



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***OLEA EUROPAEA* YAPRAĞI, *RUBUS FRUTICOSUS* VE *NİGELLA CV.*  
ÖZÜTLERİNİN KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA MİKRORNA  
EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Adem ALEMDAR**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**Bursa-2016**



T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

*OLEA EUROPAEA* YAPRAĞI, *RUBUS FRUTICOSUS* VE *NİGELLA CV.*  
ÖZÜTLERİNİN KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA MİKRONA  
EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Adem ALEMDAR

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Berrin TUNCA


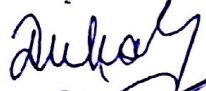

Bursa-2016



**Bu tez, Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından KUAP(T)-2013/72 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Adem ALEMDAR tarafından hazırlanan "Olea Europaea Yaprağı, Rubus Fruticosus ve Nigella Cv. Özütlerinin Kolon Kanseri Hücre Hatlarında mikroRNA Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması" konulu Yüksek Lisans tezi 08/01/2016 günü, 10:00 – 11:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Berrin Tunca	
Üye	Prof. Dr. Gülşah Çeçener	
Üye	Doç. Dr. Didem Turgut Coşan	
Üye		
Üye		

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ülgen GÜNAY

Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	IV
İNGİLİZCE ÖZET .....	V
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
Kolorektal Kanser Etiyolojisine Genel Bakış .....	2
Kolorektal Kanser Moleküler Biyolojisi .....	4
Adenom-Karsinom Süreci .....	5
Kromozomal Kararsızlık Yolağı .....	6
Mismatch Tamir Genleri Yolağı .....	6
Hipermetilasyon Fenotip Yolağı .....	7
Hibrit Yolak .....	7
Spesifik Moleküler Değişimler .....	8
Onkogen Değişimleri .....	8
<i>Ras</i> .....	8
<i>Src</i> .....	8
<i>BRAF</i> .....	9
Tümör Baskılayıcı Genler .....	9
<i>APC</i> .....	9
<i>p53</i> .....	10
<i>DCC</i> .....	11
<i>TGFB</i> .....	11
Mismatch Tamir Genleri .....	12
Kolorektal Kanser Epigenetiği.....	13
DNA Metilasyonu .....	13
Histon Modifikasyonları .....	14
mikroRNAlar .....	14
miRNA Biyogenezi ve Fonksiyonu.....	15
Kolorektal Kanserde miRNA'lar .....	16
Tümör baskılayıcı miRNA'lar.....	17
Onkogenik miRNA'lar .....	19

Terapötik Bitkilerin ve KRK Epigenetiğinde Rolü .....	20
<i>Rubus Fruticosus</i> .....	21
<i>Nigella sativa</i> .....	22
<i>Olea europaea</i> .....	23
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	24
<b>Kullanılan Cihazlar</b> .....	24
<b>Kullanılan Kimyasallar ve Kitler</b> .....	24
<b>Kullanılan Yöntemler</b> .....	25
<b>Bitkilerin Seçimi ve Özütlerin Hazırlanışı</b> .....	25
<b>Bitki Özütlerinin Kimyasal İçerik Analizi</b> .....	26
<b>Kromatografik Analiz</b> .....	26
<b>Standart Fenolik Maddelerin Hazırlanması</b> .....	27
<b>Hücre Kültürü Çalışmaları</b> .....	27
<b>Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları</b> .....	27
<b>Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarına Uygun Besi Yerlerinin Özellikleri</b> .....	28
<b>Hücre Hatlarının Çözdürülmesi ve Bakımı</b> .....	28
<b>Hücre Canlılık Testi</b> .....	29
<b>WST-1 analizi</b> .....	29
<b>WST1 Analizi İstatistikleri</b> .....	30
<b>Migrasyon Analizi</b> .....	30
<b>miRNA Ekspresyon Analizi</b> .....	31
<b>miRNA İzolasyonu</b> .....	31
<b>cDNA sentezi</b> .....	32
<b>miRNA Ekspresyon Analizleri</b> .....	32
<b>Bileşikler İçin Protein Hedef Belirlenmesi ve Yerleşme Modelleri</b> .....	34
<b>İstatistiksel Analiz</b> .....	34
<b>BULGULAR</b> .....	35
<b>Bitki Özütlerinin Kimyasal İçeriği</b> .....	35
<b>Canlılık analizi sonuçları</b> .....	37
<b>Hücre Migrasyon Analizi</b> .....	38
<b>miRNA Ekspresyon Analizi</b> .....	39
<b>Aktif Bileşiklerin Protein Hedeflerinin Belirlenmesi</b> .....	42
<b>TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	44

<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>53</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>70</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>71</b>



## ÖZET

Kolorektal kanser, dünyada en yaygın görülen kanserlerden biridir. Son 30 yılda gelişen cerrahi ve görüntüleme tekniklerine rağmen kemoterapötiklerin tedavide yeterince etkin sonuçlar veremediği görülmektedir. Biyoaktif ajanlar olarak adlandırılan bitki özütleri, son yıllarda yeni tedavilerin geliştirilmesi açısından yoğun olarak araştırılmaktadır. Epigenetik mekanizmalar üzerinden etkili olduğu anlaşılan bitkisel özütlerin yeni kanser tedavi modellerinin geliştirilmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir. Tüm bu sebepler ile mevcut tez çalışmasında kolorektal kanser hücrelerinde bitkisel özütlerin etkilerinin, önemli bir epigenetik mekanizma olan mikroRNA (miRNA) ekspresyon seviyelerindeki değişimler ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gerçekleştirilen çalışmada, *Nigella sativa* (çörekotu) tohum özütü (NTE), *Olea europae* (zeytin) yaprağı özütü (OLE) ve *Rubus fruticosus* (böğürtlen) kök özütü (RKE)'nin iki kolorektal kanser hücre hattındaki (HT-29 ve LoVo) anti kanser etkisi hücre proliferasyonu ve invazyonu açısından araştırıldı ve olası anti kanser etkinin moleküler mekanizması miRNA ekspresyon seviyesinde çalışılarak epigenetik olarak değerlendirildi. WST-1 analizi sonuçlarına göre değerlendirilen bitki özütlerinin hücre proliferasyonunu anlamlı düzeyde azaltıcı etkisinin ( $p<0.05$ ) olduğu belirlendi. RKE ve NTE'nin her iki hücre hattında da istatistiki olarak anlamlı seviyede ( $p<0.05$ ), OLE'nin ise LoVo hücre hattında istatistiki anlamlılığa yakın seviyede ( $p=0.0641$ ) hücrelerin migrasyon özelliğini inhibe ettiği görüldü. Bitki özütlerinin RT-PCR yöntemi ile miRNA ekspresyon profillerine etkisi değerlendirildiğinde RKE'nin her iki hücre hattında da miR-140 ekspresyon artışına ( $p<0.05$ ), NTE ve OLE'nin ise HT-29 hücrelerinde miR-182a ekspresyonunda istatistiki olarak anlamlı seviyede ( $p<0.05$ ) düşüşe neden olduğu belirlendi.

Mevcut çalışmada, RKE, NTE ve OLE'nin kolorektal kanser hücrelerinde epigenetik mekanizmalar aracılığı ile hücre proliferasyonu ve migrasyonunu azaltıcı yönde etkiye sahip olduğu literatürde ilk kez ortaya koyulmuştur. İleri çalışmalar gerekmektedir birlikte her üç bitki özütünün de kolorektal kanserde yeni tedavilerin araştırılmasına yönelik çalışmalar için potansiyel birer aday olabileceğini düşünmekteyiz

**Anahtar kelimeler:** Kolorektal kanser, hücre çoğalması, mikroRNA, migrasyon, *Nigella sativa*, *Olea europae*, *Rubus fruticosus*



## İNGİLİZCE ÖZET

### **Investigation of Effects of *Olea Europaea* Leaf, *Rubus Fruticosus* and *Nigella Cv* Extracts on MicroRNA Expression Levels on Colon Cancer Cell Lines**

Colorectal cancer one of the most common cancers in the World. Although surgical and screening techniques have been improved a lot in last 30 years, chemotherapeutics have not advanced sufficiently for a successful treatment. New treatments options for many disease by the help of plant extracts, which are called bioactive agents, have been searching intensively. Plant extracts, also effective on epigenetic mechanisms, are thought to be efficous for developing new cancer therapy approaches. Aim of this dissertation study is to evaluate changes in one of the important epigenetic mechanisms microRNA (miRNA) expression levels due to effects of plant extracts on the colorectal cell lines.

In present study, *Nigella sativa* (black cumin) seed extract (NTE), *Olea europeae* (olive) leaf extract (OLE) and *Rubus fruticosus* (blackberry) root extract (RKE) are investigated in two colorectal cell lines (HT-29 and LoVo) for their anti-proliferative and migration properties in means of effects on microRNA expressions. Anti-proliferative effects of plant extract are evaluated by WST-1 assay and cell proliferation is reduced significantly ( $p<0.05$ ). In cell migration analysis RKE and NTE reduced migration in both cell line significantly ( $p<0.05$ ). Migration properties of LoVo cell line is found to be inhibited by OLE with nearly significant values ( $p<0.06$ ). Real time-PCR method is used for investigation of expression differences in miRNA after extract treatment. Statistically significant increases are observed in miR-140 expressions in both cell lines after RKE treatment, and in HT-29 cell line miR-182a expression is again significantly reduced after both OLE and NTE treatments ( $p<0.05$ ).

Our data show that NTE, OLE, RKE have capability to inhibit colorectal cancer cell proliferation and migration by the means of epigenetic mechanisms for the first time in the literature. Although further studies should be conducted in this topic, all three plant extracts are thought to be potential candidates for future researches on new therapy options for colorectal cancer.

**Keywords:** Colorectal cancer, microRNA, cell proliferation, Migration, *Nigella sativa*, *Olea europeae*, *Rubus fruticosus*

## GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK) tedavisinde kullanılan ilaçların görüntüleme ve cerrahi işlemlerdeki gelişmelerin gerisinde kalması yeni ilaçların geliştirilmesinde bitki özütlerine olan ilgiyi son dönemde artırmıştır (1). *Nigella sativa*, *Olea europeae* ve *Rubus fruticosus* bitkileri Anadolu'da ve yetiştiği coğrafyalarda tedavi amacıyla birçok hastalık için kullanılmıştır. Bu bitkiler özellikle içerdikleri fenolik bileşenler açısından oldukça değerli ve günlük tüketimde kullanılmaktadırlar. Direk sindirim sistemi organlarıyla ve kolon mukozasıyla etkileşime girebilecekleri düşünülerek KRK'de içerdikleri aktif bileşenlerle önleyici bir rol alabilecekleri düşünülmektedir. *Nigella sativa* (çörekotu) ve aktif bileşeni olan timokinon (TQ) özellikle kanser çalışmalarında yoğun olarak araştırılmakta ve alınan olumlu sonuçlar ile umut vadeden bir bitkidir (2). Batı diyetinde yoğun olarak kullanılan *Rubus fruticosus* (Böğürtlen) özellikle antioksidan kapasitesi ile kanser oluşumunu önleyebilecek bir özellik sergilemektedir. Aktif bileşeni olan ellagik asit uzun yıllardır araştırmalarda kullanılmış ve KRK'deki etkileri oldukça iyi anlaşılmıştır (2, 3). *Olea europeae* (zeytin) özellikle Akdeniz havzasının en önemli bitkilerinden biri olarak yoğun olarak günlük diyetin bir parçası durumundadır. KRK'in Akdeniz havzasında diğer bölgelere nazaran daha düşük olması *Olea europeae* ve aktif bileşenlerini olan oleuropeinin potansiyel anti-kanser etkilerinin araştırılmasına dayanak oluşturmuştur (4).

Hücrel fonksiyonları gerçekleştirilmesinde özellikle gelişim dönemindeki etkilerinin anlaşılması ile mikroRNA'lar (miRNA), kanser çalışmalarında da ilgi çekici bir özellik kazanmıştır. miRNA'lar KRK ile sağlam bağlantıları olan, küçük, kodlama yapmayan düzenleyici RNA molekülleridir. Hedefledikleri mesajcı RNAları baskılayarak, hücre proliferasyonu. Apoptoz ve farklılaşma gibi birçok hücrel yolağı düzenleme kabiliyetine sahiplerdir. miRNA'lar KRK ve diğer kanserlerdeki özgün ekspresyon durumları dolayısı ile hem tanı hem de tedavi açısından umut vadeden moleküllerdir (5).

Bitki özütü ve miRNA'ların araştırma olanaklarını birleştiren ve etkileşimlerini inceleyen çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bitki özütlerinin sağladığı doğal bileşiklerin, KRK patogenezinde rol oynayan miRNA'ların ekspresyonundaki etkileri çalışmamızda incelenmektedir. Çalışmada hem bu bitkisel özütlerin KRK hücrelerinde anti-kanser etkilerinin ortaya çıkarılmasına hem de miRNA ekspresyonları yoluyla potansiyel hedefe yönelik yeni terapi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

## GENEL BİLGİLER

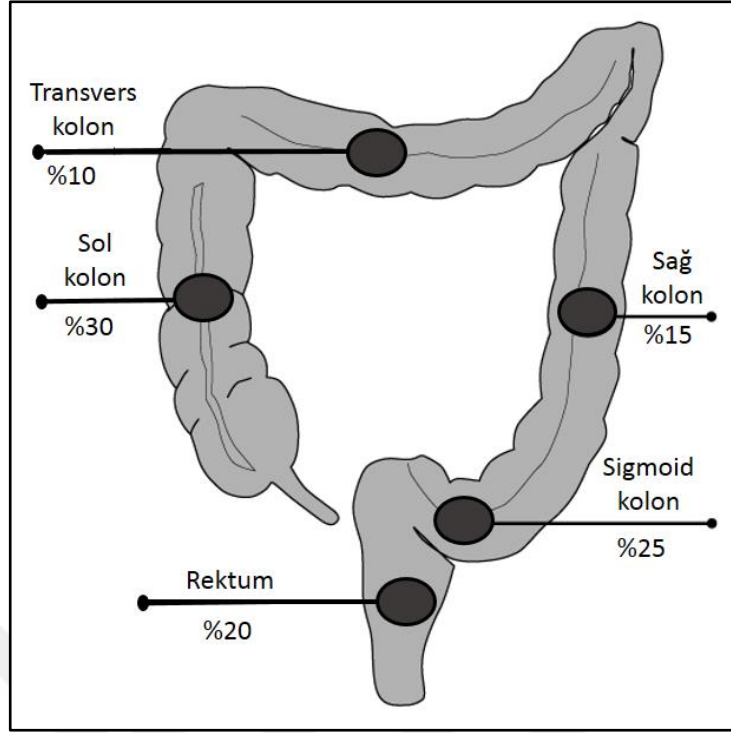
### 2.1 Kolorektal Kanser Etiyolojisine Genel Bakış

Kalın bağırsağın son 20 cm'lik kısmına rektum ve bu noktadan, ince bağırsağa kadar uzanana kısmına ise kolon denir ve bu bölgelerde yerleşen kanserler sırasıyla rektal kanser ve kolon kanseri olarak adlandırılır. Bu iki bölgede görülen kanserler genellenerek kolorektal kanserler (KRK) olarak isimlendirilirler (6).

KRK Dünya Sağlık Örgütü (WHO) istatistiklerine (7) göre, kadın ve erkeklerde en sık görülen üçüncü en yaygın kanser tipidir. Kansere bağlı ölümlerin, kadın ve erkeklerde toplam olarak bakıldığında, en önemli ikinci nedeni yine KRK'dir. Batı toplumlarında KRK görülme sıklığı daha yaygınken, gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde daha düşüktür. Türkiye'de son yıllarda yapılan istatistiklere bakılınca dünya ortalamasının altında olmakla birlikte, KRK erkeklerde (%20.7) ile 4. kadınlarda (13.1) en sık rastlanan 3. kanser durumundadır (8).

Diyet ve yaşam tarzının KRK insidansı ile yakından alakalı olduğu görülmektedir. Amerika, Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda, Japonya gibi gelişmiş ülkelerde daha sık görülmesi yüksek kalorili işlenmiş gıdaların tüketimi, yüksek sigara ve alkol kullanımı ile ilişkilendirilmektedir. Afrika ve Asya ülkelerinde daha yüksek bitkisel ürünlerin tüketilmesi, alkol tüketiminin az olması ve daha hareketli yaşam şekli, batı toplumlarının tam tersine KRK görülme oranını düşürmektedir. Kronik bağırsak inflamasyonunun, ülseratif kolitin, Crohn hastalığının KRK riskini artırdığı bilinmektedir (6). Diğer taraftan, Non steroidal antiinflamatuar ilaçların sürekli kullanımının KRK riskini azalttığı gösterilmiştir (9).

KRK lokalizasyonuna bakıldığında çoğu karsinomanın rektum (%20) ve sigmoidde (%25) olduğu görülürken, distal (sağ kolon) (%15) ve transvers (%10) kolonda görülme oranı daha düşüktür. Fakat son yıllarda proksimal (sol kolon) (%30) kolondaki yerleşimin arttığı ortaya çıkmıştır (6)(Şekil-1).



Şekil-1. Kolorektal kanserlerin kolon ve rektumda ortalama dağılımı

Asemptomatik hastalarda neoplazmlar, takip ve görüntüleme ile ortaya çıkarken, tümördeki kanamaya bağlı olarak dışkıda kan görülmesi ve dolayısıyla anemi KRK’de sık karşılaşılan özelliklerdir. Tuvalet alışkanlıklarında değişkenlik diğer önemli bir semptomdur. Proksimal ve distal oluşumlara bağlı olarak kabızlık, rektumdaki değişimlerle birlikte ağırlı dışkılama görülebilir. Bunlar dışından yüksek ateş, halsizlik, kilo kaybı ve karın ağrıları diğer semptomlardır.

Semptomlardan bir veya birkaçını gösteren bireylerde KRK tanısının konulabilmesinde modern görüntüleme teknikleri kullanılır. Günümüzde baryum lavmanı ile büyük tümörler görüntülenebilirken, hava kontrastlı radyografi görüntüleme kalitesini artırarak daha küçük lezyonların görüntülenmesini sağlayabilmektedir. Tümörün derinliği, lokal veya uzak metastaza sahip olup olmadığı dikey kesit bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme ve transrektal ultrasonografi teknikleri ile anlaşılabilir. Pozitron emisyon tomografide, radyoaktif madde içeren glikozun kanser hücreleri içerisine daha fazla alınmasından faydalanılarak, uzak metastazlar ve tümör büyüklüğü görüntülenebilir.

Endoskopi ile yapılan görüntüleme ile kalın bağırsağın tüm yüzeyleri görüntülenebilmekte ve bulunan lezyonlardan alınan biyopsilerle KRK tanısı konulabilmektedir. Endoskopi teknolojisinde meydana gelen büyük gelişmelerle birlikte 1990’dan günümüze KRK insidansı %45 ila 77 arasında azaltılmış ve mortalite oranı ise %30’dan fazla düşürülmüştür (10).

Görüntüleme tekniklerine ek olarak ucuz ve kolay uygulanabilen dışkıda gizli kan testi ile erken evrelerde tümör kanamasına bağlı olarak tanı konulması mümkün olmaktadır (11). Ayrıca ColoSure™ gibi testler ile dışkıdaki DNA örneklerinden genetik testler yapılabilmesi mümkün olabilecek ve erken tanı konulmasına yardımcı olabilecektir (12). Bu test henüz klinik uygulamaya girmemiştir.

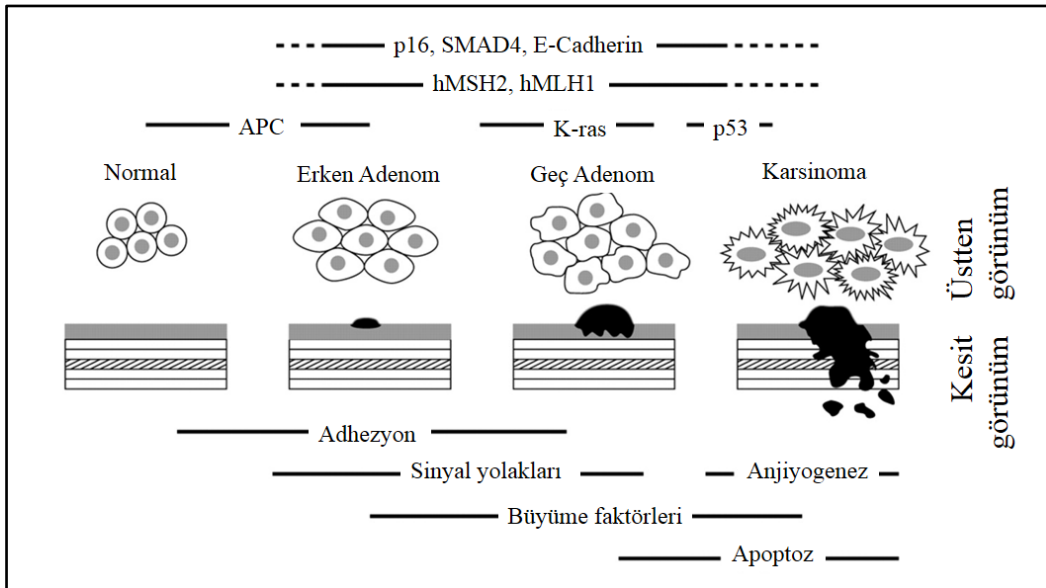
Histolojik çeşitlerine göre Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırmasında KRK'ler musinöz adenokarsinom, taşlı yüzük hücreli karsinom, medüller kanser, mikroglandüler goblet hücreli kanser, şeffaf hücreli kanser, adenoskuamöz kanser, içsi hücreli ve metaplastik kanser olarak listelenir. Bunlardan musinöz adenokarsinoma tümör hacminin % 50sinden fazlasının ekstraselüler müsinde oluşmasıyla karakterizedir. Çoğu yüksek frekanslı mikrosatellit instabilite (MSI-H) gösteren ailesel nonpolipozis KRK tümörleri bu gruba girmektedir (13). KRK'lerin %1den daha azını oluşturan taşlı yüzük hücreli karsinom %50den fazla intrasitoplazmik müsin içermesiyle karakterizedir ve hücre içinde vokullarda biriken bu müsin hücre çekirdeğinin kenara itilmesine sebep olur (14). Medüller kanser ise çok nadir olarak görülmektedir.

## **2.2 Kolorektal Kanser Moleküler Biyolojisi**

KRK moleküler mekanizması üzerine en çok çalışılmış ve en çok aydınlatılmış kanser türlerinden biridir. Geçtiğimiz yıllarda moleküler tekniklerin gelişmesi ve araştırma olanaklarının artmasıyla birlikte KRK'in moleküler temeli ile ilişkili daha fazla bulgu elde edilmiş ve tedavi yöntemleri çeşitlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda KRK'in moleküler yönden tek kaynağı olmadığı, birçok farklı yoldan etkileşimlerle çeşitlendiği, dolayısıyla da heterojen bir yapı ihtiva ettiği anlaşılmıştır (15). Diğer kanser tiplerine nazaran KRK'in moleküler biyoloji açısından daha iyi aydınlatılmış olmasının temelinde iki neden yatmaktadır. Bu nedenlerden ilki normal epitelden karsinoma kadar geçen tüm sürecin cerrahi olarak kolaylıkla tespit edilebiliyor ve doku örneklerinin rahatlıkla alınabiliyor olmasıdır. Diğer neden ise KRK'in kalıtsal tiplerinde bulunan genetik bozukluklardan yola çıkılarak, sporadik KRK'lerde bu bozukluklara ait moleküler mekanizmaların daha kolay anlaşılabilmesidir.

## 2.2.1 Adenom-Karsinom Süreci

Adenomatöz poliplerin, KRK'e geçiş sürecinin moleküler özelliklerini anlamak KRK'in moleküler patogenezi anlamayı kolaylaştırmaktadır. Polipler genel olarak bağırsağın iç yüzeyine doğru büyüyen lokal lezyonlar olarak tanımlanırlar. Prenen ve arkadaşları (15) büyüklüğü 5 mm altında olan çoğu kolorektal polipleri hiperplastik oluşumlar olarak tanımlanırken bunların KRK'lerin temel öncüsü olmadığını ortaya koymuştur. Aynı araştırmacılar, yerine adenomatöz poliplerin daha önemli öncü KRK lezyonları olduğunu savunmaktadır. Kolon iç yüzeyini kaplayan hücreler gerek zamanla kolon boşluğuna doğru soyularak gerekse apoptoz yolu ile kaybolurlar ve tabandan gelen hücrelerle yenilenirler. Bu döngünün bozulması kolon yüzeyinde ve iç kısımlara doğru büyüyen kitlelere sebep olmaktadır. Sistemin iyice bozulması ise sırasıyla adenomların oluşması, displazi ve nihayetinde dokunun invazif bir yapıya dönüşmesiyle sonuçlanır (Şekil-2). Bu hipotezi destekleyen çok sayıda patolojik, epidemolojik ve klinik veri bulunmaktadır (16). Bu hipotezin temelleri 1990 yılında Fearon ve Vogelstein (17) tarafından atılmış ve daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla daha kuvvetli bir hale gelmiştir. Bu hipoteze göre somatik veya germline mutasyonlar malignan dönüşüm için gereklidir. Multigenik mutasyonların birikimi, hangi sırayla oluştuklarından bağımsız olarak tümörün biyolojik özelliklerini belirlemektedir. Kalıtsal KRK'ler, moleküler mekanizmanın ortaya konulmasında büyük öneme sahiptir. Bu sebeple KRK oluşumundaki moleküler yolların çok iyi bilinmesi gerekmektedir.



Şekil-2 Adenom- Karsinom süreci. Fearnhead ve arkadaşlarının (18) çalışmasından uyarlanmıştır.

## 2.2.2 Kolorektal Kanserde Moleküler Yolaklar

Moleküler yolaklar, önceleri kromozomal ve mikrosatalit kararsızlık yolakları olarak ikiye ayrılmaktaydı. Yıllar boyu edinilen bilgilerle beraber, KRK moleküler mekanizmanın daha karışık olduğu ortaya çıkmış ve daha detaylı açıklanabilmesi için iki farklı yolak eklenmiştir. Bunlardan ilki hipermetilasyon fenotip yolağı diğeri ise sadece sporadik KRK'leri açıklamakta kullanılan hibrit yolaktır (Tablo1).

### 2.2.2.1 Kromozomal Kararsızlık Yolağı

Kromozomal kararsızlık yolağı, *APC* yolağı olarak da bilinmektedir. Kromozomal kararsızlık sonucu apoptoz yolaklarında ve tümör baskılayıcı genlerde aktivite düşüklüğü ortaya çıkmakta diğerk taraftan onkogenler ve büyüme tetikleyici genlerde aktivasyon artışı olmaktadır. Delesyonlar, insersiyonlar ve heterozigosite kaybı gibi kromozomal anomaliler bu tip KRK tümörlerinde görülse bile kromozomal kararsızlık yolağının tam olarak aydınlatıldığı söylenemez. Bu mekanizmada mitotik ipliklerin oluşumu ve düzgün dizilimindeki hataların KRK'e yol açtığı düşünülmektedir (19). Benzer şekilde *APC* inaktivasyonunun KRK oluşumunda rol oynadığı gösterilmiş olsa bile, *APC* mutasyonu taşıdığı halde kromozomal kararsızlık olarak tanımlanamayan tümörlerin varlığı sebebiyle, *APC* mutasyonlarının KRK yolağındaki tek etmen olmadığı görülmektedir.

### 2.2.2.2 Mismatch Tamir Genleri Yolağı

Mikrosatalit kararsızlık yolağı ya da diğerk adıyla mutator fenotip yolağı, 1-10 nükleotid uzunluğundaki genom boyunca  $10^7$  larca hatta  $10^8$  lerce kez tekrar eden ve mikrosatalit olarak bilinen dizilerin kararsızlığı ile karakterize bir yolaktır. Bu tekrar dizileri Replikasyon sırasında yaşanan insersiyonlar veya delesyonlarla uzayıp kısalarak genom boyunca kaymalara neden olur. Bu durumun oluşmasının asıl nedeni ise mismatch tamir genleri olarak bilinen replikasyonda yanlış eşlenen nükleotidleri doğruları ile değiştiren ve dolayısı ile hücreyi mutasyonlardan koruyan tamir enzimlerinin/genlerinin bozuk olmasıdır. Bu tamir genlerinden en sık mutasyon rastlananları MLH1 ve MSH2'dir. Tamir genlerinin doğru şekilde fonksiyonlarının yerine getirememeleri, her bölünmede daha fazla mutasyon birikimine neden olur. HNPCC gibi kalıtsal tümörlerin temel mekanizması olduğu gibi sporadik olarak oluşan tümörlerin de yaklaşık %15'inde

mikrosatalit kararsızlık görülür. Fakat bu vakalarda tamir genlerinin susturulması bu genlerdeki mutasyona bağlı olmayıp, epigenetik bir mekanizma olan hipermetilasyon ile meydana gelir (20). Bu epigenetik değişimin etkilerinin daha çok görüldüğü KRK'ler hipermetilasyon fenotip yolağı ile daha iyi açıklanmaktadır.

### 2.2.2.3 Hipermetilasyon Fenotip Yolağı

Hipermetilasyon fenotip yolağı bir diğer adıyla CpG adaları hipermetilasyon fenotip (CIMP+) yolağı, özellikle yüksek sıklıkta metilasyon gösteren CpG adalarının bulunduğu tümör tiplerini tanımlamakta kullanılır. DNA'nın hipermetilasyonu aralarında mismatch tamir genlerinin de bulunduğu belli başlı bazı genlerde ekspresyon kaybına neden olmaktadır. MLH1 tamir geninin hipermetilasyon sonucu ekspresyonunun azalması MSI karakterinin oluşmasına neden olmaktadır (21). CIMP+ üzerine yaptığı çalışmada Noffsinger (22) kalıtsal ve sporadik tip KRK'ların farklılık gösterdiğini savunmuştur. Buna göre kalıtsal CIMP+ KRK'larda MSI frekansı daha yüksek ve MLH1 metile durumdadır.

### 2.2.2.4 Hibrit Yolak

Bu 3 yolağı ek olarak son yıllarda ortaya atılan Hibrit yolak (23) ise KRK'in temel moleküler mekanizmalarından bazılarını içeren sporadik tipteki KRK'ları tanımlamak için kullanılmaktadır. Bu yolak ile gelişen tümörler kromozomal instabilite göstermekte ve KRAS mutasyonu içermektedir. MGMT metilasyonu taşımaları ve histopatolojik benzerliklerinden dolayı KK ve CIMP+ yolaklarının karışımı olarak görülmektedir (24).

Tablo-1 Kolorektal kanserlerin moleküler sınıflandırması (25)

	Kalıtsallık	CIMP durumu	MSI durumu	Kromozomal kararsızlık	KRAS mutasyonu	BRAF mutasyonu	MLH1 durumu	MGMT metilasyonu
<b>Kromozomal kararsızlık yolağı</b>	Kalıtsal ve Sporadik	Negatif	MSS	Mevcut	+++	---	Normal	---
<b>Mikrosatalit kararsızlık yolağı</b>	Kalıtsal	Negatif	MSI-Y	Yok	+/-	---	Mutasyonlu	---
<b>Serrated/CIMP yolağı</b>	Kalıtsal ve Sporadik	Yüksek	MSI-Y	Yok	---	+++	Metilasyonlu	+/-
		Yüksek	MSI-D	Yok	---	+++	Kısmi metilasyonlu	+++
<b>Hibrit yolak</b>	Sporadik	Düşük	MSI-D yada MSS	Mevcut	+++	---	Normal	+++

Kısaltmalar: CIMP, CpG adaları metilatör fenotipi; MGMT, O-6-methylguanine DNA metiltransferaz; MSI, mikrosatalit instabilite; MSI-Y, Yüksek-seviye mikrosatalit instabilite; MSI-D, düşük-seviye mikrosatalit instabilite; MSS, mikrosatalit kararlılığı.



### 2.2.3 Spesifik Moleküler Değişimler

Spesifik moleküler değişikliklerin etki mekanizmaları, bu genlerin içinde buldukları yolakların ve KRK yolaklarının aracılığı ile KRK patogenezinin anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır. Kanserlerde en sık görülen genetik anomalilerin onkogenik ve tümör baskılayıcı genlerde meydana geldiği görülmektedir. Bu değişimlerin, yıllar boyu yapılan çalışmalar sonrasında elde edilen bilgiler üzerinden, hücre döngüsüne etkileri, moleküler ve klinik sonuçları ortaya çıkarılmıştır.

#### 2.2.3.1 Onkogen Değişimleri

Onkogenler, normal olarak hücre bölünmesi ve büyümesinde fonksiyon gösteren proto-onkogen olarak nitelenen genlerin, nokta mutasyonlarla hasar görmüş halleridir. KRK patogenezinde en sık karşımıza çıkan onkogenler *ras*, *src*, *c-myc* olmakla birlikte en önemlisinin *ras* olduğu bilinmektedir.

##### 2.2.3.1.1 *Ras*

*Ras* onkogeni hücrede *H-ras*, *K-ras* ve *N-ras* şeklinde üç farklı formda bulunur. Bunlardan KRK'lerde en sık mutasyona rastlanılanı *K-ras*'tır, fakat diğer ikisi de hücrel dönüşümde rol alabilmektedir (26). Yapılan çalışmalarda (27) *K-ras* onkogeninin 1 cm çapından küçük adenomlarda % 10-15, 1 cm çapından büyük adenomlarda ise %30-60 civarında mutasyonlu olarak bulunduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan sporadik adenokarsinomlarda ise bu oranın yine %30-60 seviyesinde olması, *K-ras* mutasyonunun geç adenom ve karsinom geçişinden sorumlu olabileceğini göstermektedir (28). Tümör invazyonu ve metastazıyla alakalı olmakla birlikte, *K-ras* mutasyonunu taşıyan hastalarda epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) hedefleyen cetuximab gibi ilaçları etkisiz kıldığı bildirilmektedir (29).

##### 2.2.3.1.2 *Src*

*Src*, hücrede epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), sitokinler ve adipokinler tarafından tetiklenmektedir. Uyarılan *Src* molekülü, hücrenin morfolojisini, proliferasyonunu, hücre döngüsünü etkilemekte ve adezyon, farklılaşma ve

migrasyon gibi hücrel işlevlerin kontrolünü sağlayan hedefleri kontrol etmektedir (30). Tüm KRK'lerin %80'inde *src* aktivitesinde artış gözlemlenirken, hastaların %12'sinde *src* mutasyonu tespit edilmiştir (31).

### **2.2.3.1.3 BRAF**

Diğer bir onkogen değişimi olan *BRAF* mutasyonu KRK'lerin %18'inde görülmektedir. Özellikle V600E (V599E) değişimi *BRAF*'ın sürekli olarak aktif kalmasına neden olarak, onun bölünme, farklılaşma ve sağkalım gibi hücrel işlevlerdeki kontrol görevini olumsuz olarak etkilemektedir (32).

### **2.2.3.2 Tümör Baskılayıcı Genler**

Onkogenlerin tersine tümör baskılayıcı genler (TBG) hücre döngüsünde yavaşlatıcı etki gösterirler. TBG'lerin kaybında ya da aktivitelerinin azalması durumunda fonksiyonları yerine getirilemez ve hücreler kontrolsüz bölünme ve farklılaşma özelliği kazanır. TBG'lerin hücrede tek kopyasının olması işlevlerinin yerine getirilmesi için yeterlidir. Her iki kopyasının kaybolması negatif etkilerin oluşmasına neden olur. Bu bulgu Knudson (33) tarafından çocukluk çağı retinoblastoma (RB) için tanımlanmış ve "two Hit" (çift vuruş) modeli olarak adlandırılmıştır. Kalıtsal bir mutasyonlu RB alleli sonradan somatik mutasyonla birleşince bilateral tümör oluşurken, kalıtsal olarak normal olan RB allellerinin ikisinin de sonradan mutasyona uğraması sonucu unilateral tümör oluşmaktadır. Benzer şekilde KRK'de TBG'lerin rolü, büyük kromozomal delesyonların bulunması ile ortaya çıkmıştır.

Tümör dokulardaki allellerin normal hücrelerden farklılık göstermesi ve tümördeki kromozomal delesyonlar, heterozigosite kaybı (LOH) olarak adlandırılır. İlk yapılan kromozomal KRK çalışmalarında, 5q, 8p, 17p ya da 18 q kromozomlarında yüksek oranlarda LOH görülmüş, ardından yapılan araştırmalar sonucu ise bu LOH bölgelerinde *APC*, *DCC*, *SMAD4*, *SMAD2* ve *p53* genlerinin bulunduğu anlaşılmıştır (34).

### **2.2.3.2.1 APC**

Erken yaş KRK oluşumunda en önemli role sahip tümör baskılayıcı genlerin başında *APC* gelmektedir. Sporadik KRK'lerin %80'inde *APC*'nin her iki allelinde mutasyon

görülmektedir ve kalıtsal tek allel mutasyonu ailesel adenomatöz polipozis (FAP) oluşumuna sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalar FAP oluşumunda *APC* gen kayıplarının önemli olduğunu göstermektedir. Bu hastalarda delesyonlar ve somatik mutasyonlar aracılığı ile meydana gelen ikinci *APC* allel kaybının oluşması, mikroadenom ve küçük adenomatöz polipler oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum *APC* kaybının KRK tümörögenезinin erken basamaklarından biri olduğunu göstermektedir (35). *APC*'nin normal fonksiyonu ve mutasyonlarının nasıl tümör oluşumuna neden olduğu iyi çalışılmış konulardan biridir. Elde edilen önemli bulgulardan birisi, normal ya da mutasyonlu *APC* içeren çoğu sporadik KRK'de Wnt sinyal yolağı elemanlarından biri olan beta-katenin proteininde de mutasyonlar bulunmasıdır. Evrimsel olarak korunmuş olan Wnt sinyal yolağı embriyonik gelişim için elzemdir (36). Benzer şekilde bağırsak epitelinin yenilenmesinde merkezi bir rolü olan Wnt yolağı, bu yönüyle KRK tümörögenезi ile paralellik sergilemektedir. *APC* ve dolayısı ile Wnt yolağında meydana gelen mutasyonlar, hücrenin G1 evresinde tutulmasını engellemekte ya da nihai farklılaşmaya ve apoptoza dirence sebep olmaktadır (37). Diğer taraftan birçok farklı yolağın Wnt ile kesişmesi, bu yolağın “nihai ortak yolak” olarak adlandırılmasına ve diğer yolaklarda meydana gelen mutasyonlarla birlikte benzer karsinojenik sonuçlar oluşmasına sebep olmaktadır. Beta-kateninde olmayıp sadece *APC*'de oluşan mutasyonlar CIN ile bağlantılıdır ve hücreyi diğer genlerde oluşacak mutasyonlara meyilli hale getirerek tümör gelişimine ve malign dönüşüme neden olmaktadır (38).

#### **2.2.3.2.2 p53**

p53, DNA'ya bağlanan ve büyüme inhibe edici genleri transkripsiyonel olarak aktive eden bir proteindir. p53'ün rolü özellikle stres altındaki hücrelerde kritiktir. DNA'ya zarar veren ajanlar ya da hipoksiya gibi diğer stres kaynaklarının varlığında, p53 normal hücrelerde aktive olur ve büyümeyi durdurur (39). Aktivasyon sonucunda hücre döngüsünün durması, apoptoz, senesens ve farklılaşma gibi çeşitli büyüme limitleyici tepkiler ortaya çıkar. Tüm bu işlemler p53'ün yaklaşık 20 civarında hedef genin ekspresyonunu değiştirmesi sayesinde oluşur. Dolayısıyla DNA'sı zarar gören hücrelerin yayılmasını engellediği için “genomun koruyucusu” olarak adlandırılır (40).

p53 geni 17p üzerinde bulunur ve insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan genlerden biridir. KRK'lerde yaklaşık %50-70 oranında mutasyona uğramış ikinci bir p53 alleli bulunur. 17p kromozom kaybı ise yaklaşık olarak KRK'lerin %75'inde bulunur ve

genellikle erken adenomlarda görülmez. Bu durum, *p53* kaybının KRK tümörögenезinin geç evrelerinde oluştuğunu düşündürmektedir (41).

#### **2.2.3.2.3 DCC**

KRK dokularında en sık kromozomal delesyon görülen noktalardan bir diğeri olan 18q üzerinde, yapılan çalışmalarda “deleted in Colorectal Cancer” (*DCC*) olarak nitelenen genin bulunduğu anlaşılmıştır. *DCC* adenomlarda %15’ten daha az, büyük adenomlarda %47 ve sporadik KRK’lerde % 73 civarında görülmektedir (42). Dolayısıyla KRK tümörögenезinde geç evrelerde oluştuğu düşünülmektedir. Çok büyük bir gen olan ve fonksiyonu tam olarak anlaşılamayan *DCC*’nin, KRK’de hücre-hücre ya da hücre-matriks etkileşimini inhibe ettiği sanılmaktadır. Ayrıca *DCC* kaybı sağ kalımı ile ilişkilendirildiği için prognostik bir değere sahiptir. 18q üzerinde sonraki yıllarda pankreatik kanserlerde yapılan çalışmalarda *SMAD4* geninin de bu bölgede olduğu görülmüştür. *SMAD4*, “Transforming Growth Factor- Beta” (TGF-B) yolağında önemli bir sinyal polipeptidini kodlamaktadır. TGF-Beta tip1 (TGFBR1) ve tip2 (TGFBR2) transmembran reseptörlerine bağlanarak, çoğu normal hücrenin büyümesini baskılamaktadır (43). *SMAD4* ve aynı kromozomal bölgede yerleşik olan *SMAD2*’de meydana gelen delesyonlar ve mutasyonlar bu yolağın doğru çalışmamasına ve dolayısıyla hücrenin kontrolsüz büyümesine neden olmaktadır (42).

#### **2.2.3.2.4 TGFB**

Daha önce belirtildiği üzere KRK’lerde TGF-beta’nın inhibitör etkisinden kurtulmak için kullanılan bir mekanizma da *SMAD4* üzerindedir. Diğer muhtemel mekanizmalar *TGFBR2* genindeki inaktive edici mutasyonlar ve TGF-Beta yolağını büyüme tetikleyici hale getiren moleküler değişimlerdir (44).

Örneğin TGFBR1\*6a değişiminin, KRK ve diğer kanser riskini artırdığı görülmüştür. Bu değişimin sonucu olarak, TGF-Beta yolağı büyüme inhibe edici etkisini kaybedip, büyümeyi artıran bir özellik kazanmaktadır. Diğer taraftan bu değişim kalıtsal olarak primer KRK’lerin %87’sinde sörölmektedir (45).

### 2.2.3.3 Mismatch Tamir Genleri

Mismatch tamir genleri (MMR) DNA replikasyonu sırasında oluşan yanlış nükleotid eşleşmelerini, küçük insersiyon ve delesyonları düzeltmekle görevlidirler. MMR genleri arasında *MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6* ve *MLH3* gibi genler bulunmaktadır. Kalıtsal olarak MMR genlerinden birinde bulunan mutasyonlar HNPCC'nin moleküler sebebi durumundayken, sporadik KRK'lerin yaklaşık %15'inde bu genlerin ekspresyon kaybı söz konusudur. Sporadik KRK'lerde ekspresyonun azalması genetik değil epigenetik faktörler etkisiyle oluşmaktadır. Lynch- benzeri sendromda ise biallelik MMR mutasyonları görülür ve KRK gelişme riski bu ailelerde daha yüksektir (46). MMR mutasyonları sonucu genomda DNA hataları birikmektedir ve bu durum en iyi mikrosatellitler üzerinde gözlemlenebilmektedir. HNPCC hastalarının büyük bir kısmında yüksek mikrosatellit instabilite (MSI-Y) gözlemlenirken, sporadik KRK'lerin sadece %15'ine yakını MSI-Y'dir. Her ne kadar genomik kaymalardan dolayı hücrel mekanizmalar etkilense bile, MSI-Y gözlemlenen bireylerde sağ kalım daha uzundur (47).

Mismatch tamir genleri alt başlığında belirtildiği gibi mutasyonlar ve allel kayıpları, HNPCC vakalarının çoğunda görülen MSI fenotipinin oluşmasına neden olur. Diğer taraftan MMR genlerinin promotor bölgelerinde meydana gelen hipermetilasyon ya da DNA üzerinde meydana gelen ve tek bir allelin baskılanması (loss of imprinting) ile sonuçlanan hipometilasyon durumları sporadik tip KRK'lerdeki MSI fenotipinden sorumludur (48). Metilasyon sonucu oluşabilecek MMR değişimlerinin en önemlisi ve sık görüleni hipermetilasyondur. Her ne kadar metilasyonu tetikleyen süreç net olarak bilinmese bile, MMR genlerinin promotor bölgelerinde meydana gelir ve CpG adacıklarında metilleşme oluşur. Ardından bu bölgelere, metil-CpG bağlanma alanı proteini denilen proteinler bağlanır ve kromatin biçimi değişir. Bunun sonucu olarak MMR genleri sessizleştirilmiş olur (49). İkinci önemli mekanizma ise tek bir MMR allelinde daha zigot aşamasında metilasyon oluşması ve bu allelin baskılanarak diğer allelin özelliklerinin ön plana çıkmasıdır. Bu mekanizma "loss of imprinting" olarak bilinmekte ve daha çok insülin-benzeri büyüme faktörü 2 (IGF2) üzerinde etki göstermektedir. Dolayısı ile KRK tümörogenizinden sorumlu olmaktan ziyade risk faktörünü artıran bir özellik olarak değerlendirilmektedir (50).

## 2.3 Kolorektal Kanser Epigenetiği

KRK patogenezinde genetik değişimlerin etkisi üzerinde uzun süredir çalışılmaktadır. Bu açıdan en fazla aydınlatılmış kanser türlerinin başında gelmektedir. Bu çalışmalar son dönemde, mismatch tamir genleri ve *MGMT* geni üzerindeki DNA metilasyonunun etkilerinin ortaya çıkarılmasıyla, çalışmaların yönü epigenetik mekanizmalara çevrilmiştir. Epigenetik değişimler kabaca DNA dizisinde değişime neden olmadan gen ifadesinde farklılıklar oluşmasına neden olan değişimler olarak tanımlanabilir. Epigenetik değişimlerin oluşumunda DNA metilasyonu, post-translasyonel histon modifikasyonları, nükleozom pozisyonlaması, kromatin dğümlemesi (looping) ve başta mikroRNA'lar olmak üzere küçük kodlama yapmayan RNA'lar rol oynamaktadır.

### 2.3.1 DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu neredeyse genetik değişimler kadar önem taşıyan ve KRK moleküler mekanizmasının önemli faktörlerinden biridir. İlk tespit edilen epigenetik değişim DNA hipometilasyonu olarak adlandırılan durumdur. DNA hipometilasyonu yaşa bağlı olarak gerçekleşir. KRK karsinogenezinin ilk aşamalarında 5-metilsitozin grubunun kaybolması ile oluşur (51). Özellikle tekrar eden CpG dinükleotidlerinde meydana gelir ve onkogenler üzerinde görülür (52). Suzuki ve arkadaşları yaptığı çalışmada perisentromik bölgelerde meydana gelen hipometilasyonun artan genomik kararsızlığa sebep olduğu gösterilmiştir ve bu durumun rekombinasyonlara ve kromozomal replikasyonlara neden olduğu ortaya konulmuştur (53). Diğer bir çalışmada ise DNA hipometilasyonun "loss of imprinting" yani ebeveynden gelen allellerden birinin etkilenmesi sonucu işlev görememesine neden olduğu gösterilmiştir (54).

DNA hipermetilasyonu yaklaşık olarak genlerin %60'ının promotor bölgelerinde bulunan yoğun CpG dinükleotidleri içerdiği için CpG adaları olarak adlandırılan bölgelerde oluşur (55). Sporadik MSI-Y KRK ile karakterize olan MLH1 mismatch tamir geninin promotor bölgesinin hipermetilasyonu en iyi karakterize edilmiş epigenetik değişim olup klinik olarak lynch sendromunu anlamakta kullanılmıştır. Hipermetilasyon, geniş KRK yolakları ve genleri etkilediği gibi, miRNA ekspresyonunu dahi promotor hipermetilasyonlar ile değiştirebilmektedir (56). Promotor bölge hipermetilasyonlarının adenom ve KRK'lerde büyük farklılıklar göstermesinden dolayı, KRK yolakları başlığında anlatılan CpG adaları metilatör fenotip (CIMP) konsepti ortaya çıkmıştır. DNA

metilasyonunun kalıtsal özelliği ile ilgili yayınlar bulunmakla birlikte elde edilen sonuçlar oldukça tartışmalıdır.

### 2.3.2 Histon Modifikasyonları

Epigenetik mekanizmalardan bir diğeri ise histon modifikasyonlarıdır. Bu mekanizma, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon ve sumoyilasyon gibi mekanizmalar ile kromatinin temel yapısı olan histonların, DNA ve diğere proteinler ile etkileşimlerinin değişmesini ifade eder. Bu değişimler sonucu o bölgede bulunan genlerin ekspresyon seviyeleri değişmektedir. Histon modifikasyonları nedeniyle DNA metilasyonu ile bağlantılı olarak *P16*, *MLH1* ve *MGMT* gibi genlerin susturulduğu gösterilmiştir (57).

### 2.3.3 mikroRNALAR

mikroRNA'lar kodlama yapmayan, 17-25 nükleotid uzunluğundaki düzenleyici RNA molekülleridir. Hayvanlarda, bitkilerde ve hatta bazı virüslerde bulunabilen miRNA'lar, mesajcı RNAların (mRNA) 3' UTR, kodlama yapan bölge ya da 5' UTR bölgelerine bağlanarak, RNA'nın parçalanması ya da okunmasına engel olarak, posttranskripsiyonel şekilde ilgili gen ekspresyonunu düzenlerler. miRNA'ların bu özellikleri 1993 yılında *Caenorhabditis elegans* üzerinde lavral aşamalar üzerine çalışan Ambros ve Ruvkun laboratuvarı tarafından birbirinden bağımsız şekilde bulunmuştur. Ambros ve Ruvkun tarafından bulunan ilk miRNA lin-4'tür. Ardından gelen yıllarda çalışmalar devam etse de ikinci miRNA ancak 2000 yılında Ruvkun laboratuvarından Reinhart ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. Bulunan ikinci miRNA, yine *c. Elegans*'ta büyümeyi düzenleyen let-7'dir. Lin-4'ten farklı olarak Let-7'nin evrimsel olarak korunan bir diziye sahip olduğunun ve diğere birçok canlıda bulunduğu ortaya çıkması, miRNA çalışmalarına ivme kazandırmış ve diğere türlerdeki çalışmaları hızlandırmıştır (58). Mirbase internet veritabanına göre *Homo sapiens*'te 1881 precursor, 2588'de olgun miRNA tanımlanmıştır (59).

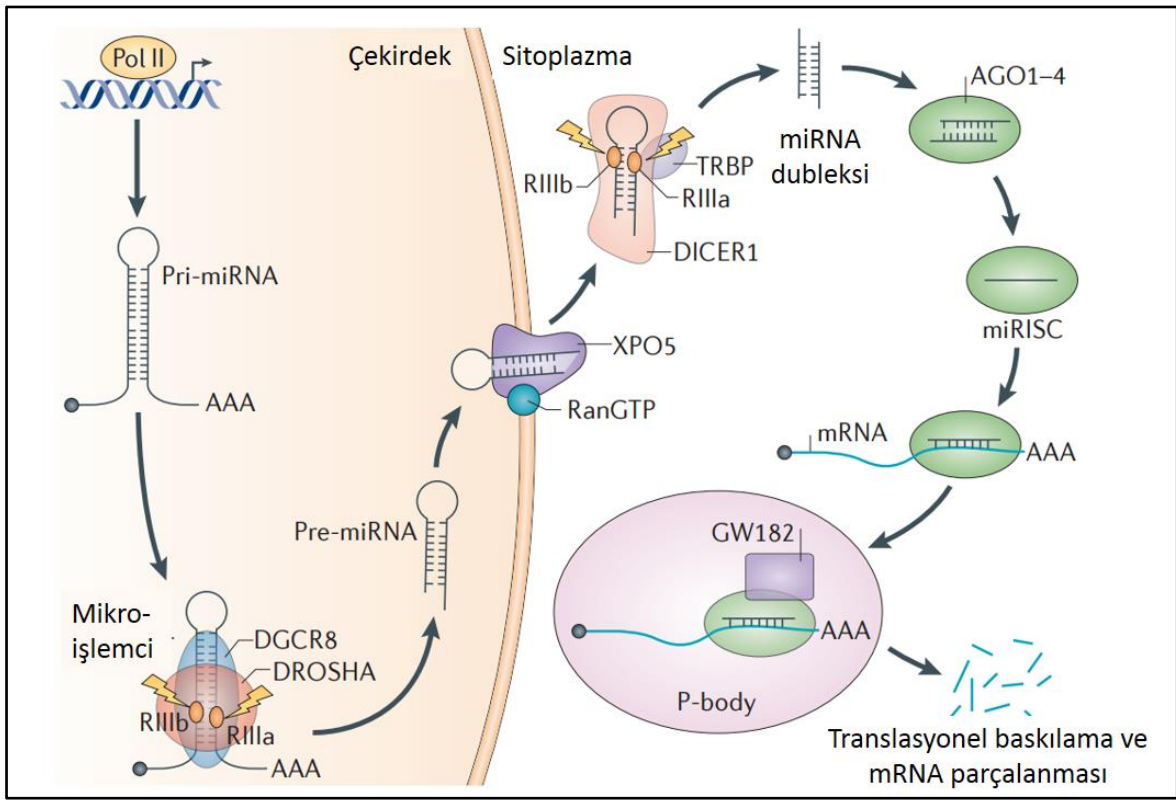
### 2.3.3.1. miRNA Biyogenezi ve Fonksiyonu

miRNA'lar hücre çekirdeği içerisinde kodlama yapmayan (non-coding) RNA bölgeleri içerisinde yada protein kodlayan genlerin intronlarında gömülü olarak bulunan dizilerden RNA polimeraz II tarafından primer-miRNA (pri-miRNA ) şeklinde 500 ila 3000 baz arasından olacak şekilde sentezlenirler (60). Pri-miRNA saç tokası şeklinde ve çift zincirli bir yapıdadır ayrıca mRNA'lar gibi poli-adenin kuyruğuna ve 5' başlığına sahiplerdir. Sentezlenen pre-miRNA'dan polisistronik biçimde birden fazla miRNA oluşturulabileceği gibi tek bir miRNA da üretilebilir (61). Ayrıca intronlardan kodlanan miRNA'ların, ilgili genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde görev aldığı düşünülmektedir (62).

Transkripsiyonundan sonra pri-miRNA RNaz III ailesinden iki enzimin arda arda işlemleri ile kesime uğrar. Bu işlemlerden ilki çekirdek içerisinde Drosha enzimi ve ona eşlik eden çift zincirli RNA bağlanma bölgesi bulunduran Pasha ile birlikte pri-miRNA'yı keserek yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki parçalara ayırır. Bu parçalar pre-miRNA olarak adlandırılır ve üzerindeki eksik eşleşmeler yine Drosha enzimi tarafından düzeltilir. İkinci adım sitoplazmada gerçekleşir (Şekil-3). Pre-miRNA çekirdekten sitoplazmaya RAN-GTP bağımlı şekilde Exportin 5 tarafından taşınır. Sitoplazmada Dicer-TRBP tarafından tekrar kesime uğrayan pre-miRNA, çift zincirli yapısını korur fakat yaklaşık 20 nükleotidlik bir uzunluğa kadar düşer. Çift iplikten sadece bir tanesi olgun miRNA'ya dönüşebilir. Bu noktada, zincirlerden hangisinin 5' ucu termodinamik açıdan daha düşük enerjiye sahipse o olgun miRNA'ya dönüşür ve diğer zincir degrade olur. Dicer, argonaute (Ago) ile birleşerek ribozom-indüklü susturucu kompleks (RISC) bünyesine katılır. Bazı kaynaklar RISC ile birçok ortak yönü olan miRNA içeren ribonükleoprotein parçacığının (miRNP) adlandırmasını kullanabilmektedir. Olgun miRNA, baz eşleşmeleri doğrultusunda miRNP'yi hedef gen bölgesine yönlendirir. Bu bölgeler mRNA'nın 3'UTR kısmı olabileceği gibi kodlama yapan dizi de olabilir. Son dönemde yapılan çalışmalarda, 5'UTR'ye bağlanmanın da söz konusu olduğunu göstermiştir(63). RISC tam, kısmi ya da eksik komplementer bağlanma ile fonksiyon gösterebilir. miRNA dizisinin 5' bölgesindeki 2-8 nükleotidi bu bağlanma görevini hedef mRNA dizisi ile yapar ve bu eşleşme bölgesine çekirdek (seed) dizi denir (64). Bazı çalışmalarda kısmi komplementer dizilerin mRNA seviyelerinde güçlü bir değişim oluşturmadığı belirtilse de yeni bulguların miRNA'ların kısmi eşleşmelerinin bile kuvvetli mRNA düşüşlerine sebep olabileceği savunulmaktadır. Hemen hemen bütün ago proteinleri hem miRNA hem de siRNA'lar ile kompleksler oluşturabilirler bile sadece Ago2 proteini ile oluşturulan kompleksler mRNA kesimine



sebeptir. miRNA-RISC yapısı üç ayrı işlem ile etkisini gösterir. Bunlardan ilki ve memelilerde en az yaygın olanı bölgeye özel kesim, (site-specific cleavage) genellikle RNAi olarak bilinir ve tam ya da tama yakın eşleşme durumlarında görülür. Memelilerde görülme sıklığı daha fazla olan diğer işlemler mRNA yıkımının kolaylaştırılması ve translasyonun inhibisyonudur. Son iki işlemin mekanizmaları hala tartışmalı birer konudur (65). Yakın zamanda ortaya atılan diğer iki senaryodan ilki (66) RISC'ten bağımsız olarak miRNA'ların ribonükleoproteinlere bağlanarak bu proteinlerin işlevlerini engelleyebildiklerini ikincisi (67) ise miRNA'ların DNA'ya direkt bağlanarak gen ekspresyonunu transkripsiyon seviyesinde düzenleyebileceklerini savunmaktadır.



Şekil-3 mikroRNA biyogenezi (61)

### 2.3.3.2 Kolorektal Kanserde miRNA'lar

miRNA'ların keşfinden itibaren memeliler ve hastalıkları üzerindeki etkileri merak konusu olmuştur. Özellikle kanserdeki rolleri çok sayıda çalışmanın önünü açmıştır. Kanser alanında miRNA çalışmaları 2002 yılında Calin ve arkadaşların kronik lenfatik lösemide (KLL) miRNA'ların insan tümörlerindeki varlığını göstermesi ile başlamıştır (68). KRK'de ise bu çalışmaların ilki 2003 yılında Michael ve arkadaşları (69) tarafından

KRK da azalan miRNA ekspresyonlarını gösterdiği çalışma ile başlamıştır. miRNA'ların yaklaşık tüm genlerin %60-70'inin regülasyonundan sorumlu olabileceği düşünülürken, kanser oluşumunda etkili olan hücre farklılaşması, büyüme, çoğalma ve apoptoz gibi mekanizmalardaki genleri etkileyerek KRK'de büyük önem taşıdığı savunulmaktadır. Kanser patogenezinde iki önemli gen grubu olan onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde miRNA'ların etkileri ayrı ayrı incelenmektedir.

### 2.3.3.2.1 Tümör Baskılayıcı miRNA'lar

Onkogenleri hedefleyerek onkosupresif rol üstlenen miRNA'lar tümör baskılayıcı miRNA olarak adlandırılırlar. Örneğin miR-18, Kristen-Ras (K-RAS) ile ters orantılı bir şekilde eksprese olmaktadır. HT-29, A431 ve WRL-68 gibi KRK hücre hatlarında yapılan deneylerde miR-18'in baskılanması yani ekspresyonunun düşürülmesi ile hücrelerin daha hızlı yayıldığı ve büyüdüğü gösterilmiştir (70). Diğer bir önemli tümör baskılayıcı miRNA ise miR-133a'dır. Fascin1 (*FSCNI*)'i hedefleyen ve bu genle ters orantılı olarak eksprese olduğu gösterilen miR-133a'nın, birçok KRK hücre hattında ve KRK tümör dokusunda ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (71). Ayrıca ERK ve MEK proteinlerinin fosforilasyonunu engelleyen miR-133a'nın MAPK sinyal yolağı üzerinden de etkili olduğu bulunmuştur (72). Tümör doku ve hücre hatlarında ekspresyonu düşen diğer bir miRNA ise miR-194'tür. PDK/AKT2 sinyal yolağını hedefleyen miR-194, hücre büyümesi, apoptozu, migrasyonu ve invazyonunu inhibe edebilmektedir (73). Diğer taraftan Wang ve arkadaşları (74) Mir-194'ün MAP4K4'ü hedefleyerek Vec-Jun transkript faktörü üzerinden *MDM2* ekspresyonunu düzenleyip hücre döngüsünde G1 fazında tutunumu artırdığını ortaya koymuştur. Bu yolla tümör büyüklüğü ve farklılaşmasını azalttığını göstermiştir. Benzer şekilde KRKde miR-126 VEGF, AKT ve ERK1/2 sinyal yolakları üzerinden, miR-375'in *PIK3CA* üzerinden ve miR-455'in *RAF1* üzerinden tümör baskılayıcı işlevler üstlendiği gösterilmiştir. Diğer birçok tümör baskılayıcı miRNA'lar Tablo-2'de gösterilmiştir.

Tablo-2 Kolorektal kanserde rol oynadığı belirlenen tümör baskılayıcı microRNAlar (75)

miRNA	Hedefler	Biyolojik fonksiyonu	E.Y.*
<b>let-7 ailesi</b>	<i>K-ras, c-Myc, CDC34, CDC25A, CDK6, HMGA2, Lin28 ve Lin28B, Bcl-2, STAT3, integrin, vimentin ve E-cadherin</i> 'in mRNAsı	Migrasyon ve invazyonunu baskılanması, anjiyogenezin artırılması	↓
<b>let-7a</b>	<i>K-ras</i>	Hücre proliferasyonu, tümör sağ kalımı anjiyogenez ve metastazın baskılanması	↓
<b>miR-143</b>	<i>ERK5, DNMT3A, Bcl-2, NF-κB, K-ras, ELK1</i>	<i>MAPK</i> 'nın fosforilasyonunun baskılanması, apoptozun artırılması, kolon kanser hücrelerinin 5-FU'ya karşı duyarlılaştırılması, hücre döngüsünde tutunumun indüklenmesi, hücre büyümesinin baskılanması, anjiyogenez ve metastazın baskılanması	↓
<b>miR-200 ailesi</b>	<i>ZEB1, ZEB2, TGFβ2, Sox2, Klf2</i>	Metastazın baskılanması, kök hücre benzeri özelliklerin ve inflamasyonun inhibe edilmesi	↓
<b>miR-200</b>		K-ras aktivasyonu,	
<b>miR-141</b>	<i>TGFβ2</i>	Metastazın düzenlenmesi	
<b>miR-200c</b>	<i>ZEB1</i>	Metastazın düzenlenmesi	
<b>miR-215</b>	<i>DHFR</i>	Hücre proliferasyonu ve hücre döngüsünün baskılanması, kolon kanser hücrelerinin 5-FU'ya karşı duyarlılaştırılması	↓
<b>miR-34 ailesi</b>	<i>c-Met</i>	Tümör oluşumu ve metastazın baskılanması, kemoterapi ve radyo terapiye karşı duyarlılaştırma	↓
<b>miR-34a</b>	<i>E2F1/3, Bcl-2, CD24 ve Src, CD44</i>	Apoptozun başlatılması, kolon kanser hücrelerinin 5-FU'ya karşı duyarlılaştırılması, proliferasyon, hareketlilik ve metastazın baskılanması	
<b>miR-34b ve miR-34c</b>		Proliferasyonun baskılanması, hücre döngüsünde tutunumun indüklenmesi	
<b>miR-145</b>	<i>IRS-1, IGF-IR, YES, FLI1, FSCN1, BIRC2, VANGL1, DFF45, HIF-1a, VEGF, c-myc, MUC1, OCT4, SOX2, KLF4, ADAM17, CCND2, p70S6K1</i>	Hücre döngüsünde tutunumun indüklenmesi, hücre büyümesinin baskılanması, proliferasyon, invazyon ve metastazın baskılanması, Apoptozun düzenlenmesi, anjiyogenezin inhibisyonu	↓
<b>miR-126</b>	<i>p85β</i>	KRK büyümesinin baskılanması	↓
<b>miR-195</b>	<i>Bcl-2</i>	Apoptozun artırılması	↓
<b>miR-491</b>	<i>Bcl-xL</i>	Apoptozun başlatılması	↓
<b>miR-133</b>	<i>c-Met, K-ras</i>	Apoptozun düzenlenmesi, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve sağ kalımın düzenlenmesi	↓
<b>miR-101</b>	<i>COX-2, PTGER4/EP4, EZH2, N-Myc, Mcl-1</i>	Büyümesinin, migrasyon ve invazyonun baskılanması, Apoptozun artırılması	↓
<b>miR-107</b>	<i>VEGF</i>	Anjiyogenezin baskılanması	↓
<b>miR-155</b>	<i>hMSH6, hMSH2 ve hMLH1</i>	Genetik bütünlüğün korunması	↓
<b>miR-137</b>	<i>LSD-1</i>	Tümör hücrelerinin ilerlemesinin durdurulması	↓
<b>miR-342</b>	<i>DNMT1</i>	Hücre döngüsünde tutunumun indüklenmesi, hücre büyümesi ve invazyonun baskılanması	↓
<b>miR-30</b>		Metastazın baskılanması	↓
<b>miR-30a-5p</b>	<i>DTL</i>	Hücre döngüsünde tutunumun indüklenmesi, Apoptozun artırılması	↓
<b>miR-365</b>	<i>Cyclin D1, Bcl-2, Mybl2</i>	Hücre döngüsü ilerleyişinin durdurulması ve apoptozun artırılması	↓
<b>miR-345</b>	<i>BAG3</i>	Hücre büyümesi, invazyon ve lenf donu metastazının baskılanması, apoptozun artırılması	↓
<b>miR-214</b>	mRNA of Quaking	Anjiyogenezin baskılanması	↓
<b>miR-16</b>	<i>VEGF, VEGFR2, FGFR1</i>	Anjiyogenezin baskılanması	↓
<b>miR-424</b>	<i>VEGF, VEGFR2, FGFR1</i>	Anjiyogenezin baskılanması	↓

\*E.Y: Ekspresyon yönü

### 2.3.3.2.2 Onkogenik miRNA'lar

Tümör dokularda ekspresyonu yükselen miRNA'lar onkogenik miRNA'lar yada onkomir olarak tanımlanır. Bu gruptaki miRNA'lar tümör büyümesini, tümör baskılayıcı, hücre farklılaşmasından sorumlu ve apoptozu kontrol eden genleri inhibe ederek durdururlar (76). Birçok miRNA'nın KKK tümör dokularında ekspresyonunun yükseldiği gösterilmiş olsa bile az bir kısmı çok iyi şekilde karakterize edilebilmiştir. Bu bölümde KKK'de iyi tanımlanmış belli başlı onkomirlere yer verilecektir. Diğer onkomirler Tablo-3'de gösterilmiştir. miR-21 -yeni adlandırılmasıyla miR-21-5p KKK'de en yüksek eksprese olan onkogenik miRNA'dır. Prognostik açıdan 2008 yılından beri değerlendirilmektedir. İlk olarak 2007 yılında Slaby ve arkadaşları (77) tarafından, KKK'in klinik aşamalarıyla Mir-21 ekspresyonunun doğrusal olarak arttığı gösterilmiştir. Ardından 2008 yılında Asangani ve arkadaşları (78) tarafından kanser hücrelerinin invazyonunu, metastazı ve intravazyonunu artıran tümör baskılayıcı *Pdcd4* geni ile miR-21 arasında negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir. *PTEN* genini post transkripsiyonel olarak düzenleyerek hücre büyümesi ve proliferasyonunu etkilediği belirtilmektedir (79). Tümör doku dışında gaita ve kan örneklerinde dahi miR-21 seviyesinin yüksek olması bu miRNA'nın yüksek biyomarker potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (80). Yapılan çalışmalarda yüksek miR-21 seviyesinin KKK'de kısa sağ kalım belirteci olduğu savunulmaktadır ve anti-miR-21 uygulamalarının söz konusu olabileceği belirtilmektedir (81). Diğer bir önemli onkomir ise miR-31'dir. Yapılan çalışmalarda miR-31 hem tümör doku örneklerinde hem de hücre hatlarında hedefi olan *HIF-1 alfa* ile negatif korelasyon içinde olduğu ve bu yolla KKK hücre büyümesi, migrasyonu ve invazyonu artırdığı gösterilmiştir. miR-31 bastırıldığında ise KKK hücrelerinin koloni kurma özelliklerinin ve yayılma yeteneklerinin bastırıldığı (82), başka bir çalışmada ise *RhoBTB1* üzerinden KKK'in genişleme ve ilerlemesine katkı sağladığı ortaya konulmuştur (83). Ayrıca, RASA1 proteinini baskılayıp, RAS sinyal yolağını aktive ederek hücre büyümesine sebep olduğu bulunmuştur (84). miR-92nin lenf nodu ve uzak metastazı olan hastalarda ve kısa sağ kalımı ve ileri klinik evre ile önemli ölçüde korale olduğu ve yine *PTEN*'i baskılayarak hücre büyümesi, migrasyonu ve invazyonunu artırdığı gösterilmiştir (85, 86). Bunların dışında miR-103'ün DICER ve PTEN, miR-135a'nın APC, miR-155in MLH1, MSH2,MSH6 miR-181anın WIF-1, PTEN miR-196b'nin FAS miR-221in *p53* üzerinde etkili olarak KKK patogeneziine sebep olduğu bilinmektedir (87, 88).

Tablo-3 Kolorektal kanserde rol oynadığı belirlenen tümör baskılayıcı microRNAlar (75)

miRNA	Hedef genler	Biyolojik fonksiyonu	E.Y*
miR-17-92	<i>TSP1, CTGF, E2F1</i>	Anjiyogenezin artırılması	↑
miR-17	<i>RND3</i>	Tümör hücre büyümesinin artırılması, hücre döngüsünde tutunumun baskılanması	↑
miR-19a	<i>WNT3</i>	Lenf nodu metastazının artırılması, apoptozun inhibe edilmesi	↑
miR-19b-1		Apoptozun inhibe edilmesi	↑
miR-20a	<i>BNIP2</i>	Kemoterapi rezistansı, apoptozun inhibe edilmesi	↑
miR-92	<i>BIM</i>	Apoptozun baskılanması, Lenf nodu metastazının artırılması, hücre tutunma ve sitokin etkileşimi, invazyonun artırılması	↑
miR-18a	<i>RND3, ERK5, DNMT3A, K-ras</i>	MAPK'nın sürekli fosforilasyonunun engellenmesi	↑↓
miR-675	<i>RB</i>	Malign dönüşümün ve hücre büyümesinin artırılması, hücre döngüsünün düzenlenmesi	↑
miR-21	<i>PTEN, PDCD4, RECK, TIMP3, NFIB, SPRY2, TGFβR2, TIAM1</i>	KRK ilerlemesinin artırılması, migrasyon ve invazyonun geliştirilmesi, kök hücre benzeri özelliklerin ve inflamasyonun inhibe edilmesi, Kemoterapi rezistansı	↑
miR-31	<i>AXIN1, FOXC2, FOXP3, TIAM1, SATB2</i>	Migrasyon, invazyon ve metastazın artırılması	↑
miR-96	<i>CHES1</i>	Apoptozun inhibe edilmesi	↑
miR-135a	<i>APC</i>		↑
miR-135b	<i>APC</i>	Fenotip korunumunda bulunma	↑
miR-106a	<i>RND3</i>	Farklılaşmanın sağlanması	↑
miR-190	<i>PHLPP</i>	Proliferasyon, malign dönüşüm ve metastazın artırılması	↑
miR-95	<i>SNX1</i>	Hücre büyümesinin artırılması	↑
miR-221	<i>CDKN1C/p57, TSP1</i>	Hücre büyümesinin artırılması, apoptozun, hücre döngüsünde tutunumun ve farklılaşmanın baskılanması, anjiyogenezin artırılması	↑
miR-155	<i>hMSH6, hMSH2, hMLH1</i>	Apoptozun baskılanması	↑
miR-4995p	<i>FOXO4, PDCD4</i>	Migrasyon, invazyon ve metastazın artırılması	↑
miR-103/107	<i>DAPK, KLF4</i>	İnvazyon ve metastazın artırılması	↑
miR-129*		Lenf nodu metastazının artırılması	↑
miR-137		Lenf nodu metastazının artırılması	↑
miR-9	<i>mRNA of E-cadherin</i>	Lenf nodu metastazının artırılması	↑
miR-126		Anjiyogenezin artırılması	↑
miR-27b	<i>SEMA6A, Dll4 and Spry2</i>	Anjiyogenezin artırılması	↑
miR-10b	<i>HoxD10</i>	Anjiyogenezin artırılması	↑

\*E.Y: ekspresyon yönü

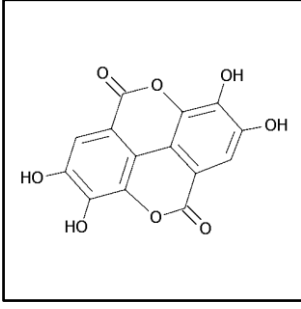
## 2.4. Terapötik Bitkilerin KRK Epigenetiğinde Rolü

Genetik değişimlerin kalıcı etkilerinden farklı olarak, hipermetilasyon, histon modifikasyonları ve miRNA etkileşimi gibi epigenetik faktörlerle oluşan ekspresyon değişimleri, ilaçlar ve kimyasallarla tersine döndürmek mümkün olmaktadır. Bu anlamda FDA, DNA metiltransferaz ve histondeasetilaz inhibitörlerini kanser tedavisi açısından

onaylamıştır (89). Terapotik bitkilerin ve etken maddelerinin benzer bir yaklaşımla miRNA ekspresyonlarını etkileyerek KRK tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

#### 2.4.1 *Rubus Fruticosus*

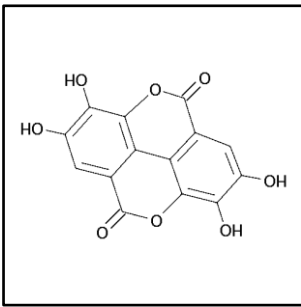
*Rubus fruticosus* (Böğürtlen), gülgiller (Rosaceae) familyasının *Rubus* cinsini oluşturan cindi insan sağlığında önemli rolleri olan organik asitler, mineraller ve vitaminler bakımından çok zengin bitki türlerinin ortak adıdır. Çok geniş bir yetişme alanına sahip olan *Rubus fruticosus* besin değeri açısından oldukça zengindir ve batı diyetinde de kullanılmaktadır. Meyvesi taze olarak tüketilmekte ya da Anadolu’da reçel olarak muhafaza edilerek kış kullanımına uygun olarak muhafaza edilebilmektedir. Yaprakları ise kurutulularak çay olarak tüketilmektedir. *Rubus* türü bitkiler (siyah ahududu, böğürtlen, morion üzümü, kırmızı ahududu, çilek vb.) yüksek miktarlarda antosiyanin ve ellagik asit (Şekil-4) içermektedirler (90). Geleneksel tıpta da kullanılan *Rubus fruticosus* özellikle karaciğer ve böbrek rahatsızlıklarında, doğum sancılarının iyileştirilmesi ve diyeraya gibi farklı rahatsızlıkların iyileştirilmesinde kullanılmıştır. *Rubus* türlerinin anti kanser etkileri gösterdiği de bilinmektedir. Serbest radikalleri temizleme, zenobiyotik metabolizmasında etkin olan genleri aktive etme, gen ekspresyonlarını düzenleme, hücrel sinyalleri değiştirme ve apoptozu indükleme gibi özellikleri anti kanser etkilerinin oluşmasına neden olduğu belirtilmektedir (91). *Rubus fruticosus* içerisindeki bileşiklerden bazılarının kolon kanseri üzerinde etkileri son yıllarda daha dikkatli bir şekilde değerlendirilmiştir. 1,2 dimetilhidrazin ile oluşturulan sıçan kolon kanseri üzerinde, böğürtlen kökünün temel bileşenlerinden biri olan ellagik asidin, AKT- fosfoinositid-3 kinaz yolağını baskılayarak kanser oluşumunu önlediği bildirilmiştir (92). Benzer bir şekilde yine 1,2 dimetilhidrazin ile oluşturulan sıçan kolon kanserinde, ellagik asidin, inflamasyon elemanları olan NF-kappaB, iNOS, COX-2, TNF-alfa ve IL-6 üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ellagik asitin bu özelliklerinden yola çıkarak Santos ve ekibi, biyoyararlanım ve hedefe yönelik terapi açısından bu molekülü kolon ve rektal kanser tedavisinde değerlendirmişlerdir (93). *Rubus fruticosus* kök ekstresi (RKE) ile KRK üzerine yapılmış şu anki bilginiz dahilinde bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat Blassan ve arkadaşları İnsan KRK Caco-2 hücre hattında, *Rubus fairholmianus* kök özütünün kaspaza bağımlımlı yolaklarla apoptozu indükleyerek, hücre büyümesini durdurduğunu göstermiştir (94). KRK üzerinde farklı *Rubus* türleri ile gerek in vivo gerek in vitro çalışmalar yapılmış olsa dahi, RKE’nin miRNA ekspresyonu seviyesinde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.



Şekil-4 Ellagik asidin kimyasal yapısı

#### 2.4.2 *Nigella sativa*

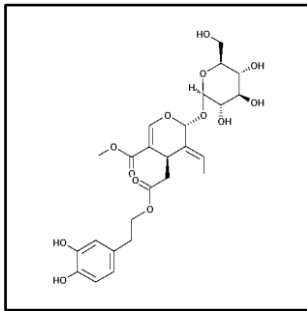
*Nigella sativa* (Çörek otu) bitkisi ve yağı yüzyıllardır Asya, Afrika ve orta doğu ülkelerinde sağlıklı yaşam ve hastalıklarla savaşmak için kullanılmaktadır. Çörek otu içeriğinde yüksek miktarlarda bulunan timokinon (TQ) (Şekil-5) bileşiği bulunmaktadır. Gali ve arkadaşları, HCT-116 kolon kanseri hücre hattında TQ'un p53 yolağı üzerinden apoptoza neden olduğunu göstermiştir (95). Dalal ve ekibi ise yaptıkları in vivo çalışmada *Nigella sativa*'nın antioksidan ve kemoterapatik etkililerini sıçan kolon kanseri üzerinde araştırmış ve DNA hasarını engelleyici bir rol oynadığını rapor etmiştir (96). Diğer bir in vivo çalışmada fare kolon kanseri üzerinde TQ'un tümör büyümesini engellediği ve tümör invazyonunun önüne geçtiği belirtilmiştir (97). Bir diğer önemli çalışmada ise yeşil çayın temel bileşeni olan Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ve TQ sürekli şekilde SW-620 kolon kanseri hücre hattına uygulanmıştır. Her iki etken maddenin de 5-FU ile kayda değer şekilde benzer etkilere yol açarak, hücresel yıkıma ve metabolik fonksiyon bozukluklarına neden olduğu ortaya konulmuştur (98). Ancak, *Nigella sativa* tohum ekstresi (NTE)'nin, KRK'de miRNA ekspresyon seviyelerine olan etkileri araştırılmamıştır.



Şekil-5 Timokinonun kimyasal yapısı

### 2.4.3 *Olea europaea*

*Zeytin (Olea Europaea)* dünyanın birçok bölgesinde yetiştirilir fakat Akdeniz havzası tarımsal üretimin ana merkezi olup dünyadaki zeytin üretimin %98'i bu bölgede yapılmaktadır (99). Zeytin ağacından sağlanan temel ürün zeytinyağıdır ve içerdiği fenolik bileşenler açısından yoğun bir şekilde antioksidan çalışmalarında kullanılmaktadır. Fenolik içerik açısından zeytinyağı ön plana çıkmış olsa da Zeytin yaprağı oleuropein, hidroksitirosol, verbaskozit, apigenin-7-glukozit ve luteolin-7-glukozit gibi fenolik bileşenler açısından bitkinin diğer bölgelerinden daha zengindir (100). Geleneksel tıbbi kullanımı dışında, zeytin yaprağı bilimsel araştırmalarla insan ve hayvan sağlığına anti-oksidan kapasite, anti-hipertansif, hipoglisemik, hipo-kolestrolemik, kardiyokoruyucu, anti-inflamatuvar özelliklerinden dolayı fayda sağladığı gösterilmiştir (101). Zeytin yaprağının bu faydalı etkilerinin en önemli sebebi fenolik bileşenler ve özellikle oleuropeindir (Şekil-6). Zeytin yaprağının kimyasal içeriği bitkinin kökenine, saklama koşullarına, hava koşullarına, nem oranına ve toprak yapısına göre değişmektedir. Fakat polifenol ve oleuropein miktarı büyük varyasyonlar göstermemektedir (102). Oleuropein'in meme, kolorektal, prostat, akciğer, lösemi, melanoma gibi birçok kanser hücre hattında anti-tümöral etki gösterdiği ortaya konulmuştur (103). Özellikle KRK'de *Olea europaea* yaprak özütü (OLE) kullanılarak yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat Oleuropein'in KRK'de anti-kanser etkileri değerlendirilmiştir. Cardeno ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Oleuropein'in HIF-1 $\alpha$  proteinini baskılayarak HT-29 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (104).



Şekil-6 Oleuropein'in kimyasal yapısı



## GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Kullanılan Cihazlar

- LightCycler 480II (Roche Diagnostics, ABD)
- Isıtıcı blok (DB-2A) (Techne, İngiltere)
- Santrifüj (22R) (Beckman Coulter, Almanya)
- Plate santrifüjü (Thermo, ABD)
- Manyetik Karıştırıcı (Vorteks) (Velp Scientifica, İtalya)
- + 4°C Buzdolabı (Alaska, İstanbul, Türkiye)
- - 20 °C derin dondurucu (Bosch, İstanbul, Türkiye)
- - 80 °C derin dondurucu (Nüve, İstanbul, Türkiye)
- -152 °C ultra derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- PCR UV kabini (Biosan, Litvanya)
- UV spektrofotometre Beckman Coulter DU 800 (Beckman Coulter, Almanya)
- Mikroskop (Nicon, Japonya)
- İverted mikroskop (Olympos CH, Japonya)
- Karbondioksit inkübatörü (Panasonic, Japonya)
- Eliza reader (Tecan, İsviçre)

### 3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

- RNeasy kiti (50 örneklik) (Qiagen, USA)
- miScript Primer Assays (Qiagen, USA)
- miScript II RT Kit (Qiagen, USA)
- RT2 SYBR Green Mastermix Kiti (Qiagen, USA)
- Wst-1 Hücre Proliferasyon Kiti (Roche, İsviçre)
- Hücre migrasyon analiz kiti (CHEMICON® QCM™ , USA)
- Etanol (Merck, Germany)
- Tripkan Mavisi (Biochrom AG, Almanya)
- DMSO (dimetil sülfoksit) (Sigma, Almanya)

### 3.3. Kullanılan Yöntemler

#### 3.3.1. Bitkilerin Seçimi ve Özütlelerin Hazırlanışı

OLE'nin hücre kültürü çalışmalarında kullanılabilen şekilde hazırlanabilmesi amacıyla yeterli miktarda zeytin yaprağı Balıkesir – Edremit bölgesinden Şubat 2010'da toplanmıştır. Tarımsal ilaç kalıntılarının oluşmaması için bitkinin ilk dönem yaprakları seçilmiştir. Yapraklar yıkandıktan sonra yaklaşık bir ay boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutma işlemi tamamlandığında karıştırıcı yardımıyla toz haline getirilmiştir. Üzerine %70 etanol konularak (üzerini kapatacak miktarda) bir hafta bekletilmiştir. Ara ara çalkalanıp, süzölmüş ve rotary evaporator kullanılarak çözgeni uçurulmuştur. Ekstrenin kullanıma hazırlanması içinse cihazda yapışma olmaması için bir miktar çözgen bırakılarak ekstre elde edilmiş, temiz ve darası alınmış, geniş yüzeyli cam bir malzemeye ekstre dökülerek çeker ocak altında bekletilmiş çözgenin uçması sağlanmıştır. Kalan ekstre tartılarak 100 gr bitkiden ne kadar ekstre elde edildiği belirlenmiştir. Stok solüsyon 250 mg/ml olacak şekilde %5'lik DMSO (dimetil sülfoksit) içeren besi yerinde çözödürölmüştür.

RKE hazırlayabilmek için Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakölte Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hulusi Malyer tarafından Uludağ Üniversitesi yerleşke alanında bitkilerin tayini yapılmış ve ardından kökleri sökölerek üzerindeki toprak atıkları yıkanarak temizlenmiştir. Kökler oda sıcaklığında bir hafta bekletilerek kurutulmuştur. Kuruyan kökler öğütölerek toz haline getirilmiştir. Stok solüsyonu hazırlamak için OLE örneğindeki yol takip edilmiştir.

NTE'nin hazırlanması için 100 gr tohum tartılıp, üzerini geçecek kadar hekzan içerisinde bir hafta bekletilmiştir. Bu süre içinde ara ara çalkalanarak karışması sağlanmış ve süzölmüştür. Süzölen hekzan çözeltisi rotary evaporator kullanılarak çözgenin uçurulması sağlanmıştır. Çörekotu etanol ekstresinin hazırlanması için hekzanda bekletilerek hekzan ekstresi hazırlanan tohumlarda kalan son hekzan uçurularak bitki kurutulmuştur. Stok solüsyonu hazırlamak için OLE örneğindeki yol takip edilmiştir.

### 3.3.2. Bitki Özülerinin Kimyasal İçerik Analizi

Hazırlanan bitki özütleri Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Saliha Şahin tarafından OLE örneğinde Kafeik asit ve Oleuropein, RKE örneğinde ellagik asit, NTE örneğinde TQ maddeleri HPLC ile kromatografik analiz yapılarak içerisindeki fenolik bileşiklerin miktarları tayin edilmiştir.

#### 3.3.2.1. Kromatografik Analiz

Numunelerde bulunan fenolik bileşikler HPLC tekniği ve XBridge C18 (4,6×250 mm, 3,5 µm, Waters) kolon kullanılarak 10 µL'lik enjeksiyon hacminde 0,5 mL/dk akış hızı ile çalışılmıştır. Analiz sırasında %1 formik asit-%99 su (A) ve asetonitrilden (B) oluşan gradient çözücü programı uygulanmıştır. HPLC için analiz çalışma koşulları Tablo-4'de verilmektedir.

Tablo-4 Ellagik asit, Kafeik asit ve Oleuropein'in HPLC çalışma koşulları

Süre (dk)	Hareketli faz
0	%90 A- %10 B
10	%87 A- %13 B
20	%58,5 A- %41,5 B
25	%30 A- %70 B
35	%90 A- %10 B

A: %1 formik asit-%99 su, B: asetonitril

TQ fenolik bileşiği, HPLC ile analizinde, XBridge C18 (4,6×250 mm, 3,5 µm, Waters) kolon ile 20 µL'lik enjeksiyon hacminde 0,5 mL/dk akış hızı ile çalışılmıştır. Analiz sırasında %42 su-%58 asetonitrilden oluşan izokritik çözücü programı uygulanmıştır. HPLC için çalışma koşulları Tablo-5'te verilmektedir.

Tablo-5 Timokinon için HPLC çalışma koşulları

Süre (dk)	Hareketli faz
0	%42 su - %58 asetonitril
17	%42 su - %58 asetonitril

### 3.3.2.2. Standart Fenolik Maddelerin Hazırlanması

OLE, RKE ve NTE numuneleri 1/100 metanol ile tamamlanıp santrifüjlenerek örneklerdeki fenolik maddeleri bulmak için HPLC cihazına verildi. Örneklerdeki pik alan değerlerinden Kafeik asit, Oleuropein, Ellagik asit, TQ fenolik maddeleri bulundu. Stok çözeltiler kullanılarak 70 ppm Ellagik asit (1/100 seyreltme), 100 ppm Kafeik asit(1/5 seyreltme), Oleuropein (1/100 seyreltme), TQ (1/100 seyreltme) olacak şekilde metanolde çözülerek fenolik maddelerin kalibrasyon çözeltileri hazırlandı ve HPLC cihazı ile analiz edildi. Her bir standart çözeltinin pik alanı değerleri ile konsantrasyon değerleri arasında grafik çizilerek kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

HPLC cihazı için standart fenolik bileşikler ile kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. Bu standart fenolik maddeler için konsantrasyona karşılık pik alan değerleri ile kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. HPLC cihazında dalga boyu Ellagik asit, Kafeik asit, Rutin, Oleuropein için 280 nm, TQ için 254 nm dalga boyunda çalışılmıştır.

## 3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

### 3.4.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

HT-29 (ATCC® HTB38™), LoVo (ATCC® CCL-229™) ve HUVEC (ATCC® CRL-1730™) hücre hatları American Type Culture Collection ATCC'den temin edilmiştir. HT-29 hücre hattı kolorektal adenokarsinoma tanılı 42 yaşındaki bir kadın hastadan elde edilmiştir. LoVo hücre hattı ise IV. evre kolorektal adenokarsinoma tanısına sahip 56 yaşındaki erkek bir hastadan, metastaz sonucu sol supraklavikular bölgeden izole edilmiştir ve HT-29 hücre hattı gibi epitel morfolojisinde ve yapışkan büyüme özelliği göstermektedir. Her iki hücre hattında *myc*, *ras*, *myb*, *fos*, genleri mutant, *abl* ve *ros* genleri wild type tiptedir. *p53* yönünden LoVo normalken, HT-29 8. ekzondaki c.818G>A değişimi ile mutant fenotiptedir. HUVEC hücre hattı sağlıklı endotel hücrelerden oluşmaktadır ve özütlerin normal hücrelerdeki etkilerini ölçmek için kullanılmıştır.

### 3.4.2. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarına Uygun Besi Yerlerinin Özellikleri

HT-29 ve HUVEC hücre hatları sırasıyla içerisinde %10 fetal sığır serumu (FBS, Gibco), %1 penisilin/streptomisin antibiyotiği (Lonza), %1 L-Glutamin (Lonza) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Lonza) besiyeri kullanıldı. LoVo hücre hattı için %10 fetal sığır serumu %1 penisilin/streptomisin antibiyotiği, %1 L-Glutamin içeren Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Lonza) besiyeri kullanıldı ve bütün hücre hatları %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'de inkübatörde üretildi.

### 3.4.3. Hücre Hatlarının Çözdürülmesi ve Bakımı

Uzun süreli olarak -152 °C ultra derin dondurucuda (Panasonic, Japonya) %10 DMSO (Sigma, Almanya) içinde kriyo tüplerde (Corning, ABD) stoklanan hücre hatları 37°C'deki su banyosu (Nüve) içerisinde ve kontaminasyonu engellemek adına kapakları suyla temas etmeyecek şekilde 2 dakika kadar hafifçe çalkalayarak çözdürüldü. Kriyo tüpler alkolle dekontamine edildikten sonra hücreler 9 ml besiyeri içerisine eklenerek DMSO'yu uzaklaştırmak için 2000 rpmde 5 dakika santrifüj (Nüve, Türkiye) edilmesinin ardından yeniden besiyeri ile sulandırılan hücreler 25 cm<sup>2</sup> petri kabına (Corning) alınarak CO<sub>2</sub> inkübatörüne (Panasonic, Japonya) kaldırıldı.

Alt kültürler oluşturulurken %80-90 oranında doluluğa ulaşan petri kaplarından besiyerleri uzaklaştırılarak, hücreler tripsin (Lonza) inhibitörlerini uzaklaştırmak için önce fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, Lonza) kullanılarak yıkandı. 2-3 ml tripsin eklenen petri kapları 5 dakika kadar 37 °C inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeyden ayrılması beklendi ve 2000 rpmde 5 dakika santrifüj edildikten sonra 1:3 oranında ayrılarak 75 cm<sup>2</sup>'lik petri kaplarına aktarıldı. Petri kaplarındaki besiyeri haftada 2-3 kez değiştirildi.

Hücrelerin dondurulması ve deneyler için ekimi aşamasında hücreler yine kültür kabı yüzeyini %90-95 kapladığında, tripsinizasyon yapıldı, serumlu besi ortamı ile hücreler homojenize edildi, canlılık kontrolü ve hücre sayımı için 0,9 ml numune alındı. Alınan numune içine 0,1 ml tripan mavisi (Biochrom AG, Almanya) konuldu ve hemasitometre (Bürker, Almanya) kullanılarak ışık mikroskopunda (Olympos CH, Japonya) hücre sayımı yapıldı.

### 3.5 Hücre Canlılık Testi

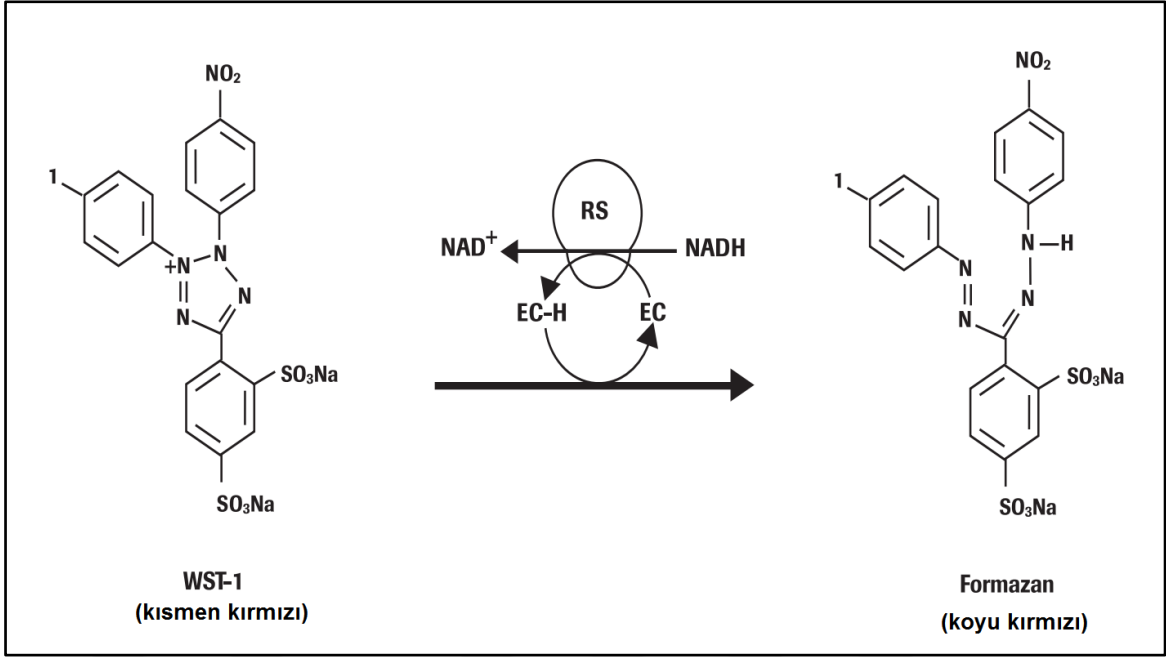
Bitki özütlerinin KRK hücre hatları üzerindeki etkilerini ölçmek amacıyla kolorimetrik bir test olan WST1 analiz yöntemi kullanılmış ve üreticinin talimatları takip edildi. Hem farklı dozlar uygulanan hem de doz uygulanmayan hücre hatlarındaki etkiler değerlendirildi.

#### 3.5.1 WST-1 analizi

WST-1 analiz yöntemi, besi ortamına konulan tetrazolium tuzunun canlı hücreler tarafından koyu kırmızı renkli formazan boyasına dönüştürülmesine dayanarak canlı hücre sayısını analiz etmeye yararayan bir tekniktir. Genellikle hücre yüzeyinde, kompleks hücresel mekanizmalarla gerçekleşen reaksiyon, canlı ve metabolik olarak aktif hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri vasıtasıyla gerçekleşir (Şekil-6). Sonuç olarak canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olarak koyu kırmızı formazan boyası oluşur.

WST-1 analizi için HT-29 ve LoVo hücreleri 96 kuyuluk flaska,  $10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve tabana tutunabilmeleri için  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyu bekletildi. Ertesi gün hücreler  $100-0,05\text{mg/ml}$  konsantrasyonlarındaki 9 farklı doz özütü 24 saatliğine ve en az 3 tekrar olacak şekilde muamele edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, besi yeri her kuyuda  $100\text{ }\mu\text{l}$  besiyeri olacak şekilde değiştirildi ve üzerine  $10\text{ }\mu\text{l}$  WST-1 ajanı konularak 1 saat boyunca tekrar inkübe edildi. 1 saat sonrasında flask ELISA cihazında  $480-620\text{ nm}$ 'de okuma yapıldı. Hücre olmaksızın WST-1 eklenmiş besi yeri negatif kontrol olarak kullanıldı. Bitki özütlerinin her bir konsantrasyonda hücre büyümesini engelleme yüzdesini (GI %) hesaplamak ve normalize etmek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$GI \% = \frac{\text{özüt uygulanan hücrelerden alınan ortalama absorbands}}{\text{özüt uygulanmayan hücrelerden alınan ortalama absorbands}} \times 100$$



Şekil-6 WST-1 analiz yönteminin çalışma prensibi

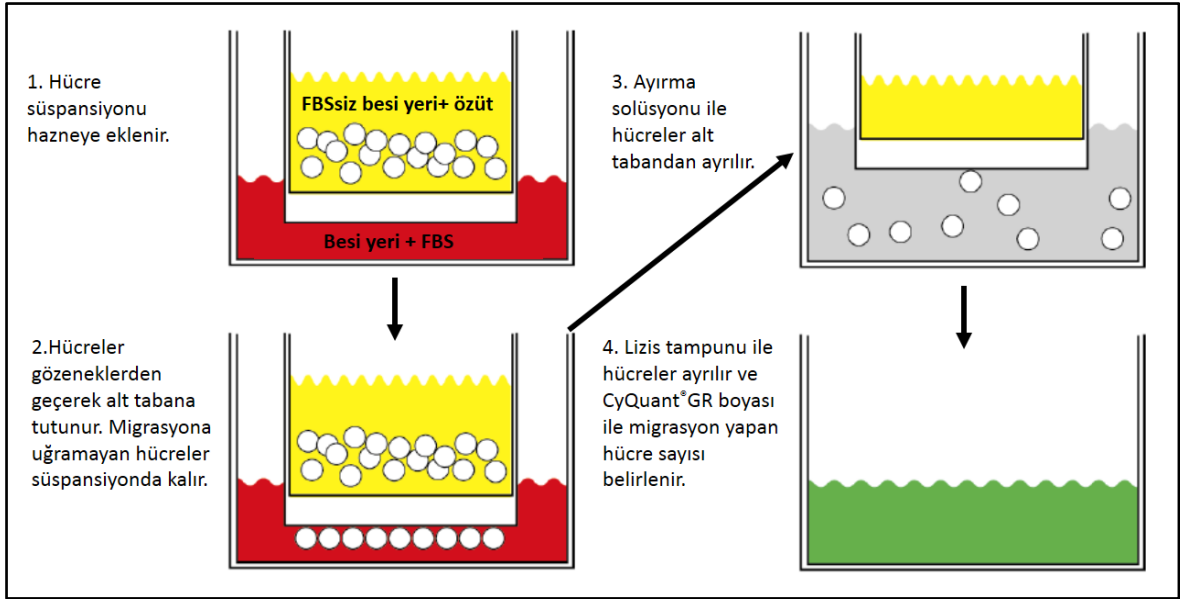
### 3.5.2 WST-1 Analizi İstatistikleri

WST1 analizi sonucunda oluşan canlılık dataları Graphpad programı kullanılarak non-linear regresyon yöntemi ile analiz edildi. Hücre büyümesini %50 (GI<sub>50</sub>) azaltan özüt konsantrasyonu aynı program kullanılarak, doz-etki ilişkisi yöntemi ile değerlendirildi.

### 3.6 Migrasyon Analizi

CHEMICON® QCM™ 24-well hücre migrasyon analizi Boyden hazne prensibine dayanan migrasyon haznesi prensibi kullanılarak yapıldı. Kit içerisinde 8 mm gözenek büyüklüğüne sahip 24 kuyucuk bulunmakta ve florometrik okuma prensibine dayanmaktadır. 8 mm gözenek çapı deneylerde kullanılan hücre tipleriyle uyumludur. Deney prosedürü üretici firmanın yönlendirmeleri ile Şekil-7'deki gibidir. Serum ihtiva etmeyen besiyeri içerisinde süspanse edilen yaklaşık  $0.5 \times 10^6$  hücre, taban kısmında 8mm gözenekler bulunan hazne içerisine eklendi ve alt kısmında bulunan ana hazneye FBS içeren besiyeri eklendi. Gözenekli hazne hava kabarcığı kalmayacak ve alt kısımdaki FBS içeren besiyeri ile temas edecek şekilde yerleştirildi. Kapağı kapatılan plate 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon ardından gözeneklerden geçen hücreler ayırma solüsyonu ile 30 dakika muamele edilerek haznedan ayrıldı. Ayrılan hücreler CyQuant® GR boya ile boyanır ve

oda sıcaklığında inkübe edildi. Elde edilen hücre süspansiyonundan 200 µl 96 kuyuluk plate aktarılmış ve floresan okuyucuda 480/520 nm dalga boyunda en az üç tekrar şeklinde okutuldu. Herhangi bir özüt verilmeyen hücrelerdeki floresan ışımaya RFU değeri negatif kontrol olarak değerlendirildi. Migrasyona uğrayan hücre sayısı arttıkça RFU değeri de paralel şekilde artmaktadır. Elde edilen RFU değerleri Graphpad prism programında Student t-testi ile %95 güven aralığında ve  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak analiz edildi.



Şekil-7 Hücre migrasyon analizinin deneysel prosedürü

### 3.7. miRNA Ekspresyon Analizi

Etkin dozları belirlenen bitki özütlerinin KRK hücre hatları üzerinde meydana getirdikleri miRNA ekspresyonu farklılıklarını belirlemek için sırasıyla miRNA izolasyonu ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) işlemleri yapıldı.

#### 3.7.1 miRNA İzolasyonu

Belirlenen dozlar ile 24 saatlik inkübe edilen hücreler PBS ile yıkanıp, tripsin uygulaması ile 25 cm<sup>2</sup>lik petri kabından ayrıldı ve miRNA izolasyonuna kadar -152 C<sup>0</sup> ultra derin dondurucuda muhafaza edildi. miRNA izolasyonu miRNeasy Mini Kit



(Qiagen, Germantown, Maryland, USA) kullanılarak ve üretici talimatları takip edilerek yapıldı. İzolasyon ardından elde edilen miRNA konsantrasyonu ve kalitesi Beckman Coulter DU 800 Spektrofotometre cihazında 280-260 nm dalga boylarında (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) ölçüldü.

### 3.7.2. cDNA Sentezi

Elde edilen miRNA'dan, miScript II RT Kit (QIAGEN, Germantown, Maryland, USA) kullanılarak ve üretici talimatları takip edilerek RT-PCR işlemi için gerekli olan komplementer DNA (cDNA) üretildi. Reaksiyon için kullanılan kit içeriği ve miktarları Tablo-6'da reaksiyon koşulları ise Tablo-7'de gösterilmiştir. Reaksiyon sonrası cDNA örneklerine 200 µL RNase-free H<sub>2</sub>O eklenerek 110 µL'lik 2 alikot şeklindeki örnekler RT-PCR işlemleri yapılınca kadar -80 C<sup>0</sup> de muhafaza edildi.

Tablo-6 cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaksiyon içeriği	1 örnek için gerekli miktar/hacim
RNA	50 ng-200 ng (0.5 ng– 2 µg RNA)
5x miScript HiSpec Buffer	4.0 µL
miScript Reverse Transcriptase Miksi	2.0 µL
10x Nucleics Mix	2.0 µL
RNase-free H <sub>2</sub> O	Toplam hacim 20.0 µL olacak şekilde dH <sub>2</sub> O ile tamamlanır

Tablo-7 cDNA sentezi için kullanılan PCR Programı

Sıcaklık	Süre
37 °C	60 dakika
95 °C	5 dakika
4 °C	∞

### 3.7.3 miRNA Expresyon Analizleri

Çalışmada, KRK gelişimi ve migrasyonunda öneme sahip, miRNA'ların değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda değerlendirilen miRNA'lar bu amaç doğrultusunda yapılan literatür araştırması sonucu belirlendi. miRNA'ların nükleotid

dizileri ve erişim kodları Tablo-8’ da verilmiştir. Ekspresyon analizi için SYBR Green metodu kullanılarak, LightCycler 480II (Roche Diagnostics, ABD) cihazı ile yapılmıştır. Bu metodda SYBR Green boyası çift sarmal DNA’nın küçük girintisine bağlanarak az miktarda floresans yaymaktadır. Her PCR döngüsünde bu floresan ışması miktarı örnek içerisindeki hedef miRNA oranınca artmaktadır. RT-PCR koşulları, başlangıç aktivasyonu 95°C’de 15 dakika, denatürasyon 94°C’de 15 saniye, bağlanma 55°C’de 30 saniye, uzama ve floresan data toplama 70°C’de 30 saniye ve 40 döngü olarak uygulandı. Çoğaltılmış hedef cDNA’ya bağlanan SYBR Green boyası ile elde edilen erime eğrisi sayesinde spesifik hedef cDNA’nın varlığı analiz edilmektedir. Hesaplamalarda floresan miktarındaki artışın bir ölçüsü olan Ct (threshold cycle) eşik değeri kullanılır. Ct değeri, floresan ışmada ( $\Delta R_n$ ) artışın başladığı ilk siklusu ifade eder.  $R_n(+)$ , yüklenen örneğin reaksiyona giren tüm komponentlerin floresan emisyonu,  $R_n(-)$  ise negatif/pasif kontrolün floresan emisyonu olarak tanımlanmaktadır.  $\Delta R_n$ ,  $R_n(+)$  ve  $R_n(-)$  arasındaki fark olup, Ct değerinin hesaplanmasında kullanılan temel göstergedir. Çalışmada, SNORD48’ in ortalama Ct değerleri belirlenerek, elde edilen verilerin normalizasyonu yapıldı.

Tablo-8 Ekspresyon analizi yapılan mikroRNAlar

miRNA Adı	Erişim Kodu	Olgun Dizi Kodu	miRNA Dizisi
hsa-miR-19a	MI0000073	MIMAT0004490	14 - aguuuugcauaguugcacuaca - 35
hsa-mir-21	MI0000077	MIMAT0000076	8 - uagcuuaucaugacugauguuga - 29
hsa-mir-140	MI0000456	MIMAT0000431	23 - cagugguuuuaccuauugguag - 44
hsa-mir-106a	MI0000113	MIMAT0000103	13 - aaaagugcuuacagucagguag - 35
hsa-mir-124-1	MI0000443	MIMAT0004591	14 - cguguucacagcggaccuugau - 35
hsa-mir-181a-1	MI0000289	MIMAT0000256	24 - aacauucaacgcugucggugagu - 46
hsa-mir-182	MI0000272	MIMAT0000259	23 - uuuggcaaugguagaacucacacu - 46
hsa-mir-195	MI0000489	MIMAT0000461	15 - uagcagcacagaaauuuggc - 35
hsa-mir-451a	MI0001729	MIMAT0001631	17 - aaaccguuaccuuacugaguu - 38

### 3.8. Bileşikler İçin Protein Hedef Belirlenmesi ve Yerleşme Modelleri

Özütlerin temel içeriği olan ve aktif metaboliti olarak düşünülen kimyasal bileşikler OLE’de Kafeik asit ve Oleuropein, RFE’de Ellagik asit, NTE’de örneğinde TQ için protein hedefleri SwissTargetPrediction (105) programı ile belirlendi. Belirlenen hedeflerden hücre canlılığı ve migrasyonu ile alakalı proteinlerde bileşiklerin yerleşme modelleri ise yine çevrimiçi bir yazılım olan SwissDock (106) ve Chimera (107) programı ile araştırıldı.

### 3.9. İstatistiksel Analiz

Hücre canlılık istatistiklerinin yapılmasında Graphpad prism programından yararlanıldı. Öncelikle uygulanan dozlar için logaritmik çevrim yapılarak 3lü tekrar şeklinde elde edilen veriler programa eklenerek normalize edildi. Bu işlem esnasında program tarafından en küçük veri ( $H_2O_2$  uygulanan ) %0, en yüksek veri (herhangi bir doz verilmeyen) %100 olarak kabul edildi. Normalizasyonun ardından non-linear regresyon analizi ile  $GI_{50}$  ve  $GI_{25}$  dozları hesaplandı. Tüm analizler %95 güven aralığında gerçekleştirildi.

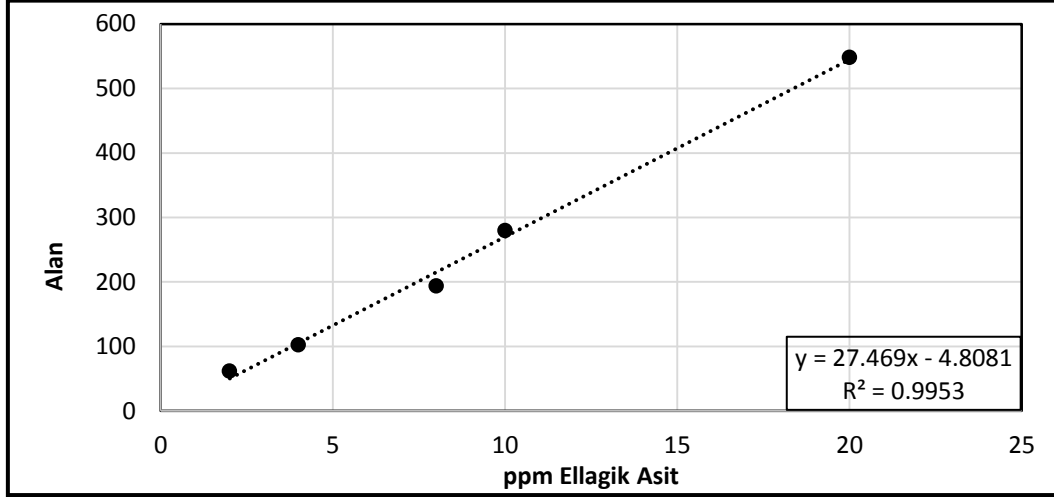
Ekspresyon analizleri için web tabanlı Sabiosciences PCR-Data Analiz ( $RT^2$  profiler PCR array data analysis version 3.5) programından yararlanıldı. Dozlar arasında miRNA ekspresyon düzeyindeki değişimleri ifade eden kat değişimi (fold change) grafikleri ve değerlendirilen gruplara göre miRNA’ların hangilerinin yüksek eksprese (up-regüle) hangilerinin düşük eksprese (down-regüle) olduğunu gösteren Clustrogram görüntüsü oluşturuldu. Sabiosciences PCR-Data Analiz sisteminde  $2^{\Delta CT}$  değerlerinden Student T testi yapılarak her bir miRNA’nın p değeri belirlendi. Sonuçlar %95’lik güven aralığında ve anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirildi. miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların, dozlar ve bitki özütleriyle ilişkili olup olmadığını ortaya koymak için ise Sabiosciences PCR-Data analiz programından yararlanıldı.

## BULGULAR

### 4.1. Bitki Özütlerinin Kimyasal İçeriği

HPLC cihazı için standart fenolik bileşikler ile kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak bu standart fenolik maddeler için konsantrasyona karşılık pik alan değerleri ile kalibrasyon grafikleri çizildi. HPLC cihazında, Ellagik asit, Kafeik asit, Rutin, Oleuropein için 280 nm, TQ için 254 nm dalga boyunda çalışıldı (Şekil- 8-10).

Fenolik bileşikler için hazırlanan kalibrasyon grafikleri;



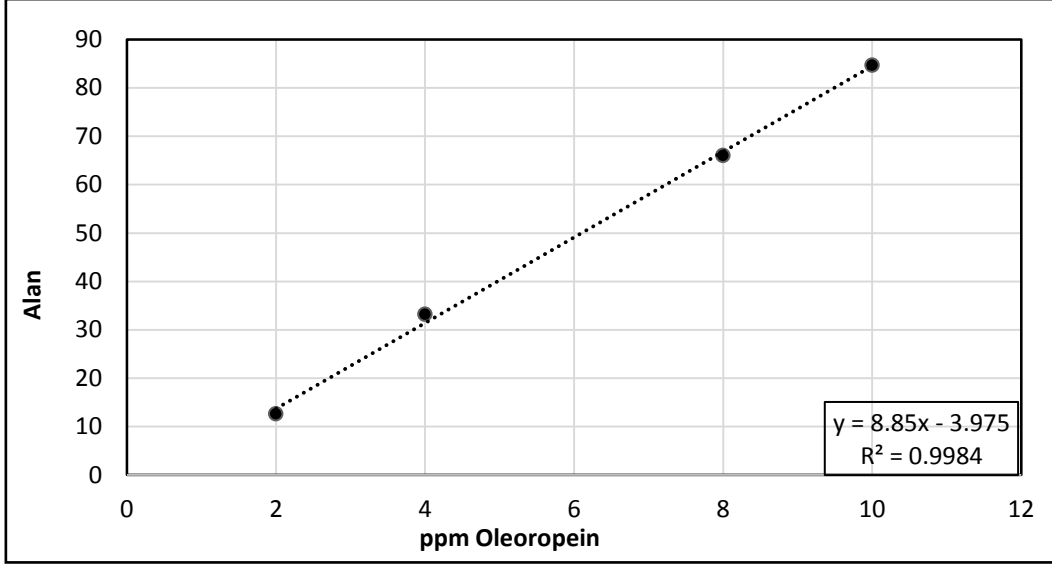
Şekil-8 Ellagik asit kalibrasyon grafiği

Ellagik asit için pik alan değeri=106.7

$y = 27.469x - 4.8081$  denkleminde pik alanı yerine Konulduğunda  $x = C = 4.06$  ppm

$4.06 \text{ ppm} \times 10$  (Seyreltme Faktörü) =  $40.6 \text{ ppm}$   $0.0406 \text{ mg / mL}$

$RKE = 250 \text{ mg / mL} = 0.25 \text{ g / mL}$  ise  $\rightarrow 0.16 \frac{\text{mg ellagik asit}}{\text{g örnek}}$  şekilde hesaplandı.



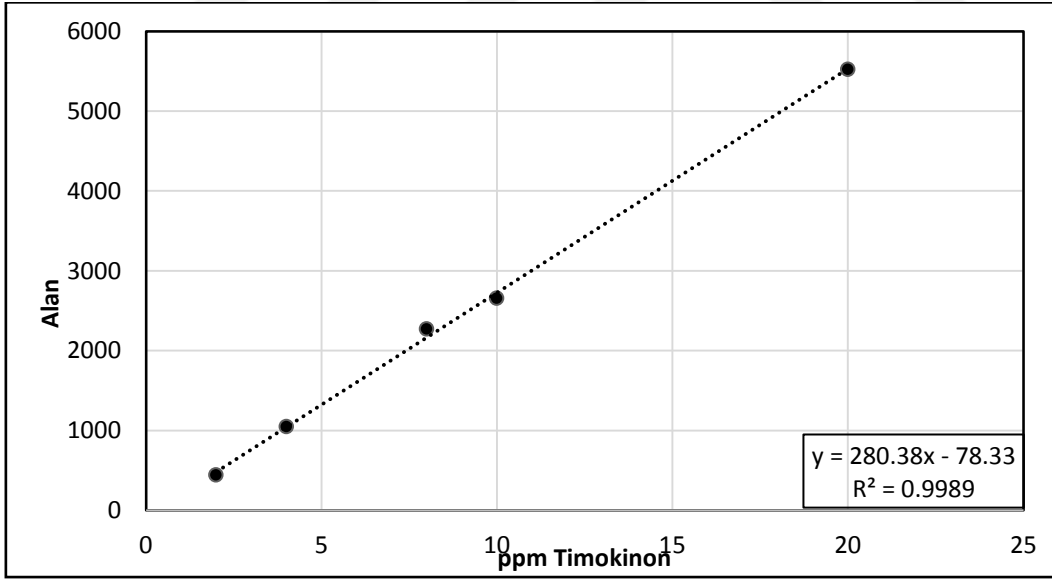
Şekil-9 Oleuropein kalibrasyon grafiği

Oleuropein için pik alan değeri = 47.7

$y = 8.85x - 3.975$  denkleminde pik alanı yerine konulduğunda  $x = C = 5.84$  ppm

$5.84 \text{ ppm} \times 10$  (Seyreltme Faktörü) =  $58.4 \text{ ppm} \rightarrow 0.058 \text{ mg / mL}$

OLE =  $0.5 \text{ g/mL}$  ise  $\rightarrow 0.12 \frac{\text{mg oleuropein}}{\text{g örnek}}$  şekilde hesaplandı.



Şekil-10 Timokinon kalibrasyon grafiği

TQ için pik alan değeri = 637.3

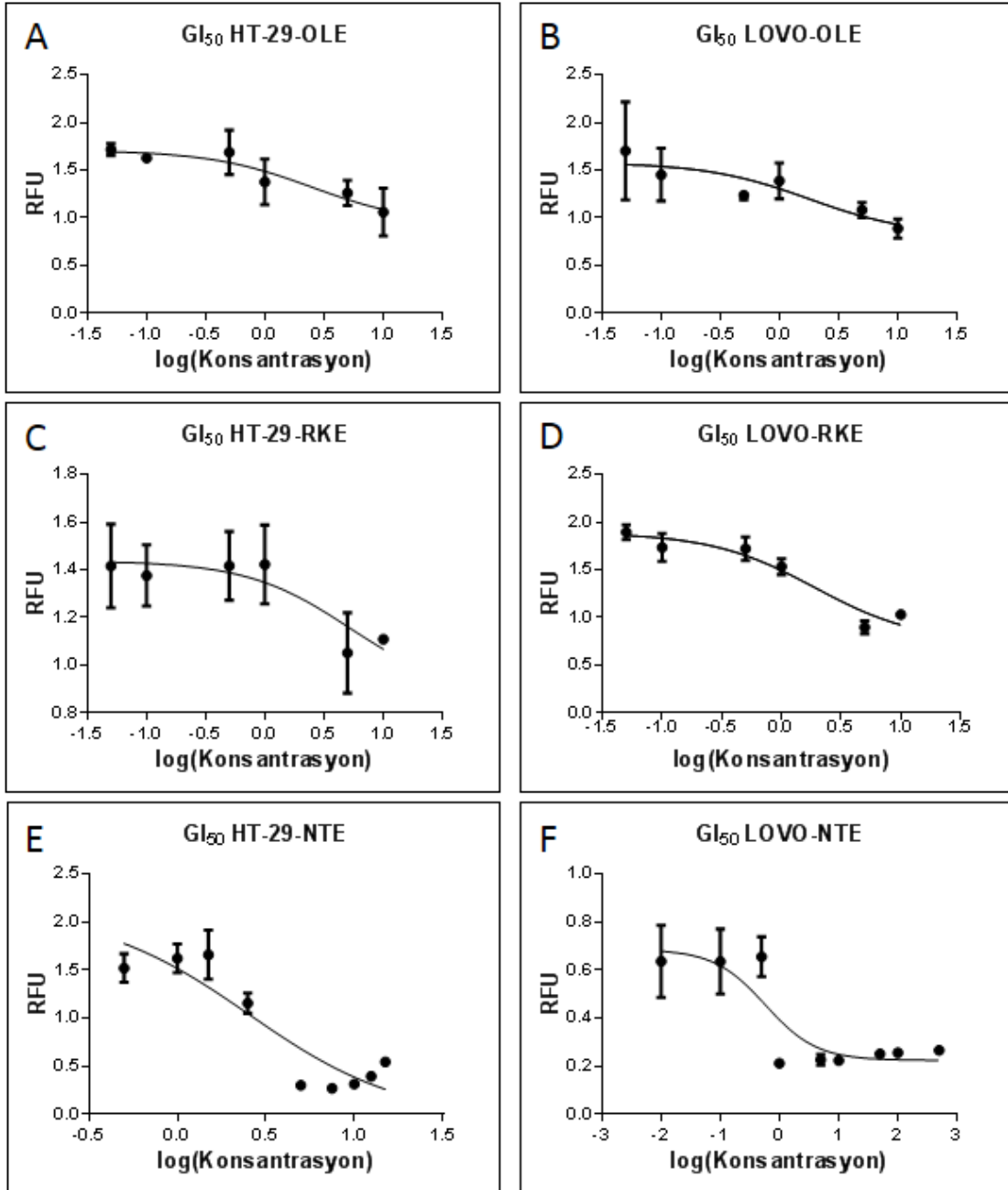
$y = 280.38x - 78.33$  denkleminde pik alanı yerine konulduğunda  $x = C = 2.54$  ppm

$2.54 \text{ ppm} \times 10$  (Seyreltme Faktörü) =  $25.4 \text{ ppm} \rightarrow 0.0254 \text{ mg / mL}$

NTE =  $1 \text{ g/mL}$  ise  $\rightarrow 0.025 \frac{\text{mg TQ}}{\text{g örnek}}$  şekilde hesaplandı.

## 4.2. Canlılık analizi sonuçları

LoVo ve HT-29 hücre hattında her üç bitki özütü 100mg/ml ila 0,05mg/ml arasında değişen dozlardaki özütlerle 24 saat süre ile en az üç tekrar olacak şekilde inkübe edildikten sonra WST1 canlılık analizi ve ELİZA okuyucusu ile alınan doza bağımlı canlılık dataları Graphpad (Şekil-11) programı ile değerlendirildiğinde büyümenin %50 ve %25 oranında azaldığı dozlar hesaplanmıştır (Tablo-9).



Şekil-11 Özüt dozlarına bağlı HT-29 (A, C, E) ve LoVo (B, D, F) hücre hatlarına ait canlılık grafikleri (RFU: Relative fluorescence units)

Tablo-9 Özütlerin GI<sub>50</sub> ve GI<sub>25</sub> konsantrasyonları

	LoVo		HT-29	
	GI <sub>50</sub>	GI <sub>25</sub>	GI <sub>50</sub>	GI <sub>25</sub>
<b>OLE</b>	0,579 mg/ ml	0,193 mg/ ml	2,120 mg/ ml	0,707 mg/ ml
<b>RKE</b>	1,903 mg/ ml	0,634 mg/ ml	5,176 mg/ ml	1,725 mg/ ml
<b>NTE</b>	1,792 mg/ ml	0,597 mg/ ml	2,523 mg/ ml	0,841 mg/ ml

WST1 analizi sonrası, OLE'nin en düşük 0,579 ve 2,120 mg/ ml konsantrasyonlarda sırasıyla LoVo ve HT-29 hücre hatlarında GI<sub>50</sub> değerine ulaştığı belirlenmiştir. HUVEC endotel hücrelerine en yüksek ve %50 inhibisyonun gerçekleştiği özüt dozları uygulanmıştır. Hiçbir özüte ait GI<sub>50</sub> dozları HUVEC hücre hattında %9'den fazla inhibisyona sebep olmamıştır. Tüm hücre hatlarında en yüksek inhibisyon oranlarına ulaşılan özüt konsantrasyonları tablo-10'da gösterilmiştir. Ulaşılan en yüksek proliferasyon inhibisyonu oranları OLE ile LoVo hücrelerinde %47.09, RKE ile LoVo hücrelerinde %52.56, NTE ile HT-29 hücrelerinde %74.95 olarak belirlenmiştir.

Tablo-10 Özütlerin en yüksek büyüme inhibisyonu oluşturduğu dozlar

	Özüt konsantrasyonu	Kontrole göre % inhibisyon
<b>OLE</b>	HT-29	10 mg/ ml %38.11
	LoVo	10 mg/ ml %47.09
	HUVEC (GI <sub>50</sub> )	2,120 mg/ ml %-15.01
<b>RKE</b>	HT-29	10 mg/ ml %22.02
	LoVo	10 mg/ ml %36.83
	LoVo	5 mg/ ml %52.56
	HUVEC (GI <sub>50</sub> )	5,176 mg/ ml %7.33
<b>NTE</b>	HT-29	15 mg/ ml %67.21
	HT-29	50 mg/ ml %74.95
	LoVo	50 mg/ ml %58.18
	HUVEC (GI <sub>50</sub> )	2,523 mg/ ml %8.94

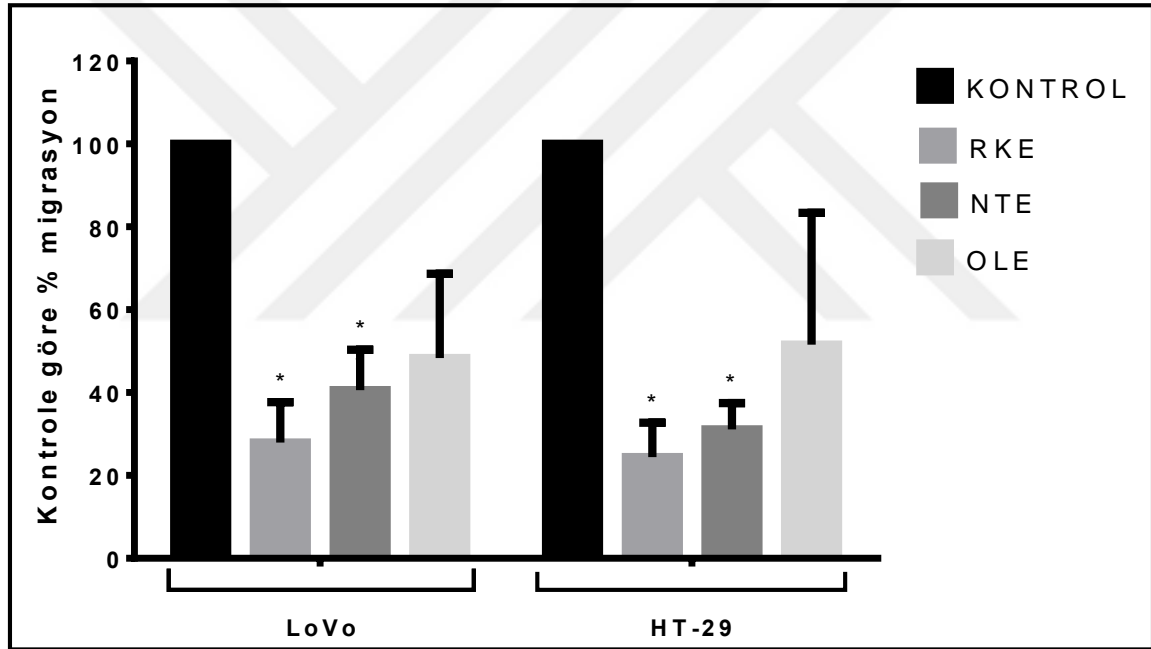
### 4.3 Hücre Migrasyon Analizi

Etkin dozların hücre migrasyonuna etkileri CHEMICON® QCM™ kiti ile değerlendirilmiştir. WST1 analizi ile hesaplanan dozlar 24 saat boyunca en az üç tekrar şeklinde hücrelere uygulanmış ve takip eden gün üretici talimatları takip edilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Doz uygulanmamış kontrol grubuna göre GI<sub>50</sub> dozu uygulanan hücrelerin migrasyon grafiği Şekil-12'de, yüzde migrasyon oranları ise tablo11'de

gösterilmiştir. Ulaşılan en yüksek migrasyon inhibisyonu oranları OLE ile LoVo hücrelerinde %51.66 (p=0.0641), RKE ile HT-29 hücrelerinde %75.56 (p<0,05), NTE ile HT-29 hücrelerinde %68.92 (p<0,05) olarak belirlendi.

Tablo-11 Özütlerin GI<sub>50</sub> dozlarının migrasyon oranına etkisi

	Kontrol		HT-29		LoVo		
	% migrasyon	% migrasyon	% inhibisyon	p değeri	% migrasyon	% inhibisyon	p değeri
<b>OLE</b>	100	51.55	48.45	0.2022	48.34	51.66	0.0641
<b>RKE</b>	100	24.44	75.56	0.0008	27.93	72.07	0.0017
<b>NTE</b>	100	31.08	68.92	0.0004	40.57	59.43	0.0036



Şekil-12 Özütlerin KRK hücre hatlarında migrasyon üzerine etkileri (\*ile gösterilen değerler p<0,05'tir.)

#### 4.4 miRNA Ekspresyon Analizi

Hücre canlılık analizi sonrası elde edilen etkili dozlar KRK hücre hatlarına 24 saat boyunca uygulanarak hücrelerden miRNA izolasyonu yapıldı. cDNA çevrimi yapıldıktan sonra RT-PCR ile ekspresyon değerleri elde edildi. İç kontrol (Snord48) ve doz uygulanmamış grup ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda miRNA kat değişimleri hesaplandı. Bu değerler Tablo-12 ve Tablo-13'te gösterilmiştir. OLE, LoVo hücrelerinde miR-182a, HT-29 hücrelerinde ise miR-195 ve miR-21 ekspresyon artışına neden olurken,



HT-29 hücrelerinde miR-182a'nın ekspresyonunu düşürdüğü görüldü. RKE, HT-29 hücrelerinde miR-19a ve miR-140 ekspresyonunu artırdığı belirlendi. NTE ise HT-29 hücrelerinde miR-182a'nın ekspresyonunu baskıladığı görüldü.

Tablo-12 HT-29 Hücre hattında bitki özütlerinin miRNA ekspresyonları üzerine etkileri

	Kontrol grubuna göre miRNA ekspresyon kat değişimleri					
	NTE		RKE		OLE	
	GI <sub>25</sub>	GI <sub>50</sub>	GI <sub>25</sub>	GI <sub>50</sub>	GI <sub>25</sub>	GI <sub>50</sub>
Snord48	1	1	1	1	1	1
miR-124	1,0521	1,1121	1,0619	2,0658	69,7119*	23,1563*
miR-195	-1,0918	2,2243	-2,8219	25,753	5,8835	31,6324*
miR-21	2,8613*	1,7983	1,7532	64,8934	5,9107*	30,7675*
miR-106a	25,9921	11,5782	3,9908	81,0084	710,8165*	458,2528*
miR-19a	2,6208	1,0619	-1,8067	63,4112*	11,6318	-2,2089
miR-182a	1,1865	-9,2535*	-4,3671*	-1,1199	2,6574*	-20,2521*
miR-181a	-5,1694	-23,9176	-18,4643	-1,2512	3,4581*	-4,801
miR-451	2,5491	1,923	-9,1261	37,1855	40,5042*	-50,3295
miR-140	23,9729	2,061	-1,4142	95,0095*	21,7057*	-2,555

\* ile gösterilen değerler P<0,05'tir.

Tablo-13 LoVo Hücre hattında bitki özütlerinin miRNA ekspresyonları üzerine etkileri

	Kontrol grubuna göre miRNA ekspresyon kat değişimleri					
	NTE		RKE		OLE	
	GI <sub>25</sub>	GI <sub>50</sub>	GI <sub>25</sub>	GI <sub>50</sub>	GI <sub>25</sub>	GI <sub>50</sub>
Snord48	1	1	1	1	1	1
miR-124	2,969	-2,3027	-3,1529	-3,3714	1,2086	-1,0994
miR-195	-1,2114	-2,7447	-5,6962	-1,8108	-1,162	-1,5476
miR-21	3,6217	-2,0467	1,3819	4,2477	3,0525	1,6663
miR-106a	5,3147	-1,6058	-1,9679	-4,2772	1,007	-1,2628
miR-19a	2,1287	-2,2974	-4,0371	-1,4208	1,0918	1,5984
miR-182a	3,1895	-2,5315	-1,5192	1,4811	1,6663	7,3107*
miR-181a	3,0314	-3,4422	-1,4573	2,1535	1,7901	3,5145
miR-451	7,1768	-2,6329	-3,1311	3,4502	1,0093	-1,7371
miR-140	10,753*	-1,5728	5,7358*	2,3511*	1,5911	1,0305

\* ile gösterilen değerler  $p < 0,05$ 'tir.

Uygulanan doza bağlı olarak ekspresyonlarını anlamlı olarak değiştiği anlaşılan miR-182a ve miR-140'ın KKK'de hedeflediği genler ve bu genlerin hücresel fonksiyonları Tablo-14'te gösterilmiştir. KKK'de, miR-140 ekspresyonunun azalmasının *VEGFA*, *Smad2* ve *Smad3* genlerinde, miR-182a ekspresyonundaki artışın ise  $\beta$ -*Catenin*, *FoxF2* ve *SATB2* genleri üzerinde etkili olduğu literatürde belirtilmektedir (108-113).

Tablo-14 miR-182a ve miR-140'ın KKK'de hedef genleri ve fonksiyonları (108-113)

	Hedef gen	Hücresel fonksiyon	E. Y.*
miR-140	<i>VEGFA</i>	Hücre migrasyonunu artırma, apoptozu engelleme	↓
	<i>Smad2</i>	Hücre proliferasyonu, apoptoz ve farklılaşmasının düzenlenmesi	↓
	<i>Smad3</i>	Hücre proliferasyonu, apoptoz ve farklılaşmasının düzenlenmesi	↓
miR-182a	$\beta$ - <i>Catenin</i>	Hücre-hücre etkileşimi	↑
	<i>FoxF2</i>	Organ gelişimi, ekstremiteler matris sentezi	↑
	<i>SATB2</i>	Transkripsiyonel düzenleme, kromatin modellemesi	↑

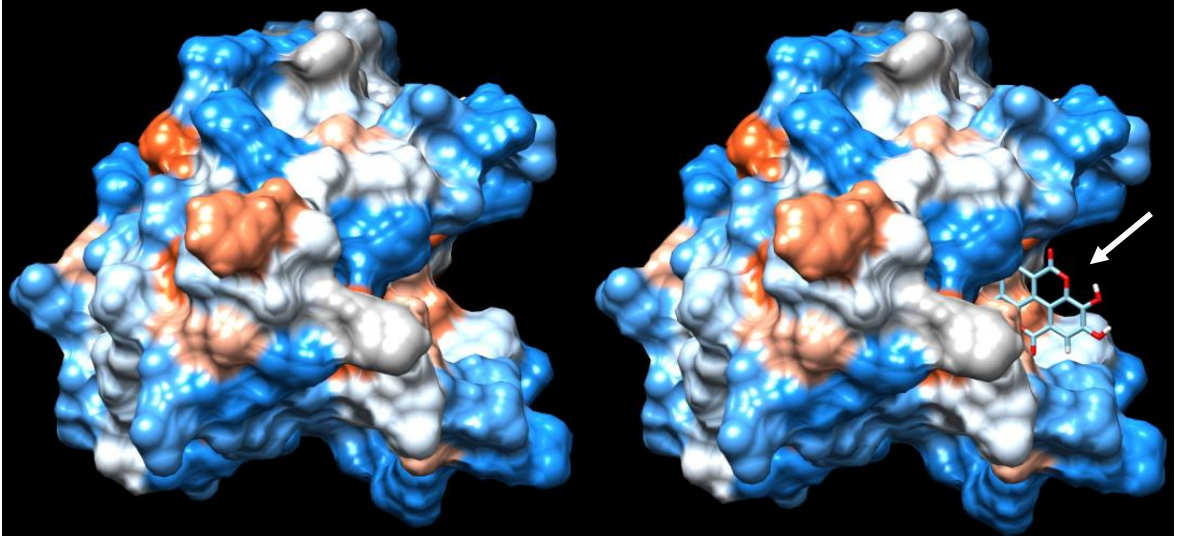
\*E.Y: ekspresyon yönü

#### 4.5 Aktif Bileşiklerin Protein Hedeflerinin Belirlenmesi

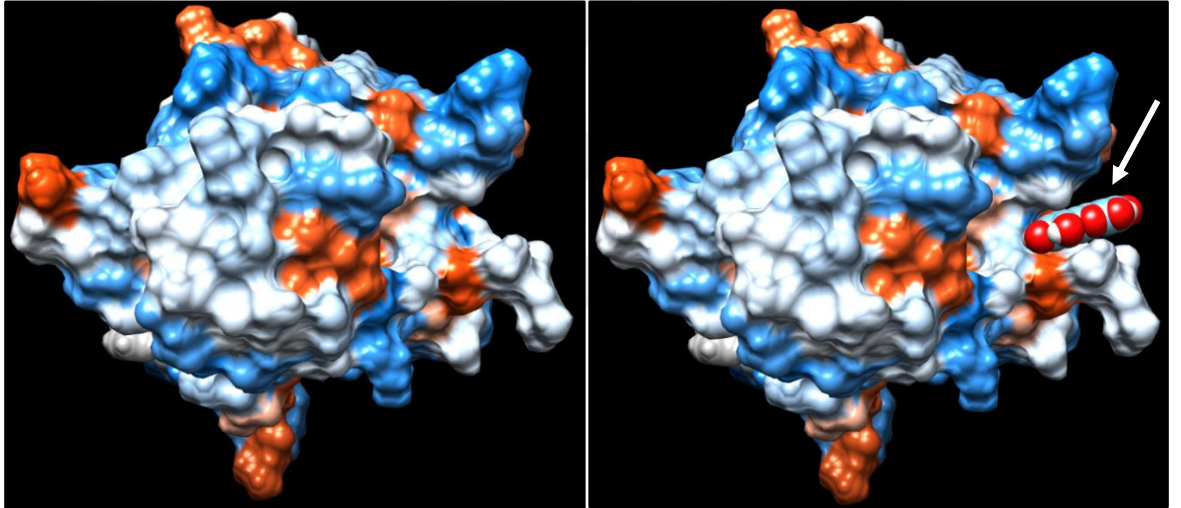
İn siliko analiz, bilgisayar yazılımları kullanılarak yapılır. Bileşiklerin protein hedef tayinleri Swiss Target Prediction yazılımı ile yapıldı. Belirlenen hedefler ChEMBL veritabanı kullanılarak konfirme edilmiştir. Swiss Target Prediction programı Gfeller ve arkadaşlarının 2013'te (114) ortaya koyduğu yöntem üzerinden analiz yapmaktadır ve 5 organizmaya ait 2000'in üzerinde protein ve 20,000'den fazla molekülün taranması sonrası sonuçları oluşturmaktadır. RKE bulunan ellagik asit için hedef protein listesi Tablo-15'te gösterilmiştir. Birçok hücrel yolak proteinlerine bağlanma özelliğine sahip olan ellagik asitin epidermal büyüme faktör reseptörüne EGFR ve p53'e bağlanması ise Swissdock (106) ve Chimera (107) programları ile analiz edildi ve bu bağlanma modeli şekil-13 ve Şekil-14'te gösterilmiştir.

Tablo-15 Ellagik asitin protein hedefleri

ChEMBL No	Hedef Protein	Kısaltma	Organizma	Score
CHEMBL5619	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	APEX1	Homo sapiens	1.000
CHEMBL4096	Cellular tumor antigen <i>p53</i>	p53	Homo sapiens	1.000
CHEMBL203	Epidermal growth factor receptor	EGFR	Homo sapiens	1.000
CHEMBL1293	G-protein coupled receptor 35	GPR35	Homo sapiens	0.999
CHEMBL2231	Cytochrome P450 1A1	CYP1A1	Homo sapiens	0.994
CHEMBL5990	Breast cancer type 1 susceptibility protein	BRCA1	Homo sapiens	0.985
CHEMBL1824	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2	ERBB2	Homo sapiens	0.975
CHEMBL4899	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	MAP3K8	Homo sapiens	0.852
CHEMBL4860	Apoptosis regulator Bcl-2	BCL	Homo sapiens	0.693
CHEMBL3142	DNA-dependent protein kinase	PRKDC	Homo sapiens	0.532
CHEMBL2916	Telomerase reverse transcriptase	TERT	Homo sapiens	0.516



Şekil-13 Ellagik asitin EGFR proteinine bağlanma modeli



Şekil-14 Ellagik asitin p53 proteinine bağlanma modeli

NTE, OLE ve aktif bileşenleri için her iki programla kayda değer sonuçlar alınamamıştır.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Kolorektal kanser (KRK) yeni tedavi şekilleri ve önleyici tedbirlerin geliştirilmesi için yapılan araştırmalara rağmen artan vaka sayısı ile birlikte dünya çapında erken ölüm sebeplerinin başında gelmektedir. Sporadik KRK'in multistep gelişimi iyi açıklanmış olmasına rağmen, tedavi için mevcut ilaçlar toksik etkileri, yeterince etkili olmamalarından ve tedavideki başarısızlıklarından dolayı yetersiz kalmaktadır. Tüm bu nedenlerden sınırsız bir potansiyele sahip olan doğal bitkisel kaynaklı kimyasalların potansiyel tedavi noktasında araştırılması yıllardır devam eden ve başarılı sonuçlar elde etmiş bilimsel bir süreçtir. Bitkisel kaynaklı kimyasallar tek başına tedavide başarı gösteren ilaçlara dönüşebileceği gibi bitki özütündeki diğer kimyasal yapılarla birlikte etki göstererek çok daha etkili bir sonuç oluşturmaları da olası bir durumdur (115). Anadolu'da ve dünyanın birçok coğrafyasında bitkiler terapotik etkilerinden faydalanılarak yüzyıllar boyu hastalıklara karşı kullanılmışlardır. Bu anlamda bitkilerin yaprağından köküne, tohumundan çiçeğine kadar birçok yapısı özüt haline getirilerek ya da çay olarak demlenerek kullanılmaktadır.

*Rubus fruticosus*, 6 kıtada deniz kenarlarından, dağ zirvelerine kadar uzanan geniş bir yeryüzü kesiminde yetişebilmektedir. Böyle geniş bir yerleşime sahip olmasından dolayı farklı toplumlar tarafından birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. İçeriğinde alkaloidler, fenolikler terpenoidler ve glikozitler gibi aktif fitokimyasallar bulunmaktadır. Fakat en çok fenolik bileşenler *Rubus* türlerinin geleneksel tıp uygulamalarında yer bulmasının önünü açmıştır. Çalışmamızda RKE'nin KRK üzerindeki etkileri, miRNA ekspresyonlarında oluşturduğu farklılıklar boyutunda değerlendirilmiştir. RKE içerisindeki ellagik asit miktarı yapılan HPLC analizi sonucu 0.0406 mg / ml (0.16 mg/gr örnek) olarak belirlenmiştir. 2007 yılında (116) yapılan başka bir çalışmada *Rubus* meyvesinde ellagik asit miktarı 0.1 mg/gr olarak belirlenmiştir. *Rubus* türlerinin farklı etnofarmakolojik kullanımlarını inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Fakat bu çalışmaların neredeyse tamamı *Rubus* meyvesi üzerine yoğunlaşmıştır. Şu anki bilgimiz dahilinde KRK'de kök özütünün kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat meme kanseri ve bazı mikroorganizmalar üzerine RKE'nin kullanıldığı 3 çalışma mevcuttur (104-106). İlk çalışmada, Riaz ve arkadaşları(117) özellikle RKE'nin diğer bitki bölümlerine nazaran daha yüksek seviyede antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermiştir. RKE'nin kullanıldığı diğer bir çalışmada (118) ise MCF-7 meme kanseri hücrelerinde DNA topoisomerez I'in inhibisyonu ile apoptozu indüklendiği gösterilmektedir.

Mikroorganizmalarda yapılan bir diğer araştırmada ise RKE'nin *Staphylococcus aureus*'un oluşturduğu biyofilm yapısını inhibe edildiği ve antibiyotiklere karşı hassasiyet geliştirilebildiği ortaya konulmuştur (119). Bizim alışmamızda RKE'nin LoVo ve HT-29 KRK hücre hatları üzerinde hücre proliferasyonunu sırasıyla %52.56 ve %22.02 oranlarına kadar inhibe ettiği bulunmuştur (Tablo-10). Çalışmada kontrol grubu olarak kullanılan HUVEC hücrelerinde ise aynı RKE dozları hücre proliferasyonunu sadece %7.33 oranında inhibe etmiştir. RKE LoVo hücre hattında 1.903 mg/ml konsantrasyonda hücrelerin yarısının ölümüne sebep olurken, 0,634 mg/ml konsantrasyonda hücrelerin %25'inin ölümünü sağlamıştır. HT-29 hücre hattı için bu değerler sırası ile 5.176 mg/ml ve 1.725 mg/ml'dir. Lee ve arkadaşları tarafından 2000 yılında (118) MCF-7 meme kanseri hücre hattında çalışmada RKE'nin 0.2-1.0 mg/ml aralığında, doza bağımlı Şekilde hücre proliferasyonunu engellediğini göstermiştir. Lakin hem hücre hattının farklı olması, hem de bitkinin hasat dönemi, konumu ve alt türleri gibi birçok faktörden dolayı etken doz konsantrasyonları bizim bulgularımızla farklılık göstermektedir.

Her ne kadar RKE kullanılarak kanser hücreleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalara seyrek rastlansa da RKE'nin temel etken molekülü olan ellagik asidin kanser hücrelerindeki etkilerini araştıran çok sayıda çalışma literatürde yer almaktadır. 1999 yılında Narayanan ve arkadaşları (120) ellagik asidin servikal kanser hücreleri (CaSki) zerinde p53/p21 ekspresyonlarını değerlendirerek G1 fazında tutunuma ve apoptoza sebep olabileceğini ortaya koymuştur. İlerleyen yıllarda bu konudaki çalışmaların sayısı artmış ve 2005 yılında yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada (121) insan oral, prostat ve kolon kanserlerine ait toplam 8 farklı hücre hattında nar suyu, nar özütü, ellagik asit ve nardan elde edilen diğer birleşikler değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda ellagik asidin 4 kolon kanser hücre hattında (SW 460, SW 620, HT 29 ve HCT 116) %17'ye varan inhibisyona yol açtığı gösterilmiştir. Diğer taraftan nar suyunun direk kullanımının, diğer birleşiklerin hepsinden daha fazla inhibisyona neden olması nar suyunda bulunan diğer birleşiklerin kümülatif etkisinin artmasına neden olduğunu vurgulanmaktadır.

Özellikle metastatik KRK'lerin tedavisinde mevcut kemoterapatiklerin etkisiz kalması metastaz üzerindeki araştırmaların önemini artırmaktadır. RKE'nin KRK metastazı üzerindeki etkisi literatürde henüz doldurulmamış bir boşluktur. Bu amaçla gerçekleştirilen migrasyon analizi ile mevcut çalışmada RKE'nin GI<sub>50</sub> dozlarının hem LoVo hem de HT-29 hücre hatlarında hücre migrasyonunu sırasıyla %72 ve %75 oranında azalttığı görülmüştür (p<0.05). HT-29 hücre hattı ve Sprague-Dawley sıçanlarda gerçekleştirilen bir araştırmada da (122) ellagik asitin kr bağırsakta succinate seviyesinde

yükselmeye sebep olarak KRK hücrelerinde bizim sonuçlarımızla benzer şekilde migrasyonu ve proliferasyonu durdurduğu ortaya konulmuştur.

Bitkisel özütlerin epigenetik mekanizmalar üzerinde de etkili olmaları sebebiyle çalışmamızda RKE'nin miRNA seviyesindeki etkileri değerlendirilmiştir. Değerlendirilen miRNAlardan HT-29 hücre hattında miR-19a ve miR-140'ın ekspresyonları sırasıyla 63.4112 ve 95.0095 kat artışa neden olduğu görülmektedir ( $p < 0.05$ )(Tablo-12). miR-19a'nın ekspresyonundaki artış KRK'de birçok kez ortaya konulmuştur. KRK'de normal ve kanser dokularda ya da normal ve kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalar (123, 124) bu artışa işaret ederken, Hayashita ve arkadaşları (125) bu artışın sadece miR-19a'da değil aynı gruba mensup olduğu miR-17-92 grubundaki tüm miRNAlarda görüldüğünü ortaya koymuştur. Diğer taraftan miR-19a ekspresyonu KRK dışında akciğer kanseri, B-hücreli lenfoma ve Kronik lenfosittik Lösemi gibi kanser tiplerinde de yüksek olarak bulunmuştur. KRK dâhil diğer birçok farklı kanser tipinde görülebilen miR-19a ekspresyon artışı HT-29 hücre hattında uygulanan RKE'den kaynaklanmadığı anlaşılmaktadır. Tablo-12'de görüldüğü üzere KRK'de miR-140 ekspresyonu düşüktür. RKE uygulanan HT-29 hücre hatlarında bu miRNA'nın ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuştur. miR-140'ın yüksek ekspresyonunun, Smad2, Smad3 ve VEGFA'yı baskılayarak hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu engellediği gösterilmiştir. Ayrıca apoptozu tetikleyerek hücre ölümünü artırdığı bilinmektedir (95-97). Tüm bu sebepler ile RKE uygulamasına bağlı olarak gözlemlenen miR-140 ekspresyonundaki artışın KRK hücrelerinin tedavisinde RKE'nin faydalı olabileceğine işaret etmektedir.

LoVo hücre hattında RKE, HT-29 hücre hattındakine benzer bir şekilde sadece miR-140'ın ekspresyon artışına neden olmuştur. Her iki hücre hattında da RKE'nin hücre proliferasyonu ve migrasyonunda benzer etkiler göstermesinde miR-140 ekspresyon artışının etkili olduğu söylenebilir. Hepatoselüler karsinoma ve küçük olmayan akciğer kanserlerinde yapılan çalışmalarda miR-140'ın hücre proliferasyonu ve migrasyonunda çeşitli yolaklarla etkili olduğu gösterilmiştir (126, 127). miR-140'taki ekspresyon artışının Smad2, Smad3 ve VEGFA'yı baskılayarak, hücre proliferasyonu, migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (95-97). Ayrıca ellagik asit ile gerçekleştirilen iki çalışmada, ellagik asitin farklı kanser türlerinde p53/p21 ekspresyonlarını artırarak G1 tutunumuna ve apoptoza neden olduğunu gösterilmektedir (120, 128). Mevcut çalışmada Swiss Target Prediction programı ile yaptığımız protein hedef tayininde, ellagik asidin p53'ü ve EGFR'yi hedeflediği gösterilmiştir (Şekil-14,15). Sonuç olarak bulgularımız, RKE'nin

protein etkileşimi ve miR-140 üzerinden proliferasyonu ve invazyonu azaltıcı yönde kümülatif bir etki oluşturabileceğini göstermektedir.

*Nigella sativa* dini kitaplarda da şifalı olarak adlandırılması sebebiyle Ortadoğu ve Hindistan'da yoğun şekilde tedavi amacıyla yüzyıllar boyu kullanılmıştır. Baş ağrısından astıma, sarılıktan iltihabi hastalıklara kadar pek çok farklı tedavi için kullanılan bu bitki, baharat olarak günlük tüketimde de tercih edilmektedir. Dolayısıyla bitkinin çok yaygın kullanımı bilimsel çalışmalara da yansımış ve birçok farmakolojik çalışmanın nesnesi olmuştur. NTE en çok anti inflamatuvar ve anti-oksidan özellikleri boyutlarıyla araştırılmıştır. Etkinliği ve normal hücreler üzerindeki düşük toksisitesinin anlaşılması etken maddelerinin izole edilmesine katkı sağlamıştır. NTE yaklaşık %0.5-4 oranında esansiyel yağ içermektedir. Esansiyel yağın %30-48 gibi büyük bir miktarını TQ'un oluşturmasından dolayı, bu bileşik NTE'nin etken maddesi olarak kabul edilmektedir. Bizim çalışmamızda HPLC analizi sonrası NTE'deki TQ oranı 0.0254 mg / ml, (0.025 mg TQ/g örnek) olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda olduğu gibi NTE ile yapılan HPLC analizlerinde yüksek miktarlarda TQ olduğu gösterilmiştir. Omar ve arkadaşları NTE'de TQ miktarını 0,053 mg / mL olarak tespit etmiştir (129). Konsantrasyonda görülen bu 2 kata yakın farklılığın sebebi bitkinin hasat dönemi ve yetiştirildiği coğrafya gibi birçok etkenle alakalı olduğu savunulmaktadır (130).

NTE'nin farklı kanser tipleri üzerindeki etkileri ilk olarak Salomi ve arkadaşları tarafından 1989 yılında gösterilmiştir (131). Bu çalışma her ne kadar homeopatik yaklaşım göstermektedir fakat NTE'nin anti-kanser etkisini göstermesinden dolayı önemlidir. Günümüze kadar birçok kanser araştırmasında kemoterapatik ajan potansiyeli araştırılan bu bitkinin farklı kanser türleri üzerinde anti-proliferatif etkisi ortaya konulmuştur. İn vitro araştırmalarda NTE özütünün ve özellikle TQ'un insan meme ve over adenokarsinoma hücre hatlarında (132), myeloblastik lösemi hücrelerinde (HL-60) (133), skuamoz karsinoma (SCC VII), fibrosarkoma (FSSaR) (134), laringeal neoplastik hücreleri (Hep-2) (135), prostat ve pankreatik hücre hatlarında (136-139) proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. KRK üzerine yapılan in vivo çalışmada Jalal ve arkadaşları (96) tarafından NTE'nin besin takviyesi olarak uygulandığı sıçanlarda kolon karsinogenezinin engellendiği bildirilmiş olup muhtemel mekanizmalarının araştırılmasının gerekliliği vurgulanmıştır. Salim ve Fukushima'nın (140) gerçekleştirdiği in vivo araştırmada da yoğun TQ içeriğine sahip *Nigella sativa* esansiyel yağının sağlıklı organlara zarar vermeden kolon dokusunda oluşturulan preneoplastik lezyonların çoğalmasını engellediği gösterilmiştir.



WST-1 analizi sonucu, çalışmamızda HT-29 ve LoVo hücre hatlarında NTE'nin GI<sub>50</sub> konsantrasyonları olan 2.523 mg/ ml ve 1.792 mg/ ml'lik muamelesinin hücre proliferasyonunu doza bağımlı şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir. İn vitro çalışmalarda NTE'den ziyade aktif bileşen olan TQ üzerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır. Gali-Muhtasib ve arkadaşları (95) 2005 yılında HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmada, TQ'un hücre proliferasyonunu süreye ve doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini, G1 fazında hücre döngüsünü durduğunu ve bu etkinin p53 üzerinden ortaya çıktığını göstermiştir. Aynı ekibin 2008 yılında yayınladıkları diğer bir çalışmada (97) bu etki p53+/+ ve p53-/- HTC116 hücre hattında araştırılmış ve p53+/+ hücre hatlarında TQ uygulamasına bağlı olarak daha yüksek apoptoza sebep olduğu, diğer taraftan p53-/- hücrelerde CHEK1 geni ekspresyonunu artırdığını ortaya koyulmuştur. 2014 yılında yine HCT-116 hücre hattıyla yapılan çalışmada (141) TQ'nun hücre proliferasyonunu, anti apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-x1'nin ekspresyonunu azaltıp ve pro-apoptik Bax protein ekspresyonunu artırmak suretiyle inhibe ettiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da yüksek p53 aktivitesine sahip HT-29 hücre hattında hücre proliferasyonunun %74.95 (50 mg/ml) oranında inhibe olduğu belirlenmiştir (Tablo-10). Aynı konsantrasyonda NTE uygulanan p53-/- LoVo hücre hattında proliferasyon inhibisyonu %58.18 seviyesinde kalmıştır. Kontrol olarak kullanılan HUVEC hücrelerinde ise %8.94 oranında hücre proliferasyonunun inhibe edildiği görülmüştür. Bizim çalışmamızın bulguları da yüksek p53 ekspresyonuna bağlı hücre ölümünün tetiklenmesinde NTE'nin rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

KRK metastazı özellikle karaciğer ve akciğere olmakla birlikte, tedavi açısından ikinci bir cerrahi operasyona ve kemoterapi seanslarına neden olmaktadır. Metastatik KRK için 5-fluorouracil, capecitabine, oxaliplatin ve irrinotecan gibi hızlı çoğalan hücreleri hedefleyen konvansiyonel ajanlar kullanılsa bile tedavi başarısı oluşan yan etkilerden dolayı kısıtlanmaktadır. Çalışmamızda HT-29 ve LoVo hücre hatlarında NTE'nin hücre migrasyonu üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde sırasıyla %68.92 ve %59.43 inhibisyon değerlerine ulaşılmıştır (p<0.05)(Tablo-11). Khan ve arkadaşları (142) tarafından 2015'te yapılan bir çalışmada MDA-MB-435, HeLa ve BT549 gibi kanser hücre hatlarında TQ'nun düşük konsantrasyonlarda (5 µM) TWIST1 transkripsiyon faktörünü inhibe ederek hücre migrasyonu ve invazyonunu engellediği gösterilmiştir. HT-29 hücre hattında yapılan çalışmada ise 40 µM TQ uygulanan hücrelerde migrasyonun hem in vitro hem de in vivo olarak azaldığı rapor edilmiştir (143). Tüm bu veriler bizim çalışmamızın migrasyon ile ilgili bulgularını destekler niteliktedir.

Bitki özütlerinin epigenetik mekanizmalar üzerindeki etkileri bilindiğinden çalışmamızda NTE'nin miRNA ekspresyonlarına olası etkileri değerlendirilmiştir. NTE'nin KRK'de miRNA seviyelerine etkilerini inceleyen literatürde şimdiye kadar yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Sadece bir çalışmada (144) pankreas kanseri hücre hatlarında miR-101 ve miR-24-2 transfeksiyonu sonrasında, TQ, betulinik asit ve gemcitabine uygulanarak sinerjistik veya antagonistik etkiler araştırılmış olup TQ'nun miRNA ekspresyonları ile gemcitabine'in etkisini artırdığı görülmüştür. Literatürde farklı bitki özütlerinin farklı kanser tiplerinin miRNA ekspresyon değişikliklerine neden olduğu gösterilmiştir. 2012 yılında çalışma ekimiz tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada OLE'nin glioblastoma hücrelerinde miRNA ekspresyonunu mevcut glioblastoma tedavisinde yaygın olarak kullanılan temozolomidin etkinliğini artırıcı yönde değiştirdiği gösterilmiştir (145). Çalışmamızda HT-29 hücre hattında NTE miR-182a ekspresyonunda 9.25 kat azalmaya neden olmuştur ( $p < 0.05$ ) (Tablo-12). Yüksek miR-182a ekspresyonunun  $\beta$ -Catenin, FoxF2, SATB2 gibi genlerinin ekspresyonunu düzenleyerek, hücre-hücre etkileşimini, ekstraselüler matriks sentezini ve transkripsiyonel düzenleme gibi fonksiyonları değiştirdiği bilinmektedir (98-100) (Tablo-12). Mir-182a ekspresyonun HCT116, HT-29, ve SW480 KRK hücre hatlarında değişiklik gösterdiğini ve miR-182 ekspresyon artışının apoptozu önlediği ilk kez 2012'de Cekaite ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur (146). Bu bilgiler dahilinde, NTE'nin miR-182 ekspresyonunu düşürerek apoptozda artışa ve hücre proliferasyonunda azalmaya neden olabileceğini düşündürmektedir. Amodeo ve arkadaşları 2013 (147) te HT-29 hücre hattının da arasında bulunduğu 3 KRK hücre hattı ile yaptıkları bir çalışmada, miR-182'nin yüksek ekspresyonunda TSP-1'in baskılandığını ve böylelikle anjiyogenez ve metastatik özelliklerin ortaya çıktığını vurgulamaktadırlar. Zhang ve arkadaşları da 2015'te yaptığı çalışmada (112) fetanyl'in KRK'de  $\beta$ -Catenin ve miR-182a'nın ekspresyonunu azaltarak, migrasyon ve hücre proliferasyonunu engellediğini belirlenmişlerdir. Bu verilerde yine NTE'nin çalışmamızda belirlenen proliferasyonda ve migrasyonda meydana getirdiği azalmayı miR-182a üzerinden gerçekleştirebileceğini destekler niteliktedir. Mevcut çalışma bulguları NTE'nin epigenetik mekanizmalar ile migrasyonu önleme yönünde katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Akdeniz havzasında yaygın olarak yetiştirilmekte olan zeytinin hem yağı hem de yaprağı halk tarafından farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Zeytin yaprağı üzerine yoğunlaşan çalışmalar, onun antihipertansif, anti-aterojenik, kardiyoprotektif, hipokolesterolemik, hipoglisemik, antimikrobiyal, antiviral, antitümöral, anti-inflamatuar

ve antioksidan özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (101). Özellikle OLE'nin aktif bileşeni olarak bilinen oleuropein'in söz konusu biyolojik etkilerin kaynağı olduğu düşünülmektedir. Fenolik bileşenler içinde Oleuropein miktarı zeytinyağında %0.005-%0.12, zeytinyağı üretildikten sonra kalan posada %0.87 oranlarında tespit edilmişken OLE'de %1-%14 gibi en yüksek miktarda bulunmuştur (100, 148). Yaptığımız HPLC analizinde oleuropein miktarı 0.058 mg / mL (0.12 mg oleuropein /g örnek) olarak belirlenmiştir. WST-1 analizi sonrası OLE özütü, HUVEC hücrelerinde ölüme neden olmazken, HT-29 ve LoVo hücrelerinde sırasıyla 2.120 mg/ ml ve 0.579 mg/ ml dozlarında hücre proliferasyonunu %50 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu dozlar HPLC analizi sonrası elde edilen oleuropein konsantrasyonları ile hesaplanınca HT-29 için GI<sub>50</sub> değeri 90.1 µM, LoVo içinse 24.8 µM olarak tespit edilmiştir. 2013 yılında Oleuropein ile yapılan başka bir çalışmada (149) GI<sub>50</sub> değerleri MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için sırasıyla 110 ve 160 µM olarak bulunmuştur. Farklı kanser türlerinde OLE antiproliferatif etki bakımından incelenmiş olsa bile şu anki literatür bilgimize göre KRK üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Meme kanseri (SKBR3 ve MCF-7), pankreas kanseri (MiaPaCa-2) lösemi (K562 ve HL-60), larinks kanseri (HEp2), mesane kanseri (T-24) hücre hatlarında yapılan in vitro çalışmaların tamamında OLE özütünün kanser hücrelerinde proliferasyonu engellediği gösterilmiştir (149-153). Özüt hazırlama teknikleri ve kullanılan dozlar farklılık göstermesine rağmen proliferasyonun birbirinden çok farklı hücre hatlarında etkili olması, OLE'in global bir hücre ölüm mekanizmasını tetiklediğini göstermektedir. Bu noktada literatürde en çok üzerinde durulan mekanizma apoptozdur. Samed ve arkadaşları (154) tarafından 2014 yılında gerçekleştirilen çalışmada OLE'nin K562 lösemi hücre hattında apoptozu indüklediği ve hücre döngüsünü düşük sürelerde G0/G1 geçişinde, uzun süre uygulamada ise G2/M geçişinde durdurduğu ortaya konmuştur.

Kanserin lethal etkilerinin oluşmasının en önemli sebeplerinden biri metastazdır. Farklı bitki özütlerinin metastazı önleme yönünden etki gösterdikleri bilinmesine rağmen OLE ve oleuropein'in hücre migrasyonu üzerindeki etkisi hakkında yapılmış sadece iki çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde (155) oleuropein'in meme kanseri metastazını matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerinin ekspresyonlarını baskılayıp, doku metalloproteinaz inhibitörlerinin (TIMP) ekspresyonlarını artırarak engellediğini gösterilmiştir. Diğer çalışmada ise OLE'nin lizozomal membran bütünlüğünü koruyarak sıçanlarda metastaz ve invazyonunu engellediği savunulmuştur (156). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde HT-29 ve LoVo hücrelerinde OLE'nin etkisiyle migrasyonun sırasıyla

%48.45 (p=0.202) ve %51.66 (p=0.064) oranında azaldığı fakat bu azalmanın istatistiki olarak anlamlılığa ulaşmadığı görülmüştür (Tablo-11).

Çalışmamızda OLE'nin hücre proliferasyonunu ve metastazını engelleyici yöndeki etkilerinin epigenetik temellerini incelemek için OLE'nin hücre hatlarında meydana getirdiği miRNA ekspresyon değişimleri analiz edildi. Bitki özütlerinin miRNA seviyeleri üzerine etkilerini ortaya koyan çalışmalar giderek artmaktadır fakat KRK üzerine bu anlamda yapılan çalışmalar çok kısıtlı sayıdadır. Bu çalışmaların ilk örneği 2009 yılında Davidson ve arkadaşlarının (157) sıçanlarda azoksimetan ile indüklenmiş kolon kanserinde mısır ve balık yağı diyeti sonrası miRNA değişimlerini değerlendirdiği çalışmadır. Bu çalışmada miR-34a, miR-132, miR-223 ve miR-224 ekspresyonlarında artış, miR-192, miR-194, miR-215 ve miR-375 ekspresyonlarında azalma tespit edilmiştir. 2013'te gerçekleştirilen diğer bir çalışma (158) yine sıçanlarda azoksimetan ile indüklenen kolon tümörlerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada üzüm çekirdeği diyeti sonrası, tümör büyüklüğü ve sayısındaki azalmanın yanı sıra miR-19a, miR-20a ve let7a ekspresyonlarında artış, miR-205, miR-135b, miR-196a, miR-21, miR-148a ve miR-103 ekspresyon seviyelerinde azalma görülmüştür. Ayrıca OLE'nin T98G, U-138MG ve U-87MG glioblastoma hücre hatlarında miRNA ekspresyonda değişime sebep olarak apoptozu indükleyebileceği bildirilmektedir (159). Bizim çalışmamızda HT-29 hücre hattında OLE miRNA ekspresyonları üzerinde büyük bir etki oluşturmuştur. Doza bağımlı olarak miR-195 ve miR-21 ekspresyonları OLE verilmeyen hücre hattına göre artış gösterirken, sadece miR-182a ekspresyonunda anlamlı azalma görülmüştür (p<0.05) (Tablo-13,14). 2015'te Yang ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada (160) miR-195'in Bcl-2 ekspresyonunu inhibe ederek Caco-2 ve NCM460 KRK hücrelerinde apoptoza sebep olduğu rapor edilmiştir. Hakkında en fazla çalışma yapılmış miRNA'lardan biri olan miR-21'in KRK'de onkogenik etki gösterdiği bildirilmektedir (161). Dolayısıyla miR-21'deki ekspresyon artışının hücrelerde proliferasyonu artırması beklenirken HT-29 hücre hattında bu etkisinin oluşmadığı görülmektedir. HT-29 hücre hattında ekspresyonu anlamlı şekilde azalan miR-182a'da KRK'ya spesifik bir onkomirdir. Daha önceki bölümlerde tartışıldığı gibi miR-182a'nın ekspresyonunun artışının FoxF2, SATB2 genleri ve  $\beta$ -catenin yolağı üzerinden kanser oluşumuna zemin hazırladığı düşünülmektedir (111, 112). OLE'nin etkisi ile HT-29 hücre hattında miR-182a'nın ekspresyonunun azalışı, bu hücrelerde OLE'nin proliferasyon ve migrasyonu azalttığı yönündeki bulgularımızı destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, mevcut çalışmada RKE, NTE ve OLE'nin KRK hücrelerinde, hücre proliferasyonu ve inazyonunu engellediği belirlendi. Bulgularımız, değerlendirilen özütlerin, bu anti kanser etkisini epigenetik mekanizma ile gerçekleştirebileceklerini destekler niteliktedir. RKE'nin KRK hücrelerinde miR-140 ekspresyonunu artırarak, NTE ve OLE'nin de miR-182a'nın ekspresyonunu azaltarak KRK hücrelerinde invazyonu önleyici etkisi mevcut çalışmada ilk kez ortaya konmuştur. İleri çalışmalara ihtiyaç duyulmakla birlikte, mevcut bulgular RKE, NTE ve OLE'nin KRK tedavisine yönelik gerçekleştirilecek yeni çalışmalarda kullanılabilir potansiyel terapötik adaylar olabileceklerini göstermektedir.



## KAYNAKLAR

1. KASDAĞLI M, RADHAKRISHNAN S, REDDIVARI L, VEERAMACHANENI DR, VANAMALA J. Colon carcinogenesis: Influence of Western diet-induced obesity and targeting stem cells using dietary bioactive compounds. *Nutrition*, 30(11): 1242-1256, 2014.
2. H EL-FAR A. Thymoquinone Anticancer Discovery: Possible Mechanisms. *Current drug discovery technologies*, 12(2): 80-89, 2015.
3. M BROWN E, IR GILL C, J MCDOUGALL G, STEWART D. Mechanisms underlying the anti-proliferative effects of berry components in in vitro models of colon cancer. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(1): 200-209, 2012.
4. ROTELLI M, BOCALE D, DE FAZIO M, ANCONA P, SCALERA I, MEMEO R, TRAVAGLIO E, ZBAR A, ALTOMARE D. IN-VITRO evidence for the protective properties of the main components of the Mediterranean diet against colorectal cancer: A systematic review. *Surgical oncology*, 24(3): 145-152, 2015.
5. THOMAS J, OHTSUKA M, PICHLER M, LING H. MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12): 260-280, 2015.
6. FLEJOU JF. [WHO Classification of digestive tumors: the fourth edition]. *Annales de pathologie*, 31(5): 27-31, 2011.
7. SIEGEL R, MA J, ZOU Z, JEMAL A. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(1): 9-29, 2014.
8. GÜLTEKİN M, BOZTAŞ G. Türkiye Kanser İstatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 43: (12-32), 2014.
9. NAN H, HUTTER CM, LIN Y, JACOBS EJ, ULRICH CM, WHITE E, BARON JA, BERNDT SI, BRENNER H, BUTTERBACH K, CAAN BJ, CAMPBELL PT, CARLSON CS, CASEY G, CHANG-CLAUDE J, CHANOCK SJ, COTTERCHIO M, DUGGAN D, FIGUEIREDO JC, FUCHS CS, GIOVANNUCCI EL, GONG J, HAILE RW, HARRISON TA, HAYES RB, HOFFMEISTER M, HOPPER JL, HUDSON TJ, JENKINS MA, JIAO S, LINDOR NM, LEMIRE M, LE MARCHAND L, NEWCOMB PA, OGINO S, PFLUGEISEN BM, POTTER JD, QU C, ROSSE SA, RUDOLPH A, SCHOEN RE, SCHUMACHER FR, SEMINARA D, SLATTERY ML, THIBODEAU SN, THOMAS F, THORNQUIST M, WARNICK GS, ZANKE BW, GAUDERMAN WJ, PETERS U, HSU L, CHAN AT, CCFR, GECCO. Association of aspirin and NSAID use

with risk of colorectal cancer according to genetic variants. *The Journal of the American Medical Association*, 313(11): 1133-1142, 2015.

10. LIEBERMAN D. Screening for colorectal cancer in individuals at average risk: current methods and emerging issues. *JAMA internal medicine*, 174(1): 10-11, 2014.
11. CALISTRI D, RENGUCCI C, CASADEI GARDINI A, FRASSINETI GL, SCARPI E, ZOLI W, FALCINI F, SILVESTRINI R, AMADORI D. Fecal DNA for noninvasive diagnosis of colorectal cancer in immunochemical fecal occult blood test-positive individuals. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(10): 2647-2654, 2010.
12. NED RM, MELILLO S, MARRONE M. Fecal DNA testing for Colorectal Cancer Screening: the ColoSure test. *PLOS Currents*, 3: 1205-1220, 2011.
13. LEOPOLDO S, LORENA B, CINZIA A, GABRIELLA DC, ANGELA LUCIANA B, RENATO C, ANTONIO M, CARLO S, CRISTINA P, STEFANO C, MAURIZIO T, LUIGI R, CESARE B. Two subtypes of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: clinicopathological and genetic features. *Annals of Surgical Oncology*, 15(5): 1429-1439, 2008.
14. FLEMING M, RAVULA S, TATISHCHEV SF, WANG HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(3): 153-173, 2012.
15. PRENEN H, VECCHIONE L, VAN CUTSEM E. Role of targeted agents in metastatic colorectal cancer. *Targeted oncology*, 8(2): 83-96, 2013.
16. MURAKAMI T, MITOMI H, SAITO T, TAKAHASHI M, SAKAMOTO N, FUKUI N, YAO T, WATANABE S. Distinct WNT/beta-catenin signaling activation in the serrated neoplasia pathway and the adenoma-carcinoma sequence of the colorectum. *Modern Pathology*, 28(1): 146-158, 2015.
17. FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5): 759-767, 1990.
18. FEARNHEAD NS, WILDING JL, BODMER WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *British medical bulletin*, 64(1): 27-43, 2002.
19. BARBER TD, MCMANUS K, YUEN KW, REIS M, PARMIGIANI G, SHEN D, BARRETT I, NOUHI Y, SPENCER F, MARKOWITZ S. Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(9): 3443-3448, 2008.
20. WEISENBERGER DJ, SIEGMUND KD, CAMPAN M, YOUNG J, LONG TI, FAASSE MA, KANG GH, WIDSCHWENDTER M, WEENER D, BUCHANAN D, KOH

- H, SIMMS L, BARKER M, LEGGETT B, LEVINE J, KIM M, FRENCH AJ, THIBODEAU SN, JASS J, HAILE R, LAIRD PW. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature Genetics*, 38(7): 787-793, 2006.
21. GOEL A, NAGASAKA T, ARNOLD CN, INOUE T, HAMILTON C, NIEDZWIECKI D, COMPTON C, MAYER RJ, GOLDBERG R, BERTAGNOLLI MM, BOLAND CR. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology*, 132(1): 127-138, 2007.
  22. NOFFSINGER AE. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annual review of pathology*, 4: 343-364, 2009.
  23. 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*, 14(8): 16365-16385, 2013.
  24. JASS JR, BAKER K, ZLOBEC I, HIGUCHI T, BARKER M, BUCHANAN D, YOUNG J. Advanced colorectal polyps with the molecular and morphological features of serrated polyps and adenomas: concept of a 'fusion' pathway to colorectal cancer. *Histopathology*, 49(2): 121-131, 2006.
  25. NOFFSINGER AE. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease*, 4: 343-364, 2009.
  26. TAKAYAMA T, OHI M, HAYASHI T, MIYANISHI K, NOBUOKA A, NAKAJIMA T, SATOH T, TAKIMOTO R, KATO J, SAKAMAKI S, NIITSU Y. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 121(3): 599-611, 2001.
  27. KRESSNER U, BJORHEIM J, WESTRING S, WAHLBERG SS, PAHLMAN L, GLIMELIUS B, LINDMARK G, LINDBLOM A, BORRESEN-DALE AL. Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 34(4): 518-521, 1998.
  28. SHIELDS JM, PRUITT K, MCFALL A, SHAUB A, DER CJ. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends in Cell Biology*, 10(4): 147-154, 2000.
  29. KARAPETIS CS, KHAMBATA-FORD S, JONKER DJ, O'CALLAGHAN CJ, TU D, TEBBUTT NC, SIMES RJ, CHALCHAL H, SHAPIRO JD, ROBITAILLE S. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(17): 1757-1765, 2008.



30. YEATMAN TJ. A renaissance for SRC. *Nature Reviews Cancer*, 4(6): 470-480, 2004.
31. IRBY RB, YEATMAN TJ. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene*, 19(49): 5636-5642, 2000.
32. DAVIES H, BIGNELL GR, COX C, STEPHENS P, EDKINS S, CLEGG S, TEAGUE J, WOFFENDIN H, GARNETT MJ, BOTTOMLEY W, DAVIS N, DICKS E, EWING R, FLOYD Y, GRAY K, HALL S, HAWES R, HUGHES J, KOSMIDOU V, MENZIES A, MOULD C, PARKER A, STEVENS C, WATT S, HOOPER S, WILSON R, JAYATILAKE H, GUSTERSON BA, COOPER C, SHIPLEY J, HARGRAVE D, PRITCHARD-JONES K, MAITLAND N, CHENEVIX-TRENCH G, RIGGINS GJ, BIGNER DD, PALMIERI G, COSSU A, FLANAGAN A, NICHOLSON A, HO JW, LEUNG SY, YUEN ST, WEBER BL, SEIGLER HF, DARROW TL, PATERSON H, MARAIS R, MARSHALL CJ, WOOSTER R, STRATTON MR, FUTREAL PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6): 949-954, 2002.
33. KNUDSON AG, JR. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer research*, 45(4): 1437-1443, 1985.
34. VOGELSTEIN B, FEARON ER, KERN SE, HAMILTON SR, PREISINGER AC, NAKAMURA Y, WHITE R. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*, 244(4): 207-211, 1989.
35. SPIRIO LN, SAMOWITZ W, ROBERTSON J, ROBERTSON M, BURT RW, LEPPERT M, WHITE R. Alleles of APC modulate the frequency and classes of mutations that lead to colon polyps. *Nature Genetics*, 20(4): 385-388, 1998.
36. BIENZ M, CLEVERS H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, 103(2): 311-320, 2000.
37. SHIH IM, WANG TL, TRAVERSO G, ROMANS K, HAMILTON SR, BEN-SASSON S, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5): 2640-2645, 2001.
38. FODDE R, KUIPERS J, ROSENBERG C, SMITS R, KIELMAN M, GASPAR C, VAN ES JH, BREUKEL C, WIEGANT J, GILES RH, CLEVERS H. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nature Cell Biology*, 3(4): 433-438, 2001.
39. KASTAN MB, ONYEKWERE O, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, CRAIG RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research*, 51(23): 6304-6311, 1991.

40. LANE DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381): 15-16, 1992.
41. VOGELSTEIN B, FEARON ER, HAMILTON SR, KERN SE, PREISINGER AC, LEPPERT M, NAKAMURA Y, WHITE R, SMITS AM, BOS JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England Journal of Medicine*, 319(9): 525-532, 1988.
42. FEARON ER, CHO KR, NIGRO JM, KERN SE, SIMONS JW, RUPPERT JM, HAMILTON SR, PREISINGER AC, THOMAS G, KINZLER KW, ET AL. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, 247(4): 49-56, 1990.
43. GOYETTE MC, CHO K, FASCHING CL, LEVY DB, KINZLER KW, PARASKEVA C, VOGELSTEIN B, STANBRIDGE EJ. Progression of colorectal cancer is associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition of tumorigenicity is accomplished by correction of any single defect via chromosome transfer. *Molecular and Cellular Biology*, 12(3): 1387-1395, 1992.
44. MARKOWITZ S, WANG J, MYEROFF L, PARSONS R, SUN L, LUTTERBAUGH J, FAN RS, ZBOROWSKA E, KINZLER KW, VOGELSTEIN B, ET AL. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 268(5): 1336-1338, 1995.
45. PASCHE B, KNOBLOCH TJ, BIAN Y, LIU J, PHUKAN S, ROSMAN D, KAKLAMANI V, BADDI L, SIDDIQUI FS, FRANKEL W, PRIOR TW, SCHULLER DE, AGRAWAL A, LANG J, DOLAN ME, VOKES EE, LANE WS, HUANG CC, CALDES T, DI CRISTOFANO A, HAMPEL H, NILSSON I, VON HEIJNE G, FODDER R, MURTY VV, DE LA CHAPELLE A, WEGHORST CM. Somatic acquisition and signaling of TGFBR1\*6A in cancer. *Journal of the American Medical Association*, 294(13): 1634-1646, 2005.
46. SHIBATA D, PEINADO MA, IONOV Y, MALKHOSYAN S, PERUCHO M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nature Genetics*, 6(3): 273-281, 1994.
47. RODRIGUEZ-SOLER M, PEREZ-CARBONELL L, GUARINOS C, ZAPATER P, CASTILLEJO A, BARBERA VM, JUAREZ M, BESSA X, XICOLA RM, CLOFENT J, BUJANDA L, BALAGUER F, RENE JM, DE-CASTRO L, MARIN-GABRIEL JC, LANAS A, CUBIELLA J, NICOLAS-PEREZ D, BREA-FERNANDEZ A, CASTELLVIBEL S, ALENDA C, RUIZ-PONTE C, CARRACEDO A, CASTELLS A, ANDREU M,

- LLOR X, SOTO JL, PAYA A, JOVER R. Risk of cancer in cases of suspected lynch syndrome without germline mutation. *Gastroenterology*, 144(5): 926-932, 2013.
48. CHUNG DC, RUSTGI AK. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology*, 109(5): 1685-1699, 1995.
49. ESTELLER M, FRAGA MF, GUO M, GARCIA-FONCILLAS J, HEDENFALK I, GODWIN AK, TROJAN J, VAURS-BARRIERE C, BIGNON YJ, RAMUS S, BENITEZ J, CALDES T, AKIYAMA Y, YUASA Y, LAUNONEN V, CANAL MJ, RODRIGUEZ R, CAPELLA G, PEINADO MA, BORG A, AALTONEN LA, PONDER BA, BAYLIN SB, HERMAN JG. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Human Molecular Genetics*, 10(26): 3001-3007, 2001.
50. CUNNINGHAM JM, KIM CY, CHRISTENSEN ER, TESTER DJ, PARC Y, BURGART LJ, HALLING KC, MCDONNELL SK, SCHAID DJ, WALSH VOCKLEY C, KUBLY V, NELSON H, MICHELS VV, THIBODEAU SN. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *The American Journal of Human Genetics*, 69(4): 780-790, 2001.
51. GOELZ SE, VOGELSTEIN B, HAMILTON SR, FEINBERG AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science*, 228(4): 187-190, 1985.
52. EHRLICH M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, 21(35): 5400-5413, 2002.
53. SUZUKI K, SUZUKI I, LEODOLTER A, ALONSO S, HORIUCHI S, YAMASHITA K, PERUCHO M. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell*, 9(3): 199-207, 2006.
54. KANEDA A, WANG CJ, CHEONG R, TIMP W, ONYANGO P, WEN B, IACOBUZIO-DONAHUE CA, OHLSSON R, ANDRAOS R, PEARSON MA, SHAROV AA, LONGO DL, KO MS, LEVCHENKO A, FEINBERG AP. Enhanced sensitivity to IGF-II signaling links loss of imprinting of IGF2 to increased cell proliferation and tumor risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(52): 20926-20931, 2007.
55. WAJED SA, LAIRD PW, DEMEESTER TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Annals of Surgery*, 234(1): 10-20, 2001.
56. VAN ENGELAND M, DERKS S, SMITS KM, MEIJER GA, HERMAN JG. Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity. *Journal of Clinical Oncology*, 29(10): 1382-1391, 2011.

57. KONDO Y, SHEN L, ISSA JP. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1): 206-215, 2003.
58. PASQUINELLI AE, REINHART BJ, SLACK F, MARTINDALE MQ, KURODA MI, MALLER B, HAYWARD DC, BALL EE, DEGNAN B, MULLER P, SPRING J, SRINIVASAN A, FISHMAN M, FINNERTY J, CORBO J, LEVINE M, LEAHY P, DAVIDSON E, RUVKUN G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6): 86-89, 2000.
59. KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*, 42(5): D68-73, 2014.
60. LEE Y, AHN C, HAN J, CHOI H, KIM J, YIM J, LEE J, PROVOST P, RADMARK O, KIM S, KIM VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6): 415-419, 2003.
61. BARTEL DP, CHEN CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nature Reviews Genetics*, 5(5): 396-400, 2004.
62. PILLAI RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*, 11(12): 1753-1761, 2005.
63. MORETTI F, THERMANN R, HENTZE MW. Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. *RNA*, 16(12): 2493-2502, 2010.
64. TOMARI Y, ZAMORE PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development*, 19(5): 517-529, 2005.
65. IORIO MV, CROCE CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine*, 4(3): 143-159, 2012.
66. BEITZINGER M, MEISTER G. Preview. MicroRNAs: from decay to decoy. *Cell*, 140(5): 612-614, 2010.
67. KHRAIWESH B, ARIF MA, SEUMEL GI, OSSOWSKI S, WEIGEL D, RESKI R, FRANK W. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell*, 140(1): 111-122, 2010.
68. CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, BICHI R, ZUPO S, NOCH E, ALDLER H, RATTAN S, KEATING M, RAI K, RASSENTI L, KIPPS T, NEGRINI M, BULLRICH F, CROCE CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA

- genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(24): 15524-15529, 2002.
69. MICHAEL MZ, SM OC, VAN HOLST PELLEKAAN NG, YOUNG GP, JAMES RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular Cancer Research*, 1(12): 882-891, 2003.
70. TSANG WP, KWOK TT. The miR-18a\* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras. *Carcinogenesis*, 30(6): 953-959, 2009.
71. ZHENG K, LIU W, LIU Y, JIANG C, QIAN Q. MicroRNA-133a suppresses colorectal cancer cell invasion by targeting Fascin1. *Oncology Letters*, 9(2): 869-874, 2015.
72. WANG H, AN H, WANG B, LIAO Q, LI W, JIN X, CUI S, ZHANG Y, DING Y, ZHAO L. miR-133a represses tumour growth and metastasis in colorectal cancer by targeting LIM and SH3 protein 1 and inhibiting the MAPK pathway. *European Journal of Cancer*, 49(18): 3924-3935, 2013.
73. ZHAO HJ, REN LL, WANG ZH, SUN TT, YU YN, WANG YC, YAN TT, ZOU W, HE J, ZHANG Y, HONG J, FANG JY. MiR-194 deregulation contributes to colorectal carcinogenesis via targeting AKT2 pathway. *Theranostics*, 4(12): 1193-1208, 2014.
74. WANG B, SHEN ZL, GAO ZD, ZHAO G, WANG CY, YANG Y, ZHANG JZ, YAN YC, SHEN C, JIANG KW, YE YJ, WANG S. MiR-194, commonly repressed in colorectal cancer, suppresses tumor growth by regulating the MAP4K4/c-Jun/MDM2 signaling pathway. *Cell Cycle*, 14(7): 1046-1058, 2015.
75. XUAN Y, YANG H, ZHAO L, LAU WB, LAU B, REN N, HU Y, YI T, ZHAO X, ZHOU S. MicroRNAs in colorectal cancer: Small molecules with big functions. *Cancer letters*, 360(2): 89-105, 2015.
76. ZHANG B, PAN X, COBB GP, ANDERSON TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1): 1-12, 2007.
77. SLABY O, SVOBODA M, FABIAN P, SMERDOVA T, KNOFLICKOVA D, BEDNARIKOVA M, NENUTIL R, VYZULA R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*, 72(5-6): 397-402, 2007.
78. ASANGANI IA, RASHEED SA, NIKOLOVA DA, LEUPOLD JH, COLBURN NH, POST S, ALLGAYER H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 27(15): 2128-2136, 2008.

79. XIONG B, CHENG Y, MA L, ZHANG C. MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells. *International journal of oncology*, 42(1): 219-228, 2013.
80. LINK A, BALAGUER F, SHEN Y, NAGASAKA T, LOZANO JJ, BOLAND CR, GOEL A. Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(7): 1766-1774, 2010.
81. SCHETTER AJ, YOU WC, LENNETTE ET, GAIL MT, RABKIN CS. Association of Epstein-Barr virus antibody levels with precancerous gastric lesions in a high-risk cohort. *Cancer Science*, 99(2): 350-354, 2008.
82. CHEN T, YAO LQ, SHI Q, REN Z, YE LC, XU JM, ZHOU PH, ZHONG YS. MicroRNA-31 contributes to colorectal cancer development by targeting factor inhibiting HIF-1alpha (FIH-1). *Cancer Biology & Therapy*, 15(5): 516-523, 2014.
83. XU RS, WU XD, ZHANG SQ, LI CF, YANG L, LI DD, ZHANG BG, ZHANG Y, JIN JP, ZHANG B. The tumor suppressor gene RhoBTB1 is a novel target of miR-31 in human colon cancer. *International journal of oncology*, 42(2): 676-682, 2013.
84. SUN D, YU F, MA Y, ZHAO R, CHEN X, ZHU J, ZHANG CY, CHEN J, ZHANG J. MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1). *The Journal of Biological Chemistry*, 288(13): 9508-9518, 2013.
85. ZHANG G, ZHOU H, XIAO H, LIU Z, TIAN H, ZHOU T. MicroRNA-92a functions as an oncogene in colorectal cancer by targeting PTEN. *Digestive Diseases and Sciences*, 59(1): 98-107, 2014.
86. ZHOU T, ZHANG G, LIU Z, XIA S, TIAN H. Overexpression of miR-92a correlates with tumor metastasis and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease*, 28(1): 19-24, 2013.
87. WANG J, SONG YX, MA B, WANG JJ, SUN JX, CHEN XW, ZHAO JH, YANG YC, WANG ZN. Regulatory Roles of Non-Coding RNAs in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8): 19886-19919, 2015.
88. HRASOVEC S, GLAVAC D. MicroRNAs as Novel Biomarkers in Colorectal Cancer. *Frontiers in Genetics*, 3: 180, 2012.
89. KELLY TK, DE CARVALHO DD, JONES PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nature biotechnology*, 28(10): 1069-1078, 2010.
90. KÄHKÖNEN MP, HOPIA AI, HEINONEN M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8): 4076-4082, 2001.

91. STONER GD. Foodstuffs for preventing cancer: the preclinical and clinical development of berries. *Cancer Prevention Research*, 2(3): 187-194, 2009.
92. UMESALMA S, SUDHANDIRAN G. Ellagic acid prevents rat colon carcinogenesis induced by 1, 2 dimethyl hydrazine through inhibition of AKT-phosphoinositide-3 kinase pathway. *European journal of pharmacology*, 660(2): 249-258, 2011.
93. SANTOS IS, PONTE BM, BOONME P, SILVA AM, SOUTO EB. Nanoencapsulation of polyphenols for protective effect against colon–rectal cancer. *Biotechnology advances*, 31(5): 514-523, 2013.
94. PLACKAL ADIMURIYIL GEORGE B, TYNGA IM, ABRAHAMSE H. In Vitro Antiproliferative Effect of the Acetone Extract of *Rubus fairholmianus* Gard. Root on Human Colorectal Cancer Cells. *BioMed Research International*, 2015: 8, 2015.
95. GALI-MUHTASIB H, DIAB-ASSAF M, BOLTZE C, AL-HMAIRA J, HARTIG R, ROESSNER A, SCHNEIDER-STOCK R. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *International journal of oncology*, 25(4): 857-866, 2004.
96. AL-JOHAR D, SHINWARI N, ARIF J, AL-SANEA N, JABBAR AA, EL-SAYED RA, MASHHOUR A, BILLEDO G, EL-DOUSH I, AL-SALEH I. Role of *Nigella sativa* and a number of its antioxidant constituents towards azoxymethane-induced genotoxic effects and colon cancer in rats. *Phytotherapy Research*, 22(10): 1311-1323, 2008.
97. GALI-MUHTASIB H, KUESTER D, MAWRIN C, BAJBOUJ K, DIESTEL A, OCKER M, HABOLD C, FOLTZER-JOURDAINNE C, SCHOENFELD P, PETERS B. Thymoquinone triggers inactivation of the stress response pathway sensor CHEK1 and contributes to apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer research*, 68(14): 5609-5618, 2008.
98. NORWOOD A, TUCCI M, BENGHUZZI H. A comparison of 5-fluorouracil and natural chemotherapeutic agents, EGCG and thymoquinone, delivered by sustained drug delivery on colon cancer cells. *Biomedical sciences instrumentation*, 43: 272-277, 2006.
99. RYAN D, ROBARDS K. Critical Review. Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123(5): 31-44, 1998.
100. PRIEGO-CAPOTE F, RUIZ-JIMÉNEZ J, DE CASTRO ML. Fast separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis–diode array detection: Application to the characterisation of alperujo after ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1045(1): 239-246, 2004.

101. ARMUTCU F, AKYOL S, HASGÜL R, YIĞİTOĞLU MR. Zeytin Yaprağının Biyolojik Etkileri ve Tıpta Kullanımı. *Spatula DD*, 1(3): 159-165, 2011.
102. DELGADO-PERTIÑEZ M, GÓMEZ-CABRERA A, GARRIDO A. Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*): digestibility and chemical composition and in vitro studies. *Animal feed science and technology*, 87(3): 187-201, 2000.
103. BARBARO B, TOIETTA G, MAGGIO R, ARCIELLO M, TAROCCHI M, GALLI A, BALSANO C. Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10): 18508-18524, 2014.
104. CÁRDENO A, SÁNCHEZ-HIDALGO M, ROSILLO MA, DE LA LASTRA CA. Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1 $\alpha$ . *Nutrition and cancer*, 65(1): 147-156, 2013.
105. GFELLER D, GROSDIDIER A, WIRTH M, DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic acids research*, 42(W1): W32-W38, 2014.
106. GROSDIDIER A, ZOETE V, MICHIELIN O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic acids research*, 39(2): W270-W277, 2011.
107. PETERSEN EF, GODDARD TD, HUANG CC, COUCH GS, GREENBLATT DM, MENG EC, FERRIN TE. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13): 1605-1612, 2004.
108. ZHANG W, ZOU C, PAN L, XU Y, QI W, MA G, HOU Y, JIANG P. MicroRNA-140-5p Inhibits the Progression of Colorectal Cancer by Targeting VEGFA. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(3): 1123-1133, 2015.
109. ZHAI H, FESLER A, BA Y, WU S, JU J. Inhibition of colorectal cancer stem cell survival and invasive potential by hsa-miR-140-5p mediated suppression of Smad2 and autophagy. *Oncotarget*, 2015.
110. ZHAO W, ZOU J, WANG B, FAN P, MAO J, LI J, LIU H, XIAO J, MA W, WANG M. [microRNA-140 suppresses the migration and invasion of colorectal cancer cells through targeting Smad3]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*, 36(10): 739-745, 2014.
111. ZHANG Y, WANG X, WANG Z, TANG H, FAN H, GUO Q. miR-182 promotes cell growth and invasion by targeting forkhead box F2 transcription factor in colorectal cancer. *Oncology reports*, 33(5): 2592-2598, 2015.



112. ZHANG X-L, CHEN M-L, ZHOU S-L. Fentanyl inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer via  $\beta$ -catenin. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(1): 227, 2015.
113. YANG M-H, YU J, JIANG D-M, LI W-L, WANG S, DING Y-Q. microRNA-182 targets special AT-rich sequence-binding protein 2 to promote colorectal cancer proliferation and metastasis. *Journal of Translational Medicine*, 12: 109, 2014.
114. GFELLER D, MICHIELIN O, ZOETE V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules. *Bioinformatics*, 29(23): 3073-3079, 2013.
115. LIU RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3): 517S-520S, 2003.
116. KOPONEN JM, HAPPONEN AM, MATTILA PH, TORRONEN AR. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(4): 1612-1619, 2007.
117. RIAZ M, AHMAD M, RAHMAN N. Antimicrobial screening of fruit, leaves, root and stem of *Rubus fruticosus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(24): 5920-5924, 2011.
118. LEE JH, HAM Y-A, CHOI S-H, IM EO, JUNG JH, IM KS, KIM D-K, XU Y, WANG MW, KIM ND. Activity of crude extract of *Rubus crataegifolius* roots as a potent apoptosis inducer and DNA topoisomerase I inhibitor. *Archives of pharmacal research*, 23(4): 338-343, 2000.
119. QUAVE CL, ESTÉVEZ-CARMONA M, COMPADRE CM, HOBBY G, HENDRICKSON H, BEENKEN KE, SMELTZER MS. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PLoS One*, 7(1): 287-307, 2012.
120. NARAYANAN BA, GEOFFROY O, WILLINGHAM MC, RE GG, NIXON DW. p53/p21 (WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer letters*, 136(2): 215-221, 1999.
121. SEERAM NP, ADAMS LS, HENNING SM, NIU Y, ZHANG Y, NAIR MG, HEBER D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(6): 360-367, 2005.

122. HARAGUCHI T, KAYASHIMA T, OKAZAKI Y, INOUE J, MINEO S, MATSUBARA K, SAKAGUCHI E, YANAKA N, KATO N. Cecal succinate elevated by some dietary polyphenols may inhibit colon cancer cell proliferation and angiogenesis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(24): 5589-5594, 2014.
123. AYAZ L, GÖRÜR A, YAROĞLU HY, ÖZCAN C, TAMER L. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 139(9): 1499-1506, 2013.
124. BANDRÉS E, CUBEDO E, AGIRRE X, MALUMBRES R, ZARATE R, RAMIREZ N, ABAJO A, NAVARRO A, MORENO I, MONZO M. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Molecular cancer*, 5(1): 29, 2006.
125. HAYASHITA Y, OSADA H, TATEMATSU Y, YAMADA H, YANAGISAWA K, TOMIDA S, YATABE Y, KAWAHARA K, SEKIDO Y, TAKAHASHI T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer research*, 65(21): 9628-9632, 2005.
126. SONG B, WANG Y, XI Y, KUDO K, BRUHEIM S, BOTCHKINA GI, GAVIN E, WAN Y, FORMENTINI A, KORNMANN M. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene*, 28(46): 4065-4074, 2009.
127. YANG H, FANG F, CHANG R, YANG L. MicroRNA-140-5p suppresses tumor growth and metastasis by targeting transforming growth factor  $\beta$  receptor 1 and fibroblast growth factor 9 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 58(1): 205-217, 2013.
128. LI T-M, CHEN G-W, SU C-C, LIN J-G, YEH C-C, CHENG K-C, CHUNG J-G. Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Research*, 25(2): 971-979, 2005.
129. UMAR S, HEDAYA O, SINGH AK, AHMED S. Thymoquinone inhibits TNF- $\alpha$ -induced inflammation and cell adhesion in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by ASK1 regulation. *Toxicology and applied pharmacology*, 287(3): 299-305, 2015.
130. WARING R, MCDONALD A, LARSSON S, ERICSSON T, WIREN A, ARWIDSSON E, ERICSSON A, LOHAMMAR T. Differences in chemical composition of plants grown at constant relative growth rates with stable mineral nutrition. *Oecologia*, 66(2): 157-160, 1985.

131. SALOMI M, PANIKKAR K, KESAVAN M, DONATA SR K, RAJAGOPALAN K. Anti-cancer activity of nigella sativa. *Ancient science of life*, 8(3-4): 262, 1989.
132. SHOIEB AM, ELGAYYAR M, DUDRICK PS, BELL JL, TITHOF PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *International journal of oncology*, 22(1): 107-113, 2003.
133. EL-MAHDY MA, ZHU Q, WANG QE, WANI G, WANI AA. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *International journal of cancer*, 117(3): 409-417, 2005.
134. IVANKOVIC S, STOJKOVIC R, JUKIC M, MILOS M, MILOS M, JURIN M. The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone in vitro and in vivo. *Experimental oncology*, 28(3): 220-224, 2006.
135. WOMACK K, ANDERSON M, TUCCI M, HAMADAIN E, BENGHUZZI H. Evaluation of bioflavonoids as potential chemotherapeutic agents. *Biomedical sciences instrumentation*, 42: 464-469, 2005.
136. BANERJEE S, KASEB AO, WANG Z, KONG D, MOHAMMAD M, PADHYE S, SARKAR FH, MOHAMMAD RM. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer research*, 69(13): 5575-5583, 2009.
137. KASEB AO, CHINNAKANNU K, CHEN D, SIVANANDAM A, TEJWANI S, MENON M, DOU QP, REDDY GP-V. Androgen receptor–and E2F-1–targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research*, 67(16): 7782-7788, 2007.
138. YI T, CHO S-G, YI Z, PANG X, RODRIGUEZ M, WANG Y, SETHI G, AGGARWAL BB, LIU M. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular cancer therapeutics*, 7(7): 1789-1796, 2008.
139. TAN M, NORWOOD A, MAY M, TUCCI M, BENGHUZZI H. Effects of (-) epigallocatechin gallate and thymoquinone on proliferation of a PANC-1 cell line in culture. *Biomedical sciences instrumentation*, 42: 363-371, 2005.
140. SALIM EI, FUKUSHIMA S. Chemopreventive potential of volatile oil from black cummin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutrition and cancer*, 45(2): 195-202, 2003.

141. KUNDU J, CHOI BY, JEONG C-H, KUNDU JK, CHUN K-S. Thymoquinone induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells through inactivation of STAT3 by blocking JAK2-and Src-mediated phosphorylation of EGF receptor tyrosine kinase. *Oncology reports*, 32(2): 821-828, 2014.
142. KHAN MA, TANIA M, WEI C, MEI Z, FU S, CHENG J, XU J, FU J. Thymoquinone inhibits cancer metastasis by downregulating TWIST1 expression to reduce epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget*, 6(23): 19580-19591, 2015.
143. ATTOUB S, SPERANDIO O, RAZA H, ARAFAT K, AL-SALAM S, AL SULTAN MA, AL SAFI M, TAKAHASHI T, ADEM A. Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(5): 557-569, 2013.
144. PANDITA A, MANVATI S, SINGH SK, VAISHNAVI S, BAMEZAI RN. Combined effect of microRNA, nutraceuticals and drug on pancreatic cancer cell lines. *Chemico-biological interactions*, 233: 56-64, 2015.
145. TUNCA B, TEZCAN G, CECENER G, EGELI U, AK S, MALYER H, TUMEN G, BILIR A. *Olea europaea* leaf extract alters microRNA expression in human glioblastoma cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 138(11): 1831-1844, 2012.
146. CEKAITE L, RANTALA JK, BRUUN J, GURIBY M, ÅGESEN TH, DANIELSEN SA, LIND GE, NESBAKKEN A, KALLIONIEMI O, LOTHE RA. MiR-9,-31, and-182 deregulation promote proliferation and tumor cell survival in colon cancer. *Neoplasia*, 14(9): 868-881, 2012.
147. AMODEO V, BAZAN V, FANALE D, INSALACO L, CARUSO S, CICERO G, BRONTE G, ROLFO C, SANTINI D, RUSSO A. Effects of anti-miR-182 on TSP-1 expression in human colon cancer cells: there is a sense in antisense? *Expert opinion on therapeutic targets*, 17(11): 1249-1261, 2013.
148. SAVOURNIN C, BAGHDIKIAN B, ELIAS R, DARGOUTH-KESRAOUI F, BOUKEF K, BALANSARD G. Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(2): 618-621, 2001.
149. ELAMIN MH, DAGHESTANI MH, OMER SA, ELOBEID MA, VIRK P, AL-OLAYAN EM, HASSAN ZK, MOHAMMED OB, ABOUSSEKHRA A. Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. *Food and Chemical Toxicology*, 53: 310-316, 2013.

150. QUIRANTES-PINÉ R, ZUREK G, BARRAJÓN-CATALÁN E, BÄßMANN C, MICOL V, SEGURA-CARRETERO A, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A. A metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC–ESI-QTOF-MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 72: 121-126, 2013.
151. GOLDSMITH CD, VUONG QV, SADEQZADEH E, STATHOPOULOS CE, ROACH PD, SCARLETT CJ. Phytochemical Properties and Anti-Proliferative Activity of *Olea europaea* L. Leaf Extracts against Pancreatic Cancer Cells. *Molecules*, 20(7): 12992-13004, 2015.
152. ABAZA L, TALORETE TP, YAMADA P, KURITA Y, ZARROUK M, ISODA H. Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(5): 1306-1312, 2007.
153. BELŠČAK-CVITANOVIĆ A, DURGO K, BUŠIĆ A, FRANEKIĆ J, KOMES D. Phytochemical attributes of four conventionally extracted medicinal plants and cytotoxic evaluation of their extracts on human laryngeal carcinoma (HEp2) cells. *Journal of medicinal food*, 17(2): 206-217, 2014.
154. SAMET I, HAN J, JLAIEL L, SAYADI S, ISODA H. Olive (*Olea europaea*) leaf extract induces apoptosis and monocyte/macrophage differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells: insight into the underlying mechanism. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 12(1): 406-417, 2014.
155. HASSAN ZK, ELAMIN MH, DAGHESTANI MH, OMER SA, AL-OLAYAN EM, ELOBEID MA, VIRK P, MOHAMMED OB. Oleuropein induces anti-metastatic effects in breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(9): 4555-4559, 2012.
156. ABDEL-HAMID N, EL-MOSELHY M, EL-BAZ A. Hepatocyte lysosomal membrane stabilization by olive leaves against chemically induced hepatocellular neoplasia in rats. *International journal of hepatology*, 6(7): 625-633, 2010.
157. DAVIDSON LA, WANG N, SHAH MS, LUPTON JR, IVANOV I, CHAPKIN RS. n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding microRNA signatures in rat colon. *Carcinogenesis*, 30(12): 2077-2084, 2009.
158. DERRY MM, RAINA K, BALAIYA V, JAIN AK, SHROTRIYA S, HUBER KM, SERKOVA NJ, AGARWAL R, AGARWAL C. Grape seed extract efficacy against

- azoxymethane-induced colon tumorigenesis in A/J mice: interlinking miRNA with cytokine signaling and inflammation. *Cancer Prevention Research*, 6(7): 625-633, 2013.
159. TEZCAN G, TUNCA B, BEKAR A, BUDAK F, SAHIN S, CECENER G, EGELI U, TASKAPILIOGLU MO, KOCAELI H, TOLUNAY S. Olea europaea leaf extract improves the treatment response of GBM stem cells by modulating miRNA expression. *American journal of cancer research*, 4(5): 572-580, 2014.
160. YANG B, TAN Z, SONG Y. Study on the molecular regulatory mechanism of MicroRNA-195 in the invasion and metastasis of colorectal carcinoma. *International Journal of Clinical & Experimental Medicine*, 8(3): 625-633, 2015.
161. ZHAO J, XU G, ZHANG Y, ZHAO G. Emerging role of microRNA-21 in colorectal cancer. *Cancer biomarkers: section A of Disease markers*, 16(7): 635-653, 2015.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve bu tezin hazırlanmasındaki sabrından, desteğinden ve bilimsel katkılarından dolayı değerli danışmanım **Prof. Dr. Berrin Tunca**'ya kıymetli hocalarım **Prof. Dr. Ünal Egeli** ve **Prof. Dr. Gülşah Çeçener**'e en içten teşekkürlerimi borç bilirim.

Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Hulusi Malyer ve Doç. Dr. Saliha Şahin'e,

Ayrıca 3 yıl boyunca birlikte çalıştığım ve büyük mutluluk duyduğum Tıbbi Biyoloji A.D asistan, öğrenci ve tüm çalışanlarına,

Yine bu süre içerisinde desteklerini ve sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili anneme, babama ve kardeşlerime,

Kahrımı çeken ve bu sürecin eğlenceli bir hale gelmesine katkı sunan arkadaşlarım **Emrah, Burcu, Gökhan, Toygar** ve **Dursun**'a, teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılı Erzurum doğumluyum. İlköğretimimi Erzurum Aziziye ilkokulunda, orta öğrenimimi ise Adapazarı Dr. Nuri Bayar ve Erzurum Şair Nefi Ortaokullarında tamamladım. Erzurum Anadolu Lisesinden 2004 yılında mezun olduktan sonra Orta Doğu Teknik Üniversitesinde Biyoloji eğitimime başladım. Türkiye’de ilk kez sentetik gen üretimi yapan Sentegen firmasında stajyerlik yaptım. 2011 yılında mezuniyetimi takiben Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji A.D’da yüksek lisans eğitimime başladım. 2013 yılında tez aşamasındayken ayrılıp Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) dahilinde Uludağ Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.D yüksek lisans eğitimine başladım.