

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA APİGENİN FLAVONOİDİNİN
APOPTOZ YOLAK GEN İFADE EDİLMESİNE OLAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet TÜRKTEKİN

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Ece KONAÇ

ANKARA
Eylül 2009

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA APİGENİN FLAVONOİDİNİN
APOPTOZ YOLAK GEN İFADE EDİLMESİNE OLAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet TÜRKTekin

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Ece KONAÇ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2008-13 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Eylül 2009

KABUL VE ONAY

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi: 29 / 09 / 2009



İmza

**Prof. Dr. Adnan MENEVŞE
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**



İmza

**Prof. Dr. Cemalettin AYBAY
Gazi Üniversitesi**



İmza

**Yrd. Doç. Dr. Ece KONAÇ
Gazi Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER	vi
TABLOLAR	ix
SEMBOLLER, KISALTMALAR	x
ÖNSÖZ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Kolon Kanseri	4
2.1.2. HT29 Kolon Kanseri Hücre Hattı	5
2.2. Flavonoidler	6
2.2.1. Apigenin	8
2.2.1.1. Apigenin'in Biyolojik Etkileri	8
2.2.1.1.1. Apoptozu Uyarıcı Etkisi	9
2.2.1.1.2. Proliferasyon, Metastaz ve İnvazyon Önleyici Etkisi	9
2.2.1.1.3. Sinyal Yolaklarına Olan Etkisi	11
2.2.1.1.4. Anti-inflamatuvar Etkisi	12
2.2.1.1.5. Anti-karsinogen Etkisi	12
2.2.1.1.6. Serbest Radikal Toplayıcılarını Uyarıcı Etkisi	13
2.2.1.1.7. Diğer Biyolojik Etkileri	14
2.3. 5-Fluorourasil (5-FU)	14
2.4. Apoptoz	15
2.4.1. Kaspaz 3 (CASP3)	16
2.4.2. Kaspaz 8 (CASP8)	18
2.4.3. Rapamisin' in Memeli Hücrelerindeki Hedefi (mTOR)	19
2.4.4. Siklin D1 (Cyc D1)	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	22
3.1.1. Hücre Kültürü	22
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	22
3.1.3. Kullanılan Sarflar	23
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.1.5. Kullanılan Kitler	24
3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı	25
3.2.1. % 10'luk DMEM Besiyerinin Hazırlanışı	25
3.2.2. % 1'lik DMEM Besiyerinin Hazırlanışı	25

3.2.3.	XTT Karışımının Hazırlanması	25
3.2.4.	0.2M Na ₂ HPO ₄ Çözeltisinin Hazırlanışı	25
3.2.5.	0.1M Sitrik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı	25
3.2.6.	Fosfat-Sitrat Çözeltisinin (pH: 7.8) Hazırlanışı	26
3.2.7.	%0.25 Nonidet P-40 (NP-40) Çözeltisinin Hazırlanışı	26
3.2.8.	1mg/ml Proteinaz K Çözeltisinin Hazırlanışı	26
3.2.9.	1mg/ml Ribonükleaz A (RNaz A) Çözeltisinin Hazırlanışı	26
3.2.10.	10X Tris Borat EDTA (TBE) Stok Çözeltisinin Hazırlanışı	26
3.2.11.	0.5 M EDTA Çözeltisinin Hazırlanışı	27
3.2.12.	1X Tris Borat EDTA (TBE) Tamponunun Hazırlanışı	27
3.2.13.	Oranj G Jel Yükleme Tamponu	27
3.2.14.	Stok Etidyum Bromür Boyasının Hazırlanışı	27
3.2.15.	Agaroz Jelin Hazırlanışı	27
3.2.16.	1X PBS çözeltisinin hazırlanması	28
3.3.	Yöntemler	28
3.3.1.	Hücre Kültürü	28
3.3.2.	XTT Sitotoksisite Deneyi	28
3.3.3.	Floresan Mikroskopunda Apoptozun Değerlendirilmesi	29
3.3.4.	Hücre Çoğalması ELISA, BrdU Deneyi	30
3.3.5.	Sitotoksisite Belirleyici LDH Deneyi	30
3.3.6.	CASP3 Sandwich ELISA Deneyi	31
3.3.7.	Hücre Ölümü Belirleyici ELISA Deneyi	32
3.3.8.	DNA Fragmentasyon Analizi	33
3.3.9.	Agaroz Jel Elektroforezi	34
3.3.10.	Hücre Kültüründen Total RNA Saflaştırılması	34
3.3.11.	cDNA sentezi	36
3.3.11.1.	cDNA RT-PCR Programı	36
3.3.11.2.	Genlerin İfade Edilmesinin Real-Time PCR ile Ölçümü	37
3.3.11.3.	CASP3 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	37
3.3.11.4.	CASP8 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	38
3.3.11.5.	mTOR Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	39
3.3.11.6.	CCND1 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	40
3.3.11.7.	GADPH Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	41
3.3.11.8.	Light Cyclers (LC) Deney Programı	42
3.3.12.	İstatistiksel Analiz Yöntemleri	43
4.	BULGULAR	44
4.1.	HT29 Hücrelerinin Apigenin' e Duyarlılığının XTT Sitotoksisite Yöntemi ile İncelenmesi	44
4.2.	Apoptoz / Nekroz Ayrımının Floresan Mikroskopunda İncelenmesi	48

4.3.	Hücre çoğalması ELISA, BrdU Deney Sonuçları	53
4.4.	Sitotoksisite Belirleyici LDH Deney Sonuçları	54
4.5.	CASP3 Sandwich ELISA Deney Sonuçları	55
4.6.	Hücre Ölümü Belirleyici ELISA Deney Sonuçları	56
4.7.	DNA Fragmantasyon Analizi Sonuçları	57
4.8.	Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi	58
4.9.	Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırması	62
4.9.1.	24. saatte CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 Genlerinin İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi	62
4.9.2.	48. saatte CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 Genlerinin İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi	64
4.9.3.	72. saatte CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 Genlerinin İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi	66
5.	TARTIŞMA	69
6.	SONUÇ	74
7.	ÖZET	76
8.	SUMMARY	78
9.	KAYNAKLAR	80
10.	TEŞEKKÜR	102
11.	ÖZGEÇMİŞ	103

ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER

Şekil 1. Bir kolon kanserinin gelişim evrelerini gösteren enine kesitler.	5
Şekil 2. HT29 hücrelerinin morfolojik görüntüsü.	6
Şekil 3. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.	7
Şekil 4. Apigenin'in kimyasal yapısı.	8
Şekil 5. Apigenin'in hücre döngüsüne etkisi.	10
Şekil 6. Apigenin'in, NF- κ B aracılı yolaktaki anti-inflamatuvar etkisi.	12
Şekil 7. Apigenin'in, detoksifikasyon enzimlerini uyarmasıyla apoptoz sinyal yollarında oluşturduğu etki.	13
Şekil 8. Apoptoza genel bir bakış.	16
Şekil 9. Kaspaz kaskadı.	17
Şekil 10. mTOR sinyal yolağı.	20
Şekil 11. Siklin D1 sinyal yolağı.	21
Şekil 12. CASP3 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi.	37
Şekil 13. CASP8 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi.	38
Şekil 14. mTOR mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi.	39
Şekil 15. CCND1 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi.	40
Şekil 16. GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi.	41
Şekil 17. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları.	45
Şekil 18. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları.	45
Şekil 19. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları.	46
Şekil 20. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin + 5-FU ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları.	47
Şekil 21. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin + 5-FU ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları.	47
Şekil 22. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin + 5-FU ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları.	48
Şekil 23. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.	49

Şekil 24. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.	49
Şekil 25. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.	50
Şekil 26. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin + 5-FU ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.	51
Şekil 27. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin + 5-FU ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.	51
Şekil 28. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin + 5-FU ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.	52
Şekil 29. HT29 hücrelerinde apoptozun morfolojik olarak gösterilmesi.	53
Şekil 30. HT29 hücrelerinin Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen hücre çoğalma oranlarındaki değişim.	54
Şekil 31. HT29 hücrelerinin Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen LDH Salınımı	55
Şekil 32. HT29 hücrelerinin Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen aktif kaspaz 3 oranı.	56
Şekil 33. HT29 hücrelerinin Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen DNA fragmentasyon oranı	57
Şekil 34. HT29 hücrelerinin Apigenin ve Apigenin'in + 5-FU ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonrasında görülen DNA fragmentasyonunun %1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü.	58
Şekil 35. CASP3 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.	59
Şekil 36. CASP8 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.	59
Şekil 37. mTOR geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.	60
Şekil 38. CCND1 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.	60
Şekil 39. GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.	61

- Şekil 40. Apigenin uygulaması sonucunda CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifade düzeylerinin 24. saatte kontrole göre doza bağımlı olarak değişimi. 63
- Şekil 41. Apigenin ve Apigenin+5-FU uygulanması sonucunda CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifade düzeylerinin 24. saatte kontrole göre doza bağımlı olarak değişimi. 64
- Şekil 42. Apigenin uygulaması sonucunda CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifade düzeylerinin 48. saatte kontrole göre doza bağımlı olarak değişimi. 65
- Şekil 43. Apigenin ve Apigenin+5-FU uygulanması sonucunda CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifade düzeylerinin 48. saatte kontrole göre doza bağımlı olarak değişimi. 66
- Şekil 44. Apigenin uygulaması sonucunda CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifade düzeylerinin 72. saatte kontrole göre doza bağımlı olarak değişimi. 67
- Şekil 45. Apigenin ve Apigenin+5-FU uygulanması sonucunda CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifade düzeylerinin 72. saatte kontrole göre doza bağımlı olarak değişimi. 68

TABLÖLAR

Tablo 1. cDNA RT-PCR tepkime karışımı.	36
Tablo 2. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program.	36
Tablo 3. CASP3 Real-Time PCR tepkime karışımı	38
Tablo 4. CASP8 Real-Time PCR tepkime karışımı	39
Tablo 5. mTOR Real-Time PCR tepkime karışımı	40
Tablo 6. CCND1 Real-Time PCR tepkime karışımı	41
Tablo 7. GADPH Real-Time PCR tepkime karışımı	42

SEMBOLLER, KISALTMALAR

4EBP1	: Ökaryotik Başlatma Faktörü 4E Bağlayıcı Protein 1
α	: Alfa
β	: Beta
μ L	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
APAF	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör
BrdU	: 5-bromo-2'-deoksiuridin
Casp3	: Kaspaz 3
Casp8	: Kaspaz 8
CCND1	: Siklin D1 (gen)
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CEA	: Karsino-Embriyonik Antijen
CK2	: Kazein Kinaz II
COX	: Siklooksijenaz
Cyc B1	: Siklin B1
Cyc D1	: Siklin D1 (protein)
DHFU	: Dihidrofluorourasil
DMBA	: Dimetil Benzantrasen
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Media
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DPD	: Dihidropirimidin Dehidrojenaz
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ERK	: Hücre dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz
FCS	: Fetal Sığır Serumumu
FU	: Fluorourasil
g	: Gram
HIF-1 α	: Hipoksiyle Uyarılan Faktör 1 alfa

ICAM	: Hücreler Arası Adezyon Molekülü
IgA	: İmmün Globulin A
iNOS	: Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentaz
JNK	: c-Jun N-terminal Protein Kinaz
KOH	: Potasyum Hidroksit
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LPS	: Lipopolisakkarit
M	: Molar
MAPK	: Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mRNA	: Elçi RNA
mTOR	: Rapamisinin Memeli Hücrelerindeki Hedefi
NF-κB	: Nükleer Faktör-kappa B
nM	: Nanomolar
PARP	: Poli ADP-Riboz Polimeraz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI3K	: Fosfoinozitol 3 Kinaz
PKC	: Protein Kinaz C
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorid
Rpm	: Dakika başına dönme sayısı
sn	: Saniye
Taq	: Thermus aquaticus
TBE	: Tris Borat EDTA
TGF-β	: Değiştirici Büyüme Faktörü beta
TNF-α	: Tümör Nekrozu Faktörü alfa
TP	: Timidin Fosforilaz
TS	: Timidilat Sentaz
VCAM	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
°C	: Santigrad derece

ÖNSÖZ

“Kolon Kanseri Hücre Hattında Apigenin Flavonoidinin Apoptoz Yolak Gen İfade Edilmesine Olan Etkilerinin Araştırılması” konulu bu tez, Gazi Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı’nca 01/2008-13 kod no’lu proje ile desteklenmiştir. Çalışmamız, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

1. GİRİŞ

Flavonoidler, bitki içerisinde yaygın olarak bulunan polifenolik bileşiklerdir. Apigenin, flavonoidlerin flavon alt sınıfının bir üyesi olup, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar sonucunda kanser hücreleri üzerinde, özellikle apoptotik etkisi olmak üzere, başlıca anti-metastatik, anti-proliferatif, anti-inflamatuvar ve anti-mutajenik etkileri gösterilmiştir.

Genetik, çevresel ve besinsel nedenler öncelikli olmasına rağmen yaygın bir kanser türü olan kolon kanserinin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Başlangıç evresinde, herhangi bir belirti göstermediği için geç tanı konulabilen kolon kanseri ilerleme kaydeder ve tedavisi zorlaşır. Genellikle cerrahi müdahale sonrasında kemoterapi uygulanması şeklinde tedavi edilir. Kolon kanseri tedavisinde en sık kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri yüksek sitotoksiteye sahip olduğu bilinen 5-Fluorourasil (5-FU)'dir. Bu kemoterapötik ajanlar ile hedeflenen, gerek protoonkogen aktivasyonu gerekse tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu sonucu sinyal ileti mekanizmalarında meydana gelen değişimlerle çoğalma ve/veya yaşama işlevleri üzerindeki kontrollerini yitiren ve bu şekilde apoptozdan kaçan kanser hücrelerinin ortadan kaldırılması ve/veya apoptoza yönlendirilmesidir.

Apoptoz, programlı hücre ölümünü ifade etmekte olup, birçok farklı sinyal ileti mekanizmaları aracılığıyla uyarılabilmektedir. Bu uyarı, mitokondri aracılı olarak hücre içinden olabileceği gibi, çeşitli reseptörler aracılığıyla dış etmenli de olabilir. Kaspaz 3, her iki şekilde de uyarılabilen kaspaz kaskadının merkezi bir elemanıdır. Kaspaz 8 ise içsel uyarı ile kaspaz 9'un, dışsal uyarı ile kaspaz 3'ün aktifleşmesini sağlayan, kaspaz kaskadının bir diğer önemli üyesidir. Apoptozdan kaçmakta olan kanser hücreleri aynı zamanda, hücre döngüsünün kontrolünde görev alan siklin

D1 geninin ve translasyonel bazı faktörlerin kontrolünde görev alan mTOR geninin de aşırı ifade edilmesine neden olarak sürekli bölünmekte ve çoğalmaktadır. Böylece, bu hücrelerin ikincil tümörler şeklinde organizmaya yayılmaları da kolaylaşmaktadır. Bu nedenle, kanser hücrelerinin normal hücresel işlevlerine geri döndürülebilmesi ya da apoptoz yoluyla yok edilebilmesi için apoptotik süreçler ve bu süreçleri uyarıcı ajanların etki mekanizmaları, moleküler düzeyde açıklığa kavuşturulmalıdır.

Bu tez çalışmasında, p53 mutant HT29 insan kolon adenokarsinom hücre hattında Apigenin'in, tek başına ve 5-FU ile birlikte kullanımı sonucunda apoptoz üzerine olan etkilerinin, DNA, mRNA ve protein düzeyinde araştırılması amaçlandı. Bu amaç kapsamında, apoptotik süreçte etkili olan kaspaz 3 ve kaspaz 8 genleri ile hücre döngüsü ve çoğalmasında etkili olan siklin D1 ve mTOR genlerinin ifadelerindeki değişimin mRNA düzeyinde araştırılması hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

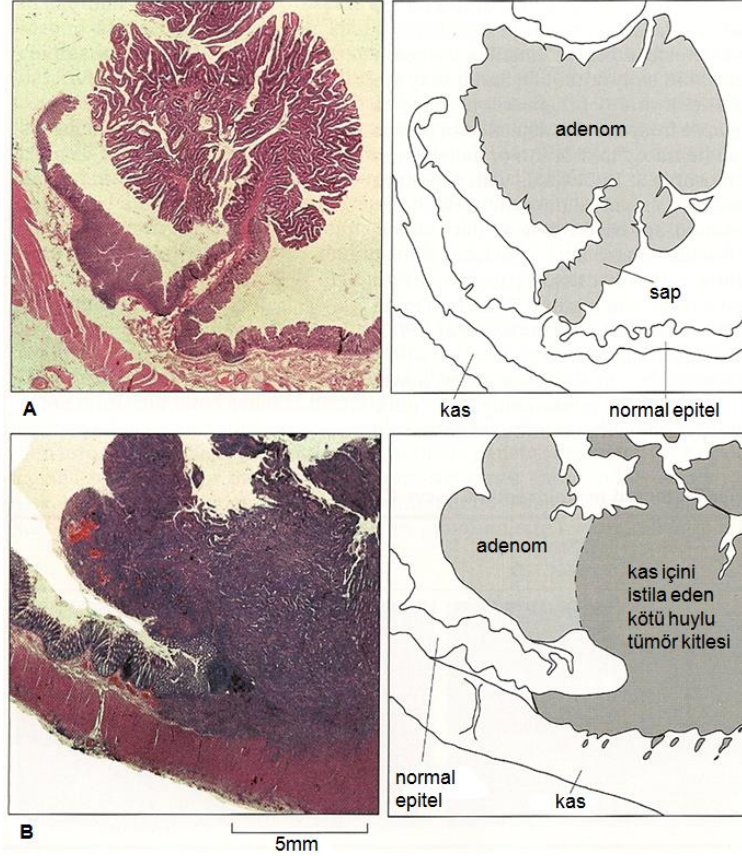
Kanser, hücre ölüm programı bozulmuş, kontrolsüz bölünen hücrelerin aşırı çoğalması sonucu oluşan neoplastik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Kanser kelime anlamı olarak Yunanca yengeç anlamına gelen *canceros* kelimesinden köken almaktadır. Bu kelimenin, yine Yunanca köken anlamına gelen *genesis* kelimesiyle birleştirilmesi sonucunda da kanser oluşumunu ifade etmek üzere karsinogenez terimi türetilmiştir. Karsinogenez, hücrenin yaşaması, büyümesinin kontrolü ve farklılaşması gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesinden kaynaklanmaktadır. Karsinogenez, bu genetik değişimlerle birlikte, protoonkogen aktivasyonunu ve tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunu da içeren çoklu bir süreç olarak belirtilmektedir. Kanser gelişim sürecinde tümör hücreleri iki önemli özellik sergilemektedir. Bunlardan birincisi, normal bir hücre bölünmesinin sahip olduğu sınırlamalara karşı koyarak çoğalmaya devam etmeleridir. İkincisi ise diğer hücrelerin yaşam alanlarına yayılmaları ve yerleşmeleridir. Çeşitli kontrol mekanizmalarının denetiminden kurtulan hücreler çoğalmalarına devam ederek, sıra dışı büyüyen anormal hücre kitlesinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu kitlelere tümör ya da neoplazma adı verilmektedir. Bu tümör hücreleri tek bir kitle içinde kümelenmiş bir şekilde durdukları sürece iyi huylu olarak sınıflandırılmaktadır. İyi huylu bu kitleler cerrahi müdahaleler ile çıkartılarak bireyin tam tedavisi sağlanabilmektedir. Ancak bu tümör hücreleri kötü huylu (malin) ise yani etrafındaki dokuya yayılma ve yerleşme yeteneği kazanmış ise kanser olarak kabul edilmektedir. Tümör hücrelerinin çevre dokuya yayılma ve yerleşmesi, doku bütünlüğünü bozma, kan dolaşımına ya da lenf damarlarına girme ve vücudun diğer bölgelerine, metastaz olarak adlandırılan, ikincil tümörler oluşturma yeteneğini ifade etmektedir¹⁻⁴.

Kanseri moleküler düzeyde anlamak için ilgili mutasyonları ve bunların kanser hücresi davranışını nasıl ortaya çıkardığını belirlemek gerekmektedir. İnsan kanser türlerinde mutasyona uğramış 100'den fazla gen tespit edilmiş olmasına karşın, halen keşfedilmeyi bekleyen çok daha fazlası olduğu düşünülmektedir^{2, 3}. Geçirdiği mutasyonlar sonucu kanser oluşumuna katkısı olan genler, gen ürününün daha çok ya da daha az etkin olmasına göre iki ana sınıf altında gruplandırılabilir. Birinci sınıftaki genler, işlev kazandıran bir mutasyonun hücreyi kansere doğru yaklaştırdığı protoonkogenlerdir. Bunların mutant ve aşırı etkin formları da onkogen olarak adlandırılmaktadır. İkinci sınıftaki genler, işlev kaybı mutasyonlarına uğramaları halinde kanser oluşumu riskini artıran tümör baskılayıcı genlerdir. Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığıyla malin fenotipin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Sinyal iletim yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır^{5, 6}. Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırmakta ve apoptozdan kaçmasına neden olmaktadır. Böylelikle onkojenik sinyal iletimi, tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır¹.

2.1.1. Kolon Kanseri

Kolon kanseri, kolon ve rektumu kaplayan epitel tabakasından köken alan yaygın bir kanser türüdür. Amerika'da her yıl 130.000 kişi yeni tanı almakta, bunlardan 50.000'ine yakını ölümle sonuçlanmaktadır⁷. Genellikle yaşamın geç dönemine kadar görülmemektedir. Bununla birlikte normal erişkinlerin kolonoskopi ile yapılan olağan kontrolleri sırasında, çoğunlukla polip adı verilen doku çıkıntıları şeklinde bağırsak epitelinde adenomlar ya da küçük iyi huylu tümörler görülmektedir (Şekil 1A). Bu adenomatöz poliplerin kolon kanserlerinin büyük çoğunluğunun öncülleri olabileceği düşünülmektedir.

Hastalığın gelişimi genellikle çok yavaş olduğundan, henüz kötü huylu yapıya dönüşmemiş, yavaşça büyüyen tümörün tespit edilmesi için tipik olarak 10 ile 35 yıl gerekmektedir^{1, 3, 8}.



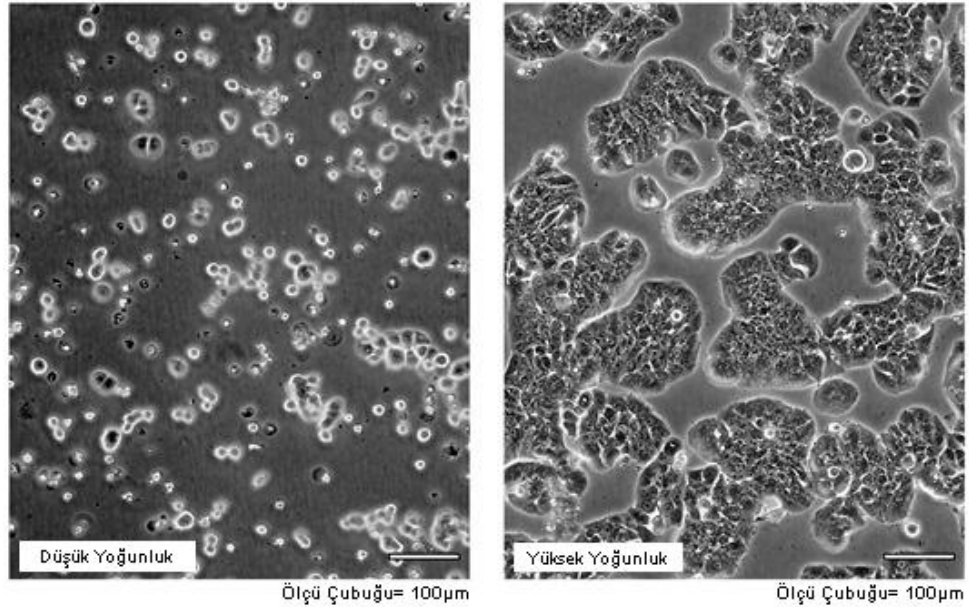
Şekil 1. Bir kolon kanserinin gelişim evrelerini gösteren enine kesitler¹.

Hastalığın daha sonraki evrelerinde tümör hücreleri, öncelikle epitelyum bazal laminasını aşp daha sonra bağırsağı çevreleyen kas tabakasından yayılırlar (Şekil 1B). Daha sonrasında ise lenf düğümlerine, karaciğere, akciğere ve diğer dokulara metastaz yaparak ilerlerler^{1, 3}.

2.1.2. HT29 Kolon Kanseri Hücre Hattı

HT29 hücre hattı, kaynağı insan kolonu olan bir adenokarsinomdur. Hücreler, epitelyal morfolojiye sahiptir (Şekil 2). Tümör

baskılayıcı bir gen olan p53 için mutanttır. HT29' un yapısal özellikleri içerisinde, mikrovili, mikrofilament, koyu tanecikli büyük boşluklu mitokondri, serbest ribozomları olan granüllü endoplazmik retikulum, düz endoplazmik retikulum, lipid damlacıkları, birkaç tane birincil ve ikincil lizozom yer aldığı belirtilmektedir. HT29'un hücresel ürünleri arasında, Immunglobulin A (IgA) salgı komponenti, karsino-embriyonik antijen (CEA), değiştirici büyüme faktörü beta (TGF- β) bağlayıcı protein ve mûsin bulunmaktadır⁹.



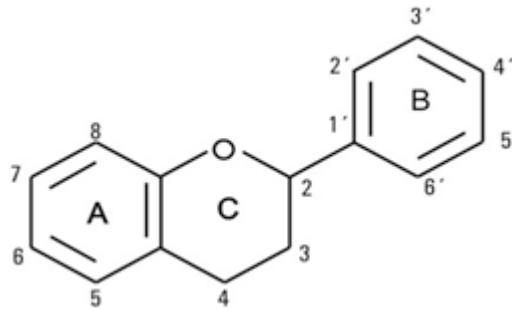
Şekil 2. HT29 hücrelerinin morfolojik görüntüsü (<http://www.lgcstandards-atcc.org/Attachments/1986.jpg>).

2.2. Flavonoidler

Fenil alaninden türevlenen fenolik bileşiklerden olan flavonoidler, bitkilerin meyve, tohum, çiçek, yaprak ve gövdelerinde bulunan renkli maddelerdir. Bitkilerin yaşamlarında birçok mekanizmada iş gören flavonoidler aynı zamanda birçok ülkenin geleneksel halk tıbbında kullandığı preparatların içerisinde bulunmakta ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Kansere karşı koruyuculuğu olduğu da

düşünülen flavonoidler, bitki yapılarında en yaygın ve bol bulunan polifenol bileşigidir¹⁰⁻¹⁴.

Ortak bir fenilkroman yapısının (C6-C3-C6) bir veya daha fazla hidroksil alt grubu ile oluşturduğu ve kimyasal olarak 5000'e yakın tanımlanmış alt tipi bulunan bir gruptur^{13, 14}. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı Şekil 3'de gösterilmektedir.



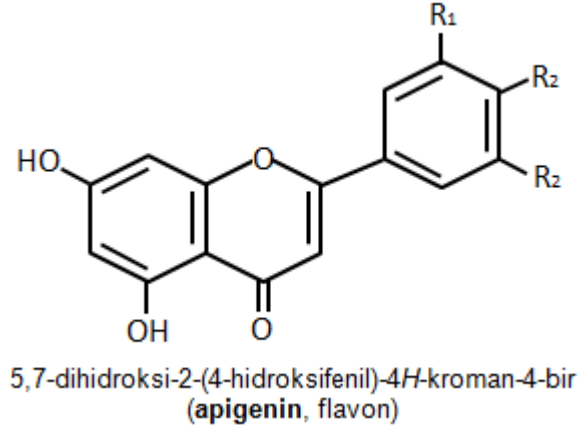
Şekil 3. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.

Flavonoidler, 6 alt sınıfa ayrılmaktadır; (1) flavonlar, (2) flovonollar, (3) izoflavonlar, (4) kateşinler, (5) flavononlar ve (6) antosiyanidinler⁸.

Flavonoidlerin *in vivo* ve *in vitro* pek çok memeli sistemde, serbest radikal toplayıcısı, anti-oksidan, anti-inflamatuvar, anti-mutajenik, anti-viral ve bağırsak temizleyicisi olarak sergilediği biyolojik etkileri gösterilmiştir¹⁴. Flavonoidlerin bu biyolojik etkinlikleri göstermesinde 5 farklı temel eylemi sergileme yetenekleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Flavonoidlerin sahip oldukları bu 5 farklı temel yetenekleri; apoptozu uyarma, hücre döngüsünü durdurma, oksidatif stresi azaltma, detoksifikasyon enzimlerinin etkinliğini artırma ve bağışıklık sistemini uyarma şeklinde belirtilmektedir¹⁴⁻¹⁶.

2.2.1. Apigenin

Apigenin, flavonoidlerin flavon yapı sınıfı içerisinde yer almaktadır. Aynı zamanda 4',5,7 – trihidroksiflavon olarak da bilinmektedir. Düşük molekül ağırlıklı olup saf halde sarı iğne şeklindedir. Suda çözünmeyip, seyreltik Potasyum Hidroksit (KOH) veya Dimetil Sülfoksit (DMSO) ile çözünmektedir. Saf halde oldukça kararsız olup -20°C 'de depolanması gerekmektedir⁸. Şekil 4'de Apigenin'in kimyasal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 4. Apigenin'in kimyasal yapısı.

2.2.1.1. Apigenin'in Biyolojik Etkileri

Apigenin, kanser hücrelerine karşı koruyucu olma özelliğiyle birlikte aynı zamanda düşük toksisiteye de sahip olması nedeniyle yapısal olarak kendisine benzeyen diğer flavonoidlerden ayrılmaktadır¹⁷. Apigenin'in, kanser hücrelerinde apoptozu uyarıcı etkisinin dışında, başlıcaları anti-karsinojenik, anti-proliferatif, anti-inflamatuvar ve kazein kinaz II (CK2) inhibitörü olmak üzere birçok biyolojik etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir¹⁸.

2.2.1.1.1. Apoptozu Uyarıcı Etkisi

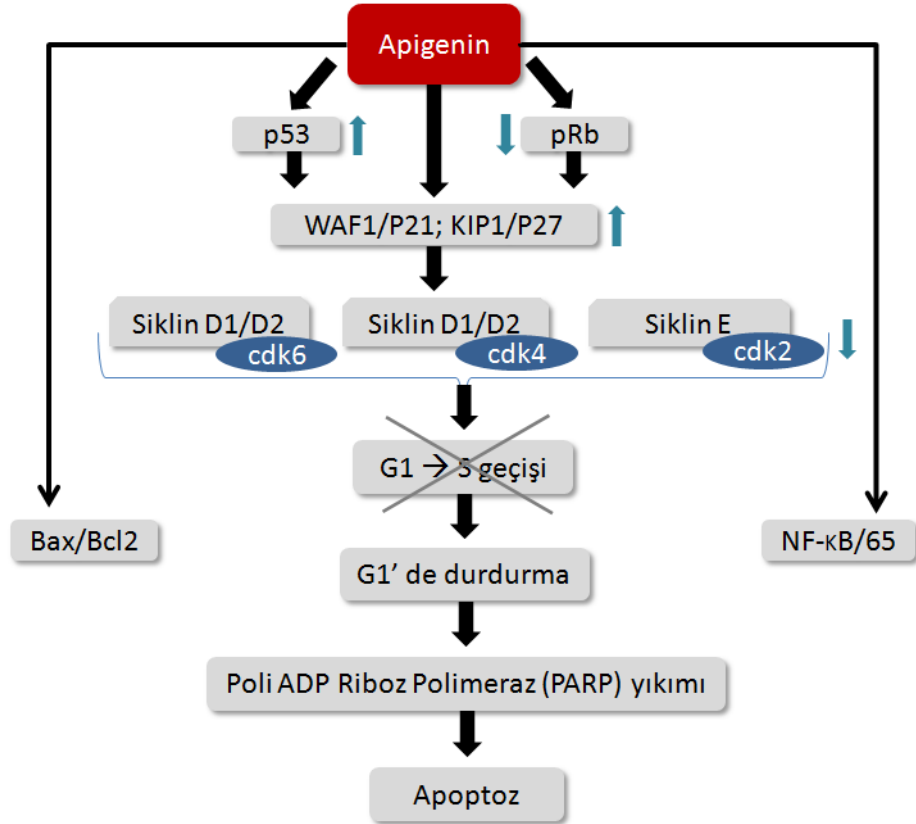
İnsan prostat kanseri hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada, Apigenin'in doza bağımlı olarak apoptozu uyardığı gösterilmiş ve sitotoksik etkisinin düşük olduğu bildirilmiştir¹⁷. SW480 ve Caco-2 insan kolon karsinoma hücre hatları üzerinde Apigenin ve 7 analogu ile birlikte yapılan çalışmada, Mirisetin ve Naringenin dışındaki analogların apoptozun uyarılmasında doza bağımlı olarak anlamlı sonuçlar verdiği, bu analogların Apigenin ile birlikte düşük dozda birlikte kullanımının daha az sitotoksik etki oluşturduğu bildirilmiştir¹⁹.

Apigenin'in apoptozun uyarılmasında birçok apoptotik faktöre karşı etkili olduğu saptanmıştır. Kan kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, Apigenin'in kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesini artırarak apoptozu uyardığı gösterilmiştir²⁰. Apigenin, kaspaz aktivitesini ve poli ADP-riboz polimerazın (PARP) parçalanmasını sağlayan apoptotik proteaz aktive edici faktör (APAF-1)'ü uyarmakta, sitokrom c'nin serbest kalmasını sağlamakta ve böylece Bax/Bcl-2 oranını apoptoz lehinde değiştirmektedir²¹. Bir diğer çalışmada, kolon kanseri hücrelerinin, Apigenin kullanımı ile tümör nekrozu faktörü alfa (TNF- α) aracılı apoptoza karşı duyarlı hale geldiği bildirilmiştir²². Bunlara ek olarak, Apigenin'in çeşitli malin hücrelerde apoptozu arttırdığı bildirilmiştir²³⁻²⁵.

2.2.1.1.2. Proliferasyon, Metastaz ve İnvazyon Önleyici Etkisi

Kanser hücreleri üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar, Apigenin kullanımının hücre çoğalmasında etkili olan gen ifade düzeylerinde azalışa neden olduğunu göstermektedir^{21, 26-28}. Apigenin'e maruz bırakılan kolon kanseri hücrelerinde hücre büyümesi inhibe olmaktadır. Bunun p34 (cdc2)

ve siklin B1 (Cyc B1) proteinlerinin azalması ve p34 kinazın inhibisyonuyla birlikte hücre döngüsünün G2/M safhasıda geri dönüşümlü olarak durması sonucu olduğu bildirilmiştir²⁶. Androjen duyarlı insan prostat kanser hücre hatlarında WAF1/P21 düzeyini artırarak hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozisi indüklediği gösterilmiştir^{21, 27}. İnsan prostat kanser hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada, Apigenin'in p38 ve fosfoinozitol 3 kinaz (PI3K) / Akt ifade edilme düzeyindeki azalma ile ilişkili olarak siklin D1 (Cyc D1) ifade düzeyinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Apigenin'in Siklin D1, D2 ve E ile bunların hücre döngüsünün G0/G1 safhasında görevli düzenleyicileri olan siklin bağımlı kinaz (CDK) 2, 4 ve 6'da azalma sağladığı bildirilmiştir²⁸. Bu durum Şekil 5'de özetlenmiştir.



Şekil 5. Apigenin'in hücre döngüsüne etkisi.

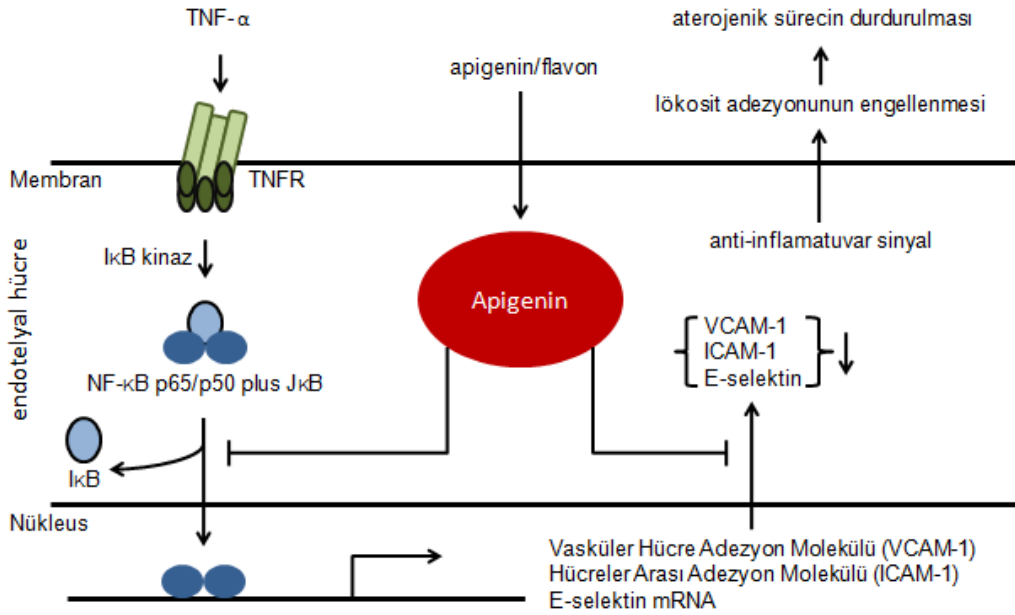
Apigenin'in, insan over kanser hücrelerinde, PI3K/Akt/p70S6K1 ve HDM2/p53 aracılı hipoksiyle uyarılan faktör 1 alfa (HIF-1 α) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ifade edilmesini inhibe ettiği gösterilmiştir²⁹. Apigenin'in tümör hücreleri ile endotelial hücreler arasındaki etkileşimi bozarak akciğer melanom metastazlarını engellediği belirtilmiştir³⁰. Üstelik, endotel hücrelerin Apigenin'e maruz kalması, HIF-1 α proteininin yıkımı aracılığıyla oluşan anjiyogeneizde önemli bir faktör olan VEGF'nin baskılanması ile sonuçlanmıştır³¹. Apigenin, proteaz ürünleri tarafından düzenlenen metastaz ve tümör hücre yayılımını da inhibe etmektedir³². Bunlara ek olarak, çeşitli malin hücrelerde hücre döngüsünü geri dönüşümlü olarak durdurarak apoptoza yardımcı olduğu bildirilmiştir^{21, 27, 33, 34}.

2.2.1.1.3. Sinyal Yolaklarına Olan Etkisi

Apigenin'in moleküler düzeydeki etkilerinin geniş bir alanda işe yaradığını gösteren çok çeşitli çalışmalar bulunmaktadır³⁵⁻³⁹. Apigenin'in, kanser önleyici aktivitesini mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) kaskadını düzenleme yeteneği aracılığıyla sergilediği gösterilmiştir. Apigenin, protein tirozin kinazların da inhibitörüdür ve hepatositlerdeki bir MAPK olan peroksizom proliferasyonunu düzenleyici kinazı (ERK) durdurduğu gösterilmiştir³⁵. Apigenin'in, C3H1 fare embriyonik fibroblastlarının transformasyonunu ve Harvey rat sarkoma viral onkogen homologu (v-Ha-ras) değiştirilmiş NIH3T3 hücrelerinde, protein kinaz C (PKC) aktivitesini ve MAPK'yı inhibe ettiği bildirilmiştir. Bunlara ek olarak Apigenin'in, insan prostat ve meme kanseri hücrelerinde CK2 ifadesini inhibe ettiği gösterilmiştir^{36, 37}. Apigenin, ERK ve p38 kinazın fosforilasyonunu doz bağımlı olarak arttırmaktadır. Ancak c-jun amino terminal kinaz (JNK) fosforilasyonuna olan etkisi çok azdır³⁸. Apigenin, insan endotelial hücrelerinde TNF α ile uyarılmış hücreler arası adezyon molekülü 1 (ICAM1)'in miktarsal artışını da inhibe etmektedir³⁹.

2.2.1.1.4. Anti-inflamatuvar Etkisi

Fare makrofajlarında, lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış siklooksijenaz 2 (COX-2) ve nitrik oksit sentaz 2 (iNOS) aktivitesini ve ifadesini baskıladığı gösterilmiştir⁴⁰. Farklı bir çalışmada, insan umbilikal ven endotelial hücrelerinde, TNF α tarafından uyarılan nükleer faktör kappa B (NF- κ B)'yi baskılayarak iyileşme sağlandığı görülmüştür⁴¹. Şekil 6'da, Apigenin'in NF- κ B'yi baskılaması sonucu vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM1), ICAM1 ve E-selektin ifadesini azalttığı gösterilmiştir.



Şekil 6. Apigenin'in, NF- κ B aracılı yolaktaki anti-inflamatuvar etkisi.

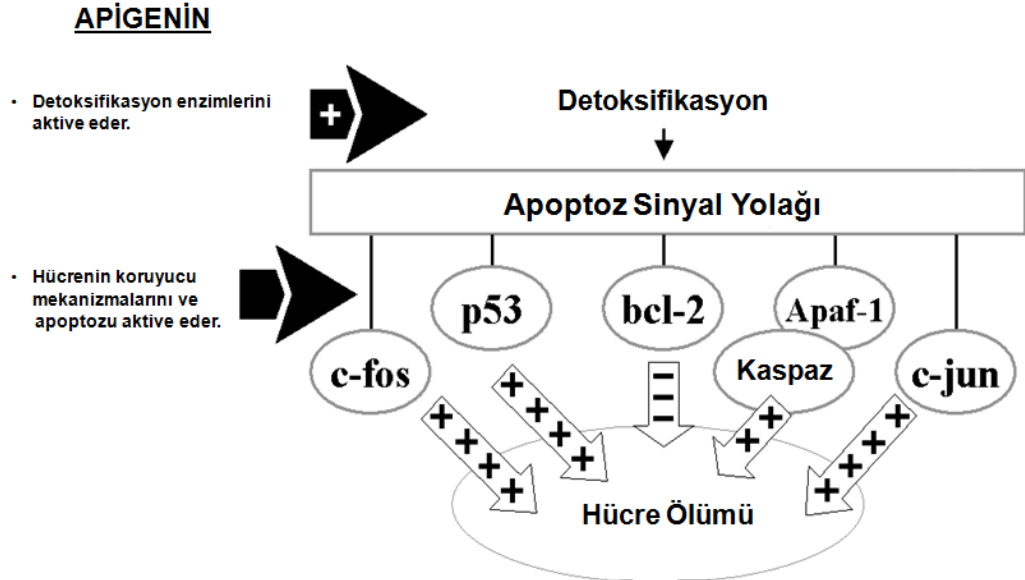
2.2.1.1.5. Anti-karsinojen Etkisi

Apigenin'in, dimetil benzantrasen (DMBA) ile indüklenmiş deri tümörü gelişimini inhibe ettiği görülmüştür⁴². Apigenin'in, bir deri karsinogenez modelinde, antikarsinojenik etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, kolon kanseri modelleri ve sıçan derisi, karsinojenik

müdahale yapılmadan önce Apigenin'e maruz bırakıldığında, Apigenin'in koruyucu bir etki sağladığı görülmüştür^{38, 43}.

2.2.1.1.6. Serbest Radikal Toplayıcılarını Uyarıcı Etkisi

Apigenin, oksidatif strese karşı endojen savunmayı güçlendiren glutatyonun hücre içi konsantrasyonunu arttırmaktadır⁴⁴. Bir başka çalışmada, Apigenin'in tümör gelişiminde önemli bir role sahip olan ornitin dekarboksilaz enziminin kuvvetli bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir⁴². Ayrıca, *in vivo* tümör modellerinde ve hücre kültürlerinde de faz II detoksifikasyon enzimlerini uyardığı bildirilmiştir⁴⁵. Uyarılmış detoksifikasyon enzimlerinin çeşitli apoptoz sinyal yolları üzerine olan etkisi Şekil 7'de gösterilmiştir. Apigenin'in Caco-2 hücrelerinde faz II detoksifikasyon enzimi olan UGT1A1'in ifade edilmesini doz ve zamana bağlı olarak arttırdığı belirtilmiştir⁴⁶.



Şekil 7. Apigenin'in, detoksifikasyon enzimlerini uyarmasıyla apoptoz sinyal yollarında oluşturduğu etki.

2.2.1.1.7. Diğer Biyolojik Etkileri

Çin hamster over hücrelerinde nitropiren ile uyarılmış genotoksisiteye karşı anti-mutajenik özellik gösterdiği görülmüştür. Yapılan bu çalışmada Apigenin'in, 2-aminoantrasen ve benzopiren ile uyarılmış bakteriyel mutagenезisi engellediği gösterilmiştir⁴⁷. Apigenin'in kanser gelişimi ve ilerleyişi ile ilgili transkripsiyonel ve translasyonel düzeylerde olmak üzere diğer önemli etkileri arasında, ısı şoku (stres) proteinleri³¹, telomeraz⁴⁸, yağ asidi sentaz⁴⁹, matriks metalloproteinaz⁵⁰, aril hidrokarbon reseptör aktivitesi⁵¹ ve HER2/neu⁵² gelmektedir.

2.3. 5-Fluorourasil (5-FU)

5-Fluorourasil (5-FU), yapısının C-5 pozisyonunda hidrojen yerine florin atomu içeren bir urasil analogudur. Kemoterapide, özellikle kolon kanseri hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır⁵³. 5-FU, hücre içine girdikten sonra aktif metabolitlerine dönüşerek timidilat sentaz (TS) aktivitesini ve DNA sentezini bozmaktadır^{54, 55}. Bazı çalışmalarda 5-FU'in timidin fosforilaz (TP)'ın uyarılmasında etkili olduğu bildirilmiştir^{56, 57}. 5-FU'in inaktivasyonu ise hücre içinde dihidropirimidin dehidrojenaz (DPD) tarafından dihidrofluorourasil (DHFU)'e dönüştürülerek gerçekleşmektedir⁵⁸. Sitotoksik etkisi nedeniyle DNA hasarı cevabına neden olmaktadır. Bunun sonucunda da hücre döngüsünün durmasına ve/veya apoptoz oluşumuna sebep olmaktadır. Çeşitli kanser hücrelerinde, Bcl-2 ifade düzeyindeki aşırı artış ile 5-FU'e karşı olan direnç arasında ilişki bulunmuştur^{59, 60}. Yapılan farklı çalışmalarda da yine 5-FU ile Bad, Bid⁶¹ ve Fas^{62, 63} proteinlerinin ifade edilme düzeyleri arasında ilişki olduğu belirtilmiştir.

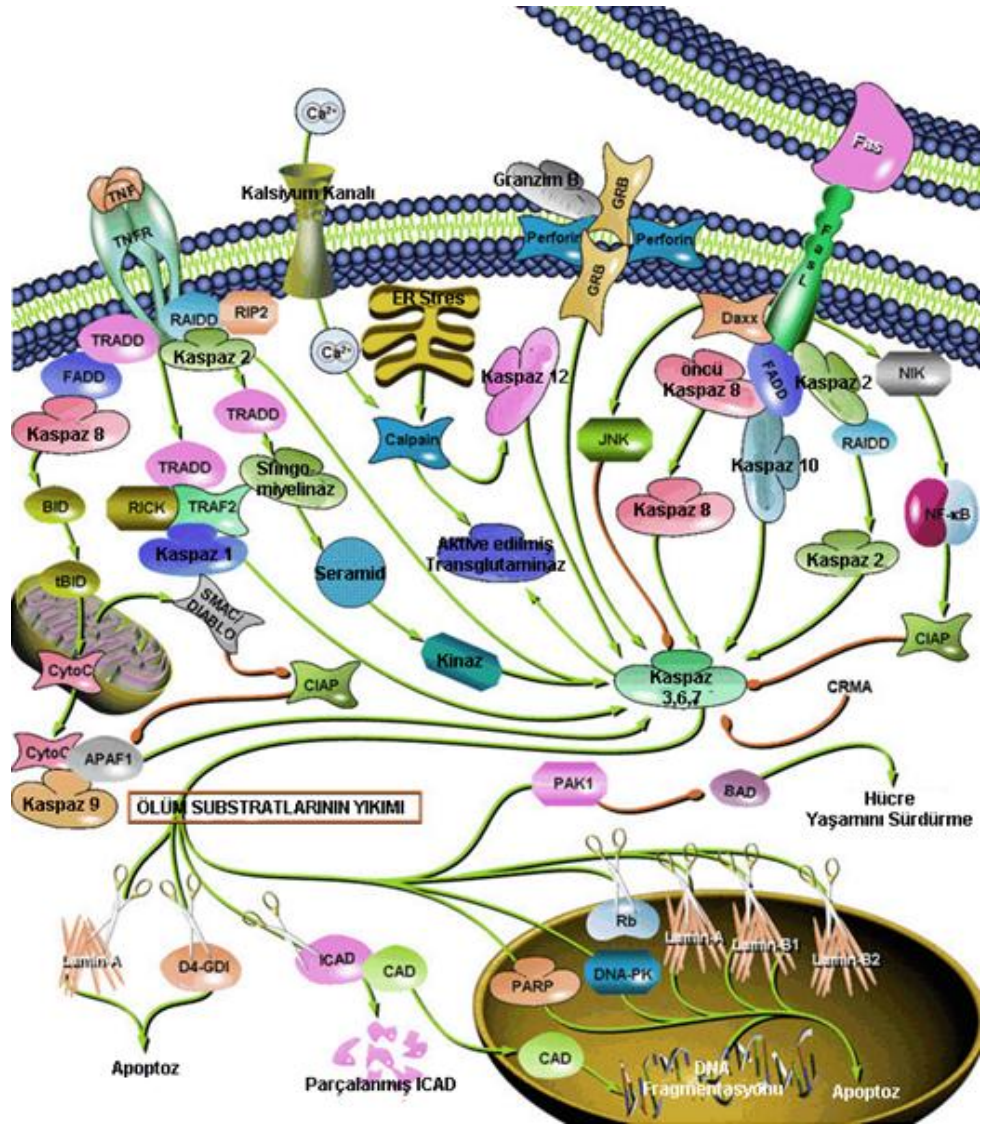
2.4. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk olarak 1972'de Kerr tarafından tanımlanmıştır. Nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şeklini, hücrenin fizyolojik ölümünü ifade etmek için kullanılmıştır. Eski bir Yunan terimi olan apoptoz, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma aracılığıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak da tanımlanmaktadır⁶⁴⁻⁶⁶. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar aracılığıyla gerçekleşen hücresel lezyonların ya da genetik faktörlerle aktive edilen hücresel intihar programının apoptoza neden olduğu söylenmektedir^{64, 65}.

Apoptoz, normal gelişim sırasında ve erişkin organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında özgün hücrelerin kaybindan sorumludur. Apoptotik hücre sayısı kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirleyen bir parametre olduğundan, apoptozun işlevsel mekanizmaları da hücrede bir denge unsuru oluşturmaktadır^{64, 67}. Apoptoz oranının azalması ile hücre sayısı artmaktadır. Aksine, eğer apoptoz oranı artarsa hücre sayısı azalarak istenmeyen doku hasarı meydana gelmektedir. Günümüzde insanı da içeren memeliler grubunda üretkenliğin dengelenmesinde apoptozun önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir⁶⁸. Ayrıca birçok hastalığın genetiğinde de bu değişimler söz konusudur⁶⁹.

Apoptoz esnasında gözlenen genetik olaylar hem toksik ilaçların hücre ölümünü bu yolla gerçekleştiriyor olması, hem de bu işlemde tümör baskılayıcı genler ve onkoproteinlerin birlikte yer alıyor

yolağı apoptozu başlatabilir. Bu farklı uyarıcıların, ölümün kaçınılmaz fenotipinden sorumlu olan ortak bir hücresel yolda birleştiği düşünülmektedir^{70, 71}. Bu hipotezle tutarlı olarak, *Caenorhabditis elegans*'ın hücre ölüm geni ced-3'ün memeli homologu olarak tanımlanmış interlökin-1b enzimine işlevsel ve yapısal özellikleri ile benzeyen bir proteaz kaskadı ile ölümün apoptoz merkezli olduğunu doğrulanmıştır⁷². Bu kaskada, kaspaz (sistein aspartat-özgün proteaz) adı verilmektedir⁷³ (Şekil 9).



Şekil 9. Kaspaz kaskadı. (http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Caspase_Cascade)

Aktif hale getirilen kaspaz, apoptoz sürecinde proteoliz ile DNA'nın parçalanmasına ve morfolojik değişikliklere katkıda bulunur. PARP içeren birkaç anahtar substratı baskılar. Kaspazların yeni tanımlanmış bir üyesi olan Kaspaz 3 aslında daha önce CPP32/Yama/Apopain olarak adlandırılmıştır⁷⁴⁻⁷⁶. Kaspaz 3, *C. Elegans*'da bulunan ced-3 genine özgü substrata ve homoloji dizisine en yakın kaspazdır. Bununla birlikte kaspaz-3'ün çeşitli apoptotik sistemlerde genellikle en çok aktif edilen kaspaz olduğu gösterilmiş ve hücre ölümü işlemlerinde önemli bir rolü olduğu ileri sürülmüştür⁷³.

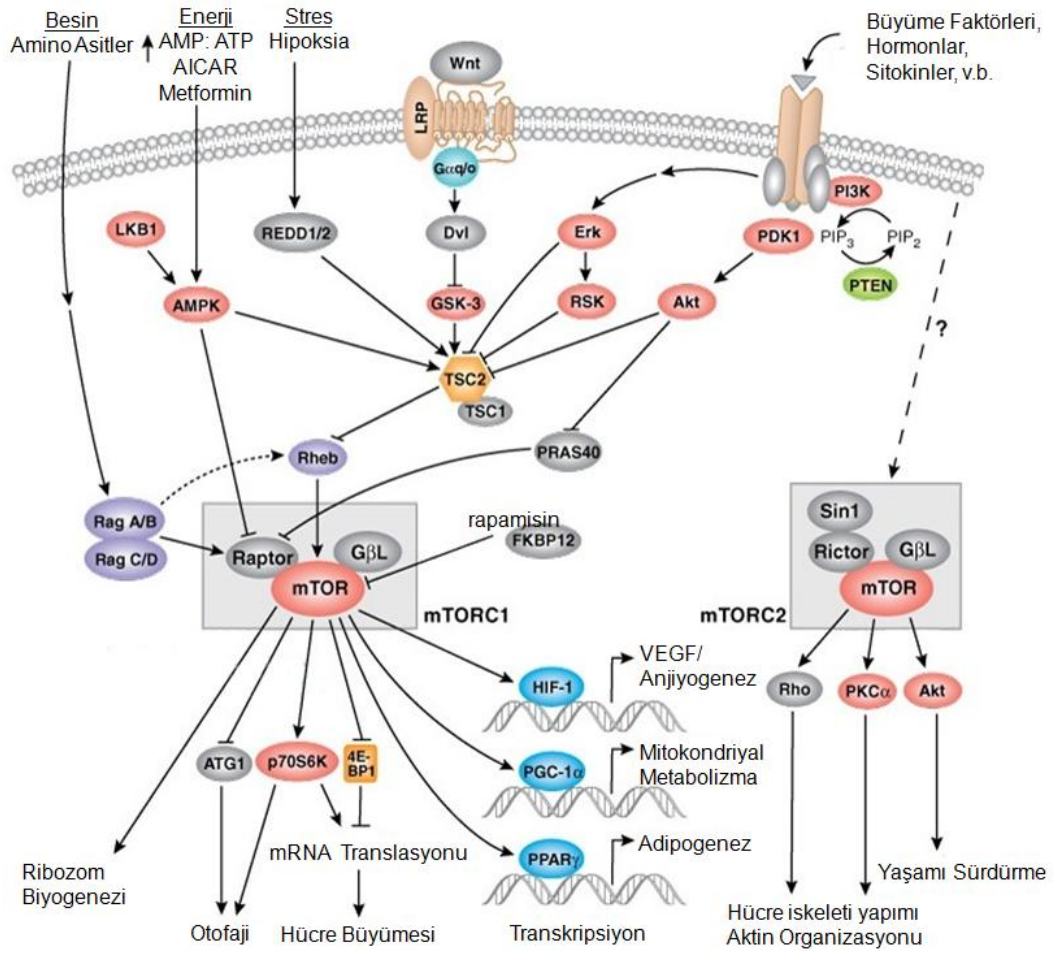
2.4.2. Kaspaz 8 (CASP8)

Apoptoz, mitokondri aracılı içsel bir yolak ya da ölüm reseptörlerinin aktivasyonu şeklinde dışsal bir yolak tarafından başlatılabilir⁷⁷. Ölüm reseptörleri aracılı yolak, reseptörlerin ligandı ile etkileşime girmesi ile uyarılır. Bunu sırasıyla, reseptörle ilişkili ölüm bölgelerinin, kaspaz 8'in ve kaspaz 3'ün uyarımı izler. Daha sonra kaspaz 3, apoptoza yol açan çeşitli substratları parçalar. Buna karşılık, mitokondri aracılı yolakta aktifleşmiş olan kaspaz 8, mitokondri zar geçirgenliğinin değişmesini uyarır. Böylece, Smac/Diablo ve sitokrom c mitokondriden serbest bırakılır. Sitozole çıkan sitokrom c, APAF1 ile birlikte kaspaz 9'u aktif hale getirir. Bu da kaspaz 3'ü aktifleştirir⁷⁸. Sitozole çıkmış olan Smac/Diablo, apoptoz protein ailesinin kaspaza bağlanmasını engelleyen inhibitör ile yarışarak kaspaz 9 aktivasyonunu uyarır^{79, 80} (Şekil 9). Mitokondri aracılı apoptoz, mitokondri zar geçirgenliğini kontrol eden Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir⁸¹⁻⁸³.

2.4.3. Rapamisin' in Memeli Hücrelerindeki Hedefi (mTOR)

Rapamisin'in memeli hücrelerindeki hedefi (mTOR), PI3K ailesine mensup bir serin/treonin protein kinazdır. Enerji gereksinimi, beslenme ve büyüme faktörlerinden kaynak alan sinyallerle düzenlenmekte olan hücre büyüme ve farklılaşması gibi evrimce korunmuş yolların temelinde yer almaktadır^{84, 85}. mTOR, bilinen iki farklı işlevsel yapıya sahiptir; mTORC1 ve mTORC2. mTORC1, mTOR'a özgü inhibitör olan rapamisine duyarlıdır. mTORC2 ise rapamisine dirençlidir^{86, 87}. mTORC1, direk fosforilasyon yoluyla gerek ökaryotik başlatma faktörü 4E bağlayıcı protein 1 (4EBP1) inaktivasyonunu ve gerek S6 kinazın (p70S6 K) aktivasyonu sağlayarak translasyon mekanizmasını düzenlemektedir. 4EBP1, ökaryotik başlatma faktörü 4E (eIF4E) ile dimer oluşturarak başlangıç kompleksinin oluşumunu engellemektedir. 4EBP1 fosforile olduğunda ise eIF4E serbest kalmakta ve translasyon başlamaktadır⁸⁸ (Şekil 10). p70S6 K kinazın temel substratı, 40S ribozomal alt birimin bir parçası olan ribozomal protein S6'dır. Ribozomal protein S6, 5' terminal oligopirimid genleri tarafından kodlanmış proteinlerin translasyonu ile ilişkilidir. Bu proteinlerin çoğu protein sentezini düzenler ve protoonkogenler olarak rol oynayabilirler⁸⁹. Bu bağlamda, mTOR sinyal aktivitesi kanser hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalması ile ilişkilidir^{90, 91}.

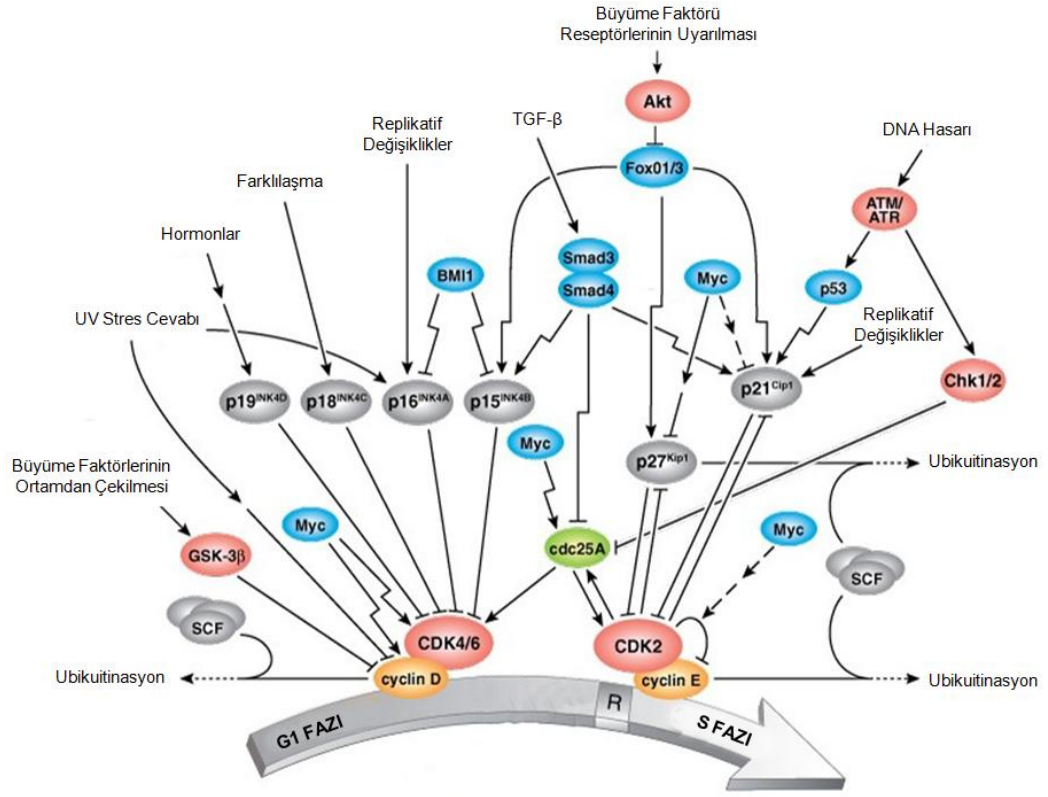
Yeni antikanser ilaçlarla birlikte kolon kanserinde uygulanan standart kemoterapi tedavileri için moleküler hedefli yeni yöntemler de geliştirilmiştir. Son zamanlarda, mTOR sinyal yolağı ile ilişkili protein inhibitörlerinin, klinik öncesi ve klinikteki etkinliği araştırılmaktadır. Elde edilen bulgular, mTOR sinyal yolağı ile ilişkili protein inhibitörlerinin potansiyel tedavi ajanları olabileceğini göstermiştir⁹².



Şekil 10. mTOR sinyal yolağı.
(<http://www.cellsignal.com/reference/pathway/mTor.html>)

2.4.4. Siklin D1 (Cyc D1)

Siklin D1, PI3K/Akt/GSK-3 yolağında yer alan bir proteindir Hücre döngüsünün ilerlemesini ve çoğalmasını düzenlemektedir (Şekil 11). Kolon kanseri de dahil olmak üzere çeşitli insan kanseri tiplerinde siklin D1'in aşırı ifadelenmesi hastalığın agresif seyri ile ilişkilidir. Ayrıca siklin D1 ifadesinin engellenmesinin kolon kanseri hücre hatlarında tümörün büyümesini durdurduğu bildirilmiştir^{93, 94}.



Şekil 11. Siklin D1 sinyal yolağı.
http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Cell_Cycle_G1S.html

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'na bağlı Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Hücre ve Virüs Bankası Bölümü'nden sağlanan insan kolon adenokarsinomu olan özgül HT29 (HT29/An1 Human caucasian colon adenocarcinoma grade II (insan) hücre hattı (HÜKÜK Kayıt No: 97042201) kullanıldı.

Çalışmamızda, Apigenin'in tek başına ve 5-FU ile birlikte, doz ve süreye bağımlı olarak uygulanması sonrasında, kültüre edilmiş olan HT29 hücrelerinde meydana gelen apoptotik etkiler, morfolojik, DNA, transkripsiyonel (mRNA) ve translasyonel (protein) düzeylerde belirlendi.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada, T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'na bağlı Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Hücre ve Virüs Bankası Bölümü'nden sağlanan HT29 insan kolon adenokarsinoma hücre hattı kaynaklı hücreler Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)'li besiyerinde kültüre edildi.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (DanLaf, Danimarka)
- Karbondioksitli etüv (Sanyo, Japonya)
- Floresan ataçmanlı mikroskop (Olympus BX-50, Japonya)
- Invert mikroskop (Zeiss, Almanya)
- Işık mikroskobu (DCM 4000, Leica, Almanya)
- Jel görüntüleme sistemi (Kodak, ABD)

- LightCycler Real-Time PCR cihazı (Roche, Almanya)
- Hybaid PCR-Sprint otomatik ısı döngü cihazı (Thermo Scientific, ABD)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) (Thermo Scientific, ABD)
- Elektroforez tankı (Thermo Scientific, ABD)
- Mikroplaka ELISA okuyucu (Tecan, Avusturya)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- pH metre (WTW 422, Almanya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071, Almanya)
- Spin vorteks (Biosan, Rusya)
- Mikropipetler, 10µL, 100µL, 100µL (Bt10, Bt100, Bt1000 Biohit, CLP, ABD)
- Derin dondurucu, -30°C (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo, Japonya)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

3.1.3. Kullanılan Sarflar

- Hücre üreme flaskları, 25cm² ve 75cm² (Corning, ABD)
- Petriler, 35mm, 60mm ve 100mm (Corning, ABD)
- Hücre kryo (dondurma) ampülü (Greiner, Almanya)
- Kültür tüpleri (Corning, ABD)
- Mikrosantrifüj tüpleri (CLP, Almanya)

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Apigenin (Sigma, ABD)
- 5-Fluorourasil (5-FU) (Eczacıbaşı, Türkiye)

- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Ambresco, ABD)
- DMEM besiyeri (HyClone, Thermo, ABD)
- Fetal sığır serumu (FCS) (inaktif) (HyClone, Thermo, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (HyClone, Thermo, ABD)
- Glutamin (HyClone, Thermo, ABD)
- Tripsin-EDTA (HyClone, Thermo, ABD)
- Akridin Oranj (Sigma, ABD)
- Etidyum Bromür (Sigma, ABD)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Roche, Almanya)
- Primer (Kaspaz 3, Kaspaz 8, mTOR, Siklin D1, GAPDH) (Alfa DNA, Almanya)
- Etanol (Sigma, ABD)
- Agaroza (Peflab, Erlangen, Almanya)

3.1.5. Kullanılan Kitler

- Cell Proliferasyon Kiti II (XTT) (Roche, Almanya)
- Cell Proliferasyon ELISA, BrdU (5-bromo-2'-deoksiuridin) (Kolorimetrik) (Roche, Almanya)
- Cytotoxicity Detection Kit Plus LDH (Laktat Dehidrogenaz) (Roche, Almanya)
- Cell Death Detection ELISA Plus Kit (Roche, Almanya)
- TaqMan Master Karışımı (Roche, Almanya)
- Transcriptör First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche, Almanya)
- High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche, Almanya)
- PathScan® Cleaved Kaspaz-3 (Asp175) Sandwich ELISA Kit

3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

3.2.1. % 10'luk DMEM Besiyerinin Hazırlanışı

450ml DMEM besiyeri içerisine, 50ml FCS, 200mM L-glutaminden 10ml, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin eklenerek %10' luk DMEM besiyeri hazırlandı.

3.2.2. % 1'lik DMEM Besiyerinin Hazırlanışı

495ml DMEM besiyeri içerisine, 5ml FCS, 200mM L-glutaminden 10ml, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin eklenerek %1' lik DMEM besiyeri hazırlandı.

3.2.3. XTT Karışımının Hazırlanması

Tek bir kuyucuk için 50µL XTT işaretleyici ajan ve 1µL elektron eşleşme ajanı kullanım öncesinde taze olarak hazırlandı.

3.2.4. 0.2M Na₂HPO₄ Çözeltisinin Hazırlanışı

1.42g Na₂HPO₄ tartılarak son hacim 50ml olacak şekilde distile su içinde çözüldü.

3.2.5. 0.1M Sitrik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı

0.96g sitrik asit tartılarak son hacim 50ml olacak şekilde distile su içinde çözüldü.

3.2.6. Fosfat-Sitrat Çözeltisinin (pH: 7.8) Hazırlanışı

0.2M Na₂HPO₄ çözeltisi ile 0.1M sitrik asit çözeltisi 48:2 oranında karıştırılarak hazırlandı. Bu amaçla, 48ml 0.2M Na₂HPO₄ çözeltisi içine 2ml 0.1M sitrik asit çözeltisi eklendi. Hazırlanan çözeltinin pH'sı 7.8'e ayarlandı.

3.2.7. %0.25 Nonidet P-40 (NP-40) Çözeltisinin Hazırlanışı

25µL NP-40 alınarak son hacmi 10ml olacak şekilde distile suda çözüldü.

3.2.8. 1mg/ml Proteinaz K Çözeltisinin Hazırlanışı

1mg Proteinaz K tartılıp 1ml distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

3.2.9. 1mg/ml Ribonükleaz A (RNaz A) Çözeltisinin Hazırlanışı

1mg RNaz A enzimi tartılıp 1ml distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

3.2.10. 10X Tris Borat EDTA (TBE) Stok Çözeltisinin Hazırlanışı

Tris bazi	54g
Borik asit	27.5g
0.5M EDTA (pH: 8)	20ml

Kimyasallar bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 500ml olacak şekilde üzerine distile su eklendi.

3.2.11. 0.5 M EDTA Çözeltisinin Hazırlanışı

29.2g EDTA, 160ml distile su içerisinde çözüldükten sonra son hacim distile su ile 200ml'ye tamamlandı ve pH'sı 8 olacak şekilde ayarlandı.

3.2.12. 1X Tris Borat EDTA (TBE) Tamponunun Hazırlanışı

50ml 10X TBE, distile su ile 500ml'ye tamamlanarak istenilen konsantrasyona seyreltili.

3.2.13. Oranj G Jel Yükleme Tamponu

55ml Gliserol, 100mg Oranj G ve 45ml 1X TBE tamponu karıştırılarak hazırlandı.

3.2.14. Stok Etidyum Bromür Boyasının Hazırlanışı

100mg etidyum bromür 10ml distile suda çözülerek hazırlandı.

3.2.15. Agaroz Jelin Hazırlanışı

%1.5'lik agaroz jel hazırlamak için, 1.5g agaroz hassas terazide tartıldıktan sonra üzerine 100ml 1X TBE çözeltisi koyuldu ve mikrodalga fırın kullanılarak kaynatıldı. Agarozun homojen bir şekilde

erimesinden sonra içine 5µL etidyum bromür eklendi ve yatay jel elektroforez tankına dökülerek jelin donması sağlandı. Sonra jelin üzerini örtecek şekilde 1X TBE tamponundan eklendi.

3.2.16. 1X PBS çözeltisinin hazırlanması

1.09g Na_2HPO_4 , 0.32g NaH_2PO_4 ve 9g NaCl tartılıp 800ml distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı 7.4'e ayarlanıp son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hücre Kültürü

HT29 hücreleri, %10'luk DMEM besiyerinde %95 nem ve %5 CO_2 'li ortamda 37°C'de kültüre edilerek çoğaltıldı.

Hücreler, 15µM, 45µM, 75µM, 90µM ve 100µM konsantrasyonlarda olacak şekilde Apigenin ile 24 saat inkübe edildi. DMSO çözücü kontrolü olarak kullanıldı ve aynı süre için inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yapılan analizler sonucunda Apigenin'in her bir dozdaki sitotoksik ve apoptotik etkileri belirlendi. Her bir konsantrasyon için 3 ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı.

3.3.2. XTT Sitotoksisite Deneyi

HT29 hücrelerinde Apigenin ve Apigenin + 5-FU birleşiminin sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için XTT kolorimetrik kiti kullanıldı. Aynı pasaj numarasına sahip HT29 hücreleri, hücre kültür kaplarının %70'ini kapladığında besiyerleri uzaklaştırıldı. Tripsin-EDTA karışımı

kullanılarak hücrelerin tabandan ve birbirlerinden ayrılması sağlandı. Daha sonra hücreler thoma lamı ile sayıldı. Hücreler, %1 FCS içeren DMEM içerisinde (ekilen hücre sayısının sabit kalması için %1'lik FCS içeren DMEM kullanıldı) süspansiyon haline getirildikten sonra her kuyucuğa 100µL (10^4 hücre) gelecek şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Hücreler 37°C ve %5 CO₂'li etüvde bir gece inkübe edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler yukarıda belirtilen dozlarda Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile hazırlanmış %10'luk FCS içeren besiyerinde, 24, 48 ve 72 saat süreyle 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Belirtilen sürelerin sonunda her bir kuyucuğa 50µL gelecek şekilde XTT karışımı eklendi ve formazan ürününün oluşturduğu renk değişimi 4 saat sonunda mikropilaka ELISA okuyucu ile 450-500nm dalga boyu aralığında belirlendi. Negatif kontroller sıfır absorbans değeri olarak kullanıldı.

3.3.3. Floresan Mikroskopunda Apoptozun Değerlendirilmesi

Hücre kültürlerinin sonlandırılmasını takiben hücreler 3µL akridin oranj (100µg/ml) ve 3µL etidyum bromür (100µg/ml) ile boyanarak floresans mikroskopunda apoptoz açısından değerlendirildi. Akridin oranj sadece canlı hücrelerin DNA'sına bağlandığından canlı hücreler yeşil renkte görülürken, etidyum bromür nekrotik hücrelerde kırmızı rengin oluşmasına neden oldu. Buna karşın her iki boya birlikte kullanıldığında, apoptotik hücreleri boyayarak sarı-turuncu renkte ve karakteristik apoptotik nükleus görünümünü yansıtarak apoptozun belirlenmesine olanak sağladı.

3.3.4. Hücre Çoğalması ELISA, BrdU Deneyi

1. HT29 hücreleri 96 kuyucuklu kültür kaplarında her bir kuyucuğa 10^4 hücre gelecek şekilde ekildi.
2. Bir gece sonra belirtilen dozlarda Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile muamele edildi.
3. İnkübasyon süreleri dolduktan sonra her bir kuyucuğa 10µL BrdU etiketleme solüsyonu eklendi. 37°C'de 2 saat inkübe edildi ve solüsyon uzaklaştırıldı.
4. 200µL FixDenat eklendi ve 25°C'de 30 dakika inkübe edildi.
5. FixDenat solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100µL anti-BrdU-POD solüsyonu eklendi. 25°C'de 90 dakika inkübe edildi.
6. Antikor konjugatı uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuk 300µL PBS yıkama solüsyonu (1X) ile 3'er defa yıkandı.
7. 100µL substrat solüsyonu eklenerek yeterli renk değişimi gözlenene kadar 25°C'de 5-30 dakika inkübe edildi.
8. Her bir kuyucuğa 25µL 1M H₂SO₄ eklendi ve 300rpm'de 1 dakika çalkalandı. 5 dakika sonra ELISA okuyucu cihazı ile 450nm dalga boyundaki absorbands değerleri okundu.

3.3.5. Sitotoksosite Belirleyici LDH Deneyi

1. HT29 hücreleri 96 kuyucuklu kültür kaplarında her bir kuyucuğa 10^4 hücre gelecek şekilde ekildi.
2. Bir gece bekledikten sonra belirtilen dozlarda Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile muamele edildi.
3. İnkübasyon süreleri dolduktan sonra kültür ortamından 100µL besiyeri alınıp 96 kuyucuklu mikropiğin her bir kuyucuğuna eklendi.

4. Her bir kuyucuğa 100µL taze hazırlanmış reaksiyon karışımı eklendi. Işıktan uzak bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
5. Elisa okuyucu cihazı ile 490-492nm dalga boyundaki absorbans değerleri okundu.
6. Deney protokolünde kullanılan kontroller:
 - a. Background kontrol: Besiyeri
 - b. Düşük kontrol: Besiyeri+Hücre
 - c. Yüksek kontrol: Triton X-100 solüsyonu+Hücre

3.3.6. CASP3 Sandwich ELISA Deneyi

1. HT29 hücreleri 6 kuyucuklu kültür kaplarında her bir kuyucuğa 10^6 hücre gelecek şekilde ekildi. Bir gece bekletildikten sonra belirtilen dozlarda Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile muamele edildi.
2. İnkübasyon sürelerinin dolmasından sonra kültür ortamından Apigenin ve Apigenin + 5-FU'li besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile bir defa yıkandı.
3. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 1mM PMSF içeren 0.5ml soğuk 1X Lizis tamponu eklendi ve 5 dakika beklendi.
4. Hücreler kültür kabından kazınarak uzaklaştırıldı ve mikrosantrifüj tüpüne alındı. Enjektör yardımıyla hücrelerin parçalanması sağlandı.
5. Hücre lizatı 10 dakika +40°C' de santrifüj edilip üstte kalan sıvı (dökelti, süpernatant) yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
6. 100µL hücre lizatı ile 100µL örnek dilüent çözeltisi primer antikor ile kaplanmış mikroparka kuyucuklarına dağıtıldı.
7. Kuyucukların üzeri bir bant yardımıyla sıkıca kapatıldı. 37°C'de 2 saat süreyle inkübe edildi.

8. Kuyucukların içeriği boşaltıldıktan sonra her bir kuyucuk, 4'er defa 200µL yıkama tamponu (1X) ile yıkandı.
9. Her bir kuyucuğa 100µL belirleyici antikor eklendi. Kuyucukların üzeri bir bant yardımıyla sıkıca kapatıldı. 37°C'de 1 saat süreyle inkübe edildi.
10. Her bir kuyucuk, 4' er defa 200µL yıkama tamponu (1X) ile yıkandı.
11. Her bir kuyucuğa 100µL HRP (horseradish peroksidaz) bağlanmış ikincil antikor eklendi. Kuyucukların üzeri bir bant yardımıyla sıkıca kapatıldı. 37°C'de 30 dakika süreyle inkübe edildi.
12. Her bir kuyucuk, 4'er defa 200µL yıkama tamponu (1X) ile yıkandı.
13. Her bir kuyucuğa 100µL TMB (tetrametilbenzidin) substratı eklendi. Kuyucukların üzeri bir bant yardımıyla sıkıca kapatıldı. 37°C'de 10 dakika süreyle inkübe edildi.
14. Renksiz olan TMB eklendiğinde reaksiyonun belirteci olan mavi renk dönüşümü gerçekleşti.
15. Her bir kuyucuğa 100µL durdurucu solüsyon eklendi. Birkaç saniye yavaşça sallandı.
16. Durdurucu solüsyonun eklenmesinden 30 dakika sonra mavi olan rengin sarı renge dönüştüğü gözlemlendi.
17. Aynı zamanda, durdurucu solüsyonun eklenmesini takiben 30 dakika içerisinde ELISA okuyucu ile 450nm dalga boyundaki absorbans değerleri okundu.

3.3.7. Hücre Ölümü Belirleyici ELISA Deneyi

1. HT29 hücreleri 96 kuyucuklu kültür kaplarında her bir kuyucuğa 10^4 hücre gelecek şekilde ekildi.

2. Bir gece bekledikten sonra besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve belirtilen dozlarda Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile muamele edildi.
3. İnkübasyon süreleri dolduktan sonra her kuyucuğa 200µL lizis tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
4. Mikrosantrifüj tüpüne alınan hücre lizatı oda sıcaklığında, 200g'de 10 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvıdan 20µL alınıp streptavidin kaplı mikroplağa aktarıldı.
6. 80µL biyotin işaretli immün ajan (anti-histon biyotin ve anti-DNA POD) eklendi ve oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 2 saat süreyle inkübe edildi.
7. Mikroplaka 300µL inkübasyon tamponu ile oda sıcaklığında 3 defa yıkandı.
8. Her bir kuyucuğa 100µL peroksidaz substrat solüsyonu (ABTS) eklendi. Renk değişimi gözleninceye kadar oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.
9. 100µL ABTS durdurucu solüsyonu eklendikten sonra ELISA okuyucu cihazı ile 405nm dalga boyundaki absorbans değerleri okundu.

3.3.8. DNA Fragmentasyon Analizi

1. Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile inkübasyon sürelerinin dolmasından sonra besiyeri uzaklaştırılarak 10ml'lik tüplere aktarıldı.
2. Hücrelerin üzerine %0.25'lik tripsinden 2ml eklenip, 10-15dk beklendi.
3. Hücrelerin kültür kabının yüzeyinden ayrılıp yüzer duruma geçtikleri invert mikroskopunda belirlendikten sonra hücre

süspansiyonu daha önceden besiyerlerinin koyulduğu 10ml'lik tüplere eklendi.

4. Elde edilen süspansiyon 1200rpm'de 10dk santrifüj edilip üstte kalan sıvı (dökelti, süpernatant) atıldı. Hücre çökeltisi (pelet) üzerine 50µL fosfat-sitrat tamponu (pH 7.8) eklenerek oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
5. Karışım 1200rpm'de 10dk santrifüj edilerek süpernatant 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
6. Süpernatant üzerine 3µL RNaz A ve 3µL NP-40 çözeltilerinden eklenerek 37°C'de 30dk inkübe edildi.
7. Bu süre sonunda 3µL Proteinaz K çözeltisi eklenerek tekrar 37°C'de 30dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler elektroforez yöntemi uygulanana kadar +4°C'de saklandı.

3.3.9. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA fragmentasyonunun varlığı agaroz jel elektroforezi yöntemiyle gösterildi. Bunun için daha önceden hazırlanmış olan %1.5'lik agaroz jele DNA örneklerinden 15µL alınarak, 3µL Oranj G jel yükleme tamponu mikropipet yardımı ile karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklendi. Aynı zamanda kuyulardan birine de 100 bazçiftlik (bp) DNA moleküler ağırlık belirteci yüklenerek 60 dakika 90 volt sabit akımda yürütüldü. Süre sonunda "Kodak Gel Logic 100" görüntüleme sistemi kullanılarak jelin fotoğrafı çekildi.

3.3.10. Hücre Kültüründen Total RNA Saflaştırılması

İnkübasyon süresi sonunda steril flasklarda ekili bulunan hücrelerden RNA izolasyonu, "High Pure RNA Isolation Kiti" kullanılarak,

aşağıda yazılı olan protokole göre yapıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile saflaştırma işlemi biyogüvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

1. Hücrelerin üzerine 200µL PBS ve 400µL Lizis tamponu eklenip 15 saniye vortekslendi.
2. Filtre, toplama tüpüne yerleştirilip tüm karışım filtre üstüne aktarıldı.
3. 9000rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
4. Toplama tüpünde toplanan sıvı atılıp filtre aynı tüpe tekrar yerleştirildi.
5. Her bir örnek için 90µL DNaz İnkübasyon tamponu steril tüpe alındı ve 10µL DNaz I eklendi. Pipetaj ile karıştırıldıktan sonra karışım filtrenin ortasına bırakıldı. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. 500µL'lik 1. yıkama tamponu filtre üzerine eklendi ve 9000rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
7. 500µL'lik 2. yıkama tamponu filtre üzerine yerleştirildi ve 15 saniye 9000rpm'de santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
8. 200µL'lik 3. yıkama tamponu filtre üzerine eklendi ve 3 dakika 13500rpm'de santrifüj edildi.
9. Toplama tüpü atıldı. Filtre, steril 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
10. Filtre üzerine 20µL örnek seyrelti çözeltisi eklendi ve 9000rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Elde edilen RNA' ların miktarları ve saflığı "NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre" cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılabilecek kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.3.11. cDNA sentezi

Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede 260nm dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. Primer olarak random hekzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. cDNA RT-PCR tepkime karışımı.

	Son Konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4µL
dNTP	1mM	2µL
Random hekzamer primeri	60µM	2µL
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5µL
Transcriptor Ters Transkriptaz	10 ünite	0.5µL
Total RNA	1µg	1µg olacak şekilde

cDNA için PCR karışımı ince çeperli 0.2ml'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldıktan sonra saflaştırılan total RNA eklendi.

3.3.11.1. cDNA RT-PCR Programı

Otomatik ısı döngüsü cihazı, Tablo 2'de belirtilen programa ayarlanarak cDNA ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi uygulandı.

Tablo 2. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program.

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25°C	10dk	1
Ters transkripsiyon	50°C	60dk	1
İnaktivasyon	85°C	5dk	1
Soğutma	4°C	-	1

Reaksiyon sonucu cDNA örnekleri Real-Time PCR'da kullanılıncaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.3.11.2. Genlerin İfade Edilmesinin Real-Time PCR ile Ölçümü

CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 (Siklin D1) genlerinin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile Light Cycler (LC) cihazı kullanılarak yapıldı. Amplifikasyonlar 20µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, bölgeye özgü primerler, UPL TaqMan probu, LightCycler TaqMan Master karışımı ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 gen ifadenmesini normalize etmek için GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alındı. Göreceli gen ifade edilme sonuçları “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı.

3.3.11.3. CASP3 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

CASP3 genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA’daki yerleşimleri Şekil 12’de gösterildi.

CASP3F 5'- TGGAATTGATGCGTGATGTT-3'

CASP3R 5'- TGGCTCAGAAGCACACAAAC-3'

68 numaralı prob dizisi: 5'- AGGAGCAG-3'

5' -TGGAATTGATG

241 TTGAAATATGAAGTCAGGAATAAAAAATGATCTTACACGTGAAGAAATTGTGGAATTGATG

CGTGATGTT-3' 5' -AGGAGCAG-3'

301 CGTGATGTTTCTAAAGAAGATCACAGCAAAAGGAGCAGTTTTGTTGTGTGCTTCTGAGC

3' -CAAAACACACGAAGACTCG

361 CATGGTGAAGAAGGAATAATTTTGGGAACAAATGGACCTGTTGACCTGAAAAAATAACA

GT-5'

Şekil 12. CASP3 mRNA’sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000308394 giriş no’lu dizi) (Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır).

Şekil 12’de gösterilen primer ve prob lar kullanılarak Real-Time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. CASP3 Real-Time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2µL
MgCl ₂ (25mM)	4mM	1.2µL
CASP3 PrimerF (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
CASP3 PrimerR (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
CASP3 TaqMan prob (100pmol/µL)	10pmol	0.1µL
TaqMan mix (10x)	1x	1µL
cDNA	-	1µL

3.3.11.4. CASP8 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

CASP8 genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA’daki yerleşimleri Şekil 13’de gösterildi.

CASP8F 5'- TCCAAATGCAAAC TGGATGA-3'

CASP8R 5'- TCCCAGGATGACCCTCTTCT-3'

62 numaralı prob dizisi: 5'- ACCTGCTG-3'

5'-TCCAAATGCAAAC TGGATGA-3' 5'-ACCTGCTG-3'

541 TTTCTTTTGCAAGAGGAAATCTCCAAATGCAAAC TGGATGATGACATGAACCTGCTGGAT

601 ATTTTCATAGAGATGGAGAAGAGGGTCATCCTGGGAGAAGGAAAGTTGGACATCCTGAAA

3' - TCTTCTCCCAGTAGGACCCT-5'

Şekil 13. CASP8 mRNA’sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000358485 giriş no’lu dizi) (Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır).

Şekil 13’de gösterilen primer ve probolar kullanılarak Real-Time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. CASP8 Real-Time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2µL
MgCl ₂ (25mM)	4mM	1.2µL
CASP8 Primer F (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
CASP8 Primer R (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
CASP8 TaqMan prob (100pmol/µL)	10pmol	0.1µL
TaqMan karışımı (10x)	1x	1µL
cDNA	-	1µL

3.3.11.5. mTOR Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

mTOR genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA’daki yerleşimleri Şekil 14’de gösterildi.

mTOR F 5'- TGCTGGAAGCCTTTGTCTATG-3'

mTOR R 5'- CGCTTGTTGCCTTTGGTATT-3'

75 numaralı prob dizisi: 5'-GGAGGCTG-3'

5' -TGCTGGAAGCC

7201 CACACAGTGATGGAGGTGCTGCGAGAGCACAAGGACAGTGT CATGGCCGTGCTGGAAGCC

TTTGTCTATG-3' 5' -GGAGGCTG-3'

7261 TTTGTCTATGACCCCTTGCTGAAC TGGAGGCTGATGGACACAATAACCAAGGCAACAAG

3' -TTATAGGTTTCCGTTGTTC

7321 CGATCCCGAACGAGGACGGATTCCTACTCTGCTGGCCAGTCAGTCGAAATT TGGACGGT

GC-5'

Şekil 14. mTOR mRNA’sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000361445 giriş no’lu dizi) (Translasyon başlangıç nükleotidinde göre numaralandırılmıştır).

Şekil 14’de gösterilen primer ve prob lar kullanılarak Real-Time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. mTOR Real-Time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2µL
MgCl ₂ (25mM)	4mM	1.2µL
mTOR Primer F (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
mTOR Primer R (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
mTOR TaqMan prob (100pmol/µL)	10pmol	0.1µL
TaqMan karışımı (10x)	1x	1µL
cDNA	-	1µL

3.3.11.6. CCND1 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

CCND1 genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA’daki yerleşimleri Şekil 15’de gösterildi.

CCND1 F 5'- TGTCCTACTACCGCCTCACA -3'

CCND1 R 5'- CAGGGCTTCGATCTGCTC -3'

16 numaralı prob dizisi: 5'- CTGCCTCC-3'

5' -TGTCCTACTACCGCCTCACA- 3'

661 AACAACTTCCTGTCCTACTACCGCCTCACACGCTTCCTCTCCAGAGTGATCAAGTGTGAC

5' -CTGCCTCC-3'

721 CCGGACTGCCTCCGGGCCTGCCAGGAGCAGATCGAAGCCCTGCTGGAGTCAAGCCTGCGC

3' -CTCGTCTAGCTTCGGGAC-5'

Şekil 15. CCND1 mRNA’sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000227507 giriş no’lu dizi) (Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır).

Şekil 15’de gösterilen primer ve prob lar kullanılarak Real-Time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. CCND1 Real-Time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2µL
MgCl ₂ (25mM)	4mM	1.2µL
CCND1 Primer F (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
CCND1 Primer R (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
CCND1 TaqMan prob (100pmol/µL)	10pmol	0.1µL
TaqMan karışımı (10x)	1x	1µL
cDNA	-	1µL

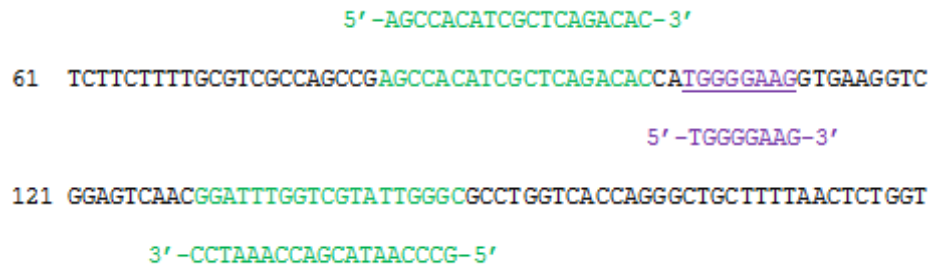
3.3.11.7. GADPH Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

GAPDH genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA’daki yerleşimleri Şekil 16’da gösterildi.

GAPDHF 5’-AGCCACATCGCTCAGACAC-3’

GAPDHF 5’-GCCCAATACGACCAAATCC-3’

60 numaralı prob dizisi: 5’-TGGGGAAG-3’



Şekil 16. GAPDH mRNA’sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000229239 giriş no’lu dizi).

Şekil 16'da gösterilen primer ve probler kullanılarak Real-Time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Tablo 7'de gösterildi.

Tablo 7. GAPDH Real-Time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2µL
MgCl ₂ (25mM)	4mM	1.2µL
GAPDH Primer F (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
GAPDH Primer R (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
GAPDH TaqMan prob (100pmol/µL)	10pmol	0.1µL
TaqMan karışımı (10x)	1x	1µL
cDNA	-	1µL

3.3.11.8. Light Cyler (LC) Deney Programı

Real-Time PCR karışımları hazırlandıktan sonra kapiller tüplere dağıtıldı ve üzerine cDNA'ler eklendi. Kapiller tüpler 3000 ila 5000rpm aralığında 10sn santrifüj edildi. Tüpler yerleştirildikten sonra LC cihazında aşağıda belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. CASP3, CASP8, mTOR, CCND1 ve GAPDH genleri için aynı program kullanıldı.

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)	
Program Verisi	Değer
Döngüler	1
Analiz Modu	-
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10:00dk
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)

Program Verisi	Değer	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10sn	20sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0

Program 3. Soğutma

Program Verisi	Değer
Döngüler	1
Analiz Modu	-
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	30sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

Reaksiyon sonucu, CASP3, CASP8, mTOR, CCND1 ve GAPDH genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi. CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 ifade düzeyleri GAPDH ifade düzeyine göre normalize edildi.

3.3.12. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Doza ve zamana bağlı olarak değişen, CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “REST (2008 Beta V2.0.7)” istatistik programı ile karşılaştırıldı. Hücre canlılığı, apoptoz ve nekrotik değişimler ise “tek yönlü Anova” testiyle karşılaştırıldı. Veriler “SPSS 15.0” istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

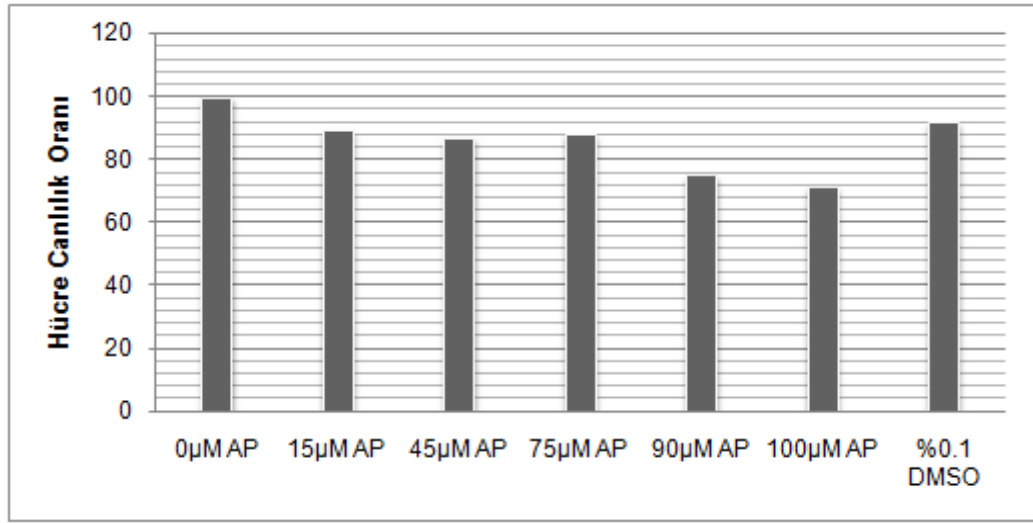
4. BULGULAR

Çalışmamızda, p53 mutant HT29 insan kolon kanseri hücrelerinde, çeşitli doz ve inkübasyon sürelerinde Apigenin'in, tek başına ve 5-FU ile birlikte olan sitotoksik ve apoptotik etkileri hem morfolojik hem de DNA, RNA (mRNA) ve protein düzeylerinde araştırıldı. Apigenin'in HT29 hücrelerinde, doz ve zamana bağlı olarak apoptotik etkilerinin arttığı ancak anlamlı bir sitotoksik etki oluşturmadığı XTT, Akridin Oranj / Ethidyum Bromür (AO/EtBr), ELISA BrdU, LDH, hücre ölümü belirleyici ELISA ve DNA fragmentasyon yöntemleri ile gösterildi. Apigenin'in 5-FU ile birlikte kullanımından elde edilen apoptoz yüzdesinde de artış bulundu. Bu yöntemler ile belirlediğimiz Apigenin'in tek başına ve 5-FU ile birlikte kullanımındaki en yüksek apoptoz dozları, hücrelerin apoptoza girdiğini gösteren efektör kaspazlardan, kaspaz 3'ün protein düzeyine "CASP3 Sandwich ELISA" yöntemi ile bakılarak doğrulandı. Son olarak, Apigenin'in apoptotik etkisi, kaspaz 3 ve kaspaz 8 mRNA ifade edilme düzeylerinin kontrole göre göstermiş olduğu artış ile de doğrulandı. Buna karşılık, hücre proliferasyonunda görev alan mTOR ve siklin D1 (CCND1) genlerinin mRNA ifade edilme düzeylerinin kontrole göre azalmış olması ise Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile muamele edilen hücrelerin apoptoza giderken kaspaz kaskadını kullandığını gösterdi.

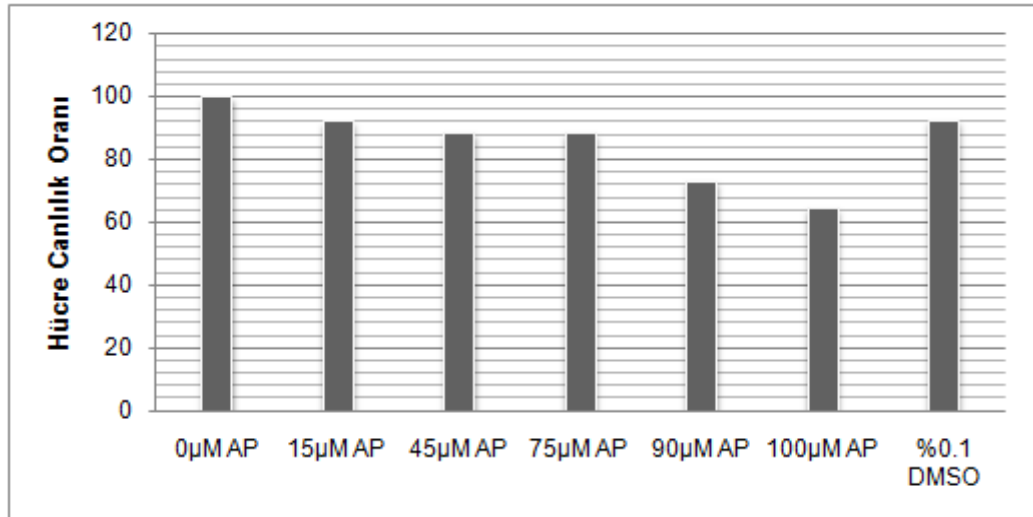
4.1. HT29 Hücrelerinin Apigenin' e Duyarlılığının XTT Sitotoksisite Yöntemi ile İncelenmesi

96 kuyulu hücre kültür kaplarına 10^4 hücre/kuyu olacak şekilde HT29 hücreleri ekilerek, 15µM – 100µM doz aralığında farklı Apigenin konsantrasyonlarıyla; 24, 48 ve 72 saat aralıklarında inkübe edildi. Şekil 17'de 24 saat inkübasyon sonucunda hücrelerin Apigenin'e cevabı gözlenmektedir. Buna göre, en yüksek konsantrasyondaki (100µM)

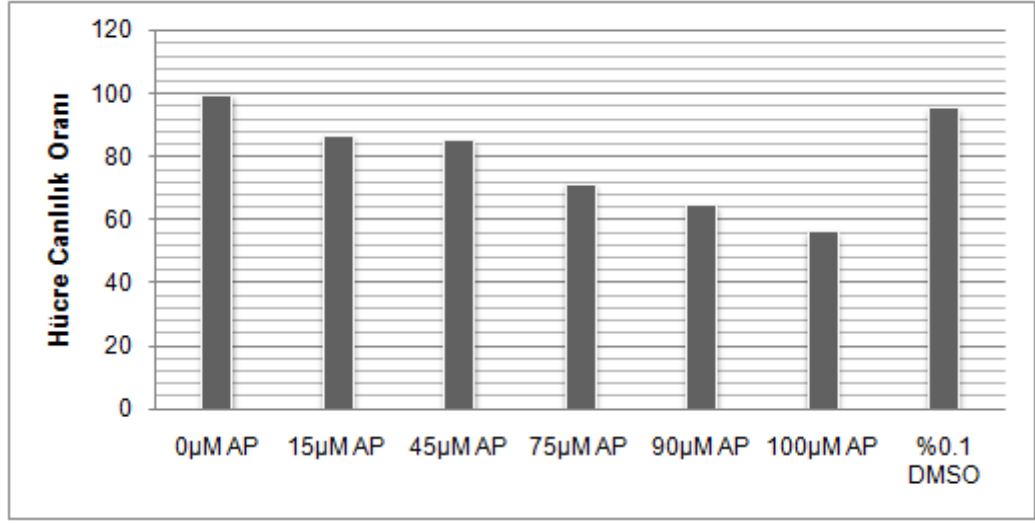
hücre canlılığı %71.67 bulundu. 48 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek konsantrasyondaki hücre canlılık oranı %64.44 bulundu (Şekil 18). 72 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek konsantrasyonda meydana gelen hücre canlılığı ise %56.42 bulundu (Şekil 19).



Şekil 17. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları.

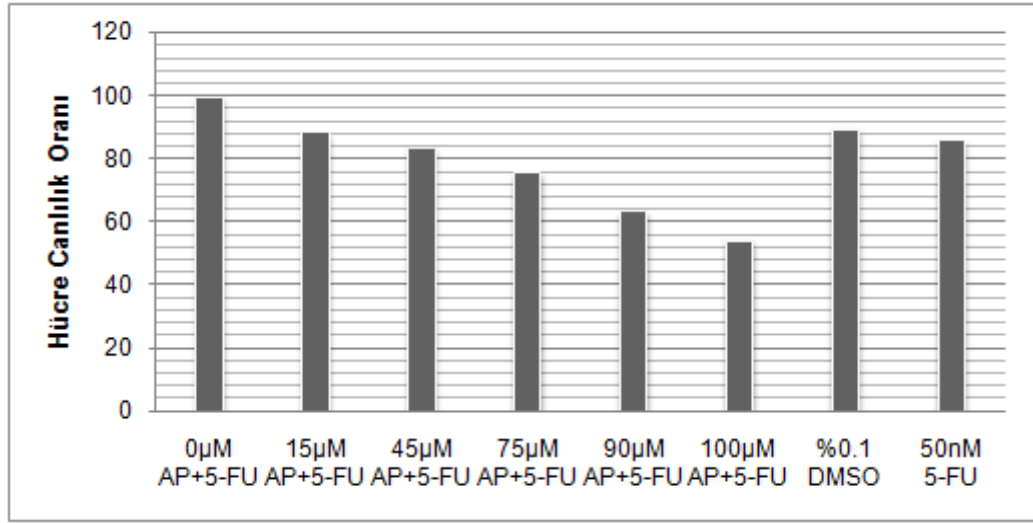


Şekil 18. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları.

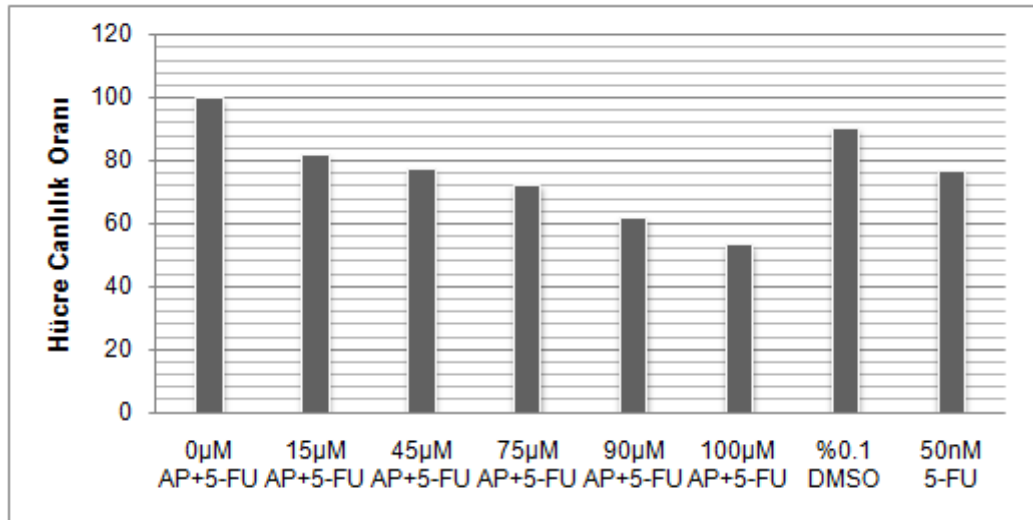


Şekil 19. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları.

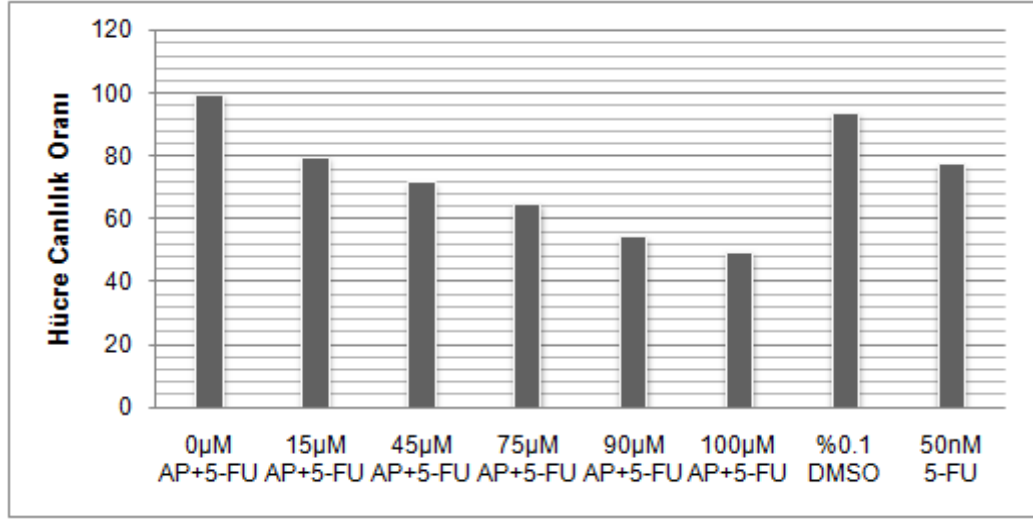
Çalışmanın bir diğer bölümünde Apigenin'in 5-FU ile birlikte kullanımının etkisini belirlemek için 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 10^4 hücre/kuyu olacak şekilde HT29 hücreleri ekildi. 15µM – 100µM doz aralığında farklı Apigenin konsantrasyonları ve her bir Apigenin konsantrasyonu içerisine sabit olarak eklenen 50nM 5-FU ile; 24, 48 ve 72 saat aralıklarında hücreler inkübe edildi. Şekil 20'de 24 saat inkübasyon sonucunda hücrelerin, Apigenin'in 5-FU ile birlikte kullanımına ilişkin oluşan cevabı gözlenmektedir. Buna göre, en yüksek Apigenin konsantrasyonundaki (100µM Apigenin + 5-FU) hücre canlılığı %54.27 bulundu. 48 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek Apigenin konsantrasyonundaki hücre canlılık oranı ise %53.54 bulundu (Şekil 21). 72 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek Apigenin konsantrasyonunda meydana gelen hücre canlılığı ise %49.62 bulundu (Şekil 22).



Şekil 20. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin + 5-FU ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları.



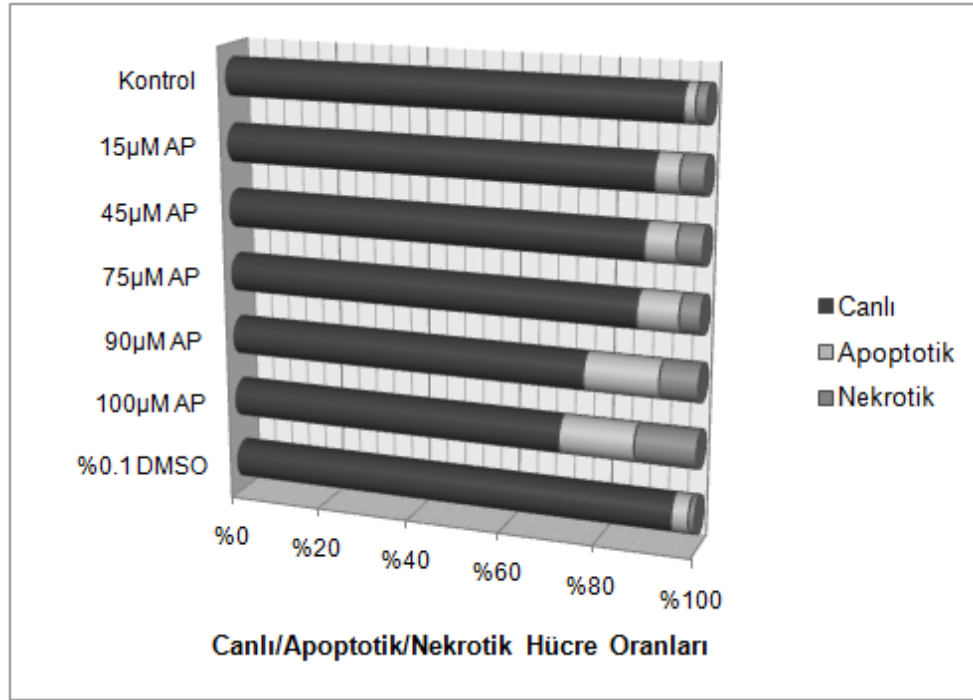
Şekil 21. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin + 5-FU ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları.



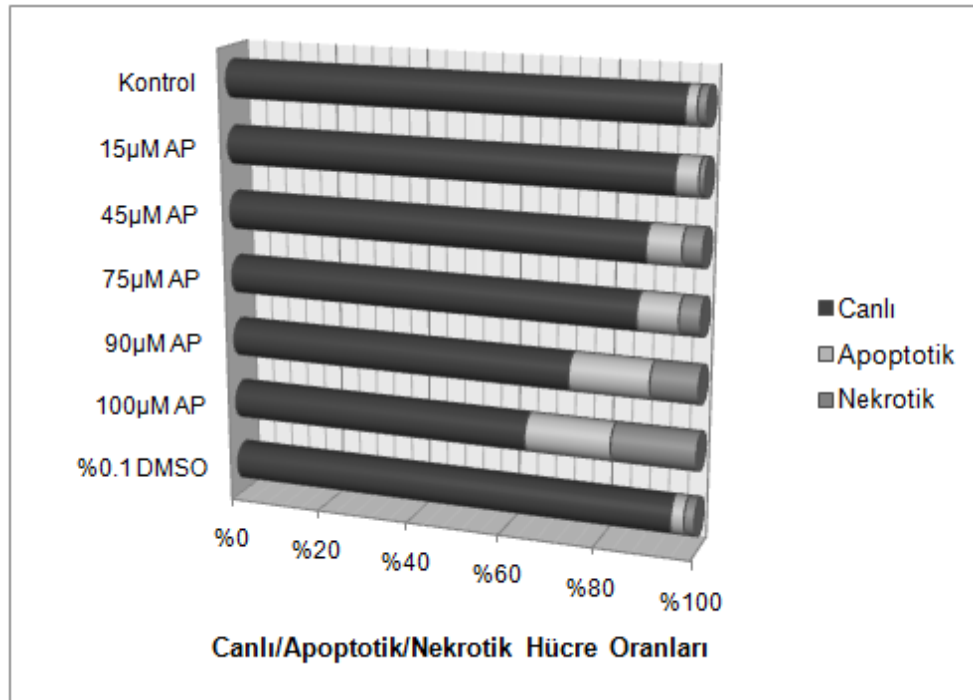
Şekil 22. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin + 5-FU ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları.

4.2. Apoptoz / Nekroz Ayrımının Floresan Mikroskopunda İncelemesi

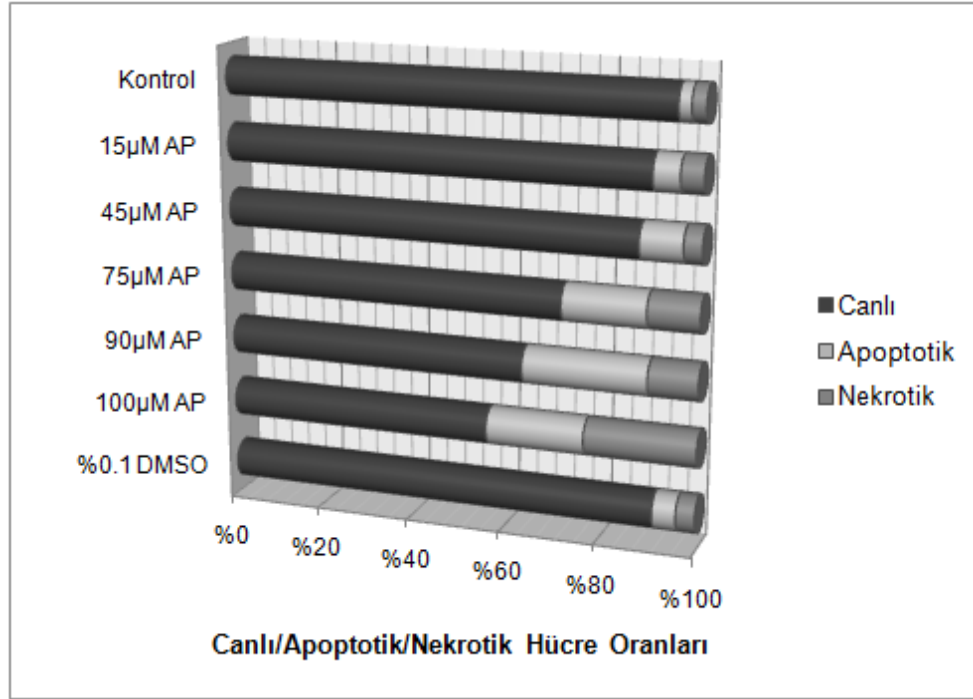
Apigenin'in tek başına ve 5-FU ile birlikte kullanımı sonucu, canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin gözlenmesinde floresan ataçmanlı mikroskoptan yararlanıldı. Tek başına Apigenin'e maruz bırakılmış hücre kültürlerinin sonlandırılmasını takiben hücreler floresan ataçmanlı mikroskopda apoptoz açısından değerlendirildi. Şekil 23'de 24 saat inkübasyon sonucunda Apigenin'e maruz bırakılmış hücrelerde belirlenen canlı / apoptotik / nekrotik hücre yüzdeleri gözlenmektedir. En yüksek konsantrasyondaki (100µM) apoptotik hücre oranı %15.57 bulundu. 48 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek konsantrasyondaki apoptotik hücre oranı ise %17.96 bulundu (Şekil 24). 72 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek konsantrasyonda meydana gelen apoptotik hücre oranı ise %20.54 bulundu (Şekil 25).



Şekil 23. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.

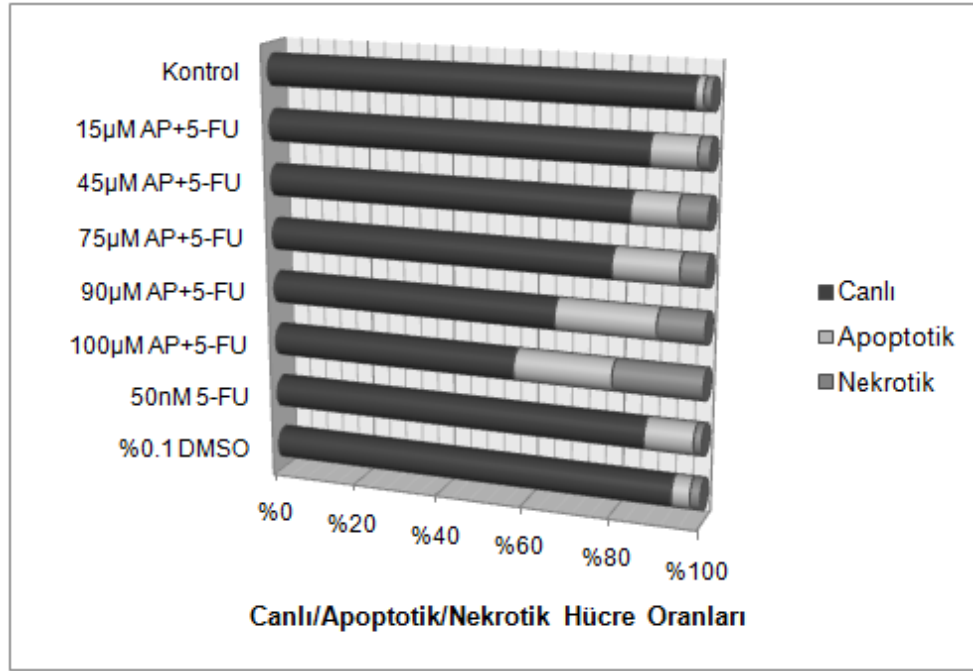


Şekil 24. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.

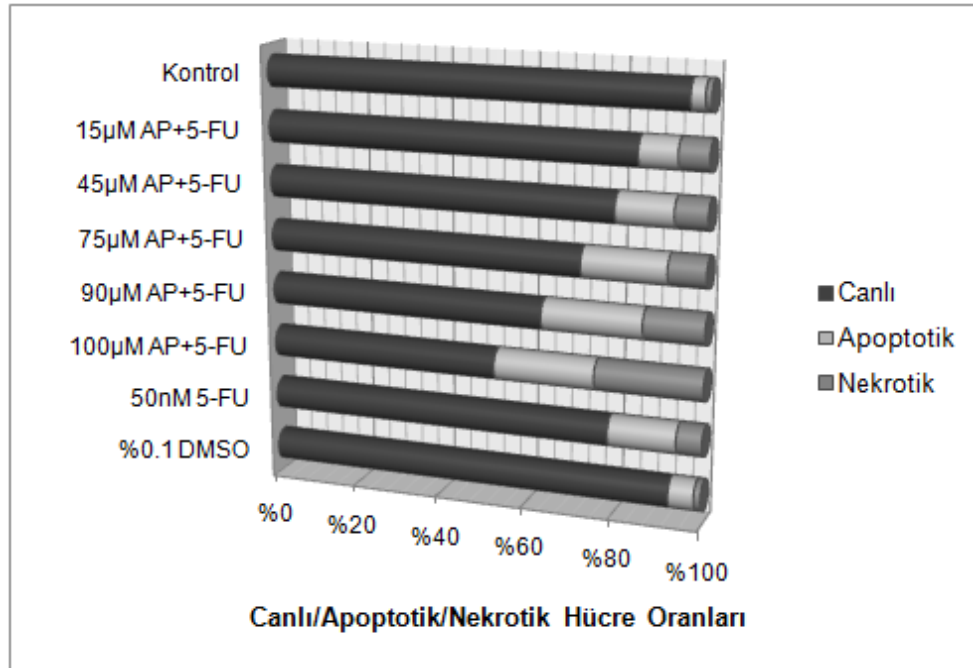


Şekil 25. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.

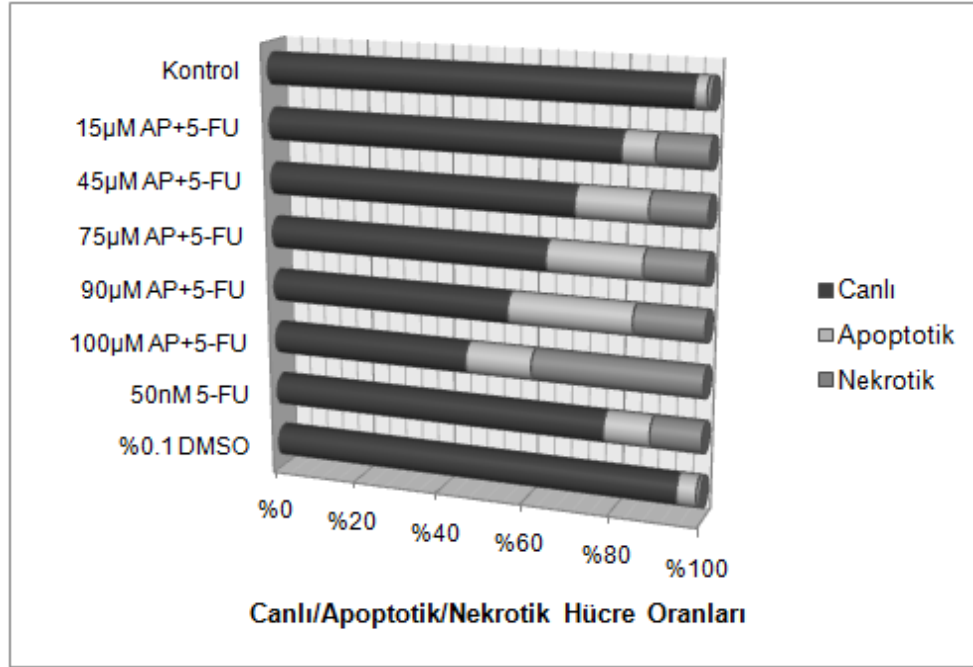
Apigenin + 5-FU'e maruz bırakılmış hücre kültürlerinin de sonlandırılmasını takiben hücreler AO / EtBr ile boyanarak floresan ataçmanlı mikroskopda apoptoz açısından değerlendirildi. Şekil 26'da 24 saat inkübasyon sonucunda hücrelerin, Apigenin'in 5-FU ile birlikte kullanıldığında göstermiş olduğu canlı / apoptotik / nekrotik hücre ayrımı yüzdeleri gözlenmektedir. En yüksek Apigenin konsantrasyonundaki (100µM Apigenin + 5-FU) apoptotik hücre oranı %22.37 bulundu. 48 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek Apigenin konsantrasyonundaki apoptotik hücre oranı ise %22.86 bulundu (Şekil 27). 72 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek Apigenin konsantrasyonunda meydana gelen apoptotik hücre oranı ise %15.25 bulundu (Şekil 28).



Şekil 26. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin + 5-FU ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.



Şekil 27. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin + 5-FU ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.

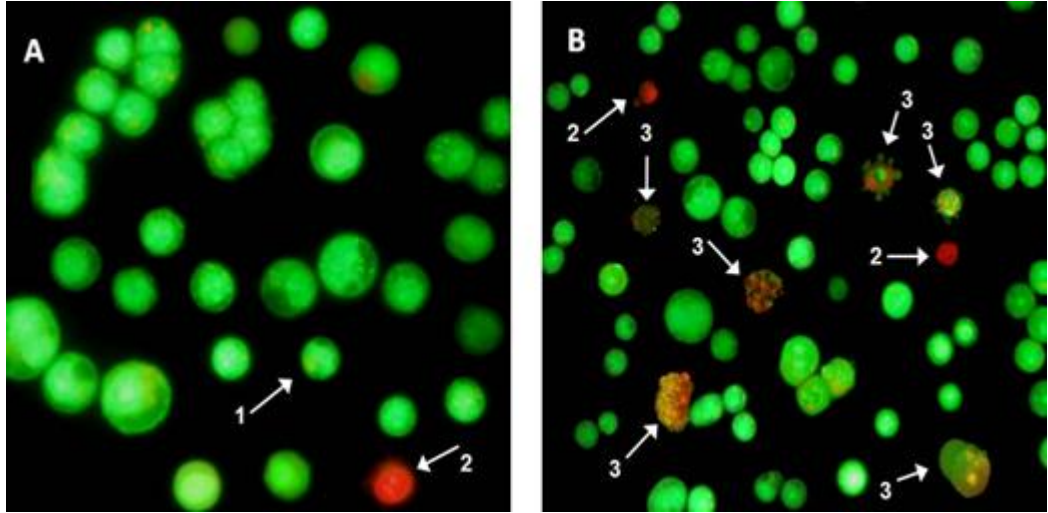


Şekil 28. HT29 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Apigenin + 5-FU ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.

En etkili inkübasyon süresi olan 72. saatte, Apigenin'in hem tek başına hem de 5-FU ile birlikte kullanımında, en yüksek doz olan 100µM konsantrasyonu bir alt doz olan 90µM konsantrasyonu ile karşılaştırılınca, apoptotik hücre oranında azalış, nekrotik hücre oranında ise artış gözlemlendi. Bu doğrultuda, apoptoz açısından en etkili Apigenin dozlarının 75µM ve 90µM konsantrasyonları olduğu belirlendi.

Canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin, 24, 48 ve 72 saat süre aralıklarında Apigenin'in tek başına ve 5-FU ile birlikte inkübasyonu sonucunda tespit edilen morfolojik görüntüleri XTT yöntemi ile elde ettiğimiz sonuçlar ile paralellik gösterdi (Şekil 29). HT29 hücrelerinde, 72 saat Apigenin uygulaması sonucunda, hücre sitoplazmasının ve çekirdeğinin büzülmesi, kromatinin çekirdek zarı civarında yoğunlaşması, apoptotik yapılar olan "bleb"lerin oluşarak hücre zarı etrafında toplanması

ve hücre çekirdeğinin böbrek şeklini alması gibi apoptotik sürece ait morfolojik değişimler gözlemlendi (Şekil 29B).

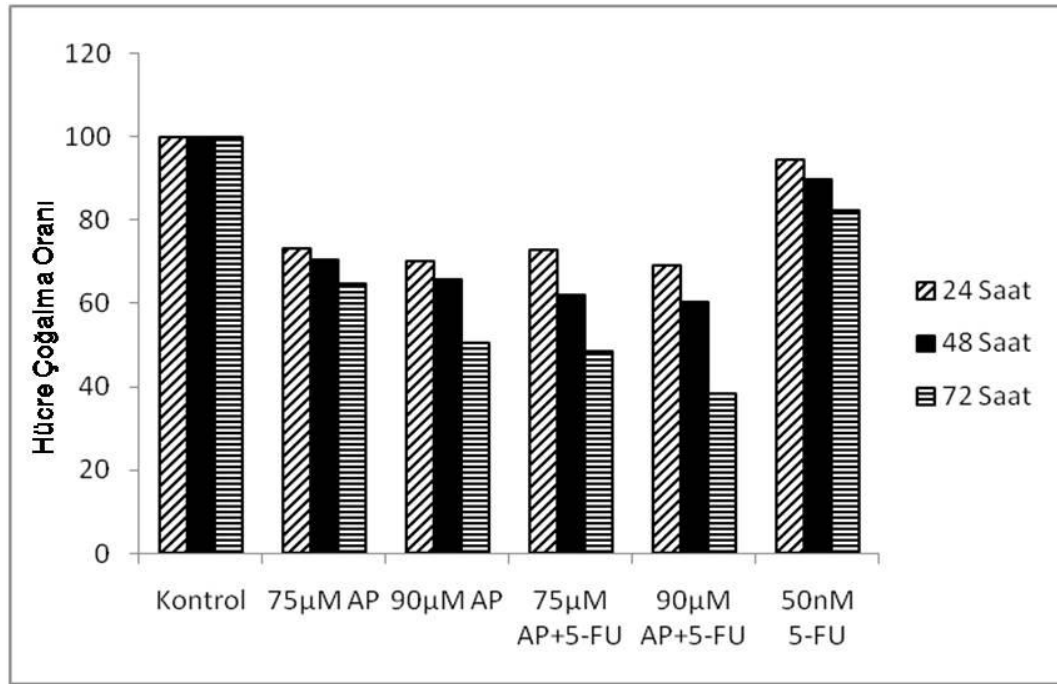


Şekil 29. HT29 hücrelerinde apoptozun morfolojik olarak gösterilmesi. A: Kontrol, B: 90µM Apigenin. Yeşil renkte görülen hücreler canlı hücreleri (1), kırmızı renkte görülen hücreler nekrotik hücreleri göstermektedir (2). Apoptozun aşamasına göre değişik şekillerde boyanmış olan apoptotik hücreler ise numara 3 ile gösterildi.

4.3. Hücre çoğalması ELISA, BrdU Deney Sonuçları

Apigenin ve Apigenin ile 5-FU birleşiminin hücre çoğalması üzerine etkisinin belirlenmesinde hücre çoğalması ELISA, BrdU yöntemi kullanıldı. Şekil 30'da 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda hücrelerin Apigenin ve Apigenin + 5-FU birleşimine cevabı gözlenmektedir. Apoptoz açısından en etkili dozlar 75µM ve 90µM olarak belirlendiğinden bu deneyde kontrol ile birlikte bu dozların hücre çoğalması üzerine etkileri gözlemlendi. Buna göre 24. saatte apoptoz açısından en etkili Apigenin konsantrasyonundaki (90µM) hücre çoğalması %70.1 iken, 5-FU ile birlikte 90µM Apigenin uygulamasında hücre çoğalması %69.23 bulundu. 48 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek Apigenin konsantrasyonundaki hücre çoğalma oranı %65.68 olarak belirlendi (Şekil 30). 90µM Apigenin ve 5-FU birleşiminin 48 saat süre ile uygulamasından sonra hücre

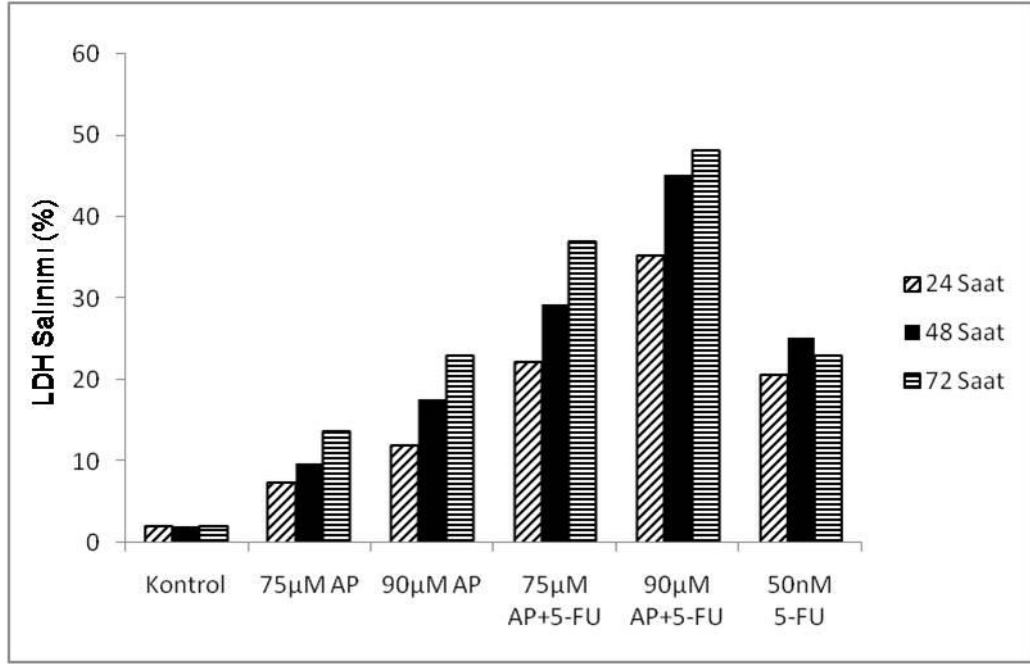
çoğalma oranı ise %60.60 olarak belirlendi. 72 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek konsantrasyonda meydana gelen hücre canlılığı Apigenin'in tek başına uygulanması sonucu %50.70 iken, 5-FU ile uygulanmasında gözlenen hücre çoğalması %38.61 bulundu (Şekil 30).



Şekil 30. HT29 hücrelerinin Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen hücre çoğalma oranlarındaki değişim.

4.4. Sitotoksikite Belirleyici LDH Deney Sonuçları

Apigenin ve Apigenin ile 5-FU birleşiminin sitotoksik etkisinin doza ve zamana bağlı olarak belirlenmesi için, besiyerine salınan LDH düzeyleri belirlendi. Deney sonucunda Apigenin'in, tek başına uygulanması sonucunda hem doza hem de zamana bağımlı olarak kontrole göre sitotoksik etkisinde önemli bir artış gözlenmezken, 5-FU ile birlikteliğinin doza ve zamana bağımlı olarak sitotoksik etkisinde artış belirlendi (Şekil 31).

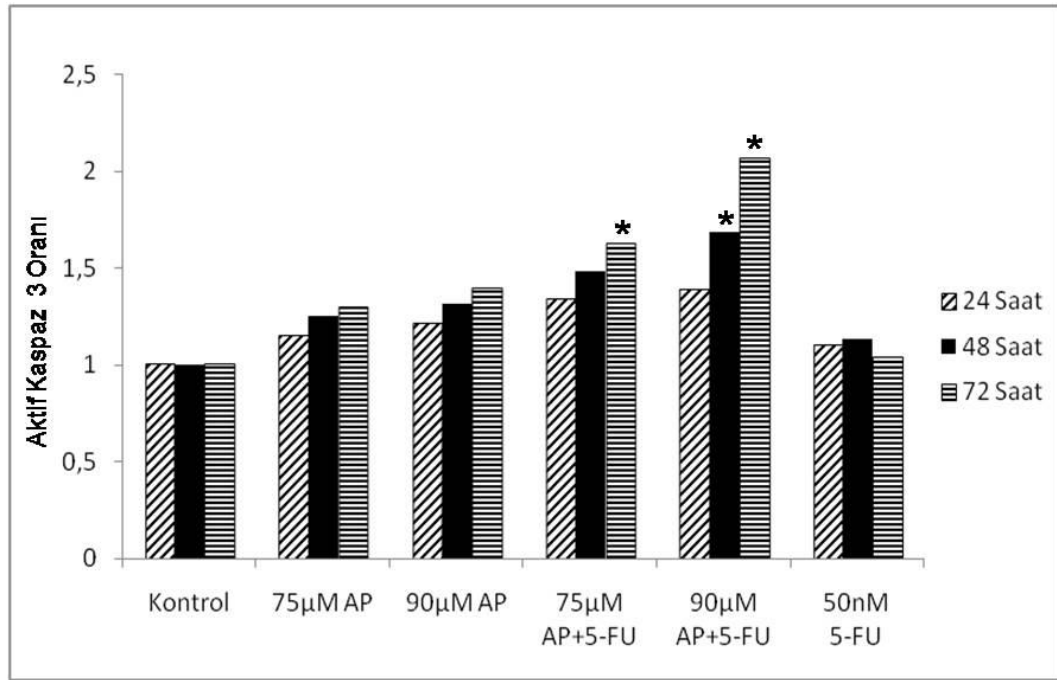


Şekil 31. HT29 hücrelerinin Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen LDH Salınımı

4.5. CASP3 Sandwich ELISA Deney Sonuçları

Şekil 32’de 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda hücrelerin Apigenin ve Apigenin + 5-FU birleşimine karşı aktif kaspaz 3 cevabı gözlenmektedir. Bu deneyde, apoptoz yolağında kaspazlar arasında hücre ölümünün doğrulanmasında en önemli ve efektör role sahip kaspaz 3 aktivitesine bakıldı. Hücrelere kontrol ile birlikte apoptoz açısından en etkili dozlar olan 75µM ve 90µM Apigenin ve bu dozların 5-FU ile birlikteliği uygulandı. Apigenin’in tek başına uygulanması sonucunda hem doza hem de zamana bağımlı olarak kontrole göre kaspaz 3 aktivitesinde artış gözlemlendi. 5-FU ile Apigenin’in birlikte uygulanması sonucunda ise benzer şekilde doza ve zamana bağımlı olarak kaspaz 3 aktivitesinde artış bulundu (Şekil 32).

Deney sonucunda özellikle 72. saatteki Apigenin+5-FU'in 75µM ile 90µM dozlarında ve 48. saatteki 90µM Apigenin+5-FU uygulamasında aktif kaspaz 3 düzeyinde anlamlı bir artış saptandı ($p<0.05$).



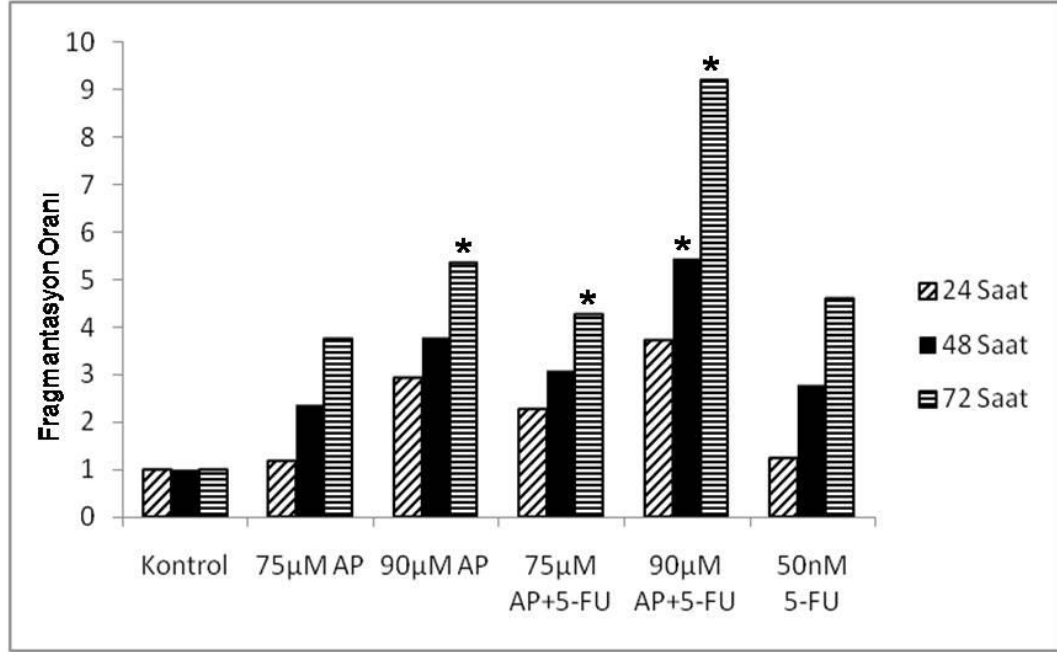
Şekil 32. HT29 hücrelerinin Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen aktif kaspaz 3 oranı. Farklı dozlarda uygulanan Apigenin ve Apigenin + 5-FU birleşiminin aktif kaspaz 3 oranı normal hücrelerdeki kaspaz 3 aktivitesi referans alınarak değerlendirilmiştir.

*Kontrol ve farklı dozlar arasında istatistiksel olarak anlam olduğunu göstermektedir.

4.6. Hücre Ölümü Belirleyici ELISA Deney Sonuçları

Şekil 33'de 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda hücrelerin Apigenin ve Apigenin + 5-FU birleşimine cevabı gözlenmektedir. Bu deneyde kontrol ile birlikte 75µM ve 90µM konsantrasyonlarının DNA fragmentasyonu üzerine etkilerine bakıldı. 72. saatte 90µM Apigenin ile

75µM ve 90µM Apigenin+5-FU uygulamasında kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0.05$). 48. saatte ise sadece 90µM Apigenin+5-FU uygulamasında kontrole göre anlamlı bir artış belirlendi ($p<0.05$).

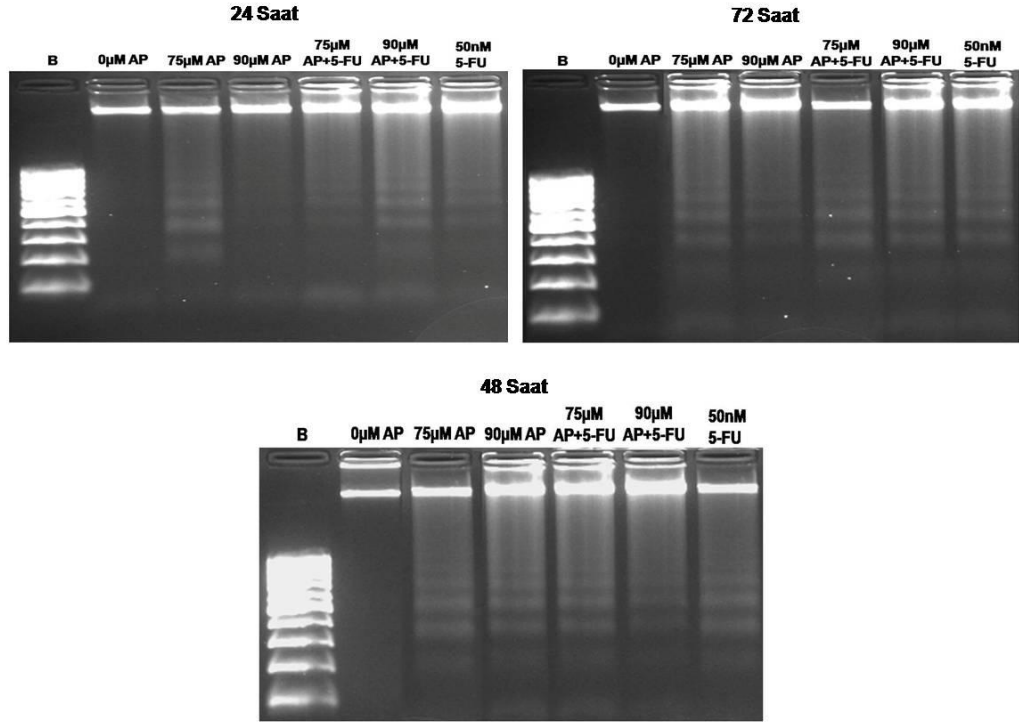


Şekil 33. HT29 hücrelerinin Apigenin ve Apigenin + 5-FU ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen DNA fragmantasyon oranı

*Kontrol ve farklı dozlar arasında istatistiksel olarak anlam olduğunu göstermektedir.

4.7. DNA Fragmantasyon Analizi Sonuçları

Bu deneyde kontrol ile birlikte 75µM ve 90µM konsantrasyonlarının DNA fragmantasyonu, agaroz jel elektroforezi ile de gösterilerek hücre ölümü belirleyici ELISA deney sonuçları ile uyumlu olup olmadığı araştırıldı. Deney sonucunda Apigenin'in tek başına ve 5-FU ile birlikte uygulanması sonucunda doza ve zamana bağımlı olarak kontrole göre ilgili dozlarda DNA fragmantasyonu gözlemlendi (Şekil 34).

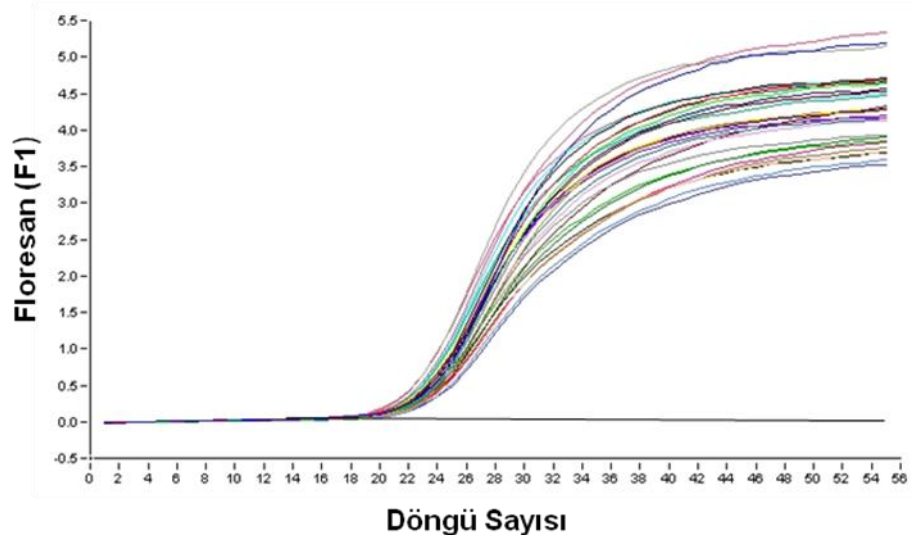


Şekil 34. HT29 hücrelerinin Apigenin ve Apigenin'in + 5-FU ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonrasında görülen DNA fragmentasyonunun %1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü. B; 100 bp'lik DNA moleküler ağırlık belirteci.

4.8. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

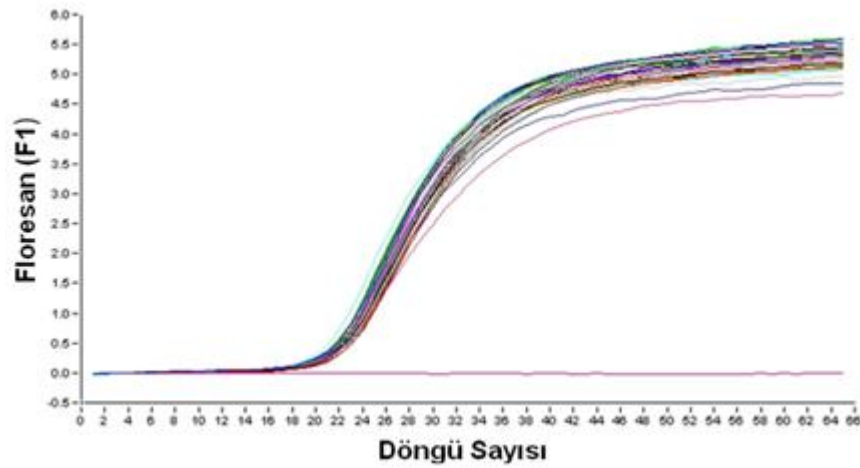
CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler cihazı kullanıldı. HT29 hücre hattından elde edilen cDNA'larda CASP3, CASP8, mTOR, CCND1 ve bu genlerin normalizasyonu için seçilen GAPDH genlerine özgül primerler ve UPL LNA problemleri kullanılarak çalışıldı.

CASP3 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 35'de gösterildi.



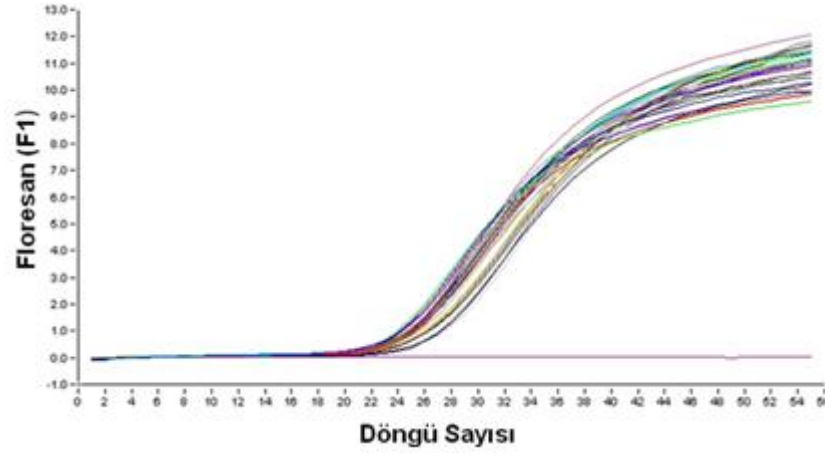
Şekil 35. CASP3 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. CASP3 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey eksende floresan sinyal izlenmektedir.

CASP8 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 36'da gösterildi.



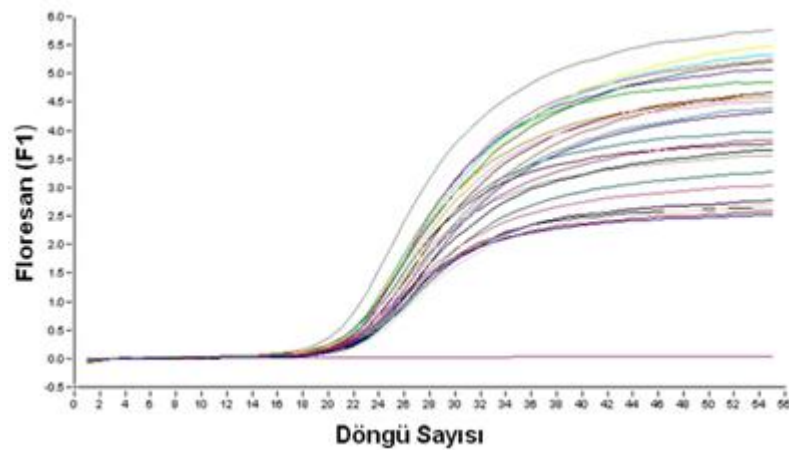
Şekil 36. CASP8 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. CASP8 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey eksende floresan sinyal izlenmektedir.

mTOR geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 37’de gösterildi.



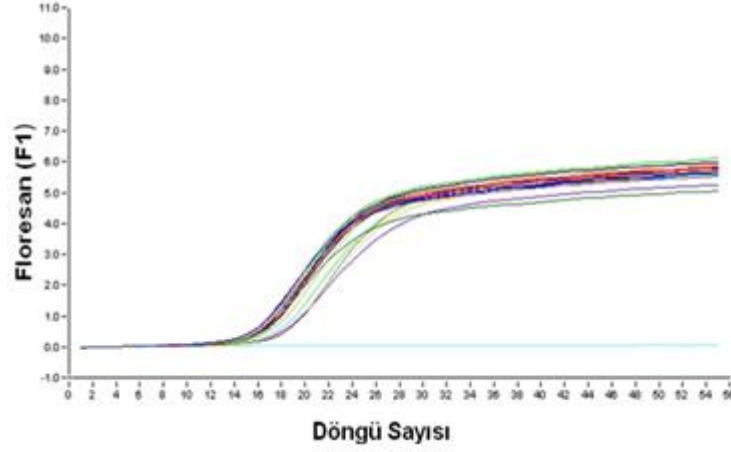
Şekil 37. mTOR geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. mTOR geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

CCND1 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 38’de gösterildi.



Şekil 38. CCND1 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. CCND1 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 genlerinin normalize etmek için seçilen GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 39'da gösterildi.



Şekil 39. GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. GAPDH geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresans sinyal izlenmektedir.

Göreceli gen ifadesi sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir.

$$R = \frac{E (\text{hedef})^{\Delta C_t (\text{kontrol-örnek})}}{E (\text{referans})^{\Delta C_t (\text{kontrol-örnek})}}$$

Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade etmektedir. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔC_t değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, elde edilen R ise ifade oranını göstermektedir.

4.9. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırması

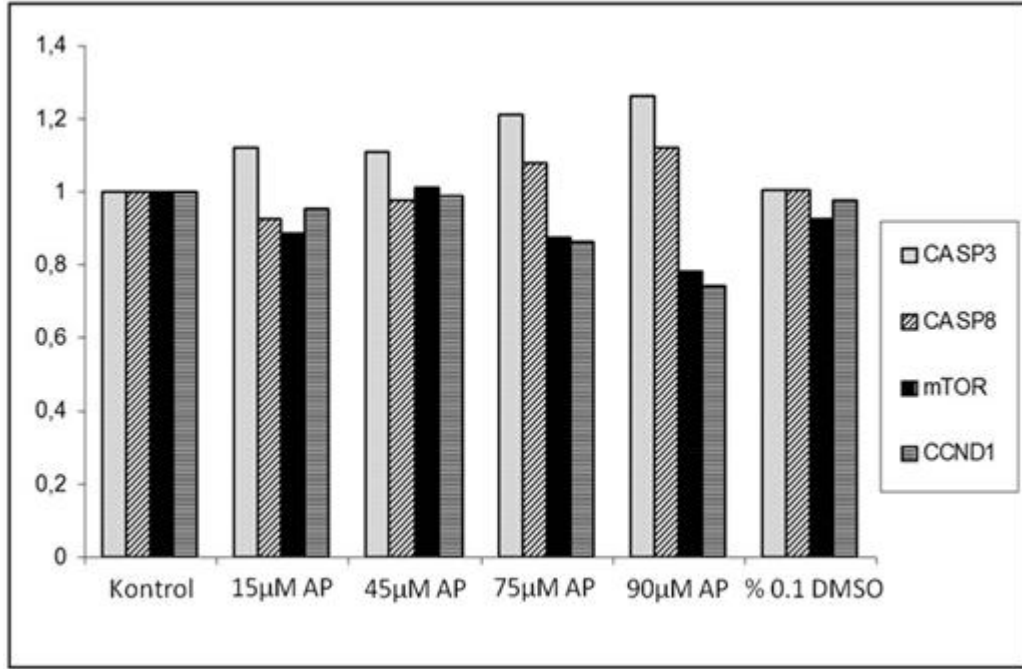
p53-mutant HT29 hücrelerine tek başına Apigenin ve Apigenin + 5-FU uygulamalarından sonra CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 genlerinin ifade düzeylerinin önceden belirlenmiş doz ve zaman aralığında karşılaştırmalı değerlendirmeleri yapıldı.

4.9.1. 24. saatte CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1

Genlerinin İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi

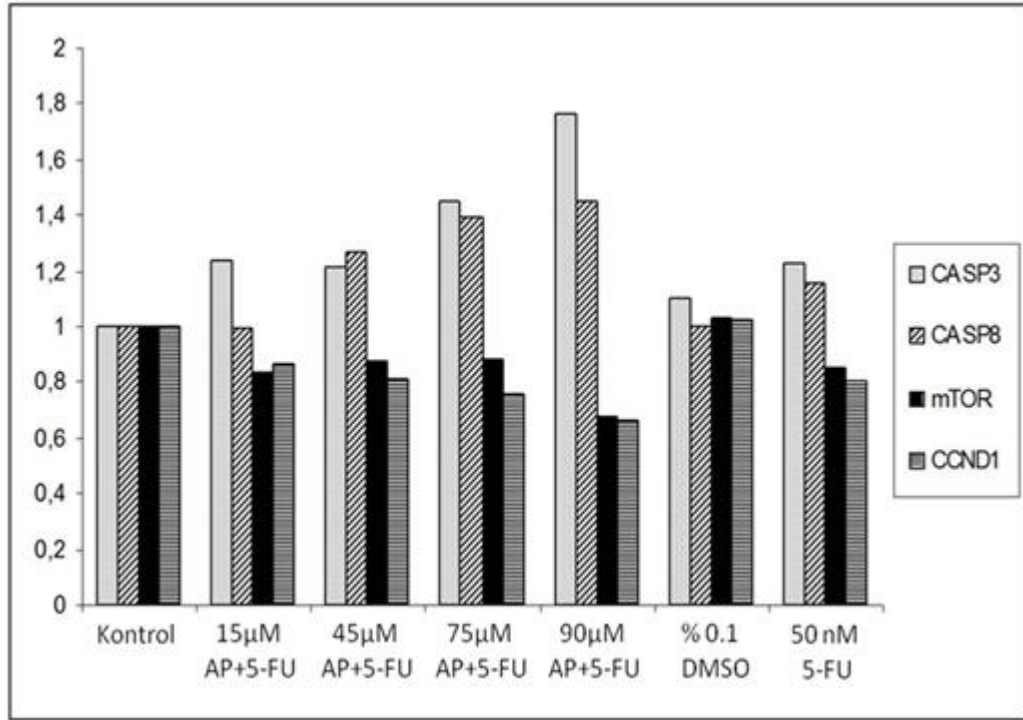
HT29 hücre hattında Apigenin'in tek başına ve 5-FU ile birlikte uygulanması sonucu CASP3 ve CASP8 genlerinin mRNA ifade düzeylerinin kontrole göre doza bağımlı olarak arttığı, mTOR ve CCND1 genlerinin ifade düzeylerinin ise düştüğü gözlemlendi. Ancak bu genlerin mRNA düzeylerindeki doza bağımlı değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 40 ve Şekil 41).

24 saat inkübasyon süresi sonunda tek başına Apigenin'in, apoptoz açısından en etkili konsantrasyonunda ($90\mu\text{M}$), en yüksek kaspaz 3 (1.265) ve kaspaz 8 (1.121) değerleri ile en düşük mTOR (0.785) ve siklin D1 (0.745) değerlerinin elde edildiği Şekil 40'da gösterildi.



Şekil 40. Apigenin uygulaması sonucunda CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifade düzeylerinin 24. saatte kontrole göre doza bağımlı olarak değişimi.

Apigenin' in 5-FU ile birlikte uygulanması sonucunda ise 24 saat inkübasyon süresi sonunda Apigenin'in apoptoz açısından en etkili konsantrasyonunda (90µM), en yüksek kaspaz 3 (1.766) ve kaspaz 8 (1.452) değerleri ile en düşük mTOR (0.678) ve siklin D1 (0.658) değerlerinin elde edildiği Şekil 41'de gösterildi.



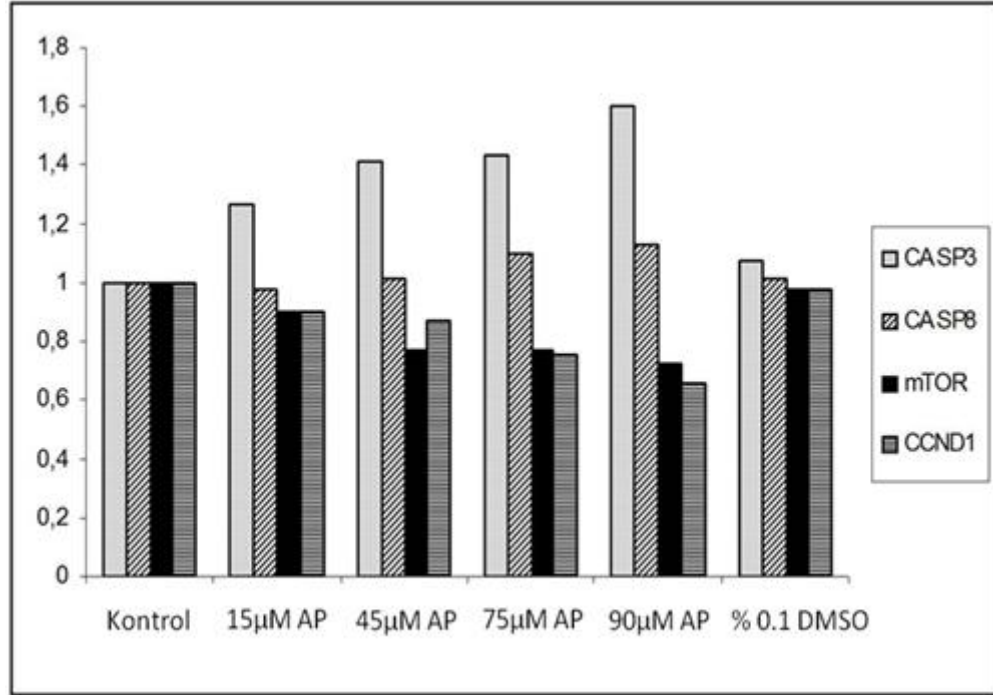
Şekil 41. Apigenin ve Apigenin+5-FU uygulanması sonucunda CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifade düzeylerinin 24. saatte kontrole göre doza bağımlı olarak değişimi.

4.9.2. 48. saatte CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1

Genlerinin İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi

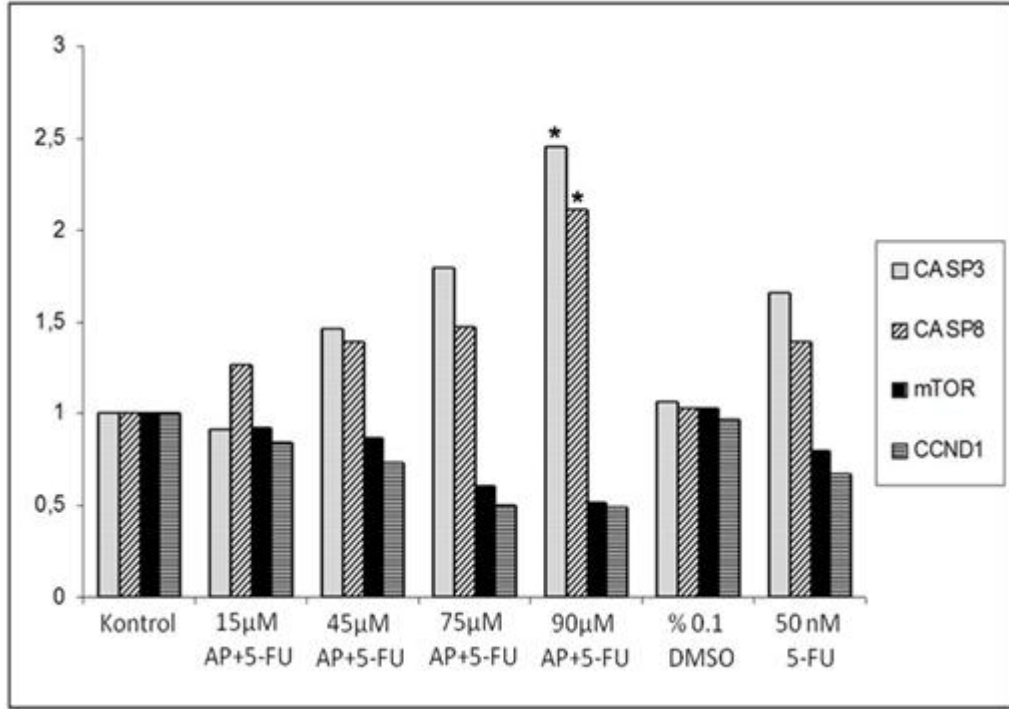
48. saatte CASP3 ve CASP8 genlerinin mRNA düzeyinde ifadelerinin Apigenin'in tek başına ve 5-FU ile birlikte uygulanması sonucu kontrole göre doza bağımlı olarak arttığını, mTOR ve CCND1 genlerinin ise ifadelerinin düştüğü gözlemlendi. Apigenin'in tek başına uygulanması sonucunda CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifadelerindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 42). Apigenin ve 5-FU'nin birlikte uygulanması sonucu CASP3 ve CASP8 genlerinin mRNA ifadelerinde gözlenen artış 90µM' da istatistiksel olarak anlamlıyken ($p<0.05$), mTOR ve CCND1 mRNA ifadelerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Şekil 43).

48 saat inkübasyon süresi sonunda en yüksek tek başına Apigenin konsantrasyonunda elde edilen kaspaz 3 (1.598), kaspaz 8 (1.132), mTOR (0.721) ve siklin D1 (CCND1) (0.654) gen ifade düzeyleri Şekil 42’de gösterildi.



Şekil 42. Apigenin uygulaması sonucunda CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifade düzeylerinin 48. saatte kontrole göre doza bağımlı olarak değişimi.

Apigenin’in 5-FU ile birlikte uygulanması sonucunda ise 48 saat inkübasyon süresi sonunda en yüksek Apigenin konsantrasyonunda elde edilen kaspaz 3 (2.455), kaspaz 8 (2.108), mTOR (0.511) ve siklin D1 (CCND1) (0.487) gen ifade düzeyleri Şekil 43’de gösterildi.



Şekil 43. Apigenin ve Apigenin+5-FU uygulanması sonucunda CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifade düzeylerinin 48. saatte kontrole göre doza bağımlı olarak değişimi.

*Kontrol ve farklı dozlar arasında istatistiksel olarak anlam olduğunu göstermektedir.

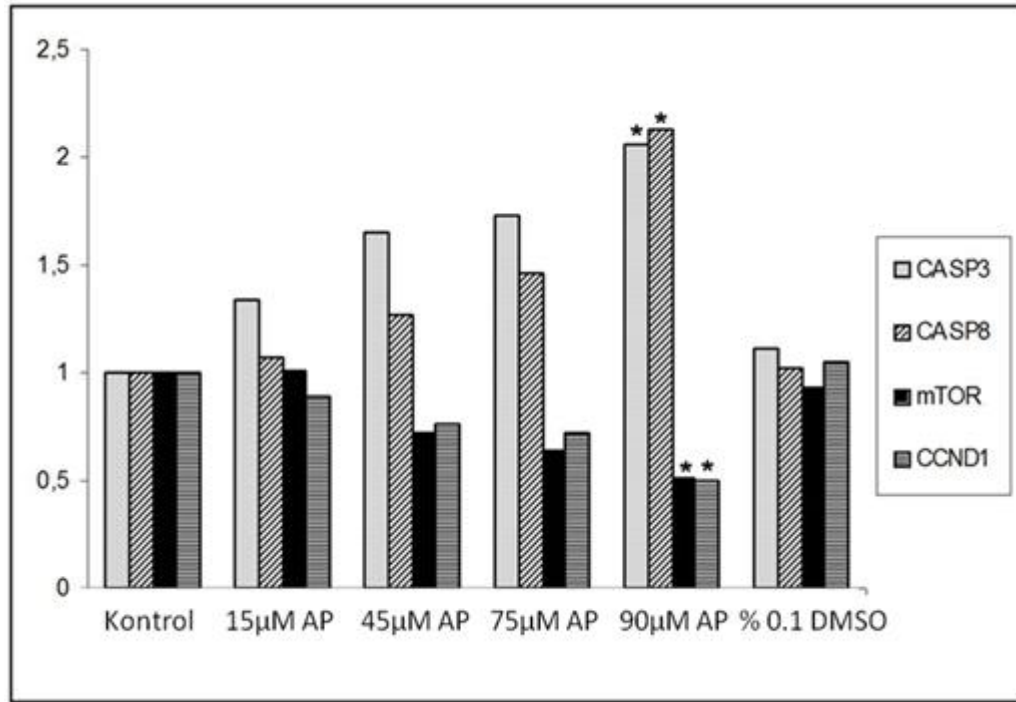
4.9.3. 72. saatte CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1

Genlerinin İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Apigenin'in tek başına ve 5-FU ile birlikte uygulanması sonucu HT29 hücre hattında CASP3 ve CASP8 genlerinin mRNA düzeyinde ifadelerinin kontrole göre doza bağımlı olarak arttığı, mTOR ve CCND1 genlerinin ifadelerinin ise düştüğü gözlemlendi. 90µM Apigenin'in tek başına kullanılması sonucunda CASP3 ve CASP8 genlerinin mRNA ifadelerindeki artış, mTOR ve CCND1 mRNA ifadelerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p > 0.05$) (Şekil 44). Apigenin ve 5-FU'nin birlikte uygulanması sonucu CASP3 ve CASP8 genlerinin mRNA ifadelerinde gözlenen artış ve CCND1 mRNA ifadesindeki düşüş 75µM ve

90µM'da istatistiksel olarak anlam ifade ederken ($p<0.05$) mTOR mRNA ifadesindeki düşüş 90µM'da anlam ifade etti ($p<0.05$) (Şekil 45).

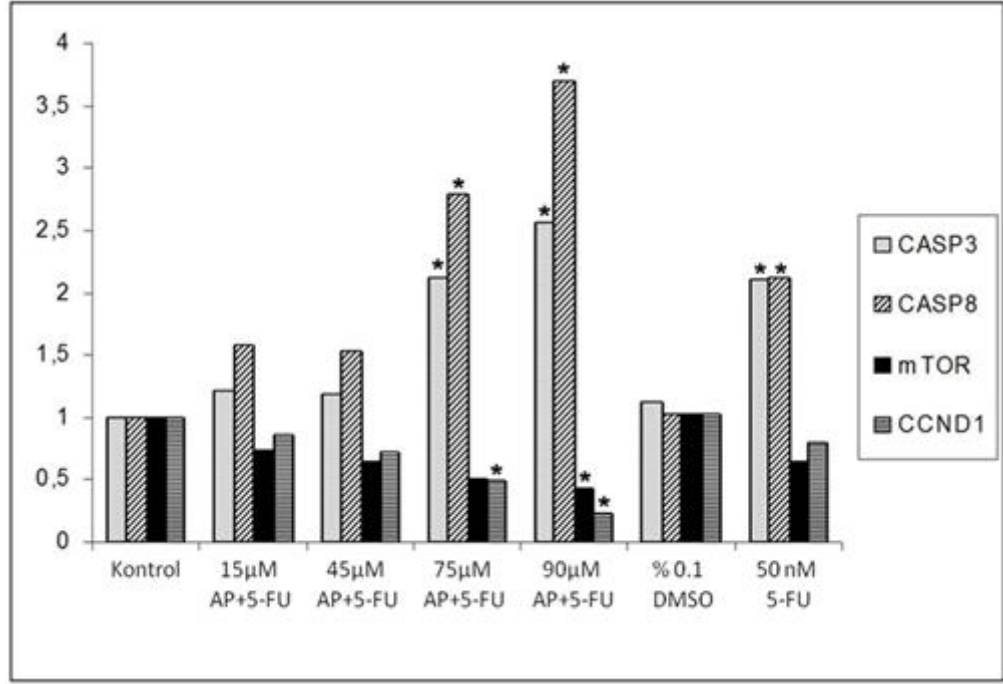
72 saat süreli inkübasyonun sonunda en yüksek tek başına Apigenin konsantrasyonunda meydana gelen ifade düzeyleri; kaspaz 3 için 2.056, kaspaz 8 için 2.132, mTOR için 0.509 ve siklin D1 için 0.501 olarak bulundu (Şekil 44).



Şekil 44. Apigenin uygulaması sonucunda CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifade düzeylerinin 72. saatte kontrole göre doza bağımlı olarak değişimi.

*Kontrol ve farklı dozlar arasında istatistiksel olarak anlam olduğunu göstermektedir.

Apigenin' in 5-FU ile birlikte uygulanması sonucunda ise 72 saat süreli inkübasyonun sonunda en yüksek Apigenin konsantrasyonunda meydana gelen ifadelenme düzeyleri; kaspaz 3 için 2.567, kaspaz 8 için 3.689, mTOR için 0.423 ve siklin D1 için 0.231 olarak bulundu (Şekil 45).



Şekil 45. Apigenin ve Apigenin+5-FU uygulanması sonucunda CASP3, CASP8, mTOR ve CCND1 mRNA ifade düzeylerinin 72. saatte kontrole göre doza bağımlı olarak değişimi.

*Kontrol ve farklı dozlar arasında istatistiksel olarak anlam olduğunu göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Protoonkogenler, tümör baskılayıcı ve DNA onarımı ile ilgili genler ve bunların aktivitelerinde meydana gelen moleküler düzeydeki kusurlar, kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasına, zamanla bu hücrelerin tedaviye direnç kazanmasına ve/veya metastaz olarak ikincil tümörler şeklinde organizmaya yayılmasına neden olmaktadır. Apoptozun temelindeki moleküler mekanizmaları anlamak ve bunlar üzerinde etkili olan moleküllerin kullanılabilirliğini belirlemek, hedef odaklı yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için önemlidir. Bu amaç kapsamında, Apigenin'in HT29 hücrelerindeki, tek başına ve kolon kanserinde sitotoksitesi yüksek olmasına rağmen adjuvan kemoterapide kullanılan 5-FU ile birlikteliğinin, apoptoz üzerine olan etkileri, DNA, RNA (mRNA) ve protein düzeylerinde araştırıldı.

Çalışmamızda Apigenin'in, tek başına ve 5-FU ile birlikte HT29 hücrelerine uygulanması sonrasında doz ve zaman artışına bağlı olarak hücre canlılık oranlarında azalma saptandı. Bu azalmanın temelinde yatan moleküler mekanizmanın, hücrelerin apoptozu mı yoksa nekroza mı girmesinden kaynaklı olduğunu belirlemek için hücreler öncelikle AO/EtBr ile boyanarak incelendi. Elde edilen bulgular, apoptoz üzerine en etkili Apigenin dozunun 72. saat 90µM konsantrasyonunda olduğunu ve Apigenin'in 5-FU ile birlikte uygulandığında ise aynı doz ve sürede daha etkin olabileceğini gösterdi. Ayrıca, 5-FU'in sabit dozda ancak farklı sürelerde tek başına uygulandığında, hücre canlılık oranını yaklaşık %20 azalttığı belirlendi. Bu azalışın nedeninin, 5-FU'in sitotoksitesinin yüksek olmasından dolayı hücreleri apoptoz yerine daha çok nekroza götürmesinden kaynaklı olduğu floresan mikroskobu aracılığıyla belirlendi. Diğer yandan, Apigenin bulgularımızla paralellik gösterecek şekilde düşük sitotoksik etkiye sahiptir¹⁰⁰⁻¹⁰⁷. Apigenin'in tek başına ve 5-FU ile birlikteliğinin hücre çoğalması üzerine olan etkisi, BrdU

ELISA yöntemiyle de saptandı. 72. saat 90µM konsantrasyonunda Apigenin'in 5-FU ile birlikte uygulanmasında, HT29 hücrelerinin çoğalmasında daha etkin bir azalma olduğu belirlendi. Çalışmamız, HT29 hücrelerinde 5-FU'in apoptotik sürece olan etkilerini gösteren çalışmalar¹⁰⁸⁻¹¹⁹ ile paralellik göstermektedir. Ayrıca, 5-FU dışındaki diğer ajanlar ile birlikte kullanımı sonucunda Apigenin'in, tek başına kullanıldığında göstermiş olduğu apoptotik etkisinde artış meydana geldiği yapılan çeşitli çalışmalar ile de gösterilmiştir¹²⁰⁻¹²². Bu sonuçlar, Apigenin'in diğer kemoterapötik ajanlarla beraber kullanılmasının en etkili doz ve süreye ulaşmada tek başına kullanılmasına göre çok daha yararlı olabileceğini gösterdi. HT29 hücre hattı üzerinde apoptotik sürece olan etkileri çalışılmış birçok flavonoid üyesi bulunmaktadır^{22, 123-135}. Ancak, HT29 hücrelerine Apigenin'in uygulanmasına ilişkin literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır^{22, 26, 95, 107, 120, 132, 136}. Bu çalışmaların dördünde Apigenin'in hücre canlılığına olan etkisi değerlendirilmiş olup, Farah ve ark.'ları²² 24. saatte 40µM, Wang ve ark.'ları²⁶ 48. saatte 40µM, 60µM ve 80µM, Kuntz ve ark.'ları¹⁰⁷ 72. saatte 130.6µM, Chung ve ark.'ları¹²⁰ ise 48. saatte 60µM ve 80µM Apigenin konsantrasyonlarında, hücre canlılığındaki azalmayı anlamlı bulmuşlardır. Diğer çalışmalarda ise Apigenin'in, kinaz aktivitesi¹³² ve COX-2 aktivitesi¹³⁶ araştırılmıştır. Sonuçlarımız ve yapılan bu çalışmalar arasındaki doz ve süre farklılığı, Apigenin'in TNFα ile birlikte uygulanmış olmasından²², başlangıçta kültür kaplarına ekilen hücre sayısının ve deney ortamının farklılığından^{26, 107}, HT29 hücre hattının farklı suşlarının kullanılmasından¹²⁰ ve hücrelerin apoptoza giderken kullanmış olabileceği yardımcı farklı moleküler mekanizmalardan ileri gelebilir. Apigenin'in tek başına ve 5-FU ile birlikte uygulaması sonrasında hücrelerin apoptoza yöneldiğine dair elde ettiğimiz bu bulgular, hücre ölümü belirleyici ELISA deneyi ve DNA fragmentasyonu ile de doğrulandı. 75µM ve 90µM konsantrasyonlarında, DNA fragmentasyonuna rastlamamız hücre ölümünün apoptoz kaynaklı olduğunu gösterdi. Kanser hücrelerinin, hipoksi durumlarından dolayı

enerji için anaerobik glikolize bağımlı oldukları bilinmektedir. Dolayısıyla kanser hücrelerinde, anaerobik glikolizin son basamağı olan laktatın pirüvata çevrimi için gerekli olan laktat dehidrogenaz enziminin sitoplazmadaki miktarında artış görülmektedir. Çalışmamızda, en etkili apoptoz dozları olarak belirlenmiş olan 75µM ve 90µM Apigenin'in, tek başına uygulanması sonrasında LDH düzeyinde kontrole göre anlamlı bir sitotoksik etki saptanmazken, 5-FU ile birlikte uygulanması sonrasında oluşan sitotoksik etki LDH düzeyinde kontrole göre anlamlı bir artış ile doğrulandı. Ancak LDH düzeyindeki bu artışın hem nekroz hem de apoptoza giden hücrelerden kaynaklanabileceği ihtimaline karşın yapmış olduğumuz DNA fragmentasyonunda, 100bp'lik boyutlarda gözlemlenen bantlı yapılar (fragmanlar) LDH salınımındaki bu artışın apoptoz kaynaklı olabileceğini gösterdi.

Çalışmamızda, 72. saatteki Apigenin+5-FU'in 75µM ile 90µM doz uygulamaları ile 48. saatteki Apigenin+5-FU'in 90µM doz uygulamasında, aktif kaspaz 3 düzeyinde anlamlı bir artış saptandı ($p<0.05$). Apoptoz yolağında kaspazlar arasında hücre ölümünün doğrulanmasında en önemli role sahip olan kaspaz 3 aktivitesinde gözlemlenen bu protein düzeyindeki artış, p53 mutant olduğu bilinen HT29 hücrelerimizde apoptoza gitmede p53 bağımsız bir yolak izlediğini ve hücre ölümünün kaspaz kaskadını kullanarak apoptozdan kaynaklandığını gösterdi. Ayrıca, Apigenin'in HT29 hücrelerinde kaspaz kaskadı aracılı yolak üzerinden etkili olduğunu göstermek üzere kaspaz 3 ve kaspaz 8 genlerinin ifade edilmesindeki artış mRNA düzeyinde de araştırıldı. Kaspaz 3 ve kaspaz 8 genlerinin her ikisi için de mRNA ifade edilme düzeylerindeki kontrole göre artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). HT29 hücrelerinde Apigenin uygulaması sonrası kaspaz 3 ve kaspaz 8 genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren başka bir çalışma olmadığından dolayı, sonuçlarımız karşılaştırılamadı. Ancak, farklı hücre hatları ile yapılan diğer çalışmalar ile sonuçlarımız paralellik gösterdi. Choi

ve ark.'ları¹³⁷, MDA-MB-453 insan meme kanseri hücrelerine, Das ve ark.'ları¹³⁸, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde, Vargo ve ark.'ları²⁰, THP-1, U937, HL60, Jurkat, K562 ve NIH3T3 lösemi hücrelerinde, Apigenin uygulaması sonrasında kaspaz 3, kaspaz 8 ve/veya kaspaz 9 aktivitelerinde anlamlı bir artış belirlemişlerdir. Ayrıca, Apigenin'in kaspaz kaskadı üzerine olan etkilerini araştırmış olan başka çalışmalar da bulunmaktadır^{23, 139-141}. Elde ettiğimiz mRNA düzeyindeki bulgular da bu çalışmalar ile uyumlu bulundu. Son olarak, Apigenin uygulaması sonucu siklin D1 ve mTOR genlerinin mRNA ifade edilme düzeylerinde azalış olduğu belirlendi. Siklin D1 geninin hücre döngüsünün kontrolünde, mTOR geninin ise translasyon faktörlerinin (S6K, 4E-BP1) kontrolünde görevli olduğunu göz önüne aldığımızda, elde ettiğimiz bu bulgular Apigenin'in hücre döngüsü ve çoğalmasında da etkili olduğunu gösterdi. Apigenin'in, HT29 hücrelerinde siklin D1 ve mTOR genlerinin mRNA ifade edilme düzeylerine olan etkisi ile ilgili bir çalışmaya literatürde rastlamamakla birlikte, Shukla ve Gupta^{28, 142}, LNCaP, 22Rv1 ve PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinde, Lepley ve Pelling³⁴, CRL2097 insan fibroblast hücrelerinde yapmış oldukları çalışmalarla, Apigenin uygulaması sonrasında doza bağımlı olarak siklin D1 mRNA ifade edilme düzeyinde azalma olduğunu belirtmişlerdir. Bunlar dışında, Apigenin'in siklin D1 üzerine olan etkisine ilişkin başka çalışmalar da bulunmaktadır^{21, 27, 143, 144}. Bulgularımız bu çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamız, Apigenin'in HT29 insan kolon kanseri hücrelerinde apoptozu uyarıcı etkin sürenin 72. saat ve etkin dozun 90µM olduğunu ve aynı doz ve sürede 5-FU ile birlikte uygulanmasında etkinliğinin daha yüksek olabileceğini gerek DNA, gerek mRNA ve gerekse protein düzeyinde gösteren ilk çalışmadır. Ayrıca, kaspaz 3, kaspaz 8, mTOR ve siklin D1 mRNA düzeyleri ile ilgili elde ettiğimiz bulgular ve HT29 hücrelerinin p53 mutant suşunun kullanılmış olması, Apigenin'in apoptotik süreçte p53'den bağımsız olarak kaspaz

kaskadını uyardığını göstermektedir. Bunlarla birlikte, ötofajide de görev almakta olan mTOR geninin transkripsiyonel ifade edilme düzeyindeki azalışı, kolon kanseri hücrelerinin apoptoz sürecine girdiğini doğrulamaktadır. Çalışmamız, 5-FU gibi kanser tedavisinde kullanılan ajanlarla Apigenin'in birlikte kullanılmasının, kanser hücrelerinin apoptoza yönelmesinde gerekli olan etkin doz ve süreyi indirebileceğini, hücreler ve mikroçevre üzerindeki sitotoksik etkiyi azaltabileceğini akla getirmiştir. Tüm bunlar ışığında, Apigenin'in klinikte kullanılabilmesi için uygun doz, süre ve uygulanma şeklinin belirlenmesi, apoptoz yolağında yer alan genlerin ifade edilmesine olan etkilerinin moleküler düzeyde aydınlatılması ve yapılan bu *in vitro* çalışmaların *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, HT29 insan kolon kanseri hücrelerinde Apigenin'in doza ve zamana bağımlı olarak, tek başına ve 5-FU ile birlikte hücre yaşamı ve çoğalması üzerinde olan etkileri, DNA, mRNA ve protein düzeyinde araştırıldı. Araştırmamızda, apoptoz sinyal ileti mekanizmasında görev alan kaspaz 3 ve kaspaz 8 genleri ile hücre çoğalmasında görev alan siklin D1 ve mTOR genleri hedef olarak seçildi.

Çalışmamızda, Apigenin'in doza ve zamana bağlı olarak HT29 hücrelerinin canlılık oranında azalmaya neden olduğu ve 5-FU ile birlikte kullanımında apoptotik etkinliğinin arttığı görüldü. En etkili Apigenin dozunun da 72. saatte 90µM konsantrasyonda olduğu bulundu. Hücre canlılığında meydana gelen bu azalışın temel nedeninin apoptoz olduğu, gerek morfolojik, gerekse DNA fragmentasyonunu belirleyen yöntemler ile gösterildi. Ayrıca LDH sitotoksikite yöntemi kullanılarak, Apigenin'in tek başına bir sitotoksik etki oluşturmadığı ancak 75µM ve 90µM Apigenin konsantrasyonlarının 5-FU ile birlikte sitotoksik etkide artışa neden olduğu ve bu etkinin de 5-FU kaynaklı olduğu belirlendi.

Aktif kaspaz 3 seviyesinin protein düzeyinde incelemesi sonucunda, Apigenin ve 5-FU birlikteliğinin 72. saat 75µM ve 90µM ile 48. saat 90µM Apigenin konsantrasyonlarında anlamlı bir artışa neden olduğu belirlendi ($p<0.05$). Apoptotik yollardan biri olan kaspazların merkezi elemanı olan aktif kaspaz 3 varlığı, p53 mutant HT29 hücrelerimizin, p53'den bağımsız olarak kaspaz kaskadı aracılığıyla apoptoza gittiğinin belirteci oldu. Ayrıca kaspaz 3 ile birlikte, hem dışsal hem içsel apoptotik sinyalin iletiminde etkili olan kaspaz kaskadının diğer bir elemanı olan kaspaz 8'in mRNA ifade edilme düzeylerinde artış meydana geldiği gösterildi. Bunlarla birlikte, kanser hücrelerinde aşırı ifade edilmekte olan,

hücre döngüsünün G1/S fazının kontrol noktasında görev alan siklin D1 geni ile translasyonel faktörlerden S6K'nın aktivasyonundan ve 4E-BP1'in inaktivasyonundan sorumlu olan mTOR geninin, mRNA ifade edilme düzeylerinde de Apigenin uygulanması sonrasında azalma saptandı. Ötofaji sürecinde görev alan mTOR'da meydana gelen bu azalma, aynı zamanda HT29 hücrelerinin apoptoza gittiğini bir başka açıdan da doğrular nitelikteydi.

Elde ettiğimiz bulgular, Apigenin'in, *in vivo* ve *in vitro* moleküler destekli çalışmalarla, kullanım şekli, dozu ve kısıtlamalarının belirlenmesinin ardından, özellikle diğer kemoterapötik ajanlarla düşük dozlu birlikteliklerinde daha etkili olarak, kolon kanseri tedavilerinde apoptozu uyaran çok yönlü moleküler hedefe sahip bir terapötik ajan potansiyeline sahip olduğunu gösterdi.

7. ÖZET

Kolon kanseri hücre hattında Apigenin flavonoidinin apoptoz yolak gen ifade edilmesine olan etkilerinin araştırılması.

Kolon kanserinde sinyal iletim yollarını ve proteinlerini hedef alan onkogenik mutasyonlara sıklıkla rastlanmaktadır. Sinyal iletiminde meydana gelen bu değişimler hücrenin çoğalmasına, yaşama işlevlerinin kontrolünün ortadan kalkmasına ve programlı hücre ölümü olan apoptozdan kaçmasına neden olabilmektedir. Apigenin (4',5,7 trihidroksiflavon), apoptoz, anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-metastatik işlevlerinin yanında mutajenik etki göstermemesinden dolayı hedefe yönelik tedavi seçeneklerine (proapoptotik tedavi) yardımcı olabilecek bileşenlerin başında gelir. Bu bilgilere dayanarak çalışmamızda, Apigenin'in sitotoksik ve apoptotik etkilerini HT29 hücre hattında araştırmayı hedefledik.

Çalışmamızda, p53 mutant HT29 insan kolon adenokarsinom hücre hattında, çeşitli doz ve inkübasyon sürelerinde Apigenin' in, tek başına ve sitotoksitesi yüksek kemoterapötik bir ajan olan 5-Fluorourasil (5-FU) ile birlikteliğinde, sitotoksik ve apoptotik etkileri morfolojik, DNA, RNA (mRNA) ve protein düzeylerinde araştırıldı.

HT29 hücrelerine tek başına Apigenin uygulanmasında en yüksek apoptotik oran (% 24.92) 72. saat 90µM Apigenin dozunda elde edilirken ($p=0.001$); aynı doz ve sürede 5-FU ile birlikte uygulanmasında bu oran daha yüksek (% 29.13) bulundu ($p=0.001$). Bu sonuçlar, kaspaz 3 (efektör)'ün mRNA ve protein; kaspaz 8 (başlatıcı)'in ise mRNA ifade edilme düzeylerinin kontrole göre artış göstermesi ile doğrulanmıştır. Buna

karşın, hücre proliferasyonunda görev alan mTOR ve siklin D1 mRNA ifade düzeyleri ise kontrole göre azalmıştır.

Çalışmamız, Apigenin'in HT29 hücrelerinde, p53 bağımsız yoldan hücre döngüsünü durdurarak kaspaz kaskadını aktive ettiğini, bu yolla HT29 hücrelerini apoptoza yönlendirdiğini ve 5-FU ile birlikte kullanımının bu etkiyi artırdığını gösteren ilk çalışmadır. Sonuç olarak çalışmamız, kaspaz kaskad yolağı hedefli kanser tedavisinde, Apigenin'in sitotoksitesi yüksek kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılmasının, uygun apoptotik etkiye düşük doz ve sürede ulaştırabilmesine bağlı olarak, klinik açıdan yararlı olabileceğine dikkat çekmektedir.

Anahtar kelimeler: Kolon kanseri, HT29 hücre hattı, Apigenin, 5-Fluorourasil, apoptoz, kaspaz 3, kaspaz 8, mTOR, siklin D1.

8. SUMMARY

Evaluating the effects of flavonoid Apigenin on the apoptosis pathway gene expression on the colon cancer cell line.

Oncogenic mutations which target signal transmission pathways and proteins are frequently observed in colon cancer. Alterations in the signal transmission might cause cell proliferation, removal of control of survival functions and break away from the process known as 'apoptosis' or programmed cell death. Apigenin (4', 5, 7,- trihydroxyflavone), due to its apoptotic, anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-metastatic and non-mutagenic properties, is one the leading components which might support targeted treatment options (proapoptotic treatment). Based on this information, the aim of the present study is to evaluate the cytotoxic and apoptotic effects of Apigenin on HT29 cell line.

In our study, we explored on the p53 mutant HT29 human colon adenocarcinoma cell line, the cytotoxic and apoptotic effects of Apigenin per se as well as when it was accompanied by 5-Fluorourasil (5-FU) – a chemotherapeutic agent with high cytotoxicity - on morphological, DNA, RNA (mRNA) and protein levels and for various doses and incubation time.

Treatment with Apigenin only for 72h incubation at 90µM dose resulted in the highest apoptotic percentage (24.92%) ($p=0.001$) while a higher percentage (29.13%) was observed after treatment with the same dose of Apigenin and 5-FU combination for the same incubation duration ($p=0.001$). These results were confirmed as mRNA and protein expression levels of caspase-3 (effector) and mRNA expression levels of caspase-8 (initiator) increased in comparison to the control groups. On the

other hand, mRNA expression levels of mTOR and cyclin D1 which take part in cell proliferation decreased in comparison to the control groups.

This is the first study displaying that Apigenin-only treatment results in cell cycle arrest through independent-p53 pathway on the HT29 cell line, activates the caspase cascade and stimulates apoptosis of the HT29 cells. It further shows that use of Apigenin and 5-FU combination leads to a further increase in this effect. In conclusion, our study draws attention to the possible clinical effectiveness of use of Apigenin together with chemotherapeutic agents with high cytotoxicity due to the opportunity to attain suitable apoptotic effect with reduced dose and time in cancer treatment targeting caspase cascade pathway.

Key Words: Colon cancer, HT29 cell line, Apigenin, 5-Fluorourasil, apoptosis, caspase 3, caspase 8, mTOR, cyclin D1.

9. KAYNAKLAR

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
2. Vogelstein B, Kinzler KW. The Genetics Basis of Human Cancer. 2nd edition. The McGraw-Hill Companies Inc. 2002.
3. Weinberg RA. The Biology of Cancer. 1st edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, LCC. New York. 2007.
4. Özçimen A. Steroid'in HL-60 (insan akut miyeloid lösemi) hücre hattında, apoptoz ve farklılaşma üzerindeki etkisi. Doktora. Hacettepe Üniversitesi; 2005.
5. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT ve ark. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. Science 1996; 271: 350 - 353.
6. Hilgers W, Kern SE. Molecular genetic basis of pancreatic adenocarcinoma. Genes Chromosomes Cancer 1999; 26: 1 - 12.
7. Jemal A, Siegel R, Ward E ve ark. Cancer Statistics 2008. CA Cancer J Clin 2008; 58: 71 - 96.
8. Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: Progress, potential and promise. Int J Oncology 2007; 30: 233-245.

9. ATCC-LGC Standarts Catalogue Search [online]. 2009 [cited 2009 August 30]. Available from URL: [http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-38&Template=cell Biology](http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-38&Template=cellBiology)
10. Yağcı C, Toker MC, Toker G. Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler. TBDD 2008; 1: 47-58.
11. Marchand LL. Cancer preventive effects of flavonoids. Biochem Phar 2002; 56: 296-301.
12. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev 2003; 3: 768-780.
13. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr 2004; 79: 727-747.
14. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annu Rev Nutr 2001; 21: 381-406.
15. Vuillemin AT, Nguyen T, Pivot X, Spano JP, et al. Molecularly targeted agents: their promise as cancer chemopreventive interventions. Eu Jr Cancer 2005; 41: 2003-2015.
16. O'Prey J, Brown J, Fleming J, Harrison PR. Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. Biochem Phar 2003; 66: 2075-2088.

17. Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of Apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem & Biophys Res Com* 2001; 287: 914-920.
18. Birt DF, Walker B, Tibbel MG and Bresnick E: Antimutagenesis and antipromotion by Apigenin, robinetin, and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis* 1986; 7: 959-963.
19. Wang W, van Alstyne PC, Irons KA, Chen S, Stewart JW and Birt DF: Individual and interactive effects of Apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. *Nutr Cancer* 2004; 48: 106-114.
20. Vargo MA, Voss OH, Poustka F, Cardounel AJ, Grotewold E, Doseff AI. Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKC δ and caspases in leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 2006; 72(6): 681 - 92.
21. Shukla S and Gupta S: Molecular mechanisms for Apigenin induced cell-cycle arrest and apoptosis of hormone refractory human prostate carcinoma DU145 cells. *Mol Carcinog* 2004; 39: 114-126.
22. Farah M, Parhar K, Moussavi M, Eivemark S and Salh B: 5,6- Dichloro-ribifuranosylbenzimidazole-and Apigenin-induced sensitization of colon cancer cells to TNF-alpha-mediated apoptosis. *Am J Physiol* 2003; 285: 919-928.
23. Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c

release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* 1999; 35(10): 1517 - 25.

24. Iwashita K, Kobori M, Yamaki K and Tsushida T: Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64: 1813-1820.

25. Hirano T, Oka K and Akiba M: Antiproliferative effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on tumor cells of the human breast carcinoma cell line, ZR-75-1. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1989; 64: 69-78.

26. Wang W, Heideman L, Chung CS, Pelling JC, Koehler KJ, Birt DF. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol Carcinog* 2000; 28(2): 102 - 110.

27. Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene* 2002; 21(23): 3727 - 38.

28. Shukla S, Gupta S. Apigenin-Induced Cell Cycle Arrest is Mediated by Modulation of MAPK, PI3K-Akt, and Loss of Cyclin D1 Associated Retinoblastoma Dephosphorylation in Human Prostate Cancer Cells. *Cell Cycle* 2007; 6:9: 1102 - 1114.

29. Fang J, Xia C, Cao Z, Zheng JZ, Reed E and Jiang BH: Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *FASEB J* 2005; 19: 342-353.

30. Piantelli M, Rossi C, Iezzi M, La Sorda R, Iacobelli S, Alberti S and Natali PG: Flavonoids inhibit melanoma lung metastasis by impairing tumor cells endothelium interactions. *J Cell Physiol* 2006; 207: 23-29.
31. Osada M, Imaoka S and Funae Y: Apigenin suppresses the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis, in endothelial cells via degradation of HIF-1alpha protein. *FEBS Lett* 2004; 575: 59-63.
32. Lindenmeyer F, Li H, Menashi S, Soria C and Lu H: Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production. *Nutr Cancer* 2001; 39: 139-147.
33. Plaumann B, Fritsche M, Rimpler H, Brandner G and Hess RD: Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene* 1996; 13: 1605-1614.
34. Lepley DM, Pelling JC. Induction of p21/WAF1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. *Mol Carcinog* 1997; 19(2): 74 - 82.
35. Mounho BJ and Thrall BD: The extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to mitogenic and anti-apoptotic effects of peroxisome proliferators in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 159: 125-133.
36. Hessenauer A, Montenarh M and Gotz C: Inhibition of CK2 activity provokes different responses in hormone-sensitive and

hormone-refractory prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2003; 22: 1263-1270.

37. Landesman-Bollag E, Song DH, Romieu-Mourez R, Sussman DJ, Cardiff RD, Sonenshein GE and Seldin DC: Protein kinase CK2: signaling and tumorigenesis in the mammary gland. *Mol Cell Biochem* 2001; 227: 153-165.

38. Van Dross R, Xue Y, Knudson A and Pelling JC: The chemopreventive, bioflavonoid Apigenin modulates signal transduction, pathways in keratinocyte and colon carcinoma cell lines. *J Nutr* 2003; 133: 3800-3804.

39. Panes J, Gerritsen ME, Anderson DC, Miyasaka M and Granger DN: Apigenin inhibits tumor necrosis factor-induced intercellular adhesion molecule-1 upregulation in vivo. *Microcirculation* 1996; 3: 279-286.

40. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF and Lin JK: Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by Apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1945-1952.

41. Choi JS, Choi YJ, Park SH, Kang JS and Kang YH: Flavones mitigate tumor necrosis factor-alpha-induced adhesion molecule upregulation in cultured human endothelial cells: role of nuclear factor-kappa B. *J Nutr* 2004; 134: 1013-1019.

42. Wei H, Tye L, Bresnick E and Birt DF: Inhibitory effect of Apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Res* 1990; 50: 499-502.
43. Birt DF, Mitchell D, Gold B, Pour P and Pinch HC: Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by Apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res* 1997; 17: 85-91.
44. Myhrstad MC, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R and Moskaug JO: Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 386-393.
45. Middleton E Jr, Kandaswami C and Theoharides TC: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 673-751.
46. Svehlikova V, Wang S, Jakubikova J, Williamson G, Mithen R and Bao Y: Interactions between sulforaphane and Apigenin in the induction of UGT1A1 and GSTA1 in CaCo-2 cells. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1629-1637.
47. Kuo ML, Lee KC and Lin JK: Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by Apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the Salmonella and CHO systems. *Mutat Res* 1992; 270: 87-95.
48. Menichincheri M, Ballinari D, Bargiotti A, Bonomini L, Ceccarelli W, D'Alessio R, Fretta A, Moll J, Polucci P, Soncini C, Tibolla M,

Trosset JY and Vanotti E: Catecholic flavonoids acting as telomerase inhibitors. *J Med Chem* 2004; 47: 6466-6475.

49. Brusselmans K, Vrolix R, Verhoeven G and Swinnen JV: Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem* 2005; 280: 5636-5645.

50. Kim MH: Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases. *J Cell Biochem* 2003; 89: 529-538.

51. Reiners JJ Jr, Clift R and Mathieu P: Suppression of cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1561-1566.

52. Way TD, Kao MC and Lin JK: Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neuoverexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 4479-4489.

53. Hector S, Prehn JHM. Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: A review. *Bioch & Biophys* 2009; 1795: 117 - 129.

54. Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG et al. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 1995; 55: 1407 - 1412.

55. Shirota Y, Stoecklacher J, Brabender J ve ark. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001; 19: 4298 - 4304.
56. Metzger R, Danenberg K, Leichman CG ve ark. High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2371 - 2376.
57. Triest B, Pinedo HM, Blaauwgeers JLG ve ark. Prognostic role of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor, and proliferation markers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1063 - 1072.
58. Tsuji T, Sawai T, Takeshita H ve ark. Tumor dihydropyrimidine dehydrogenase expression is a useful marker in adjuvant therapy with oral fluoropyrimidines after curative resection of colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54: 531 - 536.
59. Violette S, Poulain L, Dussaulx E ve ark. Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer* 2002; 98: 498 - 504.
60. Yang X, Zheng F, Xing H ve ark. Resistance to chemotherapy-induced apoptosis via decreased caspase-3 activity and overexpression of antiapoptotic proteins in ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 423 - 428.

61. Sinicrope FA, Rego RL, Foster NR ve ark. Proapoptotic Bad and Bid protein expression predict survival in stages II and III colon cancers. Clin Cancer Res 2008; 14: 4128 - 4133.
62. Tillman DM, Petak I, Houghton JA. A Fas-dependent component in 5-fluorouracil/leucovorin-induced cytotoxicity in colon carcinoma cells. Clin Cancer Res 1999; 5: 425 - 430.
63. Bezulier K, Fina F, Roussel M ve ark. Fas/FasL expression in tumor biopsies: a prognostic response factor to fluoropyrimidines? J Clin Pharm Ther 2003; 28: 403 - 408.
64. Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış hücre ölümü: apoptoz nedir? Tıp Arş Der 2008; 6(2): 93-104.
65. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26(4): 239-57.
66. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. Pathol Annu. 1982; 17: 229-259.
67. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. Mol Endocrinol. 1994; 8: 665-73.
68. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Review 1993; 14: 133-150.

69. Ballian N, Hu M, Liu SH, Brunicardi FC. Proliferation, hyperplasia, neogenesis, and neoplasia in the islets of Langerhans. *Pancreas*. 2007; 35(3): 199-206.
70. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1145 - 1149.
71. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456 - 1462.
72. Alnemri ES, Livingston DJ, Nichoson DW ve ark. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.
73. Kim WH, Yeo M, Kim MS, Chun SB, Shin EC, et al. Role of caspase-3 in apoptosis of colon cancer cells induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Int J Col Dis* 2000; 15: 105-111.
74. Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273: 9357 - 9360.
75. Woo M, Hakem R, Soengas MS, ve ark. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 1998; 12: 806 - 819.
76. He J, Whitacre CM, Xue LY ve ark. Protease activation and cleavage of poly (ADPribose) polymerase: an integral part of apoptosis in response to photodynamic treatment. *Cancer Res* 1998; 58: 940 - 946.

77. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 2005; 4: 139 - 63.
78. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998; 281: 1309 - 12.
79. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000; 102: 33 - 42.
80. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M *et al*. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000; 102: 43 - 53.
81. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002 ;2: 647 - 56.
82. Kim EJ, Park SY, Shin HK, Kwon DY, Surh YJ, Park JHY. Activation of caspase 8 contributes to 3,3'-diindolylmethane-induced apoptosis in colon cancer cells. *J Nutr* 2007; 137: 31-36.
83. Diaz GD, Li Q, Dashwood RH. Caspase-8 and apoptosis-inducing factor mediate a cytochrome c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin. *Cancer Res* 2003; 63: 1254-1261.
84. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006; 124: 471 - 84.

85. Tsang CK, Zheng XF. TOR-in(g) the nucleus. *Cell Cycle*. 2007; 6: 25 - 9.
86. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002; 110: 163 - 75.
87. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. 2004; 6: 1122 - 8.
88. Graff JR, Konicek BW, Carter JH, Marcusson EG. Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer Res*. 2008; 68: 631 - 4.
89. Dann SG, Selvaraj A, Thomas G. mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends Mol Med*. 2007; 13: 252 - 9.
90. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*. 2007; 12: 9 - 22.
91. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene*. 2006; 25: 6416 - 22.
92. Zhang YJ, Dai Q, Sun DF, Xiong H, Tian XQ, Gao FH, et al. mTOR signaling pathway is a target for the treatment of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 10: 1245-1256.

93. Tetsu O, McCormick F. B-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398; 422-426.
94. Murillo CA, Rychahou PG, Evers BM. RNAi-mediated inhibition of cyclin D1 decreases colon cancer cell proliferation and MMP protein expression. *Alim Tract* 2004; 199: 11.
95. Takagaki N, Sowa Y, Oki T, Nakanishi R, Yogosawa S, Sakai T. Apigenin induces cell cycle arrest and p21/WAF1 expression in a p53-independent pathway. *Int J Oncol* 2005; 26(1): 185 - 9.
96. Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T and Aromaa A: Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 560-568.
97. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB and Kromhout D: Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr Cancer* 1994; 22: 175-184.
98. Peterson J, Lagiou P, Samoli E, Lagiou A, Katsouyanni K, La Vecchia C, Dwyer J and Trichopoulos D: Flavonoid intake and breast cancer risk: a case-control study in Greece. *Br J Cancer* 2003; 89: 1255-1259.

99. Bosetti C, Spertini L, Parpinel M, Gnagnarella P, Lagiou P, Negri E, Franceschi S, Montell M, Peterson J, Dwyer J, Giacosa A and La Vecchia C: Flavonoids and breast cancer risk in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 805-808.
100. Kim DH, Lee JT, Lee IK, Ha JH. Comparative anticancer effects of flavonoids and diazepam in cultured cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2008; 31(2): 255 - 9.
101. Lordan S, O'Neill C, O'Brien NM. Effects of apigenin, lycopene and astaxanthin on 7 beta-hydroxycholesterol-induced apoptosis and Akt phosphorylation in U937 cells. *Br J Nutr* 2008; 100(2): 287 - 96.
102. Szliszka E, Czuba ZP, Jernas K, Król W. Dietary Flavonoids Sensitize HeLa Cells to Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). *Int J Mol Sci* 2008; 9(1): 56 - 64.
103. Tsuji PA, Walle T. Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line. *Chem Biol Interact* 2008; 171(1): 37 - 44.
104. Sonoda M, Nishiyama T, Matsukawa Y, Moriyasu M. Cytotoxic activities of flavonoids from two *Scutellaria* plants in Chinese medicine. *J Ethnopharmacol* 2004; 91(1): 65 - 8.
105. Zhang Q, Zhao XH, Wang ZJ. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis. *Toxicol In Vitro* 2009; 23(5): 797 - 807.

106. Zhang Q, Zhao XH, Wang ZJ. Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(6): 2042 - 53.

107. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* 1999; 38(3): 133 - 42.

108. Li XL, Wang CZ, Sun S, Mehendale SR, Du W, He TC, Yuan CS. American ginseng berry enhances chemopreventive effect of 5-FU on human colorectal cancer cells. *Oncol Rep* 2009; 22(4): 943 - 52.

109. Adamsen BL, Kravik L, De Angelis PM. Cellular response to chemoradiotherapy, radiotherapy and chemotherapy in two colorectal cancer cell lines. *Radiat Res* 2009; 171(5): 562 - 71.

110. Bourikas LA, Kolios G, Valatas V et al. Ciprofloxacin decreases survival in HT-29 cells via the induction of TGF-beta1 secretion and enhances the anti-proliferative effect of 5-fluorouracil. *Br J Pharmacol* 2009; 157(3): 362 - 70.

111. Flis S, Spłwiński J. Inhibitory effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin on human colorectal cancer cell survival are synergistically enhanced by sulindac sulfide. *Anticancer Res* 2009; 29(1): 435 - 41.

112. Costantino E, Maddalena F, Calise S ve ark. TRAP1, a novel mitochondrial chaperone responsible for multi-drug resistance and protection from apoptotic in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Lett* 2009; 279(1): 39 - 46.

113. Thant AA, Wu Y, Lee J ve ark. Role of caspases in 5-FU and selenium-induced growth inhibition of colorectal cancer cells. *Anticancer Res* 2008; 28(6A): 3579 - 92.

114. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Takeuchi T, Kuwano H. Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(3): 761 - 71.

115. Bernhaus A, Fritzer-Szekeres M, Grusch M, Saiko P, Krupitza G, Venkateswarlu S ve ark. Digalloylresveratrol, a new phenolic acid derivative induces apoptosis and cell cycle arrest in human HT-29 colon cancer cells. *Cancer Lett* 2009; 274(2): 299 - 304.

116. Patel BB, Sengupta R, Qazi S, Vachhani H, Yu Y, Rishi AK, Majumdar AP. Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R. *Int J Cancer* 2008; 122(2): 267 - 73.

117. Avallone A, Di Gennaro E, Bruzzese F, Laus G, Delrio P, Caraglia M ve ark. Synergistic antitumour effect of raltitrexed and 5-fluorouracil plus folinic acid combination in human cancer cells. *Anticancer Drugs* 2007; 18(7): 781 - 91.

118. Tang XY, Zhu YQ, Tao WH, Wei B, Lin XL. Synergistic effect of triptolide combined with 5-fluorouracil on colon carcinoma. *Postgrad Med J* 2007; 83(979): 338 - 43.
119. Lim YJ, Rhee JC, Bae YM, Chun WJ. Celecoxib attenuates 5-fluorouracil-induced apoptosis in HCT-15 and HT-29 human colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13(13): 1947 - 52.
120. Chung CS, Jiang Y, Cheng D, Birt DF. Impact of adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene in human colon cancer cell lines on cell cycle arrest by apigenin. *Mol Carcinog* 2007; 46(9): 773 - 82.
121. Chuang CM, Monie A, Wu A, Hung CF. Combination of apigenin treatment with therapeutic HPV DNA vaccination generates enhanced therapeutic antitumor effects. *J Biomed Sci* 2009; 16: 49.
122. Strouch MJ, Milam BM, Melstrom LG, McGill JJ, Salabat MR, Ujiki MB ve ark. The flavonoid apigenin potentiates the growth inhibitory effects of gemcitabine and abrogates gemcitabine resistance in human pancreatic cancer cells. *Pancreas* 2009; 38(4): 409 - 15.
123. Murillo G, Hirschelman WH, Ito A, Moriarty RM, Kinghorn AD, Pezzuto JM, Mehta RG. Zapotin, a phytochemical present in a Mexican fruit, prevents colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* 2007; 57(1): 28 - 37.

124. Ullmannova V, Popescu NC. Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis, reactivation of DLC1, and modulation of other gene expression by dietary flavone in breast cancer cell lines. *Cancer Detect Prev* 2007; 31(2): 110 - 8.

125. Winkelmann I, Diehl D, Oesterle D, Daniel H, Wenzel U. The suppression of aberrant crypt multiplicity in colonic tissue of 1,2-dimethylhydrazine-treated C57BL/6J mice by dietary flavone is associated with an increased expression of Krebs cycle enzymes. *Carcinogenesis* 2007; 28(7): 1446 - 54.

126. Morley KL, Ferguson PJ, Koropatnick J. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Lett* 2007; 251(1): 168 - 78.

127. Lim do Y, Jeong Y, Tyner AL, Park JH. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292(1): G66 - 75.

128. Wenzel U, Nickel A, Daniel H. Increased mitochondrial palmitoylcarnitine/carnitine countertransport by flavone causes oxidative stress and apoptosis in colon cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(24): 3100 - 5.

129. Shi RX, Ong CN, Shen HM. Protein kinase C inhibition and x-linked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65(17): 7815 - 23.

130. Daskiewicz JB, Depeint F, Viorner L, Bayet C, Comte-Sarrazin G, Comte G et al. Effects of flavonoids on cell proliferation and caspase activation in a human colonic cell line HT29: an SAR study. *J Med Chem* 2005; 48(8): 2790 - 804.

131. Wenzel U, Nickel A, Daniel H. Melatonin potentiates flavone-induced apoptosis in human colon cancer cells by increasing the level of glycolytic end products. *Int J Cancer* 2005;116(2): 236 - 42.

132. Izeradjene K, Douglas L, Delaney A, Houghton JA. Casein kinase II (CK2) enhances death-inducing signaling complex (DISC) activity in TRAIL-induced apoptosis in human colon carcinoma cell lines. *Oncogene* 2005; 24(12): 2050 - 8.

133. Chen YC, Shen SC, Chow JM, Ko CH, Tseng SW. Flavone inhibition of tumor growth via apoptosis in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2004; 25(3): 661 - 70.

134. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60(14): 3823 - 31.

135. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* 1999; 38(3): 133 - 42.

136. Al-Fayez M, Cai H, Tunstall R, Steward WP, Gescher AJ. Differential modulation of cyclooxygenase-mediated prostaglandin production by the putative cancer chemopreventive flavonoids tricetin, apigenin and quercetin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58(6): 816 - 25.
137. Choi EJ, Kim GH. Apigenin Induces Apoptosis through a Mitochondria/Caspase-Pathway in Human Breast Cancer MDA-MB-453 Cells. *J Clin Biochem Nutr* 2009; 44(3): 260 - 5.
138. Das A, Banik NL, Ray SK. Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids. *Int J Cancer* 2006; 119(11): 2575 - 85.
139. Zheng PW, Chiang LC, Lin CC. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sci* 2005; 76(12): 1367 - 79.
140. Torkin R, Lavoie JF, Kaplan DR, Yeger H. Induction of caspase-dependent, p53-mediated apoptosis by apigenin in human neuroblastoma. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(1): 1 - 11.
141. Monasterio A, Urdaci MC, Pinchuk IV, López-Moratalla N, Martínez-Irujo JJ. Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. *Nutr Cancer* 2004; 50(1): 90 - 100.

142. Shukla S, Gupta S. Molecular targets for apigenin-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell xenograft. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(4): 843 - 52.

143. Eddy SF, Guo S, Demicco EG, Romieu-Mourez R, Landesman-Bollag E, Seldin DC, Sonenshein GE. Inducible I κ B kinase/I κ B kinase epsilon expression is induced by CK2 and promotes aberrant nuclear factor-kappaB activation in breast cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65(24): 11375 - 83.

144. Yin F, Giuliano AE, Law RE, Van Herle AJ. Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. *Anticancer Res* 2001; 21(1A): 413 - 20.

10. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi, deneyim ve iyi niyetlerini esirgemeyen çok değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Adnan MENEVŞE'ye, Sayın Prof. Dr. Sevda MENEVŞE'ye ve Sayın Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmamda olanaklarını sunarak yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Cemalettin AYBAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, bilgi ve deneyimi ile yoluma ışık tutan, araştırmacı yönü ve fikirleriyle ufkumu açan, sevgi ve hoşgörüsü ile daima yanımda olan değerli hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ece KONAÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin her aşamasında, bilgi, destek, yardım ve güler yüzlerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan keyif duyduğum, Sayın Dr. H. İlke ÖNEN'e, Sayın Araş. Gör. Akın YILMAZ'a ve Sayın Araş. Gör. Ebru ALP'e teşekkürlerimi sunarım.

Üzerimde ödenemez emeği bulunan, tükenmeyen desteği ve sevgisini her zaman hissedeceğim canım annem Yüksel TÜRKTEKİN'e ve çocuk yaşta kaybetmiş olmama karşın yüreğimde ve beynimde her zaman hissettiğim rahmetli babam Hayrettin TÜRKTEKİN'e, minnet ve şükran duygularıyla sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı, kısa zaman önce kanser nedeniyle kaybettiğim, sevgisi, hoşgörüsü ve yardımseverliği ile sadece benim değil herkesin gönlünde taht kurmuş olan, canım teyzem Sayın Nuriye GÜRCAN'a ithaf eder, şükran ve minnetle anarım.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Mehmet

Soyadı : TÜRKTEKİN

Doğum Yeri ve Tarihi : Kayseri, 29.04.1979

Eğitimi :

- | | |
|-------------|--|
| 2007 – | Gazi Üniversitesi, Ankara
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı,
Yüksek Lisans |
| 1998 – 2002 | Erciyes Üniversitesi, Kayseri
Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Lisans |
| 1994 – 1998 | Kayseri Lisesi, Kayseri |
| 1991 – 1994 | Dedeman Ortaokulu, Kayseri |
| 1986 – 1991 | Servet Akaydın İlköğretim Okulu, Kayseri |

Yabancı Dili : İngilizce

Bilimsel Etkinlikleri : Kolon Kanseri Hücre Hattında Apigenin Flavonoidinin Apoptoz Yolak Gen İfade Edilmesine Olan Etkilerinin Araştırılması, Gazi Üniversitesi, BAP, 01-2008/13, Proje Araştırmacısı, 2008.

