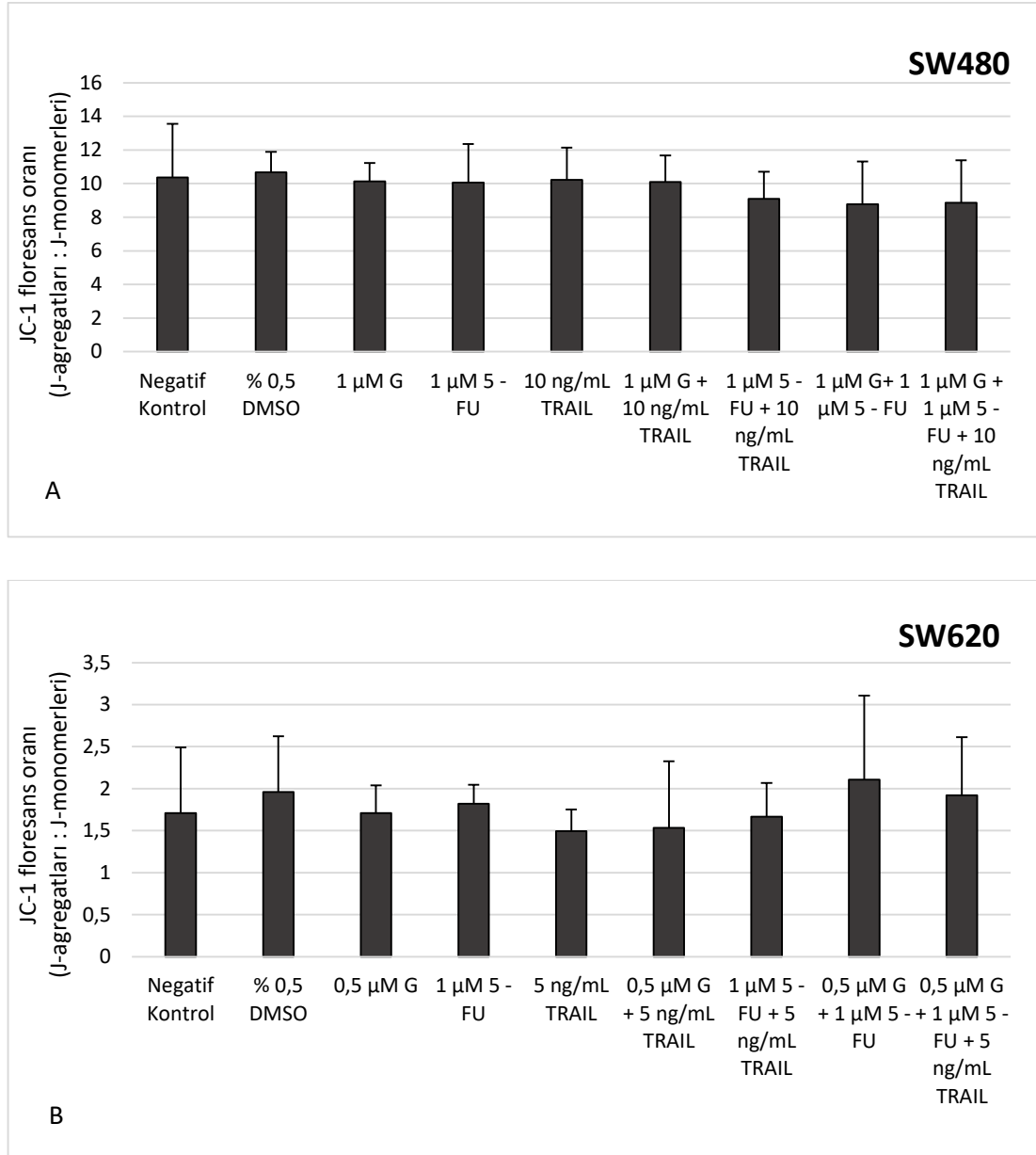




**Şekil 4.10.** Genistein, 5 - florourasil ve TRAIL'in negatif kontrole kıyasla SW480 (A) ve SW620 hücrelerindeki Kaspaz 3-8-9 aktiviteleri üzerindeki etkileri.\*

\*Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalaması olarak ve ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,001$ , pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'in mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkileri sağlıklı hücrelerin apoptotik hücelere oranının ifadesi olan JC-1 floresans oranı ile değerlendirilmiştir. Uygulanan test maddelerinin ikili ve üçlü kombinasyonlarının SW480 hücrelerinde negatif kontrol ve tek uygulanan madde gruplarına göre JC-1 oranını daha fazla azalttığı belirlenmiştir. SW620 hücrelerinde ise, 5 ng/mL TRAIL ile 0,5 µM genistein + 5 ng/mL TRAIL kombinasyonu JC-1 oranını negatif kontrole kıyasla daha fazla azaltmıştır (Şekil 4.11.).

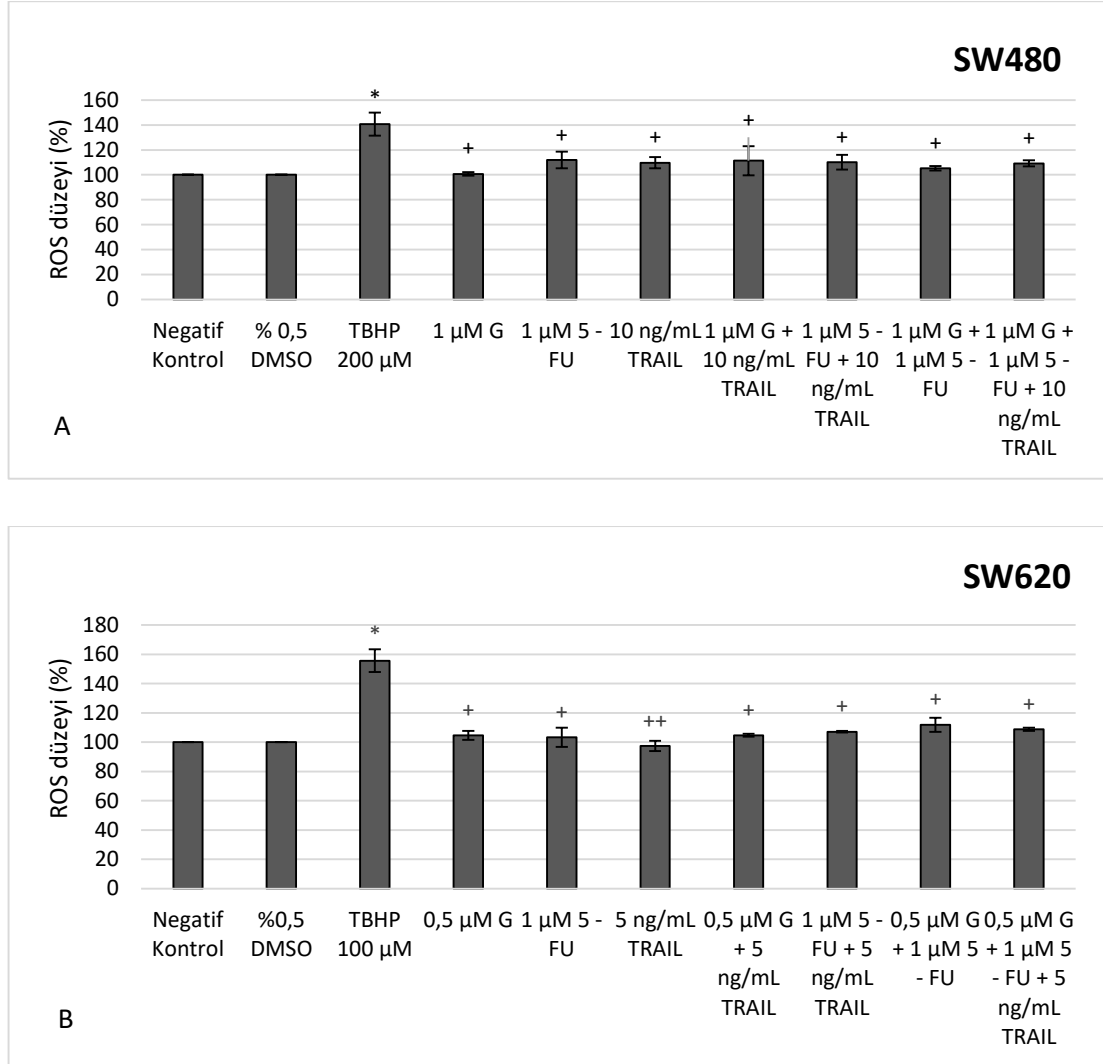


**Şekil 4.11.** Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 (A) ve SW620 (B) hücrelerindeki JC-1 agregatlarının JC-1 monomerlerine oranı şeklindeki mitokondriyal membran potansiyelleri üzerindeki etkileri.\*

\*Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalaması olarak ve ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,001$ , pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'ın SW480 ve SW620 hücrelerindeki ROS düzeylerinin değişimindeki etkileri değerlendirildiğinde, ROS düzeyinin negatif kontrole kıyasla her iki hücre hattında da arttığı belirlenmiştir. SW480 hücrelerinde en

fazla ROS artışına 5-florourasil neden olurken, SW620 hücrelerinde genistein ve 5-florourasil'in ikili ve üçlü kombinasyonları negatif kontrole kıyasla ROS düzeyini daha fazla arttırmıştır (Şekil 4.12.).



**Şekil 4.12.** Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'in SW480 (A) ve SW620 (B) hücrelerindeki ROS düzeyleri üzerindeki etkileri.\*

\*Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalaması olarak ve ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,001$ , pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

#### 4.5. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL'in Gen Ekspresyon Analizine Ait

##### Bulgular

Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL'in apoptotik ve antiapoptotik genler (Bcl-XL, Bcl-2, XIAP, DR4, DR5, DcR1, DcR2) üzerine etkilerini incelemek amacıyla

SW480 ve SW620 hücreleri sırasıyla 1 ve 0,5  $\mu$ M konsantrasyonlarda genisteine, 1  $\mu$ M 5 – florourasile, sırasıyla 10 ve 5 ng/mL TRAIL ligandına tek tek ve kombinasyonları halinde 48 saat boyunca maruz bırakılmıştır.

Gen ekspresyon değerlendirme yazılım programında Ct (eşik döngü değeri) değerleri kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

#### **4.5.1. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL’ın SW480 Hücrelerinde 48 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Gen Ekspresyon Analizlerine Ait Bulgular**

SW480 hücrelerinde negatif kontrol, çözücü kontrol (%0,5 DMSO), genistein, 5 – florourasil ve TRAIL dozlarına ait Ct değerleri Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.’de verilmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken üst sınır Ct değeri 35 olarak alınmıştır. 35’ten daha yüksek değerler de 35 olarak kabul edilmiştir. GAPDH geni (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) kontrol geni olarak kullanılmıştır. Genistein, 5 – florourasil ve kombinasyonları çözücü kontrol ile, TRAIL grubu ise negatif kontrol ile kıyaslanmıştır.

$\Delta$ Ct değerleri incelendiğinde kontrol gruplarına kıyasla Bcl – XL geni için, tüm gruplarda azalma; Bcl – 2 geni için, “10 ng/mL TRAIL” grubu dışındaki gruplarda azalma; XIAP geni için, “10 ng/mL TRAIL” grubunda azalma gözlenirken diğer gruplarda artma; DR4 geni için, genistein ve TRAIL’ın tek uygulandıkları gruplar ile ikili kombinasyonlarda artma; DR5 geni için, “10 ng/mL TRAIL”, “1  $\mu$ M 5 – fu” ve “1  $\mu$ M G + 1  $\mu$ M 5 – fu + 10 ng/mL TRAIL” gruplarında azalma ve diğer gruplarda artma; DcR1 geni için bütün gruplarda azalma; DcR2 geni için, “1  $\mu$ M G + 1  $\mu$ M 5 – fu”, “1  $\mu$ M G + 1  $\mu$ M 5 – fu + 10 ng/mL TRAIL” ve “10 ng/mL TRAIL” grupları dışındaki diğer gruplarda artma görülmüştür.

$2^{-\Delta Ct}$  değerleri incelendiğinde kontrol gruplarına kıyasla, Bcl – XL geni için “1  $\mu$ M G + 10 ng/mL TRAIL” grubu dışında artma; Bcl – 2 geni için “10 ng/mL TRAIL” grubu dışındaki gruplarda artma; XIAP geni için, “10 ng/mL TRAIL” grubunda artma gözlenirken diğer gruplarda azalma; DR4 ve DR5 genleri için, “1  $\mu$ M 5 – fu” ve “1  $\mu$ M G + 1  $\mu$ M 5 – fu + 10 ng/mL TRAIL” gruplarında artma ve diğer gruplarda azalma; DcR1 geni için bütün gruplarda artma; DcR2 geni için, “1  $\mu$ M G



+ 1  $\mu$ M 5 – fu”, “1  $\mu$ M G + 1  $\mu$ M 5 – fu + 10 ng/mL TRAIL” ve “10 ng/mL TRAIL” grupları dışındaki diğer gruplarda artma belirlenmiştir.

Kat değişimi ve kat regülasyonu değerleri incelendiğinde kontrol gruplarına kıyasla, Bcl – XL geni için, “1  $\mu$ M G + 10 ng/mL TRAIL” grubu hariç ikili ve üçlü kombinasyonlar ile “10 ng/mL TRAIL” grubunda artış gözlenirken Bcl – 2 geni için, “1  $\mu$ M G + 10 ng/mL TRAIL” grubu hariç ikili ve üçlü kombinasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. XIAP geni için, “1  $\mu$ M G” dışındaki tüm gruplarda anlamlı azalış ve “10 ng/mL TRAIL” grubunda belirgin artış; DR4 geni için, “10 ng/mL TRAIL” ve “1  $\mu$ M 5 – fu + 10 ng/mL TRAIL” grubunda anlamlı azalış; DR5 geni için, “10 ng/mL TRAIL” grubunda artış ve “1  $\mu$ M G + 10 ng/mL TRAIL” grubunda anlamlı azalış; DcR1 geni için, “10 ng/mL TRAIL” grubunda anlamlı artış; DcR2 geni için ise, “1  $\mu$ M G” ve “1  $\mu$ M G + 10 ng/mL TRAIL” gruplarında anlamlı azalma, “10 ng/mL TRAIL” ve “1  $\mu$ M G + 1  $\mu$ M 5 – fu + 10 ng/mL TRAIL” gruplarında anlamlı artış belirlenmiştir.

**Tablo 4.1.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 - fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait ortalama Ct değerleri.

<b>Dozlar / Genler</b>	<b>GAPDH</b>	<b>Bcl – XL</b>	<b>Bcl-2</b>	<b>XIAP</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	11,50 ± 0,17	16,27 ± 0,02	25,65 ± 0,04	35,00 ± 0,00
<b>Çözücü Kontrol (% 0,5 DMSO)</b>	12,33 ± 0,06	16,62 ± 0,42	26,77 ± 0,12	21,61 ± 0,64
<b>1 µM G</b>	11,61 ± 0,06	15,79 ± 0,20	26,02 ± 0,02	21 ± 0,42
<b>1 µM 5-fu</b>	11,50 ± 0,11	15,30 ± 0,00	25,37 ± 0,30	21,8 ± 0,21
<b>10 ng/mL TRAIL</b>	11,51 ± 0,09	15,71 ± 0,25	25,78 ± 0,05	21,95 ± 0,34
<b>1 µM G + 10 ng/mL TRAIL</b>	10,89 ± 0,04	15,23 ± 0,03	25,24 ± 0,05	21,35 ± 0,28
<b>1 µM 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	11,98 ± 0,27	15,44 ± 0,01	25,7 ± 0,07	23,23 ± 1,10
<b>1 µM G + 1 µM 5-fu</b>	12,58 ± 0,00	16,17 ± 0,02	26,07 ± 0,03	23,69 ± 0,65
<b>1 µM G + 1 µM 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	11,36 ± 0,05	14,75 ± 0,00	24,62 ± 0,30	22,32 ± 0,72

(Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.)

**Tablo 4.2.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 - fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait ortalama Ct değerleri.

<b>Dozlar / Genler</b>	<b>DR4</b>	<b>DR5</b>	<b>DcR1</b>	<b>DcR2</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	19,19 ± 0,04	21,06 ± 0,13	29,63 ± 0,35	18,89 ± 0,05
<b>Çözücü Kontrol (% 0,5 DMSO)</b>	21,02 ± 0,10	19,71 ± 0,26	27,93 ± 0,13	19,39 ± 0,02
<b>1 µM G</b>	20,57 ± 0,32	19,07 ± 0,22	27,2 ± 0,12	19,05 ± 0,02
<b>1 µM 5-fu</b>	20,17 ± 0,11	18,87 ± 0,17	26,71 ± 0,20	18,75 ± 0,23
<b>10 ng/mL TRAIL</b>	20,67 ± 0,46	19,21 ± 0,03	26,9 ± 0,08	18,59 ± 0,00
<b>1 µM G + 10 ng/mL TRAIL</b>	19,88 ± 0,36	18,53 ± 0,04	26,41 ± 0,15	18,29 ± 0,01
<b>1 µM 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	21,06 ± 0,00	19,37 ± 0,13	27,49 ± 0,27	19,16 ± 0,01
<b>1 µM G + 1 µM 5-fu</b>	21,68 ± 0,46	20 ± 0,05	27,61 ± 0,58	19,62 ± 0,21
<b>1 µM G + 1 µM 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	19,83 ± 0,23	18,53 ± 0,09	26,55 ± 0,20	18,26 ± 0,02

(Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.)

**Tablo 4.3.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait ortalama  $\Delta$ Ct değerleri.

<b>Dozlar / Genler</b>	<b>GAPDH</b>	<b>Bcl – XL</b>	<b>Bcl-2</b>	<b>XIAP</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	0	4,77 ± 0,15	14,15 ± 0,21	23,50 ± 0,17
<b>Çözücü Kontrol (% 0,5 DMSO)</b>	0	4,29 ± 0,49	14,44 ± 0,19	9,28 ± 0,57
<b>1 µM G</b>	0	4,18 ± 0,27	14,41 ± 0,09	9,39 ± 0,35
<b>1 µM 5-fu</b>	0	3,8 ± 0,11	13,87 ± 0,41	10,3 ± 0,09
<b>10 ng/mL TRAIL</b>	0	4,19 ± 0,35	14,27 ± 0,15	10,44 ± 0,24
<b>1 µM G + 10 ng/mL TRAIL</b>	0	4,34 ± 0,01	14,36 ± 0,09	10,46 ± 0,24
<b>1 µM 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	0	3,46 ± 0,26	13,72 ± 0,35	11,26 ± 0,82
<b>1 µM G + 1 µM 5-fu</b>	0	3,58 ± 0,01	13,48 ± 0,04	11,1 ± 0,64
<b>1 µM G + 1 µM 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	0	3,40 ± 0,05	13,27 ± 0,35	10,97 ± 0,66

(Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.)

**Tablo 4.4.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait ortalama  $\Delta Ct$  değerleri.

<b>Dozlar / Genler</b>	<b>DR4</b>	<b>DR5</b>	<b>DcR1</b>	<b>DcR2</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	7,69 ± 0,21	9,56 ± 0,31	18,13 ± 0,53	7,40 ± 0,22
<b>Çözücü Kontrol (% 0,5 DMSO)</b>	8,7 ± 0,04	7,38 ± 0,19	15,60 ± 0,20	7,06 ± 0,04
<b>1 µM G</b>	8,96 ± 0,25	7,46 ± 0,15	15,6 ± 0,05	7,44 ± 0,09
<b>1 µM 5-fu</b>	8,67 ± 0,00	7,37 ± 0,28	15,21 ± 0,32	7,25 ± 0,34
<b>10 ng/mL TRAIL</b>	9,16 ± 0,36	7,69 ± 0,06	15,39 ± 0,01	7,08 ± 0,09
<b>1 µM G + 10 ng/mL TRAIL</b>	8,99 ± 0,32	7,64 ± 0,00	15,52 ± 0,20	7,4 ± 0,05
<b>1 µM 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	9,08 ± 0,27	7,39 ± 0,13	15,51 ± 0,00	7,18 ± 0,28
<b>1 µM G + 1 µM 5-fu</b>	9,1 ± 0,45	7,41 ± 0,04	15,03 ± 0,59	7,04 ± 0,21
<b>1 µM G + 1 µM 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	8,47 ± 0,17	7,17 ± 0,04	15,19 ± 0,25	6,91 ± 0,02

(Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.)

**Tablo 4.5.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait ortalama  $2^{-\Delta Ct}$  değerleri.

<b>Dozlar / Genler</b>	<b>GAPDH</b>	<b>Bcl – XL</b>	<b>Bcl-2</b>	<b>XIAP</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	1	0,036651	0,000055	0
<b>Çözücü Kontrol (% 0,5 DMSO)</b>	1	0,051296	0,000045	0,001614
<b>1 <math>\mu</math>M G</b>	1	0,055169	0,000046	0,00149
<b>1 <math>\mu</math>M 5-fu</b>	1	0,071794	0,000067	0,00079
<b>10 ng/mL TRAIL</b>	1	0,054788	0,000051	0,00072
<b>1 <math>\mu</math>M G + 10 ng/mL TRAIL</b>	1	0,049378	0,000048	0,00071
<b>1 <math>\mu</math>M 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	1	0,090873	0,000074	0,000409
<b>1 <math>\mu</math>M G + 1 <math>\mu</math>M 5-fu</b>	1	0,083331	0,000087	0,000456
<b>1 <math>\mu</math>M G + 1 <math>\mu</math>M 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	1	0,095061	0,000102	0,000499

(Kontrol geni GAPDH değeri 1 olarak hesaplanmıştır.)

**Tablo 4.6.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait ortalama  $2^{-\Delta Ct}$  değerleri.

<b>Dozlar / Genler</b>	<b>DR4</b>	<b>DR5</b>	<b>DcR1</b>	<b>DcR2</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	0,004843	0,001325	0,000003	0,005941
<b>Çözücü Kontrol (% 0,5 DMSO)</b>	0,002413	0,006003	0,00002	0,007494
<b>1 <math>\mu</math>M G</b>	0,002008	0,005699	0,00002	0,005739
<b>1 <math>\mu</math>M 5-fu</b>	0,002455	0,006045	0,000026	0,00657
<b>10 ng/mL TRAIL</b>	0,001748	0,004826	0,000023	0,007417
<b>1 <math>\mu</math>M G + 10 ng/mL TRAIL</b>	0,001967	0,005013	0,000021	0,005921
<b>1 <math>\mu</math>M 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	0,001848	0,005962	0,000021	0,006896
<b>1 <math>\mu</math>M G + 1 <math>\mu</math>M 5-fu</b>	0,001829	0,00588	0,00003	0,007599
<b>1 <math>\mu</math>M G + 1 <math>\mu</math>M 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	0,00281	0,00692	0,000027	0,008315

(Kontrol geni GAPDH değeri 1 olarak hesaplanmıştır.)

**Tablo 4.7.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait kat değişimi değerleri.

Dozlar / Genler	GAPDH	Bcl – XL	Bcl-2	XIAP
<b>1 µM G</b>	1	1,08	1,02	0,92
<b>1 µM 5-fu</b>	1	1,4	1,48	<b>0,49</b>
<b>10 ng/mL TRAIL</b>	1	<b>1,49</b>	0,92	<b>8539,88</b>
<b>1 µM G + 10 ng/mL TRAIL</b>	1	0,96	1,06	<b>0,44</b>
<b>1 µM 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	1	<b>1,77</b>	<b>1,64</b>	<b>0,25</b>
<b>1 µM G + 1 µM 5-fu</b>	1	<b>1,62</b>	<b>1,93</b>	<b>0,28</b>
<b>1 µM G + 1 µM 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	1	<b>1,85</b>	<b>2,25</b>	<b>0,31</b>

(Sonuçlar negatif kontrol ve çözücü kontrol gruplarına karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni GAPDH değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Kırmızıyla gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı artmayı, maviyle gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı azalmayı temsil etmektedir. Anlamlılık  $p < 0,05$ 'e göre hesaplanmıştır.)



**Tablo 4.8.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait kat değişimi değerleri.

Dozlar / Genler	DR4	DR5	DcR1	DcR2
1 $\mu$ M G	0,83	0,95	1	0,77
1 $\mu$ M 5-fu	1,02	1,01	1,31	0,88
10 ng/mL TRAIL	0,36	3,64	6,68	1,25
1 $\mu$ M G + 10 ng/mL TRAIL	0,82	0,84	1,06	0,79
1 $\mu$ M 5-fu + 10 ng/mL TRAIL	0,77	0,99	1,06	0,92
1 $\mu$ M G + 1 $\mu$ M 5-fu	0,76	0,98	1,49	1,01
1 $\mu$ M G + 1 $\mu$ M 5-fu + 10 ng/mL TRAIL	1,16	1,15	1,33	1,11

(Sonuçlar negatif kontrol ve ozc kontrol gruplarına karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni GAPDH değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Kırmızıyla gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı artmayı, maviyle gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı azalmayı temsil etmektedir. Anlamlılık  $p < 0,05$ 'e göre hesaplanmıştır.)

**Tablo 4.9.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait kat regülasyonu değerleri.

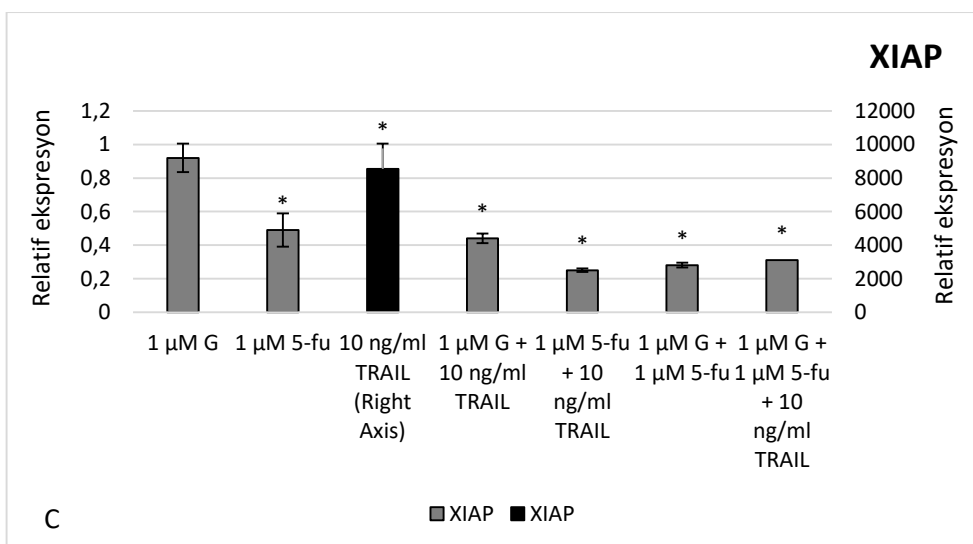
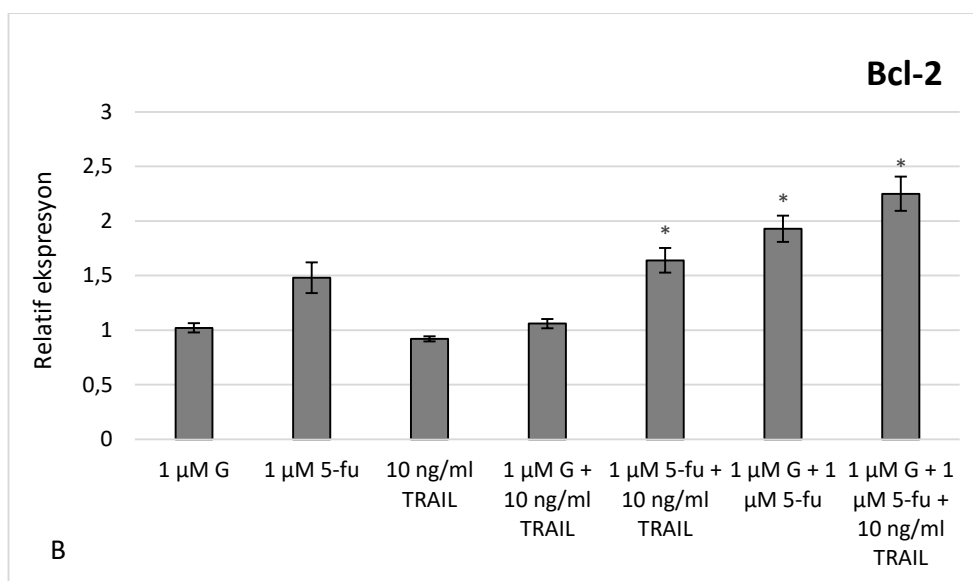
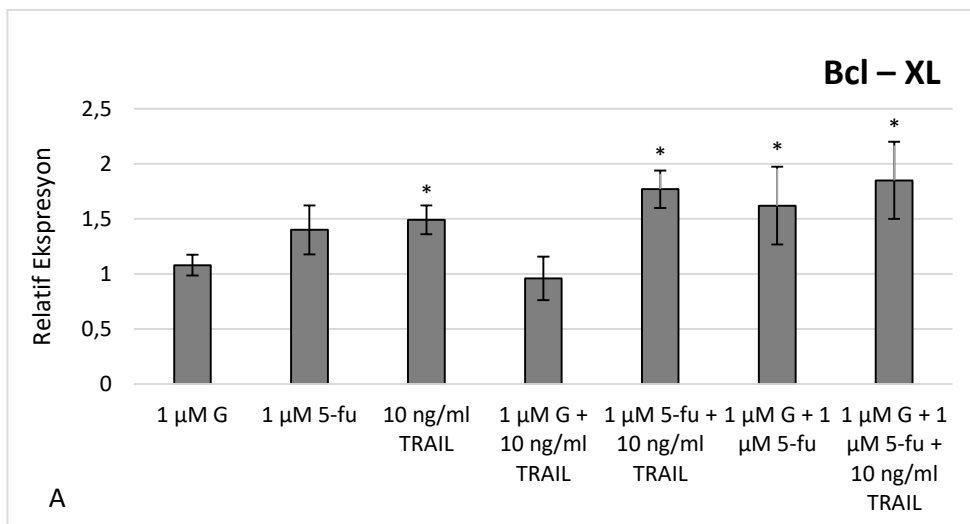
<b>Dozlar / Genler</b>	<b>GAPDH</b>	<b>Bcl – XL</b>	<b>Bcl-2</b>	<b>XIAP</b>
<b>1 µM G</b>	1	1,08	1,02	-1,08
<b>1 µM 5-fu</b>	1	1,4	1,48	<b>-2,04</b>
<b>10 ng/mL TRAIL</b>	1	<b>1,49</b>	-1,08	<b>8539,88</b>
<b>1 µM G + 10 ng/mL TRAIL</b>	1	-1,04	1,06	<b>-2,27</b>
<b>1 µM 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	1	<b>1,77</b>	<b>1,64</b>	<b>-3,94</b>
<b>1 µM G + 1 µM 5-fu</b>	1	<b>1,62</b>	<b>1,93</b>	<b>-3,54</b>
<b>1 µM G + 1 µM 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	1	<b>1,85</b>	<b>2,25</b>	<b>-3,24</b>

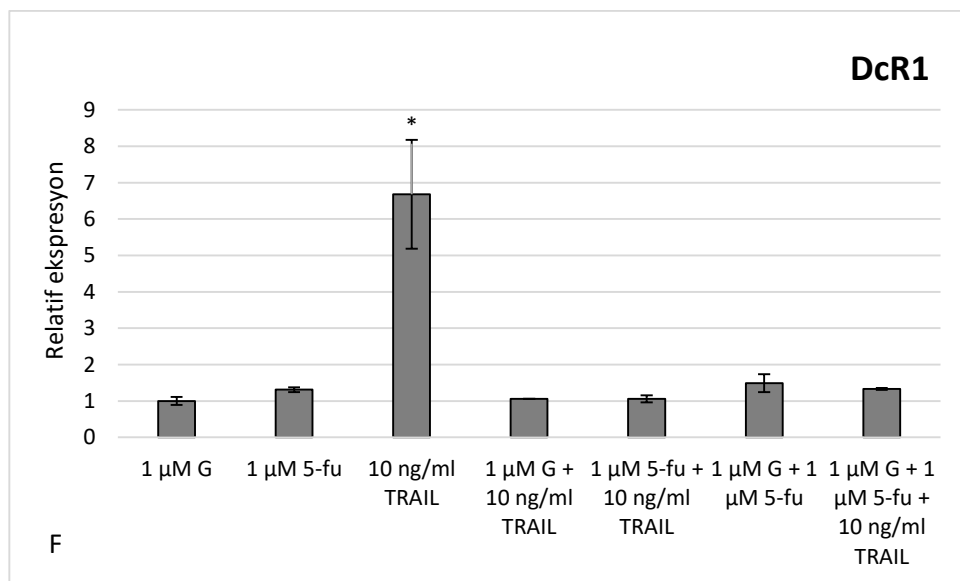
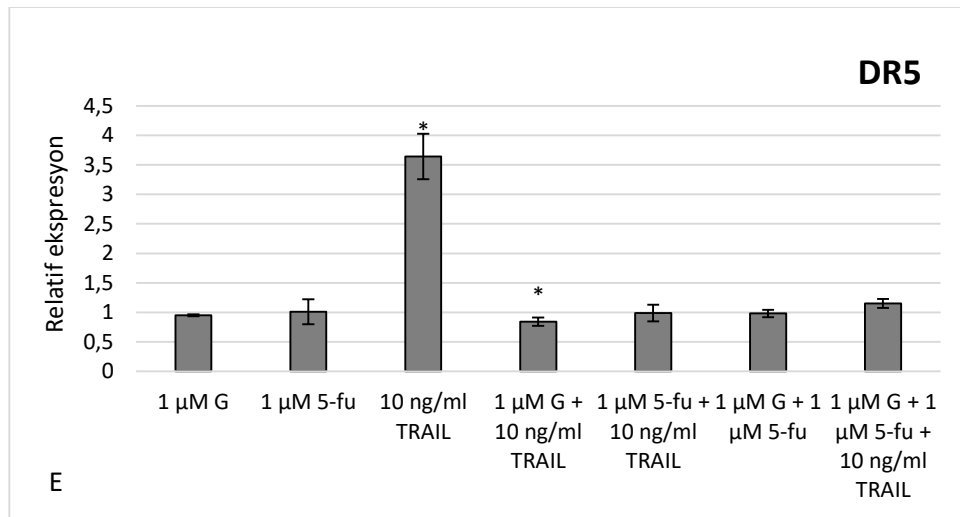
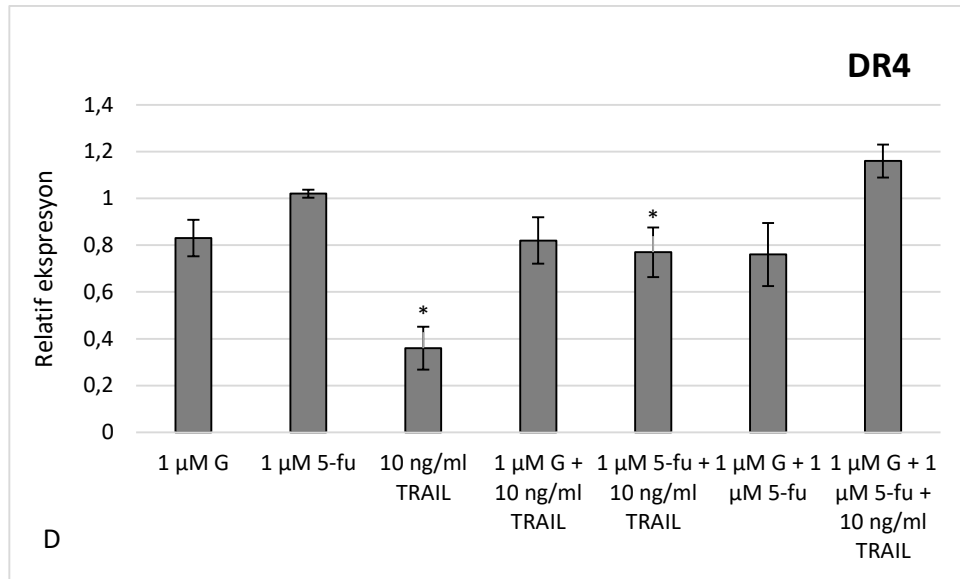
(Sonuçlar negatif kontrol ve çözücü kontrol gruplarına karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni GAPDH değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Kırmızıyla gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı artmayı, maviyle gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı azalmayı temsil etmektedir. Anlamlılık  $p < 0,05$ 'e göre hesaplanmıştır.)

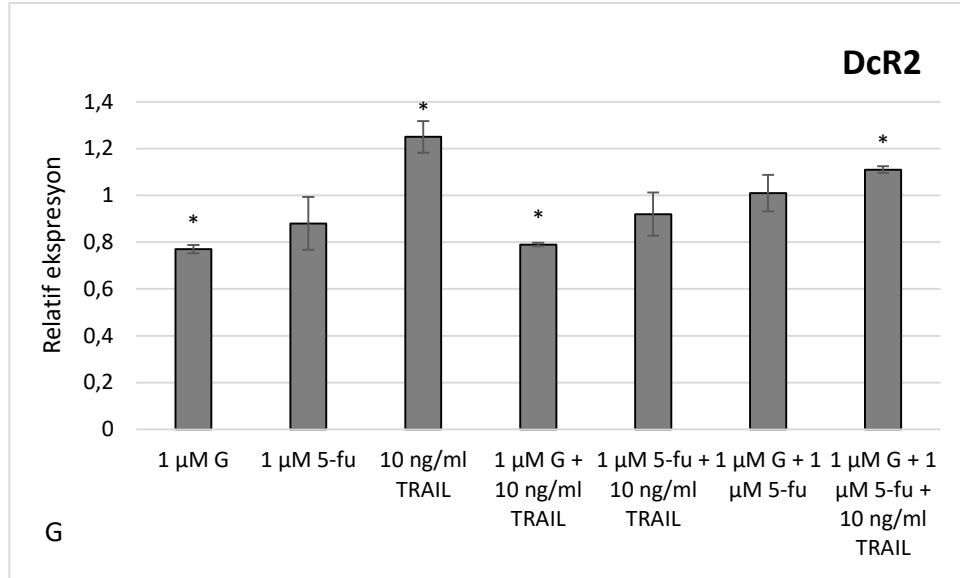
**Tablo 4.10.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait kat regülasyonu değerleri.

Dozlar / Genler	DR4	DR5	DcR1	DcR2
<b>1 <math>\mu</math>M G</b>	-1,2	-1,05	1	<b>-1,31</b>
<b>1 <math>\mu</math>M 5-fu</b>	1,02	1,01	1,31	-1,14
<b>10 ng/mL TRAIL</b>	<b>-2,77</b>	<b>3,64</b>	<b>6,68</b>	<b>1,25</b>
<b>1 <math>\mu</math>M G + 10 ng/mL TRAIL</b>	-1,23	<b>-1,2</b>	1,06	<b>-1,27</b>
<b>1 <math>\mu</math>M 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	<b>-1,31</b>	-1,01	1,06	-1,09
<b>1 <math>\mu</math>M G + 1 <math>\mu</math>M 5-fu</b>	-1,32	-1,02	1,49	1,01
<b>1 <math>\mu</math>M G + 1 <math>\mu</math>M 5-fu + 10 ng/mL TRAIL</b>	1,16	1,15	1,33	<b>1,11</b>

(Sonuçlar negatif kontrol ve çözücü kontrol gruplarına karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni GAPDH değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Kırmızıyla gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı artmayı, maviyle gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı azalmayı temsil etmektedir. Anlamlılık  $p < 0,05$ 'e göre hesaplanmıştır.)







**Şekil 4.13.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW480 hücrelerindeki kontrol gruplarına kıyasla kat değişimi değerleri A) Bcl – XL ekspresyonu, B) Bcl – 2 ekspresyonu, C) XIAP ekspresyonu, D) DR4 ekspresyonu, E) DR5 ekspresyonu, F) DcR1 ekspresyonu, G) DcR2 ekspresyonu.

#### 4.5.2. Genistein, 5 – florourasil ve TRAIL’ın SW620 Hücrelerinde 48 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Gen Ekspresyon Analizlerine Ait Bulgular

SW620 hücrelerinde negatif kontrol, çözücü kontrol (%0,5 DMSO), genistein, 5 – florourasil ve TRAIL dozlarına ait Ct değerleri Tablo 4.11. ve Tablo 4.12’de verilmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken üst sınır Ct değeri 35 olarak alınmıştır. 35’ten daha yüksek değerler de 35 olarak kabul edilmiştir. GAPDH geni kontrol geni olarak kullanılmıştır. Genistein, 5 – florourasil ve kombinasyonları çözücü kontrol ile, TRAIL grubu ise negatif kontrol ile kıyaslanmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.  $\Delta$ Ct değerleri incelendiğinde kontrol gruplarına kıyasla, Bcl – XL ve DR5 genleri için, tüm gruplarda azalma; Bcl – 2 geni için, “5 ng/mL TRAIL” grubu dışındaki gruplarda azalma; XIAP geni için, “1 μM 5 – fu + 5 ng/mL TRAIL” grubunda artış gözlenirken diğer gruplarda azalış; DR4 geni için, “5 ng/mL TRAIL” grubunda artma ile diğer gruplarda azalma belirlenmiştir. DcR1 geni için, “0,5 μM G + 5 ng/mL TRAIL”, “0,5 μM G + 1 μM 5 – fu” ve “0,5 μM G + 1 μM 5 – fu + 5 ng/mL TRAIL” grupları dışındaki gruplarda azalma; DcR2 geni için, “0,5 μM G + 5 ng/mL TRAIL” grubu dışındaki gruplarda azalma gözlenmiştir.

$2^{-\Delta Ct}$  değerlerine bakıldığında kontrol gruplarına kıyasla, Bcl – XL ve DR5 genleri için, tüm gruplarda artma; Bcl – 2 geni için, “5 ng/mL TRAIL” grubu dışındaki gruplarda artma; XIAP geni için, “1  $\mu$ M 5 – fu + 5 ng/mL TRAIL” grubunda azalma gözlenirken diğer gruplarda artma; DR4 geni için, “5 ng/mL TRAIL” grubunda azalma ile diğer gruplarda artma belirlenmiştir. DcR1 geni için, “0,5  $\mu$ M G + 5 ng/mL TRAIL”, “0,5  $\mu$ M G + 1  $\mu$ M 5 – fu” ve “0,5  $\mu$ M G + 1  $\mu$ M 5 – fu + 5 ng/mL TRAIL” grupları dışındaki gruplarda artma; DcR2 geni için, “0,5  $\mu$ M G + 5 ng/mL TRAIL” grubu dışındaki gruplarda artma gözlenmiştir.

Kat değişimi ve kat regülasyonu değerleri incelendiğinde kontrol gruplarına kıyasla Bcl – XL geni için tüm gruplarda anlamlı artış; Bcl – 2 geni için, “5 ng/mL TRAIL” grubunda anlamlı azalma ile diğer gruplarda anlamlı artma; XIAP geni için, “5 ng/mL TRAIL” grubunda anlamlı artış; DR4 geni için, “5 ng/mL TRAIL” grubu dışındaki gruplarda anlamlı artış; DR5 ve DcR1 genler için “5 ng/mL TRAIL” ve “1  $\mu$ M F + 5 ng/mL TRAIL” gruplarında anlamlı artış, DcR1 geni için, “0,5  $\mu$ M G + 5 ng/mL TRAIL” grubunda anlamlı azalma; DcR2 geni için ise, “0,5  $\mu$ M G” ve “0,5  $\mu$ M G + 5 ng/mL TRAIL” grupları dışındaki gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür.

**Tablo 4.11.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait ortalama Ct değerleri.

<b>Dozlar / Genler</b>	<b>GAPDH</b>	<b>Bcl – XL</b>	<b>Bcl-2</b>	<b>XIAP</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	11,34 ± 0,07	16,95 ± 0,14	23,48 ± 0,01	23,32 ± 4,32
<b>Çözücü Kontrol (% 0,5 DMSO)</b>	11,73 ± 0,00	17,23 ± 0,00	24,85 ± 0,00	20,43 ± 0,96
<b>0,5 µM G</b>	11,95 ± 0,30	16,8 ± 0,24	24,11 ± 0,04	20,34 ± 0,81
<b>1 µM 5-fu</b>	11,77 ± 0,05	16,88 ± 0,17	24,12 ± 0,04	19,59 ± 0,89
<b>5 ng/mL TRAIL</b>	11,77 ± 0,03	16,88 ± 0,17	24,38 ± 0,06	20,42 ± 1,22
<b>0,5 µM G + 5 ng/mL TRAIL</b>	11,73 ± 0,00	17,12 ± 0,00	24,33 ± 0,02	19,95 ± 0,66
<b>1 µM 5-fu + 5 ng/mL TRAIL</b>	11,68 ± 0,00	16,79 ± 0,20	24,05 ± 0,09	20,41 ± 1,34
<b>0,5 µM G + 1 µM 5-fu</b>	11,68 ± 0,02	16,84 ± 0,21	24,36 ± 0,28	19,59 ± 0,99
<b>0,5 µM G + 1 µM 5-fu + 5 ng/mL TRAIL</b>	11,7 ± 0,00	17,1 ± 0,05	24,16 ± 0,02	19,42 ± 0,88

(Sonaçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.)



**Tablo 4.12.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait ortalama Ct değerleri.

<b>Dozlar / Genler</b>	<b>DR4</b>	<b>DR5</b>	<b>DcR1</b>	<b>DcR2</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	19,23 ± 0,14	19,34 ± 0,02	28,14 ± 0,75	20,43 ± 0,02
<b>Çözücü Kontrol (% 0,5 DMSO)</b>	20,13 ± 0,04	19,15 ± 0,83	27,12 ± 0,11	20,53 ± 0,05
<b>0,5 µM G</b>	19,45 ± 0,17	18,56 ± 0,69	26,93 ± 0,42	20 ± 0,24
<b>1 µM 5-fu</b>	19,56 ± 0,17	18,32 ± 0,43	27,09 ± 0,06	20,34 ± 0,02
<b>5 ng/mL TRAIL</b>	19,82 ± 0,35	18,7 ± 0,35	27,3 ± 0,19	20,48 ± 0,02
<b>0,5 µM G + 5 ng/mL TRAIL</b>	19,5 ± 0,11	18,3 ± 0,27	27,4 ± 0,05	20,64 ± 0,35
<b>1 µM 5-fu + 5 ng/mL TRAIL</b>	20,41 ± 0,16	18,12 ± 0,23	26,68 ± 0,28	20,31 ± 0,10
<b>0,5 µM G + 1 µM 5-fu</b>	19,59 ± 0,12	18,27 ± 0,04	27,1 ± 0,15	20,25 ± 0,06
<b>0,5 µM G + 1 µM 5-fu + 5 ng/mL TRAIL</b>	19,42 ± 0,15	18,31 ± 0,13	27,19 ± 0,15	20,37 ± 0,05

(Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.)

**Tablo 4.13.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait ortalama  $\Delta Ct$  değerleri.

<b>Dozlar / Genler</b>	<b>GAPDH</b>	<b>Bcl – XL</b>	<b>Bcl-2</b>	<b>XIAP</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	0	5,62 ± 0,06	12,14 ± 0,05	11,99 ± 4,24
<b>Çözücü Kontrol (% 0,5 DMSO)</b>	0	5,5 ± 0,00	13,12 ± 0,01	8,7 ± 0,96
<b>0,5 µM G</b>	0	4,86 ± 0,05	12,17 ± 0,34	8,39 ± 1,12
<b>1 µM 5-fu</b>	0	5,11 ± 0,12	12,36 ± 0,09	7,83 ± 0,94
<b>5 ng/mL TRAIL</b>	0	5,11 ± 0,14	12,61 ± 0,10	8,65 ± 1,26
<b>0,5 µM G + 5 ng/mL TRAIL</b>	0	5,4 ± 0,01	12,61 ± 0,02	8,22 ± 0,66
<b>1 µM 5-fu + 5 ng/mL TRAIL</b>	0	5,11 ± 0,20	12,38 ± 0,09	8,73 ± 1,34
<b>0,5 µM G + 1 µM 5-fu</b>	0	5,17 ± 0,19	12,68 ± 0,31	7,91 ± 1,02
<b>0,5 µM G + 1 µM 5-fu + 5 ng/mL TRAIL</b>	0	5,4 ± 0,05	12,46 ± 0,02	7,72 ± 0,88

(Sonaçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.)

**Tablo 4.14.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait ortalama  $\Delta C_t$  değerleri.

<b>Dozlar / Genler</b>	<b>DR4</b>	<b>DR5</b>	<b>DcR1</b>	<b>DcR2</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	7,89 ± 0,06	8,00 ± 0,05	16,81 ± 0,83	9,09 ± 0,10
<b>Çözücü Kontrol (% 0,5 DMSO)</b>	8,41 ± 0,05	7,42 ± 0,83	15,39 ± 0,12	8,8 ± 0,06
<b>0,5 µM G</b>	7,5 ± 0,48	6,62 ± 0,99	14,98 ± 0,72	8,05 ± 0,54
<b>1 µM 5-fu</b>	7,79 ± 0,22	6,56 ± 0,48	15,32 ± 0,01	8,57 ± 0,07
<b>5 ng/mL TRAIL</b>	8,05 ± 0,38	6,93 ± 0,38	15,54 ± 0,22	8,71 ± 0,05
<b>0,5 µM G + 5 ng/mL TRAIL</b>	7,77 ± 0,12	6,58 ± 0,27	15,68 ± 0,05	8,92 ± 0,35
<b>1 µM 5-fu + 5 ng/mL TRAIL</b>	7,77 ± 0,16	6,44 ± 0,23	14,99 ± 0,28	8,63 ± 0,10
<b>0,5 µM G + 1 µM 5-fu</b>	7,75 ± 0,15	6,6 ± 0,06	15,42 ± 0,12	8,58 ± 0,09
<b>0,5 µM G + 1 µM 5-fu + 5 ng/mL TRAIL</b>	7,76 ± 0,15	6,61 ± 0,13	15,49 ± 0,15	8,67 ± 0,05

(Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.)

**Tablo 4.15.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait ortalama  $2^{-\Delta Ct}$  değerleri.

<b>Dozlar / Genler</b>	<b>GAPDH</b>	<b>Bcl – XL</b>	<b>Bcl-2</b>	<b>XIAP</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	1	0,020333	0,000222	0,000246
<b>Çözücü Kontrol (% 0,5 DMSO)</b>	1	0,022097	0,000112	0,002405
<b>0,5 <math>\mu</math>M G</b>	1	0,034435	0,000217	0,002971
<b>1 <math>\mu</math>M 5-fu</b>	1	0,028956	0,000191	0,004395
<b>5 ng/mL TRAIL</b>	1	0,029056	0,00016	0,002481
<b>0,5 <math>\mu</math>M G + 5 ng/mL TRAIL</b>	1	0,023683	0,000161	0,003354
<b>1 <math>\mu</math>M 5-fu + 5 ng/mL TRAIL</b>	1	0,029056	0,000188	0,002347
<b>0,5 <math>\mu</math>M G + 1 <math>\mu</math>M 5-fu</b>	1	0,027873	0,000152	0,004158
<b>0,5 <math>\mu</math>M G + 1 <math>\mu</math>M 5-fu + 5 ng/mL TRAIL</b>	1	0,023601	0,000177	0,004743

(Kontrol geni GAPDH değeri 1 olarak hesaplanmıştır.)

**Tablo 4.16.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait ortalama  $2^{-\Delta Ct}$  değerleri.

<b>Dozlar / Genler</b>	<b>DR4</b>	<b>DR5</b>	<b>DcR1</b>	<b>DcR2</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	0,004216	0,003893	0,000009	0,001835
<b>Çözücü Kontrol (% 0,5 DMSO)</b>	0,00295	0,005819	0,000023	0,002236
<b>0,5 <math>\mu</math>M G</b>	0,005524	0,010202	0,000031	0,00376
<b>1 <math>\mu</math>M 5-fu</b>	0,004503	0,010598	0,000024	0,002622
<b>5 ng/mL TRAIL</b>	0,00376	0,008173	0,000021	0,002388
<b>0,5 <math>\mu</math>M G + 5 ng/mL TRAIL</b>	0,004566	0,010453	0,000019	0,002064
<b>1 <math>\mu</math>M 5-fu + 5 ng/mL TRAIL</b>	0,004581	0,011518	0,000031	0,002515
<b>0,5 <math>\mu</math>M G + 1 <math>\mu</math>M 5-fu</b>	0,004661	0,010309	0,000023	0,002613
<b>0,5 <math>\mu</math>M G + 1 <math>\mu</math>M 5-fu + 5 ng/mL TRAIL</b>	0,004613	0,010237	0,000022	0,002464

(Kontrol geni GAPDH değeri 1 olarak hesaplanmıştır.)

**Tablo 4.17.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait kat değişimi değerleri.

Dozlar / Genler	GAPDH	Bcl – XL	Bcl-2	XIAP
0,5 µM G	1	1,56	1,93	1,24
1 µM 5-fu	1	1,31	1,7	1,83
5 ng/mL TRAIL	1	1,43	0,72	10,09
0,5 µM G + 5 ng/mL TRAIL	1	1,07	1,43	1,39
1 µM 5-fu + 5 ng/mL TRAIL	1	1,31	1,68	0,98
0,5 µM G + 1 µM 5-fu	1	1,26	1,36	1,73
0,5 µM G + 1 µM 5-fu + 5 ng/mL TRAIL	1	1,07	1,58	1,97

(Sonuçlar negatif kontrol ve çözücü kontrol gruplarına karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni GAPDH değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Kırmızıyla gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı artmayı, maviyle gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı azalmayı temsil etmektedir. Anlamlılık  $p < 0,05$ 'e göre hesaplanmıştır.)

**Tablo 4.18.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait kat değişimi değerleri.

Dozlar / Genler	DR4	DR5	DcR1	DcR2
0,5 $\mu$ M G	<b>1,87</b>	1,75	1,33	1,68
1 $\mu$ M 5-fu	<b>1,53</b>	1,82	1,05	<b>1,17</b>
5 ng/mL TRAIL	0,89	<b>2,1</b>	<b>2,42</b>	<b>1,3</b>
0,5 $\mu$ M G + 5 ng/mL TRAIL	<b>1,55</b>	1,8	<b>0,82</b>	0,92
1 $\mu$ M 5-fu + 5 ng/mL TRAIL	<b>1,55</b>	<b>1,98</b>	<b>1,32</b>	<b>1,13</b>
0,5 $\mu$ M G + 1 $\mu$ M 5-fu	<b>1,58</b>	1,77	0,98	<b>1,17</b>
0,5 $\mu$ M G + 1 $\mu$ M 5-fu + 5 ng/mL TRAIL	<b>1,56</b>	1,76	0,94	<b>1,1</b>

(Sonuçlar negatif kontrol ve ozc kontrol gruplarına karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni GAPDH değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Kırmızıyla gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı artmayı, maviyle gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı azalmayı temsil etmektedir. Anlamlılık  $p < 0,05$ 'e göre hesaplanmıştır.)

**Tablo 4.19.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki GAPDH, Bcl-XL, Bcl-2 ve XIAP genlerine ait kat regülasyonu değerleri.

Dozlar / Genler	GAPDH	Bcl – XL	Bcl-2	XIAP
0,5 µM G	1	1,56	1,93	1,24
1 µM 5-fu	1	1,31	1,7	1,83
5 ng/mL TRAIL	1	1,43	-1,39	10,09
0,5 µM G + 5 ng/mL TRAIL	1	1,07	1,43	1,39
1 µM 5-fu + 5 ng/mL TRAIL	1	1,31	1,68	-1,02
0,5 µM G + 1 µM 5-fu	1	1,26	1,36	1,73
0,5 µM G + 1 µM 5-fu + 5 ng/mL TRAIL	1	1,07	1,58	1,97

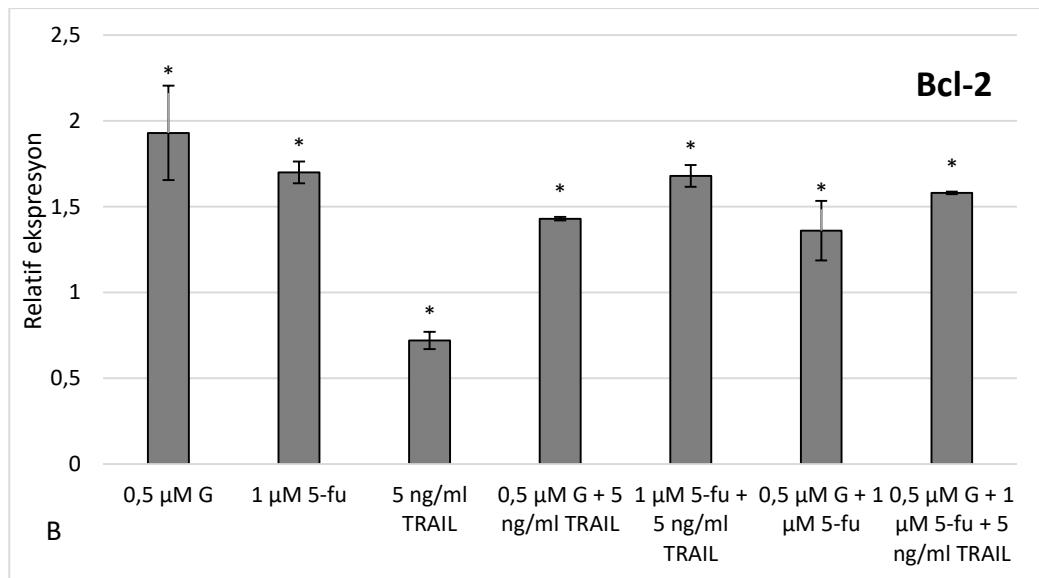
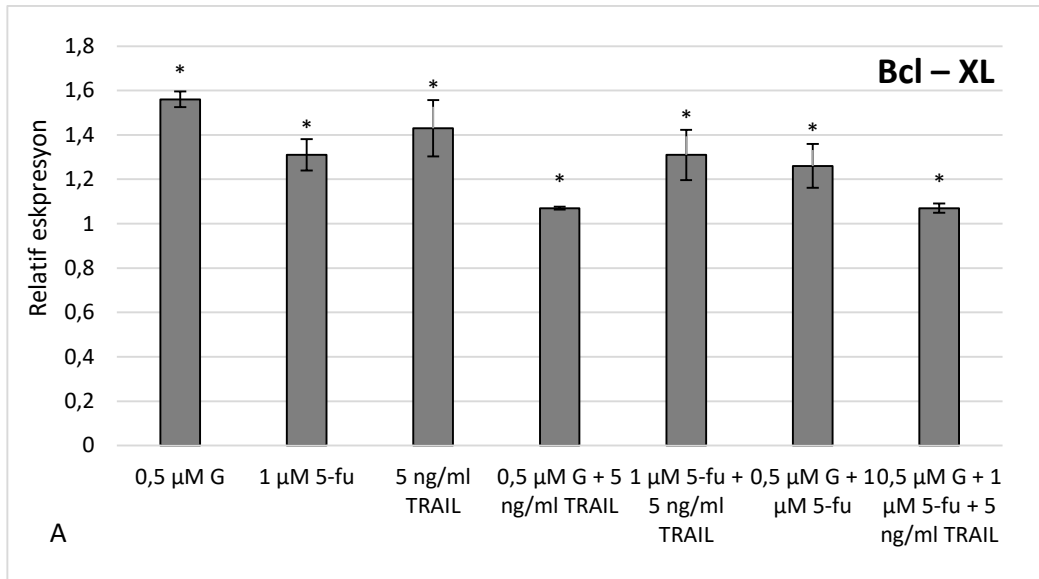
(Sonuçlar negatif kontrol ve çözücü kontrol gruplarına karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni GAPDH değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Kırmızıyla gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı artmayı, maviyle gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı azalmayı temsil etmektedir. Anlamlılık  $p < 0,05$ 'e göre hesaplanmıştır.)

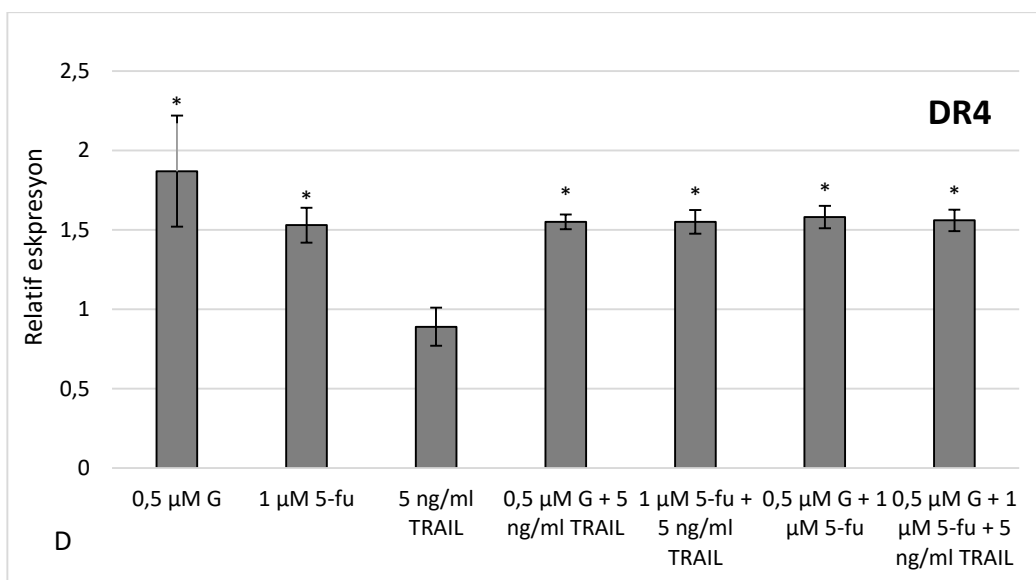
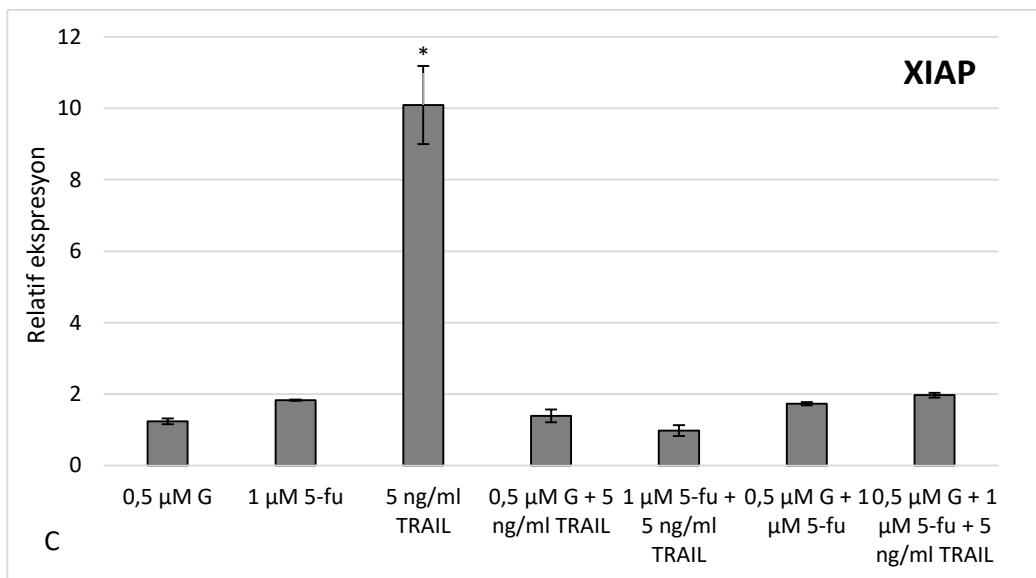


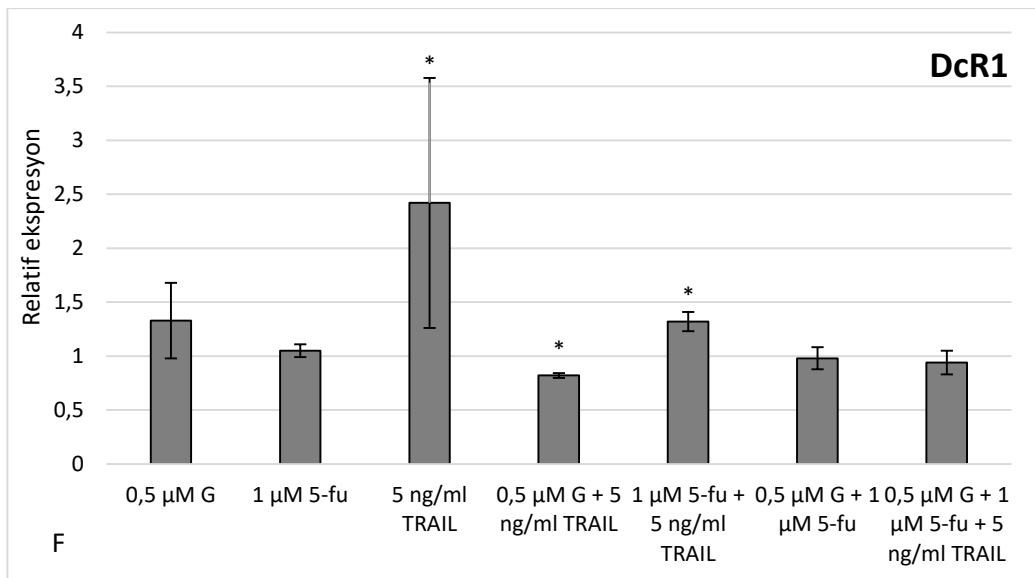
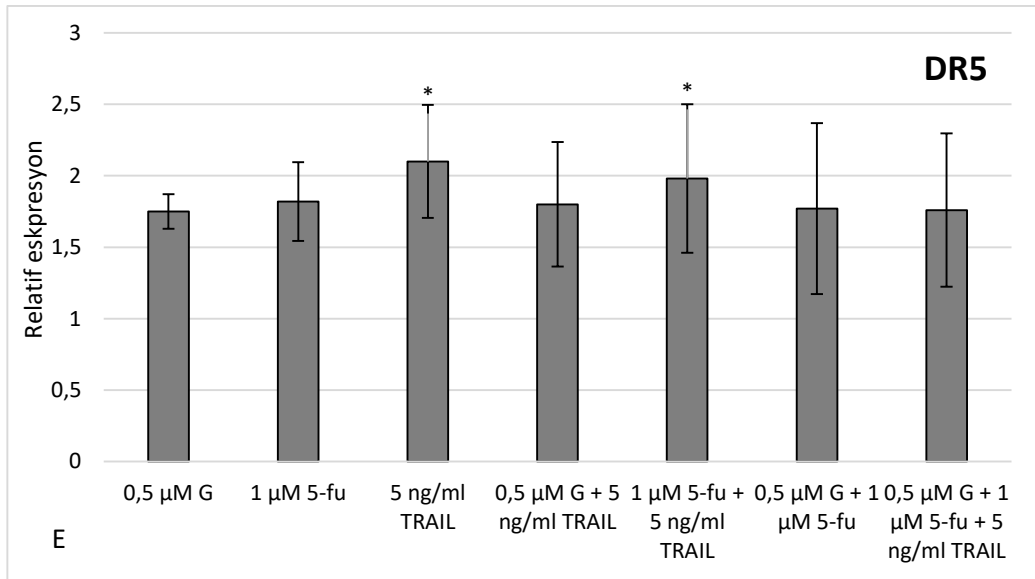
**Tablo 4.20.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerine ait kat regülasyonu değerleri.

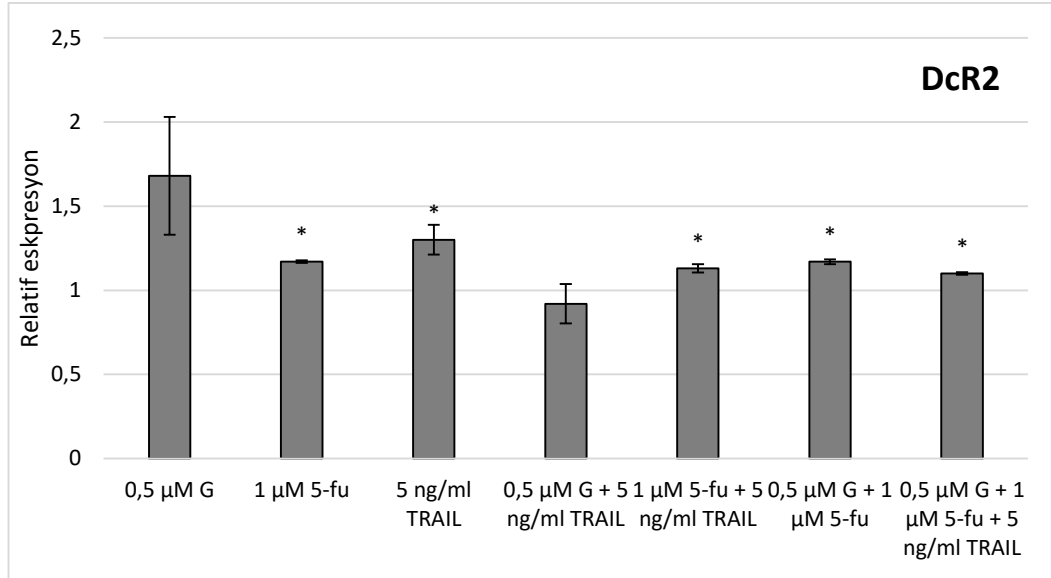
Dozlar / Genler	DR4	DR5	DcR1	DcR2
0,5 $\mu$ M G	<b>1,87</b>	1,75	1,33	1,68
1 $\mu$ M 5-fu	<b>1,53</b>	1,82	1,05	<b>1,17</b>
5 ng/mL TRAIL	-1,12	<b>2,1</b>	<b>2,42</b>	<b>1,3</b>
0,5 $\mu$ M G + 5 ng/mL TRAIL	<b>1,55</b>	1,8	<b>-1,22</b>	-1,08
1 $\mu$ M 5-fu + 5 ng/mL TRAIL	<b>1,55</b>	<b>1,98</b>	<b>1,32</b>	<b>1,13</b>
0,5 $\mu$ M G + 1 $\mu$ M 5-fu	<b>1,58</b>	1,77	-1,02	<b>1,17</b>
0,5 $\mu$ M G + 1 $\mu$ M 5-fu + 5 ng/mL TRAIL	<b>1,56</b>	1,76	-1,06	<b>1,1</b>

(Sonuçlar negatif kontrol ve çözücü kontrol gruplarına karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni GAPDH değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Kırmızıyla gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı artmayı, maviyle gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı azalmayı temsil etmektedir. Anlamlılık  $p < 0,05$ 'e göre hesaplanmıştır.)









**Şekil 4.14.** Genistein (G), 5 – florourasil (5 – fu) ve TRAIL ligandının SW620 hücrelerindeki kontrol gruplarına kıyasla kat değişimi değerleri. **A)** Bcl – XL ekspresyonu, **B)** Bcl – 2 ekspresyonu, **C)** XIAP ekspresyonu, **D)** DR4 ekspresyonu, **E)** DR5 ekspresyonu, **F)** DcR1 ekspresyonu, **G)** DcR2 ekspresyonu.

## 5. TARTIŞMA

Kolorektal kanser insidansı ve mortalitesi dünya genelinde değişiklik göstermekle birlikte, GLOBOCAN (2018) verilerine göre erkeklerde teşhisi konulan kanserler arasında üçüncü sırada ve kadınlarda ikinci sıradadır (21, 125). Genel popülasyonda yaşam boyu kolorektal kanser riski yaklaşık yüzde 5 ila 6 olmakla birlikte ailesel riski olan hastalar kolorektal kanserli tüm hastaların yaklaşık yüzde 20'sini oluşturmakta ve kolorektal kanserin otozomal dominant bir şekilde aktarıldığı bilinmektedir (126).

Kolorektal kanser, iyi huylu bir adenomatöz polip olarak başlamakta, genomik instabilite, DNA onarım hataları, tümör baskılayıcı gen mutasyonları gibi kalıtsal mekanizmalar ile obezite, fiziksel inaktivite, sebze ve meyve bakımından fakir diyet gibi çevresel faktörlerin etkisiyle invaziv bir kansere ilerlemektedir (2, 127). Sistemik tedavideki gelişmelere rağmen 5 yıllık sağ kalım oranı %12,5 düzeyindedir ve metastatik kolorektal kanser tedavisinde uygulanan kemoterapötik kombinasyonu hastaların %90'ında görülen tedavi direnci nedeniyle başarısız olmaktadır (128). Bu nedenle, tedavi direnç mekanizmalarının belirlenerek çözüm yollarının aranması önemlidir (129).

Apoptotik süreçlerdeki aksaklıkların da antikanser ilaç veya radyoterapi direncine sebep olmasından (107) yola çıkılarak bu çalışma kapsamında antikanser etkinliği bilinen genistein, kolorektal kanser tedavisinin temeli olan 5 – fluorourasil ve ekstrinsik yolak üzerinden apoptoz indüksiyonu sağlayan Tümör Nekroz Faktör (TNF) - ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL)'ın sitotoksik, genotoksik, apoptotik etkilerinin ikili / üçlü kombinasyonlar halinde, SW480 ve SW620 (insan kolon adenokarsinoma) hücre hatlarında değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Genistein, soya fasulyesinde bulunan, epidemiyolojik çalışmalarda kanser insidansında azalmaya neden olması özelliğiyle dikkat çekmiş bir fitoöstrojenik bileşiktir. Ayrıca, çeşitli kanser türleri için yürütülen Faz II klinik çalışmalarda yer almaktadır. Genisteinin maksimum plazma konsantrasyonu 2,7 – 27,4  $\mu$ M arasında değişmektedir ve minimum yan etkilerle güvenilir şekilde kullanılabilme potansiyeline sahiptir (130). Literatürde yer alan çalışmalarda genisteinin doksorubisin, paklitaksel gibi antikanser ilaçların hücre canlılığı inhibisyonu ve apoptotik etkilerini arttırdığı belirlenmiştir (11, 88, 93). Zhu ve ark. tarafından

NCM460 kolon mukoza epitel hücreleri ve HT29, SW620, LoVo, HCT116 kolon kanser hücre hatlarında yapılan bir çalışmada genisteinin konsantrasyon ve süreyle orantılı şekilde hücre canlılığını inhibe ettiği, 72 saat inkübasyonun sonunda 60 µmol/L genisteinin HT29 hücre canlılığını %38 seviyesine düşürdüğü görülmüştür (131). HT29 hücrelerinde yapılan literatürdeki çalışmalarda, 60 µM genistein ile 72 saat inkübasyonun hücre canlılığının %67,3 düzeyinde, 200 µM ve 48 saat inkübasyonda %47 olduğu, başka bir çalışmada ise IC<sub>50</sub> değerinin 48 saat için 50 µM olduğu belirlenmiştir (132-135). Literatürde SW480 hücrelerinin 80 µg/mL genisteinin 72 saat inkübasyon için hücre canlılığını %60,2 düzeyine indirdiği (136), ve SW620 hücrelerinin 100 µM genistein ile 48 saat inkübasyonunun hücre canlılığını %40'ın altına düşürdüğü belirlenmiştir (137). Genisteinin etkileri hücrenin özelliklerine göre değişkenlik göstermektedir (138). Çalışmamızda da literatürle uyumlu şekilde, genisteinin SW480 ve SW620 hücre canlılıklarını doz ve zamanla doğru orantılı olarak azalttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, SW480 hücrelerinin önceki çalışmaların aksine genisteinin sitotoksik etkilerine karşı SW620 hücrelerinden daha dirençli olduğu belirlenmiştir (139).

Literatürdeki genistein ve 5-florourasil'in kombinasyon halinde kolon kanseri hücrelerine uygulandığı çalışmalar incelendiğinde, LoVo hücrelerinde genisteinin 5-florourasilin sitotoksik etkilerini arttırdığı belirlenmiştir (140). HT29 hücrelerinde de bu kombinasyonun sinerjistik etkili olduğu ve apoptozu indüklediği görülmüştür (141, 142). Otofajik hücre ölümü de genisteinin sitotoksik etki mekanizmaları içinde yer almaktadır (143). Çalışmamızda ise, genistein ve 5-florourasil'in toksik olmayan konsantrasyonlarıyla yapılan kombinasyonları için sitotoksik etkinin arttığı ve sinerjistik etki gösterdikleri belirlenmiştir.

Genistein ve TRAIL ile yapılmış çalışmalar incelendiğinde, kolon kanserinde yapılmış bir çalışma bulunmadığı, ancak AGS gastrik adenokarsinoma hücrelerinde (95), endometriyal kanser hücrelerinde (10) ve Hep3B insan hepatoselüler karsinoma hücrelerinde (96) çalışmamızla uyumlu şekilde genisteinin TRAIL'in indüklediği apoptotik etkiyi arttırdığı görülmüştür. Genistein, 5-florourasil ve TRAIL ile inkübasyon sonrasındaki test maddesiz inkübasyon süresince hücrelerin kendilerini

yenileme ve yeniden çoğalma yeteneklerinin azalmış olmasıyla da hücrelerde apoptotik etkiler gibi geri dönüşümsüz değişikliklerin olduğu gösterilmiştir (144).

Metastatik hücre hattı olan SW620 hücrelerinin SW480 hücrelerine göre TRAIL'in indüklediği apoptoza daha dirençli olduğu bilinmektedir (145). Ancak, çalışmamızda TRAIL'in tek uygulandığı konsantrasyonlarda SW480 hücreleri daha dirençli bulunmuş ve direnç mekanizmalarında yer alan artmış XIAP ekspresyonunun görülen direnç mekanizmasında rol alabileceği düşünülmüştür (8).

Literatürde genisteinin G0/G1 ve G2/M fazlarında birikime neden olarak sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir (87, 146). 5-florourasil de G2/M ve S fazlarında birikim ile sitotoksik etki göstermektedir (147-149). Çalışmamızda genistein, 5-florourasil ve TRAIL kombinasyonlarının SW480 hücrelerinde G2/M fazındaki hücre birikimini, SW620 hücrelerinde ise S fazındaki hücre birikimini arttırdığı tespit edilmiştir. SW620 hücrelerinin S fazındaki birikiminin uzamış S fazının hücreyi duyarlı hale getirmesiyle ilişkili olabileceği ve bu aşamada DNA tek zincir kırıklarının görülebileceği belirlenmiştir (150). Uygulanan üçlü kombinasyonun ise her iki hücrede de S fazı birikimini arttırdığı belirlenmiş ve S fazı birikiminin 5-florourasil'in sitotoksik etkisini arttırdığı önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (151). Ayrıca, G0/G1 ve G2/M hücre siklusu evrelerinin DNA hasarı için kontrol noktaları olduğu ve bu aşamalarda siklin bağımlı kinazların inaktivasyonu ile mitozaya girişin engellendiği bilinmektedir (152).

Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'in SW480 ve SW620 hücrelerindeki DNA hasarını arttırdığı, SW480 hücrelerinde üçlü kombinasyonun; SW620 hücrelerinde genistein + TRAIL kombinasyonunun negatif kontrole kıyasla ( $p < 0,001$ ) DNA hasarını en fazla arttıran gruplar oldukları görülmüştür. Genisteinin, transkripsiyon ve replikasyon sırasında DNA bütünlüğünü sağlayan topoizomeraz II enzimini inhibe ederek DNA hasarını arttırdığı bilinmektedir (153, 154). DNA hasarı artışının ise, kanser hücrelerindeki NF- $\kappa$ B inaktivasyonu ve normal hücrelerdeki TGF $\beta$ 1 aktivasyonu etkisiyle selektif olduğu literatürdeki çalışmalarda görülmüştür (155). Ayrıca, ROS tayininde uygulanan kombinasyonların ROS artışının indüklenmesinde tekli madde gruplarına göre daha etkili olduğu görülmüştür. ROS artışının ise, 8-oksoguanin gibi DNA bazlarının oksidasyonu aracılığıyla DNA hasarı artışında rol



oynayabileceği bilinmektedir (156). Bununla birlikte, ROS artışı p53 bağımlı G1 fazı ve Chk1 (*checkpoint kinaz 1*) protein kinaz aktivasyonu aracılı G2 fazı hücre birikimini arttırabilmektedir (157). Bu nedenlerle, çalışmamızda görülen DNA hasarının ROS kaynaklı olabileceği ve G1 ile G2 fazındaki hücre birikimlerini etkileyebileceği düşünülmektedir.

Genisteinin kaspaz 3, 8 ve 9 aktivitesini arttırarak apoptoza aracılık ettiği literatürdeki çalışmalarda belirlenmiştir (135, 158, 159). Bu çalışmada da, genistein, 5-florourasil ve TRAIL kombinasyonlarında ve kaspaz 3 ile 8 düzeylerinde belirgin olmakla birlikte negatif kontrole kıyasla artış gözlenmiştir. Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) değerlendirildiğinde ise, SW480 hücrelerinde kombinasyon gruplarının ve SW620 hücrelerinde TRAIL'ın yer aldığı ikili kombinasyonların negatif kontrole kıyasla MMP düzeyinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. TRAIL aracılı ekstrinsik apoptotik yolağın aktivasyonunda kaspaz 3 ve 8 rol almaktadır. Kaspaz 8 aracılığıyla bölünen Bid, Bax ve Bak aracılığıyla mitokondriyal apoptotik yolağın (intrinsik) aktivasyonuna yol açmaktadır. İntrinsik yolağın aktivasyonunda DNA hasarı, hücre siklusu kontrol noktası hataları ve çeşitli hücrel stres faktörleri rol oynamaktadır (160). Çalışmamızdaki DNA hasarı, mitokondriyal membran potansiyeli, kaspaz 3,8 ve 9 düzeylerine dair bulgular da bu mekanizmayı desteklemektedir.

TRAIL ligandı, sadece tümör dokusunda apoptozu indüklemesiyle, hedefli tedaviye olanak sağlaması bakımından antikanser tedavi çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. Ancak, kanser hücrelerinde DR5'in çekirdek yüzeyinde artan lokalizasyonu, Bcl – 2, Bcl – XL'nin artan ekspresyonu, epidermal büyüme faktörü reseptörünün indüksiyonu, hücrel FLICE – benzeri inhibitör protein (cFLIP) ekspresyonu, NF –  $\kappa$ B sinyalizasyonu gibi mekanizmalarla TRAIL ligandının indüklediği apoptoza direnç görülebilmektedir (105, 161). Direnç mekanizmasının belirlenmesi ve ilgili mekanizmaya göre uygun kombinasyonların uygulanması direnç problemine çözüm bulunmasında uygulanan yöntemlerdendir.

Çalışmamızda genistein tek uygulandığında, SW480 hücrelerinde sadece DcR2 geninde anlamlı azalmaya neden olmuştur. TRAIL ligandının etkileştiği ve antiapoptotik hücre yüzey reseptörlerinden olan DcR1 ve DcR2 ekspresyonlarının

TRAIL direncinde rol aldığı bilinmektedir (162) ve uygulanan genistein dozunun SW480 hücrelerindeki direncin ortadan kaldırılmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Genisteinin tek uygulandığı SW620 hücrelerinde ise, Bcl – XL, Bcl – 2 ve DR4 gen ekspresyonlarında anlamlı artış görülmektedir. Bcl – XL ve Bcl – 2 antiapoptotik gen ekspresyonlarındaki artış TRAIL direncinde rol oyanayabilmektedir, aksine DR4 agonistik TRAIL reseptörü TRAIL’ın indüklediği apoptozda önemlidir ve hücrelerin apoptoza duyarlılığının sağlanmasında rol almaktadır (163). Genisteinin SW620 hücrelerinde DR4 ekspresyon artışıyla hücre apoptoz duyarlılığının sağlanmasına katkı sağlayabileceği, literatürde belirlenen genisteinin Bcl – XL (88) ve Bcl – 2 (134) gen ekspresyonlarında neden olduğu azalma etkisi için uygulanan konsantrasyonun yeterli olmadığı görülmüştür.

Genisteinin TRAIL ligandıyla kombinasyon halindeyken, SW480 hücrelerinde genistein ve TRAIL’ın tek uygulandığı gruplara göre antiapoptotik Bcl – XL ve XIAP genleri ile agonistik DR5 gen ekspresyonlarında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bu kombinasyonun uygulandığı SW620 hücrelerinde ise, genistein ve TRAIL’ın tek başına uygulandıkları gruplara göre Bcl – XL antiapoptotik geni ve DcR1 ile DcR2 antagonistik reseptör ekspresyonlarında (164) azalmaya, DR4 agonistik yüzey reseptöründe artışa neden olduğu görülmüştür. Genisteinin TRAIL ile kombinasyon halinde uygulandığı bir çalışmada, XIAP gen ekspresyonu üzerinde belirgin bir değişiklik oluşturmazken, Bcl – XL gen ekspresyonunda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (95). Bununla birlikte hücre direncinin XIAP gen ekspresyonundaki azalmayla ortadan kaldırılabilirliği (165), genisteinin de XIAP gen ekspresyonunda azalma sağlayabileceği de (166) bilinmektedir. Çalışmamızdaki her iki hücrede de, genistein ve TRAIL’ın kombinasyon halindeyken TRAIL ligandının tek başına uygulandığı gruba göre XIAP gen ekspresyonunda belirgin şekilde azalmaya neden olduğu görülmüştür.

5 – florourasil tek başına uygulandığında, SW480 hücrelerinde antiapoptotik XIAP geninde anlamlı azalmaya neden olurken; SW620 hücrelerinde Bcl – XL, Bcl – 2 antiapoptotik gen ekspresyonlarında, DR4 agonistik reseptör ile DcR2 antagonistik yüzey reseptör ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmuştur. Kolon kanseri hücrelerinde kemosenitivitenin Bcl – 2 ailesi proteinleriyle ilişkili

olduğu, özellikle Bcl – XL ve Bcl – 2 antiapoptotik gen ekspresyonlarının apoptoz direncinde rol aldığı tespit edilmiş ve çalışmamızla uyumlu şekilde 5 – flouorasilin tek başına SW620 hücrelerinde Bcl – XL ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür (167). Mizutani ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise, SW480 hücrelerinde olduğu gibi ekspresyonun anlamlı olarak değişmediği görülmüştür (168). Bununla birlikte, kanser hücrelerindeki direnç mekanizmasında yer alan XIAP gen ekspresyonunun (169) SW480 hücrelerinde uygulanan 5 – flouorasil ile literatürdeki çalışma sonuçlarıyla benzer şekilde (170) anlamlı azalması SW620 hücrelerinin 5 – flouorasil dirençli hücreler olduklarının göstergesidir.

5 – flouorasil, genistein ve TRAIL ligandının ikili ve üçlü kombinasyonlar halinde uygulandığı gruplar değerlendirildiğinde ise, SW480 hücrelerinde Bcl – XL, Bcl – 2 gen ekspresyonlarında anlamlı artış olduğu, bununla birlikte XIAP gen ekspresyonunun tüm kombinasyonlarda anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir. SW620 hücrelerinde ise, benzer şekilde Bcl – XL, Bcl – 2 ekspresyonlarında artış olduğu, TRAIL ligandının tek uygulandığı gruba göre XIAP gen ekspresyonunda azalma olduğu görülmüştür. Genistein ve 5 – flouorasil (141, 143) ile 5 – flouorasil ve TRAIL (171-173) kombinasyonlarının 50 – 100 M konsantrasyonlarında uygulandıklarında sinerjistik olarak DR5 ve p53 artışı, Bcl – 2 azalması sağlayarak apoptozu indükledikleri bilinmektedir. Genisteinin histon deasetilaz (HDAC) ve histon asetiltransferaz (HAT) inhibisyonu aracılığıyla p53 tümör baskılayıcı geni aktive ederek epigenetik mekanizmalarla da antikanser etki gösterdiği belirlenmiştir (174). Çalışmamızda ise, antiapoptotik ve proapoptotik gen ekspresyonlarının uygulanan ikili ve üçlü kombinasyonların etkisiyle benzer düzeyde etkilendiği, ancak TRAIL'ın tek uygulandığı gruba göre DcR1 ve XIAP antiapoptotik gen ekspresyonlarının belirgin şekilde azaldığı görülmüştür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kolorektal kanser, dünya genelinde görülme sıklığı en fazla olan kanserler arasındadır. Bununla birlikte, kalın barsak epitelinin malign transformasyonu sonucu ortaya çıkan kolorektal kanserin diğer organlara yayılma potansiyelinin varlığı kolorektal kanser çalışmalarının gerekliliğini ortaya koymaktadır. Genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin kolorektal kanser oluşum riskini etkileyebildiği, diyet ürünlerinin kolorektal kanser insidansındaki değişimde rol oynayabildiğine dair epidemiyolojik çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda sebze, meyve ve tahıl ağırlıklı beslenmenin kolorektal kanser riskini azaltabileceği ileri sürülmüştür. Kolorektal kanser riskini ya da kanser gelişimini azaltmak adına tavsiye edilen diyet kalite indekslerinden de yola çıkılarak sebze ve tahıllarda yer alan fitokimyasal maddelerden genisteinin, kemoterapötik tedavinin temeli 5-florourasil ve ekstrinsik yolak aracılığıyla apoptoz indüksiyonu sağlayan TRAIL ligandı ile tek başlarına ve kombinasyon halinde kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkileri bu tez kapsamında değerlendirilmiştir.

Genistein, 5-florourasil ve TRAIL'in kombinasyon halindeki sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerinin daha fazla olduğu, birlikte sinerjistik etki gösterdikleri belirlenmiştir. Bu etkilerin görülmesinde ROS artışının, mitokondriyel membran potansiyelindeki azalmanın ve kaspaz 3, 8, 9 aktivitelerindeki artışının rol oynanabileceği görülmüştür. Ayrıca, uygulanan kombinasyonların kolorektal kanser tedavisinde ortaya çıkabilen direnç problemine DcR1 ve XIAP genindeki azalma ile katkıda bulunabileceği, diğer gen ekspresyonlarında beklenen sinerjistik etkinin görülebilmesi için kombinasyon konsantrasyonlarının biraz daha yüksek aralıktan seçilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, tez kapsamında değerlendirilen proje maddelerinin kolorektal kanser tedavisine kazandırılması, uygun ilaç formülasyonlarının geliştirilerek hedefli tedaviye olanak sağlanması ve mevcut tedavi problemlerinin çözülmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Haggard FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2009;22(04):191-7.
2. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2009;59(6):366-78.
3. Türkiye Kanseri İstatistikleri 2009 [Available from: <https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2009kanseraaporu-1.pdf>].
4. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *New England journal of medicine*. 2005;352(5):476-87.
5. Zhang H-H, Guo X-L. Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2016;78(1):13-26.
6. Kaminski BM, Weigert A, Brüne B, Schumacher M, Wenzel U, Steinhilber D, et al. Sulforaphane potentiates oxaliplatin-induced cell growth inhibition in colorectal cancer cells via induction of different modes of cell death. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2011;67(5):1167-78.
7. Hotnog D, Mihăilă M, Lancu IV, Matei GG, Hotnog C, Anton G. Resveratrol modulates apoptosis in 5-fluorouracil treated colon cancer cell lines. *Roumanian archives of microbiology and immunology*. 2013;72(4):255-64.
8. Trivedi R, Mishra DP. Trailing TRAIL resistance: novel targets for TRAIL sensitization in cancer cells. *Frontiers in oncology*. 2015;5:69.
9. Yoon MJ, Kang YJ, Kim IY, Kim EH, Lee JA, Lim JH, et al. Monensin, a polyether ionophore antibiotic, overcomes TRAIL resistance in glioma cells via endoplasmic reticulum stress, DR5 upregulation and c-FLIP downregulation. *Carcinogenesis*. 2013;34(8):1918-28.
10. Parajuli B, Shin S-J, Kwon S-H, Cha S-D, Lee H-G, Bae I, et al. The synergistic apoptotic interaction of Indole-3-Carbinol and Genistein with TRAIL on endometrial cancer cells. *Journal of Korean medical science*. 2013;28(4):527-33.
11. Dixon RA, Ferreira D. Genistein. *Phytochemistry*. 2002;60(3):205-11.
12. Bullard K, Rothenberger D. Colon rectum and anus In: *Schwartz's Principles of Surgery*. Ed by: Brunickardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Pollock RE. Mc Graw Hill Medical Publishing ...; 2005.
13. Ellis H, Mahadevan V. Anatomy of the caecum, appendix and colon. *Surgery (Oxford)*. 2014;32(4):155-8.
14. Jorge JMN, Habr-Gama A. Anatomy and embryology. *The ASCRS textbook of colon and rectal surgery*: Springer; 2011. p. 1-22.
15. Fındık ÜY, Ünver ÖÜS, Eyi ÖÜS. *Gastrointestinal Sistemin Cerrahi Hastalıkları ve Hemşirelik Bakımı*: Nobel Tıp Kitabevi; 2019.
16. Guyton A, Hall J. *Tıbbi Fizyoloji*. 937-942. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul. 2013.

17. Recio-Boiles A, Cagir B. Cancer, Colon. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2019.
18. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(1):197.
19. Kolligs FT. Diagnostics and epidemiology of colorectal cancer. *Visceral medicine*. 2016;32(3):158-64.
20. Roswall N, Weiderpass E. Alcohol as a risk factor for cancer: existing evidence in a global perspective. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*. 2015;48(1):1.
21. Rossi M, Jahanzaib Anwar M, Usman A, Keshavarzian A, Bishehsari F. Colorectal cancer and alcohol consumption—populations to molecules. *Cancers*. 2018;10(2):38.
22. Macrae FA. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors.
23. Pan P, Yu J, Wang L-S. Colon cancer: what we eat. *Surgical Oncology Clinics*. 2018;27(2):243-67.
24. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015;136(5):E359-E86.
25. Gültekin M, Boztaş G. Türkiye kanser istatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2014;43.
26. Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores EH, Barrera-Mera B, Herrera Enríquez M, Uriarte-Ruíz K, et al. Colorectal cancer: a review. *Int J Res Med Sci*. 2017;5(11):4667-76.
27. Thanikachalam K, Khan G. Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients*. 2019;11(1):164.
28. Carethers JM, Jung BH. Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1177-90. e3.
29. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Annals of internal medicine*. 2002;137(7):603-12.
30. Stoffel EM, Kastrinos F. Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2014;12(7):1059-68.
31. Armelao F, de Pretis G. Familial colorectal cancer: a review. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014;20(28):9292.
32. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044-58.
33. Gala M, Chung DC, editors. Hereditary colon cancer syndromes. *Seminars in oncology*; 2011: Elsevier.
34. Büyükdoğan M. Kolorektal kanserde genetik ve etyolojik faktörler. *Selçuk Tıp Dergisi*. 2009;25:171-80.

35. Hamilton SR, Aaltonen LA. Pathology and genetics of tumours of the digestive system: IARC press Lyon;; 2000.
36. Soytürk M. Kolorektal kanser epidemiyoloji ve risk faktörleri.[Internet]. 2005. [Erişim Tarihi 18 Ağustos 2021]. Erişim adresi: <http://www.tihud.org.tr/uploads/content/kongre/7/7.28.pdf>
37. Mojarad EN, Kuppen PJ, Aghdai HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*. 2013;6(3):120.
38. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer biology & medicine*. 2016;13(1):120.
39. Wright M, Beaty JS, Ternent CA. Molecular markers for colorectal cancer. *Surgical Clinics*. 2017;97(3):683-701.
40. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(8):16365-85.
41. Amersi F, Agustin M, Ko CY. Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and health services. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2005;18(03):133-40.
42. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2010;31(2):31.
43. Roper J, Hung KE. Molecular mechanisms of colorectal carcinogenesis. *Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer*: Springer; 2013. p. 25-65.
44. Lawes D, SenGupta S, Boulos P. The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2003;29(3):201-12.
45. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Advances in genetics*. 70: Elsevier; 2010. p. 27-56.
46. Sulewska A, Niklinska W, Kozlowski M, Minarowski L, Naumnik W, Niklinski J, et al. DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2007;45(3):149-58.
47. Inamura K. Colorectal cancers: an update on their molecular pathology. *Cancers*. 2018;10(1):26.
48. Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *International journal of molecular epidemiology and genetics*. 2016;7(3):105.
49. Bishehsari F, Mahdavinia M, Vacca M, Malekzadeh R, Mariani-Costantini R. Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014;20(20):6055.
50. Vargas AJ, Thompson PA. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk. *Nutrition in Clinical Practice*. 2012;27(5):613-23.
51. Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2029-43. e10.

52. Marmot M, Atinmo T, Byers T, Chen J, Hirohata T, Jackson A, et al. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. 2007.
53. Requena T, Martínez-Cuesta MC, Peláez C. Diet and microbiota linked in health and disease. *Food & function*. 2018;9(2):688-704.
54. Higginbotham S, Zhang Z-F, Lee I-M, Cook NR, Giovannucci E, Buring JE, et al. Dietary glycemic load and risk of colorectal cancer in the Women's Health Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(3):229-33.
55. Vulcan A, Manjer J, Ohlsson B. High blood glucose levels are associated with higher risk of colon cancer in men: a cohort study. *BMC cancer*. 2017;17(1):842.
56. Van Zutphen M, Kampman E, Giovannucci EL, van Duijnhoven FJ. Lifestyle after colorectal cancer diagnosis in relation to survival and recurrence: a review of the literature. *Current colorectal cancer reports*. 2017;13(5):370-401.
57. Fuchs MA, Sato K, Niedzwiecki D, Ye X, Saltz LB, Mayer RJ, et al. Sugar-sweetened beverage intake and cancer recurrence and survival in CALGB 89803 (Alliance). *PLoS One*. 2014;9(6).
58. Mattar MC, Lough D, Pishvaian MJ, Charabaty A. Current management of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research: GCR*. 2011;4(2):53.
59. Çalışkan C, Güler N, Makay Ö, Fırat Ö, Yeniay L, Korkut MA. Rektal Kanama ve Yandaş Kolorektal Hastalığın Kolorektal Kanserlerde Prognoz Üzerine Olumlu Etkileri. *Kolon Rektum Hast Derg*. 2009;19:112-17.
60. Özkan ÖF, Kaya Ü, Güner A, Cevizci S, Özkul F, Sezer C, et al. Bir eğitim ve araştırma hastanesinde kolorektal kanser hastalarının demografik dağılımı ve hastalık özellikleri. *Pamukkale Tıp Dergisi*. 2012(3):132-5.
61. Hamilton W, Sharp D. Diagnosis of colorectal cancer in primary care: the evidence base for guidelines. *Family Practice*. 2004;21(1):99-106.
62. Karahasanoğlu T. Kolorektal Kanserler: Tanı ve Cerrahi Tedavi. *Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu Kitabı İstanbul*. 2001:271-9.
63. Akın T. Rektum ve Rektosigmoid Kanserlerin Tedavisinde Laparoskopik Cerrahinin Perioperatif ve Erken Dönem Onkolojik Sonuçları İle Yaşam Kalitesine Etkisi [Uzmanlık Tezi]. İstanbul: Dr Lütfü Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2009.
64. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1296-310. e1.
65. Millan M, Merino S, Caro A, Feliu F, Escuder J, Francesch T. Treatment of colorectal cancer in the elderly. *World journal of gastrointestinal oncology*. 2015;7(10):204.
66. Wolpin BM, Meyerhardt JA, Mamon HJ, Mayer RJ. Adjuvant treatment of colorectal cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2007;57(3):168-85.
67. Recio-Boiles A, Cagir B. Cancer, Colon. *StatPearls* [Internet]. 2021. [Erişim Tarihi: 21 Eylül 2021]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>



68. Zhang N, Yin Y, Xu S-J, Chen W-S. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules*. 2008;13(8):1551-69.
69. Gmeiner WH. Fluoropyrimidine Modulation of the Anti-Tumor Immune Response—Prospects for Improved Colorectal Cancer Treatment. *Cancers*. 2020;12(6):1641.
70. Zhang G, Luo X, Zhang W, Chen E, Xu J, Wang F, et al. CXCL-13 Regulates Resistance to 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*. 2020;52(2):622.
71. Hu T, Li Z, Gao C-Y, Cho CH. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(30):6876.
72. Patel BB, Majumdar AP. Synergistic role of curcumin with current therapeutics in colorectal cancer: minireview. *Nutrition and cancer*. 2009;61(6):842-6.
73. Wang W, Xi M, Duan X, Wang Y, Kong F. Delivery of baicalein and paclitaxel using self-assembled nanoparticles: synergistic antitumor effect in vitro and in vivo. *International journal of nanomedicine*. 2015;10:3737.
74. Zhao J, Huang Y, Liu D, Chen Y. Two hits are better than one: synergistic anticancer activity of  $\alpha$ -helical peptides and doxorubicin/epirubicin. *Oncotarget*. 2015;6(3):1769.
75. Du J, Li L. Which one performs better for targeted lung cancer combination therapy: pre-or post-bombesin-decorated nanostructured lipid carriers? *Drug delivery*. 2016;23(5):1799-809.
76. Zhao H, Liu Q, Wang S, Dai F, Cheng X, Cheng X, et al. In vitro additive antitumor effects of Dimethoxycurcumin and 5-fluorouracil in colon cancer cells. *Cancer medicine*. 2017;6(7):1698-706.
77. Wang F, Dai W, Wang Y, Shen M, Chen K, Cheng P, et al. The synergistic in vitro and in vivo antitumor effect of combination therapy with salinomycin and 5-fluorouracil against hepatocellular carcinoma. *PloS one*. 2014;9(5):e97414.
78. Shi L-x, Ma R, Lu R, Xu Q, Zhu Z-f, Wang L, et al. Reversal effect of tyroservatide (YSV) tripeptide on multi-drug resistance in resistant human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402/5-FU. *Cancer letters*. 2008;269(1):101-10.
79. Zhu H, Guo W, Zhang L, Davis JJ, Teraishi F, Wu S, et al. Bcl-XL small interfering RNA suppresses the proliferation of 5-fluorouracil-resistant human colon cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2005;4(3):451-6.
80. Kim YH, Shin SW, Kim BS, Kim JH, Kim JG, Mok YJ, et al. Paclitaxel, 5-fluorouracil, and cisplatin combination chemotherapy for the treatment of advanced gastric carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 1999;85(2):295-301.
81. Soo JS-S, Ng C-H, Tan SH, Malik RA, Teh Y-C, Tan B-S, et al. Metformin synergizes 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC) combination therapy through impairing intracellular ATP production and DNA repair in breast cancer stem cells. *Apoptosis*. 2015;20(10):1373-87.

82. Qin J, Chen JX, Zhu Z, Teng JA. Genistein inhibits human colorectal cancer growth and suppresses miR-95, Akt and SGK1. *Cellular physiology and biochemistry*. 2015;35(5):2069-77.
83. Zhu H, Huang M, Ren D, He J, Zhao F, Yi C, et al. The synergistic effects of low dose fluorouracil and TRAIL on TRAIL-resistant human gastric adenocarcinoma AGS cells. *BioMed research international*. 2013;2013.
84. Spagnuolo C, Russo GL, Orhan IE, Habtemariam S, Daglia M, Sureda A, et al. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions. *Advances in nutrition*. 2015;6(4):408-19.
85. Tuli HS, Tuorkey MJ, Thakral F, Sak K, Kumar M, Sharma AK, et al. Molecular mechanisms of action of genistein in cancer: Recent advances. *Frontiers in pharmacology*. 2019;10:1336.
86. Sarkar FH, Li Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2002;21(3):265-80.
87. Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer letters*. 2008;269(2):226-42.
88. Zhang L, Ma X, Dong Y. Effect of genistein on apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cells and expression of apoptosis factors. *JBU Off J Balk Union Oncol*. 2018;23:641-6.
89. Pavese JM, Farmer RL, Bergan RC. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2010;29(3):465-82.
90. Valles SL, Dolz-Gaiton P, Gambini J, Borrás C, Lloret A, Pallardo FV, et al. Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR $\gamma$  expression in cultured astrocytes. *Brain research*. 2010;1312:138-44.
91. Lian Z, Niwa K, Tagami K, Hashimoto M, Gao J, Yokoyama Y, et al. Preventive effects of isoflavones, genistein and daidzein, on estradiol-17 $\beta$ -related endometrial carcinogenesis in mice. *Japanese journal of cancer research*. 2001;92(7):726-34.
92. Zava DT, Duwe G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. 1997.
93. Park OJ, Surh Y-J. Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. *Toxicology letters*. 2004;150(1):43-56.
94. Mukund V, Mukund D, Sharma V, Mannarapu M, Alam A. Genistein: Its role in metabolic diseases and cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2017;119:13-22.
95. Jin C-Y, Park C, Cheong J, Choi BT, Lee TH, Lee J-D, et al. Genistein sensitizes TRAIL-resistant human gastric adenocarcinoma AGS cells through activation of caspase-3. *Cancer letters*. 2007;257(1):56-64.
96. Jin C-Y, Park C, Kim G-Y, Lee S-J, Kim W-J, Choi YH. Genistein enhances TRAIL-induced apoptosis through inhibition of p38 MAPK signaling in human

hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *Chemico-biological interactions*. 2009;180(2):143-50.

97. Jin C-Y, Park C, Moon S-K, Kim G-Y, Kwon TK, Lee SJ, et al. Genistein sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by enhancing Bid cleavage. *Anti-cancer drugs*. 2009;20(8):713-22.

98. Lee MW, Bach JH, Lee HJ, Lee DY, Joo WS, Kim YS, et al. The activation of ERK1/2 via a tyrosine kinase pathway attenuates trail-induced apoptosis in HeLa cells. *Cancer investigation*. 2005;23(7):586-92.

99. Bronikowska J, Szliszka E, Czuba ZP, Zwolinski D, Szmydki D, Krol W. The combination of TRAIL and isoflavones enhances apoptosis in cancer cells. *Molecules*. 2010;15(3):2000-15.

100. Nazim UM, Park S-Y. Genistein enhances TRAIL-induced cancer cell death via inactivation of autophagic flux. *Oncology reports*. 2015;34(5):2692-8.

101. Jacquemin G, Shirley S, Micheau O. Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: a promising approach to kill resistant cancer cells? *Cellular and molecular life sciences*. 2010;67(18):3115-30.

102. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy*. 2005;4(2):147-71.

103. Wu GS. TRAIL as a target in anti-cancer therapy. *Cancer letters*. 2009;285(1):1-5.

104. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death & Differentiation*. 2018;25(1):104-13.

105. Yuan X, Gajan A, Chu Q, Xiong H, Wu K, Wu GS. Developing TRAIL/TRAIL death receptor-based cancer therapies. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2018;37(4):733-48.

106. Jung EM, Lim JH, Lee TJ, Park J-W, Choi KS, Kwon TK. Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated upregulation of death receptor 5 (DR5). *Carcinogenesis*. 2005;26(11):1905-13.

107. Van Geelen CM, de Vries EG, de Jong S. Lessons from TRAIL-resistance mechanisms in colorectal cancer cells: paving the road to patient-tailored therapy. *Drug resistance updates*. 2004;7(6):345-58.

108. Tang S-Y, Zhong M-Z, Yuan G-J, Hou S-P, Yin L-L, Jiang H, et al. Casticin, a flavonoid, potentiates TRAIL-induced apoptosis through modulation of anti-apoptotic proteins and death receptor 5 in colon cancer cells. *Oncology reports*. 2013;29(2):474-80.

109. Szliszka E, Krol W. Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013.

110. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor–related apoptosis–inducing ligand in vivo. *Nature medicine*. 1999;5(2):157-63.
111. Noor A, Umelo IA, Kronenberger P, Giron P, De Vlieghere E, De Wever O, et al. Targeting Polo-like kinase 1 and TRAIL enhances apoptosis in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2018;9(47):28731.
112. Pishavar E, Attaranzadeh A, Alibolandi M, Ramezani M, Hashemi M. Modified PAMAM vehicles for effective TRAIL gene delivery to colon adenocarcinoma: in vitro and in vivo evaluation. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2018;46(sup3):S503-S13.
113. Qiao X, Wang X, Shang Y, Li Y, Chen S-z. Azithromycin enhances anticancer activity of TRAIL by inhibiting autophagy and up-regulating the protein levels of DR4/5 in colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Communications*. 2018;38(1):1-13.
114. Sun T, Zhu T, Liang X, Yang S, Zhao R. Effects of Recombinant Circularly Permuted Tumor Necrosis Factor (TNF)-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)(Recombinant Mutant Human TRAIL) in Combination with 5-Fluorouracil in Human Colorectal Cancer Cell Lines HCT116 and SW480. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2018;24:2550.
115. Van Ophoven A, Ng C, Patel B, Bonavida B, Belldegrun A. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) for treatment of prostate cancer: first results and review of the literature. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 1999;2(5):227-33.
116. Delmas D, Rebe C, Micheau O, Athias A, Gambert P, Grazide S, et al. Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene*. 2004;23(55):8979-86.
117. Jeon K-I, Rih J-K, Kim HJ, Lee YJ, Cho C-H, Goldberg ID, et al. Pretreatment of indole-3-carbinol augments TRAIL-induced apoptosis in a prostate cancer cell line, LNCaP. *FEBS letters*. 2003;544(1-3):246-51.
118. Kim H, Kim EH, Eom YW, Kim W-H, Kwon TK, Lee SJ, et al. Sulforaphane sensitizes tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)–resistant hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species–mediated up-regulation of DR5. *Cancer research*. 2006;66(3):1740-50.
119. Murai M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Ra C, Nishida S, et al. Diallyl trisulfide sensitizes human melanoma cells to TRAIL-induced cell death by promoting endoplasmic reticulum-mediated apoptosis. *International journal of oncology*. 2012;41(6):2029-37.
120. Bousserouel S, Le Grandois J, Gossé F, Werner D, Barth SW, Marchioni E, et al. Methanolic extract of white asparagus shoots activates TRAIL apoptotic death pathway in human cancer cells and inhibits colon carcinogenesis in a preclinical model. *International journal of oncology*. 2013;43(2):394-404.

121. Duiker E, Mom C, De Jong S, Willemsse P, Gietema J, van der Zee A, et al. The clinical trail of TRAIL. *European journal of cancer*. 2006;42(14):2233-40.
122. Panner A, James CD, Berger MS, Pieper RO. mTOR controls FLIPS translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2005;25(20):8809-23.
123. Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Martinez-Valdez H, Medeiros LJ, Younes A. Inhibition of Heat Shock Protein 90 Function by 17-Allylamino-17-Demethoxy-Geldanamycin in Hodgkin's Lymphoma Cells Down-Regulates Akt Kinase, Dephosphorylates Extracellular Signal-Regulated Kinase, and Induces Cell Cycle Arrest and Cell Death. *Clinical cancer research*. 2006;12(2):584-90.
124. Park S-Y, Seol D-W. Regulation of Akt by EGF-R inhibitors, a possible mechanism of EGF-R inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;295(2):515-8.
125. Macrae FA. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. *Uptodate com* [ažurirano 9 lipnja 2017. 2016.
126. Lynch HT, De la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(10):919-32.
127. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular basis of colorectal cancer. *New England journal of medicine*. 2009;361(25):2449-60.
128. Hammond WA, Swaika A, Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2016;8(1):57-84.
129. Temraz S, Mukherji D, Alameddine R, Shamseddine A. Methods of overcoming treatment resistance in colorectal cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2014;89(2):217-30.
130. Busby MG, Jeffcoat AR, Bloedon LT, Koch MA, Black T, Dix KJ, et al. Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. *The American journal of clinical nutrition*. 2002;75(1):126-36.
131. Zhu J, Ren J, Tang L. Genistein inhibits invasion and migration of colon cancer cells by recovering WIF1 expression. *Molecular medicine reports*. 2018;17(5):7265-73.
132. Liang Y-S, Qi W-T, Guo W, Wang C-L, Hu Z-B, Li A-K. Genistein and daidzein induce apoptosis of colon cancer cells by inhibiting the accumulation of lipid droplets. *Food & nutrition research*. 2018;62.
133. Qi W, Weber CR, Wasland K, Savkovic SD. Genistein inhibits proliferation of colon cancer cells by attenuating a negative effect of epidermal growth factor on tumor suppressor FOXO3 activity. *BMC cancer*. 2011;11(1):1-9.
134. Yu Z, Li W, Liu F. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. *Cancer letters*. 2004;215(2):159-66.
135. Shafiee G, Saidijam M, Tavilani H, Ghasemkhani N, Khodadadi I. Genistein induces apoptosis and inhibits proliferation of HT29 colon cancer cells. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2016;5(3):178.

136. Fan Y, Li G, Wang Y, Ren Q, Shi H. Effects of genistein on colon cancer cells in vitro and in vivo and its mechanism of action. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese Journal of Oncology]*. 2010;32(1):4-9.
137. Chen X, Gu J, Wu Y, Liang P, Shen M, Xi J, et al. Clinical characteristics of colorectal cancer patients and anti-neoplasm activity of genistein. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;124:109835.
138. Zhu Q, Meisinger J, Thiel DHV, Zhang Y, Mobarhan S. Effects of soybean extract on morphology and survival of Caco-2, SW620, and HT-29 cells. *Nutrition and cancer*. 2002;42(1):131-40.
139. Li Q, Chen H. Epigenetic modifications of metastasis suppressor genes in colon cancer metastasis. *Epigenetics*. 2011;6(7):849-52.
140. Hotnog D, Mihaila M, Botezatu A, Matei GG, Hotnog C, Anton G, et al. Genistein potentiates the apoptotic effect of 5-fluorouracil in colon cancer cell lines. *Romanian Biotechnological Letters*. 2013;18(6):8751.
141. Hwang J-T, Ha J, Park OJ. Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;332(2):433-40.
142. Luo Y, Wang S-x, Zhou Z-q, Wang Z, Zhang Y-g, Zhang Y, et al. Apoptotic effect of genistein on human colon cancer cells via inhibiting the nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) pathway. *Tumor biology*. 2014;35(11):11483-8.
143. Suzuki R, Kang Ya, Li X, Roife D, Zhang R, Fleming JB. Genistein potentiates the antitumor effect of 5-Fluorouracil by inducing apoptosis and autophagy in human pancreatic cancer cells. *Anticancer research*. 2014;34(9):4685-92.
144. Li L, Aggarwal BB, Shishodia S, Abbruzzese J, Kurzrock R. Nuclear factor- $\kappa$ B and I $\kappa$ B kinase are constitutively active in human pancreatic cells, and their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2004;101(10):2351-62.
145. Kong CK, Lam W, Chiu LC, Ooi VE, Sun SS, Wong Y-S. A rice bran polyphenol, cycloartenyl ferulate, elicits apoptosis in human colorectal adenocarcinoma SW480 and sensitizes metastatic SW620 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Biochemical pharmacology*. 2009;77(9):1487-96.
146. Jagetia G, Krishnan SK, Aggarwal BB. *Natural Agents That Can Sensitize Tumor Cells to Chemotherapy and Radiation Therapy. Sensitization of Cancer Cells for Chemo/Immuno/Radio-therapy*: Springer; 2008. p. 211-40.
147. Huang L, Wong Y, Cai Y, Lung I, Leung C, Burd A. Low-dose 5-fluorouracil induces cell cycle G2 arrest and apoptosis in keloid fibroblasts. *British Journal of Dermatology*. 2010;163(6):1181-5.
148. Guan X-W, Xu X-H, Feng S-L, Tang Z-B, Chen S-W, Hui L. Synthesis of hybrid 4-deoxypodophyllotoxin-5-fluorouracil compounds that inhibit cellular migration and induce cell cycle arrest. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2016;26(6):1561-6.

149. De Angelis PM, Svendsrud DH, Kravik KL, Stokke T. Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. *Molecular cancer*. 2006;5(1):1-25.
150. Tokunaga E, Oda S, Fukushima M, Maehara Y, Sugimachi K. Differential growth inhibition by 5-fluorouracil in human colorectal carcinoma cell lines. *European Journal of Cancer*. 2000;36(15):1998-2006.
151. Colin D, Gimazane A, Lizard G, Izard JC, Solary E, Latruffe N, et al. Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *International journal of cancer*. 2009;124(12):2780-8.
152. Li M-H, Ito D, Sanada M, Odani T, Hatori M, Iwase M, et al. Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines. *Oral oncology*. 2004;40(1):63-70.
153. Salti G, Grewal S, Mehta R, Gupta TD, Boddie Jr A, Constantinou AI. Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells. *European Journal of Cancer*. 2000;36(6):796-802.
154. Schroeter A, Aichinger G, Stornig K, Marko D. Impact of oxidative metabolism on the cytotoxic and genotoxic potential of genistein in human colon cancer cells. *Molecular nutrition & food research*. 2019;63(2):1800635.
155. Lee R, Kim YJ, Lee YJ, Chung HW. The selective effect of genistein on the toxicity of bleomycin in normal lymphocytes and HL-60 cells. *Toxicology*. 2004;195(2-3):87-95.
156. Srinivas US, Tan BW, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox biology*. 2019;25:101084.
157. Macip S, Kosoy A, Lee S, O'Connell M, Aaronson S. Oxidative stress induces a prolonged but reversible arrest in p53-null cancer cells, involving a Chk1-dependent G 2 checkpoint. *Oncogene*. 2006;25(45):6037-47.
158. Kumi-Diaka J, Butler A. Caspase-3 protease activation during the process of genistein-induced apoptosis in TM4 testicular cells. *Biology of the Cell*. 2000;92(2):115-24.
159. Kim S-H, Kim S-H, Lee S-C, Song Y-S. Involvement of both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in apoptosis induced by genistein in human cervical cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1171(1):196.
160. Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*. 2003;22(53):8628-33.
161. Dolloff NG, Mayes PA, Hart LS, Dicker DT, Humphreys R, El-Deiry WS. Off-target lapatinib activity sensitizes colon cancer cells through TRAIL death receptor up-regulation. *Science translational medicine*. 2011;3(86):86ra50-86ra50.
162. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. 1997;277(5327):818-21.

163. Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer gene therapy*. 2005;12(3):228-37.
164. Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer E, et al. Bcl-X L protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene*. 2000;19(48):5477-86.
165. Carter BZ, Mak DH, Schober WD, Dietrich MF, Pinilla C, Vassilev LT, et al. Triptolide sensitizes AML cells to TRAIL-induced apoptosis via decrease of XIAP and p53-mediated increase of DR5. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2008;111(7):3742-50.
166. Szliszka E, Krol W. The role of dietary polyphenols in tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis for cancer chemoprevention. *European Journal of Cancer Prevention*. 2011;20(1):63-9.
167. Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *British journal of cancer*. 1998;78(8):986-92.
168. Mizutani Y, Nakanishi H, Yoshida O, Fukushima M, Bonavida B, Miki T. Potentiation of the sensitivity of renal cell carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by subtoxic concentrations of 5-fluorouracil. *European Journal of Cancer*. 2002;38(1):167-76.
169. Zhao C, Zhao Q, Zhang C, Wang G, Yao Y, Huang X, et al. miR-15b-5p resensitizes colon cancer cells to 5-fluorouracil by promoting apoptosis via the NF- $\kappa$ B/XIAP axis. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-12.
170. Fei B, Chi AL, Weng Y. Hydroxycamptothecin induces apoptosis and inhibits tumor growth in colon cancer by the downregulation of survivin and XIAP expression. *World journal of surgical oncology*. 2013;11(1):1-9.
171. Nazim UM, Rasheduzzaman M, Lee Y-J, Seol D-W, Park S-Y. Enhancement of TRAIL-induced apoptosis by 5-fluorouracil requires activating Bax and p53 pathways in TRAIL-resistant lung cancers. *Oncotarget*. 2017;8(11):18095.
172. Lee KC, Hamstra DA, Bhojani MS, Khan AP, Ross BD, Rehemtulla A. Noninvasive molecular imaging sheds light on the synergy between 5-fluorouracil and TRAIL/Apo2L for cancer therapy. *Clinical cancer research*. 2007;13(6):1839-46.
173. Yang L, Wang Y, Zheng H, Zhang D, Wu X, Sun G, et al. Low-dose 5-fluorouracil sensitizes HepG2 cells to TRAIL through TRAIL receptor DR5 and survivin-dependent mechanisms. *Journal of Chemotherapy*. 2017;29(3):179-88.
174. Schneider-Stock R, Ghantous A, Bajbouj K, Saikali M, Darwiche N. Epigenetic mechanisms of plant-derived anticancer drugs. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2012;17:129-73.



## 8. EKLER

### EK 1: Tez Çalışması Orjinallik Raporu



### Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Tuğbagül Çal Doğan  
Ödev başlığı: GENİSTEİNİN DNA HASARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN KOLON ...  
Gönderi Başlığı: GENİSTEİNİN DNA HASARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN KOLON ...  
Dosya adı: Doktora\_tez\_son\_hali-turnitin.docx  
Dosya boyutu: 5.66M  
Sayfa sayısı: 96  
Kelime sayısı: 16,514  
Karakter sayısı: 102,973  
Gönderim Tarihi: 07-Ara-2021 08:45ÖS (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1723538077

Y.C.  
HÜKÜMLÜK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GENİSTEİNİN DNA HASARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN  
KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE TEK HÜCRELİ  
ELEKTROBİYOLOJİK YÖNEMİYLE  
DEĞERLENDİRİLMESİ

Yaz. Doç. Tuğbagül ÇAL DOĞAN

Yazınışıl Tez Çalışması Projesi  
DOKTORA TEZİ

ANKARA  
2021

Copyright 2021 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

**TEZİN TAM BAŞLIĞI:** GENİSTEİNİN DNA HASARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ (COMET) YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ

**ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI:** TUĞBAGÜL ÇAL DOĞAN

**DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI:** 96

GENİSTEİNİN DNA HASARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ (COMET) YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% <b>17</b>	% <b>15</b>	% <b>3</b>	% <b>8</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080">www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</a> İnternet Kaynağı	% <b>12</b>
<b>2</b>	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>
<b>3</b>	Wei Liu, Yong Fang, Xiao-Tong Wang, Ju Liu, Xing Dan, Lu-Lu Sun. "Overcoming 5-Fu Resistance of Colon Cells through Inhibition of Glut1 by the Specific Inhibitor WZB117", Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2014 Yayın	<% <b>1</b>
<b>4</b>	S. C. Juneja. "A mouse model of familial oligoasthenoteratozoospermia", Human Reproduction, 12/17/2004 Yayın	<% <b>1</b>
<b>5</b>	<a href="http://www.istanbulsaglik.gov.tr">www.istanbulsaglik.gov.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>6</b>	Submitted to Anadolu University Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>

## 9. ÖZGEÇMİŞ

