

T. C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**KOLON KANSER HÜCRE HATTINDA *Dianthus orientalis* EKSTRAKTININ OLASI  
ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DR. SAMET PAYDAŞ**

**UZMANLIK TEZİ**

**KONYA 2024**

**KONYA 2024**

T. C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**KOLON KANSER HÜCRE HATTINDA *Dianthus orientalis* EKSTRAKTININ OLASI  
ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DR. SAMET PAYDAŞ**  
**ORCID: 0009-0001-1838-6218**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: DOÇ. DR. MEHMET AYKUT YILDIRIM**

**KONYA, 2024**

## TEŞEKKÜR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi genel cerrahi anabilim dalındaki asistanlık eğitimim boyunca cerrahi sanatının inceliklerini bize aktaran, her türlü bilgi ve becerilerini bizden esirgemeyen başta tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet Aykut Yıldırım olmak üzere Prof. Dr. Süleyman Şakir TAVLI, Prof. Dr. Mehmet Metin BELVİRANLI, Prof. Dr. Celalettin Vatansev, Prof. Dr. Mehmet ERİKOĞLU, Prof. Dr. Tevfik KÜÇÜKKARTALLAR, Prof. Dr. Murat ÇAKIR, Doç. Dr. Mustafa ŞENTÜRK, Doç. Dr. Selman ALKAN, Dr. Öğr. Üyesi Alper VARMAN ve Dr. Öğr. Üyesi Ömer KİŞİ'ye, tezin çeşitli aşamalarında yardımları sonucu büyük mesafe katetmemde emeği olan İç Hastalıkları ABD öğretim üyesi Öğr. Gör. Dr. Mehmet Ali KARASELEK'e, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Serkan KÜÇÜKTÜRK'e, KTO Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe DURAN'a, bitki ekstraktlarının temini için Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Gökhan ZENGİN'e,

Asistanlık süreci boyunca çalışmaktan büyük keyif aldığım başta Dr. Burak Sevinç ve Dr. Rıza Erol Mıngır olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, hemşire, personel ve sekreter arkadaşlarıma,

Fakülte hayatım ve sonrasındaki asistanlık sürecimde her zaman destek olan, iyi günde ve kötü günde, hastalıkta ve sağlıkta hayatı paylaşmaktan mutluluk duyduğum değerli eşime,

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi asistanlık sürecinde de benden hiçbir desteği esirgemeyen, sevgilerini her zaman hissettiren anneme, babama ve tüm aile üyelerime,

En kalbi ve samimi duygularıyla teşekkürlerimi sunuyorum.

**Dr.Samet Paydaş**

**Kasım 2024**

## ÖZET

### KOLON KANSER HÜCRE HATTINDA *Dianthus orientalis* EKSTRAKTININ OLASI ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DR. SAMET PAYDAŞ

UZMANLIK TEZİ, KONYA, 2024

**Amaç:** Kolon kanserinde adjuvan ve neoadjuvan yeni ajanların ortaya çıkması hastalara sunulacak tedaviler açısından önemlidir. Klinik kullanımda olan ilaçların çoğunluğu bitkisel kaynaklıdır. *Dianthus* türleride içerdiği fenolik bileşikler ile antikanser ajan olabilecek potansiyelde olmakla birlikte literatürde az sayıda veri bulunmaktadır. Bu noktadan hareketle çalışmada *Dianthus orientalis* ekstraktının kolon kanser hücre hattındaki olası antikanser etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Bu amaçla apoptoz ve kaspaz yolağında rol oynayan gen ekspresyonlarındaki değişikliklerin belirlenmesi amaçlandı.

**Materyal ve Metod:** *Dianthus orientalis* ekstraktı hazır toz halinde temin edildi. Ekstraktlar hekzan, diklorometan (DCM), etil asetat (EA), etanol (EtOH), etanol/su (%70) ve su gibi farklı çözücülerde hazırlandı. Bitki ekstraktlarının kimyasal kompozisyon analizleri HPLC-MS tekniği kullanılarak belirlendi. Bu analiz hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. Çalışmada HT-29 kolon kanser hücre hattı ve kontrol grubu olarak da HEK-293 sağlıklı embriyonik böbrek hücre hattı ile CCD sağlıklı kolon hücre hattı kullanıldı. HT-29 ve HEK-293 hücre hattı temin edilen bu hücreler, %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 penisilin/streptomisin (100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin) içeren RPMI kültür ortamında flasklarda kültüre ekildi. Hücreler kültür ortamında yeterli sayıya ulaştıktan sonra PBS ile yıkanarak % 0,25 Trypsin-EDTA aracılığıyla enzimatik olarak kültür ortamında kaldırılıp FBS içeren besiyeri ile inaktive edildi. Çalışma için yeterli miktardaki hücreler ile çalışmaya devam edilen diğer hücrelerin %10 dimethyl sulfoxide (DMSO) protokolü ile kriyoprezervasyonu yapılarak -80°C de stoklandı. Çalışmaya devam edilen hücrelerin 37°C ve %5'lik CO<sub>2</sub>'li ortamda kültüre ekilen, besiyeri iki günde bir yenilenerek ve yeterli sayıya ulaşıncaya kadar bu işlem tekrar edildi. Yeterli hücre sayısına ulaşılan hücreler yeni kültür ortamlarına alınıp hücre sayımı yapıldı. Sonrasında sitotoksite analizi, real time

polimeraz zincir reaksiyonu ve flow sitometrik analizler yapılarak veriler istatistiksel analize alındı.

**Bulgular:** *DiO22* uygulanan grupta antiapoptotik genler olan *Bcl-XL* ve *Bcl-2* ekspresyonlarında anlamlı olarak azalma tespit edildi. Proapoptotik gen ekspresyonlarında ise *Apaf-1*, *Bax*, *Bak*, *p53* ve *ATM* gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi.

*DiO23* uygulanan grupta antiapoptotik genler olan *Bcl-XL* ve *Bcl-2* ekspresyonlarında anlamlı olarak azalma tespit edildi. Proapoptotik gen ekspresyonlarında ise *Apaf-1*, *Bax*, *Bak*, *p53* ve *ATM* gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi.

**Sonuç:** Çalışmamız *Dianthus orientalis* bitkisine ait iki farklı şekilde hazırlanmış olan *DiO22* ve *DiO23* ekstraktlarının kolon kanser hücre hattında antiapoptotik genleri baskıladığı görüldü. Proapoptotik ile kaspaz yolağındaki başlatıcı ve efektör kaspaz gen ekspresyonlarını aktive ettiğini gösterdi. İlave olarak flow sitometrik apoptoz analizindeki *DiO22* grubunda erken apoptozda, *DiO23* grubunda geç apoptoz oranındaki kontrole göre artmış apoptoz oranı gen ekspresyon sonuçlarını da destekler nitelikteydi.

**Anahtar Kelimeler:** Kolon Kanseri, *Dianthus Orientalis*, Antikanser Etkiler, Apoptoz, Kaspaz

## ABSTRACT

### INVESTIGATION of POSSIBLE ANTICANCER EFFECTS of *Dianthus orientalis* EXTRACT on COLON CANCER CELL LINE

DR. SAMET PAYDAŞ

SPECIALIST THESIS, KONYA, 2024

**Objective:** The emergence of new adjuvant and neoadjuvant agents in colon cancer is important for the treatments offered to patients. The majority of drugs in clinical use are of plant origin. Although *Dianthus* species have the potential to be anticancer agents with the phenolic compounds they contain, there is little data in the literature. Starting from this point, the study aimed to evaluate the possible anticancer effects of *Dianthus orientalis* extract on the colon cancer cell line. For this purpose, it was aimed to determine the changes in gene expressions that play a role in apoptosis and caspase pathway.

**Material and Method:** *Dianthus orientalis* extract will be supplied in ready powder form. Extracts will be prepared in different solvents such as hexane, dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EA), ethanol (EtOH), ethanol/water (70%) and water. Chemical composition analyzes of plant extracts will be determined using the HPLC-MS technique. This analysis will be carried out in the form of service procurement. In the study, HT-29 colon cancer cell line and HEK-293 healthy embryonic kidney cell line and CCD healthy colon cell line will be used as control groups. HT-29 and HEK-293 cell lines will be obtained and these cells will be cultured in flasks in RPMI culture medium containing 10% FBS (Fetal Bovine Serum) and 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). After the cells reach a sufficient number in the culture medium, they will be washed with PBS, enzymatically removed from the culture medium by 0.25% Trypsin-EDTA, and inactivated with the medium containing FBS. Sufficient cells for the study and other cells that will continue to be used will be cryopreserved with a 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) protocol and stored at -80°C. The cells that continue to be studied will be cultured in an

environment of 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, the media will be renewed every two days, and this process will be repeated until the sufficient number is reached. Cells with sufficient cell numbers will be transferred to new culture media and cell counts will be performed. Afterwards, cytotoxicity analysis, real time polymerase chain reaction and flow cytometric analyzes will be performed and the data will be obtained and taken into statistical analysis.

**Findings:** A significant decrease in the expressions of *Bcl-XL* and *Bcl-2*, which are antiapoptotic genes, was detected in the DiO22 applied group. As for pro-apoptotic gene expressions, a statistically significant increase was detected in *Apaf-1*, *Bax*, *Bak*, *p53* and *ATM* gene expressions.

A significant decrease in the expressions of *Bcl-XL* and *Bcl-2*, which are antiapoptotic genes, was detected in the DiO23 applied group. As for pro-apoptotic gene expressions, a statistically significant increase was detected in *Apaf-1*, *Bax*, *Bak*, *p53* and *ATM* gene expressions.

**Results:** Our study showed that DiO22 and DiO23 extracts of the *Dianthus orientalis* plant, prepared in two different ways, activated the apoptosis pathway in the colon cancer cell line by suppressing antiapoptotic genes and activating the initiator and effector caspase gene expressions in the proapoptotic and caspase pathway. In addition, in the flow cytometric apoptosis analysis, the increased early apoptosis rate in the DiO22 group and late apoptosis rate in the DiO23 group compared to the control also supported the gene expression results.

**KeyWords:** Colon Cancer, *Dianthus Orientalis*, Anticancer Effects, Apoptosis, Caspase

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kolorektal Kanserler.....	3
2.1.1.Giriş.....	3
2.1.2.İnsidans ve Risk Faktörleri.....	3
2.1.3.Yaş.....	3
2.1.4.Herediter Risk Faktörleri.....	4
2.1.5.Beslenme ve Çevresel Faktörler.....	4
2.1.6.İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları.....	4
2.1.7.Diğer Risk Faktörleri.....	4
2.2. Kolon Kanserinde Tedavi.....	5
2.3.Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	6
2.4.Dianthus L.....	7
2.4.1. <i>Dianthus orientalis</i> .....	8
3.MATERYAL ve METHOD.....	9
3.1.Materyal.....	9
3.1.1. <i>Dianthus orientalis</i> Ekstraktının Elde edilmesi.....	9
3.2.Method.....	9
3.2.1. Hücre Kültürü.....	9
3.2.2.Hücre Sayısının Belirlenmesi.....	10
3.2.3.Sitotoksosite Analizi.....	10
3.2.4.Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR).....	11
4.BULGULAR.....	14
4.1. Hücre Kültürü Sonuçları.....	14
4.2. MTT Analizi.....	15
4.3. RT-PZR Sonuçları.....	15
4.4. Akan Hücre Ölçer Analizleri.....	17
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	18
6.KAYNAKÇA.....	22

## TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kolorektal Kanserin Risk Faktörleri ve Önleyici Faktörleri.....	5
Tablo 2. Çalışma kapsamında apoptoz ve kaspaz aktivasyonunda rol oynayan genlere ait primer dizileri.....	11

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1. Apoptotik Sürecin Şematik Gösterimi

Şekil-2. Dianthus Orientalisin fotoğrafı

Şekil-3. Dianthus Orientalisin Türkiye'de bulunduğu coğrafyalar

Şekil-4. CaCO<sub>2</sub> ve HEK293 hücre hatlarına *DiO22* ve *DiO23* uygulama öncesi ve sonrası X10 ışık mikroskobu görüntüsü

Şekil 5. CaCO<sub>2</sub> hücre hattına farklı dozlarda ve zaman dilimlerinde(24, 48 ve 72 saat) *DiO22* ve *DiO23* uygulama sonrası elde edilen MTT analiz sonuçları

Şekil 6. CaCO<sub>2</sub> hücre hatlarına *DiO22* ve *DiO23* uygulama sonrası gen ekspresyon değişiklikleri

Şekil 7. CaCO<sub>2</sub> hücre hattına etkin doz ve zamanda *DiO22* ve *DiO23* uygulama sonrası akan hücre ölçer yöntemi ile apoptoz sonuçları

## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

APAF-1: Apoptotic protease activating factor-1

ATCC: American Type Culture Collection

BAX: Bcl-2-associated X protein

BCL-2: B-cell lymphoma gene-2

DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

FASL: Fas ligandı

FBS: Fetal Bovine Serum

İBH: İnflamatuvar barsak hastalığı

KRK: Kolorektal Kanser

KT: Kemoterapi

MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol 2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür

P53: Tümör protein 53

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RT: Radyoterapi

Sit-C: Sitokrom C

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TNF: Tümör Nekroz Faktör

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, 20. yüzyıl içerisinde en korkulan hastalıklardan biri olup her geçen yıl artan insidansla hızlı bir şekilde yayılmaya devam etmektedir. Bu nedenle kanser günümüzde önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiş olup ölümün önde gelen sebepleri arasındadır. Son olarak 2022 yılı kanser istatistiklerine göre erkek cinsiyette akciğer, prostat ve kolorektal, kadın cinsiyette ise akciğer, meme ve kolorektal kanserlerin en fazla ölüm nedenleri arasında olduğu bildirilmiştir (Siegel ve ark, 2017). Kolorektal kanser (KRK), yılda 1.7 milyon yeni tanı sayısı ile dünya çapında görülen en yaygın ikinci kanserdir. Kolorektal kanserlerde standart tedavi, orta ve yüksek riskli hastalar için cerrahiye takiben kemoterapidir (KT). Adjuvan KT'ye rağmen, hastaların genellikle %20-30'unda tedaviye dirençli hastalığın yeniden geliştiği bildirilmektedir (Osterman ve Glimelius, 2018). Kolorektal kanserlerdeki bu durum dikkate alındığında yeni tedavi seçeneklerinin araştırılması gerektiği kaçınılmazdır. Bitkisel ilaçlar, kanserli hücrelerin çoğalmasını inhibe edip DNA onarım yolağını stimüle ederler. Aynı zamanda apoptozu uyararak hücre döngüsünü belli bir aşamada durdururlar. Dolayısıyla multipl terapötik etkilerinden dolayı yeni geliştirilecek antikanser ilaç deneylerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Kullanılan sistemik tedavi yöntemleri malign hücrelerin apoptoza girmesini indükleyebilir, metastatik yayılım özelliklerini durdurabilir veya kaspazları aktive ederek hücre ölüm yollarını hedef alabilir. Apoptoz, Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Apoptoz ayrıca KT ve radyoterapi (RT) ile stimüle edilen ve tedavide oldukça önemli bir rolü olan hücre ölüm mekanizmasıdır (Kaufmann ve Gores, 2000). Apoptoz, hücre içinde oluşan stresörlerce uyarılan intrinsik yol veya ölüm reseptörlerinin aktive olması ile uyarılan ekstrinsik yol ile oluşabilir. Mitokondriden salınan sitokrom c, intrinsik yolda önemli olan bir aşamadır. *Bcl-2* protein ailesi (proapoptotik protein *Bad* ve antiapoptotik protein *Bcl-2* gibi) bu süreçte mitokondri zar geçirgenliğini değiştirerek sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasında rol alır. Ayrıca tümör süpresör protein *p53*, hücrelerde DNA hasarı olması halinde *BAX* gibi apoptoz öncüsü genleri aktive eder. Sitokrom c, sitoplazmaya geçince *Apaf-1* isimli protein ile bir kompleks meydana getirir ve bu kompleks, başlatıcı protein olan kaspaz-9'u parçalar. Sonrasında aktiflenmiş kaspazları 3, 6 ve 7 hücre ölümünü indüklemek için aktive edilir. Ancak hücre yüzeyindeki ölüm ligandlarının ve ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ekstrinsik yolda önemlidir (D'Arcy, 2019). Bundan dolayı çalışmalarda kullanılan ajanın etkinliğini değerlendirme apoptoz

(*Bax, Bad, p50, Bak, Apaf-1, Bcl-2, Bcl-XL*) ve kaspaz aktivasyonunda (*Casp6, Casp9, Casp3, Casp12, Casp2*) rol oynayan gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Şu anda tedavide kullanılan kanser ajanlarının %70'inden daha fazlası bitkisel kökenli olup (taksol, vinblastin, vinkristin, topotekan, irinotekan vb.) antikanser ajanlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Gogoi ve ark, 2022). *Dianthus* isimli bitki türleri alkaloidler, tanenler, saponinler, siklik peptitler ve fenolik bileşikler içeriği açısından oldukça zengindir. *Dianthus* türleri genelde diüretik, anti-inflamatuar, immün sistem destekleyici ve ekspektoran amaçlı kullanılmaktadır. *Dianthus* türleri ile yapılan az miktarda araştırmada bu bitki ekstraktlarının hücreler için toksik etkilerinin bulunduğu gözlenmiştir. *Dianthus carmelitarum* isimli bitkinin dimetil sülfoksit (DMSO) isimli çözücü ile hazırlanmış ekstraktının kolon kanser hücre hattında antikanser etkisinin araştırıldığı bir çalışmada kolon kanserli hücreler üzerinde sağlıklı kolon hücrelerine göre 3.6 kat daha fazla sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Turan ve ark. 2017). Bazı çalışmalar *Dianthus orientalis* ekstraktının insan karaciğer, akciğer, meme ve kolon kanser hücre hattında olası antikanser etkilerinin araştırıldığı çalışmada anlamlı bir sitotoksik etkisinin olmadığını ancak konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etkinin olabileceğini bildirmişlerdir. *Dianthus orientalis*'in akciğer ve kolon kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin olduğu gösterilmiştir. Literatürde *Dianthus orientalis* türünün antikanser etkilerinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Naghbi ve ark. 2014). *Dianthus orientalis*'in içerdiği fenolik bileşikler nedeniyle antikanser etkilerinin olabileceği düşünülmektedir. Bundan dolayı çalışmada *Dianthus orientalis* ekstraktının kolon kanser hücre hattındaki olası antikanser etkilerinin araştırılması amaçlandı.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kolorektal Kanserler**

#### **2.1.1. Giriş**

KRK, kolonun lüminal kısmından köken alarak ortaya çıkan malign bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. KRK'ler günümüzde önlenebilir maligniteler arasında sayılmaktadır. KRK erkek cinsiyette 3. en sık saptanan kadın cinsiyette ise 2. en sık saptanan malignite türüdür. KRK Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) mortalite sıralamasında 3. sırada yer almaktadır. Son zamanlardaki tedavi gelişmeleri ile mortalite oranları gerilemektedir. Ancak 2035 yılına doğru ise morbidite oranlarının yaklaşık olarak 10 kat yükseleceği tahmin edilmektedir (Siegel ve ark 2017).

#### **2.1.2. İnsidans ve Risk Faktörleri**

KRK gastrointestinal sistemin en sık görülen maligniteleridir. ABD'de yıllık 130.000 yeni vaka görülmektedir. Yıllık mortalitesi 50.000 den fazla olup bu sayı KRK'yi 3. ölüm nedeni yapmaktadır. İnsidans her iki cinsiyette de eşittir ve yaklaşık son 20 yıldır neredeyse aynı seviyede devam etmektedir. Ulusal kanser tarama projeleri, 50 yaş üstündeki vakalarda ölümcül hastalığın görülme insidansını azaltmaktadır. Buna rağmen 50 yaş altındaki vakalarda insidans artmakta ve daha yüksek mortalite ile seyretmektedir. Erken teşhis, medikal ve cerrahi tedavilerde ilerleme son zamanlarda KRK'lerdeki mortalite oranlarını azaltmıştır (Siegel ve ark 2017).

#### **2.1.3. Yaş**

KRK için en önemli risk faktörüdür. KRK insidansı 50 yaşından sonra belirgin şekilde artmaktadır. Olguların yaklaşık %90'dan çoğu 50 yaşını aşmış kişilerdir. Bu durum KRK görülmesi için ortalama riske sahip kişilerde tarama programının 50 yaşında başlamasının ana sebebidir. Ayrıca KRK herhangi bir yaşta ortaya çıkabilmektedir. Dışkılama alışkanlığında bozulma, makatta kanama, melena, sebebi bilinmeyen anemi ve kilo kaybı gibi durumlar ileri araştırmaya sebeptir (Papadakis ve Mcphee, 2016).

#### **2.1.4. Herediter Risk Faktörleri**

KRK'lerin yaklaşık %65-70 gibi bir kısmı sporadik olarak ortaya çıkarken geri kalan %30-35 kadarlık kısmındaysa genetik yatkınlık ön plandadır. Bu herediter bozuklukların bulunması, erken teşhis ve tedavi için genetik çalışmalara ilgi çekmiştir. Familial sendromlardan kuşkulandığında medikolegal olarak genetik danışmanlık istenmelidir (Giglia ve Chu, 2016).

#### **2.1.5. Beslenme ve Çevresel Faktörler**

KRK genel olarak hayvansal yağdan zengin ve liften fakir diyetle beslenenlerde daha sık görülmektedir. Doymuş ya da doymamış hayvansal yağlı gıdalar KRK gelişim riskini artırırken, oleik asitten zengin yağlar riski artırmaz. Kalsiyum, vitamin A, vitamin C, vitamin E, selenyum, karotenoidler ve bitki fenollerini KRK gelişim riskini azaltmaktadır. Fiziksel aktivitenin az olması ve obezite KRK gelişim riskini artırmaktadır. Bu bilgiler bize KRK'lerden korunma yollarından birisinin de yaşam şekli değişikliği olduğunu göstermektedir (Calle ve ark 2013).

#### **2.1.6. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları**

Uzun süredir inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) olan hastalar KRK gelişimi için risk altındadır. Kronik inflamasyona neden olan kolit kolon mukozasında malign süreçlere sebebiyet vermektedir. Kolit; kolonu ne kadar yaygın tutarsa ve şiddeti ne kadar yüksekse KRK gelişme riskide o derece yüksektir (Rogler, 2014).

#### **2.1.7. Diğer Risk Faktörleri**

Uzun süreli tütün kullanımı KRK gelişim riskini arttırmaktadır. Üreterosigmoidostomi yapılmış olan hastalar normal popülasyona göre daha yüksek risk altındadır. Akromegali de artan hormonlar nedeni ile riski artıran bir diğer sebeptir (Mori ve Pasca, 2021).

**Tablo 1.** Kolorektal kanserin risk faktörleri ve önleyici faktörleri (Calle ve ark 2013).

<b>Kolon kanseri riskini artıran faktörler</b>	<b>Kolon kanseri riskini azaltan faktörler</b>
Yüksek kalorili diyet	Antioksidan vitamin kullanımı
Aşırı kırmızı et tüketimi	Taze sebze, meyve tüketimi
Yüksek satüre yağ	Non-steroid antiinflamtuvar ilaçlar
Aşırı alkol kullanımı	Kalsiyum içeriği yüksek diyet
Sigara	
Sedanter yaşam	
Obezite	

## **2.2. Kolon Kanserinde Tedavi**

Kolon kanserinde tedavi hastalığın evresine göre değişmekle birlikte genel olarak cerrahi ve kemoterapötik ajanların kullanıldığı tedavi seçenekleri bulunmaktadır.

Evre I kolon kanseri, daha çok lokal olarak görülme eğilimindedir ve cerrahi ile yüksek oranda kür olmaktadır. 5 senelik sürveylerinin yüksek olması sebebiyle adjuvan KT önerilmez (Papadakis ve Mcphee, 2016; Aydın ve ark. 2006).

Evre II kolon kanserinin beş yıllık sürveyi %66-80 arasında olduğu tahmin edilmektedir (Papadakis ve Mcphee, 2016). Bu evrede yapılan çalışmalarda adjuvan KT verilmesinin yararı ispat edilememiştir. Amerikan Klinik Onkoloji Derneği bu evrede standart adjuvan KT önermemektedir. Ancak Evre II’de olup da nüks riski yüksek seyreden (tümör perforasyonu, T4 hastalık bulunması, diferansiyasyonun az olması, on ikiden az lenf bezi diseke edilmesi gibi durumlar) hastalarda adjuvan KT’nin faydalarını gösteren ve beş senelik sürveyin anlamlı şekilde yüksek olduğunu gösteren birçok araştırma bulunmaktadır (Papadakis ve Mcphee, 2016; Sargent ve ark 2009).

Evre III kolon kanseri hastalarında adjuvan KT’nin faydaları belirtilmiş ve bu evrede standart olarak adjuvan KT önerilmektedir. Cerrahi sonrası beş senelik sürvey %30-50 arasında bulunmaktadır. Buna rağmen, cerrahiden sonra adjuvan KT’nin hastaların genel ve hastaliksız sağ kalımını %30 kadar arttırdığı gösterilmiştir (Papadakis ve Mcphee, 2016).

Evre IV kolon kanseri; bu aşamada tanı alan hastaların yaklaşık %20 kadarında tanı anında metastatik hastalık bulunabildiğinden, hastaların bazısında (soliter karaciğer veya

akciğer metastazı bulunanlarda) küratif cerrahi tedavi uygulanabilir. Metastatik kolon kanseri vakalarının bir bölümünde tam kür elde edilemez ve bundan dolayı palyatif sistemik KT tercih edilir. Tedavisiz olan hastaların ortalama sürveyi on iki aydan az iken günümüze sistemik KT ile bu süre yirmi dört ayın üstüne çıkabilmektedir (Papadakis ve Mcphee, 2016; Clark ve ark 2017).

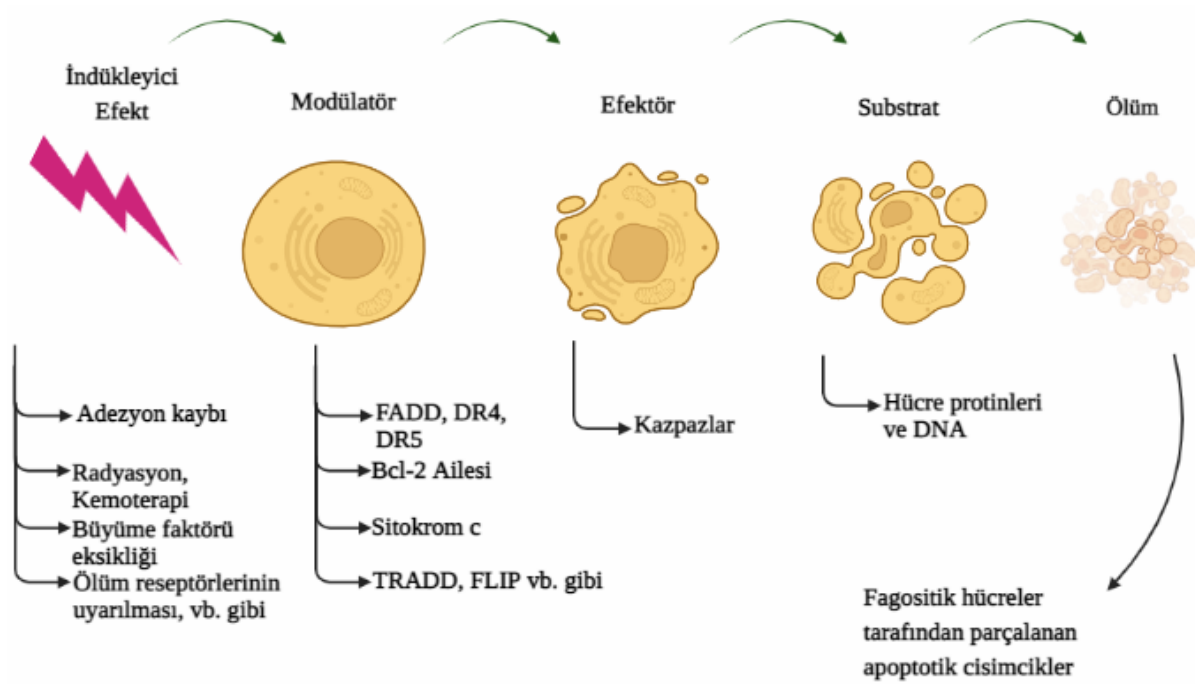
### 2.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Bu terim ilk defa Kerr ve ekibi tarafından 1972 yılında "hücrede ölümün morfolojik formu" olarak tanımlanmıştır (Kerr ve ark, 1972; Que ve Gores, 1996; Shirin ve Moss, 1998; Staunton ve Gaffney, 1998). Hücrenin ölümü, mevcut hayatın sonu olarak tarif edilen biyolojik süreçtir. Hücrenin ölümünün iki yolu vardır; apopitoz ve nekrozdur. Apopitoz, fizyolojik olan bir ölüm şeklidir. Morfolojik olarak sitoplazmada büzülme, çekirdekte yoğunlaşma, hücre zarı ile organeller arasındaki bütünlüğün bozulmaması gibi özellikleri vardır. Nekroz ise hücrede strese karşı cevap olarak oluşan kontrollü olmayan hücre ölümüdür (Krüger ve Richter, 2022).

Apopitoz mekanizmasındaki bozukluklar maligniteye ve otoimmün rahatsızlıklara yol açabilirken apopitoz eksikliği ise acquired immune deficiency syndrome ve nörodejeneratif hastalıklara sebep olabilmektedir (Kartlaşmış ve ark, 2016; King ve Cidlowski, 1998). Apopitoz, fetal gelişim esnasında embriyonun farklılaşmasında ve gelişmesinde çok önemli roller oynamaktadır. Apopitoz immün sistemde virüs tarafından enfekte edilmiş olan hücrelerin ve otoreaktif lenfositik hücrelerin eliminasyonunu sağlamaktadır. Ayrıca apopitoz DNA'sı hasarlanan hücrelerin yok olmasını sağlayarak malignite oluşumunu engellemektedir.

Apopitoz mekanizmasında meydana gelen problemler malignitenin gelişmesine önemli oranda katkı sağlar. Bundan dolayı apopitoz mekanizmasının kanser hücrelerinde indüklenmesi kullanılan ajanının etkinliğini artırabilir. Apopitoz mekanizması moleküler düzeyde çeşitli şekillerde gerçekleşmektedir. Moleküler düzeydeki bu mekanizma temel olarak içsel ve dışsal mekanizma olarak gruplandırılmaktadır. Apopitozda içsel yolak apopitoz için sinyal, hücre membranındaki reseptörler veya intrasellüler stresten kaynaklanabilir. Dış yolak *TNF $\alpha$ -CD95L/FASL* benzeri apopitoz öncüsü ligandların ölüm reseptörü sinyallerini uyarır. Apopitoz kontrol eden birçok gen vardır. Bu genlerden birisi de *Bcl-2* genidir. *Bcl-2* geni hücreleri apopitoz mekanizmasından korumaktadır. Her ne kadar iç ve dış apopitoz yolları farklı olsa da birbirleriyle etkileşim halindedir. *Bcl-2* antiapoptotik etkisini mitokondriden sitokrom-C (sit-c) salınmasını önleyerek yapmaktadır.

Kaspazlar, apoptoz mekanizmasının temel efektörleri olarak görev alırlar ve apoptoz esnasında aktive olmaktadır. Apoptoz sinyallerinin uygun şekilde salınması, hücrenin ölmesi ve sağ kalması arasındaki denge ve genom bütünlüğünün devamı açısından kritik bir öneme sahiptir. Apoptozun aksaması maligniteye yol açmaktadır. Malign hücreler, apoptoz mekanizmasını ve yolağını, transkripsiyonel, translasyonel ve translyon sonrası aşamada değiştirebilmektedir. Bu olaylar özgün olmayıp malign hücreler apoptozda kurtulabilmek için çeşitli stratejiler kullanmaktadır (Krüger ve Richter, 2022).



Şekil 1. Apoptotik sürecin şematik gösterimi

#### 2.4. Dianthus L.

Bir veya çok yıllık otsu, nadiren çalimsı olarak görülen bitkilerdir. Bu cinsin yaprakları karşı karşıyadır ve taban kısmında birleşme eğiliminde ve damarlanması dar ve paraleldir. Çiçeği ise tek ve gevşektir. Simoz ya da braktelerce sarılmış baş şeklindedir. Çiçeklerinin rengi, kırmızı, beyaz, pembe olabilmektedir. Brakteoller kalikse basık ve iki ya da daha çok sayıda olabilmektedir. Kaliks tüpü, iki ana damar arasında bulunmaktadır. Kaliksin ana damar yapıları ara damar yapıları birbiriyle bağlantılı değildir ve beş dişlidir. Petaller beş tane, serbest, tırnakları uzun, tam, bifid olmayan, dişli veya saçaklı olup ek yapılar taşımaz. Ancak ağız tarafında tüy toplulukları olabilir. Stamen sayısı ise on adettir.

Stilus sayısı ikidir. Kapsülü dört diş tarafından açılmaktadır. Tohumları peltat ve hilum tarafındadır (Reeve, 1967).

*Dianthus* cinsinin, Türkiye Cumhuriyeti coğrafyasındaki florasında, endemik olan seksen üç türü, toplamda ise doksan iki taksonu vardır (Hamzaoğlu ve ark. 2021).

Birçok KT ilacının fenolik içeriği yüksek olan bitkilerden köken aldığı bilinmektedir. *Dianthus* türleride içerdiği yüksek fenolik içerikler nedeni ile dikkat çekmektedir. Çalışmamızda bu yüzden fenolik içeriği yüksek olan *Dianthus* cinsi bitki tercih edilmiştir (Yusupova ve ark, 2022).

#### **2.4.1. *Dianthus orientalis***

Yar karanfili (*Dianthus orientalis*) Karanfilgiller (Caryophyllaceae) ailesinden bir türdür (Lindon ve ark, 2020).

Türkiye'de Doğu Karadeniz, Yukarı Fırat, Erzurum-Kars, Yukarı Murat-Van, Hakkari, Adana alt bölgelerinde doğal yayılış göstermektedir. Uçurumlar, taşlık yamaçlar ve döküntü alanlarda; 500-3160 metre yükseklikler arasında gözlenebilir.

Bu türün örnekleri 2021 senesinde Doğu Anadolu'da yapılan arazi araştırmaları sonucunda toplanmıştır. Bu bitkilerin örneklerinin taksonomik sınıflandırmaları Munzur Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Uğur Çakılcıoğlu tarafından gerçekleştirilmiştir.

Boyu 15-40 cm bulabilen, genellikle odunsu sürünücü tabanlı, çok yıllık bir türdür. Yapraklar 20-70 x 0.5-3 mm boyutlarda ve şeritsi formdadır; uzun sivri uçlu veya kısa keskin uçludur. Çiçeklenme genellikle haziran ve eylül ayları arasında gerçekleşir. Çiçekler tekildir; eğer gövdeler dallanmış ise çiçek sapı en az 2 cm uzunluktadır. Brakteol 4-14 adettir, eğer çiçekler 8'den çok ise brakteoller dışa doğru küçülür. Çanak 17-21 x 2.5-3.5 mm boyutlardadır; dişler 6-9 mm uzunluktadır; çanağın alt kısmı daha geniştir. Taç yapraklarının üst geniş kenarı pembe ve saçaklıdır, dip kısım dışa taşmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. *Dianthus orientalis*



Şekil 3. *Dianthus orientalis* Türkiye'deki yayılış alanları

### 3.MATERYAL ve METHOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. *Dianthus orientalis* Ekstraktının Elde edilmesi

Çalışma kapsamında kullanılan *Dianthus orientalis* bitkisine ait iki farklı şekilde hazırlanmış olan iki farklı ekstrakt olan DiO22 ve DiO23 Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden etanol (EtOH) içinde süspansiyon halinde temin edildi.

#### 3.2. Method

Çalışmada da *Dianthus orientalis* ekstraktlarının uygulandığı tedavi grubu (DiO22+ ve DiO23+) ile *Dianthus orientalis* ekstraktlarının uygulanmadığı grup (DiO-) olmak üzere üç grup oluşturuldu. Ek olarak HEK-293 hücre hattı içinde tedavi ve kontrol olmak üzere iki grup oluşturuldu.

##### 3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmada CaCO<sub>2</sub> kolon kanser hücre hattı ile HEK-293 sağlıklı embriyonik böbrek hücre hattı (kontrol) kullanıldı. Her üç hücre hattı da ATCC'den (American Type Culture Collection, Rockville, USA) temin edildi. Hücreler, % 10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve % 1 penisilin/streptomisin (100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin) içeren DMEM-F12

(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kültür ortamında 37°C ve %5'lik CO<sub>2</sub>'li T25 flasklarda kültüre edildi. İlk olarak her flaksa 2x10<sup>6</sup> olacak şekilde ekim yapıldı ve hücrelerin büyümeleri her gün kontrol edilerek pasajlandı. Hücreler kültür ortamında yeteli sayıya ulaştıktan sonra PBS ile yıkanarak fiziksel olarak kültür ortamında kaldırılıp FBS içeren besiyeri ile inaktive edildi. Hücrelerin bir kısmı sitotoksosite analizi için kullanılırken diğer kısmı gen ekspresyon ve akan hücre ölçer analizinde kullanılmak üzere %10 DMSO içeren kültür ortamında kriyoprezervasyonu yapılarak -196°C'de çalışma gününe kadar saklandı.

### 3.2.2. Hücre Sayısının Belirlenmesi

10 µl hücre süspansiyonu, 10 µl %0.04 trypan blue boya solüsyonu ile bir ependorf tüp içinde hafifçe pipetaj yapılmak suretiyle karıştırılıp 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra hücre ve boya karışımında 10 µl alınıp hücre sayım cihazında (Hemocytometer, Thermo Fisher) hücre sayımı yapılarak ml'de hücre sayısı ve hücre canlılığı tespit edildi.

### 3.2.3. Sitotoksosite Analizi

Hücrelerin uygulanan ekstrakta duyarlılığı 3-(4,5-dimetiltiyazol 2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) yöntemi ile analiz edildi. Kültür ortamındaki hücreler kültür ortamından enzimatik veya fiziksel olarak kaldırıldı hücre sayısı ml'de 1x10<sup>6</sup> olacak şekilde kültür ortamında süspanse edildi. 96'lık platlerin herbir kuyucuguna 100 µL hücre süspansiyonları ile 250 µM konsantrasyonlarda 48 saat boyunca *DiO22* ve *DiO23* ile inkübe edildi. *DiO22* ve *DiO23* ilave edilmeyen sadece hücreler ve kültür ortamının bulunduğu kuyucuk negatif kontrol olarak kullanıldı. Bu analizler CaCO<sub>2</sub> ve HEK-293 hücre hatlarında eş zamanlı gerçekleştirildi. Absorbans okumalarında negatif kontrol sağlamak için sadece medyumun bulunduğu üç kuyucuk oluşturuldu. Daha sonra hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 10 µL MTT reagent ilave edilip 2-4 saat kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonrası spektrofotometrede (mikrotiter plate readerde) 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü

yapılarak hücrelerin %50'sini öldüren doz ve süre (IC<sub>50</sub>) dozu belirlendi. Tespit edilen IC<sub>50</sub> doz ve süre boyunca hücreler yeniden kültürü edildi. Kültür sonrası gen ekspresyon ve moleküler analizler gerçekleştirildi.

### 3.2.4. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

#### Primer Dizaynı

RT-PZR yöntemi ile *Bax*, *Bad*, *p50*, *Bak*, *Apaf-1*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Casp6*, *Casp9*, *Casp3*, *Casp12*, *Casp2* gen ekspresyonları analiz edildi. Bu amaçla bu genlere ait primerler IDT Primer Questonline program kullanılarak dizayn edildi. Dizayn edilen primerler Tablo 2'de gösterildi.

**Tablo 2.** Çalışma kapsamında apoptoz ve kaspaz aktivasyonunda rol oynayan genlere ait primer dizileri

Genler	Forward	Reverse
<i>Bax</i>	CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
<i>Bad</i>	CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG	CCCATCCCTTCGTCGTCCT
<i>Bak1</i>	CATCAACCGACGCTATGACTC	GTCAGGCCATGCTGGTAGAC
<i>p53</i>	CAGCACATGACGGAGGTTGT	TCATCCAAATACTCCACACGC
<i>Bcl-2</i>	GGTGGGGTCATGTGTGTGG	CGGTTTCAGGTACTCAGTCATCC
<i>Bcl-XL</i>	GAGCTGGTGGTTGACTTTCTC	TCCATCTCCGATTCAGTCCCT
<i>APAF-1</i>	AAGGTGGAGTACCACAGAGG	TCCATGTATGGTGACCCAT
<i>Casp2</i>	AGCTGTTGTTGAGCGAATTGT	AGCAAGTTGAGGAGTTCCACA
<i>Casp3A</i>	CATGGAAGCGAATCAATGGACT	CTGTACCAGACCGAGATGTCA
<i>Casp9</i>	CTCAGACCAGAGATTCGCAAAC	GCATTTCCCCTCAAACCTCTCAA
<i>Casp12</i>	AACAACCGTAACTGCCAGAGT	CTGCACCGGCTTTTCCACT
<i>Casp6</i>	GAGGAGGGCAAGGTGTCTGG	GTTTTCTTCCCCACCTGCCG
<i>GAPDH</i>	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCAT

#### RNA İzolasyonu

Uygun doz ve süresi sonunda kontrol ve tedavi grubundaki hücreler kültür ortamında alınıp santrifüj edildikten 500 µl QIAzol (Qiagen, India) içine süspanse edildi. Ardından kloroform ile faz ayrımı yapıldı. Faz ayrımından sonra RNA çöktürüldü ve %70'lik etanol ile yıkayıp kurululduktan sonra DNase/RNase-free su içinde çözüldü. RNA konsantrasyonları belirlendikten sonra cDNA sentezi yapıldı.

### **cDNA Sentezi**

cDNA sentezi, cDNA sentezi kiti [cDNA Synthesis Kit withRNaseInh. (High Capacity) (A.B.T™, Turkey)] kullanılarak prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi.

### **RT-PZR Reaksiyonu**

RT-PZR reaksiyonu SYBR Greenmaster mix (Hibrogen, 2x SYBR Green Master Mix. Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi. Her gen için RT-PZR karışımı, 5 µL 2X SYBR Greenmaster mix, 5 pMolforward ve reverse primer ve 2 µL cDNA içeren toplam 10 µL hacimde RT-PZR reaksiyonu kuruldu. RT-PZR profili, 95 °C'de 10 s ilk denatürasyonundan, ardından 95 °C'de 15 s süreyle denatürasyon ve 57 °C'de 30 s süreyle elongation basamaklarından oluştu. Bu aşamada 40 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. RT-PZR reaksiyonu varlığında QuantStudio 3 qPCR sistemi ile (Thermo Fisher ScientificInc., Waltham, MA, USA) gerçekleştirildi.

### **İstatistiksel Analizler**

Normalizasyon için *GAPDH* housekeeping geni kullanıldı. Gen ifadelerindeki değişiklikler Livak'ın  $\Delta\Delta CT$  yöntemi ile tespit edildi. Öncelikle çalışılan tüm genler *GAPDH* ile normalize edilerek  $\Delta CT$  hesaplandı. Ardından *DiO* uygulanan tedavi grubu *DiO* uygulanmayan kontrol grubundan çıkarılarak  $\Delta\Delta CT$  değeri elde edildi.  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değeri hesaplandı ve fold-change (kat değişikliği) elde edildi.  $\Delta CT$  değerleri kullanılarak Student T-test yapıldı ve gen ekspresyonlarındaki anlamlılık seviyeleri belirlendi.  $p < 0,05$ 'lik temel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler Statistical Package for the Social Sciences yazılımı, versiyon 21 (IBM SPSS Corp.; Armonk, NY, ABD) ile gerçekleştirildi.

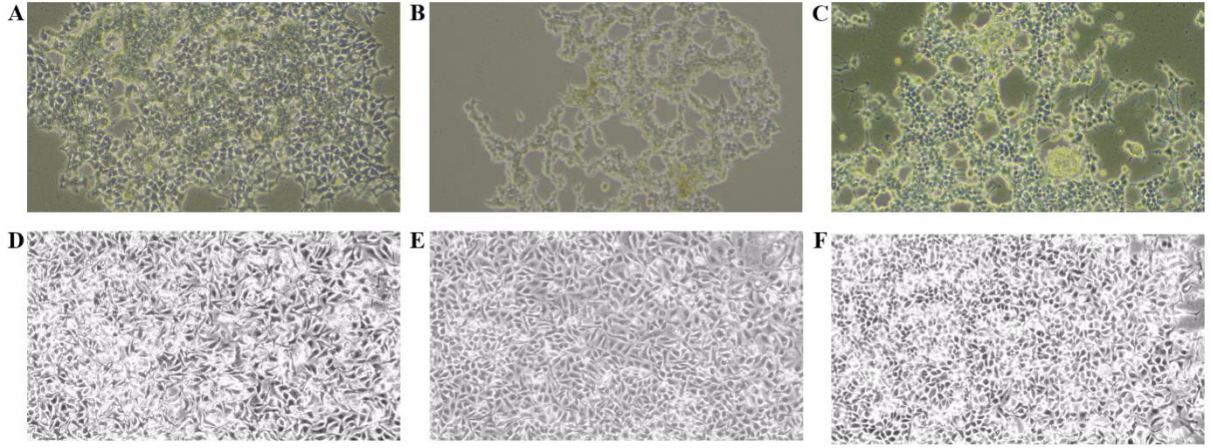
### **3.2.5. Akan Hücre ler Analizi**

Çalışma kapsamında tedavi grubu ile kontrol grubuna akan hücre ölçer ile apopitoz analizi yapıldı. Bu amaçla APC Annexin V Apoptosis Detection Kit with Propidiumiodide (PI) (Bio- Legend, Bio Legend Inc., San Diego) kullanıldı. Sadece Annexin V pozitif olan hücreler erken apopitozu, sadece PI pozitif hücreler nekrozu, her ikisi de pozitif olan hücreler geç apopitozu ifade etmektedir. Kit prosedrine uygun olarak hücre yüzey boyaması yapıldı. Gerekli inkübasyon ve yıkama adımlarının ardından Beckman Coulter (Beckman Coulter Life Science, USA) akan hücre ölçer cihazında hücre sayımı yapılm Kaluza (Beckman Coulter Life Science, USA) programı ile de akan hücre ölçer analizleri gerçekleştirildi.

## 4.BULGULAR

### 4.1. Hücre Kültürü Sonuçları

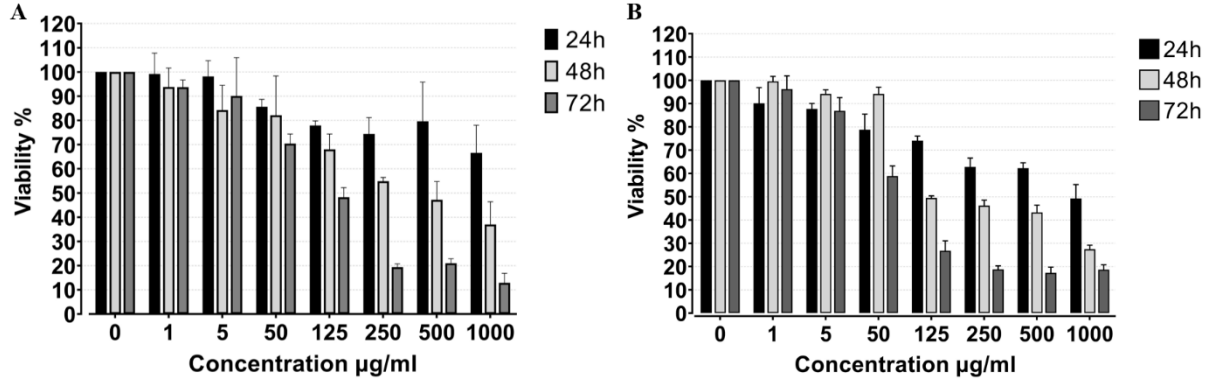
*DiO22* ve *DiO23* uygulama öncesi ve sonrası hücrelerde tespit edilen morfolojik değişikliklerin ışık mikroskopik görüntüsü Şekil 4'te gösterildi.



**Şekil 4.** CaCO<sub>2</sub> ve HEK293 hücre hatlarına *DiO22* ve *DiO23* uygulama öncesi ve sonrası X10 ışık mikroskobik görüntüsü (A. CaCO<sub>2</sub> hücre hattına *DiO22* ve *DiO23* uygulaması öncesi, B. CaCO<sub>2</sub> hücre hattına *DiO22* uygulama sonrası, C. CaCO<sub>2</sub> hücre hattına *DiO23* uygulama öncesi, D. HEK293 hücre hattına *DiO22* ve *DiO23* uygulama öncesi, E. HEK293 hücre hattına *DiO22* uygulama sonrası, F. HEK293 hücre hattına *DiO23* uygulama sonrası)

## 4.2. MTT Analizi

*DiO22* ve *DiO23*'ün CaCO2 hücreleri üzerindeki sitotoksit etkisinin belirlenmesi için farklı dozlarda 24, 48 ve 72 saat uygulama sonrası MTT analiz sonuçları Şekil 5'te gösterildi. MTT analizi sonucunda IC<sub>50</sub> dozu 48. saatte 250 µg olarak belirlendi.



Şekil 5. CaCO2 hücre hattına farklı dozlarda ve zaman dilimlerinde (24, 48 ve 72 saat) *DiO22* ve *DiO23* uygulama sonrası elde edilen MTT analiz sonuçları (A. CaCO2 hücre hattına *DiO22* ve *DiO23* uygulaması öncesi, B. CaCO2 hücre hattına *DiO22* uygulama sonrası)

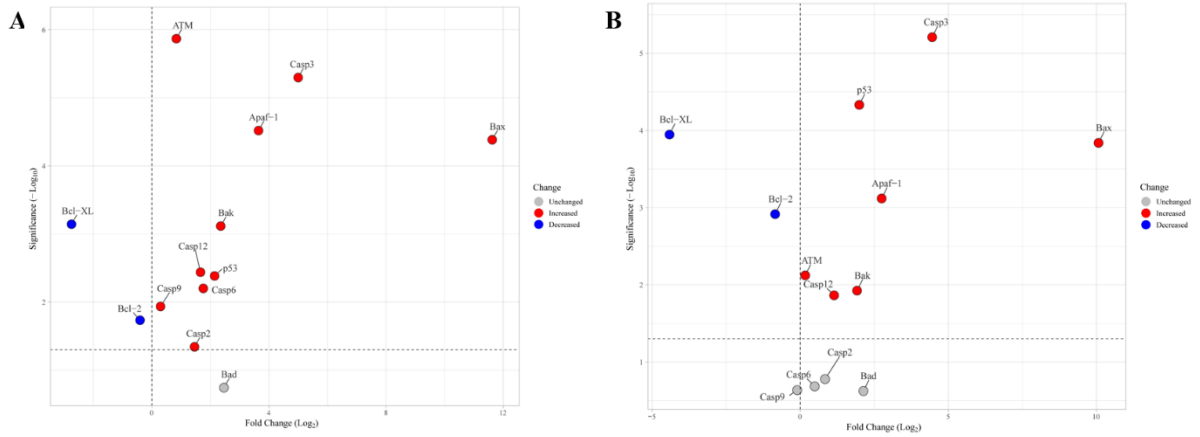
## 4.3. RT-PZR Sonuçları

CaCO2 hücrelerine belirlenen doz ve sürede *DiO22* ve *DiO23* uygulaması uygulama sonrası *Bcl-XL*, *Bcl-2*, *Bax*, *Bad*, *Bak*, *p53*, *Apaf-1*, *Casp2*, *Casp3*, *Casp9*, *Casp12* ve *Casp6* gen ekspresyonlarındaki değişiklikler Şekil 6A-B'de gösterildi.

*DiO22* uygulanan grup *DiO22* uygulanmayan grup ile apoptoz yolağında rol oynayan genler açısından karşılaştırıldığında; antiapoptotik genler olan *Bcl-XL* (6.69-fold,  $p < 0.001$ ) ve *Bcl-2* (1.32-fold,  $p = 0.02$ ) ekspresyonlarında anlamlı olarak azalma tespit edildi. Proapoptotik gen ekspresyonlarında ise *Apaf-1* (12.48-fold,  $p < 0.001$ ), *Bax* (3151-fold;  $p < 0.001$ ), *Bak* (5.10-fold,  $p < 0.001$ ), *p53* (4.41-fold,  $p = 0.004$ ) ve *ATM* (1.78-fold,  $p < 0.001$ ) gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi. Buna karşın proapoptotik gen olan *Bad* (5.50-fold,  $p = 0.181$ ) ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik yoktu. Kaspaz yolağındaki genler açısından karşılaştırıldığında; *Casp3* (31.93-fold,  $p < 0.001$ ), *Casp6* (3.37-fold,  $p = 0.006$ ), *Casp9* (1.22-fold,  $p = 0.012$ ), *Casp2* (2.74-fold,

p0.045), *Casp12* (3.16-fold, p=0.004), gen ekspresyonlarında artış tespit edildi ve artışlar istatistiksel olarak anlamlıydı.

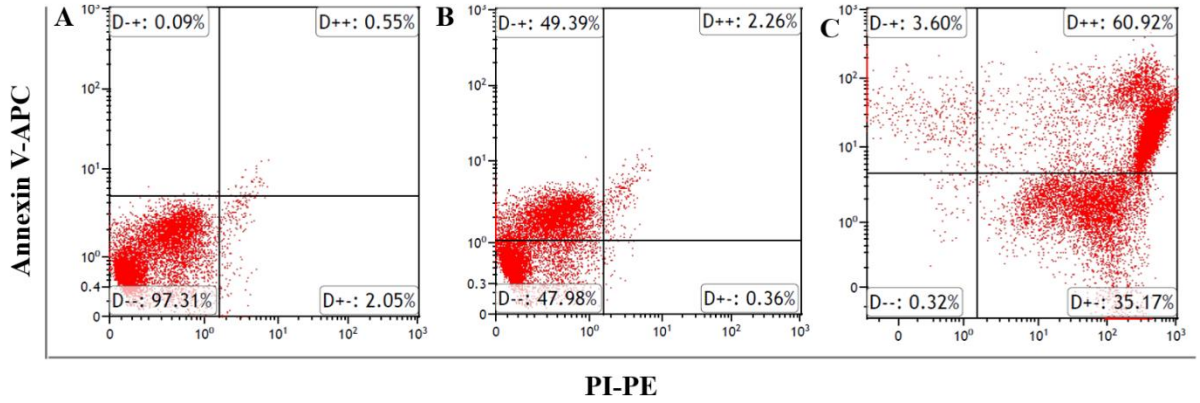
*DiO23* uygulanan grup *DiO23* uygulanmayan grup ile apoptoz yolağında rol oynayan genler açısından karşılaştırıldığında; antiapoptotik genler olan *Bcl-XL* (21.28-fold, p<0.001) ve *Bcl-2* (1.79-fold, p=0.001) ekspresyonlarında anlamlı olarak azalma tespit edildi. Proapoptotik gen ekspresyonlarında ise *Apaf-1* (6.71-fold, p<0.001), *Bax* (1073-fold; p<0.001), *Bak* (3.77-fold, p=0.012), *p53* (3.98-fold, p<0.001) ve *ATM* (1.12-fold, p=0.008) gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi. Buna karşın proapoptotik gen olan *Bad* (4.38-fold, p=0.238) ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik yoktu. Kaspaz yolağındaki genler açısından karşılaştırıldığında; *Casp3* (21.9-fold, p<0.001) ve *Casp12* (2.02-fold, p=0.014) gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak artış tespit edilmesine karşın *Casp6* (1.4-fold, p=0.207), ve *Casp2* (1.78-fold, p0.045) istatistiksel olarak anlamlı bir artış yoktu. *Casp9* (1.07-fold, p=0.231) gen ekspresyonunda ise azalma tespit edildi fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.



**Şekil 6.** CaCO<sub>2</sub> hücre hatlarına *DiO22* ve *DiO23* uygulama sonrası gen ekspresyon değişiklikleri (A. CaCO<sub>2</sub> hücre hattına *DiO22* uygulama sonrası uygulanmayan grup ile karşılaştırılması, B. CaCO<sub>2</sub> hücre hattına *DiO23* uygulaması sonrası uygulanmayan grup ile karşılaştırılması). Kırmızı renk, istatistiksel olarak anlamlı olan up-regüle genleri; mavi renk, istatistiksel olarak anlamlı olan down-regüle genleri; gri renk, istatistiksel olmayan değişiklikleri ifade etmektedir.

#### 4.4. Akan Hücre Ölçer Analizleri

Etkin doz ve zamanda *DiO22* ve *DiO23* uygulama sonrası gruplardaki apoptotik etki akan hücre ölçer yöntemi ile analiz edildi. Buna göre kontrol grubunda erken apoptoz oranı %0.09, geç apoptoz oranı %0.55 ve nekrotik hücre oranı %2.05 olarak belirlendi. CaCO2 hücre hattında *DiO22*+ olan grupta erken apoptoz oranı %49.39, geç apoptoz oranı %2.26 ve nekrotik hücre oranı %0.36 iken hattında *DiO23*+ olan grupta erken apoptoz oranı %3.6, geç apoptoz oranı %60.92 ve nekrotik hücre oranı %35.17 olarak belirlendi (Şekil-7).



**Şekil 7.** CaCO2 hücre hattına etkin doz ve zamanda *DiO22* ve *DiO23* uygulama sonrası akan hücre ölçer yöntemi ile apoptoz sonuçları (A. *DiO22* ve *DiO23* uygulanmayan (kontrol) grup, B. CaCO2 hücre hattına *DiO22* uygulama sonrası, C. CaCO2 hücre hattına *DiO23* uygulama sonrası)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolon kanseri dünya genelinde en sık görülen kanserler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Bu nedenle çok önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Günümüzde kolon kanserinin onkolojik ve cerrahi tedavisi açısından çok fazla bilimsel çalışma yapılmaktadır (Siegel ve ark 2017). Onkolojik tedavi çalışmaları olarak her geçen gün yeni KT ilaçları keşfedilmektedir. Bu KT ilaçlarının kökeninin ise genelde bitki türleri olduğu görülmektedir. Bitkiler seçilirken ise en önemli tercih edilme sebeplerinden biri de içeriğindeki fenolik bileşiklerdir. *Dianthus orientalis* bitkisi de içerdiği fenolik bileşikler sayesinde kolon kanseri tedavisinde kullanılabileceği düşünülen bitkiler arasındadır (Yusupova ve ark, 2022).

Literatüre baktığımızda *Dianthus orientalis* bitki türünün kolon kanseri hücre hattında antikanser etkilerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda CaCO2 kolon kanser hücre hattı ile HEK-293 sağlıklı embriyonik böbrek hücre hattı (kontrol) kullanıldı. Bu hücrelerde DiO-, DiO22 ve DiO23 sonrası erken apoptoz, geç apoptoz, nekrotik hücre oranı ve bu yollarda rol alan gen ekspresyonları çalışıldı. Bu çalışmada *Dianthus orientalis*'in apoptozu; pro-apoptotik genlerin ekspresyonunu artırarak ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu azaltarak indüklediği görülmüştür.

*Dianthus orientalis* ile yapılan literatürdeki tek çalışmada konsantrasyon bağımlı sitotoksik etki incelenmiştir. Bu çalışmada insan HepG2, MCF-7, A549, HT-29 hücre serilerinde 100 µg/mL konsantrasyona kadar sitotoksik etki gösterilememiştir (Naghbi ve ark. 2014). Bizim çalışmamızda ise MTT dozu 48. saatte 250 µg çıkmıştır.

Daha önce dianthus türleri ile yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde *Dianthus superbus* türünün ekstraktının HepG2 hücre serilerine 20-80 µg/ml dozunda 48 saat süre ile maruz bırakılması sonucu mitokondriye bağımlı apoptotik yolu aktive ederek apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Yu ve ark,2012). Bu çalışmada hücre bölünmesinin *sub-G1* fazında duraklatılmış olduğu gösterildi. *Bcl-2* ve *NF-κB* ifadelerini önemli ölçüde

baskıladığını gösterdi. Hücrelerin 48 saat boyunca *Dianthus superbus* ekstraktının 80 µg/ml dozuna maruz bırakılması, sitozolde sitokrom c'nin önemli ölçüde artmasına neden oldu; bu da mitokondriden sitokrom c salınımını gösterdi. Hücreler bu ekstrakta maruz kalınca kaspaz-9 ve 3'ün aktivasyonu da belirlendi. Çalışmamız *Dianthus orientalis*'in apopitozda öncü olan genlerin ekspresyonunu artırarak ve apopitozu önleyici genlerin ekspresyonunu azaltarak apopitozu indüklediğini göstermiştir.

Başka bir dianthus türü olan *Dianthus chinensis* ile yapılan ağız kanseri hücre serilerinde *specifity protein 1 (Sp1)* seviyesini düşürerek apopitozu indüklediği görülmüştür (Shin ve ark, 2013). Yine bu tür ile yapılan başka bir çalışmada ise insan akciğer kanseri (H1299) ve kolon kanseri (HCT-116) hücre serilerinde 250-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında sitotoksik etki gösterdiği raporlanmıştır (Lee ve ark, 2016).

*Dianthus caryophyllus* ekstraktının insan kolon kanseri (HCT-8) hücre serisinde hücre siklusunu G0/G1 evresinde durdurarak antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir (Martineti ve ark, 2010).

Görüldüğü üzere yapılan çalışmalarda hücre siklusu farklı aşamalarda ve farklı şekillerde durdurulmakta ve hücre ölümü sağlanmaktadır. Çalışmamızda DiO22 verilen hücrelerde antiapoptotik genler olan *Bcl-XL* ve *Bcl-2* gen ekspresyonlarında anlamlı olarak azalma tespit edildi. Proapoptotik gen ekspresyonlarında ise *Apaf-1*, *Bax*, *Bak*, *p53* ve *ATM* gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi. Buna karşın proapoptotik gen olan *Bad* ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik yoktu. Çalışmamızda kaspaz yolağındaki genler karşılaştırıldığında; *Casp3*, *Casp6*, *Casp9*, *Casp2*, *Casp12* gen ekspresyonlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı.

DiO23 verilen hücrelerde ise antiapoptotik genler olan *Bcl-XL* ve *Bcl-2* ekspresyonlarında anlamlı olarak azalma tespit edildi. Proapoptotik gen ekspresyonlarında ise *Apaf-1*, *Bax*, *Bak*, *p53* ve *ATM* gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış

tespit edildi. Buna karşın proapoptotik gen olan *Bad* ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik yoktu. Kaspaz yolağındaki genler karşılaştırıldığında; *Casp3* ve *Casp12* gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmesine karşın *Casp6* ve *Casp2* genlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir artış yoktu. *Casp9* gen ekspresyonunda ise azalma tespit edildi fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

DiO22 verilen grupta erken apoptoz oranı DiO23 verilen gruba göre daha fazlaydı. DiO23 verilen grupta ise geç apoptoz ve nekrotik hücre oranı DiO22 verilen gruba göre daha fazlaydı.

CaCO2 kolon kanser hücre hattına MTT analizi sonucunda belirlenen doz ve sürede *DiO22* ve *DiO23* uygulama sonrası morfolojik, hücresel ve moleküler düzeyde kanser hücre proliferasyonunu apoptoz mekanizmasını indükleyerek baskıladığı gösterildi. Apoptoz, normal olarak gelişim sırasında dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için kullanılan homeostatik bir mekanizmadır (Elmore,2007). Apoptoz kanser tedavisinde indüklenmiş önemli bir hücre ölüm yoludur. Apoptoz; kaspazlar olarak bilinen bir proteaz ailesi tarafından yürütülür. Kaspazlar, hem başlatıcılar (kaspaz-2, 8, 9 ve 10) hem de yürütücüler (kaspaz-3, 6 ve 7) olduklarından apoptoz mekanizmasının merkezinde yer alır. Apoptoz intrinsik yol veya ekstrinsik yolla meydana gelebilir. İntrinsik yolak farklı stres koşullarına yanıt olarak mitokondriyal seviyede birleşen hücre içi sinyaller aracılığıyla gerçekleşir. Genetik hasar, hipoksi, sitozolik kalsiyum seviyesindeki artış ve şiddetli oksidatif stres gibi durumlar intrinsik apoptoz yolağının aktivasyonuna neden olur. Proapoptotik genler olan *Bcl-2* ailesinin (*Bax*, *Bak*) aktivasyonu, antiapoptotik genler olan *Bcl-2* ve *Bcl-XL*'nin baskılanmasına neden olur. Ayrıca tümör baskılayıcı protein *p53*, hücrelerde DNA hasarı olması durumunda proapoptotik gen olan *Bax*'ı aktive eder. Mitokondriyal zar dış zar geçirgenliği bozulur ve proteinler (Sitokrom c) sitozole geçer. Bu proteinler sitozolde *Apaf-1* proteini ile bir kompleks oluşturur ve kaspaz yolağı aktive olarak apoptoz gerçekleşir

(Pistritto ve ark,2016; Wuest ve ark, 2019). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda da CaCO<sub>2</sub> hücre hattında *DiO22* ve *DiO23* uygulama sonrası antiapoptotik gen ekspresyonları baskılandı buna karşın proapoptotik ve kaspaz gen ekspresyonlarının arttığı tespit edildi. Çalışmamız *Dianthus orientalis* bitkisine ait iki farklı şekilde hazırlanmış olan olan *DiO22* ve *DiO23* ekstraktlarının kolon kanser hücre hattında antiapoptotik genleri baskılayarak ve proapoptotik ile kaspaz yolağındaki başlatıcı ve efektör kaspaz gen ekspresyonlarını aktive ederek apoptoz yolağını aktive ettiğini gösterdi. İlave olarak flow sitometrik apoptoz analizindeki *DiO22* grubunda erken apoptozda, *DiO23* grubunda geç apoptoz oranındaki kontrole göre artmış apoptoz oranı gen ekspresyon sonuçlarını da destekler nitelikteydi.

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılmak üzere birçok yeni molekül deneysel olarak çalışılmaktadır. Çalışılan bu ajanların birçoğunun kökeni ise bitkiseldir. Özellikle fenol bileşenleri olan bitkiler daha çok tercih edilmektedir ve *Dianthus orientalis*'in fenolik bileşenler içerdiği bilinmektedir. Çalışmamız *Dianthus orientalis* türünün ihtiva ettiği bileşenlerin kolon kanseri tedavisinde rol alabileceğini göstermiştir.

İn vitro olarak yapılan çalışmamızın literatüre katkı sağladığını ve etken maddelerin etki mekanizmasını daha da aydınlatmak için ileri moleküler ve in vivo çalışmalar ile desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

## 6.KAYNAKÇA

- Aydiner A, Topuz E, Özmen V, Şakar B, Dinçer M.(2006).Gastrointestinal Sistem Tümörleri. Aydiner A, Topuz E (Editörler). Onkoloji El Kitabı. İstanbul, Turgut Yayıncılık.199-267
- Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., &Thun, M. J. (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine*, 348(17), 1625–38.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa021423>
- Clark JV, Grothey A. Goldberg RM (ed.)(2017).Systemic chemotherapy for metastatic colorectal cancer: Completed clinical trial. Jan 03,  
<http://www.uptodate.com/contents/systemic-chemotherapy-for-metastaticcolorectalcancer-completed-clinical-trials>
- D'Arcy M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582–92. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Giglia, M. D.,&Chu, D. I. (2016). Familial Colorectal Cancer: Understanding the Alphabet Soup. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 29(3), 185–95. <https://doi.org/10.1055/S-0036-1584290>
- Gogoi, P., Kaur, G., & Singh, N. K. (2022). Nanotechnology for colorectal cancer detection and treatment. *World journal of gastroenterology*, 28(46), 6497–511.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i46.6497>
- Hamzaoğlu, E., Koç, M., Büyük, İ.(2021).Dianthus yilmazii (Caryophyllaceae), a new species from central Turkey, *Kew Bull.*,76(3): 524. DOI 10.1007/S12225– 021–09954–3
- Kartlaşmış K, Kökbaş U, Kayrın L.(2016). Apoptozis Biyokimyası. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 25(1):52-69

Kaufmann, S. H., & Gores, G. J. (2000). Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bio Essays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22(11), 1007–17. [https://doi.org/10.1002/1521-1878\(200011\)22:11<1007::AID-BIES7>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-1878(200011)22:11<1007::AID-BIES7>3.0.CO;2-4)

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239–57. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

King, K. L., & Cidlowski, J. A. (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual review of physiology*, 60, 601–17. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.601>

Krüger, M.; Richter, P. (2022). To Die or Not to Die: Cell Death in Biology and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 6734

Lee, J., Seo, Y., Lee, J. ve Ju, J., (2016). Antioxidant activities of *Dianthus chinensis* L. extract and its inhibitory activities against nitric oxide production and cancer cell growth and adhesion, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 45, 1, 44-51

Lindon, Heather, Gardiner, Lauren, Vorontsova, Maria, & Brady, Abigail. (2020). Gendered Author List International Plant Names Index 2020 (Version 2) [Data set]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3911077>

Martineti, V., Tognarini, I., Azzari, C., Carbonell Sala, S., Clematis, F., Dolci, M., Lanzotti, V., Tonelli, F., Brandi, M. L., & Curir, P. (2010). Inhibition of in vitro growth and arrest in the G0/G1 phase of HCT8 line human colon cancer cells by kaempferide triglycoside from *Dianthus caryophyllus*. *Phytotherapy research : PTR*, 24(9), 1302–8. <https://doi.org/10.1002/ptr.3105>

Mori, G., & Pasca, M. R. (2021). Gut microbial signatures in sporadic and hereditary colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–23

Naghibi F, Irani M, Hassanpour A, Pirani A, Moghadam MH. (2014). Cytotoxic effects of selective species of Caryophyllaceae in Iran. *Research Journal of Pharmacognosy*.

Osterman E, Glimelius B. (2018). Güncel kolon kanseri evrelemesi, ameliyatı ve patolojisinden sonra tekrarlama riski: tüm İsvaç nüfusunun analizi. *Dis Colon Rectum*. 61(9):1016–25

Papadakis MA, Mcphee SJ.(2016). Current Medical Diagnosis and Treatment. Rabow MW (ed.). 55. Baskı. New York, McGraw-Hill Education.1615-22

Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., &D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8(4), 603–19. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>

Que, F. G., &Gores, G. J. (1996). Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology*, 110(4), 1238–43. <https://doi.org/10.1053/gast.1996.v110.pm8613014>

Reeve, H.(1967).Dianthus L. Editör: Davis, P. H. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh: Edinburgh University Press,2: 99–131

Rogler G. (2014). Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer letters*, 345(2), 235–41. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.032>

Sargent, D., Sobrero, A., Grothey, A., O'Connell, M. J., Buyse, M., Andre, T., Zheng, Y., Green, E., Labianca, R., O'Callaghan, C., Seitz, J. F., Francini, G., Haller, D., Yothers, G., Goldberg, R., & de Gramont, A. (2009). Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *Journal of clinical oncology :official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(6), 872–7. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.5362>

Shin, J. A., Kim, J. J., Choi, E. S., Shim, J. H., Ryu, M. H., Kwon, K. H., Park, H. M., Seo, J. Y., Lee, S. Y., Lim, D. W., Cho, N. P., &Cho, S. D. (2013). In vitro apoptotic effects of methanol extracts of *Dianthus chinensis* and *Acalypha australis* L. targeting specificity protein 1 in human oral cancer cells. *Head&neck*, 35(7), 992–8. <https://doi.org/10.1002/hed.23072>

Shirin, H., & Moss, S. F. (1998). Helicobacter pylori induced apoptosis. *Gut*, 43(5), 592–4. <https://doi.org/10.1136/gut.43.5.592>

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Ahnen, D. J., Meester, R. G. S., Barzi, A., &Jemal, A. (2017). Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(3), 177–93. <https://doi.org/10.3322/caac.21395>

Staunton, M. J., &Gaffney, E. F. (1998). Apoptosis: basic concepts and potential significance in human cancer. *Archives of pathology&laboratory medicine*, 122(4), 310–9

Turan İ, Demir S, Aliyazıcıoğlu R, Mısırs, Aliyazıcıoğlu Y. (2017). Dianthus carmelitarum Ekstraktının Antioksidan ve Sitotoksik Özelliklerinin İncelenmesi. *dergiparak.org.tr*. 7 (1): 41-50

Wuest, M., Perreault, A., Richter, S., Knight, J. C., &Wuest, F. (2019). Targeting phosphatidylserine for radionuclide-based molecular imaging of apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 24(3-4), 221–44.  
<https://doi.org/10.1007/s10495-019-01523-1>

Yu, J. Q., Yin, Y., Lei, J. C., Zhang, X. Q., Chen, W., Ding, C. L., Wu, S., He, X. Y., Liu, Y. W., &Zou, G. L. (2012). Activation of apoptosis by ethylacetate fraction of ethanol extract of *Dianthus superbus* in HepG2 cell line. *Cancer epidemiology*, 36(1), e40–5.  
<https://doi.org/10.1016/j.canep.2011.09.004>

Yusupova, U., Usmanov, D., Azamatov, A., Ramazonov, N., & Rejepov, J. (2022). Phytochemical constituents and biological activities of *Dianthus helenae* Vved., growing in Uzbekistan. *Natural product research*, 36(13), 3480–4.  
<https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1862834>