



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



SODYUM BENZOATIN HCT116 KOLON KANSER HÜCRELERİNDE CANLILIK ÜZERİNE ETKİSİ

Betül YILMAZ

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Arzu Zeynep KARABAY**

ANKARA

2017

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SODYUM BENZOATIN HCT116 KOLON KANSER
HÜCRELERİNDE CANLILIK ÜZERİNE ETKİSİ**

Betül YILMAZ

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
16L0237007 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Arzu Zeynep KARABAY**

**ANKARA
2017**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “SODYUM BENZOATIN HCT116 KOLON KANSER HÜCRELERİNDE CANLILIK ÜZERİNE ETKİSİ” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Yüksek Lisans Öğrencisinin Adı Soyadı : Betül YILMAZ

Tarih :

İmza :

Kabul ve Onay

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Biyokimya Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

14.01/2016

Prof.Dr. Meral Torun

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Jüri Başkanı

Yrd.Doç.Dr. Arzu Z. Karabay

Ankara Üniversitesi

Eczacılık Fakültesi

Raportör

Prof.Dr. Zehra Büyükbingöl

Ankara Üniversitesi

Eczacılık Fakültesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. K. Zafer KARAER

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	iii
Kabul ve Onay	iv
İçindekiler	v
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
1.GİRİŞ	1
1.1.1. Apoptozda Gerçekleşen Morfolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler	1
1.1.2. Apoptozun Dışsal (Ekstrinsik) Yolağı	4
1.1.2.1. Dışsal (Ekstrinsik) Apoptotik Yolak	4
1.1.2.2. İçsel (İntrinsik) Apoptotik Yolak	5
1.1.3. Kaspazlar	6
1.1.4. Bcl-2 Ailesi	7
1.1.5. NFkB Yolağı ve Apoptoz	9
1.1.6. Anti-Kanser Mekanizma Olarak Apoptoz	10
1.1.7. Kanserde Apoptotik Yolaklarda Meydana Gelen Değişiklikler	11
1.2. Kolon Kanseri	12
1.2.1. Kolon Kanseri ve Diyet	12
1.3. Gıda Katkı Maddeleri	14
1.3.1. Benzoik asit- Tanımı ve Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanımı	14
1.3.1.1. Sodyum Benzoatın Biyolojik Etkileri İle İlgili Çalışmalar	16
1.4. NFkB'nin Kanserdeki Rolüne İlişkin Yapılmış Çalışmalar	17
2.GEREÇ VE YÖNTEM	20
2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	20
2.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
2.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Serisi	20
2.4. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	21
2.4.1. Hücre Kültürü	21
2.4.2. Hücre Sayımı ve Canlı Hücrelerin Belirlenmesi	21
2.4.3. Hücre Canlılık Testi	21
2.4.4. Protein Miktar Tayini	22
2.4.5. Kaspaz-3 Aktivitesi Tayini	23
2.4.6. Annexin V-PE ve 7-AAD ile Apoptoz Tayini	23
2.4.7. NFkB Translokasyonu ve Bcl-2 İçin Western Blot Analizi	24
2.4.8. İstatistiksel Analiz	24
3.BULGULAR	25
3.1. Sodyum Benzoatın HCT116 Kolon Kanseri Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi	25
3.2. Sodyum Benzoatın HCT116 Kolon Kanseri Hücrelerinin Apoptoz ve Nekrozu Üzerine Olan Etkileri	26
3.3. Sodyum Benzoatın HCT116 Kolon Kanseri Hücrelerinde Kaspaz 3/7 Aktivitesi Üzerindeki Etkileri	28

3.4. Sodyum Benzoatın HCT116 Kolon Kanser Hücrelerinde NFkb Translokasyonu Üzerindeki Etkileri	29
3.5. Sodyum Benzoatın HCT116 Kolon Kanser Hücrelerinde Bcl-2 Proteini Üzerindeki Etkileri	30
4.TARTIŞMA	31
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
ÖZET	35
SUMMARY	36
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	58



ÖNSÖZ

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, sodyum benzoatın HCT116 kolon kanser hücrelerinde canlılık üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 16L0237007 proje numarası ile desteklenmiştir. Sodyum benzoatın HCT116 kolon kanser hücrelerinde canlılık üzerine etkileri ilk kez ortaya konmuştur.

Tez çalışmalarım esnasında ve öncesinde tüm bilgi, birikim ve deneyimlerini büyük bir anlayış ve sevgi ile benimle paylaşan, deneysel çalışmalarda disiplin ve başarının sözle değil, sabırla ve yılmadan çalışarak elde edildiğini öğreten, hücre kültürü çalışmalarının büyüdü dünyasıyla beni tanıştıran, başaramamaktan korkup geri dönmek istediğimde elimden tutup destek olan, değerli tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Arzu Zeynep KARABAY' a herşey için minnettarım.

Üzerimde çok emeği olan kıymetli hocalarım, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zeliha BÜYÜKBİNGÖL'e, Prof. Dr. Fügen AKTAN'a, Prof. Dr. Bilgehan DOĞRU'ya, bu yola girmemde beni yüreklendiren Dr. Ecem KAYA'ya ve Farmakoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyesi Prof. Dr. Nuray ARI' ya kalpten teşekkürlerimi sunarım.

Biyokimya alanına duyduğum ilgi ve karşı koyamadığım merak ile atıldığım, benim için çok zorlu ve bir o kadar keyifli olan bu yolda yürümemi kolaylaştıran, her koşulda yanımda olan ve beni destekleyen neşeli ailemin her bir eşsiz bireyine ve tezim boyunca gösterdiği anlayış ve desteği için biricik eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Siz olmasaydınız bu çalışmayı tamamlayamazdım. Her biriniz tek tek iyi ki varsınız.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A1	Bcl-2 related protein A1
AIP	Apoptosis inducing protein
Apaf-1	Apoptosis protease activating factor-1
Bad	Bcl-2 associated agonist of cell death
BAG	Bcl-2 associated athanogene protein
Bak	Bcl-2 antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
Bcl-B	B-cell lymphoma B
Bcl-w	B-cell lymphoma -2 like protein 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma extra large
Bcl-XS	B-cell lymphoma extra small
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Blk/Bik	Bcl-2 interacting killer
Bmf	Bcl-2 modifying factor
Bok	Bcl-2 related ovarian killer
CAD	Caspase activated DNase
CLL	Kronik lenfatik lösemi
c-MYC	Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
COX2	Siklooksijenaz 2
DD	Death domain

DIABLO	Direct IAP binding protein with low pl
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DLBCL	Büyük hücreli B-cell lenfoma
DNA	Deoksribonükleik asit
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
Fas (APO-1, CD95)	Type-II transmembrane protein that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) family
Hrk	Activator of apoptosis harakiri
IAP	Inhibitors of apoptosis proteins
ICAD	Inhibitor of CAD
IGF-1R	Insulin-like growth factor-1 reseptör
IKK	İnhibitör kappa B kinaz
IL-1 β	İnterlökin 1-beta
IR	İnsülin reseptörü
IRS	İnsülin reseptör substrat ailesi
I κ B	İnhibitör kappa B
JAK3	Janus kinaz 3
LDH	Laktat dehidrogenaz
LPS	Lipopolisakkarit
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MOMP	Mitokondrial outer membran permeabilization
MTT	[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]
NF κ B	Nükleer Faktör kappa B
NOXA	NADPH oxidase activator 1
NSAİ	Non steroidal anti enflamatuvar
NSCLC	Küçük hücreli akciğer kanseri

p53/TP53	Tümör-protein 53
PARP	Poli- (ADP-riboz) polimeraz
PCD	Programlı hücre ölümü
PS	Fosfotidilserin
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
ROS	Reaktif oksijen türleri
RTK	Reseptör tirozin kinaz
siRNA	Silencing interferans RNA'sı
SMAC	Second mitochondrial activator of caspases
STAT	Sinyal Transdüksiyon ve Transkripsiyon Aktivatörü
TNF	Tümör nekrosis faktör
TNFR	Tümör nekrosis faktör reseptör
TNF α	Tümör nekrosis faktör alfa
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1 associated DEATH domain protein
TRAIL	Tümör nekrosis faktör ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Apoptozda gerçekleşen morfolojik değişiklikler	2
Şekil 1.2. İçsel ve dışsal apoptotik yolların şematik gösterimi	4
Şekil 1.3. Bcl-2 ailesinin korunmuş bölgelerine göre sınıflandırılması	8
Şekil 1.4. NFkB'nin TNFα aracılı aktivasyonu	9
Şekil 3.1. HCT116 kolon kanser hücrelerinde MTT testi ile hücre canlılık sonuçları	25
Şekil 3.2. Sodyum benzoatın HCT116 kolon kanser hücrelerinin apoptoz ve nekrozu üzerine olan etkileri	27
Şekil 3.3. HCT116 kolon kanser hücrelerinde Kaspaz 3/7 aktivitesi	28
Şekil 3.4. NFkB p65 proteininin sitozol ve nükleustaki protein düzeylerinin western blot sonucunda membrandaki görünümü	29
Şekil 3.5. Bcl-2 proteininin sitozol ve nükleustaki protein düzeylerinin western blot sonucunda membrandaki görünümü	30

1.GİRİŞ

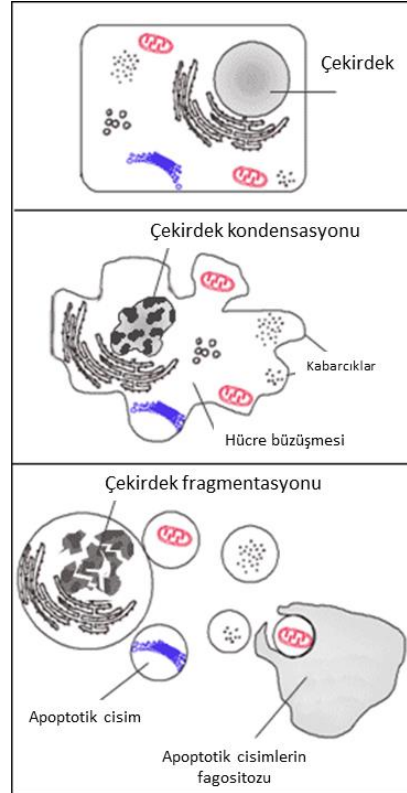
1.1.1.1. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk kez Kerr ve arkadaşları tarafından programlı hücre ölümü (PCD) olarak tanımlanmıştır (Kerr ve ark., 1972). Tip 1 hücre ölümü olarak da ifade edilen bu ölüm şekli, çok hücreli organizmalarda hayatsal rol oynamaktadır ve homeostazın yanısıra proliferasyon, diferansiasyon, gelişim, zararlı ve DNA'sı hasarlanmış hücrelerin uzaklaştırılması ve enfekte hücrelerden korunma gibi çeşitli biyolojik, fizyolojik ve patolojik roller üstlenmektedir. Apoptoz, normal gelişim ve doku homeostazının sağlanması için temel yollar arasında yer almasının yanında genetik olarak kontrol edilen ve doğal olarak var olan bir mekanizmadır (Elmore, 2007; Fuchs ve Steller, 2011). Apoptozun görülme sıklığı, morfolojik özellikleri ve biyokimyası onu diğer ölüm şekillerinden keskin bir şekilde ayırmaktadır (Ouyang ve ark., 2012).

1.1.1. Apoptozda Gerçekleşen Morfolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler

Apoptotik hücreler, morfolojik açıdan sitoplazmik büzüşme, plazma membranının tomurcuklanması, hücre membranının dış yüzeyine fosfatidilserin tabakasının lokalize olması, kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu ile karakterize edilmektedir (Hacker, 2000; Saraste ve Pulkki, 2000). Apoptozun morfolojik özellikleri ilk kez, Wyllie ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu özelliklerden biri, özelleşmiş yüzey yapılarının kaybıdır. Bu kayıpların sonucunda hücre, komşu hücrelerden izole hale dönüşmektedir. Temel olarak su kaybı ve buna bağlı sitoplazmik organellerin konsantre hale gelerek hücrenin kompakt bir hal alması ve yoğunluğunun artması sonucunda hücre hacminin azalması apoptozun bir diğer belirtisidir. Bu noktada hücre çeşitli apoptotik cisimcikleri oluşturmak üzere bölünebilmektedir. Nükleer kromatin kondensasyonu da apoptozun en dikkat çekici özellikleri arasında yer almaktadır ve bu basamak, kromatinin yoğunlaşması ve daha

granüler bir yapıya dönüşmesi ile sonuçlanır. Apoptozun sonraki safhasında ise membranın çıkıntı oluşturmaları, sitoplazmik organellerin yapısal olarak modifiye olmaları ve membran bütünlüğünün bozulması gibi morfolojik özellikler gözlenmektedir (Kroemer ve ark., 2005). Aynı zamanda hücre kırılmakta ve çekirdek dağınık bir görünüm sergileyen çeşitli parçalara ayrılmaktadır. Bütün bu değişiklikleri takiben apoptotik hücre, canlı komşu hücreler tarafından özellikle plazma membranı aracılığıyla tanınmakta ve fagositoz için bir hedef haline gelmektedir (Kroemer ve ark., 2005; Wyllie ve ark., 1981). Apoptozda meydana gelen morfolojik değişiklikler Şekil 1.1’de özetlenmektedir.



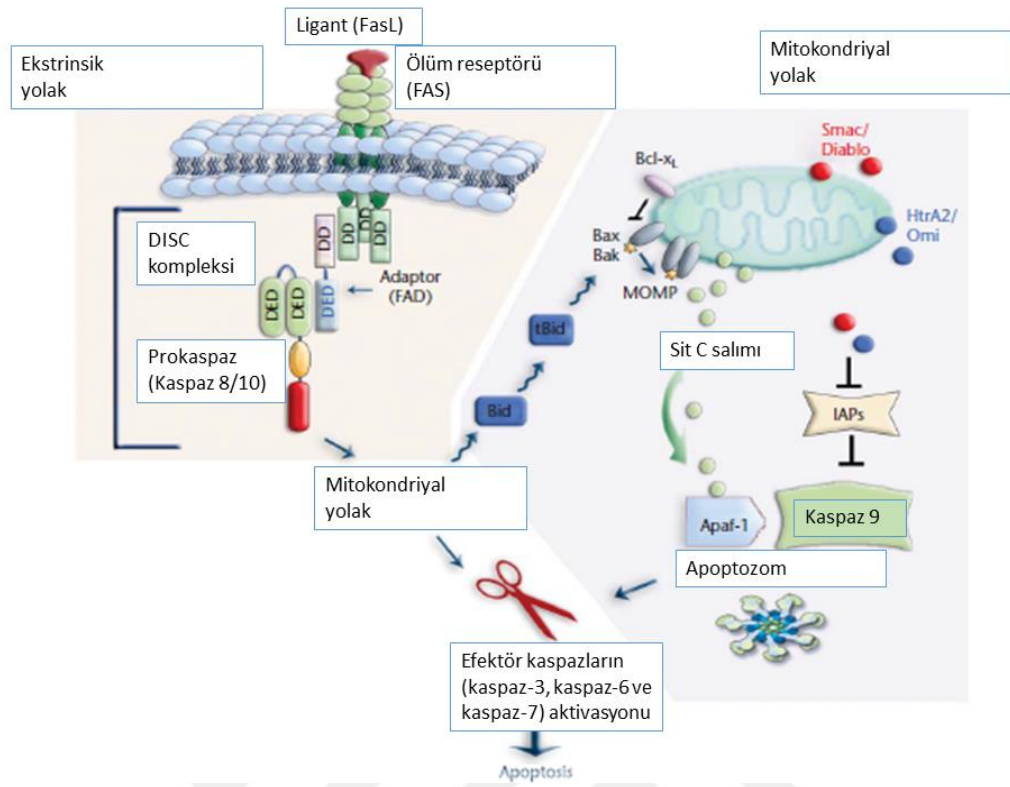
Şekil 1.1. Apoptozda gerçekleşen morfolojik değişiklikler (de.wikipedia.org/wiki/Bild:Apoptose-german.png).

Apoptozda gözlenen biyokimyasal değişiklikler arasında yer alan hücre membranının dış katmanında fosfatidilserin (PS) artışı, ölü hücrelerin makrofajlar tarafından erken olarak algılanmasına ve pro-inflamatuvar bir yanıt oluşmaksızın bu hücrelerin fagositozuna neden olmaktadır (Fadok ve Chimini, 2001; Hengartner,

2000). Genellikle fagositik hücreler apoptotik hücreleri, apoptotik yapılar oluşmadan önce yutmaktadırlar (Bucur ve ark., 2001).

Apoptotik hücrelerin morfolojik değişimleri, nükleer kondensasyon ve fragmentasyon, hücrenin büzülmesi, ekstrasellüler matriksle ve komşu hücrelere adhezyon kaybı şeklinde özetlenebilmektedir. Apoptozda görülen başlıca biyokimyasal değişimler, DNA'nın internüklezomal iplikçiklere parçalanması, fosfotidil serin eksternalizasyonu (fosfotidil serinin hücre dışına çıkması) ve kaspazlar olarak bilinen protein ailesinin aktivasyonu şeklindedir (Ouyang ve ark., 2012).

Apoptozun gerçekleşmesi oldukça kompleks bir süreçtir ve bu süreçte çok çeşitli sinyal yolları görev yapmaktadırlar. Apoptoz, kaspazlar adı verilen apoptotik enzimlerin aracılığı ile içsel (intrinsik) ve dışsal (ekstrinsik) yollarla tetiklenebilmektedir (Wong, 2011). Bundan başka, bu iki yolağın yanında kaspaz aktivasyonuna dayanan, endoplazmik retikulum stresiyle tetiklenen ve apoptoza yol açan kaspaz 2 ve 12' nin başlatıcı rollerini içeren alternatif yollar da vardır fakat bu yollar diğer yollar kadar aydınlatılmamışlardır (Szegezdi ve ark., 2006). Perforin/granzim yolağı ise T hücreleri aracılığıyla sitotoksositeye yol açan bir diğer apoptotik yoldur. Bu yolak, granzim A ya da granzim B aracılığıyla apoptozu indükleyebilmektedir. Bütün bu apoptotik yollar aynı terminal yolda birleşirler (Jin ve El-Deiry, 2005). Her iki yolda da efektör apoptotik kaspazların aktivasyonu sonucunda gerçekleşen morfolojik ve biyokimyasal hücresel değişiklikler apoptozun karakteristik özellikleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Wong, 2011). İçsel ve dışsal yolların şematik gösterimi Şekil 1.2'de sunulmaktadır.



Şekil 1.2. İçsel ve dışsal apoptotik yolların şematik gösterimi (Cairra ve ark., 2010).

1.1.2. Apoptozun Dışsal (Ekstrinsik) Yolağı

1.1.2.1. Dışsal (Ekstrinsik) Apoptotik Yolak

Ölüm reseptörleri aracılı dışsal yolak, tümör nekroz faktörü reseptör (TNFR) süper ailesine ait proteinlerin ilgili TNF ailesi ligantlarına bağlanarak, hücre yüzeyinde ölüm reseptörlerinin artışına sebep olmasıyla başlatılmaktadır (Guicciardi ve Gregory, 2009). Ölüm reseptörleri, apoptozu indükleyen sinyal yollarında kritik öneme sahip olan ölüm bölgesi (DD) olarak adlandırılan, yapısal olarak intrasellüler protein-protein etkileşimi bölgesi tarafından tanımlanmaktadır (Fulda ve Debatin, 2003). TNFR1-TNF α , FAS (CD95, APO-1)- FasL, TRAILR1 (DR4)-TRAIL, TRAILR2 (DR5)-TRAIL ölüm reseptörleri arasında yer almaktadır. İlgili ligandın ölüm reseptörü uyarımına bağlı olarak, aynı reseptör oligomerizasyona gider ve onun sitoplazmik DD ile diğer DD içeren proteinlerinle homotipik etkileşimi

aracılığıyla sitoplazmik DD' de konformasyonel değişiklikler ortaya çıkar (Guicciardi ve Gregory, 2009). FADD/TRADD adaptör proteinlerinin rolü protein kompleksi oluşumu esnasında mühürlemektir, başlatıcı pro-kaspaz 8 ve/veya 10 DISC oluşumunu gerçekleştirirler. Prokaspazların lokal konsantrasyonlarının artışı karşılıklı oto aktivasyonu desteklemektedir (Boatright ve Salvesen, 2003). Başlatıcı kaspazların aktivasyonu efektör kaspazlar olan kaspaz 3,6 ve 7' nin aktivasyonuna sebep olur ve bunların aktivasyonu hücrenin hayatta kalımı için gerekli substratların kesimi yoluyla hücre ölümünü indüklemektedir (Degterev ve ark., 2003). Bazı hücreler tek başına dışsal yolağın aktivasyonu ile ölmezler ve kaspaz 8' in indüklediği amplifikasyon basamaklarına ihtiyaç duyarlar. Bu durumda kaspaz 8 kesim için Bid' i hedefler ve t-Bid' in aktive fragmentini oluşturur, daha sonra t-Bid mitokondrial dış membran geçirgenliğini (MOMP) uyarmak için çok bölgesel pro-apoptotik proteinleri aktive eder ve böylece içsel yolla birlikte çalışır (Plati ve ark., 2008).

1.1.2.2. İçsel (İntrinsik) Apoptotik Yolak

Mitokondri aracılı içsel yolak, radyasyon, kemoterapötik ajanlarla tedavi vs. gibi çeşitli stres faktörlerine cevap olarak mitokondri aracılığıyla apoptotik yanıtın gerçekleştiği ve mitokondri iç membran geçirgenliğinde artışa yol açan sinyal yolağıdır (Green ve Kroemer, 2004; Kroemer ve ark., 1998). Bu yolak, büyük ölçüde mitokondri tarafından düzenlenmektedir (Galluzzi ve ark., 2010). Geri dönüşümsüz genetik hasar, hipoksi, çok yüksek seviyelerde seyreden sitozolik kalsiyum konsantrasyonu, ağır oksidatif stres gibi içsel uyarılar, mitokondrial içsel yolağın başlamasını tetikleyebilmektedir (Kroemer ve ark., 2007). Mitokondri, Smac/DIABLO, apoptoz indükleyen faktör (AIF), sitokrom c gibi pek çok pro-apoptotik proteinler içermektedir (Brenner ve Mak, 2009; Gustafsson ve Gottlieb 2008 ve Wang ve Youle, 2009). Hücrel stres, serbest radikal hasarı veya büyüme faktörlerinin yıkımı gibi apoptotik sinyaller sonucunda Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri aktive olur. Bu da mitokondrial membranın geçirgenlik geçiş poru olarak adlandırılan formunu almasına yol açmaktadır. Bcl-2 ailesinin pro-apoptotic BH3-

üyelerinin (Bax, Bak) takip eden aktivasyonu, anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1' i nötralize eder, bu da MOMP' (mitokondri membran potansiyeli) un bozulmasına yol açar, böylece mitokondriyal iç membran boşluğunda bulunan proteinler sitozole yayılır. Bu proteinler arasında sitokrom c ve APAF-1 de yer almaktadır. Sitokrom-c sitozoldeki, mitokondri aracılı ölümü aktive etmek için kritik öneme sahiptir (Danial ve Korsmeyer, 2004). Sitokrom-c sitozolik Apaf-1' e (apoptoz proteaz aktive edici faktör-1) bağlanır ve apoptozom olarak adlandırılan kompleksin oluşumunu ve bunun ardından başlatıcı pro-kaspaz 9' un aktivasyonunu uyarır, böylece otoaktivasyon ve proteoliz başlar. Bu süreçte, apoptotik hücre ölümünde fragmentasyon işlemi için kullanılan hücresel bileşenler olan, efektör kaspaz 3, 6 ve 7' nin aktivasyonu gerçekleşmektedir (Brunelle ve Letai 2009; Cheng ve ark., 2008; Galluzzi ve ark., 2009; Gupta ve ark., 2009; Kroemer ve ark., 2009; Kuribayashi ve ark., 2006 ve Slee ve ark., 1999).

1.1.3. Kaspazlar

Hücreyi ölüme götüren majör yolak, sistein proteazlar ailesi olan kaspazların aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşmektedir. Kaspazlar, apoptozun regülasyonu sırasında mitokondriden sitokrom c' nin salınması aracılığıyla aktifleşirler (Jiang ve Wang, 2004; Li ve Yuan, 2008). Sonuçta DNA, kaspaz tarafından aktive edilen DNaz (CAD) tarafından çok küçük parçalara ayrılır (Enari ve ark., 1998).

Kaspazlar, proteaz ailesinin iki ana katalitik özelliğini taşıdıkları için kaspaz olarak adlandırılmışlardır. Kaspazdaki 'c', sistein proteaz mekanizmasını, 'aspase' ise aspartik asitten sonrasını kesme özelliğini temsil etmektedir (Alnemri ve ark., 1996). Kaspazlar, pro-enzim olarak sentezlenmekte ve proteolitik olarak aktive olmaktadır (Salvesen ve Dixit, 1997).

Kaspazlar apoptoz mekanizmasının merkezinde yer alır, her iki kaspaz grubu da apoptozun başlamasından ve hücrenin ölümünden sorumludur. Bu apoptotik enzimler, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9 ve -10, apoptotik yolağın

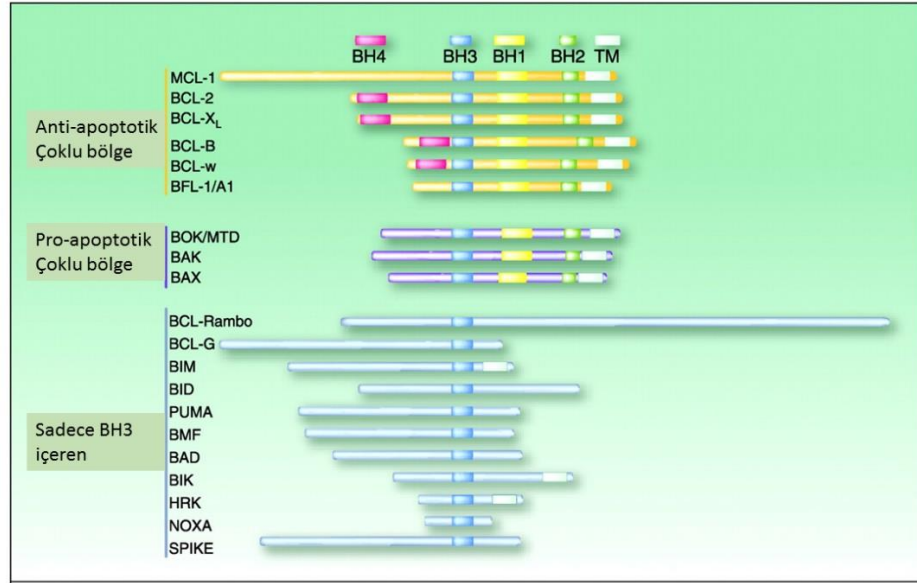
başlatıcılarıdır) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7, hücrenin kesiminden sorumludurlar) olmak üzere ikiye ayrılır (Hu ve ark., 2013; Thomberry ve Laxebnik, 1998). Kaspazlar, inaktif proteinler (zimojenler ve prokaspazlar) olarak üretildikten sonra kendi kendilerini proteolizle parçalama yoluyla otoaktifleşirler ve spesifik adaptör moleküllerle etkileşerek apoptotik süreçte rol alırlar (Nicholson, 1999). Başlatıcı kaspazlar aktive olduklarında, efektör kaspazları kesmeye başlarlar, efektör kaspazlar ise hücreyi ölüme götüren fragmentasyon işlemlerini yapan kritik öneme sahip apoptotik enzimlerdir (Green ve Evan, 2002; Stennicke ve Salvesen, 2000).

Bu kaspaz aktivitesi kromatin kondensasyonu, plazma membran asimetrisi ve hücre yüzeyinde çıkıntı oluşturmak gibi apoptotik işaretlemelerden sorumludur. Efektör kaspaz aracılı geri dönüşümsüz proteolitik aktivite içsel ve dışsal apoptotik yolların her ikisinin sonucunda da karşımıza çıkmaktadırlar. Böylece her iki yolak da DNA ve hücresel bileşenlerin ayrıştırılmasına yarayan, apoptozdaki tipik morfolojik değişiklikleri yaratan kaspaz 3,6 ve 7'nin görev aldığı kompleks bir süreç olarak gerçekleşmektedir (Degterev ve ark., 2003).

1.1.4. Bcl-2 Ailesi

Apoptozun içsel yolağı Bcl-2 ailesi olarak adlandırılan protein ailesi tarafından düzenlenir. Bu proteinlerden Bad, Bax ve Bid pro-apoptotik fonksiyonlar üstlenen proteinler, Bcl-2 ve Bcl-XL ise anti-apoptotik olarak rol oynayan proteinler arasında yer almaktadır. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeler arasındaki denge hücrenin apoptotik uyarılara duyarlılığını belirlemektedir. Pro-apoptotik proteinlerin yüksek ekspresyonu hücreyi apoptoza duyarlı hale getirmekte, yüksek anti-apoptotik protein ekspresyonu ise hücreyi apoptoza dirençli hale getirmektedir. Pro-apoptotik proteinler genelde sitozolde bulunurken anti-apoptotik proteinler hücre yüzeyinde lokalizedirler. Apoptoz boyunca mitokondriyal olayların regülasyonu ve kontrolü Bcl-2 ailesi proteinlerince yapılır (Cory ve Adams, 2002). Günümüzde, şu ana kadar 25 farklı tipte Bcl-2 ailesi proteini teşhis edilmiştir. Bu üyeler, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri (Örneğin; Bax, Bak, Bad, Bcl-XS, Bid, Bim) ve anti-apoptotik

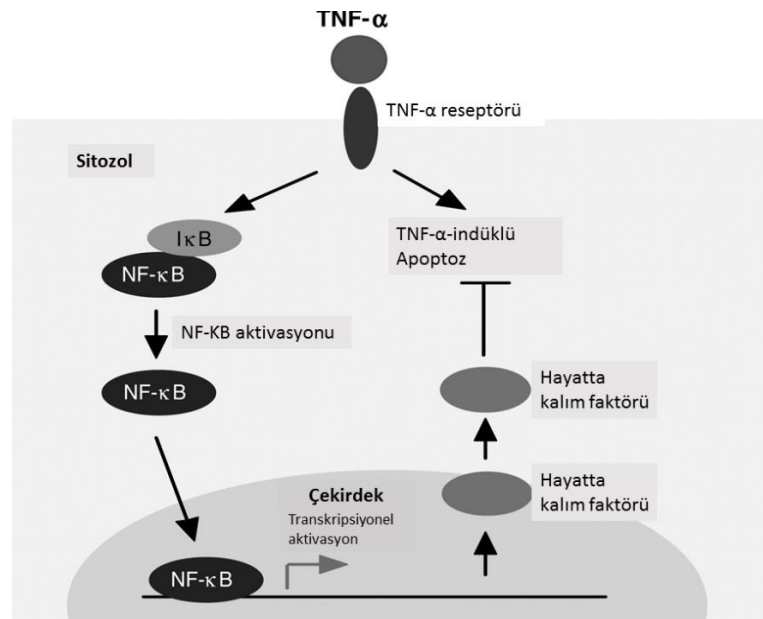
üyeleri (Örneğin; Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, A1) dir (Cory ve ark., 2003). Bcl-2 ailesi geleneksel olarak Bcl-2 homoloji bölgesi (BH) veya motifleri olarak adlandırılan kısa sekanslara sahiptir (Sato ve ark., 1994). Farklı apoptotik uyarılara cevap olarak iki önemli pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi Bax ve Bid, MOMP (mitokondriyal dış membran permeabilizasyon) kompleksini oluşturarak apoptozu başlatır (Green ve Kroemer, 2004). MOMP oluşumu, mitokondri membranlar arası boşluğundan sitokrom c ve diğer faktörlerin salınımı ile sonuçlanır ve bu salınım da daha sonra kaspaz kaskadını uyarır. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin etkileşimi ile MOMP oluşumunun inhibe ya da aktive olması, hücrenin kaderini belirlemektedir (Certo ve ark., 2006). Son çalışmalar göstermiştir ki apoptotik hücre ölümündeki ana yollar birbirleriyle etkileşim içindedirler ve bu bağlamda Bcl-2 ailesi proteinleri düzenleyici rol oynamaktadır (Denton ve ark., 2012). Bcl-2 ailesinin, korunmuş bölgelerine göre sınıflandırılması Şekil 1.3’de gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Bcl-2 ailesinin korunmuş bölgelerine göre sınıflandırılması (Danial, 2007).

1.1.5. NFkB Yolağı ve Apoptoz

NFkB, genellikle dimer yapıda bulunan ve ortak DNA dizilerine bağlanan birbiriyle yakından ilişkili proteinleri içeren oldukça önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Bu proteinlerin bağlandıkları DNA dizileri, kB B bölgesi adı verilen hedef genlerin promotor bölgelerinde yer almaktadır ve koaktivatör ve korepressörlerin yapıya girmesiyle gen aktivasyonu düzenlenmektedir (Aggarwal, 2004). NFkB yolağı, inflamasyon, proliferasyon, apoptoz, metastaz, tümör hücrelerinin invazyonu ve anjiyogenez ile ilişkili genleri transaktive etme yoluyla tümörigenezde hayatsal rol oynamaktadır (Orlowski ve Baldwin, 2002). NFkB1 ailesi transkripsiyon faktörleri 5 üyeden oluşmaktadır. Bunlar, NF-kB1 (p50), NF-kB2 (p52), c-Rel, RelB ve RelA (p65)dır. Bu üyeler, DNA bağlanmasından ve homodimerizasyondan ve heterodimerizasyondan sorumlu N-terminal Rel homolojisi sergilerler (Aggarwal, 2004; Baud ve Karin, 2009). NFkB ile endojen inhibitör IκB sitoplazmada normalde birlikte bulunur. IκB-α, IKK (IκB kinaz) tarafından iki katalitik alt üniteye (IKK-α ve IKK-β), ve bir regülatör alt üniteye IKK-α) hızlı bir şekilde fosforile edilir (Solt ve May, 2008). NFkB'nin TNFα aracılı aktivasyonu şematik olarak Şekil 1.4'te gösterilmektedir.



Şekil 1.4. NFkB'nin TNFα aracılı aktivasyonu (Dale ve ark., 2006).

NFkB, inflamatuvar uyarılar, sitokinler, karsinojenler, tümör oluşumuna yol açan ajanlar, α -radyasyon, endotoksinler, UV ışınları tarafından aktive olabilmektedir ve hücrel büyüme ve transformasyon, invazyon, metastaz, kemoterapi direnci ve inflamasyonda kritik öneme taşımaktadır (Ghosh ve Hayden, 2008). Enflamatuvar mikro çevrelerdeki TNF α , IL1, IL6, ve COX-2, 5 ajanları da tümör ilerlemesi, anjiyogenez ve metastazla oldukça ilişkilidir (Karin ve ark., 2002).

NFkB aktivasyonunun, Bcl-2 aile üyelerini ve kaspaz inhibitörlerini uyararak apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir (Lin ve Karin, 2007). NFkB ve onun aile üyelerinin en önemli fonksiyonları arasında, proteolitik matriks metalloproteinaz enzimine yardım ederek tümör invazyonunu desteklemek yer almaktadır (Affara ve Coussens, 2007; Luo ve ark., 2005) Böylece IKKa prostat kanserinde serin proteaz inhibitörünü inhibe ederek metastazı teşvik eder, aynı zamanda IL8 ve VEGF'ü aktive ederek de anjiyogenezi uyarmaktadır. Ancak, proteozom inhibisyonu yoluyla Ikb α proteininin akümüasyonu, antiapoptotik NFkB'nin aktivasyonunu engeller, bu da tümör hücresinde apoptozla sonuçlanır (Biswas ve Iglehart, 2006). NFkB'nin anti-apoptotik rol üstlenerek tümörleşme sürecindeki etkilerinin gösterildiği bu çalışmaların yanında, artmış apoptozla korelasyon gösterir şekilde artmış NFkB aktivitesi sergileyen çeşitli örnekler de gösterilmiştir (Parrondo ve ark., 2010; Ryan ve ark., 2000 ve Stark ve ark., 2007). Bu çalışmalar, kanser terapilerinde NFkB'nin hedef molekülü olduğunu göstermektedir. NFkB'nin, özellikle hedef genlerinin uyarılması aracılığıyla hücre hayatta kalımını teşvik etmek suretiyle çok çeşitli patolojik, fizyolojik, biyolojik proseslerde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Tanabe ve ark., 2010).

1.1.6. Anti-Kanser Mekanizma Olarak Apoptoz

Genellikle pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein regülatörleri arasındaki denge hücrenin apoptozla gidip gitmemesinde kritik öneme sahiptir. Apoptoz, ölüm ve yaşamda kalım arasındaki hassas dengede rol oynaması nedeniyle, apoptozun düzenlenmesindeki bozukluklar, kontrolsüz hücre proliferasyonuna, gelişimine,

kanser oluşumu ve ilerlemesine ve kanser ilaçlarına direnç gelişimine yol açmaktadır (Plati ve ark., 2009). Bu nedenle, apoptozun deregülasyonu kanseri karakterize edebilecek kilit öneme sahiptir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Apoptoza karşı direnç gelişiminden sorumlu molekülleri hedefleyerek geliştirilen stratejik terapötikler kanser hücrelerinin apoptoza duyarlılığını yeniden yapılandırarak kanser tedavisindeki başarısızlığın üstesinden gelmek için yaklaşımlar sunmaktadır (Fulda, 2015; Gimenez-Bonafe ve ark., 2009).

1.1.7. Kanserde Apoptotik Yolaklarda Meydana Gelen Değişiklikler

Gerek dışsal gerekse içsel apoptotik yolaklardaki bileşenlerin değişimi değişik tümör tiplerinde kemoterapiye direnç gelişiminde temel rol üstlenebilmektedirler. Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyeleri arasındaki dengenin bozulması etkilenmiş hücrelerde yanlış apoptozla sonuçlanabilir. Bu durum, bir kısım ya da çeşitli anti-apoptotik proteinlerin aşırı baskılanmasıyla, bir ya da daha çok proteinin down-regüle olmasıyla ya da her ikisiyle de ilişkili olarak gerçekleşebilmektedir. Prostat kanseri, büyük hücreli B-cell lenfoma (DLBCL) ve melanoma gibi birçok insan kanser türünde anti-apoptotik Bcl-2' nin aşırı artışı rapor edilmiştir (Gandour-Edwards ve ark., 2004; Watanabe ve ark., 2013) ayrıca TRAIL aracılı apoptozun engellenmesinin kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir (Fulda ve ark., 2000; Raffo ve ark., 1995). Kolorektal kanser ve Kaposi' s sarkomada ise Bcl-xL' in aşırı baskılandığı belirlenmiştir (Foreman ve ark., 1996; Krajewska ve ark., 1996). Bu anti-apoptotik bileşenlerdeki aşırı artışlar kanser hücrelerinde çoklu ilaç rezistansına yol açar ve hücrelerin apoptoza gidişini engeller (Minn ve ark., 1995). Bunun yanında, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi antiapoptotik proteinlerin aşırı ifadesinin, cisplatine direnç gelişimi, küçük hücreli akciğer kanserini (NSCLC) de kapsayan değişik kanser türlerinde tümör direnci ve baş-boyun, over ve meme kanserleriyle korelasyon gösterdiği de gösterilmiştir (Han ve ark., 2003; Yang ve ark., 2013). Diğer yandan pro-apoptotik Bax geninin mutasyonu antikanser tedavilere direnç ve kolorektal kanserlerle ilişkili bulunmuştur (Miquel ve ark., 2005). Kronik lenfatik lösemi hastalarında (CLL),

artmış Bcl-2/Bax oranı tespit edilmiştir (Pepper ve ark., 1997). İçsel yolaktaki değişiklikleri kapsayan diğer örnekler, metilasyonun anormal artışı sonucunda ortaya çıkan, apoptozom, APAF-1 ve melanomalarda (Baldi ve ark., 2004; Soengas ve ark., 2001) basit bileşenlerin artışının azalmasıdır. Ayrıca kaspaz aktivitesinde rol alan bileşenler gibi içsel apoptotik yolağı kontrol eden araçların değişimine bağlı olarak bozulan apoptozom nedeniyle tümör hücreleri apoptoza direnç geliştirebilmektedirler. Bu bağlamda değişik kanser türlerinde IAP'lerin aşırı artış gösterdikleri bulunmuştur ve bu artış hastalarda zayıf prognozla ilişkilendirilmektedir (Fulda, 2009; Schimmer, 2004).

1.2. Kolon Kanseri

Kolon kanseri; akciğer, karaciğer, ovaryumlar ve gastrointestinal organlar gibi vücudun farklı dokularına metastaz yapma potansiyeli olan en ciddi kanser türleri arasında yer almaktadır (Donaldson, 2000; Margovich ve ark., 2010). Kolon kanserinden ölüm hızı ve insidansı özellikle İngiltere, Avrupa, bir kısım Asya ülkelerinde ve dünyanın pek çok ülkesinde giderek artmaktadır. Kolon kanserindeki bu artışın beslenme alışkanlıkları ve fiziksel aktivite düzeylerinin değişmesi ve genetik faktörlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Center ve ark., 2009).

1.2.1. Kolon Kanseri ve Diyet

Kolon kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar hayatta kalımı sağlamakta fakat pek çok yan etki sergilemektedirler (Davenport ve Roudebush, 2006). Buna bağlı olarak kolon kanser tedavisinde kullanılabilecek nutrasötik ve fitokimyasallarla ilgili çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır. Nutrasötikler, besinlerden elde edilen veya farmasötik derivelerdir ve fonksiyonel gıdalar olarak da anılmaktadırlar (Ricciardiello ve ark., 2011). Nutrasötikler, günümüzde modern tıp tarafından kullanımlarının yanı sıra kozmetik amaçlı, besin katkı maddesi olarak ya

da besin bileşeni olarak çeşitli endüstriler tarafından da kullanılmaktadırlar (Slattery ve ark., 2004).

Nutrasötiklerin tümör hücrelerinde DNA transkripsiyonunu ve DNA hasar faktörlerini modüle edebildiklerine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Nutrasötiklerin, anti-obezite, kardiyovasküler etkiler, anti-diyabetik etki, immün koruma, doğal antioksidan aktivite ve anti-inflamatuvar etkiler sergileyebilecekleri bildirilmiştir (Gerson, 1978; Holt, 1999). Kolon kanser tedavisinin pek çok basamağında kemoterapi, cerrahi, radyasyon ve fitoterapi gibi çeşitli tedavi şekilleri kullanılmaktadır. Kanser terapötiklerinin diğer bütün çeşitleri ciddi yan etkilere sahiptir. Bitki derivelerinden elde edilen nutrasötiklerin kolon kanserinde ciddi avantajlar taşıyabileceği öne sürülmektedir (Prakash ve ark., 2012).

Bu amaçla çeşitli bitkisel derivelerin, anti-kanser etkileri açısından incelendiği pek çok çalışma bulunmaktadır. Reaktif oksijen türleri normal hücrelerde problemlere yol açabilir. O₂ – ve OH- gibi serbest radikaller normal insanlarda kolonosit aktivitesini artırabilir ve kolon poliplerinin oluşmasına sebep olabilir. Doğal bir antioksidan ve bitkisel bir flavanoid derivesi olan quersetinin içerdiği flavonoid fitokimyasalları ile kolon hücrelerinde oksidatif hasarı durdurabildiği ve kolon kanser hücrelerini apoptoza indüklediği bildirilmiştir (Potter, 1999). Doğal bir diyet bileşeni olan Naringinin intestinal tümörünezi önlediği, probiyotiklerin kolon karsinogenezinde koruyucu etkiler sergilediği, diyetle alınan kakaonun kolitle ilişkili kanseri Nrf2/Keap1 yolağını aktive ederek önlediği bildirilmiştir (Pandurangan ve ark., 2015; Walia ve ark., 2015 ve Zhang ve ark., 2016). Mercimeğin bileşenleri arasında yer alan β 1,3 glukanın da anti-kanser etkiler sergilediği ve kolon kanserinin tedavisinde klinik olarak kullanıldığı ve hayvan modellerinde kolon tümörlerinin oluşumunu dikkat çekici bir biçimde azalttığı bildirilmiştir. Brokoli ekstraktları, kırmızı şarap, diyet lifi, biber, soya, karanfil, çemen otu, zencefil, elma ve diğer sebzelerde bulunan önemli bir mineral olan selenyum da antikanser etkileri için araştırılmaktadır. Selenyumun kolon kanseri riskini azalttığı bildirilmiştir (Finley ve ark., 2000; Rajamanickam ve Agarwal, 2008). Elma polisakkaritinin NFkB aracılı kolit ilişkili karsinogenezi azalttığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2015). Brezilya

ailesi bitkilerinden sentezlenen sarı hardal yağının kolon kanser hücrelerinin oluşmasında koruyucu bir rolü olabileceği bildirilmiştir (Nobili ve ark., 2009). Esansiyel yağ asitleri arasında yer alan EPA (eikazopentaenoik asit), DHA (dokosahekzaenoik asit) ve omega 3'ün de kanser ve kalp hastalıklarından korunma tedavilerinde kullanılmaktadır. Genel olarak balık ve balık yağı tüketimi kolon kanser riskini ve progresyonunu azaltmaktadır (Pandey ve ark., 2010). Bunların yanı sıra, probiyotikler olarak adlandırılan ve son yıllarda geliştirilen yaşayan canlı mikro organizmalar da insanlar için önemli bir diyetel suppleman olarak ortaya çıkmaktadır. Bu mikroorganizmalar, barsak mikroflorasını dengelemekte ve insanlarda sindirim sistemi üzerine yararlı etkiler sergilemektedir. Çevresel faktörler ve diyet alışkanlıkları kolonik bakterilerin sayısını ve laktobasili konsantrasyonunu etkileyebilmekte, malign tümörlerin ve poliplerin oluşumuna sebebiyet verebilmektedir. Probiyotik kullanımı öncül kanser hücrelerinin gelişimini engelleyebilir (Uccello ve ark., 2012). N-nitroso-N-methylurethane ile indüklenen fare kolon kanser modelinde probiyotik kullanımı kolon kanseri gelişiminin engellenmesinde etkili olmuştur. (Shmueli ve ark., 2013). Bütün bu çalışmalar, fonksiyonel gıdaların ve diyetin kolon kanseri ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır (Caruso ve Notarnicola, 2005).

1.3. Gıda Katkı Maddeleri

Sağlık Bakanlığı' nın gıda katkı maddeleri yönetmeliğine göre gıda katkı maddeleri gıda hammaddesi olarak kullanılamaz ve tek başına tüketilemez. Bunun yanı sıra tek başına besleyici değeri olabilir ya da olmayabilir. Gıdayı işleme sırasında kullanılan teknolojiye bağlı olarak kalıntı ya da türevlerini içerebilir. Tüm bunların ışığında gıda maddelerinin üretimi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması esnasında gıda maddesinin organoleptik özelliklerini korumak ya da düzeltmek amacıyla kullanımına izin verilir (Sağlam, 1999).

Katkı maddeleri içerisinde, her tür gıdaya eklenebilen anti-mikrobiyal maddeler; gıdalarda oluşumu arzu edilmeyen fakat farklı sebeplerle oluşabilen küf, maya, patojen olan ve patojen olmayan her türlü mikroorganizmayı ortamdaki uzaklaştırmak ya da bu

organizmaların çoğalma ve çalışmalarını önlemek amacı ile kullanılırlar. Bu amaçla kullanılan katkı maddeleri arasında benzoik asit ve sodyum benzoat da bulunmaktadır.

1.3.1. Benzoik Asit- Tanımı ve Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanımı

Benzoik asitin keşfi 16. Yüzyıla dayanır. Benzoin reçinesinden kuru damıtma yöntemiyle ilk eldesi ise 1556'da eczacı Michel de Nostredame tarafından gerçekleştirilmiştir. 1832'de Justus von Liebig ve Friedrich Wöhler kimyasal yapısını ortaya koymuşlardır. Salkowski ise 1875' te maya ve küflere karşı etkinliğini bulmuştur.

Benzoik asitin ana kaynağı olan tarçın, sinnamaldehit, sinnamil asetat ve sinnamil alkol gibi sırasıyla oksidasyon ve hidroliz ile sinnamik aside dönüşen, üç major bileşen içerir. Sinnamik asit karaciğerde, sodyum benzoat gibi sodyum tuzu ve benzoil- CoA olarak da bulunabilen; benzoata, beta okside edilir (Abd El-Mawla ve ark., 2001). Sodyum benzoatın çok az bir miktarının bile insanlarda idrarla atıldığı rapor edilmiştir (Bridges ve ark., 1970; Kubota ve Ishizaki, 1991).

Sodyum benzoat tıbbi açıdan önemlidir çünkü çocuklarda üre süklüsü hastalıklarının neden olduğu hiperamonemi ile birlikte seyreden hepatik metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılan, FDA onaylı bir ilaç olan Ucephan' ın bir bileşenidir. Aynı zamanda besin ve kozmetik sanayide geniş çaplı bir kullanımı vardır. Sodyum benzoatın % 2' lik içme suyu konsantrasyonunun farelerde ömür boyu kullanımı hiçbir yan etkisi olmaksızın güvenli bulunmuştur (Leonard ve Morris, 2002; Scaglia ve ark., 2004).

Benzoik asit, benzoatlar ve benzoik asit esterleri meyvelerin çoğunda bulunmaktadır. Kiraz iyi bir kaynağı iken kıvılcık meyvesi benzoik asitten oldukça zengindir. Benzoatlar bunun dışında mantar, tarçın, karanfil gibi bitkisel kaynaklarda doğal olarak bulunmakta ve bazı süt ürünlerinde bakteriyel fermentasyon neticesinde kendiliğinden oluşmaktadır. Benzoik asit, gıdalarda kullanmakta olan en güvenli koruyucu katkı maddelerinden biridir. Kodexte E kodu 210' dur. En basit aromatik

karboksilik asit olan benzoik asit, benzoin reçinesinden elde edilir. Beyaz kristal ya da küçük kristaller halinde bir organik asit olan benzoik asidin kimyasal formülü C_6H_5COOH tır.

Benzoik asit ve tuzları (E210: benzoik asit, E211: sodyum benzoat, E212: potasyum benzoat, E213: kalsiyum benzoat) gıdalarda koruyucu olarak etkin kullanım alanına sahiptirler. Gıdalarda genellikle sodyum tuzu formunda uzun süredir kullanılmaktadır. Serbest asidin düşük çözünürlüğü, sodyum tuzunun tercih edilmesine yol açmaktadır. Benzoik asitin bir tuzu olan sodyum benzoat, genelde en çok maya ve bakterilere karşı aktiftir (Yentür ve ark., 1995). Buna karşın küfler karşısında daha az etkindir. Uygun şartlar altında benzoik asidin bakteriyostatik, bakteriyosidal, fungistatik ve fungisidal özelliklere sahip olduğu saptanmıştır. Besinleri koruyucu maddeler arasında sodyum benzoat düşük maliyeti ile tercih edilmektedir. Sodyum benzoatın farklı besinlerde kullanım oranı genellikle % 0.05-0.10 arasında değişmektedir (Altuğ, 1999).

1.3.1.1. Sodyum Benzoatın Biyolojik Etkileri İle İlgili Çalışmalar

Geçtiğimiz yıllarda, benzoik asit ve sodyum benzoatın biyolojik etkileri farklı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda araştırılmıştır. Nadir de olsa sodyum benzoat alımı sonrasında, küçük damarlarda nekroza yol açan, Löko Klastik Vaskülit hastalığının görüldüğü rapor edilmiştir. Benzoik asitin, astım, deri döküntüleri ve migrene yol açabileceği de başka çalışmalarda bildirilmiştir (Çalışır ve Çalışkan, 2003). Ayrıca, bir diğer çalışmada gıdalarda koruyucu olarak kullanılan sodyum benzoatın tavuk embriyosu karaciğer dokusuna olası embriyotoksik etkileri histolojik yönden değerlendirilmiş ve sodyum benzoatın doza ve süreye bağlı olarak embriyoların toplam ağırlıklarında anlamlı bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Karakahya, 2011).

Sodyum benzoatın tavuk embriyosunda nöral tüp defekti gelişimine etkisini inceleyen ayrı bir çalışmada ise tek bir embriyoda nöral tüp defekti geliştiği bulunmuş ve sodyum benzoatın civciv embriyosunda yüksek dozda bile negatif etkisinin olmadığına

işaret edilmiştir (Emon ve ark., 2015). Besin katkı maddelerinin genotoksisiteleri ile ilgili yapılan bir çalışmada sodyum benzoat ve potasyum benzoatın periferik lenfosit hücrelerine *in vitro* etkisi incelenmiş ve sodyum benzoatın belirgin bir şekilde artmış DNA hasarına neden olduğuna ve sonuç olarak sodyum ve potasyum benzoatın klastojenik, mutajenik ve sitotoksik olduğuna işaret edilmiştir (Zengin ve ark., 2011).

Potasyum sorbat, sodyum benzoat ve potasyum nitratın insan lenfositlerine etkisini inceleyen bir çalışmada potasyum sorbat ve sodyum benzoatın 2.0, 0.2 ve 0.02 mM konsantrasyonlarının sitostatik aktivitesinin olmadığı, ancak 4 ve 8 mM konsantrasyonlarının zayıf sitostatik aktivite gösterdiği dolayısıyla bu katkı maddelerinin düşük konsantrasyonlarının non-genotoksik olduğu sonucuna varılmıştır (Mpauntoukas ve ark., 2008). Sodyum benzoatın, multipl sklerozun bir *in vivo* modeli olan deneysel allerjik ensefalomyelit (EAE) üzerindeki immünmodülatör etkileri incelenmiş ve bu maddenin T hücrelerinin farklılaşmasını etkileyerek, Treg popülasyonunu arttırdığı, EAE yolu hastalıklarını bloke edebileceği ve MS için terapötik bir ilaç olarak kullanılabileceği iddia edilmiştir (Miller, 1997).

2009 yılında yapılmış olan bir çalışmada, sodyum benzoatın anti-enflamatuvar etkileri mikrogliya ve astrositlerin aktivasyonu ile karakterize nörodejeneratif bir hastalık modelinde incelenmiştir. Çalışmada, sodyum benzoatın fare mikrogliasında LPS ile uyarılan iNOS ekspresyonunu, pro-enflamatuvar sitokinleri (TNF-alfa ve IL-1 beta) ve çeşitli yüzey belirteçlerini (CD11b, CD11c, and CD68) engellediği bulunmuştur. Sodyum benzoatın iNOS üzerindeki inhibitör etkilerini bir transkripsiyon faktörü olan NFkB (nükleer faktör kappa b)'nin inhibisyonu aracılığıyla yaptığı bildirilmiştir (Brahmachari ve ark., 2009).

1.4. NFkB'nin Kanserdeki Rolüne İlişkin Yapılmış Çalışmalar

Yakın zamanda yapılmış olan çalışmalar, NFkB yolağının anlamlı bir biçimde tümör gelişimini desteklediğine işaret etmektedir (Viatour ve ark., 2005). NFkB transkripsiyon faktörü, pek çok kanser hücresi tipinde anti-apoptoz, metastaz,

anjyogenez, kemoterapiye direnç ve tümör oluşumu gibi tümörigenezin çeşitli mekanizmaları ile ilişkilendirilmektedir (Karin ve ark., 2002). Bu kanser tipleri arasında kolon kanseri de yer almaktadır. İnsan kolorektal karsinom dokularında NFkB transkripsiyon faktörünün aktif olduğu ve kolon kanser hücrelerine büyümeleri için uygun koşulların sağlanmasına aracılık ettiği bildirilmiştir (Fantini ve ark., 2008; Yu ve ark., 2004). Bu nedenle, son zamanlarda NFkB yolağının inaktive edilmesi yoluyla ortaya çıkan anti-kanser etkinin gösterildiği pek çok çalışma bildirilmiştir ve NFkB, anti-kanser terapiler için önemli bir hedef olarak ortaya çıkmıştır (Ban ve ark., 2009a; Ban ve ark., 2009b; Ban ve ark., 2014 ve Oh ve ark., 2012). 2011 yılında yapılmış olan bir çalışmada, adaçayı bileşenlerinden linalil asetat ve alfa terpineolün HCT 116 kolon kanser hücrelerinde NFkB sinyal yolağı üzerine etkileri araştırılmış ve bu maddelerin doza bağlı kombinasyonlarının non-sitotoksik konsantrasyonlarda HCT 116 hücrelerinin yaşam süresini kısalttıkları belirlenmiştir. Kombinasyon tedavisinin apoptoz ve nekroza neden olarak hücre canlılığını azalttığı ve bu etkilerin NFkB' nin DNA' ya bağlanmasının baskılanması, p65'in nükleer translokasyonunun engellenmesi ve NFkB degradasyonunun artması ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Deeb ve ark., 2011). Kolon kanser hücrelerinde çeşitli farklı ajanların NFkB yolağı üzerinden apoptotik etkilerinin incelendiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Mahmoud ve ark., 2015; Rajitha ve ark., 2016). Bu çalışmaların bir diğesinde ise, flavanoidlerin, NFkB yolağını inaktive etmek yoluyla HT29 kolon kanser hücrelerinin gelişimini durdurduğunu gösterilmiştir. Bir flavanoid olan metil 3.5 dikafeoil kinat' ın HT29 insan kolon kanseri hücrelerinde NFkB aktivasyonunu inhibe ederek apoptozu ve hücre arrestini indüklediği gösterilmiştir (Rajitha ve ark., 2016). Bir başka çalışmada ise *in vivo* fare melanoma modelinde tarçın ekstraktının anti-kanser etkileri araştırılmış ve bu hücrelerde NFkB ve AP1 aktivitesini inhibe etmek yoluyla, artmış pro-apoptotik etki sergilediği Bcl-2, Bcl-xL ve survivin gibi NFkB ve AP1 hedef genlerinin aktivitelerini inhibe ederken, pro-apoptotik genleri upregüle ederek tümör hücrelerinin aktif hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Kwon ve ark., 2010). 2011 yılında yapılmış bir çalışmada ise zerdeçal ve analoglarının iki farklı kolon kanser hücre serisi olan HT29 ve HCT116 hücre serileri üzerindeki etkileri araştırılmış ve bu analogların NFkB' yi inhibe ettikleri, hayatta kalım yollarını inhibe ettikleri ve hücre döngüsünün ilerlemesini engelledikleri belirlenmiştir. G0/G1

fazında tutulumun transkripsiyon faktörü olan E2F-1 ve bu faktörün hedef geni TS ile ilişkili olarak gerçekleştiği de gösterilmiştir (Nagaraju ve ark., 2014).

Ancak, literatürde NFkB aktivasyonunun çeşitli farklı ajanların apoptotik etkilerine aracılık ettiğine dair de pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde askorbil stearatın servikal kanser hücrelerini mitokondriyal membran permeabilitesinde değişiklik, sitokrom c salımı ve kaspaz 3 ve NF-kB aktivasyonu aracılığıyla apoptoza indüklediği bildirilmiştir (Mane ve ark., 2016). Bir başka çalışmada ise arsenitin 16-HBE hücre serisinde NFkB aktivitesinde artışa yol açarak apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2015). Aspirinin HT29 hücrelerinde apoptoz indükleyici etkilerine NFkB aktivasyonunun aracılık ettiği ve NFkB'nin pro ya da anti-apoptotik fonksiyonunun, apoptotik uyarının doğası tarafından belirlendiği rapor edilmiştir (Kaltschmidt ve ark., 2000; Stark ve ark., 2007). Bir diğer çalışmada ise, NFkB aktivasyonunun inhibisyonu durumunda p53 bağımlı hücre ölümünün engellendiği bildirilmiştir (Ryan ve ark., 2000). Bir başka çalışmada ise NFkB aktivasyonunun, insan prostat kanser hücrelerinde antimitotik ilaçlar tarafından gerçekleştirilen hücre ölümünü arttırdığı da belirlenmiştir (Parrondo ve ark., 2010).

Yapılmış olan tüm bu çalışmalarda, farklı ajanların kolon kanseri hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkileri NFkB yolağı üzerinden araştırılmıştır. Besin katkı maddesi olarak yaygın kullanım alanı olan sodyum benozatın immün sistem hücreleri üzerindeki etkilerini NFkB yolağının inhibisyonu aracılığıyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Sodyum benozatın kanser hücreleri üzerine olan etkilerinin in vitro olarak araştırıldığına dair bir çalışmaya ise literatürde rastlanmamıştır. Tüm bu literatür bilgilerinin ışığında, önerilen bu tez çalışmasında sodyum benozatın, kolon kanser hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri, bu kanser tipinde aktif olduğu bilinen NFkB yolağı üzerinden araştırılmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre (Spectramax), santirifüj (Beckman Coulter), steril kabin (Holten Lamin Air), CO₂ İnkübatörü (Sanyo), otomatik pipetler (Gilson), su banyosu (Mettler), magnetik karıştırıcı (Velp Scientifica), pH metre (Sesa 1400), -20 °C ve -80 °C derin dondurucular (Heto, Sanyo, Bosch), buzdolabı (Arçelik), vorteks (Heidolph), elektronik terazi (Mettler Toledo), çalkalayıcı (Labnet International), inverted mikroskop (Leica), floresan mikroskop (Olympus), spektrofotometre (Thermo), jel elektroforezi ve immunblotlama Bio-Rad tetra cell western blot cihazı, akım sitometri (Accuri C6) kullanıldı.

2.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

RPMI 1640 medium, fetal bovine serum, penisilin/streptomisin, L-glutamin, PAA firmasından, , BSA, glisin, PBS, thiazol blue tetrazolium bromide (MTT), DMSO Sigma'dan Annexin V-PE, 7-AAD BD Biosciences' dan, kaspaz-3 kolorimetrik assay kit Abcam firmasından, , Bradford ajanı Bio-rad firmasından, temin edildi.

2.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Serisi

Çalışmalarımızda Bert Vogelstein (Johns Hopkins University) tarafından hediye edilen HCT 116 kolon kanser hücre serisi kullanıldı.

2.4. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

2.4.1. Hücre Kültürü

HCT 116 kolon kanser hücreleri, 75cm²'lik flasklarda, 37°C'de, %5 CO₂ ile içeren etüvde, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve inaktif fetal sıgır serumu (%10) içeren RPMI 1640 besiyerinde çoğaltıldı. Hücrelerin pasajlanması, %80 yoğunluğa ulaştıklarında PBS ile yıkanmaları ve tripsinize edilerek kaldırılmaları yoluyla yapıldı.

2.4.2. Hücre Sayımı ve Canlı Hücrelerin Belirlenmesi

Deneylerimiz sırasında, hücreler, ölü hücrelerin mavi-mor renkte boyanarak ayırt edilmelerine olanak sağlayan Trypan mavisi boyasıyla boyandılar. Bu amaçla eşit hacimde (20 µl hücre süspansiyonu) Trypan mavisi ve hücre çözeltisi karıştırıldı. (Strober, 2001). Daha sonra, ml'deki hücre sayısının hesaplanmasına olanak veren Neubauer lamının üzerine bu hücre süspansiyonu konuldu. Lamın, bilinen hacme sahip karelerinde sayım yapıldı ve elde edilen hücre sayısı seyreltme faktörü (2) ve lamın 10⁴ çarpanı ile çarpılarak ml'deki canlı hücre sayısı elde edildi. Daha sonra, hücreler, 6 kuyulu plaklar için kuyu başına 10⁶ ve 96 kuyulu plaklar için kuyu başına 5x10⁴ hücre sayısında olmak üzere plaklara ekildiler.

2.4.3. Hücre Canlılık Testi

Çalışmamızda, sodyum benzoatın farklı konsantrasyonlardaki (0.75 mM, 1.5 mM, 3 mM, 6,25 mM, 12 mM, 25 mM ve 50 mM) çözeltileri hücre kültür besiyerinde hazırlandı. HCT116 kolon kanser hücreleri 96 kuyulu plaklara ekildikten sonra bir gece inkübasyonda tutuldular. Ertesi gün, HCT116 kolon kanser hücrelerinin üzerindeki besiyeri atılarak yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki

sodyum benzoat hücrelere uygulandı. Kontrol grubundaki hücrelere sodyum benzoat uygulanmadı.

Çalışmalarımız sırasında, hücre canlılığı, 3-(4,5- dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) testi ile belirlendi. MTT testi, metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enziminin tetrazolyum boyası ile verdiği reaksiyon sonucunda oluşan mor renkteki suda çözünmeyen formazan kristallerinin uygun çözücüde çözülerek absorbansının ölçümü esasına dayanan bir testtir. MTT testi sonucunda oluşan mor rengin koyuluğunun, canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Mosmann, 1983).

Çalışmamızda, MTT tozu, 5 mg/ml konsantrasyonda RPMI 1640 besiyerinde hazırlandı. Hücrelerin üzerindeki besiyeri atıldıktan sonra, 96'lık plakta her kuyuya 20 µl MTT çözeltisi ve 100 µl besiyeri eklenerek 37°C'de, CO2 inkübatöründe 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri-MTT karışımı atıldı ve her kuyuya 100 µl DMSO eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Daha sonra 550 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçüldü. Sodyum benzoat uygulanmayan hücrelerin absorbans değeri %100 canlılık olarak kabul edildi ve diğer hücre gruplarındaki canlılık bu değerden hareketle yüzde olarak hesaplandı.

2.4.4. Protein Miktar Tayini

Çalışmamızda kaspaz aktivite tayini ve western blot için kullanılacak örneklerin protein miktar tayini yapıldı (Bradford, 1976). Bu amaçla, 96 kuyulu plaklarda her kuyuya, 5 µl örnek ve 195 µl Bradford ayırıcı konuldu. Karanlıkta, 5 dakika, oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 595 nm'de absorbans ölçüldü. Örneklerin protein tayini, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standart BSA çözeltilerinden hareketle elde edilmiş olan standart BSA grafiğinden ve eşitliğinden hareketle yapıldı.

2.4.5. Kaspaz-3 Aktivitesi Tayini

Farklı dozlarda sodyum benzoat uygulanan ve uygulanmayan HCT116 kolon kanser hücreleri liziz edilerek sitozolik lizatları hazırlandı ve sitozolik ekstrede daha önce de belirtildiği şekilde Bradford yöntemine göre protein tayini yapıldı. Elde edilen lizatların 100 µg'ı, 2xReaksiyon Tamponu/DTT ve kaspaz-3'ün substratı olan DEVD-pNA ile 96'lık plakta 1 saatlik inkübasyona bırakıldıktan sonra oluşan kolorimetrik ürünün absorbansı 405 nm dalga boyunda ölçüldü. Sodyum benzoat uygulanmayan hücrelerin kaspaz-3 enzim aktivitesi 1 kat olarak kabul edildi ve sodyum benzoat uygulanan hücrelerdeki kaspaz-3 aktivitesi bu hücrelere göre kat değişimi olarak hesaplandı.

2.4.6. Annexin V-PE ve 7-AAD ile Apoptoz Tayini

Annexin V-PE, apoptotik hücreleri belirlemek için kullanılan ve fosfotidil serine diğer fosfolipidlere kıyasla yüksek ilgiyle bağlanan bir boyadır. Annexin V bağlanması kalsiyum bağımlıdır ve Annexin V boyama protokolünde ifade edilmiş en uygun kalsiyum ve tuz konsantrasyonlarında gerçekleşmektedir.

Hücreler 6'lık plaklara ekim yapılarak bir gecelik inkübasyona bırakıldılar. Ertesi gün etkileri belirlenecek olan sodyum benzoat ile 24 saatlik inkübasyona bırakıldılar. Bu inkübasyonun ardından kuyulardaki hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 1x bağlama tamponunda ml'de 10^6 hücre olacak şekilde karıştırıldılar. Bu solusyondan 100 µl alınarak üzerine 5 µl Annexin V-PE ve 5 µl 7-AAD eklendi. Hücreler çok hafifçe vortexlenerek 15 dakika oda ısısında inkübe edildiler. İnkübasyonun ardından hücrelerin üzerine 400 µl 1xbağlama tamponu eklendi ve 1 saat içinde akım sitometride ölçüm gerçekleştirildi.

Akım sitometri ölçüm sonuçlarına göre Annexin V-PE negatif ve 7-AAD negatif olan hücreler canlı, Annexin V-PE pozitif ve 7-AAD negatif olan hücreler erken apoptotik, Annexin V-PE pozitif ve 7-AAD negatif olan hücreler ise nekrotik

olarak değerlendirilmiştir. Sodyum benzoat uygulanan ve uygulanmayan hücrelerdeki bu popülasyonlar belirlenerek analiz edildiler.

2.4.7. NFkB Translokasyonu ve Bcl-2 İçin Western Blot Analizi

Sodyum benzoatın HCT116 kolon kanser hücrelerinde NFkB p65 proteininin çekirdeğe göçü ve Bcl-2 proteini üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla hücreler 6 kuyucuklu plaklara ekildiler, bir gece sonra sodyum benzoat ile inkübe edildiler. Sitozolik ekstre hazırlamak üzere, hücreler, PBS (phosphate buffered saline) ile 2 kez yıkanarak, yıkama işleminin ardından sitozolik-nükleer protein ekstraksiyon kiti kullanılarak parçalandılar. Örnekler 30 saniye 13,000 rpm de santrifüj edildikten sonra supernatanlar toplanarak protein konsantrasyonu Bradford Metodu ile saptanmıştır. Lizatlar, Western blot analizi gerçekleştirilmek üzere -80 ° C' ye kaldırılmıştır.

HCT116 hücre lizatları (20 µg protein), SDS-poliakrilamid jelde ayrıldıktan sonra, PVDF(poliviniliden florid) bir membrana 1 saat boyunca 100 V voltaj uygulanarak transfer edildiler ve membranlar transfer sisteminden çıkarıldıktan sonra apoptoz yolağında görevli olan anti-p65 ve Bcl-2 primer antikorları ile bir gece artı 4 derecede inkübe edildiler. Sonraki aşamada horseradish peroksidaz (HRP) ile konjuge sekonder antikorlar ile oda ısısında 1 saat inkübasyon yapıldı. Bu son inkübasyonun ardından, proteinler, kemilüminesans (ECL) ajanı ile görünür hale getirildikten sonra protein ekspresyonunun analizi yapıldı (Karabay ve ark., 2015).

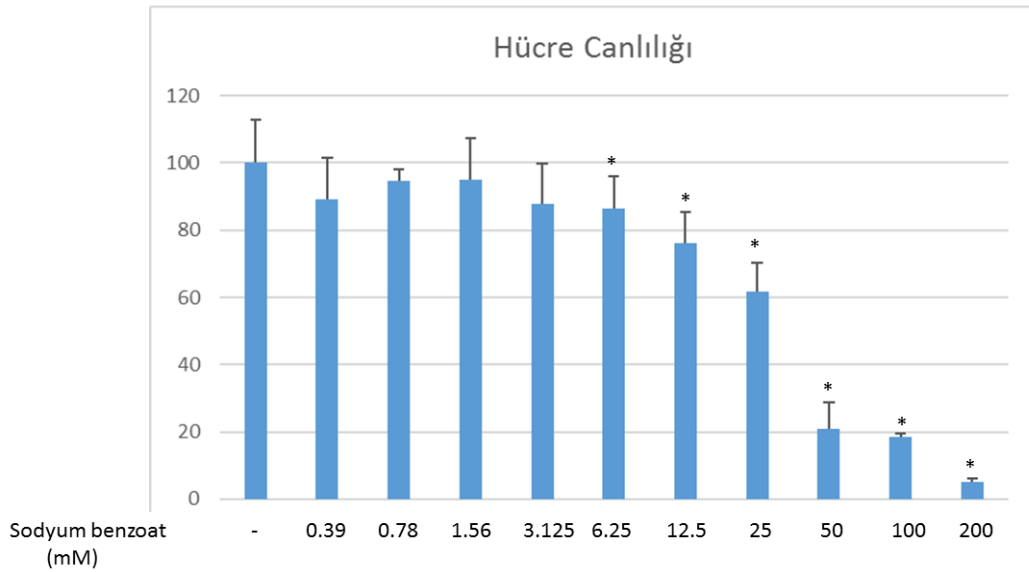
2.4.8. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri için StatistiXL istatistik programı ile One way Anova Varyans Analizi Testi kullanılmıştır. Birbirinden bağımsız en az üç denemeden elde edilen 3 tekrarlı sonuçlar kullanılmıştır.

3.BULGULAR

3.1. Sodyum Benzoatın HCT116 Kolon Kanseri Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi

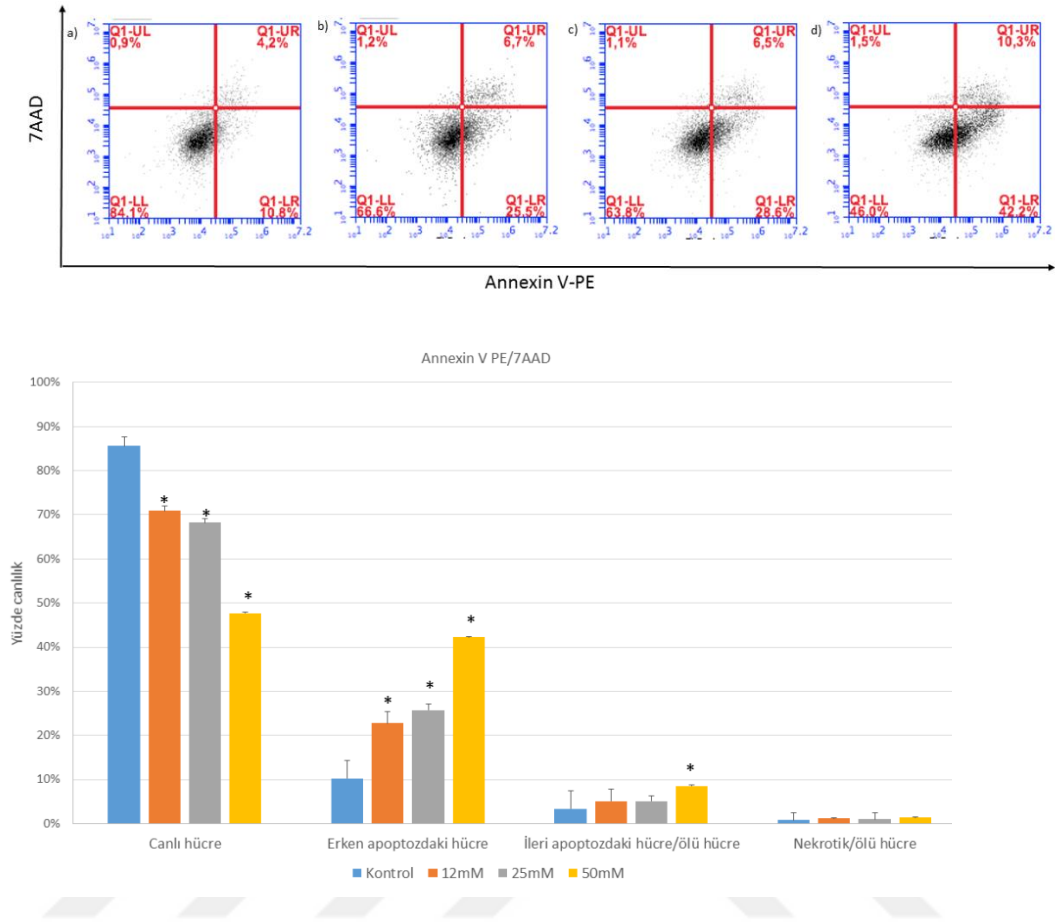
Sodyum benzoat 0.39 mM-200 mM konsantrasyon aralığında değişen dozlarda HCT116 kolon kanser hücrelerine 24 saat süreyle uygulandı. 24 saatlik inkübasyon sonucunda, sodyum benzoatın 6,25 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda, kolon kanser hücrelerinin canlılığını anlamlı olarak azalttığı belirlendi. 200 mM sodyum benzoatın hücre canlılığını %100 azalttığı bulundu (Şekil 3.1.). MTT testi sonucunda, sodyum benzoatın kolon kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin daha ayrıntılı olarak incelenebilmesi için doz aralığı 6.25 mM-50 mM olarak belirlendi.



Şekil 3.1. HCT116 kolon kanser hücrelerinde MTT testi ile hücre canlılık sonuçları. Hücreler 0.39 mM-200 mM konsantrasyon aralığındaki sodyum benzoatla 24 saat inkübe edildikten sonra MTT testi ile hücre canlılığı tayin edilmiştir. Sodyum benzoatın 6.25 mM- 200 mM arasındaki dozlarda hücre canlılığını doz bağımlı ve anlamlı olarak azalttığı belirlendi (* $p \leq 0.05$).

3.2. Sodyum Benzoatın HCT116 Kolon Kanser Hücrelerinin Apoptoz ve Nekrozu Üzerine Olan Etkileri

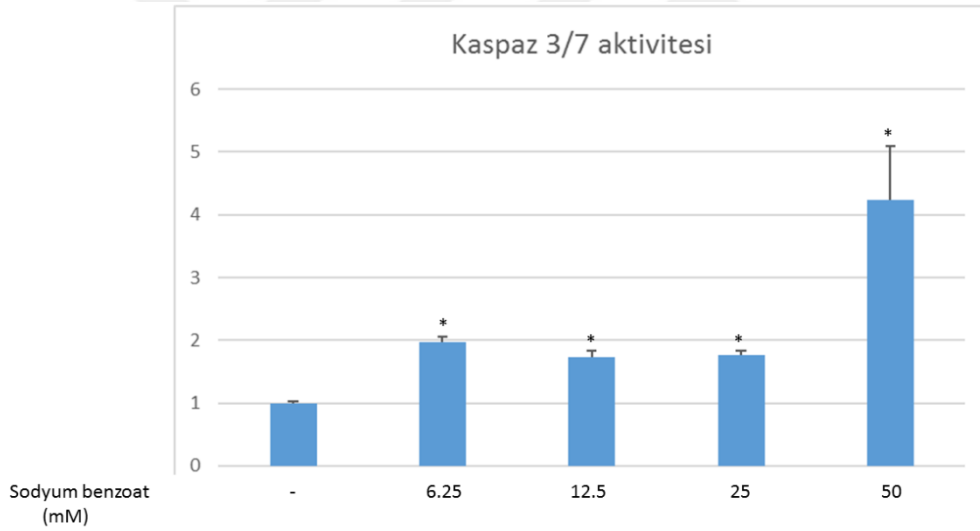
MTT testinin sonuçlarından hareketle, HCT116 kolon kanser hücreleri 6.25 mM-50 mM arasında değişen konsantrasyonlarda sodyum benzoatla 24 saat inkübe edildiler. 24 saatin sonunda hücreler toplanarak gerekli işlemlerden geçirildikten sonra akım sitometride apoptotik/nekrotik hücre oranları belirlendi (Şekil 3.2.). Sodyum benzoatın uygulanan bütün dozlarında canlı hücre sayısını sodyum benzoat uygulanmayan hücrelere göre anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak azalttığı ve erken apoptotik hücre sayısını anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak arttırdığı belirlendi. 50 mM konsantrasyondaki sodyum benzoatın ileri apoptotik hücre sayısını anlamlı olarak arttırdığı, nekrotik hücre sayısında anlamlı değişikliğe yol açmadığı belirlendi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Sodyum benzoatın HCT116 kolon kanser hücrelerinin apoptoz ve nekrozu üzerine olan etkileri. Hücreler 12.5 mM-50 mM konsantrasyon aralığındaki sodyum benzoatla 24 saat inkübe edildikten sonra akım sitometri ile canlı, apoptotik ve nekrotik hücre sayıları tayin edilmiştir. Sodyum benzoatın 12.5 mM-50 mM arasındaki dozlarda canlı hücre sayısını doz bağımlı ve anlamlı olarak azalttığı, aynı doz aralığında erken apoptotik hücre sayısını doz bağımlı ve anlamlı olarak artırdığı ve 50 mM sodyum benzoatın ileri apoptotik hücre sayısını sodyum benzoat uygulanmayan hücelere göre anlamlı olarak artırdığı belirlendi (* $p \leq 0.05$). Şeklin üst kısmındaki plot grafiği: a) Sodyum benzoat uygulanmayan HCT116 kolon kanser hücreleri, b) 12.5 mM sodyum benzoat, c) 25 mM sodyum benzoat, d) 50 mM sodyum benzoat uygulanan HCT116 kolon kanser hücreleri göstermektedir. Şeklin alt kısmındaki grafik, tekrarlı olarak elde edilen plotlardan toplanan verilerin ortalama ve standart sapmalarıyla gösterimidir.

3.3. Sodyum Benzoatın HCT116 Kolon Kanser Hücrelerinde Kaspaz 3/7 Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

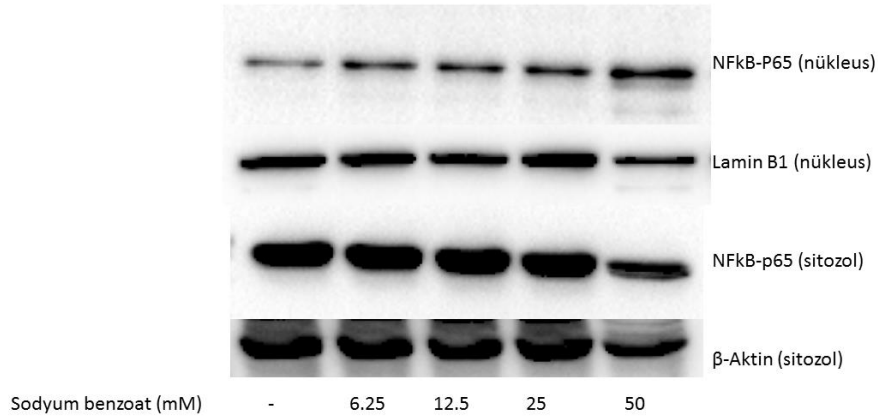
HCT116 kolon kanser hücreleri 6,25 mM-50 mM arasında değişen konsantrasyonlarda sodyum benzoatla 24 saat inkübe edildiler. 24 saatin sonunda hücreler toplanarak parçalandı ve eşit miktarda protein içeren lizatlar, 96 kuyulu plaklara ekildiler. Kaspaz-3/7 substratı Ac-DEVD-pNA ile 37 santigrat derecede inkübe edilen lizatlarda kaspaz 3/7 aktivitesi saptandı. Elde edilen bulgular, sodyum benzoatın 6.25 mM, 12.5 mM, 25 mM ve 50 mM konsantrasyonlarda kaspaz-3/7 enzim aktivitesini anlamlı ($*p \leq 0.05$) olarak arttırdığını ortaya koydu. Kaspaz 3/7 enzim aktivitesindeki en yüksek artış 50 mM sodyum benzoat uygulamasıyla elde edildi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. HCT116 kolon kanser hücrelerinde Kaspaz 3/7 aktivitesi. Hücreler 6.25-50 mM konsantrasyon aralığındaki sodyum benzoatla 24 saat inkübe edildikten sonra hücreler liziz edilerek kaspaz 3/7 aktivitesi tayin edilmiştir. Sodyum benzoatın bütün dozlarda kaspaz 3/7 aktivitesini sodyum benzoat uygulanmayan hücrelere göre anlamlı olarak arttırdığı belirlendi ($*p \leq 0.05$).

3.4. Sodyum Benzoatın HCT116 Kolon Kanser Hücrelerinde NFkB Translokasyonu Üzerindeki Etkileri

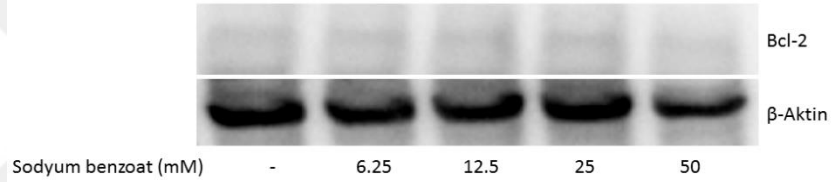
HCT116 kolon kanser hücreleri 6,25 mM-50 mM arasında değişen konsantrasyonlarda sodyum benzoatla 24 saat inkübe edildiler. 24 saatin sonunda hücreler toplanarak sitozolik ve nükleer proteinler izole edilerek eşit miktarda protein içeren lizatlar, SDS-PAGE’de elektroforeze tabi tutulduktan sonra jeller çıkarılarak membranlara aktarıldı. Membranlar, uygun primer ve sekonder antikorlarla inkübasyonun ardından kemilüminesans ajan kullanılarak CCD kamerada görüntülendiler. Sodyum benzoatın 6,25 mM-50 mM arasındaki dozlarda anlamlı olarak NFkB’nin sitozolden çekirdeğe göçünü arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. NFkB p65 proteininin sitozol ve nükleustaki protein düzeylerinin western blot sonucunda membrandaki görünümü. Sodyum benzoatın 6.25 mM-50 mM arasındaki konsantrasyonlarda NFkB-p65 proteininin nükleer translokasyonunu anlamlı olarak arttırdığı belirlenmiştir ($p \leq 0.05$).

3.5. Sodyum Benzoatın HCT116 Kolon Kanser Hücrelerinde Bcl-2 Proteinini Üzerindeki Etkileri

HCT116 kolon kanser hücreleri 6,25 mM-50 mM arasında değişen konsantrasyonlarda sodyum benzoatla 24 saat inkübe edildiler. 24 saatin sonunda hücreler toplanarak sitozolik ve nükleer proteinler izole edilerek eşit miktarda protein içeren lizatlar, SDS-PAGE’de elektroforeze tabi tutulduktan sonra jeller çıkarılarak membranlara aktarıldı. Membranlar, uygun primer ve sekonder antikorlarla inkübasyonun ardından kemilüminesans ajan kullanılarak CCD kamerada görüntülendiler. Sodyum benzoatın 6,25 mM-50 mM arasındaki dozlarda Bcl-2 proteinini üzerinde anlamlı değişiklik yaratmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Bcl-2 proteininin sitozol ve nükleustaki protein düzeylerinin western blot sonucunda membrandaki görünümü. Sodyum benzoatın 6.25 mM-50 mM arasındaki konsantrasyonlarda Bcl-2 proteininin düzeylerinde anlamlı değişiklik yaratmadığı belirlenmiştir.

4.TARTIŞMA

Sodyum benzoat, bakteriyostatik ve fungistatik özellikleri nedeniyle tüm dünyada çeşitli yiyecek preparatlarında yaygın olarak kullanılan koruyucu bir maddedir. FAO/WHO uzman komitesi, sodyum benzoatın vücut ağırlığı olarak kg başına 5 mg'lık günlük tüketimini güvenli olarak bildirmiştir. Ancak, araştırmalar sodyum benzoatın çok yüksek konsantrasyonlarda (2119 mg/kg) kullanıldığını göstermektedir (Dixit ve ark., 2008). İsveç fare modelinde, diyetle %4 sodyum benzoat kullanımının 5 hafta içinde ölüm ya da büyüme depresyonu ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Toth, 1984). Sodyum benzoatın karaciğer ağırlığını arttırdığı ve serum klinik parametrelerinde değişikliklere yol açarak hepatotoksisiteye yola açtığı, ancak kalp, dalak ve akciğer ağırlığını değiştirmediği gösterilmiştir (Fajitani, 1993). Sodyum benzoat, aynı zamanda üre bozuklukları, akut hepatik ensefalopati ve multipl skleroz gibi hastalıklar için tedavi edici bir ajan olarak da kullanılmaktadır (Branmachari ve Pahan, 2007; Sushma ve ark., 1992). FDA onaylı bir ilaç olan Ucephan, çocuklardaki üre döngüsü bozukluğu gibi hiperammonemi ile ilişkili hepatik metabolik defektlerin tedavisi için kullanılmaktadır (Gropman ve ark., 2007; Scaglia ve ark., 2004). Sodyum benzoatın küçük bir miktarının insanda idrarla dışarı atıldığı rapor edilmiştir (Bridges ve ark., 1970; Kubota ve ark., 1991). Bunun yanı sıra non-toksik olduğuna ve içme suyunda kullanılabileceğine ve içme suyunda %2 sodyum benzoatın farelerde yaşam boyunca gözlenen yan etki sergilemediği bildirilmiştir (Toth, 1984). Son yıllarda diyet katkı maddelerinin kanser üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalar dikkat çekmektedir. Sodyum benzoatın kolon kanseri üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmaya ise literatürde rastlanmamıştır. Çalışmamızda sodyum benzoatın, HCT116 kolon kanser hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda sodyum benzoatın 6.25 mM ve 200 mM arasındaki konsantrasyonlarda HCT116 kolon kanser hücrelerinin canlılığını anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir. Literatürde, sodyum benzoatın splenositler üzerindeki

etkilerinin incelendiği bir çalışmada 6.9 mM sodyum benzoatın splenositler için en yüksek non-toksik doz olduğu belirlenmiş ve T ve B hücrelerindeki etkileri için bu doz seçilmiştir (Yadav ve ark., 2016). Bir başka çalışmada ise, sodyum benzoatın fare mikrogliya hücrelerinde 0.2 mM-2 mM arasında değişen dozlarda LPS ile indüklenen iNOS bağımlı nitrit düzeyini azalttığı bildirilmiştir (Brachmachari ve ark., 2009). Ancak bu çalışmalar, sodyum benzoatın anti-enflamatuvar ve immün sistem hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlendiği çalışmalar olup, sodyum benzoatın non-sitotoksik dozlardaki etkileri değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, sodyum benzoatın 6.25 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda, sodyum benzoat ile tedavi edilmemiş HCT116 hücrelerine göre anlamlı olarak kaspaz-3 aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Akım sitometri sonuçlarına göre, sodyum benzoatın uygulanan bütün dozlarında canlı hücre sayısını sodyum benzoat uygulanmayan hücrelere göre anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak azalttığı ve erken apoptotik hücre sayısını anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak arttırdığı belirlenmiştir. Bunun yanında, 50 mM konsantrasyondaki sodyum benzoatın ileri apoptotik hücre sayısını anlamlı olarak arttırdığı, nekrotik hücre sayısında anlamlı değişikliğe yol açmadığı belirlendi. Bu bulgular, sodyum benzoatın 6.25 mM ve üzerindeki dozlarda HCT116 kolon kanser hücrelerinde apoptozu uyardığını ortaya koymaktadır. Literatürde sodyum benzoatın kolon kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır ve bu çalışma ile sodyum benzoatın apoptotik etkileri ilk kez ortaya konulmaktadır.

Çalışmamızda, ayrıca sodyum benzoatın, hücre proliferasyonu ve apoptozun kontrolünde hayatsal role sahip NFkB transkripsiyon faktörü üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Elde ettiğimiz bulgular, sodyum benzoatın 6.25 mM-50 mM konsantrasyonlar arasında NFkB'nin çekirdeğe göçünü anlamlı olarak arttırdığı belirlenmiştir. NFkB aktivasyonunun, Bcl-2 aile üyelerini ve kaspaz inhibitörlerini uyararak apoptozu inhibe ettiği (Lin ve Karin, 2007), proteozom inhibisyonu yoluyla Ikb α proteininin akümüülasyonunun, antiapoptotik NFkB'nin aktivasyonunu engellediği ve böylece tümör hücresinde apoptozun gerçekleştiği bildirilmiştir (Biswas ve Iglehart, 2006). Bu çalışmalar, NFkB aktivasyonunun özellikle, anti-

apoptotik olarak davrandığını ortaya koymakta ve NFkB inhibisyonunun anti-kanser etkiler sergileyebileceği ve kanser için bir hedef olabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak, literatürde, bazı ilaçların apoptotik etkilerini NFkB aktivasyonu ile gerçekleştirdiğine dair çalışmalar da bulunmaktadır. Aspirinin HT29 hücrelerinde apoptoz indükleyici etkilerine NFkB aktivasyonunun aracılık ettiği rapor edilmiştir (Stark ve ark., 2007). NFkB'nin pro ya da anti-apoptotik fonksiyonunun, apoptotik uyarının doğası tarafından belirlendiği de bildirilmiştir (Kaltschmidt ve ark., 2000). 2000 yılında yapılmış olan bir başka çalışmada ise, p53 indüksiyonunun, p53'ün apoptozu indükleme yeteneği ile korele olarak NFkB transkripsiyon faktörü aktivasyonunu arttırdığı ve NFkB aktivasyonunun kaybı ya da inhibisyonunun, p53 bağımlı hücre ölümünü engellediği bildirilmiştir (Ryan ve ark., 2000). NFkB aktivasyonunun, insan prostat kanser hücrelerinde antimitotik ilaçlar tarafından gerçekleştirilen hücre ölümünü arttırdığı belirlenmiştir (Parrondo ve ark., 2010). Bu çalışmaların yanısıra, askorbil stearatın apoptotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bu ajanın HeLa servikal kanser hücrelerini mitokondriyal membran permeabilitesinde değişiklik, sitokrom c salımı ve kaspaz 3 ve NF-kB aktivasyonu aracılığıyla kanser hücrelerini apoptoza indüklediği bildirilmiştir (Mane ve ark., 2016). Bir başka çalışmada ise arsenitin 16-HBE hücre serisinde NFkB aktivitesinde artışa yol açarak apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2015). Bu tez çalışmasında da benzer şekilde, sodyum benzoatın sitotoksik ve apoptoz indükleyici konsantrasyonlarında NFkB'nin sitozolden çekirdeğe translokasyonunu ve dolayısıyla aktivasyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Bizim de çalışmamızda elde ettiğimiz, sodyum benzoatın NFkB aktive edici etkisinin apoptozun indüksiyonuna aracılık etmiş olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, sodyum benzoatın NFkB'nin hedefleri arasında bulunan Bcl-2 proteini üzerindeki etkileri de belirlenmiş ve bu proteinin düzeyinde anlamlı değişiklik saptanmamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. HCT116 kolon kanser hücrelerinin 6.25 mM-50 mM konsantrasyon aralığındaki sodyum benzoat ile inkübasyonu sonucunda, hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı belirlendi.
2. Akım sitometri analizi sonucunda, sodyum benzoatın HCT116 kolon kanser hücrelerinin canlılığını azaltıcı etkisini apoptoz aracılığıyla gerçekleştirdiği belirlendi.
3. Sodyum benzoatın 6.25 mM-50 mM konsantrasyon aralığında kaspaz 3/7 enzim aktivitesinin anlamlı olarak arttırdığı belirlendi. Sodyum benzoatın kaspaz 3/7 enzim aktivitesini en fazla arttırdığı doz 50 mM olarak belirlenmiştir.
4. Sodyum benzoatın, apoptozda görev alan NFkB proteininin sitozolden çekirdeğe göçü üzerinde ise aktive edici etkiler sergilediği ve apoptotik etkileri üzerinde NFkB aktive edici etkilerinin de rol alabileceği belirlenmiştir.
5. Sodyum benzoatın 6.25 mM-50 mM arasındaki dozlarda Bcl-2 proteinini üzerinde anlamlı değişiklik yaratmadığı belirlenmiştir.
6. Sodyum benzoatın apoptotik etki mekanizmasına yönelik yeni çalışmaların ve sodyum benzoatın NFkB arttırıcı etkisinden hareketle, NFkB ilişkili yolların sodyum benzoat uygulanmasıyla ne şekilde değiştiği de ileri çalışmalar için önerilebilir.

ÖZET

Sodyum Benzoatın HCT116 Kolon Kanseri Hücrelerinde Canlılık Üzerine Etkisi

Günümüze kadar, sodyum benzoatın biyolojik rollerine ilişkin çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda sodyum benzoatın glial hücrelerde, astrositlerde ve peritoneal makrofajlarda anti-inflamatuvar etkiler gösterdiği; nörodejeneratif hastalıklarda nörotropik faktörleri uyararak oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir. Sodyum benzoatın anti-inflamatuvar etkilerine aracılık eden yollar arasında NFkB yolağının inhibisyonu da yer almaktadır. NFkB, hücre proliferasyonunun regülasyonu, hücrenin sağ kalımı, kemoterapiye direnç oluşumu, metastaz, anjiyogenez gibi çok sayıdaki biyolojik olguda görev yapan bir transkripsiyon faktörüdür. Hücresel streslere yanıt olarak aktive olduğunda sitozolden nukleusa göç ederek, burada hücrenin kaderini belirleyecek çok çeşitli genlerin ekspresyonunu uyarmaktadır. Aralarında kolon kanserinin de yer aldığı pek çok kanser tipinde NFkB' nin aktive olduğu bildirilmiş ve bu aktivasyon kanserle ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle NFkB' nin hedeflenmesi anti kanser terapiler için önemli bir yaklaşım oluşturmaktadır. Diğer taraftan, NFkB aktivasyonuna paralel olarak apoptoz indüksiyonunun gerçekleştiği çeşitli kanser hücre modellerinin varlığı ve bunun yanı sıra NFkB aktivasyonunun uyarıcı tipine bağlı olarak anti ya da pro apoptotik etkiler sergileyebildiği de bildirilmiştir. Bütün bu bilgilerden hareketle, sodyum benzoatın HCT116 kolon kanser hücre ölümü üzerindeki etkileri NFkB proteini ve bu proteinin hedefleri arasında yer alan Bcl-2 üzerinden araştırılmıştır. HCT116 kolon kanser hücrelerinin 6.25 mM-50 mM konsantrasyon aralığındaki sodyum benzoat ile inkübasyonu sonucunda, hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı, kaspaz 3/7 enzim aktivitesinin anlamlı olarak arttığı ve apoptotik hücrelerin sayısının anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir. Sodyum benzoatın, apoptozda görev alan NFkB proteininin sitozolden çekirdeğe göçü üzerinde ise aktive edici etkiler sergilediği ve apoptotik etkileri üzerinde NFkB aktive edici etkilerinin de rol alabileceği belirlenmiştir. Sodyum benzoatın 6.25 mM-50 mM arasındaki dozlarda Bcl-2 proteini üzerinde anlamlı değişiklik yaratmadığı belirlenmiştir. Sodyum benzoatın apoptotik etki mekanizması ve etkilerine aracılık eden NFkB ilişkili yolların belirlenmesi de ileri çalışmalar için önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: HCT116, kolon kanseri, sodyum benzoat, apoptoz

SUMMARY

The effects of benzoic acid on HCT116 colon cancer cell viability

Until now, various *in vitro* and *in vivo* studies have been made investigating the biological roles of benzoic acid. In these studies, sodium benzoate has been shown to exert anti-inflammatory actions in glial cells, astrocytes and peritoneal macrophages, inhibit oxidative stress by inducing neurotrophic factors in neurodegenerative diseases and possess beneficial effects in learning and memory functions. NFkB is a transcription factor which mediates various biological processes such as the regulation of cell proliferation, survival, resistance to chemotherapy, metastasis and angiogenesis. Upon activation, NFkB translocates to the nucleus to induce the expression of various genes which determine cell fate. NFkB has been reported as constitutively active and dysregulated in various types of cancer and this activation has been linked with cancer. Therefore, targeting NFkB is an important approach for anti-cancer therapies. Colon cancer is one of the cancer types which exhibits constitutive NFkB activation and various agents have been shown to decrease colon cancer cell viability by targeting NFkB. However, in some colon cancer cell lines, it was shown that NFkB activation can also modulate, induce and accompany apoptosis. Since sodium benzoate has been shown to inhibit NFkB in different cell types and NFkB is closely related to inflammation and cancer, it is thought that sodium benzoate may effect the viability of colon cancer cells. In our knowledge, the effects of sodium benzoate on colon cancer cells have not been investigated until now. In this study, the effects of sodium benzoate were examined on colon cancer cells. HCT116 colon cancer cells were incubated with different concentrations of sodium benzoate for different time intervals and after incubations, it was found that sodium benzoate diminished cell viability and induced apoptosis of HCT116 colon cancer cells at 6.25 mM-50 mM concentration range. Increased caspase 3 activity and NFkB translocation from cytosol to nucleus accompanied apoptosis of cells. We could not find significant change in Bcl-2 expression after sodium benzoate treatment. Our results showed that sodium benzoate induced apoptosis and activated NFkB in HCT116 cells and further research is needed to explore its effects on colon cancer cells via NFkB modulation.

Key Words: HCT116, colon cancer, sodium benzoate, apoptosis

KAYNAKLAR

- ABD EL-MAWLA AM, SCHMIDT W, BEERHUES L (2001). Cinnamic acid is a precursor of benzoic acids in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. but not in cell cultures of *Centaureum erythraea* RAFN. *Planta*, **212**: 288–293.
- AFFARA NI, COUSSENS LM (2007). IKKalpha at the crossroads of inflammation and metastasis. *Cell*, **129**:25–6.
- AGGARWAL BB (2004). Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*, **6**:203–8.
- ALBECK JG, BURKE JM, ALDRIDGE BB, ZHANG M, LAUFFENBURGER DA, SORGER PK (2008). Quantitative analysis of pathways controlling extrinsic apoptosis in single cells. *Mol Cell*, **30**: 11–25.
- ALNEMRI ES, LIVINGSTON DJ, NICHOLSON DW, et al. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**:171. PubMed doi:10.1016/S0092- 8674(00)81334-3.
- ALTUĞ T (1999). Gıda Katkı Maddeleri, *Hekim ve Yaşam Dergisi*, **6**: 29-31.
- AMUNDSON SA, MYERS TG, FORNACE AJ JR (1998). Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* **17**: 3287–3299.
- ARAKI Y, OKAMURA S, HUSSAIN SP, NAGASHIMA M, HE P, SHISEKI M, MIURA K, HARRIS CC (2003). Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer Res.*, **63**: 728–734.
- ASHKENAZI A, DIXIT VM (1998). Death receptors: Signalling and modulation. *Science*, **281**: 1305 – 8. PubMed doi:10.1126/science.281.5381.1305.
- BABY J, PICKERING BF, VASHISHT GOPAL, YN, VAN DYKE, MW (2007). Constitutive and inducible nuclear factor-kappaB in immortalized normal human bronchial epithelial and non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Lett*, **255**: 85–94.
- BAIG-LEWIS S, PETERSON-NEDRY W, WEHRLI M (2007). Wingless/Wnt signal transduction requires distinct initiation and amplification steps that both depend on Arrow/LRP. *Dev Biol*. **306**:94–11.
- BAKSHI A, JENSEN JP, GOLDMAN P, WRIGHT JJ, MCBRIDE OW, EPSTEIN AL. et al. (1985) Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*, **41**: 899–906.
- BALDI A, SANTINI D, RUSSO P, CATRICALÀ C, AMANTEA A, PICARDO M, TONINI G (2004). Analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression. *Experimental Dermatology*, **13**(2): 93-97.
- BALKWILL F, MANTOVANI A (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, **357**: 539–545.
- BAN JO, JUNG YS, KIM DH, PARK KR, YUN HM, LEE NJ, et al. (2014). (E)-2,4-Bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal inhibits tumor growth via suppression of NF-kappaB and

induction of death receptor 6. *Apoptosis : An International Journal On Programmed Cell Death*. 19(1):165–178.

BAN JO, LEE HS, JEONG HS, SONG S, HWANG BY, MOON DC, et al. (2009a). Thiacremonone augments chemotherapeutic agent-induced growth inhibition in human colon cancer cells through inactivation of nuclear factor- κ B. *Molecular cancer research, MCR*. 7(6):870–879.

BAN JO, OH JH, HWANG BY, MOON DC, JEONG HS, LEE S, et al. (2009b). Inflexinol inhibits colon cancer cell growth through inhibition of nuclear factor- κ B activity via direct interaction with p50. *Mol Cancer Ther*. 8(6):1613–1624.

BARON JA, BEACH M, MANDEL JS, VAN STOLK RU, HAILE RW, SANDLER RS, ROTHSTEIN R, SUMMERS RW, SNOVER DC, BECK GJ, BOND JH, GREENBERG ER (1999). Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. Calcium Polyp Prevention Study Group. *N Engl J Med.*, 340:101–107.

BASERGA R, PERUZZI F, REISS K (2003). The IGF-1 receptor in cancer biology. *International Journal of Cancer*, 107(6): 873–877.

BASU S, ROSENZWEIG KR, YOUMELL M, PRICE BD (1998). The DNA-dependent protein kinase participates in the activation of NF κ B following DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun*, 247: 79–83.

BAUD V, KARIN M (2009). Is NF- κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*, 8: 33–40.

BAZAN NG, LUKIW WJ (2002). Cyclooxygenase-2 and presenilin-1 gene expression induced by interleukin-1 β and amyloid β 42 peptide is potentiated by hypoxia in primary human neural cells. *J. Biol. Chem*. 277: 30359–30367.

BEG AA, SHA WC, BRONSON RT, GHOSH S, BALTIMORE D (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature*, 376: 167–170.

BEROUKHIM R et al. (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 463: 899–905.

BHOJ VG, CHEN ZJ (2009). Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 458: 430–437.

BISWAS DK, IGLEHART JD. (2006). Linkage between EGFR family receptors and nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling in breast cancer. *J Cell Physiol*, 209: 645–52.

BOATRIGHT KM, SALVESEN GS (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. 6:725–731.

BODE AM, DONG Z (2004). Post translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4:793–805.

BRAHMACHARI S, JANA A, PAHAN K (2009). Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, reduces microglial and astroglial inflammatory responses. *The Journal of Immunology*, 183(9): 5917–5927.

BRAHMACHARI S, PAHAN K (2007). Sodium benzoate, a food additive and a metabolite of cinnamon, modifies T cells at multiple steps and inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*, 179(1):275–83.

- BRASIER AR (2006). "The NF-kappaB regulatory network". *Cardiovascular Toxicology* 6 (2): 111–30.
- BRATTON DL, FADOK VA, RICHTER DA, KAILEY JM, GUTHRIE LA, HENSON PM (1997) Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272(42):26159–26165.
- BRATTON SB, SALVESEN GS (2010). Regulation of the Apaf-1- caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci*, 123: 3209–3214.
- BRENNER D, MAK TW (2009) Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21(6):871–877.
- BRIDGES JW, FRENCH MR, SMITH RL, WILLIAMS RT (1970). The fate of benzoic acid in various species. *Biochem. J.* 118: 47–51. 12. Kubota, K., and T. Ishizaki. 1991. Dose-dependent pharmacokinetics of benzoic acid following oral administration of sodium benzoate to humans. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 41: 363–368.
- BRUNELLE JK, LETAI A (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* 122(Pt 4):437–441.
- BUCUR O, NAT R, CRETOIU D, POPESCU LM (2001). Phagocytosis of apoptotic cells by microglia in vitro. *J Cell Mol Med.* 5:438- 441.
- BUDRAM-MAHADEO V, MORRIS PJ, LATCHMAN DS (2002). The Brn-3a transcription factor inhibits the pro-apoptotic effect of p53 and enhances cell cycle arrest by differentially regulating the activity of the p53 target genes encoding Bax and p21(CIP1/Waf1). *Oncogene*, 21:6123–31.
- CAAMANO JH, RIZZO CA, DURHAM SK, BARTON DS, RAVENTOS-SUAREZ C, SNAPPER CM, BRAVO R (1998). Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J Exp Med*, 187: 185–196.
- CAIRRA~ O, Fa`TIMA, DOMINGOS PM (2010). Apoptosis:Molecular Mechanisms. In: *Encyclopedia of Life Sciences* (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. doi: 10.1002/9780470015902.a0001150.pub2
- CALANDRA G, BRIDGER G, FRICKER S (2010). CXCR4 in clinical hematology. *Curr Top Microbiol Immunol* 341: 173–191.
- CAMPBELL KJ, BATH ML, TURNER ML, VANDENBERG CJ, BOUILLET P, METCALF D, SCOTT CL, CORY S (2010) Elevated Mcl-1 perturbs lymphopoiesis, promotes transformation of hematopoietic stem/progenitor cells, and enhances drug resistance. *Blood*: 116: 3197–3207.
- CARR AM (2000). Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle. *Science*, 287:1765–6.
- CARUSO MG, NOTARNICOLA M (2005). Biochemical changes of mevalonate pathway in human colorectal cancer. *Anti cancer Res*, 25: 3393–7.
- CENTER MM, JEMAL A, WARD E (2009). International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:1688–94.
- CERTO M, MOORE VDG, NISHINO M, et al (2006) Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9(5):351–365.

- CHEN C, GU S, JIANG X, ZHANG Z (2015). Nuclear translocation of nuclear factor kappa B is regulated by G protein signaling pathway in arsenite-induced apoptosis in HBE cell line. *Environ Toxicol.* Aug 25. doi: 10.1002/tox.22183.
- CHENG EH, SHEIKO TV, FISHER JK, CRAIGEN W, KORSMEYER SJ (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* **301**: 513–517.
- CHENG WC, LEACH KM, HARDWICK JM (2008) Mitochondrial death pathways in yeast and mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1783**(7):1272–1279.
- CHIPUK JE, BOUCHIER-HAYES L, GREEN DR (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ*, **13**: 1396-402.
- CHIPUK JE, KUWANA T, BOUCHIER-HAYES L, et al (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303, 1010-4.
- CHO E, SMITH-WARNER SA, RITZ J, van den BRANDT PA, COLDITZ GA, FOLSOM AR, FREUDENHEIM JL, GIOVANNUCCI E, GOLDBOHN RA, GRAHAM S, et al. (2004). Alcohol intake and colorectal cancer: A pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann. Intern. Med.* **140**: 603–613.
- CLEMMONS DR (1998). Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions, *Mol. Cell. Endocrinol.* **140**(1): 19–24.
- COLBERT LH, HARTMAN TJ, MALILA N, LIMBURG PJ, PIETINEN P, VIRTAMO J, TAYLOR PR, ALBANES D (2001). Physical activity in relation to cancer of the colon and rectum in a cohort of male smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **10**: 265–268.
- COLDITZ GA, CANNUSCIO CC, FRAZIER AL (1997). Physical activity and reduced risk of colon cancer: Implications for prevention. *Cancer Causes Control*, **8**: 649–667.
- COLOTTA F, ALLAVENA P, SICA A, GARLANDA C, MANTOVANI A (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, **30**: 1073–1081.
- CONLON I, RAFF M (1999). Size control in animal development. *Cell* **96**: 235 – 44. PubMed doi:10.1016/S0092-8674(00)80563-2.
- CORNEJO MG, BOGGON TJ, MERCHER T (2009). JAK3: A two-faced player in hematological disorders. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**: 2376–2379.
- CORY S, ADAMS JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**(9):647–656.
- CORY S, HUANG DC, ADAMS JM (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, **22**: 8590 – 607. PubMed doi:10.1038/sj.onc.1207102.
- CRAGG MS, HARRIS C, STRASSER A, SCOTT CL (2009). Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics. *Nat Rev Cancer*, **9**: 321–326.
- CZABOTAR PE, LESSENE G, STRASSER A, et al (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **15**: 49-63.
- ÇALIŞIR Z, ÇALIŞKAN D (2003). Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. *J. Fac. Pharm, Ankara*, **32**(3): 193-206, 2003.

- DALE E, DAVIS M, FAUSTMAN DL (2006). A role for transcription factor NF- κ B in autoimmunity: possible interactions of genes, sex, and the immune response. *Advances in Physiology Education*, 30(4): 152-158.
- DAN HC, COOPER MJ, COGSWEL PC, DUNCAN JA, TING JP, BALDWIN AS (2008). Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev*, 22: 1490–1500.
- DANIAL NN (2007). BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical Cancer Research*, 13(24): 7254-7263.
- DANIAL NN, KORSMEYER SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell*. 116:205-219.
- DAVENPORT DJ, ROUDEBUSH P (2006). The use of nutraceuticals in cancer therapy. *NAVC Proc Small Animal-Oncol* 20:7–11.
- de VISSER KE, EICHTEN A, COUSSENS LM (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6: 24–37.
- DEEB SJ, EL-BABA CO, HASSAN SB, LARSSON RL, GALI-MUHTASIB HU, et al. (2011). Sage components enhance cell death through nuclear factor κ B signaling. *Front Biosci (Elite Ed)*. Jan 3: 410-20.
- DEGTEREV A, BOYCE M, YUAN JY (2003). A decade of caspases. *Oncogene*. 22:8543-8567.
- DENTON D, NICOLSON S, KUMAR S (2012) Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Diff*, 19(1):87–95.
- DONALDSON MS (2000). Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J*, 3:19–21.
- EGLE A, HARRIS AW, BOUILLET P, CORY S (2004b) Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6164–6169.
- ELMORE S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35: 495-516.
- EMON S, ORAKDOGEN M, USLU S, SOMAY H (2015). Yaygın olarak kullanılan gıda katkı maddelerinden sodyum benzoatın tavuk embriyosunda nöral tüp gelişimi üzerine etkileri. *Turkish Neurosurgery*, 2: 294-297.
- ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K, IWAMATSU A, NAGATA S (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391:43 – 50. PubMed doi:10.1038/ 34112.
- ERLACHER M, MICHALAK EM, KELLY PN, LABI V, NIEDEREGGER H, COULTAS L, et al. (2005). BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood*, 106: 4131–4138.
- FADOK VA, CHIMINI G (2001) The phagocytosis of apoptotic cells. *Sem Immunol* 13(6):365–372.
- FANIDI A, HARRINGTON EA, EVAN GI (1992). Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* 359: 554–556.
- FANTINI MC, PALLONE F (2008). Cytokines: from gut inflammation to colorectal cancer. *Curr Drug Targets*, 9(5):375–380.

- FERRARI P, JENAB M, NORAT T, MOSKAL A, SLIMANI N, OLSEN A, TJØNNELAND A, OVERVAD K, JENSEN MK, BOUTRON-ROUULT MC, et al. (2007). Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int. J. Cancer* **121**: 2065–2072.
- FINLEY JW, DAVIS CD, FENG Y (2000). Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. *J Nutr* **130**:2384–9.
- FOREMAN KE, WRONE-SMITH T, BOISE LH, THOMPSON CB, POLVERINI PJ, SIMONIAN PL, NUNEZ G, NICKOLOFF BJ (1996). Kaposi's sarcoma tumor cells preferentially express Bcl-xL *Am J Pathol.* **149**: 795-803.
- FRENZEL A, LABI V, CHMELEWSKI W, PLONER C, GELEY S, FIEGL H et al (2010). Suppression of B-cell lymphomagenesis by the BH3-only proteins *Bmf* and *Bad*. *Blood.* **115**: 995–1005.
- FUCHS CS, WILLETT WC, COLDITZ GA, HUNTER DJ, STAMPFER MJ, SPEIZER FE, GIOVANNUCCI EL (2002). The influence of folate and multivitamin use on the familial risk of colon cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **11**: 227–234.
- FUCHS Y, STELLER H (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell.* **147**: 742–758.
- FUJITANI T (1993). Short-term effect of sodium benzoate in F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicol Lett.* **69(2)**:171-9.
- FULDA S (2009). Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. *Leukemia.* **23**:467-476.
- FULDA S (2009). Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer.* **124**:515-515.
- FULDA S (2015). Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Sem Cancer Biol.* **31**:84-88.
- FULDA S, DEBATIN KM (2003). Death receptor signaling in cancer therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* **3**: 253-262.
- FULDA S, GORMAN AM, HORI O, SAMALI A (2010). Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol* 214074.
- FULDA S, MEYER E, DEBATIN KM (2000). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene.* **21**:2283- 2294.
- GALLUZZI L, MORSELLI E, KEPP O, et al (2010). Mitochondrial gateways to cancer. *Mol Asp Med,* **31(1)**:1–20.
- GALLUZZI L, MORSELLI E, KEPP O, KROEMER G (2009). Targeting postmitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1787(5)**:402–413.
- GANDOUR-EDWARDS R, MACK PC, DEVERE-WHITE RW, GUMERLOCK PH (2004). Abnormalities of apoptotic and cell cycle regulatory proteins in distinct histopathologic components of benign prostatic hyperplasia. *Prost Cancer Prost Dis.* **7**:321-326.
- GARLAND C, SHEKELLE RB, BARRETT-CONNOR E, CRIQUI MH, ROSSOF AH, PAUL O (1985). Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer: a 19-year prospective study in men. *Lancet* **1**:307–309.

- GERSON M (1978). The cure of advanced cancer by diet therapy: a summary of 30 Years of clinical experimentation. *Physiol Chem Phys* **10**:449–64.
- GHOSH S, HAYDEN MS (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* **8**: 837–48.
- GIAM M, HUANG DC, BOUILLET P (2008). BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* **27**(Suppl 1), S128–S136.
- GILMORE TD (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways perspectives. *Oncogene* **25**(51): 6680–4.
- GILMORE TD, KALAITZIDIS D, LIANG MC, STARCZYNOWSKI DT (2004). The c-Rel transcription factor and B-cell proliferation: a deal with the devil. *Oncogene* **23**: 2275–2286.
- GIMENEZ-BONAFE P, TORTOSA A, PEREZ-TOMAS R (2009). Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Curr Cancer Drug Targ*, **9**:320-340.
- GIOVANNUCCI E, RIMM EB, STAMPFER MJ, COLDITZ GA, ASCHERIO A, WILLETT WC (1994). Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* **121**:241–246.
- GOLDSTEIN JC, WATERHOUSE NJ, JUIN P, EVAN GI, GREEN DR (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*, **2**: 156–162.
- GOLSTEIN P (1998). Cell death in us and others. *Science* **281**: 1283.
- GREEN DR, EVAN GI (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell*, **1**: 19-30.
- GREEN DR, KROEMER G (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**:626-629.
- GREENBERG ER, BARON JA, TOSTESON TD, FREEMAN DH, BECK GJ, BOND JH, COLACCHIO TA, COLLIER JA, FRANKL HD, HAILE RW (1994). A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. Polyp Prevention Study Group. *N Engl J Med* **331**:141–147.
- GREENLEE RT, HILL-HARMON MB, MURRAY T, THUN M (2001). Cancer statistics, *CA Cancer J Clin* **51**:15–36.
- GREENLEE RT, MURRAY T, BOLDEN S, WINGO PA (2000). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, **50**:7– 33.
- GRIVENNIKOV S, KARIN E, TERZIC J, MUCIDA D, YU GY, VALLABHAPURAPU S, SCHELLER J, ROSE-JOHN S, CHEROUTRE H., ECKMANN L, et al. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* **15**: 103–113.
- GRIVENNIKOV S, KARIN M (2008). Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? *Cancer Cell* **13**: 7–9.
- GUICCIARDI ME, GORES GREGORY J (2009). Life and death by death receptors, *FASEB J*. **23**:1625-1637.
- GUO LD, CHEN XJ, HU YH, YU ZJ, WANG D, LIU JZ (2013). Curcumin inhibits proliferation and induces apoptosis of human colorectal cancer cells by activating the mitochondria apoptotic pathway. *Phytother. Res.* **27**: 422–430.

- GUPTA S, KASS GE, SZEGEZDI E, JOSEPH B (2009). The mitochondrial death pathway: a promising therapeutic target in diseases. *J Cell Mol Med* **13**(6):1004–1033.
- GUSTAFSSON AB, GOTTLIEB RA (2008). Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc Res* **77**(2):334–343.
- HACKER G (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* **301**:5-17.
- HAHN E, KRAUS S, ARBER N (2010). Role of cyclooxygenase-2 in pathogenesis and prevention of colorectal cancer. *Dig. Dis.* **28**: 585–589.
- HAKAMA M (1998). Chemoprevention of cancer. *Acta Oncol* **37**:227–230.
- HAMPTON MB, ORRENIUS S (1998). Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* **8**:1 – 5. PubMed doi:10.1002/biof.5520080101.
- HAN JY, HONG EK, CHOI BG, PARK JN, KIM KW, KANG JH, JIN JY, PARK SY, HONG YS, LEE KS (2003). Death receptor 5 and Bcl-2 protein expression as predictors of tumor response to gemcitabine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancers. *Med Oncol.* **20**:355-362.
- HANAHAN D, WEINBERG RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* **144**:646-674.
- HANAHAN D, WEINBERG, RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57–70.
- HASSEN S, ALI N, CHOWDHURY P (2012). Molecular signaling mechanisms of apoptosis in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *World J Gastrointest Pathophysiol*, **3**: 71-9.
- HE ZY, SHI CB, WEN H, LI FL, WANG BL, WANG J (2011). Upregulation of p53 expression in patients with colorectal cancer by administration of curcumin. *Cancer Invest.* **29**: 208–213.
- HEINRICH M, ROBLES M, WEST JE (1998). Ortiz de Montellano BR, Rodriguez E. Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (Compositae). *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**:539–65.
- HENGARTNER MO (2000). Apoptosis: corralling the corpses. *Cell.* **104**:325-328.
- HERNÁNDEZ GL, VOLPERT OV, IÑIGUEZ MA, LORENZO E, MARTINEZ-MARTINEZ S, GRAU R, FRESNO M, REDONDO JM (2001). Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: Roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J. Exp. Med.* **193**: 607–620.
- HOELZER JD, FRANKLIN RB, BOSE HR, Jr (1979). Transformation by reticuloendotheliosis virus: development of a focus assay and isolation of a nontransforming virus. *Virology* **93**: 20–30.
- HOFFMANN A, BALTIMORE D (2006). Circuitry of nuclear factor kappa B signaling. *Immunol Rev*, **210**: 171–186.
- HOGARTH LA, HALL AG (1999). Increased BAX expression is associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. *Blood* **93**: 2671–2678
- HOLT PR (1999). Dairy foods and prevention of colon cancer:human studies. *J Am Coll Nutr* **18**:379 S–391SS.
- HOTCHKISS RS, STRASSER A, MCDUNN JE, SWANSON PE (2009). Cell death. *N Engl J Med* **361**: 1570–1583.

- HU Q, WU D, CHEN W, et al. (2013). Proteolytic processing of the caspase-9 zymogen is required for apoptosome-mediated activation of caspase-9. *J Biol Chem*, **288**: 15142-7.
- IMSUMRAN A, ADACHI Y, YAMAMOTO H, et al. (2007). Insulin-like growth factor-I receptor as a marker for prognosis and a therapeutic target in human esophageal squamous cell carcinoma, *Carcinogenesis* **28(5)**: 947–956.
- JAGER R (2007). Targeting the death machinery in mammary epithelial cells: Implications for breast cancer from transgenic and tissue culture experiments. *Crit Rev Oncol Hematol* **63**: 231–240.
- JAGER R, HERZER U, SCHENKEL J, WEIHER H (1997). Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene* **15**: 1787–1795.
- JAIN A, MATHUR P (2015). Evaluating Hazards Posed by Additives in Food-A Review of Studies Adopting A Risk Assessment Approach. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, **3(3)**, 243-255.
- JEFFERS JR, PARGANAS E, LEE Y, YANG C, WANG J, BRENNAN J et al. (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* **4**: 321–328.
- JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **61**: 69–90.
- JIANG X, WANG X (2004). Cytochrome c- mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*, **73**: 87 – 106. PubMed doi:10.1146/annurev biochem. 73.011303.073706.
- JIN Z, EL-DEIRY WS (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, **4**: 139-63.
- JOHNSON IT (2002). Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. *Food Chem Toxicol*, **40**: 1171 – 8. PubMed doi:10.1016/S0278-6915(02)00051-0.
- JONES JI DR (1995). Clemmons, Insulin-Like growth factors and their binding proteins: biological actions*, *Endocr. Rev.* **16(1)**: 3–34.
- JOST PJ, GRABOW S, GRAY D, MCKENZIE MD, NACHBUR U, HUANG DC, BOUILLET P, THOMAS HE, BORNER C, SILKE J, STRASSER A, KAUFMANN T (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* **460**: 1035–1039.
- KAIDI A, QUALTROUGH D, WILLIAMS AC, PARASKEVA C (2006). Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. *Cancer Res.* **66**: 6683–6691.
- KALTSCHMIDT B, KALTSCHMIDT C, HOFMANN TG, HEHNER SP, DROGE W, SCHMITZ ML (2000). The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem*, **267(12)**: 3828-35.
- KANG R, ZEH HJ, LOTZE MT, TANG D (2011) The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Diff* **18(4)**: 571–580.
- KARAKAHYA F (2011). *Tavuk embriyonal gelişimi üzerine gıda katkı maddesi sodyum Benzoat'ın embriyotoksik etkilerinin histolojik yönden belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, 77.

- KARAMI H, BARADARAN B, ESFEHANI A, et al. (2014). Downregulation of Mcl-1 by small interference RNA induces apoptosis and sensitizes HL-60 leukemia cells to etoposide. *Asian Pac J Cancer Prev*, **15**: 629-35.
- KARIN M (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **441**: 431–436.
- KARIN M, CAO Y, GRETEN FR, LI ZW (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, **2**: 301–10.
- KASPERS GJ, PIETERS R, Van ZANTWIJK CH, VAN WERING ER, VAN DER DOES-VAN DEN BERG A, VEERMAN AJ (1998). Prednisolone resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia: vitro-vivo correlations and cross-resistance to other drugs. *Blood* **92**: 259–266.
- KAUFMANN SH et al. (1998). Elevated expression of the apoptotic regulator Mcl-1 at the time of leukemic relapse. *Blood* **91**: 991–1000.
- KENNEDY SG, WAGNER AJ, CONZEN SD, et al. (1997). The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev* **11**: 701 – 13. PubMed doi:10.1101/gad.11.6.701.
- KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239 – 57.
- KHANDWALA HM, MCCUTCHEON I E, FLYVBJERG A, FRIEND KE (2000). The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocrine Reviews*, **21**(3): 215-244.
- KIDA Y, KOBAYASHI M, SUZUKI T, TAKESHITA A, OKAMATSU Y, HANAZAWA S, YASUI T, HASEGAWA K (2005). Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase- 1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine* **29**: 159–168.
- KIM, Y, FISCHER, SM (1998). Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in mouse skin carcinoma cells. Regulatory role of CCAAT/enhancer-binding proteins in the differential expression of cyclooxygenase-2 in normal and neoplastic tissues. *J. Biol. Chem.* **273**: 27686–27694.
- KISCHKEL FC, HELLBARDT S, BEHRMANN I, GERMER M, PAWLITA M, KRAMMER PH, PETER ME (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)—associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**: 5579–5588.
- KO LJ, PRIVES C (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10**:1054 – 72. PubMed doi:10.1101/gad.10.9.1054.
- KOJIMA M, MORISAKI T, IZUHARA K, UCHIYAMA A, MATSUNARI Y, KATANO M, TANAKA M (2000). Lipopolysaccharide increases cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor-kappa B activation. *Oncogene* **19**: 1225–1231.
- KONTGEN F, GRUMONT RJ, STRASSER A, METCALF D, LI R, TARLINTON D, GERONDAKIS S (1995). Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev* **9**: 1965–1977.

- KRAJEWSKA M, MOSS SF, KRAJEWSKI S, SONG K, HOLT PR, REED JC (1996). Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res.* **56**: 2422-2427.
- KROEMER G, DALLAPORTA B, RESCHE-RIGON, M (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology*, **60**(1): 619-642.
- KROEMER G, EL-DEIRY WS, GOLSTEIN P, PETER ME, VAUX D, VANDENABEELE P, ZHIVOTOVSKY B, BLAGOSKLONNY MV, MALORNI W, KNIGHT RA, PIACENTINI, M, NAGATA S, MELINO G (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death & Differentiation*, **12**: 1463-1467.
- KROEMER G, GALLUZZI L, BRENNER C (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, **87**(1): 99-163.
- KROEMER G, GALLUZZI L, VANDENABEELE P, ABRAMS J, ALNEMRI ES, BAEHRECKE EH, HENGARTNER M (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation*, **16**(1): 3-11.
- KUBOTA K, ISHIZAKI T (1991). Dose-dependent pharmacokinetics of benzoic acid following oral administration of sodium benzoate to humans. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **41**(4): 363-368.
- KUNE GA, KUNE S, WATSON LF (1988). Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Research*, **48**: 4399-4404.
- KURIBAYASHI K, MAYES PA, EL-DERY WS (2006). What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? *Cancer Biology & Therapy*, **5**: 763-765.
- KURODA J, PUTHALAKATH H, CRAGG MS, KELLY PN, BOUILLET P, HUANG DC, et al. (2006). Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proceedings of The National Academy of Sciences* **103**: 14907-14912.
- KVANSAKUL M, YANG H, FAIRLIE WD, CZABOTAR PE, FISCHER SF, PERUGINI MA, HUANG DC, COLMAN PM (2008). Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ* **15**: 1564-1571.
- KWON HK, HWANG JS, SO JS, LEE CG, SAHOO A, RYU JH, PARK ZY (2010). Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NF κ B and AP1. *BMC cancer*, **10**(1): 392.
- LABI V, GRESPI F, BAUMGARTNER F, VILLUNGER A (2008). Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? *Cell Death Differ*, **15**: 977-987.
- LAZAROU M, STOJANOVSKI D, FRAZIER AE, KOTEVSKI A, DEWSON G, CRAIGEN WJ, RYAN MT (2010). Inhibition of Bak activation by VDAC2 is dependent on the Bak transmembrane anchor. *Journal of Biological Chemistry*, **285**(47): 36876-36883.
- LENZ G, DAVIS RE, NGO VN, LAM L, GEORGE TC, WRIGHT GW, DAVE SS, ZHAO H, XU W, ROSENWALD A, et al. (2008). Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* **319**: 1676-1679.
- LEONARD JV, MORRIS AA (2002). Urea cycle disorders. *Semin. Neonatol*, **7**: 27-35.

- LEROITH D, ROBERTS CT (2003). The insulin-like growth factor system and cancer, *Cancer Lett.* 195(2): 127–137.
- LI J, YUAN J (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48): 6194-6206.
- LIANG PS, CHEN TY, GIOVANNUCCI E (2009). Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 124(10): 2406-2415.
- LIN Q, LAI R, CHIRIEAC LR, LI, C, THOMAZY VA, GRAMMATIKAKIS I, HAMILTON SR (2005). Constitutive activation of JAK3/STAT3 in colon carcinoma tumors and cell lines: inhibition of JAK3/STAT3 signaling induces apoptosis and cell cycle arrest of colon carcinoma cells. *The American Journal of Pathology*, 167(4): 969-980.
- LIN WW, KARIN M (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5): 1175-1183.
- LINDSTEN T, ROSS AJ, KING A, ZONG WX, RATHMELL JC, SHIELDS HA, CHEN Y (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Molecular Cell*, 6(6): 1389-1399.
- LIU X, ZOU H, SLAUGHTER C, WANG X (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89(2): 175-184.
- LOWE SW, LIN AW (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3): 485-495.
- LUO JL, KAMATA H, KARIN M (2005). IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death—a new approach to cancer therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(10): 2625-2632.
- MACLENNAN R, MACRAE F, BAIN C, BATTISTUTTA D, CHAPUIS P, GRATTEN H, WARD, M (1995). Randomized trial of intake of fat, fiber, and beta carotene to prevent colorectal adenomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(23): 1760-1766.
- MAHMOUD AM, ABDELLA EM, EL-DERBY AM, ABDELLA EM (2015). Protective Effects of Turbinaria ornata and Padina pavonia against Azoxymethane-Induced Colon Carcinogenesis through Modulation of PPAR Gamma, NF- κ B and Oxidative Stress. *Phytotherapy Research*, 29(5): 737-748.
- MANE SD, THOH M, SHARMA D, SANDUR SK, NAIDU KA (2016). Ascorbyl Stearate Promotes Apoptosis Through Intrinsic Mitochondrial Pathway in HeLa Cancer Cells. *Anticancer Res.* 36(12):6409-6417.
- MANN AP, VERMA A, SETHI G, MANAVATHI B, WANG H, FOK JY, MEHTA K (2006). Overexpression of tissue transglutaminase leads to constitutive activation of nuclear factor- κ B in cancer cells: delineation of a novel pathway. *Cancer Research*, 66(17): 8788-8795.
- MANTOVANI A (2009). Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* 457: 36–37.
- MARGOVICH MJ, MORRIS J, BROWN V, ELLIS J, LOGOTHETIS B, WEBER R (2010). Nutraceutical use in late-stage cancer. *Cancer Metastasis Rev* 29:503–10.
- MARUSAWA H, CHIBA T (2010). Helicobacter pylori-induced activation- induced cytidine deaminase expression and carcinogenesis. *Current Opinion in Immunology*, 22: 442-447.

- MAZUMDER S, CHOUDHARY GS, AL-HARBI S, ALMASAN A (2012). Mcl-1 Phosphorylation defines ABT-737 resistance that can be overcome by increased NOXA expression in leukemic B cells. *Cancer Research*, 72(12): 3069-3079.
- McDONNELL T J, KORSMEYER SJ (1991). Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t (14; 18).
- MCDONNELL TJ, DEANE N, PLATT FM, NUNˆEZ G, JAEGER U, MCKEARN JP, KORSMEYER SJ (1989). bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57: 79–88.
- MEADE EA, MCINTYRE TM, ZIMMERMAN GA, PRESCOTT SM (1999). Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 8328–8334.
- MEI JM, HORD NG, WINTERSTEIN DF, DONALD SP, PHANG JM (1999). Differential expression of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 and formation of activated beta-catenin-LEF-1 transcription complex in mouse colonic epithelial cells contrasting in Apc. *Carcinogenesis*, 20: 737–740.
- MICHALAK E, VILLUNGER A, ERLACHER M, STRASSER A (2005). Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(3): 786-798.
- MICHALAK EM, JANSEN ES, HAPPO L, CRAGG MS, TAI L, SMYTH GK, SCOTT CL (2009). Puma and to a lesser extent Noxa are suppressors of Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death & Differentiation*, 16(5): 684-696.
- MILLER A (1997). Current and investigational therapies used to alter the course of disease in multiple sclerosis. *Southern Medical Journal*, 90(4): 367-375.
- MILLER C, ZHANG M, HE Y, ZHAO J, PELLETIER JP, MARTEL-PELLETIER J, DI BATTISTA JA (1998). Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 gene by okadaic acid inhibition of phosphatase activity in human chondrocytes: Co-stimulation of AP-1 and CRE nuclear binding proteins. *Journal of Cellular Biochemistry*, 69(4): 392-413.
- MIN Y, ADACHI YH, YAMAMOTO, et al. (2003). Genetic blockade of the insulin-like growth factor-I receptor a promising strategy for human pancreatic cancer, *Cancer Res.* 63(19): 6432–6441.
- MINN AJ, RUDIN CM, BOISE LH, THOMPSON CB (1995). Expression of Bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood*, 86: 1903-1910.
- MIQUEL C, BORRINI F, GRANDJOUAN S, AUPÉRIN A, VIGUIER J, VELASCO V, DUVILLARD P, PRAZ F, SABOURIN JC (2005). Role of bax mutations in apoptosis in colorectal cancers with microsatellite instability. *American Journal of Clinical Pathology*, 123(4): 562-570
- MPONTOUKAS P, VANTARAKIS A, SIVRIDIS E, LIARIALIS T (2008). Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. *Food Chem Toxicol.* 46(7): 2390-3. doi: 10.1016/j.fct.2008.03.021. Epub 2008 Mar 30.
- MUKHOPADHYAY S, PANDA, PK, SINHA N, DAS, DN, BHUTIA SK (2014). Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*, 19(4): 555-566.
- MUSCAT JE, STELLMAN SD, WYNDER EL (1994). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and colorectal cancer. *Cancer*, 74(7): 1847-1854.

- NAGARAJU GP, ALESE OB, LANDRY J, DIAZ R, EL-RAYES BF (2014). HSP90 inhibition downregulates thymidylate synthase, *Oncotarget*, **5**: 9980–9991).
- NAGATA S (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* **88**: 355 – 65. PubMed doi:10.1016/S0092 8674(00)81874-7.
- NAGLEY P, HIGGINS GC, ATKIN JD, BEART PM (2010). Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, **1802(1)**: 167-185.
- NAUGLER WE, KARIN M (2008). NF- κ B and cancer—identifying targets and mechanisms. *Current Opinion in Genetics & Development*, **18(1)**: 19-26.
- NICHOLSON DW (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, **6(11)**: 1028-1042.
- NING Y WANG L, GIOVANNUCCI EL (2010). A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies. *Obesity Reviews*, **11(1)**: 19-30.
- NOBILI S, LIPPI D, WITORT E, DONNINI M, BAUSI L, MINI E, et al. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res*, **59**: 365–78.
- NORAT T, BINGHAM S, FERRARI P, SLIMANI N, JENAB M, MAZUIR M, BOUTRON-RUAULT MC (2005). Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, **97(12)**: 906-916.
- OBERST A, BENDER C, GREEN DR (2008). Living with death: the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals. *Cell Death & Differentiation*, **15(7)**: 1139-1146.
- OH JH, BAN JO, CHO MC, JO M, JUNG JK, AHN B, HONG JT (2012). 4-O-methylhonokiol inhibits colon tumor growth via p21-mediated suppression of NF- κ B activity. *The Journal of nutritional biochemistry*, **23(7)**: 706-715.
- ORLOWSKI RZ, BALDWIN AS (2002). NF- κ B as a therapeutic target in cancer. *Trends in Molecular Medicine*, **8(8)**: 385-389.
- OSBORN L, KUNKEL S, NABEL GJ (1989). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2336–2340.
- OUYANG L, SHI Z, ZHAO S, et al. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*, **45**: 487-98.
- PANDEY M, VERMA RK, SARAF SA (2010). Nutraceuticals: new era of medicine and health. *Asian J Pharm Clin Res*; **3**: 11–5.
- PANDEY N, MEENA RP, RAI SK, PANDEY-RAI S (2011). Medicinal plants derived nutraceuticals: a re-emerging health aid. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **2**: 419-441.
- PANDURANGAN AK, SAADATDOUST Z, ESA NM, HAMZAH H, İSMAİL A (2015). Dietary cocoa protects against colitis-associated cancer by activating the Nrf2/Keap1 pathway. *Biofactors*. **41(1)**: 1-14.

- PARK EJ, LEE JH, YU GY, HE G, ALÍ SR, HOLZER RG, OSTERREICHER CH, TAKAHASHI H, KARIN M (2010). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* **140**: 197–208.
- PARKIN DM (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*, **118**: 3030–3044.
- PARRONDO R, POZAS A, REINER T, RAI P, PEREZ-STABLE C (2010). NF-kappaB activation enhances cell death by antimetabolic drugs in human prostate cancer cells. *Mol Cancer*, **9**: 182. doi: 10.1186/1476-4598-9-182.
- PEPPER C, HOY T, BENTLEY DP (1997). Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *British Journal of Cancer*, **76**(7): 935-938.
- PERKINS ND (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**(1): 49-62.
- PISTRITTO G, JOST M, SRINIVASULA SM, BAFFA R, POYET JL, KARI C, LAZEBNIK Y, RODECK U, ALNEMRI ES (2002). Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia. *Cell Death & Differentiation*. **9**: 995-1006.
- PLATI J, BUCUR O, Khosravi-FAR R (2008). Dysregulation of apoptotic signaling in cancer. Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Biological Chemistry*. **104**: 1124-1149.
- PLONER C, RAINER J, NIEDEREGGER H, EDUARDOFF M, VILLUNGER A, GELEY S, et al. (2008). The BCL2 rheostat in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **22**: 370–377.
- POLIGONE B, BALDWIN AS (2001). Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: Roles of different prostaglandins. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 38658–38664.
- POLK DB, PEEK RM (2010). Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond. *Nature Reviews Cancer*, **10**(6): 403-414.
- POTTER JD (1999). Colorectal cancer: molecules and populations. *Journal of the National Cancer Institute*, **91**(11): 916-932.
- PRAKASH D, GUPTA C, SHARMA G (2012). Importance of phytochemicals in nutraceuticals. *J Chin Med Res Develop*, **1**: 70-8.
- PRASAD S, RAVINDRAN J, AGGARWAL BB (2010). NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **336**: 25–37.
- PSYRRI A, DIMAIO D (2008). Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, **5**: 24–31.
- QIAO L, ZHANG H, YU J, FRANCISCO R, DENT P, EBERT MP, ROCKEN C, FARRELL G (2006). Constitutive activation of NF-kappaB in human hepatocellular carcinoma: evidence of a cytoprotective role. *Hum Gene Ther* **17**: 280–290.
- QIN H, WILSON CA, LEE SJ, ZHAO X, BENVENISTE EN (2005). LPS induces CD40 gene expression through the activation of NFkappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia. *Blood* **106**: 3114–3122.

- RAFFO AJ, PERLMAN H, CHEN MW, DAY ML, STREITMAN JS, BUTTYAN R (1995). Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Research*, **55**: 4438.
- RAJAMANICKAM S, AGARWAL R (2008). Natural products and colon cancer: current status and future prospects. *Drug Development Research*, **69**(7): 460-471.
- RAJITHA B, BELALCAZAR A, NAGARAJU GP, SHAIB WL, SNYDER JP, SHOJI M, EL-RAYES BF (2016). Inhibition of NF- κ B translocation by curcumin analogs induces G0/G1 arrest and downregulates thymidylate synthase in colorectal cancer. *Cancer Letters*, **373**(2): 227-233.
- RICCIARDIELLO L, BAZZOLI F, FOGLIANO V (2011). Phytochemicals and colorectal cancer prevention – myth or reality? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**:592–6.
- RIEDL SJ, SALVESEN GS (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*: **8**: 405–413.
- ROY SS, EHRLICH AM, CRAIGEN WJ, HAJNO' CZKY G (2009). VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. *EMBO Rep*. **10**: 1341–1347.
- RUFINI A, TUCCI P, CELARDO I, MELINO G (2013). Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene*, **32**: 5129–5143.
- RYAN KM, ERNST MK, RICE NR, VOUSDEN KH (2000). Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature*, **404**(6780):892-7.
- SACHDEV D, YEE D (2007). Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy, *Mol. Cancer Ther.* **6**(1): 1–12.
- SAĞLAM ÖF (1999). *Türk Gıda Mevzuatı*. Ankara: ÇEV-SAĞ Yayınları.
- SALVESEN GS, DIXIT VM (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, **91**: 443 – 6. PubMed doi:10.1016/S0092 – 8674(00)8043–4.
- SAMANI AA, YAKAR S, LEROITH D, BRODT P (2007). The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocrine reviews*, **28**(1): 20-47.
- SANDHU MS, DUNGER DB, GIOVANNUCCI EL (2002). Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **94**(13): 972-980.
- SARASTE A, PULKKI K (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research*, **45**(3): 528-537.
- SATO T, IRIE S, KRAJEWSKI S, REED JC (1994). Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl-2 protein. *Gene*, **140**(2): 291-292.
- SATTLER M, LIANG H, NETTESHEIM D, MEADOWS RP, HARLAN JE, EBERSTADT M, THOMPSON CB (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, **275**(5302): 983-986.
- SAURAV B, ARUNDHATI J, KALIPADA P (2009). Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, reduces microglial and astroglial inflammatory responses. *J Immunol*, **183**: 5917-5927.

- SCAGLIA F, CARTER S, O'BRIEN WE, LEE B (2004). Effect of alternative pathway therapy on branched chain amino acid metabolism in urea cycle disorder patients. *Molecular Genetics and Metabolism*, **81**: 79-85.
- SCHATZKIN A, LANZA E, CORLE D, LANCE P, IBER F, CAAN B, SHIKE M, WEISSFELD J, BURT R, COOPER MR, KIKENDALL JW, CAHILL J (2000). Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *New England Journal of Medicine*, 342**(16)**: 1149-1155.
- SCHIMMER AD (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer research*, 64**(20)**: 7183-7190.
- SCHINZEL A, KAUFMANN T, BORNER C (2004). Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. *Biochimica et biophysica acta*, 1644**(2-3)**: 95-105.
- SEN S (1992). Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biol Rev Camb Philos Soc* **67**: 287 – 319. PubMed doi:10.1111/j.1469-185X.1992.tb00727.x.
- SENTMAN CL, SHUTTER JR, HOCKENBERY D, KANAGAWA O, KORSMEYER SJ (1991). bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* **67**: 879-888.
- SHA WC, LIOU HC, TUOMANEN EI, BALTIMORE D (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* **80**: 321-330.
- SHALINI S, DORSTYN L, DAWAR S, KUMAR S (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Diff*, **22**: 526- 39.
- SHAO J, SHENG H, INOUE H, MORROW JD, DUBOIS RN (2000). Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275**(43)**: 33951-33956.
- SHMUELY H, DOMNIZ N, COHEN D (2013). Probiotics in the prevention of colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*, **9**: 31–6.
- SINGER II, KAWKA DW, SCHLOEMANN S, TESSNER T, RIEHL T, STENSON WF (1998). Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, **115**: 297–306.
- SLATTERY ML, CURTIN KP, EDWARDS SL, SCHAFFER DM (2004). Plantfoods, fiber, and rectal cancer. *Am J Clin Nutr*, **79**: 274–81.
- SLEE EA, ADRAIN C, MARTIN SJ (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Diff*, **6**: 1067- 1074.
- SLEE EA, ADRAIN C, MARTIN SJ (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276**(10)**:7320–7326.
- SOENGAS MS, CAPODIECI P, POLSKY D, MORA J, ESTELLER M, OPITZ- ARAYA X, MCCOMBIE R, HERMAN JG, GERALD WL, LAZEBNIK YA (2001). Cordon-Cardó C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*. **409**: 207-211.
- SOLT LA, MAY MJ (2008). The IkappaB kinase complex: master regulator of NF-kappaB signaling. *Immunol Res*, **42**: 3–18.

- SRINIVASULA SM, ASHWELL JD (2008). IAPs: what's in a name?. *Molecular cell*, 30(2): 123-135.
- STARK LA, REID K, SANSOM OJ, DIN FV, GUICHARD S, MAYER I, DUNLOP MG (2007). Aspirin activates the NF- κ B signalling pathway and induces apoptosis in intestinal neoplasia in two in vivo models of human colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 28(5): 968-976.
- STATTIN P, BYLUND A, RINALDI S, BIESSY C, DÉCHAUD H, STENMAN UH, KAAKS R (2000). Plasma insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-binding proteins, and prostate cancer risk: a prospective study. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(23): 1910-1917.
- STAUDT LM (2010). Oncogenic activation of NF- κ B. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2(6): a000109.
- STENNICKE HR, SALVESEN GS (2000). Caspases—controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1): 299-306.
- STRASSER A, HARRIS AW, BATH ML, CORY S (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*, 348: 331–333.
- STRASSER A, HARRIS AW, CORY S (1991). Bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 67: 889–899.
- STRASSER A, HARRIS AW, CORY S (1993). Em-bcl-2 transgene facilitates spontaneous transformation of early pre-B and immunoglobulinsecreting cells but not T cells. *Oncogene* 8: 1–9.
- STRASSER A, HARRIS AW, HUANG DCS, KRAMMER PH, CORY S (1995). Bcl- 2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J* 14: 6136–6147.
- STRASSER A, HARRIS AW, VAUX DL, WEBB E, BATH ML, ADAMS JM, CORY S (1990). Abnormalities of the immune system induced by dysregulated bcl-2 expression in transgenic mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 166: 175–181.
- STRASSER A, JOST PJ, NAGATA S (2009). The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30: 180–192.
- STRASSER A, WHITTINGHAM S, VAUX DL, BATH ML, ADAMS JM, Cory S, HARRIS AW (1991). Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8661–8665.
- SUBBARAMAIAH K, COLE PA, DANNENBERG AJ (2002). Retinoids and carnosol suppress cyclooxygenase-2 transcription by CREB-binding protein/p300-dependent and –independent mechanisms. *Cancer Res*, 62: 2522–2530.
- SUBBARAMAIAH K, NORTON L, GERALD W, DANNENBERG AJ (2002). Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: Evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J. Biol. Chem*, 277: 18649–18657.
- SUH O, METTLIN C, PETRELLI NJ (1993). Aspirin use, cancer, and polyps of the large bowel. *Cancer* 72: 1171–1177.
- SUN Y, PENG ZL (2009). Programmed cell death and cancer. *Postgrad Med J*, 85: 134-40.

- SUSHMA S, DASARATHY S, TANDON RK, JAIN S, GUPTA S, BHIST MS (1992). Sodium benzoate in the treatment of acute hepatic encephalopathy: a double-blind randomized trial. *Hepatology*, **16**(1):138-44.
- SZEGEZDI E, LOGUE SE, GORMAN AM, et al. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*, **7**: 880-5.
- TAN FJ, FIRE AZ, HILL RB (2007). Regulation of apoptosis by *C. elegans* CED-9 in the absence of the C-terminal transmembrane domain. *Cell Death Differ* **14**: 1925–1935.
- TANABE K, MATSUSHIMA-NISHIWAKI R, YAMAGUCHI S, IIDA H, DOHI S, KOZAWA O (2010) Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *J Neuroinflammation*, **7**:16.
- THOMBERRY NA, LAXEBNIK Y (1998). Caspases: enemies within. *Science*, **281**:1312-1316.
- THOMPSON CB, FESIK SW (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, **275**: 983–986.
- THUN MJ, NAMBOODIRI MM, HEATH CW JR (1991). Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med*, **325**:1593–159.
- TIMMER JC, SALVESEN GS (2007) Caspase substrates. *Cell Death Differ* **14**: 66–72.
- TONON G, et al. (2005). High resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:9625–9630.
- TOTH B (1984). Lack of tumorigenicity of sodium benzoate in mice. *Fundam Appl Toxicol*, **4**(3-1):494-6.
- TSAREVA SA, MORIGGL R, CORVINUS FM, WIEDERANDERS B, SCHUTZ A, KOVACIC B, FRIEDRICH K (2007). Signal transducer and activator of transcription 3 activation promotes invasive growth of colon carcinomas through matrix metalloproteinase induction. *Neoplasia*, **9**: 279–291.
- TSE C, SHOEMAKER AR, ADICKES J, ANDERSON MG, CHEN J, JIN S, et al. (2008). ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res*, **68**: 3421–3428.
- TSUJIMOTO Y, COSSMAN J, JAFFE E, CROCE CM (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, **228**: 1440–1443.
- TSUJIMOTO Y, et al. (1985). The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* **229**: 1390–1393.
- UCCELLO M, MALAGUARNERA G, BASILE F, D'AGATA V, MALAGUARNERA M, BERTINO G, et al. (2012). Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC Surg*, **12**: S1–35.
- VALLABHAPURAPU S, KARIN M (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* **27**: 693–733.
- VAUX DL, CORY S, ADAMS JM (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*; **335**: 440–442.
- VIATOUR P, MERVILLE MP, BOURS V, CHARIOT A (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci.* **30**(1): 43–52.

- VILLUNGER A, MICHALAK EM, COULTAS L, MULLAUER F, BOCK G (2003). Ausserlechner MJ et al. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science*; **302**: 1036–1038.
- VOGELSTEIN B, KINZLER KW (2001). Achilles' heel of cancer? *Nature*; **412**: 865–6.
- VOGLER M, BUTTERWORTH M, MAJID A, WALEWSKA RJ, SUN XM, DYER MJ, et al. (2009). Concurrent upregulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; **113**: 4403–4413.
- WALIA S, KAMAL R, KANWAR SS, DHAWAN DK (2015). Cyclooxygenase as a target in chemoprevention by probiotics during 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in rats. *Nutr Cancer*, **67(4)**: 603-11.
- WANG C, YOULE RJ (2009). The role of mitochondria in apoptosis. *Ann Rev Genet* **43**: 95–118.
- WANG D, DUBOIS RN (2010). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene*, **29**: 781–788.
- WARGOVICH MJ, MORRIS J, BROWN V, ELLIS J, LOGOTHETIS B, WEBER R (2010). Nutraceutical use in late-stage cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, **29(3)**: 503-510.
- WATANABE A, YASUHIRA S, INOUE T, KASAI S, SHIBAZAKI M, TAKAHASHI K, AKASAKA T, MASUDA T, MAESAWA C (2013). BCL2 and BCLxL are key determinants of resistance to antitubulin chemotherapeutics in melanoma cells. *Exp Dermatol*. **22**: 518-523.
- WEI MC, ZONG WX, CHENG EH, LINDSTEN T, PANOUTSAKOPOULOU V, ROSS AJ, ROTH KA, MACGREGOR GR, THOMPSON CB, KORSMEYER SJ (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, **292**: 727–730.
- WEIH F, CARRASCO D, DURHAM SK, BARTON DS, RIZZO CA, RYSECK RP, LIRA SA, BRAVO R (1995). Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* **80**: 331–340.
- WEYHENMEYER B, MURPHY AC, PREHN JH, et al. (2012). Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Exp Oncol*, **34**: 192-9.
- WINAWER SJ, ZAUBER AG, HO MN, O'BRIEN MJ, GOTTLIEB LS, STERNBERG SS, WAYE JD, SCHAPIRO M, BOND JH, PANISH JF (1993). Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*, **329**:1977–1981.
- WONG RSY (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *JECCR*, **30**:87.
- WU K, GIOVANNUCCI E, BYRNE C, PLATZ EA, FUCHS C, WILLETT WC, SINHA R (2006). MEAT mutagens and risk of distal colon adenoma in a cohort of U.S. men. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **15**: 1120–1125.
- WU S, RHEE KJ, ALBESIANO E, RABIZADEH S, WU X, YEN HR, HUSO DL, Brancati FL, Wick E, McAllister F, et al. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med.*, **15**: 1016–1022.
- WUILLEME-TOUMI S, et al. (2005). Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia*, **19**: 1248–1252.

- WYLLIE AH, BEATTIE GJ, HARGREAVES AD (1981). Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J*, **13**: 681 – 92. doi:10.1007/BF01002719.
- YADAV A, KUMAR A, DAS M, TRIPATHI A (2016). Sodium benzoate, a food preservative, affects the functional and activation status of splenocytes at non cytotoxic dose. *Food Chem Toxicol*, **88**:40-7.
- YANG D, CHEN MB, WANG LQ, YANG L, LIU CY, LU PH (2013). Bcl-2 expression predicts sensitivity to chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *JECCR*, **32**:105.
- YASUI H, ADACHI M, IMAI K (2003). Combination of tumor necrosis factor-alpha with sulindac augments its apoptotic potential and suppresses tumor growth of human carcinoma cells in nude mice. *Cancer*, **97**: 1412–1420.
- YENTÜR G, GÜREL H, ORMAN M, BAYHAN A (1995). Ankara Piyasasından Sağlanan Bazı Gıda Maddelerinde Sobik Asit ve Bezoik Asit Miktarlarının Gaz Kromatografisi Yöntemi ile Araştırılması, *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **42**:451-455s.
- YOULE RJ, STRASSER A (2008). The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat RevMol Cell Biol*, **9**: 47–59.
- YU H, SPITZ MR, MISTRY J, et al. (1999). Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis, *J. Natl. Cancer Inst.* **91**(2): 151–156.
- YU LL, YU HG, YU JP, LUO HS, XU XM, LI JH (2004). Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human colorectal carcinoma tissue. *World journal of gastroenterology: WJG.* **10**(22): 3255–3260.
- YUAN J, KROEMER G (2010). Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev* **24**: 2592–2602.
- YURTTAGÜL M, AYAZ A (2006). *Katkı Maddeleri; Doğrular, Yanlışlar*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi - Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Yayınları.
- ZENGİN N, YÜZBAŞIOĞLU D, UNAL F, YILMAZ S, AKSOY H (2011). The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. *Food Chem Toxicol.* **49**(4): 763-9. doi: 10.1016/j.fct.2010.11.040.
- ZHANG D, MI M, JIANG F, SUN Y, LI Y, YANG L, FAN L, LI Q, MENG J, YUE Z, LIU L, MEI Q (2015). Apple polysaccharide reduces NF-Kb mediated colitis-associated colon carcinogenesis. *Nutr Cancer.* **67**(1): 177-90.
- ZHANG YS, LI Y, WANG Y, SUN SY, JIANG T, LI C, CUI SX, QU XJ (2016). Naringin, a natural dietary compound, prevents intestinal tumorigenesis in Apc (Min/+) mouse model. *J Cancer Res Clin Oncol.* **142**(5): 913-25.
- ZHOU P, LEVY NB, XIE H, QIAN L, LEE CY, GASCOYNE RD, CRAIG RW (2001). MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood.* **97**: 3902–3909.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Betül
Soyadı : Yılmaz
Doğum Yeri ve Tarihi : Isparta, 1983
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Evli
Tel : 0 545 432 62 32
Elektronik Posta : betulay@gmail.com

II- Eğitimi

2016-2014: Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans
2006-2002: Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme & Diyetetik, Lisans
1998-2001: Isparta Gazi Lisesi

Yabancı Dili: İngilizce

III- Ünvanları

1. Diyetisyen

IV- Mesleki Deneyimi

1. 2006-2009 Alman Hastanesi
2. 2007-2008 Özel Diamed Diyaliz Merkezi
3. 2009-2011 Dr. Ender Saraç High Clinic
4. 2011 Cambridge Nutritional Science Besin İntolerans Testleri
5. 2010 Özel Olbia Diyaliz Merkezi
6. 2011-2015 Özel Akdeniz Şifa Hastanesi
7. 2015-2016 Uzman Diyetisyen Betül Ay YILMAZ Beslenme, Eğitim & Danışmanlık

V- Üye Olduğu Kuruluşlar

Türkiye Diyetisyenler Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Ulusal Dergi Yayını:

1. Aylin Ayaz, Saniye Bilici, Muhammed Fatih Uyar, **Betül Ay**, Sema Börekci, Emel Kök. (2011). Consumer acceptance, knowledge and attitudes towards organic and genetically modified foods: a cross-sectional study among Turkish university students. *Healthmed*, 5:5-1014.

Seminerler:

1. “Çocuklarda Total Parenteral Nütrisyon” Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Stajı Seminer Çalışması
2. “Yüksek Fruktöz Tüketiminin Kan Lipit Profili Üzerine Etkisi ve Hastalıklarla İlişkisi” Seminer Çalışması

VII- Diğer Bilgiler

Kongre ve Sempozyum Katılımları:

1. Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi 2002/Antalya
2. Hacettepe Üniversitesi Beslenme Günleri 2006/Ankara
3. Sevgi Okyanusu Kişisel Gelişim Eğitim Danışmanlık NLP Practitioner Hazırlık Programı 2005/ Ankara
4. Bodrum Sağlık Vakfı Yarımada Engelli Bireylere Beslenme Seminerleri 2006-2009
5. Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi 2008/Antalya
6. Trans Eğitim Danışmanlık Temel Hipnoz 1. Basamak 2010/İstanbul
7. Dr. Bülent URAN Eğitim Danışmanlık Temel Hipnoz Eğitimi 2011/Ankara
8. Dr. Bülent URAN Eğitim Danışmanlık Regresyon Eğitimi Yaz Kampı 2012 /Fethiye
9. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı İlköğretim Okul Çocuklarında Obezite Araştırması Antalya Saha Çalışması –Görevlendirme- (2012)
10. 2. Pediatrik Prebiyotik Probiyotik Akademisi Eğitim 2013/Van
11. Yogahan Ferhan Yüksel Temel Ayurveda Eğitimi 2013 /Fethiye
12. Uluslararası Katılımlı 2. Ulusal Probiyotik Prebiyotik ve Fonksiyonel Gıdalar Kongresi 2014/Antalya
13. Dr. Bülent URAN Eğitim Danışmanlık Online Zayıflama Programı/2015
14. İstanbul Medipol Üniversitesi "Metabolik Bariatrik Cerrahide Beslenme yaklaşımı & Bariatrik Cerrahi Diyetisyenliği Kursu 2015/İstanbul
15. HOH London-İstanbul Profesyonel Koçluk 2016/İstanbul