

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI
BESLENME VE DİYETETİK BİLİM DALI

DÖTERYUM OKSİTİN KAFEİK ASİT FENETİL ESTER
İLE KOMBİNE KULLANIMININ KOLON KANSERİ
HÜCRE HATTINA KARŞI TERAPÖTİK
POTANSİYELİNİN *IN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülşah DARAMA

İstanbul
Ocak-2023

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI
BESLENME VE DİYETETİK BİLİM DALI

DÖTERYUM OKSİTİN KAFEİK ASİT FENETİL ESTER İLE
KOMBİNE KULLANIMININ KOLON KANSERİ HÜCRE
HATTINA KARŞI TERAPÖTİK POTANSİYELİNİN *IN VİTRO*
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülşah DARAMA

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ABDİK

İkinci Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı TEKİNER

İstanbul

Ocak - 2023

TEZ ONAYI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, Beslenme ve Diyetetik Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ABDİK

Üye Doç. Dr. Mustafa YAMAN

Üye Doç. Dr. Seyfettin Arda ÖZTÜRKCAN

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Doç. Dr. Erhan İÇENER

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “**Döteryum Oksitin Kafeik Asit Fenetil Ester İle Kombine Kullanımının Kolon Kanseri Hücre Hattına Karşı Terapötik Potansiyelinin *In Vitro* Araştırılması**” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

Gülşah DARAMA

ÖN SÖZ

Tez çalışmam süresince yardımcı olan ve mesleki bakışıma farklı uzak görüşlülük kazandıran tez danışmanlarım Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ABDİK ve Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı TEKİNER'e, anneksin bulgularımda yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Büşra BOLAT'a, laboratuvar deneyleri boyunca çalışma arkadaşım Öykü BORA'ya, hayatım boyunca desteklerini ve güvenlerini esirgemeyen ebeveynlerim Emine ve Raif DARAMA ile kardeşim Dilşah DARAMA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Gülşah DARAMA

İstanbul-2023

ÖZET

**DÖTERYUM OKSİTİN KAFEİK ASİT FENETİL ESTER İLE
KOMBİNE KULLANIMININ KOLON KANSERİ HÜCRE
HATTINA KARŞI TERAPÖTİK POTANSİYELİNİN *IN VİTRO*
ARAŞTIRILMASI**

Gülşah DARAMA

Yüksek Lisans, Beslenme ve Diyetetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ABDİK

Ocak, 2023 – 80 Sayfa

Döteryum oksit (D₂O), normal suyun hidrojeni yerine ağır hidrojen izotopuna sahip formudur. Kafeik Asit Fenetil Ester (KAFE) ise propolisin bir polifenolik molekülüdür. Bu çalışmada, D₂O ve KAFE'nin kombine kullanımının kolon kanseri hücre hattına karşı terapötik potansiyelinin *in vitro* araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, iki bileşiğin farklı dozlarda (%10-50 D₂O; 5,10 ve 40 µM KAFE) 24. saatte tek başlarına ve birlikte HCT-116 kolon kanseri hücre hattı ve D₂O'nun sağlıklı HaCaT hücre hattı üzerindeki etkileri MTS testi ile ölçülmüştür. MTS testi sonuçlarına göre seçilen dozlarda iki bileşiğin uygulandığı hücrelerden RNA izole edilmiş, izolatlar cDNA'ya dönüştürülmüş ve yedi hedef genin (AKT, NF-κB, CCND1, p16, BAX, p53 ve p21) ekspresyon seviyeleri real-time PCR yöntemi ile belirlenmiştir. *In vitro* MTS bulgularına göre, (%30 D₂O + 10 µM KAFE) kombine uygulamasının HCT-116 hattında hücre canlılığını kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalttığı kaydedilmiştir. Gen ekspresyonu bulgularında ise, D₂O ve KAFE'nin kombine kullanımının AKT, NF-κB ve CCND1 genlerinin ekspresyon düzeylerini azalttığı, p16, BAX ve p53 genlerinin ekspresyon düzeylerini yükselttiği ve p21 geninin ekspresyon seviyesini etkilemediği görülmüştür. Özetle, D₂O ve KAFE'nin diğer kanser türleri üzerindeki terapötik etki mekanizmasının ileri yöntemler ile araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kolon Kanseri, Döteryum Oksit, Kafeik Asit Fenetil Ester, HCT-116, HaCaT.

ABSTRACT
INVESTIGATION OF *IN VITRO* THERAPEUTIC POTENTIAL
OF USING DEUTERIUM OXIDE IN COMBINATION WITH
CAFFEIC ACID PHENYLETHYL ESTER ON COLON CANCER
CELL LINE

Gülşah DARAMA

Master, Nutrition and Dietetics

Thesis Advisor: Asst. Prof. Dr. Hüseyin ABDİK

January, 2023- 80 Pages

Deuterium oxide (D₂O) is a form of water that contains heavy hydrogen rather than ordinary hydrogen. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) is a polyphenolic molecule of propolis. In this study, we aimed to investigate *in vitro* therapeutic potential of using D₂O in combination with CAPE on colon cancer cell line. The combined effects of both compounds on HCT-116 colon cancer cell line at different doses (10-50% D₂O; 5,10 and 40 µM CAPE) and 24th and that of D₂O on healthy HaCaT cell line were measured by *in vitro* MTS assay. Based on the MTS test findings, according to selected duration and dose rates, RNA was isolated from the cells, converted to cDNA, and expression levels of seven target genes (AKT, NF-κB, CCND1, p16, BAX, p53 ve p21) were subjected to real-time PCR application. *In vitro*, MTS test findings showed that the combined application (30% D₂O + 10 µM CAPE) of both compounds significantly reduced HCT-116 cell viability. Gene expression test revealed that combined use of both compounds downregulated AKT, NF-κB and CCND1 genes, and upregulated p16, BAX, and p53 genes, whereas they did not change p21 expression level. Overall, we concluded that therapeutic mechanisms of action of D₂O and CAPE on other cancer types should be studied further.

Keywords: Colon Cancer, Deuterium Oxide, Caffeic Acid Phenethyl Ester, HCT-116, HaCaT.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ.....	ii
ÖN SÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
BİRİNCİ BÖLÜM.....	1
GİRİŞ	1
İKİNCİ BÖLÜM	3
KOLON KANSERİ, DÖTERYUM OKSİT VE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER.....	3
2.1 Kolon Kanseri	3
2.1.1 Tanımı	3
2.1.2 Dünya’da ve Türkiye’de Durumu	3
2.1.3 Epidemiyolojisi	4
2.1.4 Etiyolojisi	5
2.1.4.1 Kalıtsal Sendromlar.....	5
2.1.4.2 İnflamatuar Bağırsak Hastalıkları	5
2.1.4.3 Kolon Polipleri	6
2.1.4.4 Obezite ve Diabetes Mellitus	6
2.1.4.5 Kolesistektomi	7
2.1.5 Kolon Kanseri ve Beslenme İlişkisi	8
2.1.5.1 Kırmızı ve İşlenmiş Et Ürünleri.....	8
2.1.5.2 Lif ve Sebze-Meyve Tüketimi	9
2.1.5.3 Diyet Yağı	10
2.1.5.4 Süt, Kalsiyum ve D vitamini.....	10
2.1.5.5 Alkol.....	11

2.1.5.6 Tütün ve Tütün Mamulleri	11
2.1.5.7 Fiziksel Aktivite	11
2.1.6 Tedavisi	12
2.2 Döteryum Oksit	12
2.2.1 Tanımı	12
2.2.2 Fizikokimyasal Özellikleri	13
2.2.3 Kullanım Alanları	13
2.2.4 Döteryum Oksit ve Kanser Araştırmaları	14
2.3 Kafeik Asit Fenetil Ester	15
2.3.1 Tanımı	15
2.3.2 Kaynakları	15
2.3.2.1 Propolis	15
2.3.3 Fizikokimyasal Özellikleri	16
2.3.4 KAFE ve Kanser Araştırmaları	17
2.3.4.1 KAFE ve Kolon Kanseri	17
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM	19
GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1 Gereç	19
3.1.1 Hücre Hatları	19
3.1.2 Kimyasal Maddeler ve Ticari Kitler	19
3.2 Yöntem(ler)	20
3.2.1 Hücre Kültürü Koşulları ve Kimyasallar	20
3.2.2 Hücrelerin Pasajlanması, Dondurulması ve Çözdürülmesi.....	20
3.2.3 Hücre Canlılık Testi	21
3.2.4 Anneksin	23
3.2.5 Gen Ekspresyonu Analizi.....	24
3.2.6 Koloni Oluşturma.....	27
3.2.7 İstatistiksel Hesaplamalar	28
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	29
BULGULAR.....	29
4.1 Hücre Canlılık Testi (MTS) Bulguları	29
4.1.1 HCT-116 Hücre Hattı - D ₂ O MTS Testi Bulguları.....	29

4.1.2 HCT-116 Hücre Hattı - H ₂ O MTS Testi Bulguları.....	29
4.1.3 HCT-116 Hücre Hattı - KAFE ve D ₂ O MTS Testi Bulguları.....	30
4.1.4 SH-SY5Y Hücre Hattı-D ₂ O MTS Testi Bulguları.....	31
4.1.5 HaCaT Hücre Hattı - D ₂ O MTS Testi Bulguları.....	31
4.1.6 HaCaT Hücre Hattı - H ₂ O MTS Testi Bulguları.....	32
4.2 Anneksin Bulguları	32
4.3 Gen Ekspresyon Bulguları	33
4.3.1 AKT Gen Ekspresyon Bulguları	33
4.3.2 NF-κB Gen Ekspresyon Bulguları	34
4.3.3 CCND1 Gen Ekspresyon Bulguları	35
4.3.4 p16 Gen Ekspresyon Bulguları	35
4.3.5 BAX Gen Ekspresyon Bulguları.....	36
4.3.6 p53 Gen Ekspresyon Bulguları	36
4.3.7 p21 Gen Ekspresyon Bulguları	37
4.4 Koloni Oluşturma Bulguları.....	38
4.5 İstatistik Analiz Bulguları	38
BEŞİNCİ BÖLÜM	40
DEĞERLENDİRME VE TARTIŞMA	40
ALTINCI BÖLÜM	51
SONUÇ.....	51
KAYNAKÇA	52
ÖZGEÇMİŞ.....	69

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1: D2O ve H2O'nun Fizikokimyasal Özellikleri	13
Tablo 3.1: Primer Dizilimleri.....	27
Tablo 4.1: Gen Ekspresyon Bulguları.....	37



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: D ₂ O Kimyasal Yapısı.....	12
Şekil 2.2: KAFE'nin Kimyasal Yapısı.....	15
Şekil 4.1: HCT-116 Hücre Hattı - D ₂ O MTS Testi Bulguları	29
Şekil 4.2: HCT-116 Hücre Hattı - H ₂ O MTS Testi Bulguları	30
Şekil 4.3: HCT-116 Hücre Hattı - KAFE ve D ₂ O MTS Testi Bulguları	30
Şekil 4.4: SH-SY5Y Hücre Hattı - D ₂ O MTS Testi Bulguları	31
Şekil 4.5: HaCaT Hücre Hattı - D ₂ O MTS Testi Bulguları	31
Şekil 4.6: HaCaT Hücre Hattı - H ₂ O MTS Testi Bulguları	32
Şekil 4.7: Anneksin Bulguları	33
Şekil 4.8: AKT Gen Ekspresyon Bulguları.....	34
Şekil 4.9: NF- κB Gen Ekspresyon Bulguları.....	34
Şekil 4.10: CCND1 Gen Ekspresyon Bulguları.....	35
Şekil 4.11: p16 Gen Ekspresyon Bulguları	35
Şekil 4.12: BAX Gen Ekspresyon Bulguları.....	36
Şekil 4.13: p53 Gen Ekspresyon Bulguları	36
Şekil 4.14: p21 Gen Ekspresyon Bulguları	37
Şekil 4.15: HCT-116 Koloni Oluşturma Bulguları	38

KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APC	: Adenomatöz Polipozis Coli
BKİ	: Beden Kitle İndeksi
D₂O	: Döteryum Oksit
dH₂O	: Distile Su
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
FAP	: Ailesel Adenomatöz Polipozis
FBS	: Fetal Sığır Serum
H	: Hidrojen
H₂O	: Su
HNPCC	: Kalıtsal Polipozis Olmayan Kolorektal Kanser
İBH	: İnflamatuar Bağırsak Hastalığı
KAFE	: Kafeik Asit Fenetil Ester
KRK	: Kolorektal Kanser
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PSA	: Penisilin, Streptomisin, Amfoterisin
vd	: Ve diğerleri
vb	: Ve benzeri

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Her kanser türünde ortak gözlemlenen özellik aşırı hücre çoğalması ve kontrol edilemeyen hücre büyümesidir. Kolon kanseri birkaç yıla yayılan ve birçok aşama sonrası oluşan kolon neoplazisi sürecinin sonucu olarak gelişmektedir. Genetik, cinsiyet, etnik köken, coğrafi bölge ve çevre koşulları (sigara, alkol, beslenme alışkanlıkları, hareketsiz yaşam tarzı ve obezite) gibi çeşitli etkenler kolon kanseri insidansının artması ile ilişkilidir (Tarasiuk vd., 2018; Buikhuisen vd., 2020).

Küresel Kanser İstatistikleri 2020 verilerine göre, 2020'de teşhis edilen yeni kanser vakalarının sayısı 19,3 milyon olup, kolon kanseri (%10) dünya çapında meme (%11,7) ve akciğer kanserlerinden sonra (%11,4) en sık karşılaşılan kanser türü olarak üçüncü sırada yer almaktadır. Türkiye'de ise 2017 istatistiklerine göre, kolon kanseri insidansı en yüksek üçüncü kanser türünü temsil etmektedir (Sung vd., 2021; Deniz, 2022; Deo vd., 2022).

Kolon kanserinin tedavisi tümörün evresine bağlı olarak değişmekle birlikte genellikle cerrahi müdahale yapılamayan pek çok hastaya kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri uygulanmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemlerin etkinliği sınırlı olabilmektedir ve birçok yan etkiye sahiptir (Colpan ve Erdemir, 2021). Bu nedenle, doğal ürünlerden yeni, güçlü, ancak toksisitesi düşük anti-kolon kanseri ajanların geliştirilmesi ilgi çekici bir hedef haline gelmiştir (Ji vd., 2018). Örneğin, zencefil benzeri bir bitki olan zerdeçaldan (*Curcuma longa*) elde edilen fitokimyasal kurkimin, fenolik bileşiklerin stilben ailesinden türeyen ve meyvelerde özellikle kırmızı üzümde bulunan resveratrol, yeşil çayın ana aktif bileşeni *epigallocateşin gallat* (EGCG), flavonoidler vb. birçok bileşik bu bağlamda sıklıkla çalışılmaktadır (Chen vd., 2017; Li vd., 2018; Rejhová vd., 2018; Honari vd., 2019; Pricci vd., 2020).

Hidrojenin izotopu olan döteryum ilk olarak 1934'te Nobel Ödülü'nü kazanan Harold Urey tarafından keşfedildi. Doğal ortamlarda, döteryum toplam hidrojenin %0,0156'sını oluşturarak düşük oranlarda bulunmaktadır. En sık oluşan bileşiği ise döteryum oksittir (D₂O) (Urey vd., 1932; Abilev vd., 2019). D₂O molekülünün

kütlesi, normal suyun (H₂O) kütlesinden %11 daha fazladır. Bu farklılığın sonucu olarak, D₂O'nun fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri normal sudan büyük ölçüde farklıdır (Abilev vd., 2018). Örneğin, D₂O, H₂O'ya nispeten viskozdur, erime ve kaynama noktaları daha yüksektir, ek olarak kimyasal reaksiyonlar, döteryumlu suda daha yavaş ilerler bu nedenle biyolojik süreçler etkilenir, araştırmalar yüksek konsantrasyonlarda D₂O'nun organizmaların metabolizmalarını yavaşlattığı, protein ve nükleik asit sentezi seviyelerini azalttığı, hücre bölünmesini ve mitozu inhibe ettiğini bildirmektedir (Bila vd., 2017; Abilev vd., 2019; Smirnova vd., 2018). Özellikle çeşitli konsantrasyonlarının tümör hücrelerini inhibe ettiği ve bu nedenle tümörlerin kemoterapötik tedavisinde destekleyici olabileceği düşünülmektedir (Bader vd., 2008). Takeda vd. (1998), D₂O'nun sitotoksik aktivitesini hepatik, pankreas, gastrik ve kolon kanseri hücre hatları (HepG2, Panc-1, KATO-3, Colo205) kullanarak değerlendirdiği çalışmada, dört kanser hücre hattına karşı, D₂O, zaman ve doza bağlı olarak önemli sitotoksik etkiler göstermiştir.

Kafeik asit fenetil ester (KAFE) (C₁₇H₁₆O₄; 2-feniletıl 3-[3,4-dihidroksifenil] akrilat), bazı propolis türlerinin aktif bileşığı olan katekol grubuna sahip fenolik bir bileşiktir (Yoncheva vd., 2019; Bankova vd., 2018). Günümüzde kanser, iç organ hasarları, metabolik ve enflamatuar hastalıklar ile mikrobiyal enfeksiyonlar üzerindeki terapötik etkileri nedeniyle dikkat çekmektedir. KAFE ve kanser ilişkisini araştıran *in vitro* çalışmalar, KAFE'nin antioksidan, anti-proliferatif ve apoptozu indükleyen etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle kanser hücreleri üzerinde seçici toksisite göstermesi ve sağlıklı hücrelere ise toksik etkisi bulunmaması bir avantajı olarak kabul edilmektedir (Colpan ve Erdemir, 2021; Lv vd., 2021).

Bu çalışmada; döteryum oksitin kafeik asit fenetil ester ile kombine kullanımının kolon kanseri hücre hattına karşı terapötik potansiyelinin *in vitro* araştırılması amaçlanmıştır.

İKİNCİ BÖLÜM

KOLON KANSERİ, DÖTERYUM OKSİT VE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER

2.1 Kolon Kanseri

2.1.1 Tanımı

Kolon, Latince kökenli olup, sindirimin önemli işlevini üstlenen kalın bağırsağın ilk 1,5-2 metrelik kısmına denilmektedir. Kolon kanseri (Kolorektal kanser, KRK) ise kötü huylu bir sindirim sistemi tümörü olup, kolonun iç yüzeyinde tümör veya doku büyümesi olarak başlayan ve çok aşamalı bir süreç sonucu gelişen bir kanser türünü ifade etmektedir (Granados-Romero vd., 2017; Dusak vd., 2022).

2.1.2 Dünya’da ve Türkiye’de Durumu

Kolon kanseri, 2020 yılında sindirim sistemine ait kanser türlerinde en yüksek insidansı oluşturarak dünya çapında yaygın olarak teşhis edilen malign bir tümörü temsil etmektedir (Sung vd., 2021).

Küresel Kanser İstatistikleri 2020 verilerine göre, yeni tespit edilen kanser vakaları içinde kolorektal kanser %10 (kolon için %6,0 ve rektum için %3,8) ile üçüncü, ölümler açısından ise %9,4 (kolon kanseri için %5,8 ve rektum kanserleri için %3,4) ile ikinci sırada yer almaktadır (Sung vd., 2021).

Verilere göre hastalık en yüksek, Avrupa (Macaristan, Slovenya, Slovakya, Hollanda ve Norveç), Avustralya/Yeni Zelanda, Kuzey Amerika ve Doğu Asya (Japonya ve Kore Cumhuriyeti, Singapur) bölgelerinde görülmektedir. Afrika kıtasında ve Güney Asya ülkelerinde ise insidans ve mortalite oranları hem kolon hem de rektum kanserleri açısından daha düşük seyirde görülmektedir (Arnold vd., 2017; Sung vd., 2021).

Türkiye Birleşik Veri Tabanı 2017 istatistiklerine göre, kolon kanseri en sık görülen üçüncü kanser türü olarak yerini almaktadır. Ülkemizde erkekler arasında en sık görülen kanser türleri akciğer (%21,7), prostat (%13,4) ve kolon (%9,8) kanser türleri iken, kadınlarda ise meme (%25,5), tiroit (%11,9) ve kolon (%8,1) kanserleri ilk üç sırayı paylaşmaktadır (Deniz, 2022).

2.1.3 Epidemiyolojisi

Kolon kanserleri, birkaç yıla yayılan çok aşamalı kolon neoplazisi sürecinin sonucu olarak gelişmektedir. Karsinogenez, kolon mukozasında neoplastik poliplerin gelişmesiyle başlamakta ve oluşan poliplerin histolojisi, kanser geliştirme potansiyelini belirlemek için kritik önem arz etmektedir. Genellikle iki yaygın histolojik polip tipi bulunmaktadır, bunlar hiperplastik ve adenomatözdür (Buikhuisen vd., 2020; Pop vd., 2020; Sharma, 2020).

Erken dönemde belirtilerin belirgin olmaması nedeniyle, kolon kanserinden muzdarip çoğu hasta yıllarca sessiz seyreden semptomlara sahip olmaktadır. Bu nedenle vakaların %50'sinden fazlası klinik olarak ileri kanser aşaması tanısı almaktadır. Hastalarda, bağırsak sistemindeki değişiklikler, genel veya lokal karın ağrısı, hastalık dışında bir neden olmadan gerçekleşen ani kilo kaybı, yorgunluk ve halsizlik, demir eksikliği ve anemi en sık karşılaşılan semptom ve şikayetler arasında yer almaktadır (Argilés vd., 2020; Huang vd., 2022).

Hastalık riski ve insidansı insanların yaşam ve beslenme alışkanlıklarının değişmesiyle birlikte artış göstermektedir. Özellikle yüksek kolon kanseri insidansı gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Bu durumun nedenleri arasında ise, yüksek yağlı diyet, yüksek oranda kırmızı ve işlenmiş et tüketimi, düşük lifli diyet, sigara ve alkol tüketimi, yetersiz fiziksel aktivite ve obezite gibi sağlıksız yaşam ve beslenme tarzı gösterilmektedir. Bu durumla bağlantılı olarak genç bireylerde görülme oranı da her geçen yıl artış göstermektedir (Keum ve Giovannucci, 2019; Long vd., 2021; Zuo vd., 2021).

Kanser evresi, tümörün sadece kolonun iç yüzeyiyle sınırlı olmasına, tüm kolonu sarmasına veya vücudun diğer bölgelerine ilerlemesine göre belirlenmektedir. Kolon kanserinin 0, I, II, III ve IV. evre gibi birçok aşaması bulunmaktadır ve hastalığın evresine göre tedavi rejimi değişmektedir. Prognozun en kötü olduğu en ileri evre IV. evredir. Bu nedenle, erken evrelerdeki tümörler cerrahi olarak çıkarılırken, bu evrelerin üzerindeki evrelerde veya cerrahi müdahale mümkün olmayan hastalarda radyoterapi ve kemoterapi yöntemleri hastalığın daha fazla yayılımını ve büyümesini önlemek için kullanılan diğer tedavi yaklaşımlarını oluşturmaktadır (Aiello vd., 2019; Messersmith, 2019; Gurba vd., 2022).

2.1.4 Etiyolojisi

Kolon kanseri, sporadik (%70), ailesel öykü (%20) ve kalıtsal sendromlara (%10) bağılı olarak gelişebilmektedir. Sporadik kolon kanserinin ortalama yaş tanısı 50 yaşından sonra olup, çoğunlukla çevresel faktörlere bağılı olmaktadır (Mattiuzzi vd., 2019; Thanikachalam ve Khan, 2019). Bu nedenle yaşamın beşinci on yılını geçtikten sonra, kolon kanseri gelişme riski belirgin bir şekilde artmaktadır. Aynı zamanda kişilerin inflamatuvar bağırsak hastalıkları, diabetes mellitus veya kolesistektomi geçirmiş olmaları durumunda daha fazla risk altında oldukları belirtilmektedir. Bunun dışında yaşam tarzı faktörleri de etiyolojisinde önemli rol oynamaktadır (Azer, 2019; Sawicki vd., 2021).

2.1.4.1 Kalıtsal Sendromlar

Kolon kanseri vakalarının yaklaşık %10'luk kısmının kalıtsal sendromların sonucu olarak ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. Kolon kanseri gelişimine yatkınlık yaratan en yaygın iki kalıtsal sendrom, *Lynch sendromu* olarak da bilinen kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser (HNPCC) ve ailesel adenomatöz polipozis (FAP)'tir (Valle vd., 2019).

HNPCC, otozomal dominant bir hastalık olup, genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Çoğu HNPCC vakası MLH1 ve MSH2 genlerindeki mutasyonlarla ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte, MSH6, MLH3, TGBR2, PMS1 ve PMS2 gibi HNPCC'ye yol açan birkaç başka gen mutasyonları da bulunmaktadır. HNPCC'li hastaların 50 yaşına kadar kolon kanseri gelişme riski yaklaşık %20 ve 85 yaşına kadar hastalığın gelişme riski yaklaşık %80 olduğu belirtilmektedir (Sawicki vd., 2021).

FAP ise adenomatöz polipozis coli (APC) gen defektlerinden kaynaklanmaktadır. APC, tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılmakta ve bu nedenle FAP'tan muzdarip bireylerde ileri yıllarda gençlik dönemindeki kolon polipi gelişiminin çoğunun kansere dönüşümü gözlemlenebilmektedir (Ahmed, 2020).

2.1.4.2 İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları

Kolon kanseri gelişimi için kalıtsal sendromların ardından üçüncü en yüksek riski teşkil eden grup İnflamatuvar Bağırsak Hastalık (İBH)'larıdır. İBH'nin, kolon

kanserine etkisi dünyanın çeşitli ülkelerinde uzun yıllar süren araştırmacıların çalışmaları ile doğrulanmıştır. Etiyolojisi bilinmemekle birlikte, İBH gelişiminin genetik, immünolojik ve çevresel etmenler arasındaki etkileşimlerin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. İBH, gastrointestinal sistemin bağışıklık sistemini etkileyen ve sonuç olarak kontrolsüz inflamasyonun gelişmesine yol açan kronik ve tedavisi olmayan bir hastalık grubudur (Hnatyszyn vd., 2019; Sawicki vd., 2021; Ranasinghe vd., 2022).

2.1.4.3 Kolon Polipleri

Kolon polipleri, kolonun mukoza tabakasından çıkıntı yaparak anormal doku büyümesine sebebiyet vermektedir. Histolojik olarak neoplastik olmayan ve neoplastik (adenomatöz) olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır ve adenomatöz polipler malign olma potansiyeli taşıması ile hastalık için önemli risk faktörünü oluşturmaktadır (Kanth ve Inadomi, 2021).

Bu türdeki polipler yaklaşık 5-15 yıl içinde bariz kansere dönüşebilmektedirler. Bununla birlikte polip boyutu, displazi derecesi ve bireylerin yaşının artması ile risk daha da çoğalmaktadır. Özellikle 50 yaş ve üstü kişilerin yaklaşık %40'ının bir veya daha fazla adenomatöz poliplere sahip olması nedeniyle, poliplerin kansere dönüşümünden önce tanımlanması ve çıkarılması önem taşımaktadır (Keum ve Giovannucci, 2019).

2.1.4.4 Obezite ve Diabetes Mellitus

Obezite, önemli multifaktöriyel tıbbi durum olarak kabul edilmektedir. Çoğu gelişmiş ülkede diyet düzeni ve alışkanlıklarının ve yaşam tarzının değişmesi, aşırı ağırlık ve obezite prevalansında bir artışa neden olmuştur. Obezite, beden kitle indeksinin (BKİ) ≥ 30 kg/m²'den ve aşırı kiloluluk BKİ'nin 25-29,9 kg/m² arasında olması olarak tanımlanmaktadır. Çalışmalar BKİ'si ≥ 30 kg/m² olan bireylerin, BKİ'si 20-24,9 kg/m² (normal beden kitle indeksi) arasında olanlara kıyasla 1,3 kat artmış risk taşıdığını göstermektedir (Tarasiuk vd., 2018; Mattiuzzi vd., 2019; Ye vd., 2020).

Obezitenin oluşumuna katkı sağlayan ana faktörler ise genetik ve yaşam tarzı (fiziksel hareketsizlik ve/veya uzun süredir aşırı enerji alımı) olarak kabul edilmektedir (Tarasiuk vd., 2018).

Obezite ile adipozite arttıkça, yağ visceral bölgeye nüfuz ederek, karaciğer, kalp, iskelet kasları, pankreas ve bağırsakta birikmekte ve hepatik steatoz, yağlı karaciğer hastalığı ve kanser dahil çeşitli kronik hastalıkların oluşumuna neden olan metabolik dengesizliklerin başlamasında rol oynamaktadır (Friedenreich vd., 2021).

Ek olarak, adipozite artışı tümör gelişiminin aracıları olduğu varsayılan yüksek trigliserit ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) seviyeleri ve hiperinsülinemi ile ilişkilendirilmektedir (Tarasiuk vd., 2018).

Obez hastalarda kolon kanseri gelişimine katkı sağlayan diabetes mellitus hastalığının sonucu olarak insülin konsantrasyonunda artış (hiperinsülinemi) görülmektedir. Hiperinsülinemi, kolon hücre proliferasyonunu uyarmakta ve dolaylı biçimde insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve obezite proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 ve IL-6) seviyelerini arttırarak kanser gelişimine katkı sağlayabilmektedir (Ma vd., 2018; Tarasiuk vd., 2018; Katsaounou vd., 2022).

2.1.4.5 Kolesistektomi

Kolesistektomi, safra kesesinin vücuttan cerrahi uygulama ile çıkarılmasıdır. Kolesistektomi sonrası kolon kanseri riskinin, safra asitlerinin sekresyonu ve bileşimindeki değişikliklerle bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Fizyolojik koşullar altında safra asitleri, besin alımına yanıt olarak periyodik olarak salgılanmaktadır. Safra kesesinin yokluğunda, bağırsaklara sürekli safra akışı olmakta ve bu durum ise safra asitlerinin sekonder safra asitlerine bakteriyel biyotransformasyonunun artmasına neden olmaktadır. Sekonder safra asitleri, reaktif oksijen ve azot türleri üretme, hücre zarını bozma ve kolonik mukoza hücrelerinde DNA hasarını indüklemeye potansiyeline sahip metabolitlerdir (Nguyen vd., 2018; Sawicki vd., 2021).

2.1.5 Kolon Kanseri ve Beslenme İlişkisi

Gastrointestinal kanser türlerinin %90'ından fazlasının diyetle ilgili gerçekleşebileceği fikrinin ortaya konulması ile birlikte, beslenme tarzı da kolon kanseri risk faktörleri arasında önemli bir konuma gelmiştir (Tao vd., 2018).

Diyet risk faktörlerini belirlemeye yönelik (pre)klinik çalışmalar, kolon kanserinin gelişiminde bazı besinlerin tüketiminin rolü olduğunu göstermektedir (Zam ve Hasan, 2019).

Genel olarak kepekli tahıllar, lifler, vitaminler, süt ürünleri ve kalsiyumca zengin beslenme ile daha düşük kolon kanseri riski ilişkilendirilirken, yüksek kırmızı ve işlenmiş et ürünleri, alkol tüketimi, yetersiz lif ve düşük mikro besin seviyelerine sahip beslenme biçiminin ise yüksek risk ile bağlantılı olduğu görülmektedir (Murphy vd., 2019). Özellikle Batı tarzı beslenme tarzını benimsemiş toplumlarda kolon kanseri görülme sıklığının yüksek olduğu fark edilmektedir (Mattiuzzi vd., 2019). Örneğin, ABD'de doğan Japonların beyaz nüfustan daha yüksek bir riske sahip olduğu bilinmektedir (Park vd., 2018).

Diyet, bağırsak mukozasını doğrudan luminal taraftan veya dolaylı olarak etkileyebilmektedir. Bağırsakta sürekli olarak bulunan besin kaynaklı bileşikler veya besinler, hormonların ve büyüme faktörlerinin kan içeriğini ve hücre sel dengesi etkileyerek, genomdaki genetik ve epigenetik değişikliklere karşı artan duyarlılık gibi sonuçlara neden olabilmektedir (Rawla vd., 2019).

2.1.5.1 Kırmızı ve İşlenmiş Et Ürünleri

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), işlenmiş et ürünlerinin insanlar için kanserojen grubu içinde sınıflandırmaktadır (Carr vd., 2017). Kırmızı etin hem demir içeriği, işlenmiş etin nitrit ve nitrat gibi içerikleri yanı sıra yüksek sıcaklıklarda kızartılma, ızgara, kavurma veya pişirme işlemleri, kas kreatinin amino asitlerle etkileşimi yoluyla mutajenik ve kanserojen heterosiklik aminlerin ve N-nitrozo bileşiklerinin oluşumuna yol açmaktadır. Bu maddeler, insanda genetik değişiklikleri indükleyebilmekte ve hastalık oluşumuna katkıda bulunabilmektedir (Padmanabhan vd., 2018).

Aşırı kırmızı et tüketimi, insülin sekresyonunu, hem demir ve yağ emilimini arttırarak kolon kanseri gelişim riskini önemli şekilde yükseltmektedir. Çalışmalar, günlük 100 g'dan fazla kırmızı et veya 50'g dan fazla işlenmiş et tüketen kişilerde kolon kanserine yakalanma riskinin diğer bireylere göre %20 yüksek olduğunu belirtmektedir (Mattiuzzi vd., 2019; Ranasinghe vd., 2022).

Balık ve kümes hayvanlarınca ağırlıklı beslenmenin kolon kanseri ve adenom riskini azalttığı bildirilmektedir. Beyaz etin ve özellikle n-3 çoklu doymamış yağ asitlerince zengin balık eti tüketiminin kolon kanseri riskini kırmızı ete göre düşürdüğü rapor edilmektedir (Padmanabhan vd., 2018).

2.1.5.2 Lif ve Sebze-Meyve Tüketimi

Diyet lifinin tükemi ile dışkı kıvamında artış ve bağırsaklardan geçiş hızlanması yoluyla potansiyel kanserojenlerin kolon ortamı ile temas süresi azalmaktadır (Gianfredi vd., 2018; Murphy vd., 2019).

Diyet lifinden elde edilen fermente edilebilir substratlar mikrobiyom çeşitliliğine katkıda bulunarak faydalı bakterilerin biyokütlesini arttırmakta ve bu şekilde kolon pH'sı düşmekte, fekal kanserojenler seyrelmekte, su tutulumu iyileşmekte ve kolondan geçiş süresi kısalmaktadır. Tüm bunların sonucu olarak, bağırsak geçirgenliği azalmakta ve kolonun zararlı bileşiklerle teması asgariye inmektedir (Gianfredi vd., 2018).

Diyet lifinin fermantasyonu, bağırsaktaki metabolik sinyal yollarını ve iltihabı etkileyecek anti-kanserojen kısa zincirli yağ asitlerinin (asetat, propiyonat ve bütirat) üretimini destekleyerek kanserojen sekonder safra asitlerini bağlamaktadır. Ek olarak, yüksek lifli besinler, düşük kalorili ve kanseri inhibe eden fitokimyasal bileşiklerce zengin oldukları için kolon kanserine karşı koruyucu özelliklere sahiptirler (Gianfredi vd., 2018).

Doğal lif kaynakları olan meyveler ve sebzeler aynı zamanda vitaminler, mineraller, folat, bitki steroller gibi çok sayıda biyoaktif bileşikleri de içermektedirler. Bu bileşiklerin çoğu, DNA ve hücrel hasarı inhibe edebilen güçlü antioksidan ve anti-enflamatuar kimyasallardır (Sawicki vd., 2021). Çalışmalar, sadece lif açısından değil, aynı zamanda koruyucu fitokimyasallar açısından da zengin bitki kaynaklı besinlerin tüketiminin kolon kanseri riskini

azalttığını göstermektedir. Özellikle turpgiller ve yeşil yapraklı sebzeler olmak üzere meyve ve baklagil tüketiminin kolon kanseri riskini azaltacağı bildirilmektedir (Ocvirk vd., 2019; Afrin vd., 2020).

2.1.5.3 Diyet Yağı

Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek oranda doymuş yağ ve/veya hayvansal yağ alımı ile kolon kanseri riski arasında pozitif bir ilişki olduğunu, diğer taraftan ise n-3 çoklu doymamış yağ asitlerince (ÇDYA) zengin balık ve balık yağı alımı ile kolon kanseri gelişimi arasında negatif yönlü bağlantı olduğunu göstermektedir (Zam ve Hassan, 2019).

Yüksek yağlı ve kolesterollü besinlerin karsinogenezi etkilediği ve kolondaki toksik sekonder safra asitlerinin konsantrasyonunu arttırdığı bildirilmektedir (Waluga vd., 2018). Yüksek yağlı diyetlerin bağırsak mikrobiyotası profilinde değişikliklere neden olarak, bağırsak bağışıklığı ve tümör oluşumunda rol oynayan inflamatuvar faktörlerde olumsuz değişikliklere neden olduğu öne sürülmektedir (Zam ve Hassan, 2019).

2.1.5.4 Süt, Kalsiyum ve D vitamini

Süt ürünlerinin yüksek kalsiyum ve D vitamini içeriği ile kolon kanserine karşı koruyucu olduğu varsayılmaktadır (Zhou ve Rifkin, 2021). Kalsiyumun, kolon ortamında serbest yağ asitleri ve safra asitleri gibi bileşikleri bağlayarak kanserojen etkileri azalttığı varsayılmaktadır. Aynı zamanda, hücre proliferasyonunu inhibe ederek farklılaşmayı ve apoptozu indüklediği ve DNA hasarını baskıladığı rapor edilmektedir (Murphy vd., 2019; Zhou ve Rifkin, 2021).

D vitamini yağda çözünen ve %90'ından fazlası cildin ultraviyole (UV) güneş ışığına maruz kalması ile endojen olarak sentezlenen bir tür vitamindir. D vitaminin başlıca görevleri arasında, hücre proliferasyonunu azaltmak, anjiyogenezi inhibe etmek ve apoptozu uyarmak gibi koruyucu etkiler bulunmaktadır (Padmanabhan vd., 2018). Kolon kanserinin D vitamini ile ilişkisi, daha az güneş ışığı alan bölgelerde hastalık insidansının yüksek olduğu bulgularıyla bağdaştırılmaktadır (Vallès vd., 2018).

2.1.5.5 Alkol

Alkol ve kanser bağlantısı hakkında günümüze kadar farklı mekanizmalar öne sürülmektedir. Alkollü içeceklerin ana bileşeni olan etanolün (etil alkol) tek başına bağırsak mukozası üzerinde doğrudan kanserojen etkisi bulunmamaktadır. Muhtemel etki etanolün metabolizması sonucu oluşan ilk metaboliti asetaldehitten kaynaklanmaktadır. Oluşan asetaldehit mutajenik ve kanserojen etkiye sahip olan ve kolon kanserinin başlangıcında önemli rol oynayabilecek bir maddedir (Rossi vd., 2018; Sawicki vd., 2021). Alkol vücuda alındıktan sonra sistematik dolaşım yoluyla kolonositlere ulaşmakta ve lümenin içine nüfuz etmektedir. Luminal etanol, alkol dehidrogenaz tarafından asetaldehitte metabolize edilmekte, oluşan asetaldehit mukozal hasara ve rejeneratif hücrel proliferasyona neden olmaktadır. Ek olarak, DNA sentezi ve metilasyonu için gerekli olan folatın emilimini azaltarak kanser oluşumunu tetiklemektedir. Beraberinde, folat dışındaki diğer B grubu vitaminlerinin (B₁, B₂, B₁₂) emilimlerini de azaltarak oksidatif strese karşı hassasiyeti arttırmaktadır (Rawla vd., 2019; Keum ve Giovannucci, 2019).

2.1.5.6 Tütün ve Tütün Mamulleri

Tütün solunum ve dolaşım sistemi yoluyla kolonik mukozaya kolayca ulaşabilen genetik ve epigenetik anormalliklere neden olabilecek zararlı birçok bileşik içermektedir (Keum ve Giovannucci, 2019). İçeriğinde bulunan başlıca kanserojenler, aromatik aminler, nitrozaminler, heterosiklik aminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlardır. Bu bileşikler, anormal DNA oluşumuna ve hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) konsantrasyonlarında artışa neden olarak oksidatif stres ve inflamatuvar yolların aktivasyonuna yol açabilmektedir. Tütün kullanımı sadece kolon kanseri riskini değil ayrıca kardiyovasküler hastalık, akciğer hastalığı ve diğer hastalıklara yakalanma riskini de ciddi şekilde arttırmaktadır (Sawicki vd., 2021).

2.1.5.7 Fiziksel Aktivite

Fiziksel olarak aktif bireyler için kolon kanseri gelişme riski %25 daha düşük görülmektedir. Düzenli ve hafif fiziksel egzersiz yapmak kardiyovasküler ve

gastrointestinal sistemlere olumlu etkiler sağlamakta, doku oksijenasyonunu iyileştirmekte, kan dolaşımını ve bazal metabolizma hızını arttırmaktadır. Bunun sonucunda ise kolon kanseri başta olmak üzere diğer çoğu hastalıkların gelişiminde arttırıcı etkisi olan vücut yağ kitlesi, insülin seviyesi ve direnci gelişimi ile Beden Kitle İndeksi (BKİ) gibi risk faktörlerini azaltmaktadır (Rawla vd., 2019). Fiziksel aktiviteyi arttırmak kolon kanseri gelişimi olasılığını azaltmak için önemli fayda sağlamaktadır (Padmanabhan vd., 2018).

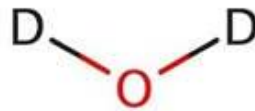
2.1.6 Tedavisi

Hastalığın tedavisinde genel olarak tercih edilen yaklaşım cerrahi müdahale ile tümörün ve metastazın çıkarılması olmaktadır. Ancak, cerrahi müdahale ile tümörün çıkarılmadığı durumlarda radyoterapi ve/veya kemoterapi yöntemleri de sıklıkla uygulanmaktadır (Messersmith, 2019; Xie vd., 2020).

2.2 Döteryum Oksit

2.2.1 Tanımı

Döteryum oksit (D_2O), hidrojenin kararlı iki izotopundan (protium ve döteryum) birisidir. Ağır su olarak da bilinir. D_2O normal sudan farklı aktiviteler göstermektedir. Atom kütlesi 2 olup, ilk defa 1932 yılında Nobel Ödüllü Harold Urey tarafından keşfedilmiştir. Yıldızlarda yüksek miktarlarda üretildiği düşünülen D_2O 'nun dünya su kaynaklarında eser miktarda (%0,0156) bulunmaktadır (Pirali vd., 2019; Jandova vd., 2021).



Şekil 2.1: D₂O Kimyasal Yapısı

Kaynak: M da S Mariano vd., 2017

2.2.2 Fizikokimyasal Özellikleri

Döteryum, hidrojen (H) ve hidrojenin diğer kararlı izotopu protiumda olduğu gibi, sadece tek bir protondan değil, aynı zamanda bir nötrondan da oluşmakta, oksijene (O) H₂O'daki H'den daha güçlü şekilde bağlanmaktadır. Bu durum, kovalent H–O bağlarının uzunluğunda ve aralarındaki açılarda farklılıklara sebep olmaktadır. Bu fark, D₂O'yu benzersiz kılan özelliklerinin ana kaynağını teşkil etmektedir (Wang vd., 2022; Ben Abu vd., 2021; Kselíková vd., 2019).

Tablo 2.1: D₂O ve H₂O'nun Fizikokimyasal Özellikleri

Özellikler	D ₂ O	H ₂ O
Molar kütle (g/mol)	20.03	18.02
Kaynama noktası (°C)	101.72	100
Erime noktası (°C)	3.82	0
20 °C'de yoğunluk	1.1056	0.9982
20 °C'de moleküler hacim	18.2	18.05
20 °C'de viskozite (cP)	1.25	1.005

Kaynak: Kselíková vd., 2019

D₂O, genel olarak H₂O ile aynı kimyasal özelliklere sahip olmakla birlikte, molar kütlesi, kaynama ve erime noktaları ile yoğunluğu açısından farklılaşmaktadır. Bu farklılıklar ise D₂O'nun metabolik (hipoglisemi, hipotermi, elektrokardiyografi, kas güçsüzlüğü ve hiperaktivite) ve diğer biyolojik sistemler (bakteriler, mavi-yeşil algler, mayalar, mantarlar ve deney hayvanları) üzerinde normal sudan farklı etkilere sahip olma potansiyelinin araştırmacıların ilgisini çekmesine yol açmıştır (Abilev vd., 2018; Zachleder, vd., 2018; Davies, 2020).

2.2.3 Kullanım Alanları

D₂O, 1940'lı yıllardan itibaren ABD Atom Enerjisi Komisyonu tarafından nükleer reaktörlerde nötron yavaşlatıcı işlevi sebebi ile artan oranda kullanılmaya başlanmıştır. Bu yoğun üretim ve kullanım 1990'lı yılların başlarına kadar devam etmiştir (Zachleder vd., 2018; Davies, 2020).

Nükleer amaçlı kullanım alanından sonra D₂O açısından farklı organizmalarda H'nin döteryum ile yer değiştirme mekanizmaları üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Özellikle, biyolojik ürünler (aşı vb.), tıp ve farmasötik (döteriye ilaçlar vb.) gibi alanlarda kullanımı yaygınlaştırmıştır (Zachleder vd., 2018). Benzer şekilde, insan ve hayvan metabolizması çalışmalarında kararlı bir izotop izleyicisi (Kselíková vd., 2019; Davies, 2020), radyoaktif olmaması sebebi ile Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) gibi yüksek çözünürlüklü tekniklerde etiketleme ile soğuk zincir kırılımı durumunda organ ve dokuların taşınması/korunması amaçlı kullanımı başlamıştır (Mosin ve Ignatov, 2015; Kselíková vd., 2019). Özellikle, döteryumlu ilaçlar, daha uzun yarı ömürleri olması, daha az sıklıkta dozlama, toksik metabolit oluşumunu azaltması ve yüksek stabilitesi gibi avantajlar sunmaktadır (Verma, 2021).

2.2.4 Döteryum Oksit ve Kanser Araştırmaları

D₂O, hücrelerin veya organizmaların morfolojisinin yanı sıra birçok fizyolojik süreci değiştirmektedir. D₂O ile gerçekleştirilen biyolojik deneylerde, civciv fibroblastları ve deniz kestanesi gibi organizmalarda hücre bölünmesinde gözle görülür gecikme olduğu gözlemlenmiştir (Abilev vd., 2019; Kselíková vd., 2019).

D₂O'nun insan sindirim organı malign hücre hatları, servikal karsinom (HeLa) hücre hattı üzerindeki etkisini araştıran *in vitro* çalışmalarda, döteryum uygulamasının tümör hücre hatlarının büyümesini doza ve zamana bağlı olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Kselíková vd., 2019).

%50 ve %100 D₂O konsantrasyonlarına maruz bırakılan deri kanseri (malign melanoma hücreleri - A375) üzerinde yapılan bir çalışma; D₂O'nun 24. saatteki hücre canlılığını önemli oranda azalttığını, 48. ile 72. saatler arasında canlı hücre kalmadığını, D₂O uygulamasının DNA sentezini engellediği ve hücreler üzerinde morfolojik değişimlere yol açtığı bildirilmiştir (Kleemann vd., 2020).

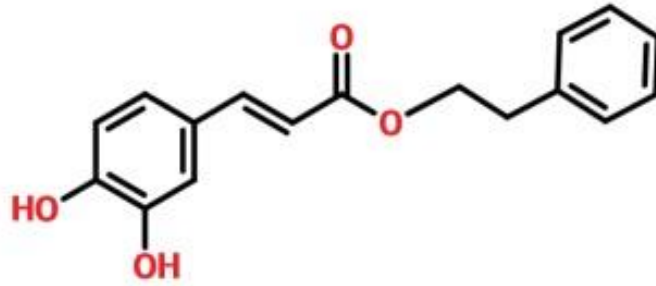
2.3 Kafeik Asit Fenetil Ester

2.3.1 Tanımı

Kafeik asit fenetil ester (KAFE), 1987 yılında propolisin bir bileşeni olarak tanımlanmış ve 1988 yılında Columbia Üniversitesi'nde sentezlenmiştir (Grunberger vd., 1988).

KAFE, esas olarak kozalaklı ağaçların kabuğunda ve bal arısı kovanlarından elde edilen propoliste bulunan doğal, hidrofobik ve polifenolik bir bileşiktir. Bu polifenolik ester bileşiği, kafeik asidin fenetil alkollerle reaksiyona sokulmasıyla laboratuvarında üretilebilmektedir. Kimyasal adı 2-feniletil (2E)-3-(3,4-dihidroksifenil) akrilat olmakla birlikte ayrıca feniletil kafeat veya fenetil kafeat olarak da isimlendirilmektedir. Kimyasal formülü ise $C_{17}H_{16}O_4$ 'tür (Pittalà vd., 2018; Sallam, 2021).

Kafeik asitin bir esteri olmasına rağmen, kafeik asitten daha iyi biyoyararlanımı ve stabilitesi olan KAFE çeşitli fizyolojik ve biyolojik çalışmalar için kullanım üstünlüğü ve kolaylığı da sağlamaktadır (Anjaly ve Tikou, 2018).



Şekil 2.2: KAFE'nin Kimyasal Yapısı

Kaynak: Yordanov, 2019

2.3.2 Kaynakları

2.3.2.1 Propolis

Propolis, kovanı savunmak için bal arıları tarafından oluşturulan bir maddedir. 'Arı tutkalı' olarak da bilinmekte olan Propolis, işçi arılar (*Apis mellifera L.*) tarafından yaşadıkları veya ziyaret ettikleri floradan (huş ağacı, kavak, çam,

kızılağaç, söğüt ve palmye gibi ağaç türlerinin yaprak ve kabuğu) toplanan reçineli bir malzemedir. Arılar, bu gibi bitkilerden topladıkları reçineli eksüdalari enzimleri ile harmanlayarak kovadaki çatlak ve boşlukları kapatmak için propolise dönüştürmektedirler (Bhargava vd., 2021).

Propolis eski dönemlerden beri antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antitümör ve immünomodülatör gibi terapötik faydaları ile kullanılmaktadır. Toksikite göstermemesi sayesinde geleneksel tıpta sıkça tercih edilmiştir. Bileşiminde alifatik asitler, esterler, aromatik asitler, yağ asitleri, karbonhidratlar, aldehitler, amino asitler, ketonlar, vitaminler ve inorganik maddeler olmak üzere 300'den fazla farklı bileşik tanımlanmıştır. Ancak kimyasal bileşimi arıların ziyaret ettikleri bitki kaynaklarının buldukları iklim ve çevre koşullarına göre değişiklikler gösterebilmektedir (Pittalà vd., 2018; Olgierd vd., 2021). Örneğin, Brezilya propolisinde KAFE bulunmazken, Çin propolisinde 15-29 mg/g düzeyinde bulunmaktadır (Anjaly ve Tikü, 2018; Bankova vd., 2018; Olgierd vd., 2021).

Propolis yeşil, kırmızı ve koyu kahverengi renklerde olabilmektedir. Renk çeşitliliği büyük ölçüde bitki kaynağına ve toplanma süresine bağlı olmakla birlikte sıklıkla koyu kahverengi en yaygın olan çeşittir (Kasote vd., 2017).

Propolis yedi farklı türe sınıflandırılmıştır (Kocot vd., 2018; Alday vd., 2019):

- I. Kavak (Avrupa, Çin, Yeni Zelanda, Kuzey Amerika ve Güney Amerika),
- II. Huş Ağacı (Rusya),
- III. Akdeniz (Sicilya, Yunanistan, Girit ve Malta),
- IV. Yeşil (Güneydoğu Brezilya),
- V. Kırmızı (Küba, Kuzeydoğu Brezilya ve Güneydoğu Meksika),
- VI. Clusia (Venezüella ve Küba),
- VII. Pasifik (Okinawa, Tayvan, Endonezya ve Hawaii).

2.3.3 Fizikokimyasal Özellikleri

KAFE doğal suda çözünmeyen hidrofobik bir polifenol bileşiktir. Ancak, etanol, metanol, aseton ve dimetil sülfoksit (DMSO)'te çözünebilmektedir. Beyaz, ince kristalli toz formunda bulunmaktadır. Anti-inflamatuvar, antioksidan ve anti-

tümör etkileri nedeniyle çok sayıda yararlı etkileri bulunmaktadır. Bu gibi üstün biyoaktif etkilerini molekül yapısındaki katekol halkası ve hidroksil gruplarından almaktadır (Silva ve Lopes, 2020; Taylor vd., 2022).

2.3.4 KAFE ve Kanser Araştırmaları

Araştırmalar KAFE'nin sağlıklı hücelere kıyasla kanser hücreleri için daha toksik olduğunu göstermektedir (Silva ve Lopes, 2020).

KAFE'nin anti-kanser etki mekanizması, apoptoz ve çeşitli protein kinazları, büyüme faktörlerini, transkripsiyon faktörlerini, hücre döngüsü proteinlerini ve diğer kanser ilerleme yollarındaki etkileri yoluyla açıklanmaktadır. KAFE, meme, prostat, akciğer, baş ve boyun gibi çeşitli insan kanser hücre hatlarının çoğalmasını baskılamaktadır. Aynı zamanda, kemopreventif ajan olarak, normal hücreleri kemoterapötik kanser ilaçlarının sitotoksik etkilerine karşı da korumaktadır (Marin vd., 2019; Lv vd., 2021; Olgierd vd., 2021).

2.3.4.1 KAFE ve Kolon Kanseri

Sari vd. (2020), KAFE'nin (0–100 μM) kolon kanser hücre hattı (RKO) canlılığını doza bağımlı bir şekilde azalttığı göstermiştir.

Budisan vd. (2019), KAFE'nin kolon kanseri hücre hatları RKO ve HCT-116 hücrelerinin proliferasyonunu, motilitesini ve invazyonunu inhibe ettiği ve gen ekspresyonundaki değişikliklerle birlikte apoptoz ve otofajiyi uyardığını bildirmiştir.

Tang vd. (2017), KAFE'nin (10-80 μM) kolon kanseri HT-29 ve HTC-116 hücrelerinde doza bağımlı şekilde hücre canlılığını inhibe ettiğini rapor etmiştir.

Wu vd. (2017), KAFE'nin kolon kanseri hücrelerinde (SW-480) 0, 6, 8 ve 10 $\mu\text{mol/L}$ dozlarının hücrelerin proliferasyonunda 48. saatte anlamlı bir azalmaya yol açtığını tespit etmiştir. Aynı çalışmaya göre hücrelerin proliferasyonunda en anlamlı ve yüksek düşüş 96. saatte 10 $\mu\text{mol/L}$ dozda görülmüştür.

Chiang vd. (2014), KAFE'nin farklı konsantrasyonlarının (0- 100 μM) insan kolon kanseri hücrelerinin (HCT-116 ve SW-480) proliferasyonunu dikkat çekici

biçimde baskıladığını, doza bağlı şekilde G0/G1 fazında hücre döngüsünü durdurduğunu ve siklin D1 proteini ile NF-κB'nin ekspresyonunu inhibe ettiğini belirlemiştir.

Wang vd. (2005), KAFE'nin (2,5-80 mg/L) 24 ve 96 saat aralıklar boyunca kolon kanseri HCT-116 hücrelerinin döngüsünde G0/G1 tutulumu ve apoptoz başlatıcı etkisi ile güçlü bir inhibitör davranışı sergilediğini göstermiştir.



ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Hücre Hatları

Çalışmada, yetişkin erkekten elde edilen kolon kanseri (HCT-116), insan nöroblastoma (SH-SY5Y) ve yetişkin insan derisinden elde edilen (HaCaT) hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarı hücre hattı koleksiyonundan temin edildi.

3.1.2 Kimyasal Maddeler ve Ticari Kitler

Çalışmada kullanılan deney malzemeleri:

T75 hücre kültürü flaskaları, serolojik pipetler (5, 10 ve 25 ml), filtreli steril pipet uçları (10, 200 ve 1000 µl), falkon tüpler (15 ve 50 ml), steril filtre (0,2 µm), pleyt (6 ve 96 kuyucuklu), eppendorf tüp (2 ml), Buzdolabı, Hemositometre lamı (Marien Feld, Lauda- Königshofen, Almanya), Ters ışık mikroskopu (LEICA DMi1, Weltzar, Almanya), Santrifüj cihazı (NUVE NF 800, Ankara, Türkiye), Biyogüvenlik Kabini (Mikrotest MGKK-120A2, İstanbul, Türkiye), İnkübatör Cihazı (NUVE EC 160, Ankara, Türkiye), Elisa Micropleyt okuyucu (BioTek 800 TS, Santa Clara, ABD), Flowsitometri Cihazı (Beckman Coulter CytoFLEX, ABD), cDNA cihazı (SimpliAmp Thermal Cyclers, Massachusetts, ABD), Real-Time PCR cihazı (BIO-RAD, Kaliforniya, ABD), Nanodrop spektrofotometri (BioSpec-nano, SHIMADZU, Japonya), RNA İzolasyon Kiti (PureLink 12183020, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), Anneksin Kiti (BioLegend 640914, San Diego, ABD), cDNA Kiti (Appliedbiosystems 01019730, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), Kristal Virole (Sigma-Aldrich 1003248082, St. Louis, MO, ABD), SYBR qPCR Kit (GeneMark QPSY01-25, Atlanta, ABD)

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco™ 11965092, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), Fetal Sığır Serum (FBS) (Gibco™ 10500, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), Penisilin, Streptomisin, Amfoterisin (PSA) (Capricorn Scientific AAS-B, Almanya), %0.25 Tripsin/EDTA (Multicell 325-043-EL, Kanada), Fosfat Tamponlu Salin (PBS) (HyClone, Cytiva, ABD), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), D₂O (99.9 Atom % D - Sigma Aldrich 151882-250G, Darmstadt, Almanya) ve KAFE (Sigma Aldrich 104594-70-9, St. Louis, MO, ABD) İstanbul piyasasından tedarik edilmiştir.

D₂O için atomik izin işlemi İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi tarafından hazırlanan yazı ile Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK) Nükleer Güvenlik Dairesi Başkanlığı'nın izin yetki belgesi ile satın alınmıştır.

3.2 Yöntem(ler)

3.2.1 Hücre Kültürü Koşulları ve Kimyasallar

HCT-116, SH-SY5Y ve HaCaT hücre hatları, T75 flasklarında, %10 FBS, %1 PSA ve 4,5 g/L D-glikoz içeren DMEM ortamında kültürlendi ve 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde tutuldu. Yeni büyüme ortamı sağlamak için hücrelerin büyüme ortamı düzenli olarak değiştirildi ve konfluent hale geldiklerinde pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

3.2.2 Hücrelerin Pasajlanması, Dondurulması ve Çözdürülmesi

Ayrı kriyo tüpler (2 ml) içinde dondurulmuş halde bulunan 1 ml'lik HCT-116, SH-SY5Y ve HaCaT hücre hatları çözdürülmek üzere -80 °C'den alındı ve 37 °C su banyosunda buz kristalleri eriyene kadar protokole uygun olarak çözdürüldü. Çözdürülen hücreler, ayrı ayrı 5 ml medya içeren 15 ml'lik falkon tüpler içerisine alındı ve 1.300 rpm/5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonlardaki süpernatant kısım atıldı ve pipet yardımıyla pelletler 1 ml medya ile çözdürüldü. Çözdürülen hücre süspansiyonları 15 ml medya içeren ayrı T75 flasklarına alındı

ve yeterli büyümeyi sağlayabilmeleri için 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Flaskların içindeki medya rutin olarak değiştirildi ve konfluent hale geldiklerinde pasajlama işlemi gerçekleştirildi (Demir, 2022).

Pasajlama işlemi ayrı T75 flasklarında kültürlenmiş HCT-116, SH-SY5Y ve HaCaT hücre hatları için tekrarlandı. Hücrelerin pasajlanması gerektiğinde ilk olarak T75 flaskında bulunan medya serolojik pipet yardımıyla çekildi. Flask, FBS kalıntılarından kurtulmak için yüzeyi kaplayacak kadar (3 ml) PBS ile yıkandı ve yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra PBS çekildi. Ardından hücreleri yüzeyden kaldırmak için 3 ml Tripsin/EDTA çözeltisi eklenerek 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 2 dk inkübe edildi. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra flaska eklenen Tripsin/EDTA kadar (1:1) medya eklenerek tripsinin inhibe edilmesi sağlandı. İnhibisyonun ardından flask içindeki süspansiyon 15 ml'lik falkona alınarak 1.300 rpm/5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından falkon içerisindeki süpernatant atılarak pellet 1 ml medya ile çözdürüldü ve çözdürülen pellet 15 ml medya içeren T75 flaskına alınarak 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı (Yılmaz vd., 2018).

HCT-116, SH-SY5Y ve HaCaT hücre hatlarının dondurulma işlemi %10 Dimetil sülfoksit (DMSO) ve %90 medya içeren 1 ml'lik dondurma solüsyonu ile kriyo tüpler içinde gerçekleştirildi. Kriyo tüpler ilk olarak -20 °C'de 1 saat tutulduktan sonra -80 °C'de saklamaya alındı (Keskiner, 2021).

3.2.3 Hücre Canlılık Testi

Hücrelerin canlılığı MTS testi ile belirlendi. MTS testi; tetrazolyum tuzu ile yapılan bir test olup, canlı hücrelerin aktif mitokondrisi tarafından kırılan tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmesi ve formazan yapıya dönüşmesi esasına dayanmaktadır. Formazan yapıya dönüşüm sırasında renk değişikliği gözlemlenmektedir (Erkekoğlu ve Baydar, 2020; Kamiloğlu vd., 2020).

Hücre canlılık testi (MTS) için ilk olarak doz uygulaması yapılmak üzere hücrelerin 96 kuyucuklu pleytlere ekimi gerçekleştirildi. Sırasıyla; HCT-116 hücre hattına D₂O, H₂O, KAFE ve D₂O + KAFE, SH-SY5Y hücre hattına D₂O

ve HaCaT hücre hattına ise D₂O ve H₂O doz uygulaması yapıldı. SH-SY5Y hücre hattı D₂O'nun farklı kanser hücre hattındaki etkisini gözlemek adına kullanıldı. HaCaT hücre hattı ise D₂O'nun kanser hücrelerine ek olarak sağlıklı hücreyi etkileme ve öldürme özelliğini gözlemek adına kullanıldı. HCT-116 ve HaCaT hücre hatlarına H₂O uygulaması D₂O'nun etkisini gözlemek ve uygun dozu ayarlayabilmek için gerçekleştirildi.

Ekim işlemi ayrı T75 flasklarında kültürlenmiş HCT-116, SH-SY5Y ve HaCaT hücre hatları için aynı adımlar izlenerek uygulandı. Ekim aşamasında ilk olarak T75 flaskında bulunan medya çekildi ve flaska yüzeyi kaplayacak kadar PBS (3 ml) eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından PBS çekilerek hücrelerin yüzeyden kalkması için 3 ml Tripsin/EDTA eklendi ve 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 2 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tripsini inhibe etmek için 3 ml medya flaska eklendi ve süspansiyon 15 ml'lik falkona alındı. Hücre sayımı yapılmak üzere falkon içerisindeki hücre süspansiyonundan 10 mikrolitre (µl) alındı ve hemositometreye konularak ters ışık mikroskopunda sayımı yapıldı (Demir, 2022; Mercan, 2022).

Hücre sayımı için hemositometre lamının her biri 16 küçük kare içeren 4 farklı alanı sayılarak ortalaması alındı. Dışta kalmış olan ve çizgi üzerine gelen hücreler sayıma dahil edilmedi. Hücre sayısı/ml= Ortalama sayım değeri * seyreltme faktörü * 10⁴ formülü ile hesaplandı (Mercan, 2022).

Sayımın ardından falkonda bulunan hücre süspansiyonu 1.300 rpm/5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjün sonrası falkonda bulunan süpernatant kısım atılarak pellet medya ile her µl'de 1.000 hücre olacak şekilde çözdürüldü. Çözdürülen hücreler doz ile muamele edilmek üzere her bir kuyucuğa 5.000 hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu pleytlere ekildi. Ekim işleminin ardından hücreler 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kuyucuklara tutunması için 24 saat inkübe edildi (Mercan, 2022).

24 saat sonra hücrelere doz uygulaması yapıldı. Doz uygulaması HCT-116 hücre hattı için D₂O, H₂O, KAFE ve KAFE+ D₂O; SH-SY5Y hücre hattı için D₂O ve HaCaT hücre hattı için D₂O ve H₂O olarak gerçekleştirildi. Hücre hatlarına uygulanan D₂O ve H₂O dozları; Kontrol, %10, %20, %30, %40 ve %50; KAFE

için; Kontrol, 5 µM, 10 µM ve 40 µM ve de D₂O + KAFE için; %30 D₂O + 10 µM KAFE olarak gerçekleştirildi.

Doz uygulaması için ilk olarak kuyucuklarda bulunan medya aspire edildi. Daha sonra ajan + medya karışımı çoklu pipet yardımıyla kuyucuklara eklendi, ardından hücreler 24. saatteki canlılıklarını ölçmek üzere 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda MTS testi uygulandı.

Hücre canlılığının analizi için ilk olarak -20 °C'de alikot halinde saklanan MTS çözdürüldü. Her bir kuyucuğa 100 µl DPBS + %4,5 glikoz ve 10 µl MTS eklenecek miktarda MTS solüsyonu hazırlandı. 24 saat inkübe edilen pleytler çıkarıldı ve kuyucuklarına (daha önce uygulanan medya ve ajan içeren solüsyon aspire edilerek) çoklu pipet yardımı ile 110 µl MTS solüsyonu eklendi. Pleytler karanlık ortamda 37 °C'de %5 CO₂ inkübatörde 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde pleytler Elisa mikroplate okuyucuya yerleştirilerek 490 nm dalgaboyunda okumaları alındı. Okuma sonuçları Microsoft Excel programına aktarıldı ve ortalama, standart sapma, normalize ortalama ve normalize standart sapma değerleri hesaplandı (Abdik, 2022; Kabakov ve Gabai, 2018).

3.2.4 Anneksin

Anneksin uygulaması için ilk olarak HCT-116 hücre hattının 6 kuyucuklu pleyte ekimi gerçekleştirildi. Ekim işlemi için T75 flaskında bulunan medya çekildi ve 3 ml PBS eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işleminin ardından PBS çekildi, hücrelerin yüzeyden kalkması için 3 ml Tripsin/EDTA eklendi ve 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 2 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tripsini inhibe etmek için 3 ml medya flaska eklendi ve süspansiyon 15 ml'lik falkona alındı. Sayım işlemi için falkon içerisindeki hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve hemositometreye konularak ters ışık mikroskopunda sayımı yapıldı. Hücre sayısı/ml= Ortalama hücre sayısı * seyreltme faktörü * 10⁴ formülü kullanarak belirlendi. Sayımın ardından falkonda bulunan hücre süspansiyonu 1.300 rpm/5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısım atılarak, pellet medya ile her µl'de 1.000 hücre olacak şekilde çözdürüldü. Daha

sonra her kuyucuğa 2 ml medya ve 150.000 hücre ekimi yapıldı. Ardından hücreler doz uygulaması yapılmak üzere 24 saat inkübatörde bekletildi.

24 saatin ardından pleytlerdeki hücreler Kontrol, %30 D₂O, 10 µM KAFE ve %30 D₂O + 10 µM KAFE ile muamele edildi. Pleytler tekrar 24 saat inkübatörde bekletildi ve 24 saat sonunda anneksin uygulaması yapıldı.

Anneksin uygulaması, BioLegend Anneksin Kiti kullanılarak gerçekleştirildi (Zheng vd., 2017). Uygulama için kuyucuklarda bulunan ajan + medya çekilerek 15 ml'lik falkona alındı. Daha sonra kuyucuklar 500 µl PBS ile yıkandı ve PBS çekilerek daha önce medya + ajan eklediğimiz falkona ilave edildi. Hücrelerin kuyucuk yüzeyinden kalkması için 500 µl tripsin eklendi ve 3 dk boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. Hücreler yüzeyden kalkınca tripsini inhibe etmek için 1.000 µl medya eklendi ve süspansiyon çekilerek falkona alındı. Falkonlar 1.300 rpm/5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonlardaki süpernatant atıldı. Pellet bulunan falkona 500 µl staining buffer eklendi ve falkonlar tekrar 1.300 rpm/5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonlardaki süpernatant atıldı ve pellet üzerine kontrol grubuna 200 µl diğer doz gruplarına 100 µl binding buffer eklendi. Binding buffer eklendikten sonra falkondaki süspansiyon flowsitometride okutulmak üzere flow tüplere aktarıldı. Aktarım yapıldıktan sonra her tüpe 3 µl FITC boyası eklendi ve 15 dk boyunca karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her tüpe 3 µl PI boyası ve 400 µl binding buffer eklendi ve flowsitometri cihazında okumaları alındı.

3.2.5 Gen Ekspresyonu Analizi

Gen ekspresyon analizi için ilk olarak HCT-116 hücreleri 6 kuyucuklu pleytlere her kuyucuğa 150.000 hücre gelecek şekilde ekildi ve 24 sa boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde hücrelerin kuyucuklara tutunması için bekletildi. 24 sa sonra hücreler Kontrol, %30 D₂O, 10 µM KAFE ve %30 D₂O + 10 µM KAFE ile muamele edildi. Doz ile muamele edilen hücreler 24 sa boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. İnkübasyon bitiminde real time PCR analizi için pellet toplandı.

Pellet toplamak için öncelikle kuyucuklarda bulunan ajan + medya çekilerek 15 ml'lik falkona alındı. Daha sonra kuyucuklar 500 µl PBS ile yıkandı ve PBS

çekilerek daha önce medya + ajan eklediğimiz falkona ilave edildi. Hücrelerin kuyucuk yüzeyinden kalkması için 500 µl tripsin eklendi ve 3 dk boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. Hücreler yüzeyden kalkınca tripsini inhibe etmek için 1.000 µl medya eklendi ve süspansiyon çekilerek falkona alındı. Falkonlar 1.300 rpm/5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonlardaki süpernatant atıldı. Daha sonra içinde pellet bulunan falkonlar -20 °C'ye kaldırıldı. Hücrelerin RNA izolasyonu PureLink RNA İzolasyon Kiti kullanılarak gerçekleştirildi (Jin vd., 2017; Eldohaji vd., 2021). Kite belirtilen prosedüre uygun olarak izolasyon işlemi gerçekleştirildi. İlk olarak -20 °C'ye kaldırdığımız falkonlardaki pellet üzerine 600 µl Lysis Buffer ve her 1 ml Lysis Buffer için 10 µl 2-merkaptoetanol içeren karışım eklendi ve 2 ml'lik eppendorf tüplere alındı. Tüpler lizat oluşana kadar vorteks edildi. Ardından tüpler 10.000 rpm/2 dk santrifüj edildi. Daha sonra hücre homojenizasyonu kadar (600 µl) %70 etanol eklendi ve tüpler vorteks edildi. Vorteks işleminin ardından eppendorfta bulunan homojenizattan 700 µl alınarak toplama tüpüne aktarıldı ve toplama tüpleri 10.000 rpm/2 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün altındaki sıvı atıldı ve toplama tüplerine eppendorfta kalan 500 µl'lik hücre homojenizasyonu eklendi ve tekrar 10.000 rpm/2 dk boyunca santrifüj edildi ve santrifüj sonrası tüpün altında kalan sıvı atıldı. Daha sonra tüplere 700 µl wash buffer I eklendi ve tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün altındaki süpernatant atıldı ve kartuş yeni toplama tüpüne yerleştirildi. Tüpe 500 µl wash buffer II eklendi ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün altındaki süpernatant atıldı ve tekrar 500 µl wash buffer II eklenerek tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve tüpler kuru şekilde tekrar 10.000 rpm/2 dk boyunca santrifüj edildi. Daha sonra kartuş kısmı 1,5 ml'lik eppendorf tüpe alındı ve üzerine 50 µl RNase-free water eklendi. 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tekrar 10.000 rpm/2 dk boyunca santrifüj edildi. Daha sonra örneklerin nanodrop spektrofotometri ile okumaları alındı. Okuma alındıktan sonra izole edilen RNA'lerden cDNA sentezi gerçekleştirildi.

İzole edilen RNA'lerden cDNA sentezi kite belirtilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirildi (Park vd., 2022). İlk olarak her doz grubu için ayrı 1,5 ml eppendorf tüplerde RT buffer, dNTP mix, random primer, reverse transkriptaz ve nükleaz free water içeren 10 µl'lik miks hazırlandı. Miks hazırlandıktan sonra

RNA izolasyonundan elde ettiğimiz RNA örneklerine göre gerekli hesaplamalar yapılarak her gruptan eşit miktarda RNA örnekleri alındı. Alınan RNA örnekleri RNase free water ile 10 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan 10 µl'lik RNA örnekleri daha önce miks eklediğimiz ependorf tüplere aktarıldı. Daha sonra örnekler cDNA sentezinin gerçekleşmesi için SimpliAmp Thermal Cycler cihazına konuldu.

Real-time PCR için ilk olarak kullanılacak primerlere göre pleytin dizaynı yapıldı. Pleytin her kuyucuğuna primere özel 7,5 µl miks ve 2,5 µl örnek eklendi. Kullanılan primerler AKT, NF-κB, CCND1, p16, BAX, p53 ve p21 Ek-Im Ltd. Sti tarafından dizayn edildi (Cui vd., 2021; Shi vd., 2015; Luo vd., 2017; Radpour vd., 2011; Jiang vd., 2022; Liang vd., 2019; Aziz vd., 2019). Örnekler; Kontrol, %30 D₂O, 10 µM KAFE ve %30 D₂O + 10 µM KAFE'idi. Kullanılan miks ise her primere özel olarak; SYBR green miks her bir kuyucuğa 5 µl, Forward primer 0,5 µl, Reverse primer 0,5 µl gelecek şekilde ayrı ependorf tüplerde hazırlandı. Örnekler 2.5 µl olarak dağıtılacağı için hazırlanan primer miksinde her kuyucuğa 1,5 µl distile su (dH₂O) gelecek şekilde dH₂O eklenerek her kuyucuğa gelen karışım 10 µl'ye tamamlandı. Miks hazırlandıktan sonra PCR pleytinin her kuyucuğuna 7,5 µl her primere özel miksi ve 2,5 µl örnek dağıtıldı. Her kuyucuğa ekim gerçekleştikten sonra örneklerin Bio-Rad real-time PCR cihazında okumaları alındı. Amplifikasyon, 95 °C'de 3 dk, 95 °C'de 10 saniye ve 59 °C'de 10 saniye ve 72 °C'de 20 saniyelik 39 döngü ile gerçekleştirildi. SYBR Green Mix ile çalışıldığı için FAM kanalından okuma alındı. Analiz sonuçları, GAPDH 'housekeeping geni" referans alınarak standardize edildi (Craig-Mueller vd., 2020).

Tablo 3.1: Primer Dizilimleri

Primer	Dizilimi	T _m (°C)	bp
AKT (f)	AGCGACGTGGCTATTGTGAA	51.78	20
AKT (r)	CACGTTGGTCCACATCCTG	53.25	19
NF-κB (f)	AGCACAGATACCACCAAGAC	51.78	20
NF-κB (r)	TGGTCCCGTGAAATACACCT	51.78	20
CCND1 (f)	GCGGAGGAGAACAAACAGAT	55	92
CCND1 (r)	GAGGGCGGATTGGAAATGA	55.1	92
p16 (f)	AATTAGACACCTGGGGCTTG	54.9	582
p16 (r)	AGGGCGATAGGGAGACTCAG	58	582
BAX (f)	AAGAAGCTGAGCGAGTGTCT	55.45	236
BAX (r)	GTTCTGATCAGTTCCGGCAC	55.45	236
p53 (f)	GCCCCTCCTCAGCATCTTAT	56.45	246
p53 (r)	AAAGCTGTTCCGTCCCAGTA	56.45	246
p21 (f)	GCTTCATGCCAGCTACTTCC	51.8	173
p21 (r)	CCCTTCAAAGTGCCATCTGT	50.9	173
GAPDH (f)	ACACCCACTCCTCCACCTTT	56.5	276
GAPDH (r)	TACTCCTTGGAGGCCATGTG	56.7	276

3.2.6 Koloni Oluşturma

Koloni oluşturma deneyi için HCT-116 hücreleri, 6 kuyucuklu pleytlerin her kuyucuğuna 300 hücre gelecek şekilde ekildi. Ekim işlemi için ilk olarak T75 flaskında bulunan medya çekildi. Flaska 3 ml PBS eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işleminin ardından PBS çekildi ve hücrelerin yüzeyden kalkması için 3 ml Tripsin/EDTA eklendi. Ardından 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 2 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tripsini inhibe etmek için 3 ml medya flaska eklendi ve süspansiyon 15 ml'lik falkona alındı. Sayım işlemi için falkon içerisindeki hücre süspansiyonundan 10 µl hemositometreye konularak ters ışık mikroskopunda sayımı yapıldı. Hücre sayısı/ml= Ortalama hücre sayısı * seyreltme faktörü * 10⁴ formülü kullanarak belirlendi. Sayımın ardından falkonda bulunan hücre süspansiyonu 1.300 rpm/5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı atılarak pellet medya ile

her μl 'de 1.000 hücre olacak şekilde çözdürüldü. Ayrı bir falkon tüpte medya + hücre süspansiyonu hazırlanarak pleytlerin kuyucuklarına 300 hücre gelecek şekilde 2 ml medya + hücre süspansiyonu dağıtıldı. Ekimi yapılan hücreler yüzeye tutunması için $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından hücrelere doz uygulaması gerçekleştirildi. Kullanılan dozlar; Kontrol, %30 D_2O , $10\ \mu\text{M}$ KAFE ve %30 D_2O + $10\ \mu\text{M}$ KAFE olarak seçildi. Doz uygulaması yapıldıktan sonra hücreler 14 gün boyunca $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki süspansiyon aspire edildi ve her kuyucuğa 600 μl %100 methanol eklenerek $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 5 dk, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk bekletildi. Ardından kuyucuklardaki methanol çekilerek her kuyucuğa 600 μl kristal viole boyası eklendi ve 5 dk bekletildi. Ardından boya çekildi ve kuyucuklar 600 μl distile su ile yıkandı ve 2 dk boyunca bekletildi ve ters ışık mikroskobunda incelenerek görüntü alındı (Chang vd., 2019; Liu vd., 2020).

3.2.7 İstatistiksel Hesaplamalar

Hedef 7 adet gene ait %30 D_2O , $10\ \mu\text{M}$ KAFE ve %30 D_2O + $10\ \mu\text{M}$ KAFE doz uygulamalarındaki gen ekspresyonu bulguları değişkenleri arasındaki ilişkinin düzeyi parametrik yöntem olan Pearson Korelasyon Analizi ile istatistiksel olarak test edilmiştir ($p < 0.05$) (George ve Mallery, 2016). İstatistik analizler için SPSS 20 (IBM Corporation, NY, ABD) paket programı kullanılmıştır.

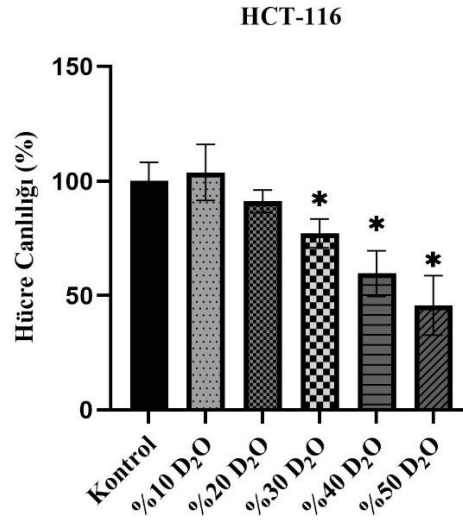
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR

4.1 Hücre Canlılık Testi (MTS) Bulguları

4.1.1 HCT-116 Hücre Hattı - D₂O MTS Testi Bulguları

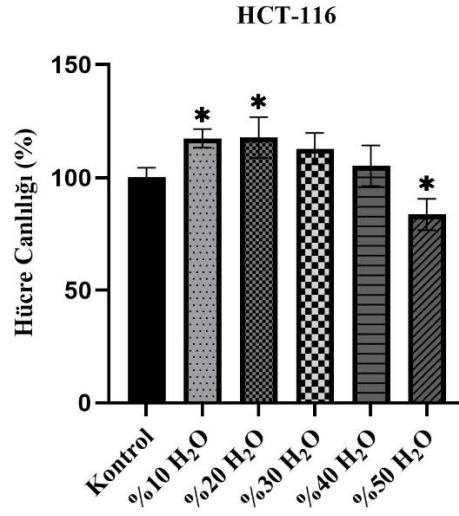
Çalışmamızda, %10 ve %20 D₂O uygulaması 24. saatte HCT-116 hücre hattının hücre canlılığını anlamlı olarak etkilememiştir. Bununla birlikte %30, %40 ve %50 D₂O uygulaması HCT-116 hücre hattının hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: HCT-116 Hücre Hattı - D₂O MTS Testi Bulguları

4.1.2 HCT-116 Hücre Hattı - H₂O MTS Testi Bulguları

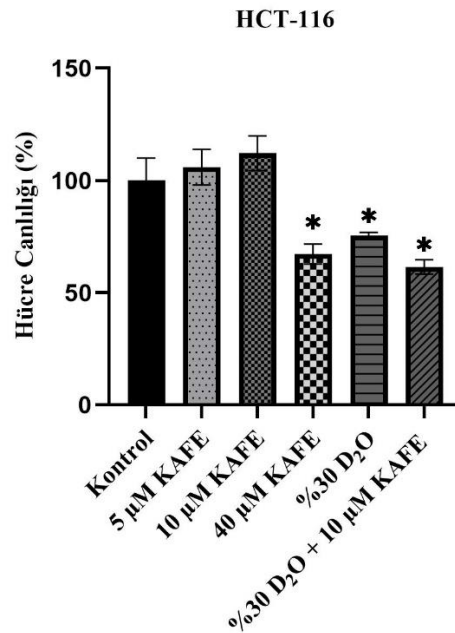
Çalışmamızda, %10 ve %20 H₂O uygulamaları 24. saatteki HCT-116 hücre hattının hücre canlılığını anlamlı olarak arttırmıştır. Bununla birlikte %50 H₂O uygulaması HCT-116 hücre hattının hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: HCT-116 Hücre Hattı - H₂O MTS Testi Bulguları

4.1.3 HCT-116 Hücre Hattı - KAFE ve D₂O MTS Testi Bulguları

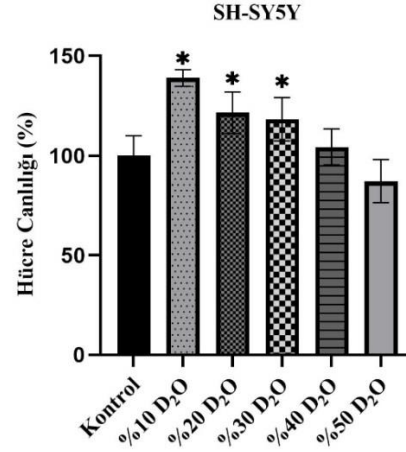
Çalışmamızda, 5 ve 10 μ M KAFE uygulaması 24. saatteki HCT-116 hücre hattının hücre canlılığını anlamlı olarak etkilememiştir. Bununla birlikte 40 μ M KAFE, %30 D₂O ve %30 D₂O + 10 μ M KAFE uygulaması hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: HCT-116 Hücre Hattı - KAFE ve D₂O MTS Testi Bulguları

4.1.4 SH-SY5Y Hücre Hattı-D₂O MTS Testi Bulguları

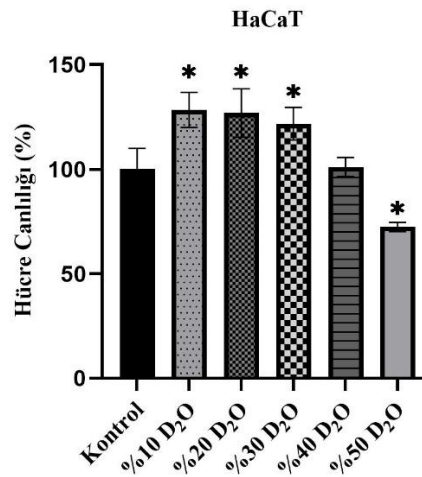
Çalışmamızda, %10, %20 ve %30 D₂O uygulaması 24. saatte SH-SY5Y hücre hattının hücre canlılığını anlamlı olarak arttırmıştır. Bununla birlikte %40 ve %50 D₂O uygulamalarının hücre canlılığına anlamlı etkisi olmamıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: SH-SY5Y Hücre Hattı - D₂O MTS Testi Bulguları

4.1.5 HaCaT Hücre Hattı - D₂O MTS Testi Bulguları

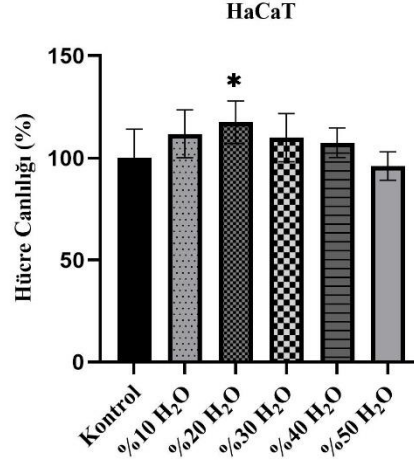
Çalışmamızda, %10, %20 ve %30 D₂O uygulaması 24. saatteki HaCaT hücre hattının hücre canlılığını anlamlı olarak arttırmıştır. Bununla birlikte %50 D₂O uygulaması hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: HaCaT Hücre Hattı - D₂O MTS Testi Bulguları

4.1.6 HaCaT Hücre Hattı - H₂O MTS Testi Bulguları

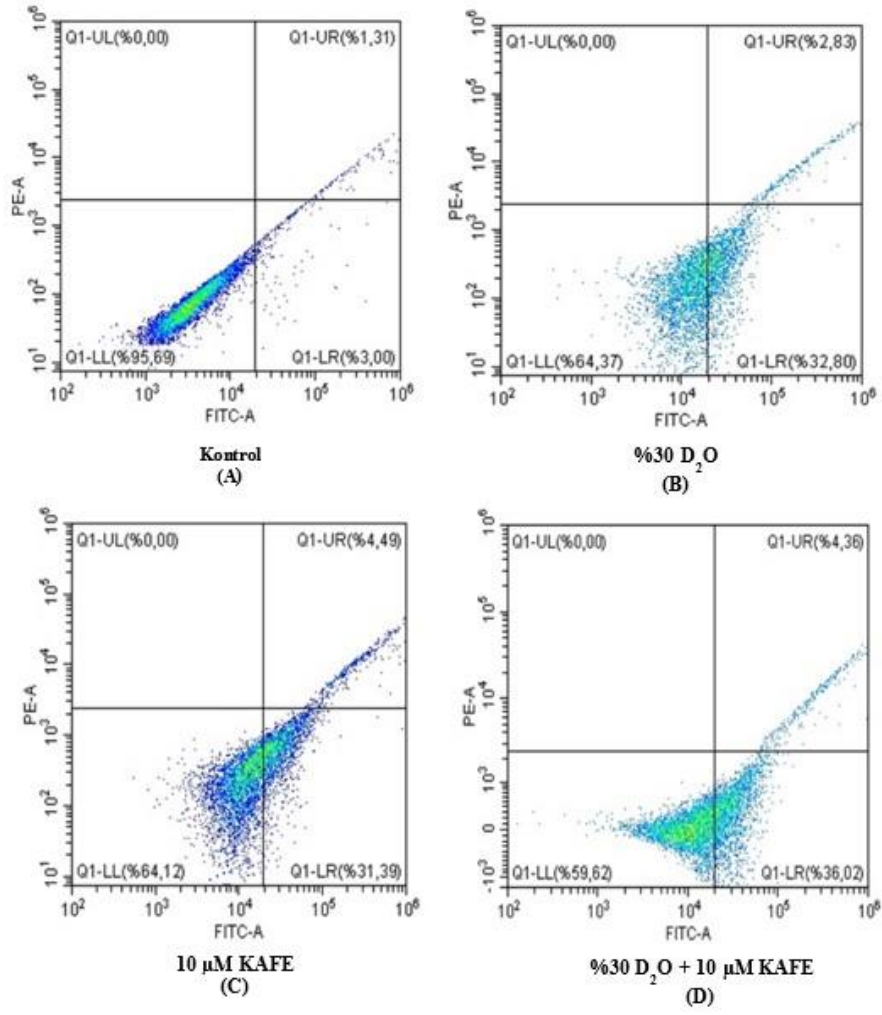
Çalışmamızda, %20 H₂O uygulaması 24. saatteki HaCaT hücre hattının hücre canlılığını anlamlı olarak arttırmıştır. Bununla birlikte %10, %30, %40 ve %50 H₂O uygulamaları HaCaT hücre hattının hücre canlılığına anlamlı etkisi olmamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: HaCaT Hücre Hattı - H₂O MTS Testi Bulguları

4.2 Anneksin Bulguları

HCT-116 hücre hattında kontrol grubuna (Şekil 4.7.A) kıyasla %30 D₂O (Şekil 4.7.B), 10 µM KAFE (Şekil 4.7.C) ve %30 D₂O + 10 µM KAFE (Şekil 4.7.D) uygulama sonrası anneksin bulguları Şekil 4.7’de gösterilmektedir.

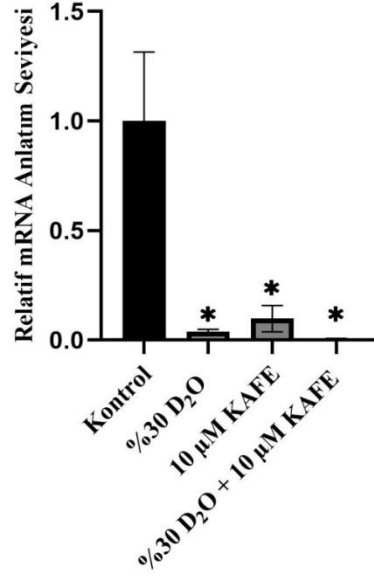


Şekil 4.7: Anneksin Bulguları

4.3 Gen Ekspresyon Bulguları

4.3.1 AKT Gen Ekspresyon Bulguları

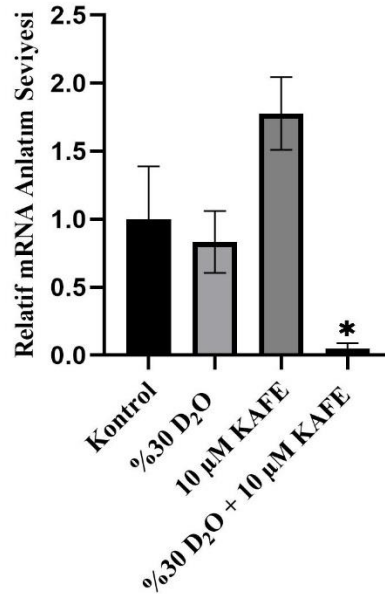
Çalışmamızda, %30 D₂O, 10 μM KAFE ve %30 D₂O + 10 μM KAFE uygulamaları AKT geninin ekspresyon düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: AKT Gen Ekspresyon Bulguları

4.3.2 NF-κB Gen Ekspresyon Bulguları

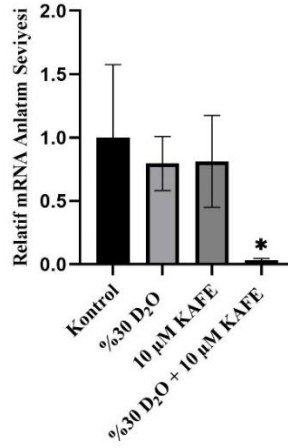
Çalışmamızda, %30 D₂O ve 10 µM KAFE uygulamaları NF-κB geninin ekspresyon düzeyine anlamlı bir etkisi bulunmazken %30 D₂O + 10 µM KAFE uygulaması NF-κB geninin ekspresyon düzeyini anlamlı olarak azaltmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: NF- κB Gen Ekspresyon Bulguları

4.3.3 CCND1 Gen Ekspresyon Bulguları

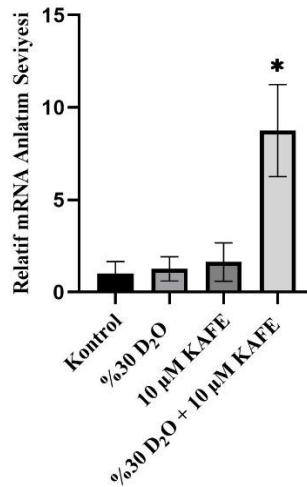
Çalışmamızda, %30 D₂O ve 10 µM KAFE uygulamaları CCND1 geninin ekspresyon düzeyine anlamlı bir etkisi bulunmazken %30 D₂O + 10 µM KAFE uygulaması CCND1 geninin ekspresyon düzeyini anlamlı olarak azaltmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: CCND1 Gen Ekspresyon Bulguları

4.3.4 p16 Gen Ekspresyon Bulguları

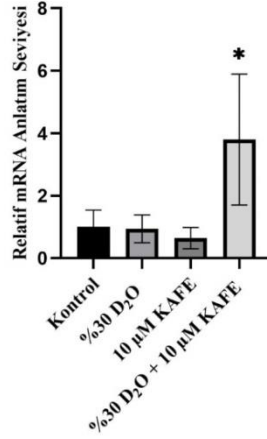
Çalışmamızda, %30 D₂O ve 10 µM KAFE uygulamaları p16 geninin ekspresyon düzeyine anlamlı bir etkisi bulunmazken %30 D₂O + 10 µM KAFE uygulaması p16 geninin ekspresyon düzeyini anlamlı olarak arttırmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: p16 Gen Ekspresyon Bulguları

4.3.5 BAX Gen Ekspresyon Bulguları

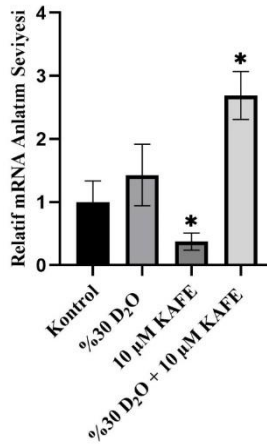
Çalışmamızda, %30 D₂O ve 10 µM KAFE uygulamaları BAX geninin ekspresyon düzeyine anlamlı bir etkisi bulunmazken %30 D₂O + 10 µM KAFE uygulaması BAX geninin ekspresyon düzeyini anlamlı olarak arttırmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: BAX Gen Ekspresyon Bulguları

4.3.6 p53 Gen Ekspresyon Bulguları

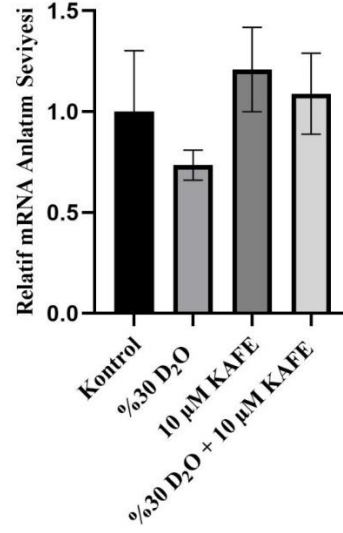
Çalışmamızda, 10 µM KAFE p53 geninin ekspresyon düzeyini azaltmıştır. Bununla birlikte %30 D₂O uygulaması p53 geninin ekspresyon düzeyine anlamlı bir etkisi bulunmazken %30 D₂O + 10 µM KAFE uygulaması p53 geninin ekspresyon düzeyini anlamlı olarak arttırmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: p53 Gen Ekspresyon Bulguları

4.3.7 p21 Gen Ekspresyon Bulguları

Çalışmamızda, %30 D₂O, 10 µM KAFE ve %30 D₂O + 10 µM KAFE uygulamaları p21 geninin ekspresyon düzeyine anlamlı bir etkisi olmamıştır (Şekil 4.14).



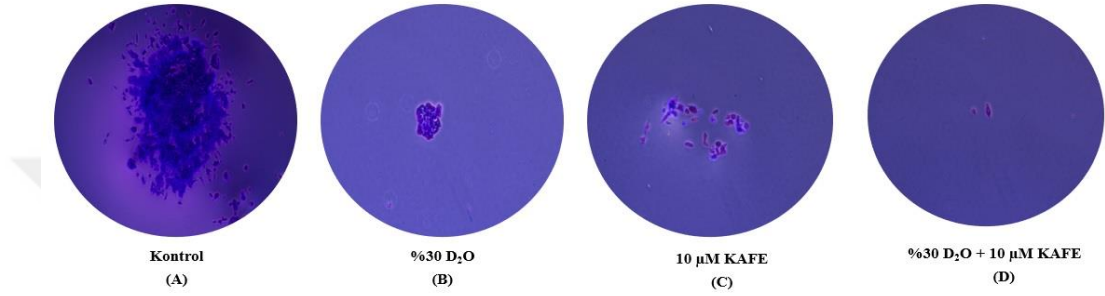
Şekil 4.14: p21 Gen Ekspresyon Bulguları

Tablo 4.1: Gen Ekspresyon Bulguları

Primerler	Örnekler							
	Kontrol		% 30 D ₂ O		10 µM KAFE		%30 D ₂ O + 10 µM KAFE	
	Eksp.	Eksp. SEM	Eksp.	Eksp. SEM	Eksp.	Eksp. SEM	Eksp.	Eksp. SEM
AKT	1	0.31492	0.03751	0.0123	0.09767	0.06001	0.00597	0.00273
NF-κB	1	0.38791	0.83242	0.22621	1.778	0.26781	0.04948	0.03892
CCND1	1	0.57534	0.79563	0.21276	0.8126	0.36204	0.03198	0.01472
p16	1	0.65427	1.26491	0.65772	1.63005	1.03305	8.75424	2.49212
BAX	1	0.54133	0.93845	0.44505	0.64072	0.33942	3.80247	2.09654
p53	1	0.33552	1.42979	0.48885	0.37453	0.13453	2.68734	0.38035
p21	1	0.30143	0.73447	0.07434	1.20863	0.20901	1.08871	0.20088

4.4 Koloni Oluşturma Bulguları

Çalışmamızda koloni oluşturma bulgularına göre kontrol grubuna (Şekil 4.15.A) kıyasla %30 D₂O (Şekil 4.15.B) ve 10 µM KAFE (Şekil 4.15.C) uygulamasının HCT-116 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerini gözle görülür şekilde inhibe ettiği ve bu inhibisyonunun iki bileşiğin birlikte uygulanması (Şekil 4.15.D) ile daha da artarak HCT-116 hücrelerinin koloni oluşturmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.15: HCT-116 Koloni Oluşturma Bulguları

4.5 İstatistik Analiz Bulguları

Pearson korelasyon katsayısı, iki değişken arasında aynı yönlü bir ilişki varsa 0 ile 1 arasında, ters yönlü bir ilişki varsa -1 ile 0 arasında değerler alır. Nokta çift serili ilişki katsayısının değeri ne kadar yüksek ise, iki değişken arasındaki ilişki de o kadar kuvvetli anlamına gelmektedir (George ve Mallery, 2016).

Hedef yedi adet genin %30 D₂O, 10 µM KAFE ve %30 D₂O + 10 µM KAFE doz uygulamalarına bağlı olarak ekspresyon düzeyleri arasında aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur;

- %30 D₂O ve 10 µM KAFE doz uygulamalarında hedef genlerin ekspresyon düzeyleri arasında pozitif yönlü zayıf korelasyon olduğu görülmüştür (R=0.3428, p=0.2302>0.05).
- %30 D₂O ve %30 D₂O + 10 µM KAFE doz uygulamalarında hedef genlerin ekspresyon düzeyleri arasında pozitif yönlü yüksek korelasyon bulunduğu tespit edilmiştir (R=0.6097, p=0.0216<0.05).

- 10 μM KAFE ve %30 D_2O + 10 μM KAFE doz uygulamalarında hedef genlerin ekspresyon düzeyleri arasında pozitif yönlü güçlü korelasyon olduğu belirlenmiştir ($R=1.0000$, $p=0.00001<0.05$).



BEŞİNCİ BÖLÜM

DEĞERLENDİRME VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, D₂O ve KAFE'nin kombine kullanımının kolon kanseri hücre hattına karşı terapötik potansiyeli *in vitro* araştırılmıştır. *In vitro* MTS bulgularına göre, (%30 D₂O + 10 µM KAFE) kombine uygulamasının HCT-116 hattında hücre canlılığını kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalttığı kaydedilmiştir. Gen ekspresyonu bulgularında ise, D₂O ve KAFE'nin kombine kullanımının AKT, NF-κB ve CCND1 genlerinin ekspresyon düzeylerini azalttığı, p16, BAX ve p53 genlerinin ekspresyon düzeylerini yükselttiği ve p21 geninin ekspresyon seviyesini etkilemediği görülmüştür.

Literatür büyüme inhibitör etkileri nedeniyle, D₂O ve KAFE'nin tümör tedavisinde etkili olabilecek bileşikler olduğunu bildirmektedir. Kolon kanseri ise dünya çapında teşhisi en sık konulan üçüncü kanser türünü oluşturmaktadır ve bu insidansın 2035 yılında 2,5 milyon yeni vakaya yükseleceği öngörülmektedir (Kumar vd., 2014; Kleczka vd., 2020; Dekker vd., 2019). Bu nedenle çalışmamızda kolon kanseri hücre hattını (HCT-116) kullandık. Ancak, D₂O'nun KAFE ile kombine kullanımının kolon kanseri hücre hattına karşı etkisini rapor eden bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada D₂O ve KAFE'nin kombine kullanımının HCT-116 hücre hattına teröpotik etkisi *in vitro* ve gen ekspresyonu yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır.

İki bileşiğin farklı dozlarda (%10-50 D₂O; 5,10 ve 40 µM KAFE) 24. saatte tek başlarına ve birlikte HCT-116 hücre hattının hücre canlılığına etkisi MTS testi ile ölçülmüştür. *In vitro* MTS sonuçlarına göre %30 D₂O ve 10 µM KAFE doz grubu olarak seçilmiştir ve iki bileşiğin kombinasyonu bu dozlarda yapılmıştır. Elde edilen verilerde 24. saatte 10 µM KAFE'nin HCT-116 hücre hattında hücre canlılığı üzerinde anlamlı etkisi olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte %30 D₂O dozu HCT-116 hücre hattında hücre canlılığını kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalttığı ve bu anlamlılığın iki bileşiğin kombine (%30 D₂O + 10 µM KAFE) uygulanmasıyla daha da arttığı gözlemlenmiştir. Kolon kanseri hücre hattına ek olarak farklı kanser hücre hattında (SH-SY5Y) ve sağlıklı hücre

hattında (HaCaT) yapılan %30 D₂O uygulaması ise hücre canlılığını anlamlı olarak arttırmıştır.

Kleemann vd. (2020), D₂O'nun farklı insan melanom hücrelerine etkisini araştırdığı bir çalışmada A375, SK-Mel-28 ve SK-Mel-30 malign melanom hücreleri kullanılmıştır. Çalışmada, A375 hücrelerinde %5 D₂O seviyeleri bile DNA sentezinde anlamlı bir düşüş gösterirken, SK-Mel-28 hücresinde %75 D₂O seviyesi DNA sentezinde anlamlı bir inhibisyon göstermiştir, buna karşılık SK-Mel-30 hücreleri diğer hücre hatlarına kıyasla %75 D₂O dozuna daha hafif ama önemli bir azalma göstermiştir. Farklı hücrelerin D₂O'ya farklı yanıt göstermesi nedeniyle D₂O'ya yanıt olarak en net etkiyi gösteren A375 melanom hücrelerinin hücre canlılığı incelenmiştir. Çalışmada %40, %50 ve %100 D₂O dozlarının doza bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı şekilde azalttığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda HCT-116 hücre hattında %30 D₂O ve daha yüksek konsantrasyonları hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır. Bu yönüyle iki çalışma benzer veriler sunmaktadır.

Bununla birlikte antikanser tedavisinde kullanılan bileşiklerin karakteristik bir özelliği, normal hücrelere zarar vermeden neoplastik hücrelere toksisite göstermeleridir (Gajek vd., 2020). Bu nedenle D₂O'yu insan derisinden elde edilen sağlıklı HaCaT hücre hattında uyguladık. Elde ettiğimiz verilerde %30 D₂O uygulamasının HaCaT hücre hattında hücre canlılığını azaltmadığı aksine anlamlı şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte başka bir kanser hücre hattında (SH-SY5Y) %30 D₂O uygulaması SH-SY5Y hücre hattının hücre canlılığını kontrole kıyasla artırarak tümör hücrelerinin canlılığını azaltmamıştır. Bu açıdan D₂O farklı kanser hücre hatlarında farklı etkiler gösteriyor gibi görünmektedir.

Kolon kanseri insidansı, yüksek oranda kırmızı ve işlenmiş et, düşük sebze ve meyve tüketimi, düşük fiziksel aktivite, aşırı alkol tüketimi gibi batılı bir yaşam tarzının benimsenmesi nedeniyle sürekli artmaktadır (Bracci vd., 2021).

Bununla birlikte proapoptotik, antiproliferatif ve anti-enflamatuar potansiyele sahip olması nedeniyle fitokimyasallar açısından yüksek olan bitkisel bileşikler, kanser tedavisi için iyi adaylardır ve fitokimyasal açıdan zengin bir diyet ile kolon kanseri gibi çeşitli kanserlerin prevalansı arasında ters ilişki bildirilmiştir. Bu

nedenle, bitkisel bileşiklerin kanser tedavisinde, özellikle diğer ilaçlarla birlikte kullanımı üzerine yapılan araştırmalar oldukça ilgi çekicidir (Chikara vd., 2018; Sameni vd., 2021).

Kolon kanserini önlemede ise diyet ajanlarının kullanımı sağlıklı popülasyonlarda ve kolon kanseri gelişme riski yüksek olan İBH hastalarında yaygın bir durumdur (Mileo vd., 2019).

Özellikle bu doğal bitkisel bileşiklerin kanserle çeşitli mekanizmalarla savaştığı, bazı durumlarda kanser hücrelerini doğrudan öldürmesede onları ortadan kaldırmak için bağışıklık sistemini güçlendirdiği belirtilmektedir. Bu nedenle resveratrol, yeşil çay polifenolleri, kurkumin, genistein ve KAFE gibi birçok bitki kaynaklı polifenol, kanser önleyici ve kemoterapötik özellikleri açısından araştırmalara konu olmuştur. Özellikle çok sayıda çalışma, doğal arı ürünlerinin veya aktif bileşenlerinin antikanser potansiyelini, insan tümörlerinin alternatif bir tedavisi olarak özetlemiştir (Bhargava vd., 2021).

Tang vd. (2017), propolis aktif polifenolik molekülü olan KAFE'nin (10-80 μM) anti-kolon kanseri etkisini araştırdığı çalışmada HT-29 ve HCT-116 hücre hatları kullanılmıştır. HT-29 hücrelerinde KAFE'nin 44,5 μM ve daha yüksek dozları ile HCT-116 hücreleri için KAFE'nin 47,2 μM ve daha yüksek dozları hücre canlılığını anlamlı şekilde azaltmıştır.

Sari vd. (2020), 0-150 μM arasındaki dozlarda KAFE'nin RKO kolon kanser hücre hattına karşı etkisini ele aldığı çalışmada 25 μM ve daha yüksek KAFE dozlarının RKO hücre hattının hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı bununla birlikte 10 μM KAFE dozunun RKO hücre hattının hücre canlılığına anlamlı etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.

Wu vd. (2017), KAFE'nin SW-480 kolon kanseri hücre hattında etkisini araştırdığı çalışmada 0-10 $\mu\text{mol/L}$ dozlarda KAFE uygulaması yapılmıştır. Elde edilen verilerde hücrelerin proliferasyonunda 24. saatte anlamlı bir azalma görülmemiştir. Bununla birlikte SW-480 hücrelerinin proliferasyonu 48. saatte KAFE ile inkübasyon sonrası anlamlı olarak azalmaya başlamış, en anlamlı ve yüksek düşüş 96. saatte 10 $\mu\text{mol/L}$ dozda gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda 5 ve 10 μM KAFE dozları 24. saatte HCT-116 hücre hattında hücre canlılığını anlamlı olarak etkilememiştir bununla birlikte 40 μM KAFE HCT-116

hücre hattının hücre canlılığını anlamlı şekilde azaltmıştır. Çalışmamız bu yönüyle literatür ile benzer veriler sunmaktadır.

Bununla birlikte Budisan vd. (2019), kolon kanseri hücre hatlarında KAFE ve kamferolun inhibitör etkisini değerlendirdiği araştırmada RKO ve HCT-116 hücre hatları kullanılmıştır. Çalışmada RKO hücre hattında 48. saatte KAFE'nin 36,87 μM ve daha yüksek konsantrasyonları hücre canlılığını anlamlı şekilde azaltırken HCT-116 hücre hattında 48. saatte KAFE'nin 3,326 μM gibi düşük dozu hücre canlılığında anlamlı bir inhibisyon göstermiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, polifenolik bileşenlerin farklı anti-kanser ilaç ve ajanlarla kombine kullanımının kanser hücrelerinin büyümesini tek başına olduğundan daha etkili bir şekilde inhibe ettiğini gözlemlemektedir (Colpan ve Erdemir, 2021). Literatürde D_2O ve propolisin aktif polifenolik molekülü olan KAFE'yi kombine ederek kanser hücrelerinde teröpotik etkilerini değerlendiren çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu yönüyle özgün bir çalışma olarak alanyazına katkıda bulunmuştur.

Elde ettiğimiz verilerde %30 D_2O 'nun 10 μM KAFE ile kombine edilerek uygulanması HCT-116 hücre hattının hücre canlılığını tek başına %30 D_2O uygulamasına kıyasla anlamlı şekilde azaltmıştır.

Kanser tedavisini başarıya götüren bir diğer temel adım kanser hücrelerinde apoptozun yani programlanmış hücre ölümünün indüklenmesidir. Apoptoz, hücre ölümü ve bölünmesi arasındaki dengenin korunmasında mühim bir rol oynamaktadır ve apoptoz eksikliği kanser dahil olmak üzere farklı hastalıklara yol açan hücrelerin kontrolsüz çoğalma ve büyümesine neden olmaktadır (Jan, 2019).

Hartmann vd. (2005), %5-30 D_2O 'nun pankreas kanseri hücre hatlarında (AsPC-1, BxPC-3 ve PANC-1) etkisini incelediği araştırmada, kontrol hücrelerinin %9,1 ile %11,9'u apoptoz gösterirken, AsPC-1 hücrelerinde %30 D_2O uygulaması apoptotik hücre sayısını %22'ye, PANC-1 hücrelerinde ise %20 D_2O uygulaması apoptotik hücre sayısını %16'ya çıkarmıştır. Bununla birlikte BxPC-3 hücrelerinde D_2O uygulaması apoptozu indüklememiştir.

Tang vd. (2017), KAFE'nin HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücre hatlarına etkisini değerlendiği aynı çalışmada 48. saatte sitotoksik etki gösteren 40 μM doz

KAFE'nin apoptoz oranı HT-29 hücrelerinde %34 ve HCT-116 hücrelerinde %39 bulunmuştur. Bununla birlikte 10 µM KAFE dozunun 48. saatte apoptoz oranı HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarında %10-20 arasında bulunmuştur.

Marin vd. (2019), miyelom hücre hattının 0-50 µM arasındaki dozlarda KAFE ile muamelesinin etkisi incelendiği başka bir çalışmada KAFE'nin miyelom hücrelerine apoptoz etkisi incelenmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular 10 µM KAFE'nin anlamlı şekilde apoptozu indükleyerek apoptotik hücre sayısını %16,6'ya çıkardığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte 50 µM KAFE uygulaması apoptotik hücre sayısını neredeyse %50 ye çıkarmıştır.

Kabała-Dzik vd. (2017), kafeik asit ve KAFE'nin (10-100 µM) meme kanseri hücresinde (MDA-MB-231) etkilerini incelediği araştırmada MDA-MB-231 hücreleri 24 sa ve 48 sa boyunca 10 ila 100 µM dozlarda KAFE ile tedavi edildi. Elde edilen verilerde aynı dozaj ve inkübasyona tabi tutulan hücrelerde KAFE'nin kafeik asite kıyasla sitotoksitesi daha fazla bulunmuştur. Ayrıca KAFE doza bağımlı olarak kafeik asitten daha yüksek bir apoptotik etkiye neden olmuştur. Çalışmada 10 µM KAFE uygulaması kontrole (%93,96) kıyasla canlı hücre sayısını %84,33'e düşürmüştür.

Çalışmamızda HCT-116 hücre hattında %30 D₂O ve 10 µM KAFE'nin tek tek uygulamaları sonucu apoptotik hücre sayısı literatürde bildirilen verilerden daha yüksek bulunmuştur. İki bileşiğin kombine uygulanması ise apoptotik hücre sayısını iki bileşiğin tek tek uygulanmasına kıyasla daha fazla arttırmıştır.

Çalışmamızda ayrıca %30 D₂O ve 10 µM KAFE'nin tek tek ve kombine uygulamalarının gen düzeyinde etkisini gözlemek adına real time PCR yöntemini kullandık. İki bileşiğin tek tek ve kombine uygulamalarının AKT, NF-κB, CCND1, p16, BAX, p53 ve p21 genlerinin ekspresyon seviyelerine etkisini inceledik. Gen ekspresyonu bulgularına göre, %30 D₂O uygulaması AKT geninin ekspresyonunu düşürmüştür. 10 µM KAFE uygulaması ise AKT ve p53 genlerinin ekspresyonlarını azaltmıştır. Bununla birlikte %30 D₂O ve 10 µM KAFE'nin kombine kullanımı, AKT, NF-κB ve CCND1 genlerinin ekspresyon düzeylerini azaltırken, p16, BAX ve p53 genlerinin ekspresyon düzeylerini yükselttiği tespit edilmiştir. %30 D₂O ve 10 µM KAFE'nin tek tek ve birlikte uygulamaları ise p21 geninin ekspresyon seviyesinde değişikliğe yol açmadığı görülmüştür.

Kanser hücreleri, baskılayıcı genlerin inaktivasyonu veya mutasyonu ve onkogenlerin aşırı ekspresyonu veya amplifikasyonu nedeniyle kontrolsüz hücre döngüsü ilerlemesine ve mitozaya yol açarak hızlıca çoğalabilmektedir (Icard vd., 2019).

Hücre döngüsü, memeli hücrelerinde gerçekleşen G1, S, G2 ve M fazları boyunca hücrenin bölünerek çoğalmasını sağlayan bir süreçtir. Çevresel stres koşulları söz konusu olduğunda bu faz geçişleri hücre döngüsünün ilerlemesini durdurabilecek kontrol noktaları tarafından düzenlenir. Siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri arasındaki dengeli etkileşimler hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi düzenler (Oršolić ve Jazvinščak Jembrek, 2022).

Şu anda propolis ve bileşenlerinin siklin D1, siklin bağımlı kinazlar ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri gibi hücre döngüsü düzenleyicilerini modüle ettiği, böylece çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyerek kanser hücresi döngüsünün ilerlemesini durdurduğu bildirilmektedir (Oršolić ve Jazvinščak Jembrek, 2022).

Araştırmalar ayrıca propolisin aktif bileşeni olan KAFE'nin siklin D1'e ek olarak AKT ve NF-κB dâhil olmak üzere karsinogenez ile ilgili süreçlerde rol oynayan proteinlerin seviyelerini azaltarak apoptozu indüklediğini göstermiştir (Forma ve Bryś, 2021). Bununla birlikte literatürde D₂O'nun gen ekspresyonuna etkisini inceleyen araştırma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu yönüyle alanyazına katkı sağlamaktadır.

AKT serin/treonin kinaz, hücrenin sağkalımı, proliferasyonunu, büyümesini, apoptozunu ve glikojen metabolizmasını düzenleyen aktivasyonu oldukça onkojenik olan bir proteindir. Çeşitli insan kanser türlerinde artmış ekspresyonu bildirilir. Çalışmalar ayrıca tümör gelişiminin indüklenmesine neden olmasının yanısıra birçok kanser türünde geleneksel kemoterapiye direnç kazandırdığına dair kanıtlar sunmaktadır (Song vd., 2019; Revathidevi vd., 2019).

Şu anda, deneysel *in vitro* çalışmalar, kolon kanseri hücrelerinin büyümesine destek olan ve inflamasyona yol açan AKT ve NF-κB gibi sinyal yollarını bloke etmeye odaklanmaktadır (Stefani vd., 2021).

Jandova vd. (2021), D₂O'nun A375 melanom hücrelerinde etkisini incelediği çalışma D₂O (%90) ile tedavi sonrası AKT geninin ekspresyonunun aşağı regülasyonu gözlemlenmiştir.

Chiang vd. (2014), insan kolon kanseri hücrelerinde (HCT-116 ve SW-480) KAFE'nin (0 ve 100 µM) etkisini araştırdığı çalışmada KAFE ile tedavinin AKT fosforilasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir.

Anjaly ve Tiku'nun (2022), KAFE'nin (0, 15 ve 30 µM), prostat kanseri hücrelerinde (DU145 ve PC3) radyomodülatör etkisini araştırdığı çalışmada KAFE ve gama radyasyonunun (3 Gy) birlikte tedavisinin DU145 ve PC3 hücreleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışmada elde edilen verilerde KAFE'nin AKT ekspresyonunu azalttığı ve bu proteinin seviyesinin, hücreler hem KAFE hem de 3 Gy ile tedavi edildiğinde en düşük düzeyde olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda %30 D₂O, 10 µM KAFE tek tek ve iki bileşiğin kombine uygulamaları AKT geninin ekspresyonunu anlamlı şekilde azaltmıştır. Çalışmamız bu yönüyle literatür ile benzerlik göstermektedir.

NF-κB proteinleri, iltihaplanma, bağışıklık, proliferasyon ve hücre ölümü gibi önemli süreçleri düzenleyen birçok genin ekspresyonuna etki edebilmektedir. Bununla birlikte NF-κB'nin aktive olması hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi artırır ve apoptozu inhibe ederek tümörigenez sürecini destekler. Çeşitli çalışmalar KAFE'nin tümör durumunda NF-κB'nin aktivasyonunu bloke ettiği göstermiştir (Patel vd., 2018; Yordanov, 2019; Zinatizadeh vd., 2021).

Kolon kanserinin gelişiminde inflamasyon ve tümörigenez arasındaki ilişki iyi bilinmekle beraber İBH hastalık için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. NF-κB, inflamatuvar bir faktör olarak kolon karsinogenezi sırasında rol oynayan çeşitli sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu uyarabilmektedir (Xie vd., 2019).

KAFE'nin (0-100 µM) yumurtalık kanseri hücreleri (SKOV-3) üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışma 25 µM ve daha yüksek KAFE dozunun yumurtalık kanseri hücrelerinin yaşayabilirliğini, göçünü ve invazyonunu anlamlı şekilde azaltabildiğini ve NF-κB sinyalini inaktive ederek apoptozu teşvik edebildiğini belirtmiştir (Liu vd., 2018).

Liang vd. (2019), nazofaringeal karsinomda KAFE'nin (1-80 µM) inhibitör etkisini değerlendirdiği bir çalışmada KAFE'nin, nazofaringeal kanser hücre hatlarının yaşayabilirliğini zamana ve doza bağlı olarak baskıladığı, apoptozu indüklediği ve NF-κB geninin ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir.

Çalışmamızda %30 D₂O ve 10 µM KAFE uygulamaları NF-κB geninin ekspresyon düzeyine anlamlı etkisi bulunmamıştır. Bununla birlikte iki bileşiğin kombine uygulanması NF-κB geninin ekspresyon düzeyini anlamlı olarak düşürmüştür.

CCND1, G1 fazındaki kısıtlama noktasından hücre döngüsünün S fazına geçişi düzenleyen bir proteindir. Bu genin aşırı ekspresyonu normal hücre döngüsünün kontrolünü bozarak kanserin gelişimini ve ilerlemesini tetikler. Bu genin aşırı ekspresyonu ayrıca kolon kanseri patogenezinde de önemli rol oynamaktadır (Xie vd., 2017; Albasri vd., 2019).

Yapılan bir çalışma, insan HCT-116 kolon ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde KAFE ile tedavi sonrası siklin D1 ve p53 genlerinin ekspresyonlarını karşılaştırmıştır. HCT-116 ve MCF-7 hücreleri 24 sa boyunca 10 µg/mL KAFE ile tedavi edilmiştir. Elde edilen verilerde KAFE ile tedavinin CCND1 geninin ekspresyonunu baskıladığı, hücre döngüsünü ve apoptozu düzenleyen ve böylece anti-kanser aktiviteyi arttıran p53'ün ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Chen vd., 2019).

Çalışmamızda %30 D₂O ve 10 µM KAFE uygulamaları CCND1 geninin ekspresyon düzeyine anlamlı etkisi bulunmamıştır bununla birlikte iki bileşiğin kombine uygulanması ile CCND1 geninin ekspresyon düzeyi anlamlı olarak düşmüştür.

p16 (siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2A, CDKN2A), hücre döngüsünün G1 fazında tutuluma yol açan tümör baskılayıcı olarak tanınan bir antionkogendir. p16 fonksiyonunun kaybı, anormal hücrelerin çoğalmasına yol açabilir ve ayrıca kanser hücreleri üretebilir. Çalışmalar, p16 protein ekspresyonunun kolon kanserinin oluşumu, ilerlemesi veya prognozu ile ilişkili olduğunu bildirmektedir (Zhou ve Gu, 2018).

Çalışmamızda %30 D₂O ve 10 µM KAFE uygulamaları p16 geninin ekspresyon düzeyine anlamlı etkisi bulunmazken iki bileşiğin kombine uygulanması p16 geninin ekspresyon düzeyini anlamlı olarak arttırmıştır.

BAX geni Bcl-2 ailesine üye olan ve p53 tarafından doğrudan düzenlenen apoptotik etkileri olan bir gendir ve çalışmalar insan kanser türlerinde BAX geninin inaktivasyonunu bildirmiştir. Bununla birlikte literatür KAFE'nin

potansiyel antikanser aktivitelerinden birisinin p53 ve BAX geninin ekspresyon seviyesini düzenleyerek apoptozun indüklenmesine bağlamaktadır (Feng vd., 2018; Radhakrishnan vd., 2021).

Bir çalışma KAFE (0-100 μ M) ile tedavi edilen yumurtalık kanseri hücrelerinde (OV7) proapoptotik BAX geninin ekspresyonunu değerlendirmiştir ve KAFE ile tedaviden sonra BAX geninin ekspresyonu doza bağımlı bir şekilde, 24. ve 48. saatte kontrolden anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (Kleczka vd., 2020).

KAFE tedavisinin insan ağız kanseri hücre hatlarında etkisini inceleyen ayrı bir çalışma KAFE'nin BAX geninin ekspresyon seviyesini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir (Yu vd., 2017).

Çalışmamızda %30 D₂O ve 10 μ M KAFE uygulamaları BAX geninin ekspresyon düzeyine anlamlı etkisi bulunmadı. Ancak iki bileşiğin kombine uygulanması BAX geninin ekspresyon düzeyini anlamlı olarak arttırmıştır.

Literatürde, p53'ün sayısız aktiviteye ve çeşitli biyolojik yolları düzenleme yeteneğine sahip olduğu belirtilmektedir. p53, hücrelerde apoptoz, hücre döngüsü ve DNA onarımını etkileyebilecek bir tümör baskılayıcı faktör olarak kabul edilir. p53, BAX gibi apoptozla ilgili proteinlerin ekspresyonunu düzenler. Birçok kanser türünde, bu proteinin ekspresyonunda veya işlevselliğinde değişiklikler tespit edilmiştir (Blagih vd., 2020; Zhu vd., 2020; Sepúlveda vd., 2020).

Literatür KAFE ile tedavinin p53'ü aktive ederek dirençli prostat kanseri hücrelerinde hücre döngüsü durmasını ve büyüme inhibisyonunu indüklediğini bildirmiştir (Matsunaga vd., 2019).

Çalışmamızda 10 μ M KAFE uygulaması p53 geninin ekspresyonunu azaltmıştır. Bununla birlikte D₂O ve KAFE'nin kombine kullanımı bu genin ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırmıştır.

Sikline bağımlı kinaz inhibitörü p21 hücre proliferasyonunu inhibe etme yeteneği ile tümör baskılayıcı bir işlev görmektedir. Özellikle, p21'in ekspresyon veya fonksiyon kaybı birçok insan kanserinin oluşumunda veya ilerlemesinde rol oynamaktadır (Li vd., 2018).

Tang vd. (2017), KAFE ve farklı kolon kanseri hücrelerinde yaptığı aynı çalışmada KAFE ile tedavinin doza bağımlı şekilde p21 geninin ekspresyon seviyesinde artışını bildirmiştir.

Çalışmamızda %30 D₂O, 10 µM KAFE ve iki bileşiğin kombine uygulamaları p21 geninin ekspresyon seviyesine anlamlı etkisi bulunmamıştır.

Genellikle kanser hücreleri, komşu hücrelerle temas halinde olan kolonilerde büyüme eğilimindedir; bitişik hücrelerle bağlantıyı kaybetmek, kanser hücrelerinin ölümüyle sonuçlanır (Sahoo vd., 2020).

Hartmann vd. (2005), D₂O'nun farklı pankreas kanseri hücre hatlarında (AsPC-1, BxPC-3 ve PANC-1) etkisini incelediği aynı çalışmada D₂O'nun pankreas kanseri hücre hatlarının koloni oluşumlarını doza bağımlı bir şekilde azalttığı gözlemlenmiştir.

Yahya ve Sudhandiran (2022), KAFE (10-100 µM) ile tedavi edilen HT-29 kolon kanseri hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerini incelemiştir. Elde edilen verilerde kontrol hücreleri koloniler oluşturmaya devam ederken, KAFE ile tedavi edilen hücreler koloni oluşumunda dikkate değer bir azalma gösterdi. Araştırma KAFE'nin kolon kanseri üzerinde anti-klonojenik etkiye sahip olduğunu vurgulamaktadır.

Ishida vd. (2018), çeşitli insan kanser hücrelerinde (SKOV3, H1299, A549, HeLa, U2OS) 5 µM KAFE uygulamasının kanser hücrelerinin koloni oluşturma etkinliğinde önemli bir azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur.

Liang vd. (2019), nazofaringeal karsinomda KAFE'nin inhibitör etkisini değerlendirdiği başka bir çalışmada 20 ve 40 µM KAFE ile tedavi edilen hücrelerin koloni oluşumunu incelediler. Elde edilen verilerde 20 µM KAFE ile tedaviden sonra koloni oluşumunda anlamlı olmayan azalma gözlemlenirken 40 µM KAFE ile tedavi edilen hücrelerde koloni oluşumu anlamlı şekilde inhibe edilmiştir.

Çalışmamızda HCT-116 hücreleri 6 kuyucuklu pleytlerde %30 D₂O, 10 µM KAFE ve %30 D₂O + 10 µM KAFE uygulamalarından sonra 2 haftalık inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonucunda hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri gözlemlenmiştir. Çalışmada koloni oluşturma bulgularına göre kontrol grubuna kıyasla %30 D₂O ve 10 µM KAFE uygulamasının HCT-116

hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerini gözle görülür şekilde inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bu bulgulara ek olarak iki bileşiğin kombine uygulanması sonucu HCT-116 hücrelerinde koloni oluşumu gözlemlenmemiştir. Sonuçlarımız bu bakımdan literatür ile benzer veriler sunmaktadır.

Özetle, özellikle D₂O açısından araştırmaların yeterli ve doyurucu sayıda olmadığı bu çalışma D₂O'nun kolon kanserindeki teröpotik etkilerini ve bu bileşiğin günümüzde oldukça popüler ve çeşitli durumlarda teröpotik etkisi kanıtlanmış olan propolisin aktif polifenolik molekülü KAFE ile sinerjistik etkisini ortaya koymuştur. Çalışmamız bu yönüyle alanyazın açısından, özellikle ülkemizde, beslenme ve diyetetik bilim dalı açısından, farklı tekniklerin birlikte kullanıldığı çok yönlü ve çok disiplinli bir araştırma olmuştur.

Bununla birlikte önceki bölümlerde bahsedildiği gibi kolon kanseri etiyolojisinde rol oynayan en önemli faktörlerden biri özellikle batılı yaşam tarzının benimsenmesine dayalı sağlıklı beslenme modelidir. Bu nedenle hastalığı önlemede beslenme ve yaşam tarzı alışkanlıklarının değişimi kolon kanserinin önlenmesi açısından büyük bir önem arz etmektedir. Bu amaçla beslenme bakımından özellikle beslenme uzmanları ve diyetisyenlerin değerlendirmeye dayalı diyet önerisi yaparken hastayı bilinçlendirmeleri ve hastalığa karşı koruyucu ve önleyici beslenme müdahalelerinde bulunmaları hastanın sağlıklı bir yaşam sürdürmesinde önemli ve etkin rolünü ortaya koymaktadır.

ALTINCI BÖLÜM

SONUÇ

Çalışmamızda D₂O ve propolisin aktif polifenolik molekülü KAFE'nin kombine kullanımının insan kolon kanseri hücre hattı (HCT-116) üzerindeki teröpotik potansiyelini değerlendirdik. Sonuç olarak, D₂O ve KAFE'nin kombine uygulamalarının kolon kanseri hücre hattında teröpotik etkileri gözlemlenmiştir. Çalışmamızda D₂O ve KAFE'nin kombine uygulanmasının kolon kanseri hücrelerinin canlılığını anlamlı olarak azalttığı, apoptotik hücre sayısını arttırdığı ve kanser ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlediği ve kanser hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerini baskıladığı gözlemlenmiştir.

Bu bağlamda iki bileşiğin kombinasyonunun insan vücudunda olası etkileri ve biyoyararlanımına dair *in vitro* ve *in vivo* araştırmalar yapılarak kolon kanseri tedavisinde en az yan etkiyi sağlayan optimal dozun ayarlanması gelecek için önem arz etmektedir.

Ek olarak D₂O ve KAFE'nin diğer kanser türleri üzerindeki terapötik etkilerinin *in vitro* ve klinik bilimler ile birlikte *in vivo* araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKÇA

- Abdik, H. (2022). Antineoplastic effects of erufosine on small cell and non-small cell lung cancer cells through induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Molecular Biology Reports*, 49(4): 2963-2971.
- Abilev, S. K., Igonina, E. V., Smirnova, S. V., & Rubanovich, A. V. (2019). Effect of Deuterium on the Expression of Inducible Genes in Escherichia coli. *Biology Bulletin*, 46(11): 1595-1600.
- Abilev, S. K., Smirnova, S. V., Igonina, E. V., Parmon, V. N., & Yankovsky, N. K. (2018). Deuterium oxide enhances Escherichia coli SOS response induced by genotoxicants. *In Doklady Biological Sciences*, 480(1): 85-89
- Afrin, S., Giampieri, F., Gasparini, M., Forbes-Hernández, T. Y., Cianciosi, D., Reboredo-Rodriguez, P., ... & Battino, M. (2020). Dietary phytochemicals in colorectal cancer prevention and treatment: A focus on the molecular mechanisms involved. *Biotechnology advances*, 38: 107322.
- Ahmed, M. (2020). Colon cancer: a clinician's perspective in 2019. *Gastroenterology research*, 13(1): 1.
- Aiello, P., Sharghi, M., Mansourkhani, S. M., Ardekan, A. P., Jouybari, L., Daraei, N., ... & Kooti, W. (2019). Medicinal plants in the prevention and treatment of colon cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Albasri, A. M., Elkablawy, M. A., Ansari, I. A., & Alhujaily, A. S. (2019). Prognostic significance of Cyclin D1 over-expression in colorectal cancer: an experience from Madinah, Saudi Arabia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 20(8): 2471.
- Alday, E., Valencia, D., Garibay-Escobar, A., Domínguez-Esquível, Z., Piccinelli, A. L., Rastrelli, L., ... & Velazquez, C. (2019). Plant origin authentication of Sonoran Desert propolis: An antiproliferative propolis from a semi-arid region. *The Science of Nature*, 106(5): 1-13.

- Anjaly, K., & Tiku, A. B. (2018). Radio-modulatory potential of caffeic acid phenethyl ester: A therapeutic perspective. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 18(4): 468-475.
- Anjaly, K., & Tiku, A. B. (2022). Caffeic acid phenethyl ester induces radiosensitization via inhibition of DNA damage repair in androgen-independent prostate cancer cells. *Environmental Toxicology*, 37(5): 995-1006.
- Argilés, G., Tabernero, J., Labianca, R., Hochhauser, D., Salazar, R., Iveson, T., ... & Arnold, D. (2020). Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 31(10): 1291-1305.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4): 683-691.
- Azer, S. A. (2019). Challenges facing the detection of colonic polyps: What can deep learning do?. *Medicina*, 55(8): 473.
- Aziz, S. G. G., Fardyazar, Z., Pashaei-Asl, F., Rahmati-Yamchi, M., Khodadadi, K., & Pashaiasl, M. (2019). Human amniotic fluid stem cells (hAFSCs) expressing p21 and cyclin D1 genes retain excellent viability after freezing with (dimethyl sulfoxide) DMSO. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(1): 43.
- Bader, Y., Hartmann, J., Horvath, Z., Saiko, P., Grusch, M., Madlener, S., ... & Szekeres, T. (2008). Synergistic effects of deuterium oxide and gemcitabine in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer letters*, 259(2): 231-239.
- Bankova, V., Trusheva, B., & Popova, M. (2018). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)–Natural sources, analytical procedures and synthetic approaches. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des sciences*, 71: 1157-1169.

- Ben Abu, N., Mason, P. E., Klein, H., Dubovski, N., Ben Shoshan-Galeczki, Y., Malach, E., ... & Jungwirth, P. (2021). Sweet taste of heavy water. *Communications biology*, 4(1): 1-10.
- Bhargava, P., Mahanta, D., Kaul, A., Ishida, Y., Terao, K., Wadhwa, R., & Kaul, S. C. (2021). Experimental evidence for therapeutic potentials of propolis. *Nutrients*, 13(8): 2528.
- Bila, W. C., Mariano, R. M. D. S., Silva, V. R., Dos Santos, M. E. S. M., Lamounier, J. A., Ferriolli, E., & Galdino, A. S. (2017). Applications of deuterium oxide in human health. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 53(4): 327-343.
- Blagih, J., Buck, M. D., & Vousden, K. H. (2020). p53, cancer and the immune response. *Journal of cell science*, 133(5): jcs237453.
- Bracci, L., Fabbri, A., Del Cornò, M., & Conti, L. (2021). Dietary Polyphenols: Promising Adjuvants for Colorectal Cancer Therapies. *Cancers*, 13(18): 4499.
- Budisan, L., Gulei, D., Jurj, A., Braicu, C., Zanoaga, O., Cojocneanu, R., ... & Berindan-Neagoe, I. (2019). Inhibitory effect of CAPE and kaempferol in colon cancer cell lines—possible implications in new therapeutic strategies. *International journal of molecular sciences*, 20(5): 1199.
- Buikhuisen, J. Y., Torang, A., & Medema, J. P. (2020). Exploring and modelling colon cancer inter-tumour heterogeneity: opportunities and challenges. *Oncogenesis*, 9(7): 1-15.
- Carr, P. R., Jansen, L., Bienert, S., Roth, W., Herpel, E., Kloor, M., ... & Hoffmeister, M. (2017). Associations of red and processed meat intake with major molecular pathological features of colorectal cancer. *European journal of epidemiology*, 32(5): 409-418.
- Chang, L., Liang, J., Xia, X., & Chen, X. (2019). miRNA-126 enhances viability, colony formation, and migration of keratinocytes HaCaT cells by regulating PI3 K/AKT signaling pathway. *Cell biology international*, 43(2): 182-191.

- Chen, H., Guan, Y., Baek, S. J., & Zhong, Q. (2019). Caffeic acid phenethyl ester loaded in microemulsions: enhanced in vitro activity against colon and breast cancer cells and possible cellular mechanisms. *Food Biophysics*, 14(1): 80-89.
- Chen, Y., Wang, X. Q., Zhang, Q., Zhu, J. Y., Li, Y., Xie, C. F., ... & Han, H. Y. (2017). (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits colorectal cancer stem cells by suppressing Wnt/ β -catenin pathway. *Nutrients*, 9(6): 572.
- Chiang, E. P. I., Tsai, S. Y., Kuo, Y. H., Pai, M. H., Chiu, H. L., Rodriguez, R. L., & Tang, F. Y. (2014). Caffeic acid derivatives inhibit the growth of colon cancer: involvement of the PI3-K/Akt and AMPK signaling pathways. *PloS one*, 9(6): e99631.
- Chikara, S., Nagaprashantha, L. D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., & Singhal, S. S. (2018). Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer letters*, 413: 122-134.
- Colpan, R. D., & Erdemir, A. (2021). Co-delivery of quercetin and caffeic-acid phenethyl ester by polymeric nanoparticles for improved antitumor efficacy in colon cancer cells. *Journal of Microencapsulation*, 38(6): 381-393.
- Craig-Mueller, N., Hammad, R., Elling, R., Alzubi, J., Timm, B., Kolter, J., ... & Cathomen, T. (2020). Modeling MyD88 Deficiency In Vitro Provides New Insights in Its Function. *Frontiers in immunology*, 11: 608802.
- Cui, Z., Gao, H., Yan, N., Dai, Y., Wang, H., Wang, M., ... & Jin, X. (2021). LncRNA PlncRNA-1 accelerates the progression of prostate cancer by regulating PTEN/Akt axis. *Aging (Albany NY)*, 13(8): 12113.
- Davies, P. S. (2020). Stable isotopes: their use and safety in human nutrition studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, 74(3): 362-365.
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L., Kasi, P. M., & Wallace, M. (2019). Pure-AMC. *Lancet*, 394: 1467-80.
- Demir, C. (2022). Propolis Ve Polen İçeriği Etken Bileşiklerin Crohn Hastalığı Üzerinde Etkilerinin Araştırılması (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi).

İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü,
İstanbul.

- Deniz, E. B. (2022). Kanser Epidemiyolojisi. *Turkey Health Literacy Journal*, 3(2): 102-111.
- Deo, S. V. S., Sharma, J., & Kumar, S. (2022). GLOBOCAN 2020 Report on Global Cancer Burden: Challenges and Opportunities for Surgical Oncologists. *Annals of Surgical Oncology*, 1-4.
- Dusak, A., Atasoy, N., & Demir, H. (2022). Nutrition and Colon Cancer. *Int J Academic Medicine and Pharmacy*, 4(1): 80-85.
- Eldohaji, L. M., Fayed, B., Hamoda, A. M., Ershaid, M., Abdin, S., Alhamidi, T. B., ... & Soliman, S. S. (2021). Potential targeting of Hep3B liver cancer cells by lupeol isolated from *Avicennia marina*. *Archiv der Pharmazie*, 354(9): 2100120.
- Erkekoğlu, P., & BAYDAR, T. (2020). Güncel İn Vitro Sitotoksikite Testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1): 45-63.
- Feng, Y., Chen, X., Zheng, Y., Liu, Q., Chen, H., Cai, Y., ... & Wang, S. Y. (2018). Prognostic value and susceptibility of BAX rs4645878 polymorphism in cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 97(29).
- Forma, E., & Bryś, M. (2021). Anticancer activity of propolis and its compounds. *Nutrients*, 13(8): 2594.
- Friedenreich, C. M., Ryder-Burbidge, C., & McNeil, J. (2021). Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Molecular Oncology*, 15(3): 790-800.
- Gajek, G., Marciniak, B., Lewkowski, J., & Kontek, R. (2020). Antagonistic effects of CAPE (a Component of Propolis) on the cytotoxicity and genotoxicity of irinotecan and SN38 in Human gastrointestinal cancer cells in vitro. *Molecules*, 25(3): 658.
- George, D., & Mallery, P. (2016). IBM SPSS Statistics 23 Step by Step: A Simple Guide and Reference (14th ed.). New York, USA: Routledge.

- Gianfredi, V., Salvatori, T., Villarini, M., Moretti, M., Nucci, D., & Realdon, S. (2018). Is dietary fibre truly protective against colon cancer? A systematic review and meta-analysis. *International journal of food sciences and nutrition*, 69(8): 904-915.
- Granados-Romero, J. J., Valderrama-Treviño, A. I., Contreras-Flores, E. H., Barrera-Mera, B., Herrera Enríquez, M., Uriarte-Ruíz, K., ... & Arauz-Peña, G. (2017). Colorectal cancer: a review. *Int J Res Med Sci*, 5(11): 4667.
- Grunberger, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E. M., Efros, L., Caldwell, M., ... & Nakanishi, K. (1988). Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*, 44(3): 230-232.
- Gurba, A., Taciak, P., Sacharczuk, M., Młynarczuk-Biały, I., Bujalska-Zadrożny, M., & Fichna, J. (2022). Gold (III) Derivatives in Colon Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2): 724.
- Hartmann, J., Bader, Y., Horvath, Z., Saiko, P., Grusch, M., Illmer, C., ... & Szekeres, T. (2005). Effects of heavy water (D₂O) on human pancreatic tumor cells. *Anticancer Research*, 25(5): 3407-3411.
- Hnatyszyn, A., Hryhorowicz, S., Kaczmarek-Ryś, M., Lis, E., Słomski, R., Scott, R. J., & Pławski, A. (2019). Colorectal carcinoma in the course of inflammatory bowel diseases. *Hereditary cancer in clinical practice*, 17(1): 1-9.
- Honari, M., Shafabakhsh, R., Reiter, R. J., Mirzaei, H., & Asemi, Z. (2019). Resveratrol is a promising agent for colorectal cancer prevention and treatment: focus on molecular mechanisms. *Cancer Cell International*, 19(1): 1-8.
- Huang, L., Hu, Z., Luo, R., Li, H., Yang, Z., Qin, X., & Mo, Z. (2022). Predictive Values of the Selected Inflammatory Indexes in Colon Cancer. *Cancer Control*, 29: 10732748221091333.

- Icard, P., Fournel, L., Wu, Z., Alifano, M., & Lincet, H. (2019). Interconnection between metabolism and cell cycle in cancer. *Trends in biochemical sciences*, 44(6): 490-501.
- Ishida, Y., Gao, R., Shah, N., Bhargava, P., Furune, T., Kaul, S. C., ... & Wadhwa, R. (2018). Anticancer activity in honeybee propolis: Functional insights to the role of caffeic acid phenethyl ester and its complex with γ -cyclodextrin. *Integrative cancer therapies*, 17(3): 867-873.
- Jan, R. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9(2): 205.
- Jandova, J., Hua, A. B., Fimbres, J., & Wondrak, G. T. (2021). Deuterium oxide (D₂O) induces early stress response gene expression and impairs growth and metastasis of experimental malignant melanoma. *Cancers*, 13(4): 605.
- Ji, X., Peng, Q., & Wang, M. (2018). Anti-colon-cancer effects of polysaccharides: a mini-review of the mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114: 1127-1133.
- Jiang, Y., Bi, J. H., Ye, S. J., Wu, M. R., Yi, Y., Wang, H. X., & Wang, L. M. (2022). Investigation of Inhibition Effect of 1, 2, 3, 4, 6-Pentagalloyl- β -D-glucose on Gastric Cancer Cells Based on a Network Pharmacology Approach and Experimental Validation. *Frontiers in oncology*, 3863.
- Jin, D. H., Kim, Y., Lee, B. B., Han, J., Kim, H. K., Shim, Y. M., & Kim, D. H. (2017). Metformin induces cell cycle arrest at the G1 phase through E2F8 suppression in lung cancer cells. *Oncotarget*, 8(60): 101509.
- Kabakov, A.E., Gabai, V.L. (2018). Cell Death and Survival Assays. In Calderwood, S., Prince, T. (Eds), *Methods in Molecular Biology*, New York: Humana Press, 107-127.
- Kabała-Dzik, A., Rzepecka-Stojko, A., Kubina, R., Jastrzębska-Stojko, Ż., Stojko, R., Wojtyczka, R. D., & Stojko, J. (2017). Comparison of two components of propolis: caffeic acid (CA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) induce apoptosis and cell cycle arrest of breast cancer cells MDA-MB-231. *Molecules*, 22(9): 1554.

- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3): 332-349.
- Kanth, P., & Inadomi, J. M. (2021). Screening and prevention of colorectal cancer. *BMJ*, 374.
- Kasote, D. M., Pawar, M. V., Bhatia, R. S., Nandre, V. S., Gundu, S. S., Jagtap, S. D., & Kulkarni, M. V. (2017). HPLC, NMR based chemical profiling and biological characterisation of Indian propolis. *Fitoterapia*, 122: 52-60.
- Katsaounou, K., Nicolaou, E., Vogazianos, P., Brown, C., Stavrou, M., Teloni, S., ... & Apidianakis, Y. (2022). Colon Cancer: From Epidemiology to Prevention. *Metabolites*, 12(6): 499.
- Keskiner, A. A. (2021). Gıda takviyesi olarak kullanılan bazı apiterapik ürünlerin çeşitli kanser hücre hatlarında etkinliğinin belirlenmesi (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Amasya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Amasya.
- Keum, N., & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(12): 713-732.
- Kleczka, A., Kubina, R., Dzik, R., Jasik, K., Stojko, J., Cholewa, K., & Kabała-Dzik, A. (2020). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) induced apoptosis in serous ovarian cancer OV7 cells by deregulation of Bcl2/Bax genes. *Molecules*, 25(15): 3514.
- Kleemann, J., Reichenbach, G., Zöller, N., Jäger, M., Kaufmann, R., Meissner, M., & Kippenberger, S. (2020). Heavy Water Affects Vital Parameters of Human Melanoma Cells in vitro. *Cancer Management and Research*, 12: 1199.
- Kocot, J., Kielczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., & Musik, I. (2018). Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Kselíková, V., Vítová, M., & Bišová, K. (2019). Deuterium and its impact on living organisms. *Folia microbiologica*, 64(5): 673-681.

- Kumar, N., Attri, P., Yadav, D. K., Choi, J., Choi, E. H., & Uhm, H. S. (2014). Induced apoptosis in melanocytes cancer cell and oxidation in biomolecules through deuterium oxide generated from atmospheric pressure non-thermal plasma jet. *Scientific reports*, 4(1): 1-13.
- Li, Y., Zhang, T., & Chen, G. Y. (2018). Flavonoids and colorectal cancer prevention. *Antioxidants*, 7(12); 187.
- Li, Z., Qiu, R., Qiu, X., & Tian, T. (2018). SNHG6 promotes tumor growth via repression of P21 in colorectal cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(2): 463-478.
- Liang, Y., Feng, G., Wu, L., Zhong, S., Gao, X., Tong, Y., ... & Zhou, X. (2019). Caffeic acid phenethyl ester suppressed growth and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by inactivating the NF- κ B pathway. *Drug design, development and therapy*, 13: 1335.
- Liang, Y., Wang, S., & Liu, J. (2019). Overexpression of tumor protein p53-regulated apoptosis-inducing protein 1 regulates proliferation and apoptosis of breast cancer cells through the PI3K/Akt pathway. *Journal of Breast Cancer*, 22(2): 172-184.
- Liu, G. L., Han, N. Z., & Liu, S. S. (2018). Caffeic acid phenethyl ester inhibits the progression of ovarian cancer by regulating NF- κ B signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 99: 825-831.
- Liu, H. Z., Liu, G. Y., Pang, W. W., Zhang, H., Zeng, Z. J., & Wang, H. J. (2020). LncRNA LUCAT1 promotes proliferation of ovarian cancer cells by regulating miR-199a-5p expression. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24: 1682-1687.
- Long, J., Guan, P., Hu, X., Yang, L., He, L., Lin, Q., ... & Li, T. (2021). Natural polyphenols as targeted modulators in colon cancer: molecular mechanisms and Applications. *Frontiers in Immunology*, 12: 635484.
- Luo, J., Yan, R., He, X., & He, J. (2017). Constitutive activation of STAT3 and cyclin D1 overexpression contribute to proliferation, migration and invasion in gastric cancer cells. *American journal of translational research*, 9(12): 5671.

- Lv, L., Cui, H., Ma, Z., Liu, X., & Yang, L. (2021). Recent progresses in the pharmacological activities of caffeic acid phenethyl ester. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394(7): 1327-1339.
- M da S Mariano, R., C Bila, W., Trindade, J. F., A Lamounier, J., & S Galdino, A. (2017). Biotechnological patents applications of the deuterium oxide in human health. *Recent Patents on Biotechnology*, 11(2): 76-84.
- Ma, Y., Yang, W., Song, M., Smith-Warner, S. A., Yang, J., Li, Y., ... & Zhang, X. (2018). Type 2 diabetes and risk of colorectal cancer in two large US prospective cohorts. *British Journal of Cancer*, 119(11): 1436-1442.
- Marin, E. H., Paek, H., Li, M., Ban, Y., Karaga, M. K., Shashidharamurthy, R., & Wang, X. (2019). Caffeic acid phenethyl ester exerts apoptotic and oxidative stress on human multiple myeloma cells. *Investigational New Drugs*, 37(5): 837-848.
- Matsunaga, T., Tsuchimura, S., Azuma, N., Endo, S., Ichihara, K., & Ikari, A. (2019). Caffeic acid phenethyl ester potentiates gastric cancer cell sensitivity to doxorubicin and cisplatin by decreasing proteasome function. *Anti-Cancer Drugs*, 30(3): 251-259.
- Mattiuzzi, C., Sanchis-Gomar, F., & Lippi, G. (2019). Concise update on colorectal cancer epidemiology. *Annals of Translational Medicine*, 7(21).
- Mercan, N. N. (2022). *Gıda Kaynaklı Biyoaktif Bileşiklerin Crohn Hastalığı Üzerindeki Etkilerinin In Siliko, In Vitro Ve Moleküler Yöntemler İle Araştırılması* (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.
- Messersmith, W. A. (2019). NCCN guidelines updates: management of metastatic colorectal cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 17(5.5): 599-601.
- Mileo, A. M., Nisticò, P., & Miccadei, S. (2019). Polyphenols: Immunomodulatory and therapeutic implication in colorectal cancer. *Frontiers in immunology*, 10: 729.

- Mosin, O. V., & Ignatov, I. (2015). Heavy Water as Medium for the Life of Organisms. *Journal of Health*.
- Murphy, N., Moreno, V., Hughes, D. J., Vodicka, L., Vodicka, P., Aglago, E. K., & Jenab, M. (2019). Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Molecular Aspects of Medicine*, 69: 2-9.
- Nguyen, T. T., Ung, T. T., Kim, N. H., & Do Jung, Y. (2018). Role of bile acids in colon carcinogenesis. *World journal of Clinical Cases*, 6(13): 577.
- Ocvirk, S., Wilson, A. S., Appolonia, C. N., Thomas, T. K., & O'Keefe, S. J. (2019). Fiber, fat, and colorectal cancer: new insight into modifiable dietary risk factors. *Current Gastroenterology Reports*, 21(11): 1-7.
- Olgierd, B., Kamila, Ž., Anna, B., & Emilia, M. (2021). The pluripotent activities of caffeic acid phenethyl ester. *Molecules*, 26(5): 1335.
- Oršolić, N., & Jazvinščak Jembrek, M. (2022). Molecular and Cellular Mechanisms of Propolis and Its Polyphenolic Compounds against Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18): 10479.
- Padmanabhan, S., Waly, M. I., Taranikanti, V., Guizani, N., Rahman, M. S., Ali, A., ... & Deth, R. C. (2018), Modifiable and non-modifiable risk factors for colon and rectal cancer. In M.I. Waly, M.S Rahman (Eds.), *In Bioactive Components, Diet and Medical Treatment in Cancer Prevention*, Cham: Springer, 121-130.
- Park, C. H., Eun, C. S., & Han, D. S. (2018). Intestinal microbiota, chronic inflammation, and colorectal cancer. *Intestinal Research*, 16(3): 338.
- Patel, M., Horgan, P. G., McMillan, D. C., & Edwards, J. (2018). NF- κ B pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Translational Research*, 197: 43-56.
- Pirali, T., Serafini, M., Cargnin, S., & Genazzani, A. A. (2019). Applications of deuterium in medicinal chemistry. *Journal of medicinal chemistry*, 62(11): 5276-5297.
- Pittalà, V., Salerno, L., Romeo, G., Acquaviva, R., Di Giacomo, C., & Sorrenti, V. (2018). Therapeutic potential of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in diabetes. *Current Medicinal Chemistry*, 25(37): 4827-4836.

- Pop, O. L., Vodnar, D. C., Diaconeasa, Z., Istrati, M., Bințișan, A., Bințișan, V., ... & Gabbianelli, R. (2020). An Overview of Gut Microbiota and Colon Diseases with a Focus on Adenomatous Colon Polyps. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19): 7359.
- Pricci, M., Girardi, B., Giorgio, F., Losurdo, G., Ierardi, E., & Di Leo, A. (2020). Curcumin and colorectal cancer: From basic to clinical evidences. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7): 2364.
- Radhakrishnan, N., Dhanjal, J. K., Sari, A. N., Ishida, Y., Terao, K., Kaul, S. C., ... & Wadhwa, R. (2021). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) confers wild type p53 function in p53Y220C mutant: bioinformatics and experimental evidence. *Discover Oncology*, 12(1): 1-13.
- Radpour, R., Barekati, Z., Kohler, C., Schumacher, M. M., Grussenmeyer, T., Jenoe, P., ... & Zhong, X. Y. (2011). Integrated epigenetics of human breast cancer: synoptic investigation of targeted genes, microRNAs and proteins upon demethylation treatment. *PLoS One*, 6(11): e27355.
- Ranasinghe, R., Mathai, M., & Zulli, A. (2022). A synopsis of modern-day colorectal cancer: Where we stand. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 188699.
- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny*, 14(2): 89-103.
- Rejhová, A., Opattová, A., Čumová, A., Slíva, D., & Vodička, P. (2018). Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 144: 582-594.
- Revathidevi, S., & Munirajan, A. K. (2019). Akt in cancer: mediator and more. *In Seminars in Cancer Biology*, 59: 80-91.
- Rossi, M., Jahanzaib Anwar, M., Usman, A., Keshavarzian, A., & Bishehsari, F. (2018). Colorectal cancer and alcohol consumption—populations to molecules. *Cancers*, 10(2): 38.
- Sahoo, N. K., Sahu, M., Pullaiah, C. P., & Muralikrishna, K. S. (2020). In vitro anticancer activity of Eclipta alba whole plant extract on colon cancer

- cell HCT-116. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1): 1-8.
- Sallam, A. I. I. (2021). *Bioactivities and potential beneficial properties of propolis ethanolic extract, caffeic acid phenethyl ester, and Arabic coffee beans extract* (Yayınlanmamış Doktora Tezi). Pécs Üniversitesi Biyoloji ve Spor Biyoloji Doktora Okulu, Macaristan.
- Sameni, H. R., Yosefi, S., Alipour, M., Pakdel, A., Torabizadeh, N., Semnani, V., & Bandegi, A. R. (2021). Co-administration of 5FU and propolis on AOM/DSS induced colorectal cancer in BALB-c mice. *Life Sciences*, 276: 119390.
- Sari, C., Sümer, C., & Eyüpoğlu, F. C. (2020). Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis in colorectal cancer cells via inhibition of survivin. *Turkish Journal of Biology*, 44(5): 264-274.
- Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arlukowicz, T., & Przybyłowicz, K. E. (2021). A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers*, 13(9): 2025.
- Sepúlveda, C., Núñez, O., Torres, A., Guzmán, L., & Wehinger, S. (2020). Antitumor activity of propolis: recent advances in cellular perspectives, animal models and possible applications. *Food Reviews International*, 36(5): 429-455.
- Sharma, R. (2020). An examination of colorectal cancer burden by socioeconomic status: evidence from GLOBOCAN 2018. *EPMA Journal*, 11(1): 95-117.
- Shi, Y., Wang, S. Y., Yao, M., Sai, W. L., Wu, W., Yang, J. L., ... & Yao, D. F. (2015). Chemosensitization of HepG2 cells by suppression of NF- κ B/p65 gene transcription with specific-siRNA. *World Journal of Gastroenterology*, 21(45): 12814.
- Silva, H., & Lopes, N. M. F. (2020). Cardiovascular effects of caffeic acid and its derivatives: a comprehensive review. *Frontiers in physiology*, 11: 595516.

- Smirnova, S. V., Abilev, S. K., Igonina, E. V., Glaser, V. M., Parmon, V. N., & Yankovsky, N. K. (2018). The Effect of Deuterium on Induction of the ada-Regulon with Alkylating Compounds in the Cells of Escherichia coli. *Russian Journal of Genetics*, 54(8): 919-924.
- Song, M., Bode, A. M., Dong, Z., & Lee, M. H. (2019). AKT as a Therapeutic Target for CancerChallenging Cancer Therapy by Targeting AKT. *Cancer research*, 79(6): 1019-1031.
- Stefani, C., Miricescu, D., Stanescu-Spinu, I. I., Nica, R. I., Greabu, M., Totan, A. R., & Jinga, M. (2021). Growth factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK signaling pathways in colorectal cancer pathogenesis: where are we now?. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19): 10260.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3): 209-249.
- Takeda, H., Nio, Y., Omori, H., Uegaki, K., Hirahara, N., Sasaki, S., ... & Ohtani, H. (1998). Mechanisms of cytotoxic effects of heavy water (deuterium oxide: D2O) on cancer cells. *Anti-cancer drugs*, 9(8): 715-725.
- Tang, H., Yao, X., Yao, C., Zhao, X., Zuo, H., & Li, Z. (2017). Anti-colon cancer effect of caffeic acid p-nitro-phenethyl ester in vitro and in vivo and detection of its metabolites. *Scientific reports*, 7(1): 1-11.
- Tao, J., Li, Y., Li, S., & Li, H. B. (2018). Plant foods for the prevention and management of colon cancer. *Journal of functional foods*, 42: 95-110.
- Tarasiuk, A., Mosińska, P., & Fichna, J. (2018). The mechanisms linking obesity to colon cancer: An overview. *Obesity research & clinical practice*, 12(3): 251-259.
- Taylor, E., Kim, Y., Zhang, K., Chau, L., Nguyen, B. C., Rayalam, S., & Wang, X. (2022). Antiaging Mechanism of Natural Compounds: Effects on Autophagy and Oxidative Stress. *Molecules*, 27(14): 4396.
- Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients*, 11(1): 164.

- Urey, H. C., Brickwedde, F. G., & Murphy, G. M. (1932). A hydrogen isotope of mass 2. *Physical Review*, 39(1): 164.
- Valle, L., Vilar, E., Tavgian, S. V., & Stoffel, E. M. (2019). Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *The Journal of pathology*, 247(5): 574-588.
- Vallès, X., Alonso, M. H., López-Caleya, J. F., Díez-Obrero, V., Dierssen-Sotos, T., Lope, V., ... & Moreno, V. (2018). Colorectal cancer, sun exposure and dietary vitamin D and calcium intake in the MCC-Spain study. *Environment international*, 121: 428-434.
- Verma, A. K. (2021). Emergence of Deuterated Drugs: Probable Start of New Era in the Field of Therapeutics. *EC Veterinary Science*, 6: 48-50.
- Waluga, M., Zorniak, M., Fichna, J., Kukla, M., & Hartleb, M. (2018). Pharmacological and dietary factors in prevention of colorectal cancer. *Journal of physiology and pharmacology*, 69(3).
- Wang, D., Xiang, D. B., He, Y. J., Li, Z. P., Wu, X. H., Mou, J. H., ... & Zhang, Q. H. (2005). Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro. *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(26): 4008.
- Wang, X., Liu, N. M., Zhao, Y. F., Yang, F., Zhu, Z. J., & Song, D. (2022). Research Progress in the Medical Application of Heavy Water, Especially in the Field of D2O-Raman Spectroscopy. *International Journal of Medical Sciences*, 19(8): 1357.
- Wu, W., Gao, F., Heng, X., Song, F., Zhao, Y., Xu, M., ... & Yang, Z. (2017). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) mediated decrease in metastasis of colon cancer cells: an in vitro and in vivo study. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(5): 63-71.
- Xie, B., Nie, S., Hu, G., Xiong, L., Hu, F., Li, M., ... & He, Y. (2019). The involvement of NF- κ B/Klotho signaling in colorectal cancer cell survival and invasion. *Pathology & Oncology Research*, 25(4): 1553-1565.

- Xie, M., Zhao, F., Zou, X., Jin, S., & Xiong, S. (2017). The association between CCND1 G870A polymorphism and colorectal cancer risk: A meta-analysis. *Medicine*, 96(42).
- Xie, Y. H., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1): 1-30.
- Yahya, S., & Sudhandiran, G. (2022). Caffeic acid phenyl ester induces apoptosis in HT29 cells through the modulation of MAPK mediated cellular proliferation and heat shock proteins. *Research Square*. DOI: 10.21203/rs.3.rs-1787502/v1
- Ye, P., Xi, Y., Huang, Z., & Xu, P. (2020). Linking obesity with colorectal cancer: epidemiology and mechanistic insights. *Cancers*, 12(6): 1408.
- Yilmaz, M. B., Erdal, T. U. N. Ç., Ilgaz, N. S., Öksüz, H., Öztecik, E., Özpak, L., ... & Demirhan, O. (2018). Cancerous cell lines alter their genomic organization and karyotype with increased passage number: a cytogenetic study. *Cukurova Medical Journal*, 43(4): 923-930.
- Yoncheva, K., Tzankova, V., Yordanov, Y., Tzankov, B., Grancharov, G., Aluani, D., ... & Petrov, P. (2019). Evaluation of antioxidant activity of caffeic acid phenethyl ester loaded block copolymer micelles. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1): 64-74.
- Yordanov, Y. (2019). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Pharmacodynamics and potential for therapeutic application. *Pharmacia*, 66: 107.
- Yu, H. J., Shin, J. A., Yang, I. H., Won, D. H., Ahn, C. H., Kwon, H. J., ... & Cho, S. D. (2017). Apoptosis induced by caffeic acid phenethyl ester in human oral cancer cell lines: Involvement of Puma and Bax activation. *Archives of oral biology*, 84: 94-99.
- Zachleder, V., Vítová, M., Hlavová, M., Moudříková, Š., Mojzeš, P., Heumann, H., ... & Bišová, K. (2018). Stable isotope compounds-production, detection, and application. *Biotechnology advances*, 36(3): 784-797.
- Zam, W., & Hassan, B. (2019). Diet influence on colorectal cancer. *Progress in nutrition*, 21(2-S): 42-48.

- Zheng, L., Wang, W., Ni, J., Mao, X., Song, D., Liu, T., ... & Zhou, H. (2017). Role of autophagy in tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of osteoblast cells. *Journal of Investigative Medicine*, 65(6): 1014-1020.
- Zhou, E., & Rifkin, S. (2021). Colorectal cancer and diet: Risk versus prevention, is diet an intervention? *Gastroenterology Clinics*, 50(1): 101-111.
- Zhou, N., & Gu, Q. (2018). Prognostic and clinicopathological value of p16 protein aberrant expression in colorectal cancer: A PRISMA-compliant Meta-analysis. *Medicine*, 97(12).
- Zhu, G., Pan, C., Bei, J. X., Li, B., Liang, C., Xu, Y., & Fu, X. (2020). Mutant p53 in cancer progression and targeted therapies. *Frontiers in oncology*, 10: 595187.
- Zinatizadeh, M. R., Schock, B., Chalbatani, G. M., Zarandi, P. K., Jalali, S. A., & Miri, S. R. (2021). The Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes & diseases*, 8(3): 287-297.
- Zuo, D., Li, C., Liu, T., Yue, M., Zhang, J., & Ning, G. (2021). Construction and validation of a metabolic risk model predicting prognosis of colon cancer. *Scientific reports*, 11(1): 1-11.

ÖZGEÇMİŞ

Gülşah DARAMA

A. EĞİTİM

- **Yüksek Lisans:** İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, 2021-2023, İstanbul.
- **Lisans:** İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, 2016-2020, İstanbul.

B. YAYINLARI

- **Darama, G.**, Bora, Ö., Abdik, H., Tekiner, İ. H. (2022). Investigation Of *In Vitro* Therapeutic Potential Of Using Deuterim Oxide In Combination With Caffeic Acid Phenylethyl Ester On Colon Cancer Cell Line. *Uluslararası "Artemis" Fen, Sosyal, Sağlık ve Spor Bilimleri Kongresi*, 12 Eylül 2022. İzmir
- Tekiner, İ. H., **Darama, G.**, Özatila, B., & Yetim, H. Beslenme ve Gıda Teknolojisi Yönünden Yenilebilir Böcekler (2022). *Academic Platform Journal of Halal Lifestyle*, 4(1): 18-29.