



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**GALLİK ASİDİN DENEYSEL KOLON KANSERİ
OLUŞTURULAN RATLARDA ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRES YOLAĞI VE BAĞIRSAK EPİTEL
KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Çiğdem FİDAN

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Erdinç DEVRİM**

**ANKARA
2023**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GALLİK ASİDİN DENEYSEL KOLON KANSERİ
OLUŞTURULAN RATLARDA ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRES YOLAĞI VE BAĞIRSAK EPİTEL
KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Çiğdem FİDAN

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Erdinç DEVRİM**

**ANKARA
2023**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Gallik Asidin Deneysel Kolon Kanseri Oluşturulan Ratlarda Endoplazmik Retikulum Stres Yolağı ve Bağırsak Epitel Kök Hücreleri Üzerine Etkileri” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Çiğdem FİDAN

Tarih: 05.07.2023

İmza:

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Çiğdem FİDAN tarafından hazırlanan “Gallik Asidin Deneysel Kolon Kanseri Oluşturulan Ratlarda Endoplazmik Retikulum Stres Yolağı ve Bağırsak Epitel Kök Hücreleri Üzerine Etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05/07/.2023

Prof. Dr. Hasan Serdar ÖZTÜRK
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Serenay ELGÜN
ÜLKAR
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Erdinç DEVRİM
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU
Gazi Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Murat KAÇMAZ
Kırıkkale Üniversitesi
Üye

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

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	i
Kabul ve Onay Sayfası	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kolon Kanseri	2
1.2. Kolorektal Kanserin Neden Olduğu Yüksek Morbidite ve Mortalite Oranları	4
1.3. Kolon Kanseri Oluşumunda Beslenmenin Rolü – Gallik Asit Açısından Önemi	6
1.4. Ratlarda Deneysel Kolon Kanseri Oluşturma Modeli	9
1.5. ER Stresinin Kolon Kanseri Patogenezindeki Yeri	10
1.6. HIF-1 α 'nın Kolon Kanseri Patogenezindeki Yeri	16
1.7. Midkinin Kolon Kanseri Patogenezinde ve Literatürdeki Yeri	17
1.8. Oksidatif Stres Parametrelerinin Kolon Kanseri Patogenezinde ve Literatürdeki Yeri	18
1.9. LGR5 Proteininin Kolon Kanseri Patogenezindeki ve Literatürdeki Yeri	20
1.10. Literatür Özeti	22
2. GEREÇ ve YÖNTEM	25
2.1. Kimyasal Hazırlanması	25
2.2. Hayvan Modeli ve Deney Tasarımı	25
2.3. Laboratuvar Analizleri	27
2.3.1. Biyokimyasal Analizler	27
2.3.2. Western Blot ve Histokimyasal Analizler	29
2.3.3. Kolon Dokusunda Adenokarsinom Oluşumunun Histopatolojik Değerlendirmesi	30
2.4. İstatistiksel Analizler	32
3. BULGULAR	33
3.1. Grupların Fiziksel Olarak Karşılaştırılması	33
3.2. Kolon Dokularının Makroskopik Olarak Karşılaştırılması	36
3.3. Biyokimyasal Analizler	37
3.4. Western Blot Analizleri	42
3.5. Histopatolojik Açıdan Değerlendirme	46
4. TARTIŞMA	52

5. SONUÇ ve ÖNERİLER	65
ÖZET	69
SUMMARY	70
KAYNAKLAR	71
EKLER	80
Ek-1: Etik Kurul Onayı	80
ÖZGEÇMİŞ	82



ÖNSÖZ

Epidemiyolojik ve bilimsel çalışmalar, kolorektal kanserin, gıda bileşenleri veya diyet tarafından indüklenen bağırsak mikrobiyotasının bileşiminin kademeli olarak bozulmasından ayrıca onkojenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki genetik değişikliklerden kaynaklandığını göstermektedir. Son yıllarda kanser araştırmalarında endoplazmik retikulum (ER) stresi sonrasında katlanmamış protein yanıtı (UPR) sinyalizasyonunun bozulduğu ile ilgili çalışmalar yer almaktadır. UPR sensörü olarak üç transmembran protein tanımlanmıştır. Bu proteinler; ER homeostazisini eski haline getirmek için düzeltici eylemleri ortaya çıkaran sinyalizasyon kademelerini başlatmaktadır.

Doğal olarak meydana gelen ve biyolojik olarak aktif polifenoller, potansiyel kanser terapötikleri olarak ilgi kazanmaktadır. Gallik asit, anti-inflamatuvar ve anti-mutajenik özelliklere sahiptir ve kanser hücrelerine karşı sitotoksikite gösteren polihidroksifenolik bir bileşiktir. Çalışmamızda deneysel olarak ratlarda kolon kanseri oluşturup gallik asit vererek, kolonda adenokarsinom oluşumunda, intestinal kök hücrelerin, ER stresinin ve oksidatif stresin nasıl etkilendiğini ve tedavide hedef olup olamayacaklarının araştırılması hedeflenmiştir.

Tezimin hazırlanması sırasında bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Erdiç DEVRİM'e sonsuz teşekkür ederim. Tez İzleme Komitesinde yer alan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Hasan Serdar ÖZTÜRK ve Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU'ya tez çalışmam sürecinde bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösterdikleri için ayrıca teşekkür ederim.

Doktora eğitimi boyunca bana destek olan ve bilgileriyle beni aydınlatan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Bölümü hocalarım; Prof. Dr. İlker DURAK, Prof. Dr. Aslıhan GÜRBÜZ, Prof. Dr. Berrin İmge ERGÜDER, Doç. Dr. Özlem DOĞAN'a saygılarımı sunarım. Özellikle bana rehberlik eden ve desteğini esirgemeyen çok kıymetli hocam Prof. Dr. Serenay ELGÜN ÜLKAR'a çok teşekkür

ederim. Her zaman yanımda olan, varlıklarını her daim hissettiren Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlileri ve idari personeline bu süreçteki yol arkadaşlıkları için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda analiz aşamasında bana yardımcı olan ve katkılar sunan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Bölümü'nden sayın hocam Prof. Dr. Can AKÇALI'ya ve sevgili arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Yusuf OLĞAR'a teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her zaman beni destekleyen, elimi bırakmayan ve karşılaştığım tüm zorlukları gülümseyerek aşmamı sağlayan canım aileme ve dostlarıma çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABTS	2,2'-Azinobis (3-Etil-Bezotiazolin 6 Sulfonat)
ACF	Aberran Kript Odakları
AICR	Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsü
α	Alpha
AKT	Protein Kinaz B
ATF-4	Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4
ATF-6	Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6
AUC	Area Under Curve (Eğri Altındaki Alan)
β	Beta
BSA	Sığır Serum Albümini
BİP	İmmunglobulin Protein Bağlayıcı
Ca	Kalsiyum
CD133	Prominin-1
CEA	Karsinoembriyonik Antijen
CHOP	CCAAT-Enhancer Binding Protein Homologous Protein
CRC	Kolorektal Kanser
DPE	Dihidroksi Fenil Etanol
dL	Desilitre
DLK1	Protein Delta Homolog 1
DMH	1,2-dimetilhidrazin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
eIF2 α	PERK Ökaryotik Başlama Faktör 2alfa
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	ER ile İlişkili Degradasyon
ESMO	Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği
GA	Gallik Asit

GADD34	Büyüme Durdurma ve DNA Hasarı ile İndüklenebilir Protein
g	Gram
GRP-78	Glukoz Regüle Protein-78
HIF-1 α	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1alfa
IRE-1 α	İnositol Gerektiren Enzim-1alfa
kg	Kilogram
LGR5	Lösin Açısından Zengin Tekrar İçeren G-Proteini ile Birleştirilmiş Reseptör-5
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
MK	Midkin
NaCl	Sodyum Klorür
NOTCH1	Nörojenik Lokus Çentik Homolog Protein 1
NRF2	Nükleer Faktör Eritroid 2
mL	Mililitre
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
PERK	Protein Kinaz RNA (PKR) Benzeri ER Kinaz
PVDF	Polivinilidin Diflorür
STAT3	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
S1P	Site-1 Proteaz
S2P	Site-2 Proteaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
pVHL	Von Hippel-Lindau Tümör Baskılayıcı
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RNS	Reaktif Azot Türleri
NF- κ B	Nükleer Faktör Kappa B
TAS	Total Antioksidan Seviye
TBS	Tris Buffer Saline
TOS	Total Oksidan Seviye
TNM	Tümörün Özellikleri-Lenf Nodu-Metastaz
UPR	Katlanmamış Protein Yanıtı
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

WCRF	Dünya Kanser Araştırma Fonu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XBP1	X-Box Bağlayıcı Protein 1



ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Gelişiminin çeşitli düzeylerinde kolon kanserinin patofizyolojisinin gösterimi	5
Şekil 1.2.	Gallik asidin (3,4,5-trihidroksibenzoik asit) kimyasal yapısı	8
Şekil 1.3.	1,2-dimetilhidrazinin kimyasal yapısı	9
Şekil 1.4.	Zamana bağlı kolorektal kanser gelişimi	10
Şekil 1.5.	UPR sinyalizasyonuna aracılık eden yollar	14
Şekil 2.1.	Deney protokolü	26
Şekil 3.1.	Gruplar arası haftalık kilo değişimi	34
Şekil 3.2.	Gruplar arası kilo alımı (A), büyüme hızı (B), kolon ağırlığı (C) ve kolon ağırlığı/son vücut ağırlığı (D) değişimi	35
Şekil 3.3.	Kolon dokularının makroskopik incelemesi	36
Şekil 3.4.	Gruplar arası HIF-1 α düzeyi değişimi	39
Şekil 3.5.	Gruplar arası Midkin düzeyi değişimi	40
Şekil 3.6.	Midkin ve HIF-1 α düzeylerine ait ROC Analizi	41
Şekil 3.7.	Gruplar arası GRP-78, ATF-4, CHOP ve ATF-6 protein ifadelerinin incelenmesi. A) GRP-78 proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi B) ATF-4 proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi C) CHOP proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi D) ATF-6 proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi verilmiştir	43
Şekil 3.8.	Gruplar arası PERK, IRE-1 α ve LGR5 protein ifadelerinin incelenmesi. E) PERK proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi F) IRE-1 α proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi G) LGR5 proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi verilmiştir	45
Şekil 3.9.	Kontrol grubu ratlarda kolon dokusunun görünümü	47
Şekil 3.10.	İlk aşama GA uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü	47
Şekil 3.11.	Son aşama GA uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü	48
Şekil 3.12.	DMH uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü	48
Şekil 3.13.	DMH uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü	49
Şekil 3.14.	DMH+GA uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü	50
Şekil 3.15.	İlk DMH sonra GA uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü	50
Şekil 3.16.	İlk DMH sonra GA uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü	51

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Kolorektal kanserde TNM evrelemesi	31
Çizelge 3.1.	Gruplar arası antropometrik ölçümlerin karşılaştırılması	33
Çizelge 3.2.	Kolon dokularının makroskopik olarak karşılaştırılması	37
Çizelge 3.3.	Gruplar arası biyokimyasal analizlerin karşılatırılması	38
Çizelge 3.4.	Gruplar arası korelasyon analizi	46



1. GİRİŞ

Kolorektal kanser (CRC), erkeklerde ve kadınlarda sırasıyla üçüncü ve ikinci en sık teşhis edilen kanserdir. Ölüm oranı ile ilgili olarak, her iki cinsiyette de ikinci sırada yer almaktadır (Sánchez-Guillén ve Arroyo, 2020). Dünya Sağlık Örgütü'nden alınan istatistikler, dünya genelinde yeni CRC vakalarının sayısının 2018'de 1,8 milyon olduğunu ve aynı yıl içinde 880.792 vakanın öldüğünü göstermiştir (Sánchez-Guillén ve Arroyo, 2020). CRC'de cerrahi sonuçlar, preoperatif hazırlık, antibiyotik profilaksisi, cerrahi teknik ve postoperatif yönetimdeki gelişmeler eşliğinde son 50 yılda önemli ölçüde iyileşmiştir. Bununla birlikte, CRC tedavisindeki ilerlemelere rağmen, postoperatif mortalite ve komplikasyonların önlenmesi açısından bu hastalığın tedavisinde hala gri bir alan olduğu belirtilmektedir.

Bağırsak mikrobiyomunun disbiyozu CRC gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Bağırsak mikrobiyotası, diyet bileşenlerinin onkometabolitlere ve tümör baskılayıcı metabolitlere metabolik dönüşümlerinde yer alır ve bu da CRC gelişimini etkiler (Chattopadhyay ve ark., 2021). Bitki metabolitleri, potansiyel yeni ilaçların geniş bir kaynağını oluşturabilir ve bu nedenle birçok doğal gıda bileşeni, koruyucu veya antikanser faaliyetleri açısından taranmıştır. Örneğin, yapılan bir çalışmada, piperinin kolon kanseri hücre dizisi olan HT29 hücrelerini etkilediği ve tümör hücresi çoğalmasını engelleyebileceği bildirilmiştir (Lin ve ark., 2021). Gallik asit (GA), doğada bulunan bir tür doğal polifenol bileşiğidir. Çin tıbbında geniş ölçüde kullanılan yeşil çay ve diğer bitkilerde yaygın olarak bulunur. Ayrıca GA'nın önemli ölçüde anti-inflamatuar ve antiviral etki gösterdiği belirtilmiştir (Lin ve ark., 2021).

Kanser hücreleri, çeşitli içsel ve dışsal strese maruz kaldığında, hayatta kalmaya devam etmek için birkaç adaptif yanıtı aktive eder. Bunlar arasında en önemlilerinden biri, yanlış katlanmış proteinlerin endoplazmik retikulumda (ER) birikmesi veya oksidatif stres gibi ER stresini indükleyen koşullar tarafından aktive edilen katlanmamış protein yanıtıdır (UPR) (Benedetti ve ark., 2022). UPR, birbirine bağlı olmasına rağmen üç bağımsız sensör tarafından başlatılan sinyal yolağı

tarafından yönetilir; inositol gerektiren enzim 1 alfa (IRE1- α), Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF-6). Ayrıca UPR, otofaji ve DNA hasar onarımı gibi kanser hücrelerinin hayatta kalmasında önemli bir rol oynayan diğer yollarla da etkileşimdedir (Benedetti ve ark., 2022). Normal şartlar altında, bu proteinler inaktif kalır ve glukoz regüle protein protein-78'e (GRP-78) bağlıdır. ER stresi sırasında, GRP-78 bu proteinlerden ayrılır. Ayrılan PERK ve IRE-1 homodimerize formlara dönüşmesi, bu proteinlerin otofosforilasyonuna ve aktivasyonuna yol açar (Zhang ve ark., 2013).

LGR5 (lösin açısından zengin tekrar içeren G-proteini ile birleştirilmiş reseptör 5), CRC'deki Wnt sinyal hedef genlerinden biridir ve β -katenin mutasyonu ile ilişkili karsinomun gelişiminde kritik olarak yer alır. LGR5, yaygın olarak bağırsak kök hücrelerinin bir belirteci olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, LGR5 ekspresyonu da dahil olmak üzere bağırsak kök hücre işaretlenmesi, CRC kök hücrelerini tanımlar ve CRC hastalarında hastalığın nüksetmesini öngörmektedir. Yüksek LGR5 ekspresyonunun kolorektal kanserde kötü bir prognostik belirteç olduğu belirtilmektedir (Abdelrahman ve ark., 2022).

Bu tez çalışmasında, deneysel kolon kanseri oluşturulan ratlarda GA'nın kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmede potansiyel etki mekanizmalarını ortaya koymak amacıyla, ER stres yolağındaki proteinleri araştırmak, in vivo hayvan deneyleri yoluyla olası mekanizmaları belirlemek ve intestinal kök hücresi üzerine olan etkisi farklılaşmayı olumlu yönde etkileyip kanser oluşumunu önleyici ya da tedavi edici olabilecek etkisini kök hücre üzerinde de değerlendirmek amaçlanmıştır.

1.1. Kolon Kanseri

İnsan hücreleri, vücudun ihtiyaç duyduğu normal koşullarda yeni hücreler oluşturmak için büyür ve bölünür. Hücreler yaşlandıklarında veya hasar gördüklerinde ölürler ve yerlerini yeni hücreler alır. Bu sürecin bozulması kanserin

nedenlerinden biridir. Kanser, vücudun bazı hücrelerinin birden çok kez bölündüğü ve çevre dokulara yayıldığı bir hastalık olarak seyreder ve vücudun herhangi bir yerinde başlayabilir (Wahab ve ark., 2021). Epidemiyolojik çalışmalar, ekonomik gelişme, modern yaşam tarzındaki değişiklikler, özellikle beslenme değişiklikleri ve artan nüfus yaşı ile kolorektal kanserin insidansı en hızlı artan malign tümörlerden biri haline geldiğini ve insan yaşamı ve sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturduğunu göstermiştir (Ji ve ark., 2018). Kolorektal kanserin erken evrelerinde hiçbir belirtisi olmayabilir. Bazı durumlarda ishal, kabızlık, dışkıda kan, rektumdan kanama, aşırı gaz, karın krampları ve karın ağrısı belirtileri olabilir (Wahab ve ark., 2021) . Kolorektal kanser en yaygın olarak kolon epitelinde başlar, polip-adenoma ve ardından karsinoma ilerler. Kolorektal kanserin, mukus astar yaralanmalarına neden olan bazı çevresel faktörler, sedanter yaşam tarzı ve sigara içme gibi çeşitli faktörler nedeniyle ilerlediği ve bunun sonucunda tümör baskılayıcı genlerin onkogenlerinin ekspresyonunun bozulduğu düşünülmektedir (Wahab ve ark., 2021). Yaş, sporadik kolon kanseri için değiştirilemez ana risk faktörü olarak kabul edilir; hastaların yaklaşık %70'i >65 yaşındadır ve bu hastalık, Batı kayıtlarından alınan verilere göre 40-44 yaş grubunda artan bir insidans göstermesine rağmen, 40 yaşından önce nadir görüldüğü belirtilmiştir (Argilés ve ark., 2020).

Aşağıdakilerden herhangi birine sahip bireylerin kolon kanseri açısından yüksek risk altında olduğu kabul edilip, aktif olarak taranmaları gerektiği Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği (ESMO) kılavuzlarında belirtilmiştir. Kalıtsal sendromlar söz konusu olduğunda da genetik danışmanlık için yönlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir (Argilés ve ark., 2020).

- Adenom, kolon kanseri, inflamatuvar barsak hastalığı (Crohn hastalığı ve ülseratif kolit) tıbbi öyküsü;
- Aile öyküsünde CRC veya adenomun olması;
- Ailesel adenomatöz polipozis koli ve varyantları (%1), Lynch ile ilişkili sendromlar (kalıtsal polipsiz kolon kanseri) (%2-%4), Turcot, Peutze

Jeghers ve MUTYH ile ilişkili polipozis sendromu gibi kalıtsal bir kanser sendromunun (tüm CRC'lerin %2-5'i) olması (Argilés ve ark., 2020).

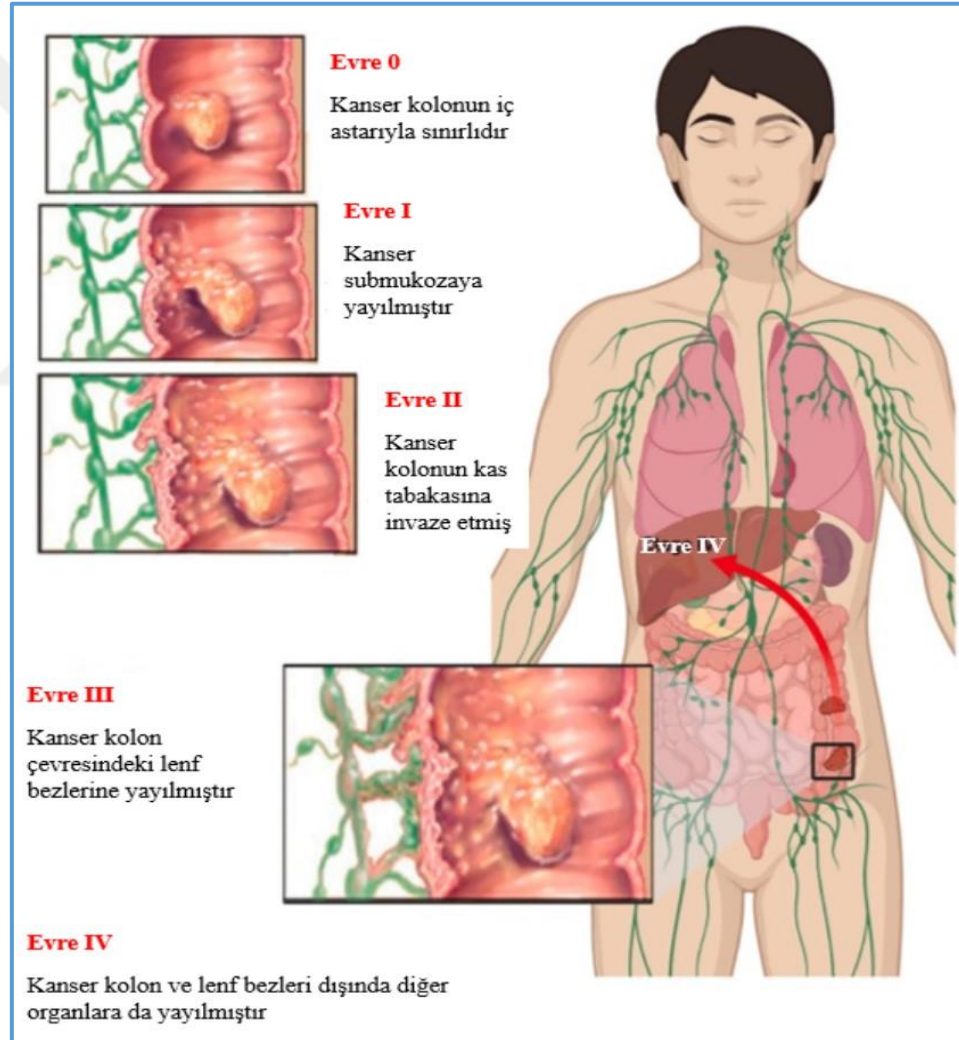
CRC, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Kolon mukozası, kritik bir bariyer ve önemli bir immün düzenleme alanı oluşturur. Bağışıklık sistemi, kanser gelişimi ve tedavisinde önemli roller oynar ve kronik enfeksiyon veya iltihaplanmanın neden olduğu bağışıklık aktivasyonunun kanser riskini arttırdığı iyi bilinmektedir. Tümör gelişimi sırasında, neoplastik hücreler, ilerleyici olarak immünoşüpresif hale gelen tümör mikroçevresi ile sürekli olarak etkileşime girer ve onu şekillendirir (Ruan ve ark., 2020).

Kemoterapi, kolon kanseri için en etkili tedavi olarak kabul edilir, ancak yüksek toksik etkileri hastanın yaşam kalitesini ciddi şekilde düşürdüğü için tatmin edici bir terapötik etki sağlamaz. Bu nedenle, doğal kimyasallardan yeni, güçlü, ancak düşük toksisiteli anti-kolon kanseri reaktiflerinin geliştirilmesi ilgi çekici bir hedef haline gelmektedir (Ji ve ark., 2018). Antioksidan diyet takviyeleri, hastalığın önlenmesinde olduğu kadar kanser hastalarının tedavisinde de önemli bir rol oynamaktadır. Nutrasötiklerin uygun kullanımıyla kişinin sağlığını korumak ve kolon kanserinden korunmak kabul edilebilir bir yaklaşımdır. Diyet takviyelerini tüketmek için en yaygın motivasyonlar, kanser semptomlarını hafifletmek ve gelecekteki hastalıkları önlemektir (Islam ve ark., 2022).

1.2. Kolorektal Kanser Neden Olduğu Yüksek Morbidite ve Mortalite Oranları

Kolorektal kanser dünya çapında erkeklerde üçüncü (totalin % 10'u) kadınlarda (totalin % 9.2'si) ise ikinci en sık görülen kanser türüdür (Vocka ve ark., 2019). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın 2018 yılı verilerine göre, CRC insidans açısından üçüncü, ölüm oranı açısından ise ikinci sırada yer almaktadır (Huang ve ark., 2021). Kolon kanseri hastalarının yaklaşık %25'ine evre IV kanser teşhisi konmuştur. Kolon kanseri olan hastaların diğer %25'ine ise erken evrelerde

teşhis konmaktadır. Ancak kanserleri yine de metastaza ilerler. Evre IV tümörlü hastalarda beş yıllık sağkalım oranının %10'dan az olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2022). CRC'nin küresel yükünün 2030'da yılda yaklaşık 2,2 milyon yeni vakaya ulaşması ve böylece %20'lik bir artış daha göstermesi beklenmektedir (Huang ve ark., 2021). Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanmış olan en son 2016 Türkiye Kanser İstatistikleri verilerine göre hem erkeklerde hem kadınlarda tüm yaş gruplarındaki en sık görülen üçüncü kanser türüdür. Ayrıca tedavisi en pahalı ve en sık rastlanan kanser türlerinden biri olan bağırsak kanseri için 12 bin dolar yıllık tedavi maliyeti bulunmaktadır (Türk Kanser Derneği, 2018).



Şekil 1.1. Gelişiminin çeşitli düzeylerinde kolon kanserinin patofizyolojisinin gösterimi (Wahab ve ark., 2021).

1.3. Kolon Kanseri Oluşumunda Beslenmenin Rolü – Gallik Asit Açısından Önemi

Kolon kanseri normal işleyen kolon epitelinin adenomatöz poliplere dönüşmesinden kaynaklanır. Epidemiyolojik ve bilimsel çalışmalar, kolorektal kanserin, gıda bileşenleri veya diyet tarafından indüklenen bağırsak mikrobiyotasının bileşiminin kademeli olarak bozulmasından ve ayrıca onkojenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki genetik değişikliklerden kaynaklandığını göstermektedir (O'Keefe, 2016). Etiyolojisinin kalıtsal, çevresel, diyet faktörleri ve fiziksel aktivite eksikliğinin bir kombinasyonu sonucu oluştuğu bilinmektedir (Subramanian ve ark., 2016). Mevcut durum göz önünde bulundurulduğunda, hastalığın patogenezi ve hastalık gelişimi sürecinde yer alabilecek faktörleri ele almak önemlidir. Dünya Kanser Araştırma Fonu / Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsü (WCRF / AICR) paneli, diyetle yüksek lif içeren gıdaların kolorektal kansere karşı koruyucu olduğunu, kırmızı ve işlem görmüş et ile alkol tüketiminin (özellikle erkeklerde) ise kolorektal kanser gelişme riskini arttırdığına yönelik bir rapor sunmuştur (Vece ve ark., 2015).

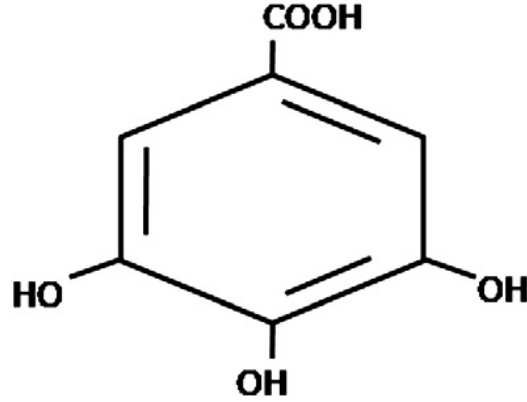
Diyette gıda alımında, sebze ve tıbbi bitkilerin tüketilmesinin, deney hayvanlarında ve insanlarda kanser riskini azalttığına yönelik çalışmalar mevcuttur. Bu bağlamda, yaygın diyet kaynaklarından türetilen, doğal olarak meydana gelen biyolojik olarak aktif polifenoller, potansiyel kanser terapötikleri olarak ilgi kazanmaktadır (Giftson ve ark., 2010). Böğürtlen, üzüm, erik, nar, yeşil çay, turpgiller, sebzeler, soya fasulyesi, domates, sarımsak, zerdeçal, zencefil, zeytin, kepekli tahıllar ve mantar ve nar gibi doğal kaynakların kullanımı apoptozu ve hücre döngüsü durmasını teşvik ederek kolon karsinogenezini gelişimini engelleyebilir. Bitkilerden, denizlerden ve diğer kaynaklardan elde edilen yaklaşık 35.000 bitkisel biyoaktif bileşik, kanseri tedavi etmek için kullanılan kemoterapi ve radyolojik terapi gibi modern teknolojinin kullanılmasının olumsuz etkilerini en aza indirir. Tıbbi bitkiler, CRC tedavisine yeşil bir yaklaşım olarak ilaçlardan alternatif sistemlere geçişte doğal ilaçlar için en güvenilir biyoaktif bileşikler kaynağıdır. Terpenoidler, saponinler, uçucu yağlar, flavonoidler, fenolikler, kinonlar ve alkaloidler, daha düşük

risk ve daha az yan etki ile CRC hücrelerine karşı güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Esmeeta ve ark., 2022).

Fenoliklerin serbest radikalleri temizleme kapasitesine sahip oldukları bildirilmiştir (Giftson ve ark., 2010). Serbest radikaller, hücresel bileşenlere, özellikle DNA'ya kalıcı olarak zarar vererek karsinogenezi tetikleyebilirler. Diyetteki antioksidanların başka mekanizmalar aracılığıyla da kansere karşı koruyucu olabileceğine dair kanıtlar da mevcuttur (Vece ve ark., 2015). Diyetteki farklı antioksidanlar sinerjik olarak yada en azından kanseri önlemek için ek olarak etkili olabileceğinden (Vece ve ark., 2015), diyetin kanser riski üzerindeki etkilerini araştırırken genel antioksidan alımını değerlendirmekte önemli görünmektedir.

Polifenoller ince bağırsakta emilebilir, ancak büyük çoğunluğu, polifenole bağlı olarak %50-99 arasında, bağırsak mikrobiyotası tarafından metabolize edilebilecekleri ve küçük fenolik asitler olarak kısmen emilebilecekleri kolona geçerler. Ayrıca, polifenoller bağırsak mikrobiyotasını hem miktar hem de tür olarak modüle edebilir. Dysbiosis adı verilen dengesiz bağırsak mikrobiyotası ise, polifenollerin hem metabolizmasını hem de Emilimini değiştirebilir ve ayrıca kolorektal kanserin patogenezi tetikleyerek anormal moleküler sinyale neden olabilir (Zamora-Ros ve ark., 2018). Deneysel kanıtlar, kolon kanseri gelişimine karşı belirli polifenollerin kemo-önleyici rolünü desteklemektedir. Kafeik asit ve ferulik asit gibi fenolik asitlerin in vitro ve in vivo araştırmalarda kolon kanseri üzerinde anti-proliferatif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Murphy ve ark., 2018). Bizde projemizde diyetel ajan olarak gallik asidin (3,4,5-trihidroksibenzoik asit, GA) ratlarda oluşturacağımız deneysel kolon kanseri modelinde adenokarsinom gelişimini önleyici etkinliğinin olup olmadığını araştırmayı amaçlamaktayız.

Gallik asit; safra, çay yaprakları, ağaç kabuğu, yeşil çay, elma kabukları, üzüm, çilek, ananas, muz, limon, kırmızı ve beyaz şarap gibi çeşitli doğal ürünlerde bulunabilen bir polihidroksifenolik bileşiktir (Giftson ve ark., 2010).



Şekil 1.2. Gallik asidin (3,4,5-trihidroksibenzoik asit) kimyasal yapısı (Giftson ve ark., 2011).

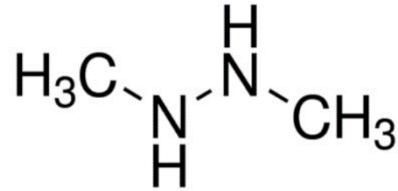
Yapılan çalışmalar, GA'nın prostat, akciğer, lösemik ve meme kanseri dahil olmak üzere kanser hücre dizilerinde hücre ölümüne neden olabileceğine dair bilgiler vermektedir. GA'nın farklı kanser türlerindeki anti-kanser potansiyeli, apoptoz, anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi kanserin farklı yönlerine karşı inhibe edici etkilerini gösteren bazı in vitro ve in vivo çalışmalarda belirtilmiştir. Mevcut literatür, GA'nın kemopreventif bir ajan olarak kanser tedavisinde kullanımını desteklemektedir (Jiang ve ark., 2022).

GA anti-inflamatuvar ve anti-mutagenik özelliklere sahiptir ve kanser hücrelerine karşı sitotoksikite gösterir. Bir serbest radikal temizleyici olarak tümör hücrelerinde farklılaşmanın ve programlanmış hücre ölümünün bir indükleyicisi olarak tanımlanmıştır (Giftson ve ark., 2011). Ayrıca literatürde GA'nın in vitro kolon kanseri hücreleri üzerine etkisini araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur (Jakobsen ve ark., 2008; Subramanian ve ark., 2016; Rosman ve ark., 2018). Ancak in vivo olarak GA'nın kolon kanserine etkisini araştıran az sayıda çalışma literatürde yer almaktadır (Giftson ve ark., 2010, 2011). Bu çalışmalarda da GA'nın kolon dokusunda antioksidan / oksidan parametreleri nasıl etkilediğine ve ksenobiyotik metabolizması enzimleri üzerine olan etkisine bakılmıştır. Bu iki çalışmanın sonucuna göre de; GA'nın 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ile indüklenen kolon karsinogenezinde önemli bir kemopreventif etki uyguladığı sonucuna varılmıştır. 2019 yılında total deney süresinin 15 gün olarak tasarlandığı bir çalışmada; 14 gün

boyunca günlük 25 ve 50 mg/kg GA olmak üzere iki farklı doz iki ayrı gruba verilmiş ve 14. günde tek doz olarak 40 mg/kg DMH uygulandıktan sonra 15. günde sakrifiye işlemi gerçekleştirilmiş ve çalışmada GA'nın DMH ile kolon toksisitesi oluşturulan ratlardaki etkisine bakılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, GA takviyesinin, Wistar ratlarının kolonunda DMH'nin neden olduğu oksidatif stres, inflamasyon, proliferasyon, apoptoz, müsin azalması ve goblet hücresi parçalanmasını iyileştirmede faydalı olduğunu göstermiştir (Shree ve ark., 2020).

1.4. Ratlarda Deneysel Kolon Kanseri Oluşturma Modeli

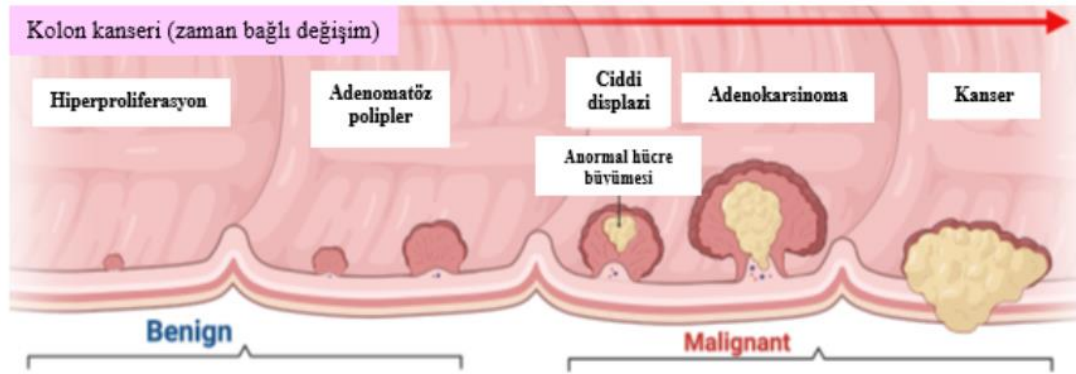
1,2-dimetilhidrazin (DMH), karaciğerde metabolize edilen ve oksidatif strese yol açtığı bilinen elektrofilik diazonyum iyonu üretimiyle sonuçlanan güçlü bir kanserojendir. DMH, DNA bazlarına metil eklenti oluşumunu, nokta mutasyonları ve makroskopik olarak görünür neoplazmlar oluşumunu indükleyen DNA'yı hedefleyen kolona özgü bir kanserojendir. Kolon adenomları genellikle polip şeklinde bulunur. Aberran kript odakları preneoplastik lezyonlardır ve insan sporadik kolon karsinomunda görülenlere çok sayıda benzerlik gösteren kolorektal kanserin öncüleridir. Bu nedenle, deneysel modellerde DMH indüksiyonunun neden olduğu aberran kript odakları oluşumu ve büyümesi, kolon karsinogenezinin modülatörlerini tanımlamak için güçlü bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Giftson ve ark., 2010; Sivaranjani ve ark., 2016; Darband ve ark., 2020).



Şekil 1.3. 1,2-dimetilhidrazinin kimyasal yapısı (Yao ve ark., 2021).

Wistar ratlarda DMH uygulanmasının kısa ve uzun süreli etkisinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; 2 hafta boyunca haftada 2 kez 40 mg/kg subkutan

enjeksiyonla DMH uygulanan ratlar, 4. ve 30. hafta sonunda sakrifiye edilmiştir. Bu iki gruptaki ratlarda aberran kript odakları (ACF) oluşumu karşılaştırılmıştır. 4. hafta sonundaki deneyde, ratların kolonunda % 91.5 bir veya iki, % 8.5 ise üç veya daha fazla kript oluşurken, 30. hafta sonunda ise % 46.9 üç veya daha fazla kript olduğu gözlenmiştir. Böylece, 4. haftadan 30. haftaya kadar çoklu kriptlerden oluşan bir ACF ilerlemesi bildirilmiştir. Ayrıca 30. hafta sonunda 10 sıçandan 8'inde 9 adet iyi diferansiye adenokarsinom bulunmuştur. Mevcut veriler, kısa vadeli (4 hafta) deneyde ACF'nin DMH tarafından indüklenmesinin, orta vadeli (30 hafta) deneyde iyi farklılaşmış adenokarsinomlardaki gelişme ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Rodrigues ve ark., 2002). Literatürde de bu haftalar aralığında (4-30 hafta DMH uygulayıp, gelişimini bekleyen çalışmalar yer almaktadır (Christudoss ve ark., 2018; Ganaie ve ark., 2019; Giftson ve ark., 2011; Sharma ve ark., 2017). Bizde projemizde literatürdeki bu verileri göz önüne alarak, deney protokolümüzü şekillendirdik.



Şekil 1.4. Zamana bağlı kolorektal kanser gelişimi (Wahab ve ark., 2021)

1.5. ER Stresinin Kolon Kanseri Patogenezindeki Yeri

Endoplazmik Retikulum (ER), granüllü (Contreras ve ark., 2018) ve düz (Casanova-Marti ve ark., 2020) olmak üzere ökaryotik hücrelerde protein sentezi, katlanması, ayrılması ve taşınmasından sorumlu olan temel bir organdır. Hücresel proteinlerin yaklaşık üçte biri, uygun hücre içi veya hücre dışı lokasyonlarına ulaşmadan önce rER'da işlenmek üzere hücresel protein trafiğine girer (Wang ve

ark., 2018). Salgı proteinleri, rER'de bulunan membrana bağlı ribozomlar tarafından sentezlenir ve daha sonra ER lümenine taşınır. ER, protein katlanması ve kalite kontrolü yaparak işlev görür. ER lümeni, özel şaperon ve enzimlere sahip protein katlanması sırasında disülfid bağlarının oluşumunu destekleyen özgün bir oksitleyici ortam sağlar (Wang ve ark., 2018). ER sadece temel hücresel fonksiyonlar için hayati önem taşımaz, aynı zamanda hücre içi ortamı izleyerek metabolik ve stres yanıtlarını buna göre ayarlayan homeostatik bir cihaz olarak görev alır (Storm ve ark., 2016). Katlanmamış proteinlerin birikmesi (örneğin protein salgılanması yüksek olduğunda), ER Ca^{+2} seviyelerindeki dengesizlik, glukoz yoksunluğu veya hipoksi gibi stresli koşulların hepsi ER stresi olarak adlandırılarak ER fonksiyonunun bozulmasına yol açabilir (Storm ve ark., 2016). ER homeostazını ve normal hücresel fonksiyonu eski haline getirmek için sinyal iletim yolları etkinleştirilir. Bununla birlikte, stres çözülemezse, sağkalım sinyali hücre ölümü ile sonuçlanan pro-apoptotik bir sinyale geçer. Bu olası sonuçların her ikisine de katlanmamış protein yanıtı (UPR) (Subramanian ve ark., 2016) adı verilen yüksek derecede entegre sinyal iletim yollarının düzenlenmesi aracılık eder (Storm ve ark., 2016). UPR sensörü olarak 3 transmembran protein tanımlanmıştır. Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ve inozitol gerektiren enzim 1α (IRE1 α)'dır. Aktivasyon üzerine, bu ER sensörleri, ER homeostazisini eski haline getirmek için düzeltici eylemleri ortaya çıkaran sinyalizasyon kademelerini başlatır. Memeli hücrelerinde, UPR sinyalizasyonuna aracılık eden üç yolak vardır: IRE1 α -XBP1, PERK-ATF4-CHOP ve ATF6 yolaklarıdır (Wang ve ark., 2018).

Hücreler, protein katlama kapasitesini ayarlayabilmek ve adaptif tepkilerle cevap verebilmek için protein katlama durumunu gözetim altında tutarlar. Başka bir deyişle, protein kalite kontrol substratlarını hedefleyen bu mekanizma, hücrelerin, yeni oluşan zincirin katlanma durumundan ziyade translasyon durumunu algıladığından, anormal proteinleri tanımak için kullandıkları kodu genişletir (Gao ve ark., 2022). IRE1 α , UPR'nin dinamik sinyalleşmesini düzenler. Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinleri hücrelerde biriktirdikten sonra, IRE1 α , GRP78'den ayrılarak IRE1 α 'nın dimerizasyonunu ve trans-otofosforilasyon mekanizmalarını tetikler (Gao ve ark., 2022). Mevcut kanıtlar, kinazın aktif bölgesinde ATP veya

ADP'nin bağlanmasıyla RNaz alanının trans-otofosforilasyonuna ve allosterik aktivasyonuna izin verdiği için oligomerizasyonun IRE1 için çok önemli olduğunu göstermektedir. Aktivasyon üzerine, IRE1 α , transkripsiyon faktörü X-box bağlayıcı protein 1'i (XBP1) kodlayan mRNA'dan 26 çift baz çifti fragmanını ayırarak XBP1'i inaktif formdan aktif forma çevirir (Gao ve ark., 2022). İnaktif XBP1, proteazomlar tarafından hızla parçalanmış kısa ömürlü bir proteindir. Temel bir lösin bölgesi fermuarı transkripsiyon faktörü nedeniyle, XBP1'ler protein katlanmasını, salgılanmasını ve fosfolipid sentezini kontrol edebilir. ER şaperon protein kodlamasının düzenlenmesi ile XBP1'ler, ER boşluğundaki protein degradasyonunun bir üyesidir ve yaygın olarak UPR aktivasyonunun göstergesi olarak kullanılır (Gao ve ark., 2022).

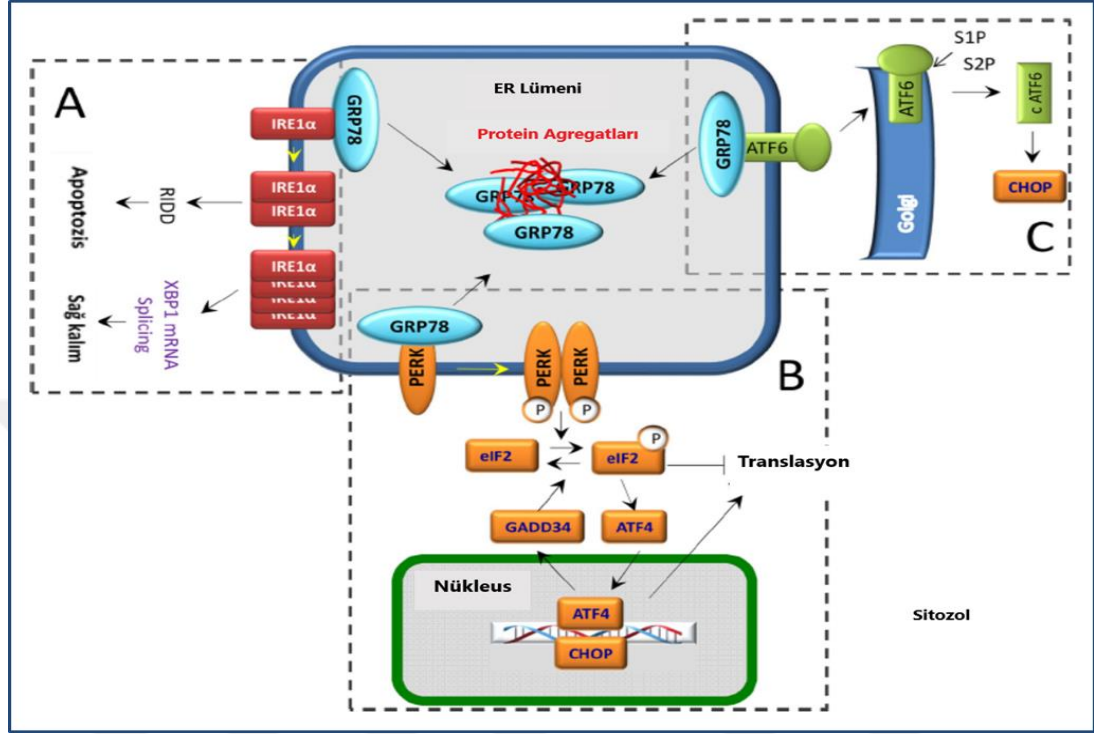
Normal fizyolojik koşullar altında, bu transmembran proteinleri immunglobulin protein bağlayıcı (BiP) tarafından inaktif bir konfigürasyonda tutulur. Yanlış katlanmış proteinlerin veya UPR'yi aktive edebilen diğer uyarıların birikmesi üzerine BiP olarak da bilinen glukozla düzenlenen protein 78 (GRP-78), ER sensörlerinden ayrılır ve bunun yerine ER lümenindeki katlanmamış proteinlere bağlanır. ER stres sırasında GRP-78'in ayrılması, IRE-1 α ve PERK'in otofosforilasyonuna yol açarken ATF-6 ise posttranskripsiyonel modifikasyona uğrayarak golgiye gönderilir. IRE-1 α ve PERK'in aktivasyonu, gen ekspresyonunda değişikliklere ve hücrede karşılık gelen fenotipik tepkilere yol açan akışındaki transkripsiyon faktörlerini de aktive eder (Storm ve ark., 2016). UPR sinyali, salgı yolunun hemen hemen her yönünde yer alan proteinlerin ekspresyonunu indükleyerek homeostazı geri kazanmayı amaçlamaktadır. Gen ekspresyon verileri, UPR'nin ER'ye protein girişi, katlanma, glukozilasyon, ER ile ilişkili degradasyon (ERAD), protein kalite kontrolü, redoks metabolizması, otofaji, lipid biyogenezi ve veziküler trafik işlemlerinde rol oynadığını göstermiştir (Storm ve ark., 2016).

İkinci sensör olan PERK, esas olarak protein translasyonunu zayıflatarak ve oksidatif stresi düzenleyerek UPR'ye katılır. PERK, antioksidan proteinleri indükleyen transkripsiyon faktörü NRF2'yi fosforile eder ve aktive eder. Ek olarak, PERK ökaryotik başlama faktör 2 α 'yı (eIF2 α) fosforile eder. Fosforillenmiş

eIF2 α 'da, mRNA translasyonunun erken basamaklarında işlev görür (Iurlaro ve Muñoz-Pinedo, 2016). Alfa alt biriminin fosforilasyonu üzerine translasyonel azalma olur. Ama bununla birlikte, dahili ribozomal giriş bölgelerine sahip mRNA'lar, bu koşullar altında yine de translasyona uğrar. ATF-4, eIF2 α inhibe edildiğinde indüklenen ve translasyona uğrayan bir transkripsiyon faktörüdür. ATF-4, protein sentezi ve salgılanmasında, amino asit sentezinde ve taşınmasında ve antioksidan stres yanıtlarında rolleri olan genleri indükler (Iurlaro ve Muñoz-Pinedo, 2016). ATF-4 ayrıca hücre ölümünün indüklenmesinde rol oynadığı biline ikinci bir transkripsiyon faktörü olan CHOP proteinini de indükler. Bu protein ayrıca eIF2 α 'ya özgü bir fosfataz kompleksinin düzenleyici bir alt birimi olan büyüme durdurma ve DNA hasarı ile indüklenebilir proteinin (GADD34) sentezini uyararak homeostazın geri kazanılmasına da katılır (Chen ve ark., 2022; Iurlaro ve Muñoz-Pinedo, 2016). PERK'nin yanı sıra diğer kinazların da eIF2 α 'yı fosforile ettiği gösterilmiştir. Bu eIF2 α /ATF4/CHOP yolağı besin açlığı gibi bazı uyanların kinazları paralele olarak devreye sokmasıyla genel olarak entegre stres tepkisi oluşturduğu bilinmektedir (Iurlaro ve Muñoz-Pinedo, 2016).

ATF-6, ER'de bulunan ve lösin fermuar transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesi olan bir transmembran proteinidir. ATF-6'nın 50 kDa aktif formu, ER stresıyla ilgili sinyal iletimindeki rolüyle bilinir (Chen ve ark., 2022). Memeliler iki homolog ATF-6 proteini olan; ATF-6 α (670 amino asit) ve ATF-6 β (703 amino asit) yer alır. Birincisinin biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri, ikincisinden önemli ölçüde daha iyidir. ATF-6 izoformlarının C-terminali ER'nin lümenine uzanırken, N-terminali sitoplazmaya bakar. ATF-6'nın sitoplazmik kısmı, temel lösin fermuar DNA bağlama ve transkripsiyon aktivasyon alanını ve ardından 20 amino asitlik bir transmembran alanını içerir. İlginç bir şekilde, ATF-6 α ve ATF-6 β önemli sekans homolojisine sahip olsa da, bu izoformlar farklı transkripsiyon aktivasyon alanları sergilemektedirler. Aslında, ATF-6 α güçlü bir transkripsiyon aktivatörü iken, ATF-6 β (zayıf bir transkripsiyon aktivatörü) ATF6 α 'nın aktivasyonunu inhibe edebilir (Chen ve ark., 2022). Grp78'den ayrıldıktan sonra, ATF-6 Golgi aparatına taşınır ve nükleusa aktarılabilen aktif bir transkripsiyon faktörü oluşturmak üzere regüle edilmiş intramembran proteolizler, proteazlar (Site1/S1P ve Site2/S2P), tarafından

etkinleştirilir. Aktif ATF-6, CHOP, şaperon ve ERAD bileşenlerinin ifadesini indükleyebilir (Chen ve ark., 2022; Iurlaro ve Muñoz-Pinedo, 2016).



Şekil 1.5. UPR sinyalizasyonuna aracılık eden yollar (Wang ve ark., 2018).

Hem ER stresi hem de UPR, insan kolon adenokarsinomu da dahil olmak üzere tümörlerin gelişiminde rol oynamaktadır (Piton ve ark., 2016). UPR'nin aktive olduğu tümörlerin tedaviye daha dirençli, daha agresif ve daha erken nüksettiği görülmektedir. Aksine, UPR bozukluğu olan tümörler büyümeye daha az eğilimlidir. Piton ve ark.'nın ER stresi, UPR ve kolon adenokarsinomu gelişimi üzerine yaptıkları bir çalışmada, BiP ekspresyonu ile kolon karsinogenezi arasında pozitif, CHOP ekspresyonuyla ise negatif bir korelasyon tespit etmişlerdir. Bu bulgular ile ER stresinin onkogeneze eşlik ettiği ve CHOP gibi ER stresinin toksisitesine aracılık eden protein kaybının tümör oluşumunu kolaylaştırabileceği yönünde bir model oluşturduğu yorumuna gitmişlerdir (Piton ve ark., 2016).

GRP78 indüksiyonu ve UPR aktivasyonu, onkojenik ilerlemede önemli bir rol oynamaktadır, bu nedenle kanser hücrelerinin hayatta kalmak için UPR sinyal yollarına bağlılığının arttırılması, kanser karşıtı araştırmalarda kullanılabilir (Sharma ve ark., 2018). GRP78'in aşırı ekspresyonu, dünyadaki en yaygın üçüncü kanser olan kolon kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde tespit edilmiş (Chang ve ark., 2015) ve patogeneze katıldığı çalışmalarda gösterilmiştir (Takahashi ve ark., 2011). PERK veya IRE-1α'nın enzimatik aktivitesinin küçük molekülü inhibitörleri, çeşitli klinik öncesi kanser modellerinde etkinlik göstermiştir. UPR'nin IRE-1α / XBP1 yolağı, anjiyogenezi ve kanser hücresi çoğalmasını teşvik etmek için triple negatif meme kanserlerinde Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1α (HIF-1α) ile sinerji gösterdiği bildirilmiştir (Hetz ve ark., 2020).

Solid tümörler ve metastatik türevleri hipoksi, besin yoksunluğu, laktik asidoz ve oksidatif stresle birlikte ER stresine ve fonksiyonunun azalmasına yol açar. Birçok açıdan UPR, kanser hücrelerinin çok olumsuz koşullarda hayatta kalmasını sağlayarak tümör büyümesini destekleyen bir sitoprotektif mekanizma olarak görülebilir. Başka bir bakış açısından da, UPR hücre ölüm yollarını başlatarak konağın korunmasına hizmette edebilir. UPR sinyalizasyonu, anjiyogenez, invazyon, mitokondriyal fonksiyon, hücreler arası iletişim ve tümörle ilişkili inflamasyon dahil olmak üzere tümör hücresi biyolojisinin çeşitli yönlerinde belirtilmiştir (Storm ve ark., 2016). Ayrıca inflamasyon ve ER stres yolağı arasında, çeşitli hastalıkların progresyonunu ve patolojisini etkileyebilecek sıkı bir bağ vardır. ER stresıyla indüklenmiş inflamasyon, tip 2 diyabet ve obezitenin progresyonuna yardımcı ve Crohn hastalığı ile ülseratif kolitte inflamatuvar bağırsak hastalığının ilerlemesine neden olabilir. Ek olarak, proinflamatuvar diyetler (yani antioksidan içeriği düşük karbanhidratı zengin) artmış CRC riski ile ilişkilendirilmiştir (Mokarram ve ark., 2017).

1.6. HIF-1 α 'nın Kolon Kanseri Patogenezindeki Yeri

HIF-1 transkripsiyon faktörü, hipoksiye adaptasyon cevabının gelişiminde anahtar rol oynayan düzenleyici bir proteindir. Normoksik koşullarda HIF-1 α alt ünitesi ubiquitinasyon yolu ile proteozomda degrade olur (Semenza, 2002). HIF-1 α , HIF-1 β ile sırasıyla HIF-1'den dimerize olur. HIF-1 α alt birimi, büyük ölçüde oksijen konsantrasyonu tarafından düzenlenir ve hipoksi belirteci olarak hizmet eder. Normal oksijen koşullarında HIF-1 α ; aktivite için oksijen, demir iyonu ve 2-oksoglutarat gerektiren prolin hidrosilazlar tarafından hidrosile edilir. Hidrosile edildikten sonra, HIF-1 α , E3 ubiquitin ligaz aktivitesi yoluyla onu proteasomal bozunmaya yönlendiren, HIF-1'in negatif bir düzenleyicisi olan Von Hippel-Lindau tümör baskılayıcıya (pVHL) hızla bağlanır (Mi ve ark., 2022). Hipoksik koşullar altında ise HIF-1 α , DNA üzerindeki “hipoksi cevap elemanı” olarak tanımlanan özgül diziye bağlanır ve hedef genlerin ekspresyonunu tetikler. HIF-1 α , fizyolojik ve patolojik süreçlerde tümör büyümesinde de olduğu gibi O₂ homeostazının merkezi bir düzenleyicisidir (Semenza, 2002).

İlaç direnci, kanser tedavisinde kemoterapinin etkinliğini sınırlayan önemli bir sorundur ve katı tümörlerin çoğu kemoterapi veya radyoterapiye direnç geliştirir. Hipoksiye bağlı HIF-1 α 'nın stabilizasyonu bu süreçte rol oynar. HIF-1 α aşırı ekspresyonu, akciğer, pankreas, mide ve kolon da dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde gözlemlenmiştir (Semenza, 2002; Zhong ve ark., 1999) ve ayrıca HIF-1 α ilaç akış proteinlerinin aktivasyonu, apoptoz ve yaşlanmanın inhibisyonu yoluyla kemorezistansı artırabilir (Wei ve ark., 2020). Önceki çalışmalar, HIF-1 α 'nın aşırı ekspresyonunun, birden fazla hipoksi ile indüklenebilir genleri yukarı regüle edebildiğini bulmuştur. HIF-1 α , hipoksik ortam altında transkripsiyonel aktiviteye sahip bir tür nükleer proteindir ve tümör hücrelerinin hızlı çoğalması nedeniyle aşırı eksprese edilir (Chai ve ark., 2022). Zhou ve arkadaşları, HIF-1 α 'nın histolojik derecelendirme yapılan, tümörün özellikleri-lenf nodu-metastaz (TNM) evrelendirilmesinin kolon kanserli hastalarda yüksek tanısal ve prognostik değer gösterdiğini bulmuşlardır (Chai ve ark., 2022; Zhou ve ark., 2020). Plazma HIF-1 α , potansiyel olarak vasküler duvar hipoksisinin veya aterosklerozun boyutunu temsil

edebilecek bir biyobelirteçtir. Bazı tümörlerde dahil olmak üzere diğer patolojik durumlarla ilişkili hipoksinin ciddiyetini de yansıtabilir (Heikal ve ark., 2018). İn-vitro ve in-vivo endotel hasarın ardından HIF-1 α ekspresyonu ve salımının değerlendirildiği yakın zamanlı bir çalışmada, Karotis arterinde balon yaralanması modeli uygulanmış olan ratlarda, dolaşımdaki HIF1 α 'nın arter duvarında indüklenen hipoksiyi yansıttığı bildirilmiştir (Heikal ve ark., 2018). Sabry ve ark.'nin koleraktal karsinomlu hastalarda yakın zamanlı yaptıkları bir çalışmada, VEGF ve HIF-1 α düzeylerini Elisa yöntemiyle ölçmüşler ve kontrollere kıyasla adenokarsinom ve adenom hastalarında plazma düzeylerini önemli ölçüde yüksek bulmuşlardır (Sabry ve ark., 2019). Literatürde plazma HIF-1 α seviyelerinin Elisa yöntemiyle düzeylerinin belirlendiği sınırlı sayıda çalışma yer almaktadır. Bizim çalışmamızda kolon kanseri oluşturulan ratlarda HIF-1 α seviyelerinin hem tanıda hem de GA ile tedavi sonrası düzeylerinin değerlendirileceği ilk çalışmadır.

1.7. Midkinin Kolon Kanseri Patogenezinde ve Literatürdeki Yeri

Midkine (MK) ilk olarak 1988'de embriyogeneze yer alan retinoik asit duyarlı genin ürünü olarak tanımlanmıştır (Yazihan ve ark., 2022). Hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve yer değiştirme gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynayan heparin bağlayıcı bir büyüme faktörüdür. Bu tipik büyüme faktörü aktivitelere ek olarak MK, fibrinoliz, kan basıncı, konakçı savunması ve diğer süreçlerle ilgili başka aktiviteler de göstermektedir. Birçok hücre yüzeyi reseptörünün MK'nin çoklu biyolojik aktiviteleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. MK ekspresyonu birçok insan karsinomunda sıklıkla artan bir büyüme faktörüdür. Ayrıca, kan MK düzeylerinin hasta sonuçları ile yakından ilişkili olduğu belirtilmiştir. MK'nin parçalanması ve blokajı, tümör oluşumunu ve tümör gelişimini baskılar. Bu nedenle MK, kanser tedavisi için bir tümör belirteci ve moleküler bir hedef olarak görülmektedir (Sakamoto ve Kadomatsu, 2012).

Midkin, inflamatuvar yanıtları modüle edebilir. Lökosit göçünü artırarak, kemokin sentezini uyararak ve T regülatör hücrelerinin gelişimini önleyerek enflamasyonu indükler (Marpaung ve ark., 2018).

Krzystek-Korpacka ve ark.'nin yaptığı çalışmada, kolon kanseri tanısı almış hastalarda, kanserli ve normal dokudaki midkin seviyeleri karşılaştırılmış ve ortalama midkin seviyesinin kanserli dokuda anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (Krzystek-Korpacka ve ark., 2012). Çalışma sonucuna göre aynı zamanda kanserli dokudaki midkin seviyesi tümör boyutu ile negatif korelasyon gösterirken, serum midkin konsantrasyonları ile pozitif korelasyon eğilimi göstermiştir (Krzystek-Korpacka ve ark., 2012). Yakın zamanlı bir çalışmada CRC'li hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda serum MK düzeylerine bakılmış ve CRC'li hastalarda serum MK düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Kemper ve ark., 2020). Ji ve ark.'nın yaptığı çalışmada, kötü huylu rektal kanserli hastalarda ameliyat öncesi serum MK ve CEA seviyelerinin iyi huylu rektal polipleri bulunan hastalara ve sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur (Ji ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda kolon kanseri oluşturulan ratlarda serum midkine seviyelerinin hem tanıda hem de GA ile tedavi sonrası düzeylerinin değerlendirileceği ilk çalışmadır.

1.8. Oksidatif Stres Parametrelerinin Kolon Kanseri Patogenezinde ve Literatürdeki Yeri

Kötü beslenme, sedanter yaşam tarzı, obezite, aşırı alkol tüketimi, sigara ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları (ülseratif kolit, Crohn hastalığı) gibi birçok faktör ve ayrıca kalıtsal ve genetik faktörler ile bunların yanı sıra reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi CRC gelişiminin ileri sürülen mekanizmalarından biri olan redoks dengesinin bozulmasına ve oksidatif strese yol açar (Janion ve ark., 2022). Serbest oksijen radikallerinin oluşumu hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerin sonucudur. Oksijen metabolizmasında, moleküler oksijenin H₂O'ya dört elektronla indirgenmesi mitokondriyal solunum zincirinde gerçekleşir. Bununla birlikte, solunum zincirinin

etkinliğinin yaklaşık %96-99 olduğu tahmin edilmektedir. Bu, geri kalan yaklaşık %1-4'ün yalnızca kısmi indirgenmeye tabi olduğu anlamına gelir. Bu tür reaksiyonların ürünleri, süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalini içeren reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılır. Fizyolojik koşullar altında, ROS, antioksidan savunma mekanizmaları tarafından hızla nötralize edilir. Ancak patolojik durumlarda redoks dengesi bozulabilir ve oksidatif stres oluşabilir (Janion ve ark., 2022).

Oksidatif stres, ROS üretimi ile vücudun kendini detoksifiye etme ve serbest radikaller de dahil olmak üzere ROS'un neden olduğu hasarı onarma yeteneği arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Artan oksidatif stres, hücresel yapıların stabilitesi için bir tehdittir. ROS fazlalığının sonucu, nükleik asitler, proteinler ve lipitler gibi makromoleküllerin hasar görmesi ve vücudun metabolik aktivitesinin bozulmasıdır ve CRC hastaları da dahil olmak üzere birçok hastalığın gelişmesine yol açabilmektedir (Janion ve ark., 2022). Aşırı ROS üretimi kanserde de gözlenir; bununla birlikte, kanser hücrelerinde oksidatif stresi tetiklemekten sorumlu mekanizmalar tam olarak keşfedilmemiştir. ROS, DNA hasarını indüklemeye, apoptozu inhibe etmeye ve malign hücrelerin çoğalmasını ve metastazını teşvik etmeye yer alabilir. Prooksidan-antioksidan homoeostazı, öncelikle endojen enzimatik mekanizmalar yoluyla sağlanır; bununla birlikte yaşam tarzı, diyet, ilaçlar, besin takviyeleri ve stres gibi dışsal faktörler de redoks dengesinin sürdürülmesinde önemlidir (Mandal, 2017).

Kolorektal kanser patolojisinde sıklıkla kalıcı oksidatif strese sebep olarak; DNA hasarına, kansere bağlı genlerde mutasyonlara ve tümör baskılayıcı genlerin epigenetik susturulmasına yol açar. Böyle bir genomik instabilitenin sonucu olarak da ROS'un ve reaktif azot türlerinin (RNS) hücresel aşırı üretimi gerçekleşebilir ve oksidatif DNA hasarı ROS kaynaklı karsinogeneze katılabilir (Giftson ve ark., 2010). Yapılan önceki çalışmalarda oksidatif stresin tiroid (Wang ve ark., 2011), servikal (Srivastava ve ark., 2009) ve prostat kanserlerinin (Eroğlu ve ark., 2013) oluşumu ve gelişimi ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte oksidatif stresin biyobelirteçleri ile kolorektal kanser oluşumu ve gelişimi arasındaki ilişkiyi araştıran

Çalışmalarda mevcuttur (Leufkens ve ark., 2012). Total oksidan seviye (TOS) genellikle vücutun genel oksidasyon durumunu, benzer şekilde total antioksidan seviye (TAS) ise vücutun genel antioksidan durumunu ölçmek için kullanılır. Oksidatif stres indeksi (OSİ); TOS'un TAS'a oranıdır. Bu oksidatif stres parametreleri, vücuttaki genel oksidatif stres durumunu değerlendirmek için kullanılır. Bu yüzden çalışmamızda genel oksidan/antioksidan durumu TAS ve TOS parametreleriyle birlikte değerlendirdik.

1.9. LGR5 Proteininin Kolon Kanseri Patogenezindeki ve Literatürdeki Yeri

Bağırsak kriptinin (bağırsak bezi) ve bağırsak villusunun dış yüzeyi veya epitelyumu, enterositler, goblet hücreleri ve enteroendokrin hücreler gibi çok sayıda terminal olarak farklılaşmış hücre tiplerini içerir. Normal şartlar altında, her 2-7 günde bir, geçen besinler tarafından sürekli olarak yıprandığı için bu hücrelerin yerini alacak yeni epitel oluşur. Bu rejenerasyon, kriptin bazal kısmındaki proliferasyon, migrasyon ve farklılaşmaya uğrayan multipotent kök hücreler tarafından sürdürülür (Jahanafrooz ve ark., 2020). Proliferasyondan farklılaşmaya giden yoldaki herhangi bir yanlış düzenleme, kontrolsüz hücre bölünmesine ve tümör oluşumuna yol açabilir. Bununla birlikte, kript tabanında bulunan telomeraz aktivitesine sahip kolon kök hücrelerinin proliferasyonu, sapmaya daha yatkındır (Jahanafrooz ve ark., 2020). Stres bağırsak iskemisi gibi, bağırsak epitel hücre soyuna, özellikle kök hücrelere zarar verebilir, dolayısıyla normal homeostazı ve bağırsak bariyer fonksiyonunu bozabilir. Her bir kript bazında 4 ila 6 kök hücre, daha sonra bağırsak homeostazının sürdürülmesini sağlayan geçiş bölgesinde epitel progenitör hücreler üretir. Bağırsaklar da dahil olmak üzere bazı organlardaki kök hücrelerin strese yanıt verdiği ve hasarların tekrar iyileşmesini sağladığı gösterilmiştir (Dong ve ark., 2020).

Lösince zengin tekrar içeren G-protein bağlı reseptör 5 (LGR5); ince bağırsak, kolon ve karaciğer dahil birçok doku/organda kanser kök hücresi belirteci

olarak potansiyel bir ilgi uyandırmaktadır (Cao ve ark., 2020). Kolon kanseri kök hücrelerinin çoğunlukla, LGR5+ hücre yüzeyi belirtecine sahip bağırsak kök hücrelerinden türetildiği bildirilmiştir (Jahanafrooz ve ark., 2020). Kolon ve bağırsakta, LGR5 kök hücre havuzu, fonksiyonel epitel hücrelerinin kaybını telafi etmek için sürekli olarak çoğalır ve olgun hücre tiplerine farklılaşır. Ayrıca, bu LGR5 kök hücreleri, bağırsak kanserinden köken alan kanser hücreleri olarak onkogeneze sürecine de katılırlar. LGR5; kolon kanseri, bağırsak kanseri ve bazal hücreli karsinomda kanser kök hücrelerini işaretler. Bağırsak adenomunun yanı sıra malign karsinomda, LGR5 hücreleri sürekli olarak tümör hücrelerinin %5-10'unu oluşturur ve tümör büyümesini tetikler (Cao ve ark., 2020). Spekülatif bir açıklamaya göre tümörlerin LGR5-pozitif kök hücrelerinden türediği, ancak bu hücrelerin daha sonra tümör ilerlemesi sırasında bastırıldığı şeklindedir. LGR5 kanser kök hücrelerinin hangi evrede hedefleneceğini belirlemede bu dinamikler önemli olabilir. Yerleşik tümörlerden LGR5 hücre ablasyonu gerçekleştirildiği zaman, bu evredeki vazgeçilebilir fonksiyonlarının yanı sıra LGR5 hücrelerinin yüzdesinin düşük olmasına bağlı olarak küçük bir etki gözlemlenmiştir, ancak erken evredeki deplesyon optimal antitümör etkileri sağlamıştır. Bu sonuç, LGR5 hücrelerinin primer ve metastatik kolon kanserinde farklı roller oynadığını gösteren önceki bulgularla uyumludur (Cao ve ark., 2020).

LGR5, Wnt sinyal yolağının bir üyesidir. Wnt sinyal yolağı bileşenlerini hedeflemeye yönelik farklı stratejiler, kolon kanseri tedavisi için umut vericidir (Jahanafrooz ve ark., 2020). Ayrıca, doğal antikanser ajan olarak bilinen silibinin, Wnt sinyal yolağını etkilediği ve kolon kanseri kök hücrelerinin büyümesini baskıladığı bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2014). Lee ve ark.'nin biyoaktif bileşenleri olarak klorojenik asit, ellajik asit, gallik asit ve kateşin içeren ceviz fenolik ekstratının kolon kanseri hücre hattı üzerine olan etkisine baktıkları bir çalışmada, ceviz fenolik ekstratı kolon kanseri kök hücresi işaretleyicileri olan; CD133, CD44, DLK1 ve Notch1'in yanı sıra katenin/p-GSK3 sinyal yolunu down-regüle etmiştir (Lee ve ark., 2016). Bu ekstrat kanser kök hücrelerinin kendilerini yenileme kapasitesini bastırmıştır ve primer kolon tümöründen izole edilen primer kolon kanseri hücrelerinde spesifik kanser kök hücresi belirteçlerini inhibe etmiştir. Bu

sonuçlarda ekstratın kolon kanser kök hücrelerinin özelliklerini düzenleyerek kolon kanserini baskılayabileceğini göstermiştir (Lee ve ark., 2016). Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada da, üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstratının bağırsak organaoidlerinde uzun süreli maruz bırakılması sonucu hücre farklılaşmasını teşvik ettiği ve LGR5+ gen ifadesini güçlü bir şekilde down regüle ettiğini bildirmişlerdir (Casanova-Marti ve ark., 2020). Bizde çalışmamızda ratlarda oluşturacağımız deneysel kolon kanseri modelinde, LGR5 antikoruyla kanser kök hücrelerini işaretleyip, bu hücrelerin terapötik hedefleme potansiyelini keşfetmeyi ve diyetel ajan olarak verilen GA'nın etkinliğini araştırmayı amaçladık.

Özetlemek gerekirse çalışmamızda ratlarda oluşturulan bu modelle kolon dokusunda ve serumda; TAS, TOS, HIF-1 α , midkin, total kalsiyum ve protein ölçümü yaparak Ca⁺² hesaplamasını analiz etmeyi planladık. Çeşitli çalışmalarda iyonize Ca⁺² seviyelerindeki dengesizlik, glukoz yoksunluğu veya hipoksi gibi stresli koşulların hepsinin ER fonksiyonunun bozulmasına yol açabilecek durumlar olup ER stresinin de insan kolon adenokarsinomu dahil olmak üzere tümörlerin gelişiminde rol oynadığı belirtilmiştir (Storm ve ark., 2016). Özellikle GA ile tedavi sonrasında, UPR sinyal yolağındaki proteinlerin (GRP-78, PERK, IRE-1 α , ATF-6, ATF-4, CHOP) bundan nasıl etkilendiğini analiz etmeyi, kolon dokusunda yapılacak olan histopatolojik incelemeyle ilişkisini ve ayrıca ilaç çalışmalarında hedef olarak değerlendirilebilecek parametreler olup olmayacağını araştırmayı amaçladık.

1.10. Literatür Özeti

Gallik asit, doğada bulunan bir tür doğal polifenol bileşigidir ve yeşil çay, Ganoderma lucidum ve diğer bitkiler gibi birçok Çin ilacında yaygın olarak bulunur. Yapılan çalışmalarda GA'nın önemli anti-inflamatuar ve antiviral etkiler gösterdiği bildirilmiştir. GA'nın tümör hücrelerinin çoğalmasını engelleyebileceği belirtilmiştir. Örneğin, birkaç çalışma, GA'nın akciğer kanseri ve özofagus kanseri hücreleri üzerinde engelleyici bir etki gösterdiğini göstermiştir (Lin ve ark., 2021). Lin ve ark. (2021), tarafından yapılan çalışmada GA, in vivo olarak insan kolon kanseri HCT116

ve HT29 hücre hatlarına 24 saat boyuna farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Çalışma sonucunda GA'nın tümör büyümesini önlediği, tümör apoptozunu indüklediği ve p-SRC, p-EGFR, p-STAT3 ve p-AKT seviyesini düşürdüğü ve sonuç olarak, GA'nın SRC ve EGFR fosforilasyonunu inhibe ederek kolon kanseri proliferasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Lin ve ark., 2021).

Yoshioka ve ark. (2000), tarafından GA'nın insan kolon adenokarsinomu COLO 205 hücreleri üzerindeki antitümör etkilerinin araştırıldığı çalışmada; COLO 205 hücrelerinin gallik aside maruz bırakılması hem büyüme inhibisyonuna hem de apoptozun indüklenmesine yol açtığı bildirilmiştir. Apoptozun özellikleri olan DNA'nın oligonükleozom boyutundaki parçalara bölünmesinin GA konsantrasyonuna ve zamana bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir (Yoshioka ve ark., 2000).

Kolon kanseri hücre hatlarından olan HCT-15 üzerine GA'nın uygulandığı in vitro bir çalışmada; GA'nın HCT-15 hücrelerinin proliferasyonunu ve koloni oluşumunu baskıladığı ve anti-kanseröz etkisinin reaktif oksijen türlerine bağlı apoptozu takip ettiği bulunmuştur. Lipid tabakasının kırılması ve mitokondriyal membran potansiyelinde düşme gibi apoptoz ile ilişkili erken olaylar, hücre döngüsünün durması ile birlikte HCT-15 hücrelerinde GA'nın uygulanmasıyla indüklendiği de bildirilmiştir (Subramanian ve ark., 2016).

Forester ve ark. (2014), tarafından Caco-2 hücre hatlarında yapılan ve GA'nın uygulandığı başka bir çalışmada; GA'nın kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Ayrıca GA'nın DNA parçalanmasına ve nükleer yoğunlaşmaya neden olduğu ve NF-kB, AP-1, STAT-1 ve OCT-1 transkripsiyon faktörlerini inhibe ettiği belirtilmiştir (Forester, Choy, Waterhouse, & Oteiza, 2014).

Obafemi ve ark. (2021), tarafından fruktozla beslenen diyabetik sıçanlarda metformin ve GA'nın glukoz metabolizması, inflamasyon, oksidatif ve ER stresleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada; normal kontrol, diyabetik kontrol, yalnızca 100 mg/kg vücut ağırlığı metformin, 50 mg/kg vücut ağırlığı GA ve her

ikisinin bir kombinasyonu olarak uygulanan 5 grup oluşturulmuştur. Diyabetik kontrole göre GA'nın uygulandığı grupta karaciğer dokusunda süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksizdaz da anlamlı bir artış gözlenirken, malondialdehit düzeyinin düştüğünü belirtmişlerdir. Karaciğer dokusunda ATF-4 protein ifadesine bakıldığında ise diyabetik kontrole göre GA uygulanmasının ATF-4 ekspersyonunu anlamlı derecede azalttığı bulunmuştur (Obafemi ve ark., 2021).

Tiroidektomi yapılarak hipotiroidi oluşturulan sıçanlarda GA'nın nöronal koruma sağlayıp sağlamadığını gözlemlemek için sıçanların hipokampusu çıkarılarak yapılan çalışmada; kontrol ve 50mg/kg GA verilen gruplar oluşturulmuştur. Hipotiroid olan sıçanlarda lipid peroksidasyonun, reaktif oksijen türlerinin ve nitritlerin arttığı; ayrıca IRE-1 α , PERK ve ATF-6 α yollarını aktive ederek ER stresini arttırdığı bildirilmiştir. GA ile tedavi edilen hipotiroid sıçanlarda ise oksidatif stresin azaldığı, IRE1 α ve ATF6 yoluyla endoplazmik retikulumla ilişkili protein yıkımını (ERAD) arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca, GA tedavisi ile Bax/Bcl2 oranının arttığı, p53 ve kaspaz 12'nin aşırı ekspresyonunu engellediği gözlenmiştir. Hipotiroid hayvanlardaki bu tedavi, hipokampusta gözlemlenen nöronal koruma ile ilişkilendirilmiş ve hipokampal hasarı önlediği Blas-Valdivia ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmada belirtilmiştir (Blas-Valdivia ve ark., 2021).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kimyasal Hazırlanması

DMH (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) 1 mM EDTA içerisinde çözülecek, 1 mM NaOH ile pH 6,5'e ayarlanarak ve ilk 10 hafta boyunca haftada bir kez 30 mg/kg vücut ağırlığı dozunda subkutan olarak sağ uyluktan ratlara uygulanmıştır (Giftson ve ark., 2011).

Gallik asit (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD), tedaviden hemen önce suda çözündürülerek ve gruplarda belirtilen 10 haftalık süre boyunca 50 mg/kg/gün dozunda (Hsu ve Yen, 2007) oral yoldan verilmiştir.

2.2. Hayvan Modeli ve Deney Tasarımı

Çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında üretilmiş olan 6-8 haftalık Wistar albino erkek ratlar kullanılmıştır. Hayvanlar rastgele olarak her biri 12 sıçan içeren altı gruba ayrılarak ve kontrollü sıcaklık (24 ± 2 C), nem ($\% 50 \pm 10$) ve 12 saatlik aydınlık / karanlık döngüsü altında tutulmuştur. Çalışmaya Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onay verilmiştir (26.08.2020 Etik Kurul karar tarihli ve 2020-14-26 sayılı). Çalışmanın total süresi 20 hafta olarak planlanmış ve gruplar aşağıda verildiği gibi oluşturulmuştur.

Grup 1; kontrol grubu olarak değerlendirilmiş ve 10 hafta boyunca haftada 1 kez olmak üzere (subkutan enjeksiyon 30 mg/kg) serum fizyolojik uygulanmıştır.

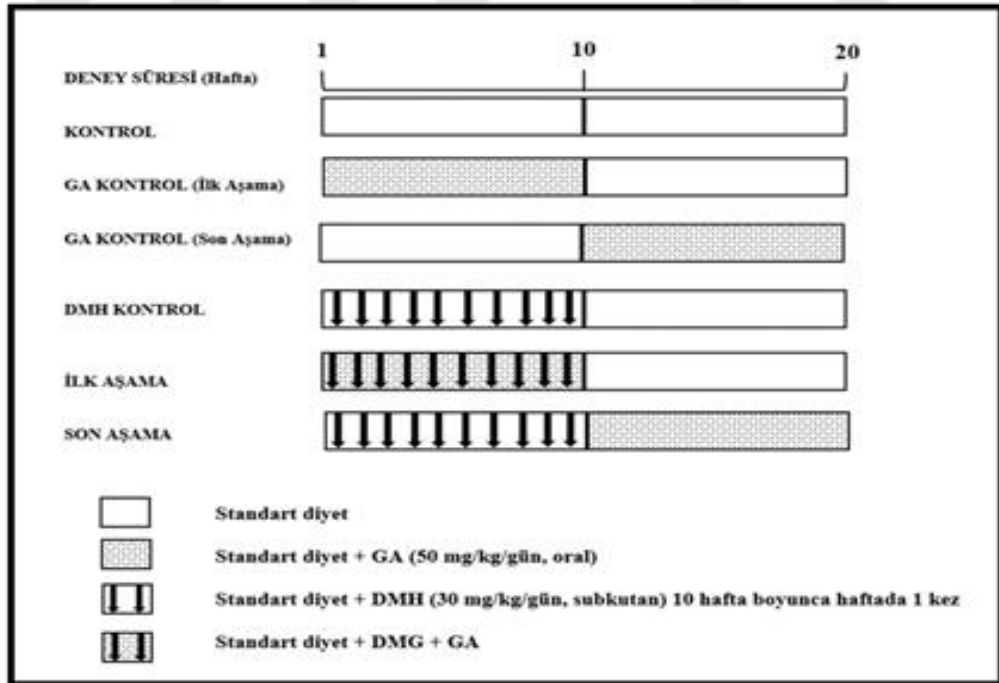
Grup 2; çalışmanın ilk 10 haftası boyunca gavaj yöntemiyle vücut ağırlığına göre 50 mg/kg/gün GA verilmiştir.

Grup 3; çalışmanın son 10 haftası boyunca gavaj yöntemiyle vücut ağırlığına göre 50 mg/kg/gün GA verilmiştir.

Grup 4; çalışmanın ilk 10 haftası boyunca haftada bir kez DMH (subkutan enjeksiyon 30 mg/kg) enjekte edilmiştir.

Grup 5; çalışmanın ilk 10 haftası boyunca GA+DMH uygulaması yapılmış olup, yukarıdaki gruplarda da belirtildiği miktarlarda (DMH: 30 mg/kg, GA: 50 mg/kg/gün) uygulanmıştır.

Grup 6; çalışmanın ilk 10 haftası boyunca DMH uygulanmış, 10. haftadan sonra 20 haftalık süreç tamamlanana kadar GA verilmiştir (Rodrigues ve ark., 2002; Giftson ve ark., 2011; Sharma ve ark., 2018). Tüm gruplarda toplamda 20 haftalık süre tamamlanmış ve süre sonuna kadar rat kaybı yaşanmamıştır. Deney tasarımına ait uygulanan yöntem aşağıda sunulmuştur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Deney protokolü

2.3. Laboratuvar Analizleri

2.3.1. Biyokimyasal Analizler

20 haftalık süre sonunda 12 saatlik açlık sonrası ratlara genel anestezi altında intrakardiyak kan alımı ile ötanazi uygulanarak ratlardan kan ve kolon doku örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri kırmızı kapaklı düz biyokimya tüplerine alınarak ve 4000xg 10 dk santrifüj edildikten sonra serumları eppendorf tüplerine alınarak dondurulmuştur. Alınan bu örneklerde HIF-1 α , midkin, TAS, TOS, total protein ve kalsiyum düzeyleri analiz edilmiştir.

Rat HIF-1 α ve rat midkin düzeyleri sandviç-ELISA yöntemiyle çalışılmış olup bu belirteçlerin piyasada mevcut olan hazır araştırma kitleri kullanılmıştır (NEPENTHE Araştırma Teknolojileri, Gebze, Kocaeli). Bu yöntemde; Rat HIF-1 α ve Midkin'e özgü antikorlar kitlerdeki mikro ELISA plakalarının kuyucuklarının katı fazına immobilize haldedir. Bu plaka kuyucuklarına standartlar / numuneler eklenerek antijen-antikor kompleksinin oluşması beklenir. Daha sonra, her bir mikrolaka kuyucuğuna deteksiyon antikoruna eklenir ve bu antikor, antijene farklı bir epitopundan bağlanır. Bağlanmayan serbest bileşenlerin yıkanmasından sonra her kuyucuğa enzime ait substrat eklenir. Substrat deteksiyon antikoruna bağlı enzimle reaksiyona girer ve bu konjugatı içeren kuyucuklar mavi renkte görünür. Daha sonra kuyucuklara durdurma solüsyonunun eklenmesiyle enzim-substrat reaksiyonu sona erer ve renk sarıya döner. Bu renk değişimi, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür ve optik dansite değerini verir. Bu değer konsantrasyon ile doğru orantılıdır. Numunelerin OD'si standart eğri ile karşılaştırılarak numunelerdeki konsantrasyon değeri hesaplanmıştır (ELISA Cihazı Mikrolaka Okuyucu - Marka: Biotek, Model: EPOCH2NS / ELISA Cihazı Mikrolaka Yıkayıcı - Marka: Biotek, Model: 50TS12). Her iki ELISA kiti için de; intra-assay CV <%8 ve inter-assay CV <%10'dur. Sensitivite değerleri; midkine için 9,51 ng/L ve HIF-1 α için 0,01 ng/mL'dir.

Serum TAS ve TOS düzeyleri kolorimetrik olarak ölçülmüştür (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep). TAS prensibine göre; örnekteki antioksidanlar, koyu mavi-yeşil renkli 2,2'-azinobis (3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat) (ABTS) radikalini renksiz ABTS formuna indirgemektedir. Bu değişimin 660 nm'deki absorbans değişikliği, numunenin toplam antioksidan seviyesi ile ilgilidir. Trolox, vitamin E'nin suda çözünen analogu olup bu yöntemde referans standart olarak kullanılır. TAS için; inter-assay CV %2,8 ve intra-assay CV %3,3'tür. TOS prensibine göre; örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonla oksitlemektedir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan güçlendirici moleküller tarafından uzatılır. Ferrik iyonlar asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Test, hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar, litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri / L) cinsinden ifade edilir. TOS için; inter-assay CV %3,2 ve intra-assay CV %3,9'dur. OSI indeksi TOS/TAS olarak hesaplanmıştır. (ELISA Cihazı Mikroplaka Okuyucu - Marka: Biotek, Model: EPOCH2NS / ELISA Cihazı Mikroplaka Yıkayıcı - Marka: Biotek, Model: 50TS12).

Serum total protein miktarı g/L birimiyle ifade edilir. İki değerlikli bakır, alkalın solüsyonu içinde protein peptid bağları ile reaksiyona girerek karakteristik mor renkli biüret kompleksini oluşturur. Bu renk yoğunluğu, fotometrik olarak ölçülebilen protein konsantrasyonu ile doğrudan orantılıdır.

Serum total Ca düzeyleri ise mg/dL birimiyle ifade edilir. Kalsiyum iyonları, alkalın koşulları altında 5-nitro-5'-metil-BAPTA ile reaksiyona girerek bir kompleks oluşturur. Bu kompleks, ikinci adımda etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ile reaksiyona girer. Absorbanstaki değişim, total kalsiyum konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçülür. Bu ölçümler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarındaki otoanalizörde gerçekleştirilmiştir (Roche/Hitachi Cobas c503, Hitachi High-Technologies Corporation, Japan). Ölçümünü yaptığımız total kalsiyum ve protein düzeylerini kullanarak Zeisler Metodu ile de iyonize kalsiyum düzeyi hesaplanmıştır. Bu metoda göre; İyonize

Kalsiyum (mg/dL) = [6,25 X Total Kalsiyum (mg/dL)] - [Total protein (gr/dL) X 3/8] / (Total protein (gr/dL) + 6,5) eşitliği şeklinde hesaplanmıştır (Çokluk ve ark., 2020). Hesaplama sonrasında iyonize kalsiyum değerleri mmol/L'ye çevrilmiştir.

2.3.2. Western Blot ve Histokimyasal Analizler

Cerrahi yöntemle deneklerin kolonları alındıktan sonra, kolon dokularının bir kısmında endoplazmik retikulum stresi sonucu UPR'ye aracılık eden 3 yolak üzerindeki proteinler western blot yöntemiyle tayin edilmiştir. Western blot; dokudaki spesifik bir proteini analiz etmemizi sağlayan yöntemdir. Prosedür 4 başlıktan oluşmaktadır: Örneklerin hazırlanması, yürütme ve transfer, tayin etmek istediğimiz proteinin işaretlenmesi ve boyanması ile görüntüleme ve analiz. Bu yöntemde tayin etmek istediğimiz proteinlerin gruplar arasındaki konsantrasyonlarının karşılaştırmasını yapmak için primer antikolar olarak; PERK, ATF-6, ATF-4, IRE1 α , GRP-78, CHOP ve LGR5 kullanılmıştır.

Western-blot için kolon dokuları -80°C'den çıkartılarak homojenizasyon için Camiola (Lizis buffer) tampon çözeltisine konmuştur. Tamponun içeriği 0,368 gr potasyum asetat, 0,8765 gr NaCl, 1mL 0,5M EDTA (pH=8), 125 μ L Triton-X100 ve 0,871gr L-arginin tartılarak çözelti 50mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltiye 1 tane proteaz inhibitör tableti eklenmiştir. Daha sonra 15000xg'de 20 dakika +4°C de santrifüj edildikten sonra homojenat elde edilmiştir. Western-blot yöntemine geçmeden önce her bir örnek için protein miktar tayini analizi Lowry yöntemiyle yapılmıştır (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951). Protein miktar tayini yaptıktan sonra 50 μ g/ml'lik toplam proteine örnek yükleme tamponu ilave edilerek immuno-blot yöntemine geçilmiştir (Yükleme tamponu: Glycerol; SDS 10%, 0,5 M Tris HCl pH 6,8, β -mercaptoethanol ve Bromophenol 0,5%). Protein miktarları eşitlenmiş olan örnekler %10 por çaplı dikey yönlü jellere yüklenerek 133V'luk sabit voltaj altında yaklaşık 2 saat yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandığında proteinler ağırlıklarına göre ayrılmış duruma gelmiştir (Cihaz: Hoefer Ps2A/200 Çift Çıkışlı Elektroferez Güç Kaynağı). Bu aşamadan sonra

transfer cihazı yardımıyla ağırlıklarına göre ayrılan proteinler 30 dakika süresince polivinilidin diflorür (PVDF) membrana transfer edilmiştir (Cihaz: Trans-Blot Turbo Transfer System - Bio-Rad). Transfer sonrası membran %3 oranında sığır serum albümini (BSA) içeren TBS-T (Tris Buffer Saline-%0,1 Tween 20) ile 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşamasının ardından %3 oranında albumin içeren TBS-T solüsyonunda birincil antikorlar ile; GRP-78 (St John's Laboratory, STJ24096, 1:1000), ATF-6 (St John's Laboratory, STJ114444, 1:1000), ATF-4 (St John's Laboratory, STJ11101481, 1:1000), p-IRE-1 α (St John's Laboratory, STJ11101016, 1:1000), PERK (St John's Laboratory, STJ95031, 1:1000), CHOP (St John's Laboratory, STJ92276, 1/1000), LGR5 (St John's Laboratory, STJ112563, 1/1000) ve β -actin (St John's Laboratory, STJ97089, 1:3000) istenilen protokole göre hazırlanmış ve bir gece (+4 °C) inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin ardından membranlara TBS-T solüsyonu ile 3×10'ar dakika süreyle yıkama işlemi yapılmıştır. Sonrasında sekonder antikorla 1 saat inkübe edildikten sonra tekrar 3×10'ar dakika yıkama yapılmıştır. Son olarak ECL substratı (WesternBright ECL HRP Substrate, Advansta) olan luminol ile ışınım yapması sağlanarak hassas X-ışını radyografi filmleri yardımıyla görüntüleme yapılmıştır (Cihaz: Azure 300 Kemilüminesan Western Blot Görüntüleme Sistemi). Elde edilen protein bant görüntüleri ImageJ programıyla dansitometrik olarak analiz edilmiştir.

2.3.3. Kolon Dokusunda Adenokarsinom Oluşumunun Histopatolojik Değerlendirmesi

Ratlardan alınan kolon doku örneklerinde makroskopik inceleme yapıldıktan sonra elde edilen dokular rutin doku takip işlemlerinin ardından parafin bloklara gömülmüştür. Elde edilen parafin bloklardan 4 mikrometre kalınlığında kesitler alınmıştır (Cihaz: Thermo Shandon). Alınan kesitler deparafinizasyon işleminden sonra hemotoksilen eozin ile boyanarak, "Olympus CX41" ışık mikroskopunda patolog tarafından değerlendirilmiş ve kanserli ratlardaki tümörlerin evrelemesi; Dünya Sağlık Örgütü, Sindirim Sistemi Tümörleri, 5. baskısında yer alan evrelemeye göre yapılmıştır (WHO, 2019).

Çizelge 2.1. Kolorektal kanserde TNM evrelemesi (WHO, 2019).

T – Tümör Evresi	Açıklama
Tx	Primer tümör değerlendirilemez
T0	Kolon ya da rektumda tümör tespit edilmemiş
Tis	Karsinoma in situ: Kanser hücreleri sadece epitelde veya lamina propriada bulunur
T1	Tümör submukozayı invaze etmiş (mukozadan submukozaya geçiş)
T2	Tümör muskularis propriayı invaze etmiş (kas tabakasına ulaşmış)
T3	Tümör peritonla kaplı kısımlarda subserozaya ulaşmış, peritonla kaplı olmayan kolon ve rektum kesimlerinde ise perikolik ve perirektal dokuları invaze etmiş (çevre organlara sıçramamıştır)
T4	Tümör direkt olarak diğer organları invaze etmiş ya da peritonu delmiş T4a: Viseral peritonun yüzeyinde büyüme T4b: Tümör büyümüş veya diğer organlara veya yapılara sıçramıştır.

Ayrıca kolon kanserlerinde histopatolojik diferansiyasyon derecesi “grading” olarak adlandırılır ve prognostik önemi vardır. İyi diferansiye (düşük dereceli) olanlar Grade I orta derecede diferansiye (orta dereceli) olanlar Grade II, kötü diferansiye olanlar (yüksek dereceli) Grade III ve diferansiye olmamış (yüksek dereceli, anaplastik) Grade IV olarak sınıflandırılmaktadır (WHO, 2019).

İmmünohistokimyasal analiz için; indirekt biotinsiz immünohistokimya sekonder kitleri ile primer antikor olarak LGR5 immünohistokimya antikorunu araştırılmıştır. Çalışmamızda LGR5 immünohistokimya boyaması için 4 deneme yapılarak optimize edilmeye çalışılmıştır. 4. deneme sonrasında zemin boyanması azalmış ve dağınık lenfoid hücrelerde boyanma saptanmıştır. Bunun sonucunda gruplara ait örneklerin bir kısmı LGR5 immünohistokimyasal olarak boyanmıştır. Fakat beklenen hücrelerde boyama gerçekleşmediği ve optimize edilemediği için değerlendirmeye alınmamıştır.

2.4. İstatistiksel Analizler

Araştırmamızdan elde edeceğimiz tüm verilerin istatistiksel analizini gerçekleştirmek için fakültemiz biyoistatistik bölümünden destek ve danışmanlık alınmıştır.

Araştırmamızda ratlara verilen normal rat yemi, DMH dozu (30 mg/kg) ve gallik asit dozu (50 mg/kg) bağımsız değişkenlerdir. Bu değişkenlerle ilişkisini inceleyeceğimiz serum biyokimyasal parametrelerinin değerleri (kalsiyum düzeyleri, total protein), oksidatif strese ilişkin parametrelerin (TAS, TOS) düzeyleri, serum HIF-1 α , midkin düzeyleri, kolon dokusundaki PERK, ATF-6, ATF-4, IRE-1 α , GRP-78, CHOP ve LGR5 düzeyleri ise bağımlı değişkenlerimizi oluşturmaktadır.

Verilerin analizinde SPSS 11.5 for Windows paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ifade edilirken ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde tanımlayıcı istatistikler kullanılmıştır. Normal dağılım gösteren parametreler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc testlerden Bonferroni, normal dağılım göstermeyen parametreler için Kruskal-Wallis varyans analizi ve uygun post hoc testler yapılmış ve istatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

3. BULGULAR

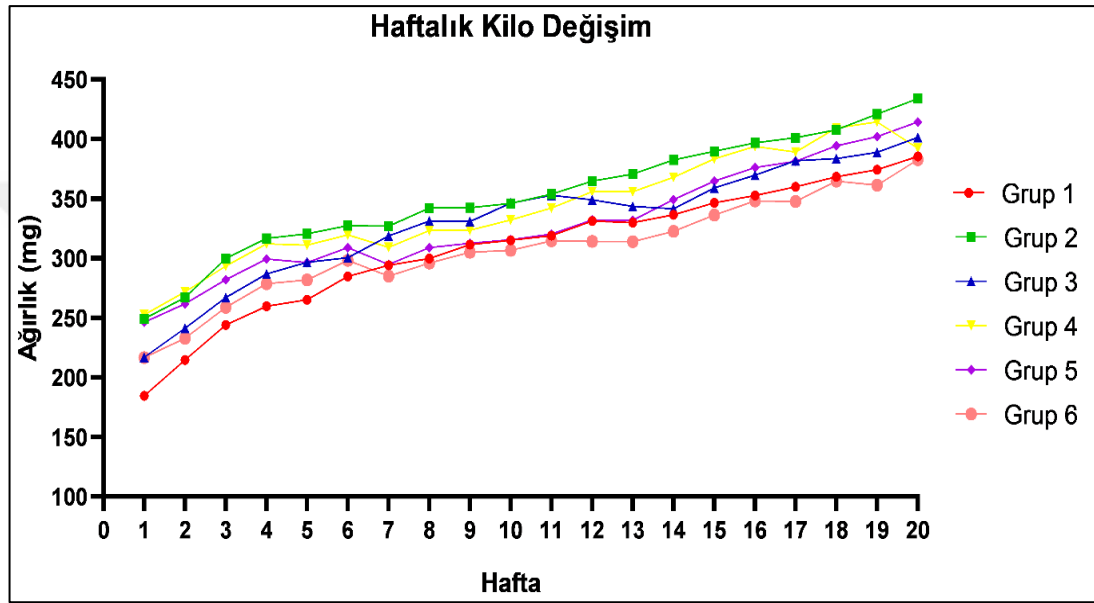
3.1. Grupların Fiziksel Olarak Karşılaştırılması

Yirmi haftalık deney protokolü boyunca tüm gruplardaki ratların haftada bir kez olmak üzere kilo ölçümleri yapılmıştır. Bunun sonucunda gruplarda başlangıç ve son vücut ağırlıkları, kilo alımı, büyüme hızı takip edilmiştir. Ayrıca özellikle DMH uygulanan gruplarda tümör oluşumundan kaynaklı kolon ağırlıklarındaki değişim de önem kazanmaktadır. Gruplar arası bu bulgular Çizelge 3.1’de ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Çizelge 3.1. Gruplar arası antropometrik ölçümlerin karşılaştırılması

GRUPLAR	Başlangıç Vücut Ağırlığı (gr)	Son Vücut Ağırlığı (gr)	Kilo Alımı	Kolon Ağırlığı	Kolon Ağırlığı/Son Vücut Ağırlığı (%o)	Büyüme Hızı
Kontrol	184,67 $\pm$ 13,14	385 $\pm$ 50,02	200,67 $\pm$ 54,21	1,47 $\pm$ 0,6	3,85 $\pm$ 1,58	1,43 $\pm$ 0,39
İlk Aşama GA (50 mg/kg v. ağı.)	249,25 $\pm$ 20	433,91 $\pm$ 23,19	184,67 $\pm$ 23,99	1,65 $\pm$ 0,67	3,83 $\pm$ 1,57	1,32 $\pm$ 0,17
Son Aşama GA (50 mg/kg v. ağı.)	217 $\pm$ 22,55	401,33 $\pm$ 43,05	184,33 $\pm$ 51,03	1,43 $\pm$ 0,63	3,66 $\pm$ 1,79	1,32 $\pm$ 0,36
DMH (30 mg/kg v. ağı.)	252,75 $\pm$ 18,58	423,70 $\pm$ 35,75	170,9 $\pm$ 33,85	2,33 $\pm$ 0,98	5,49 $\pm$ 2,24	1,22 $\pm$ 0,24
DMH (30 mg/kg v. ağı.) + GA (50 mg/kg v. ağı.)	246,33 $\pm$ 14,82	414,25 $\pm$ 34,15	167,92 $\pm$ 34,14	2,12 $\pm$ 0,71	5,18 $\pm$ 1,92	1,2 $\pm$ 0,24
İlk DMH (30 mg/kg v. ağı.), sonra GA (50 mg/kg v. ağı.)	216,67 $\pm$ 19,4	382,75 $\pm$ 21,5	166,08 $\pm$ 34,43	2,56 $\pm$ 0,73	6,66 $\pm$ 1,79	1,19 $\pm$ 0,25
p	<0,001	<0,05	>0,05	<0,01	=0,001	>0,05
	1-2: <0,001	2-6: <0,05		1-6: <0,05	1-6: <0,05	
	1-4: <0,001			3-6: <0,05	2-6: =0,01	
	1-5: <0,001				3-6: <0,01	
	3-4: <0,05					
	4-6: <0,05					

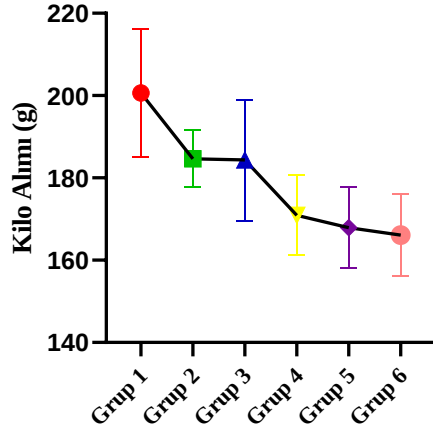
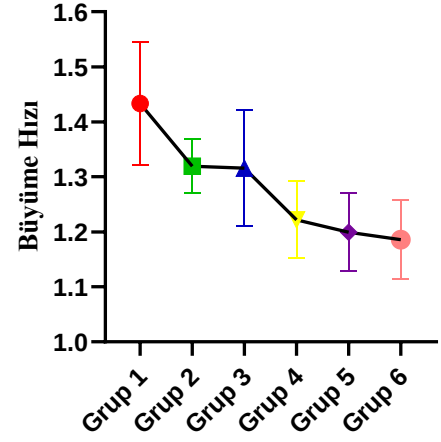
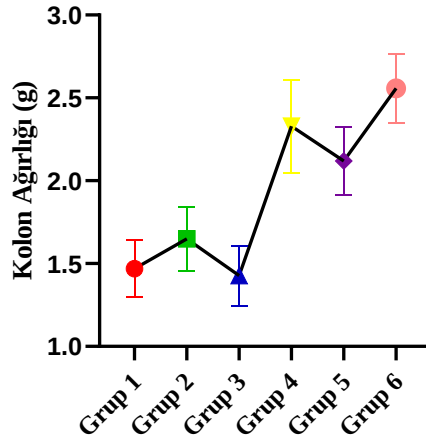
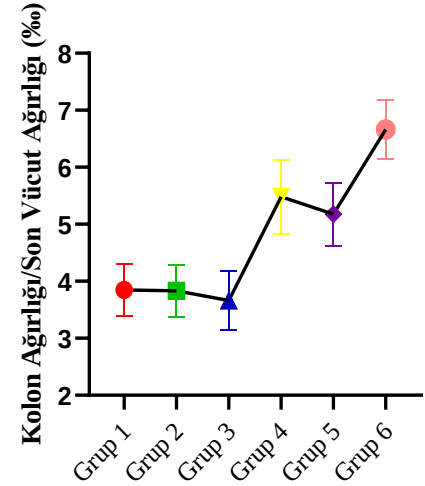
Gruplar antropometrik ölçümler açısından karşılaştırıldığında; başlangıç vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında fark izlenirken ($p<0,001$), kilo alımı ve büyüme hızı açısından anlamlı fark izlenmemiştir (Büyüme Hızı= (Son Vücut Ağırlığı – Başlangıç Vücut Ağırlığı) / Deney Gün Sayısı) (Sivaranjani, Sivagami, & Nalini, 2016). Ancak DMH uygulanan gruplardaki kilo alımı ve büyüme hızının diğer gruplara göre düşük olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.1).



Şekil 3.1. Gruplar arası haftalık kilo değişimi

(Grup1: Kontrol, Grup 2: İlk aşama GA, Grup 3: Son aşama GA, Grup 4: DMH, Grup 5: DMH+GA, Grup 6: İlk DMH sonra GA).

Çalışma bitiminde ölçülen son vücut ağırlıklarına bakıldığında gruplar arası anlamlı fark olduğu gözlenirken ($p<0,05$), bu farkın ilk aşama GA alan grupla ilk DMH sonra GA grubu arasında olduğu görülmektedir ($p<0,05$).

A**B****C****D**

Şekil 3.2. Gruplar arası kilo alımı (A), büyüme hızı (B), kolon ağırlığı (C) ve kolon ağırlığı/son vücut ağırlığı (D) değişimi

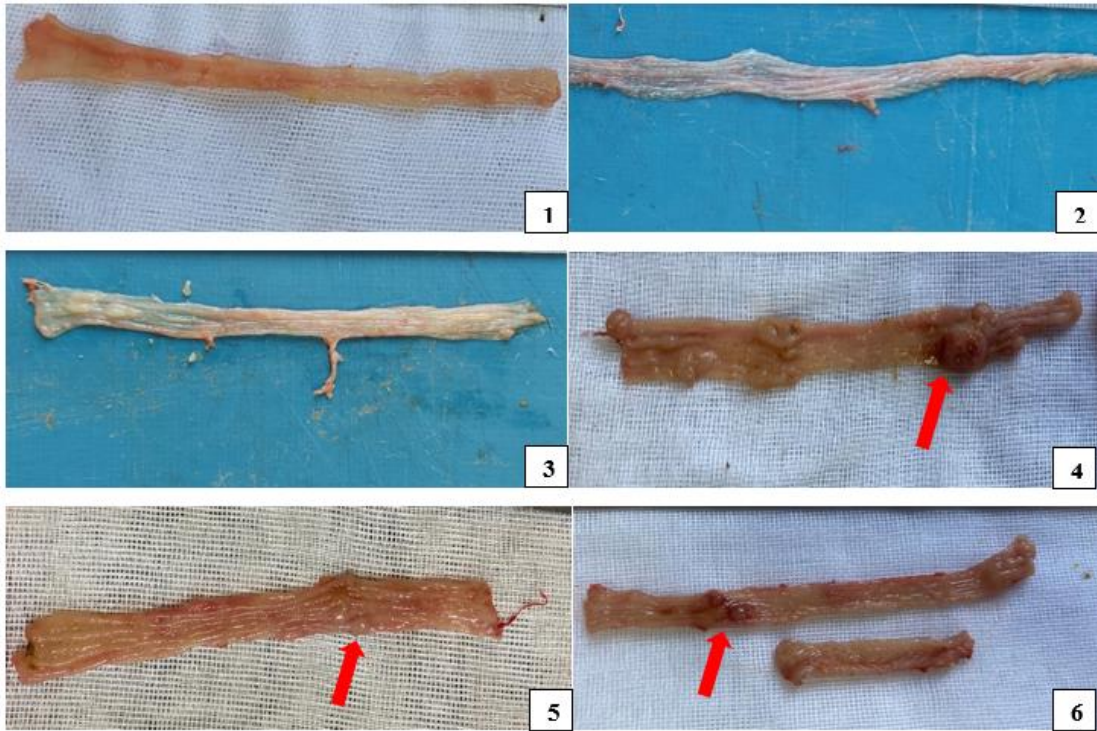
(Grup1: Kontrol, Grup 2: İlk aşama GA, Grup 3: Son aşama GA, Grup 4: DMH, Grup 5: DMH+GA, Grup 6: İlk DMH sonra GA).

Sakrifikasyon işlemi sonrası kolon dokusunun tamamen çıkarılması ile ölçülen kolon ağırlığının DMH uygulanan gruplarda diğer üç gruba göre yüksek olduğu görülmektedir. İlk DMH sonra GA uygulanan grubun kolon ağırlıklarının kontrol grubu ve son aşama GA grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir (her ikisi için; $p<0,05$). Çizelge 3.1. ve Şekil 3.2.'de görüldüğü gibi

kolon ağırlığının son vücut ağırlığına bölünmesi ile elde edilen oranın yine benzer şekilde ilk DMH sonra GA uygulanan grupta kontrol, ilk aşama GA ve son aşama GA gruplarına göre yüksek olduğu görülmektedir (sırasıyla $p<0,05$; $p=0,01$; $p<0,01$).

3.2. Kolon Dokularının Makroskopik Olarak Karşılaştırılması

Sakrifiyon işleminin yapılmasının ardından ratlara ait kolon dokuları patoloji bölümünde makroskopik olarak incelenmiştir. Her gruptaki sıçanlara ait kolonda bulunan polip ve tümör sayısı not edildikten sonra kolon dokusu biyokimyasal ve histolojik incelemelerin ayrı ayrı yapılabilmesi için ikiye ayrılmıştır. Şekil 3.3.'te 6 gruba ait kolon örneklerinin makroskopik görüntüsü yer almaktadır. Kırmızı oklar tümör dokularını göstermektedir.



Şekil 3.3. Kolon dokularının makroskopik incelemesi

(1-6: Grup numaralarını göstermektedir. (Grup1: Kontrol, Grup 2: İlk aşama GA, Grup 3: Son aşama GA, Grup 4: DMH, Grup 5: DMH+GA, Grup 6: İlk DMH sonra GA).

Çizelge 3.2. Kolon dokularının makroskopik olarak karşılaştırılması

GRUPLAR	Sıçan Sayısı	Tümör/Polip Bulunan Sıçan Sayısı	Toplam Tümör/Polip Sayısı	Tümör Taşıyan Sıçan Başına Tümör/Polip Sayısı
Kontrol	12	0	0	0
İlk Aşama GA (50 mg/kg v. ağız.)	12	0	0	0
Son Aşama GA (50 mg/kg v. ağız.)	12	0	0	0
DMH (30 mg/kg v. ağız.)	12	12	56	4,67
DMH (30 mg/kg v. ağız.) + GA (50 mg/kg v. ağız.)	12	12	27	2,25
İlk DMH (30 mg/kg v. ağız.), sonra GA (50 mg/kg v. ağız.)	12	12	30	2,5

Makroskopik inceleme sonrası tümör ve polip sayıları belirlenmiş olup Çizelge 3.2.'de verilmiştir. 20 haftalık sürenin sonuna kadar tüm ratlar hayatta kalmış ve kayıp yaşanmamıştır. Ratlar sakrifiye edildikten sonra makroskopik inceleme yapıldığında DMH uygulanan grupların hepsinde en az bir polip/tümöre rastlanmıştır. Toplam ve rat başına düşen polip/tümör sayısının GA uygulanan gruplarda DMH uygulanan gruplara göre düştüğü gözlenmiştir. DMH uygulanan grup ile DMH+GA uygulanan grup arasında tümör sayısı bakımından anlamlı fark bulunurken ($p<0,05$), ilk DMH sonra GA uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

3.3. Biyokimyasal Analizler

Gruplara ait biyokimyasal parametrelere ilişkin ortalama ve standart sapma değerleri Çizelge 3.3'te gösterilmiştir. Kontrol grubunun ortalama total kalsiyum ($10,05\pm 0,25$ mg/dL), total protein ($59,06\pm 2,06$ g/L) ve iyonize kalsiyum ($3,47\pm 0,09$ mmol/L) değerlerinin, DMH uygulanan gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir (her biri için $p<0,05$). Serum TAS seviyeleri arasında gruplar arası anlamlı fark yoktur ($p>0,05$). Kolon TAS seviyelerine baktığımızda; kontrol

grubunda DMH, DMH+GA ve ilk aşama DMH sonra GA verilen gruba göre yüksek olduğu görülmektedir (sırasıyla $p>0,05$, $p<0,05$, $p=0,01$). Serum TOS seviyeleri arasında gruplar arası anlamlı fark bulunurken ($p<0,01$), ikili grup karşılaştırmalarında anlamlı fark olmadığı görülmektedir. Kolon TOS seviyelerine baktığımızda ise ilk aşama GA ($15,06\pm5,02$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L) verilen grubun kontrol, DMH ve DMH+GA verilen gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,05$). Oksidatif stres indeksi TOS/TAS olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubuyla DMH grubunu karşılaştırdığımızda; serum OSİ değeri kontrol grubunda yüksek bulunurken, kolon OSİ değeri ise düşük bulunmuştur.

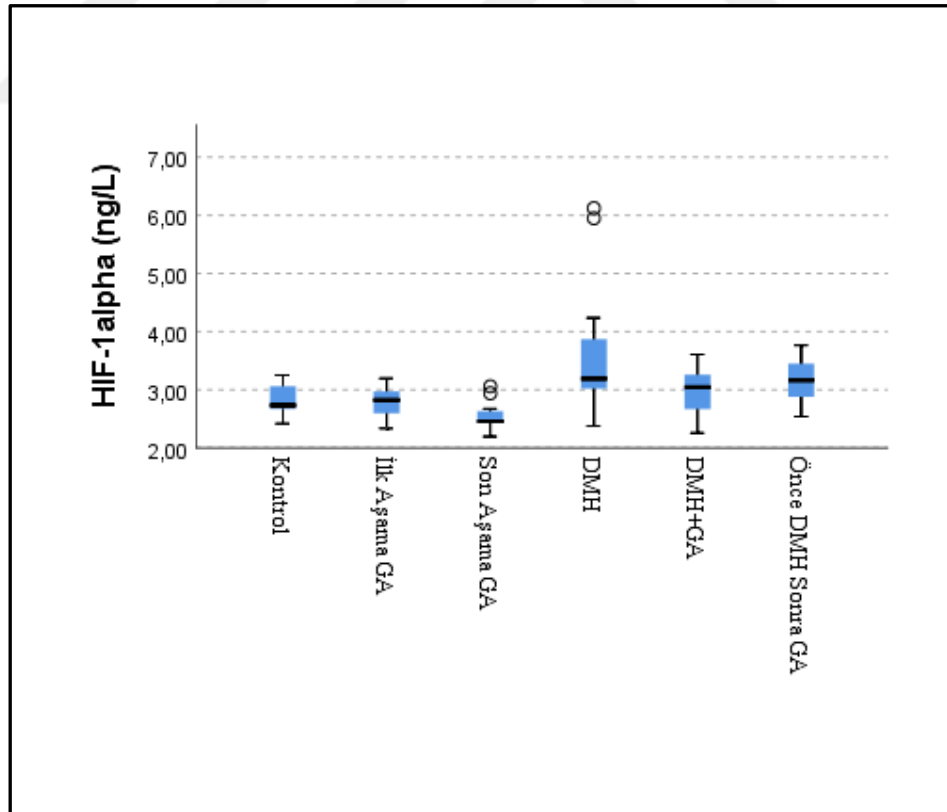
Çizelge 3.3. Gruplar arası biyokimyasal analizlerin karşılaştırılması

SONUÇLAR	Grup 1 (n:12)	Grup 2 (n:12)	Grup 3 (n:12)	Grup 4 (n:12)	Grup 5 (n:12)	Grup 6 (n:12)	p
Total Kalsiyum (mg/dL)	10,05 $\pm$ 0,25	9,48 $\pm$ 0,26	9,62 $\pm$ 0,26	9,69 $\pm$ 0,31	9,66 $\pm$ 0,26	9,76 $\pm$ 0,29	p<0,001 1-2: p<0,001 1-3: p<0,01 1-4: p<0,05 1-5: p<0,01
Total Protein (g/L)	59,06 $\pm$ 2,06	55,48 $\pm$ 7,96	57,43 $\pm$ 3,11	54,14 $\pm$ 4,61	53,22 $\pm$ 2,52	54,68 $\pm$ 2,45	p=0,001 1-4: p<0,05 1-5: p<0,01 1-6: p<0,05
İyonize Kalsiyum (mmol/L)	3,47 $\pm$ 0,09	3,28 $\pm$ 0,09	3,33 $\pm$ 0,09	3,35 $\pm$ 0,11	3,34 $\pm$ 0,09	3,38 $\pm$ 0,09	p<0,001 1-2: p<0,001 1-3: p<0,01 1-4: p<0,05 1-5: p<0,05
HIF-1α (ng/L)	2,80 $\pm$ 0,26	2,79 $\pm$ 0,27	2,34 $\pm$ 0,78	3,64 $\pm$ 1,21	2,96 $\pm$ 0,44	3,14 $\pm$ 0,39	p=0,001 3-4: p<0,001 3-6: p<0,01
Midkin (ng/mL)	500,25 $\pm$ 147,21	658,07 $\pm$ 119,54	681,33 $\pm$ 92,18	720,11 $\pm$ 111,23	639,72 $\pm$ 80,17	672,83 $\pm$ 79,91	p<0,05 1-3: p<0,05 1-4: p<0,05
Serum TAS (mmol Trolox Equiv./L)	1,28 $\pm$ 0,22	1,15 $\pm$ 0,18	1,21 $\pm$ 0,19	1,26 $\pm$ 0,14	1,21 $\pm$ 0,17	1,26 $\pm$ 0,23	p>0,05
Kolon TAS (mmol Trolox Equiv./L)	2,04 $\pm$ 0,34	1,94 $\pm$ 0,31	1,70 $\pm$ 0,32	1,66 $\pm$ 0,47	1,47 $\pm$ 0,45	1,34 $\pm$ 0,47	p<0,001 1-5: p<0,05 1-6: p=0,001 2-6: p<0,01

Çizelge 3.3. (Devamı) Gruplar arası biyokimyasal analizlerin karşılaştırılması

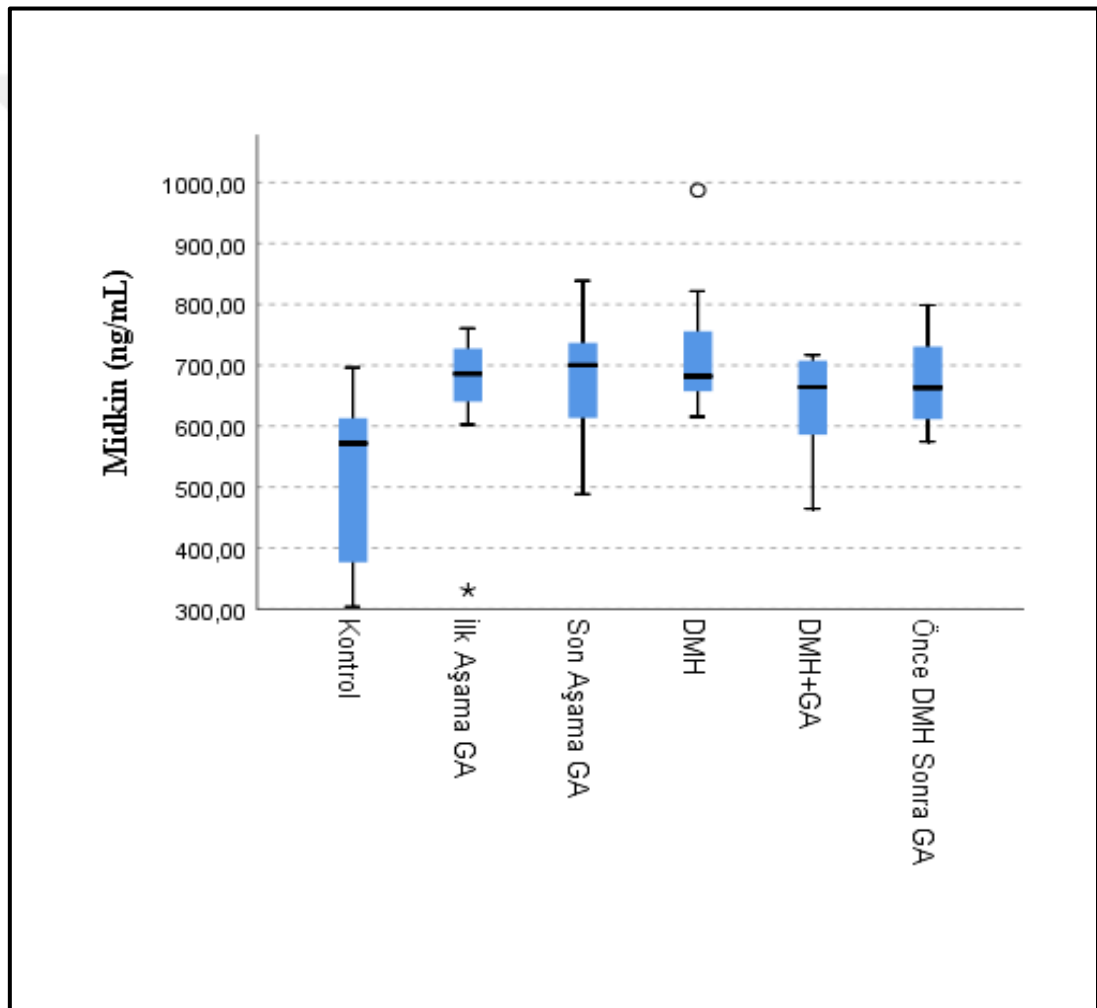
SONUÇLAR	Grup 1 (n:12)	Grup 2 (n:12)	Grup 3 (n:12)	Grup 4 (n:12)	Grup 5 (n:12)	Grup 6 (n:12)	p
Serum TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L)	16,93 $\pm$ 7,93	10,24 $\pm$ 3,41	10,61 $\pm$ 2,58	11,41 $\pm$ 5,49	18,27 $\pm$ 10,19	21,14 $\pm$ 12,80	p<0,01
Kolon TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L)	10,49 $\pm$ 10,45	15,06 $\pm$ 5,02	8,30 $\pm$ 4,06	7,75 $\pm$ 6,72	7,08 $\pm$ 3,11	8 $\pm$ 3,28	p<0,01 1-2: p<0,05 2-4: p<0,01 2-5: p<0,05
Serum OSI (arbitrary unit)	13,49 $\pm$ 6,14	9,04 $\pm$ 2,58	9,12 $\pm$ 2,31	8,96 $\pm$ 3,70	14,61 $\pm$ 6,38	16,71 $\pm$ 8,23	p<0,01
Kolon OSI (arbitrary unit)	3,84 $\pm$ 2,85	7,97 $\pm$ 3,0	5,13 $\pm$ 3,37	4,28 $\pm$ 2,30	5,05 $\pm$ 2,58	5,8 $\pm$ 3,33	p<0,05 1-2: p<0,05

(Grup1: Kontrol, Grup 2: İlk aşama GA, Grup 3: Son aşama GA, Grup 4: DMH, Grup 5: DMH+GA, Grup 6: İlk DMH sonra GA. Ca: Kalsiyum, HIF-1 α : Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör 1-alfa, TAS: Total Antioksidan Statü, TOS: Total Oksidan Statü, OSI: Oksidatif Stres İndeksi. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. 1-6: ifadeleri gruplar arası istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.)



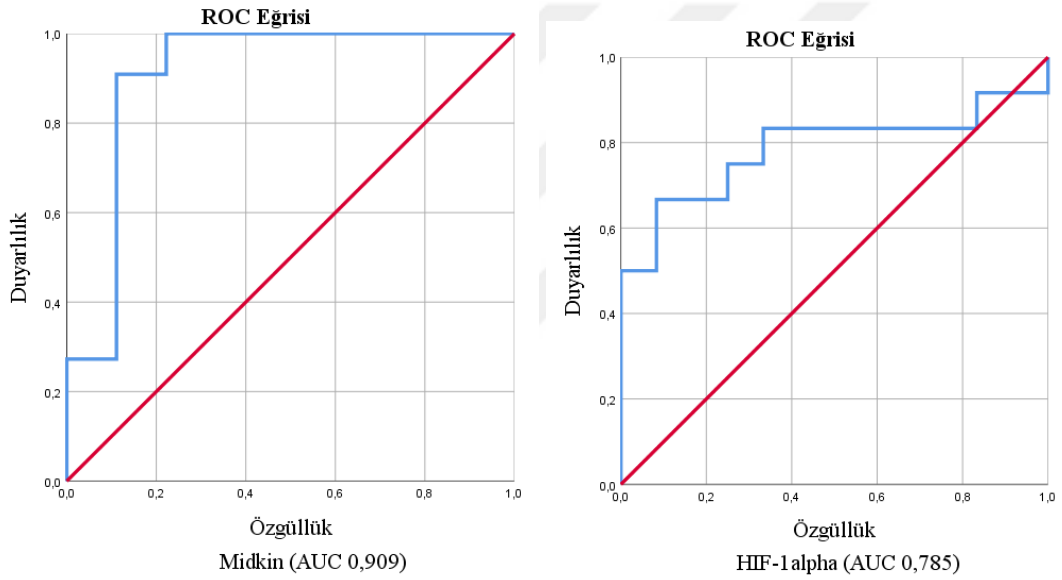
Şekil 3.4. Gruplar arası HIF-1 α düzeyi değişimi

Çizelge 3.3 ve Şekil 3.4'te HIF-1 α düzeylerine baktığımızda; kontrol ($2,80\pm0,26$ ng/L) grubuyla DMH ($3,64\pm1,21$ ng/L) grubunu karşılaştırdığımızda DMH grubunda HIF-1 α düzeylerinin daha yüksek olduğu ama anlamlı fark olmadığı görülmektedir ($p>0,05$). Son aşama GA verilen grubun ($2,34\pm0,78$ ng/L), hem DMH hem de ilk aşama DMH sonra GA ($3,14\pm0,39$ ng/L) verilen gruba göre anlamlı derecede düşüktür (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,01$). Ayrıca DMH grubundaki HIF-1 α düzeyinin DMH+GA ve ilk aşama DMH sonra GA grubuna göre daha yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 3.5. Gruplar arası Midkin düzeyi değişimi

Çizelge 3.3 ve Şekil 3.5'te Midkin düzeylerine baktığımızda; kontrol (500,25±147,21 ng/mL) grubuyla DMH (720,11±111,23 ng/mL) grubunu karşılaştırdığımızda DMH grubunda Midkin düzeylerinin anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Ek olarak DMH grubu Midkin düzeylerinin tüm gruplara kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca son aşama GA verilen grubun (681,33±92,18 ng/mL) Midkin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). Ayrıca DMH grubundaki Midkin düzeyinin DMH+GA ve ilk aşama DMH sonra GA grubuna göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

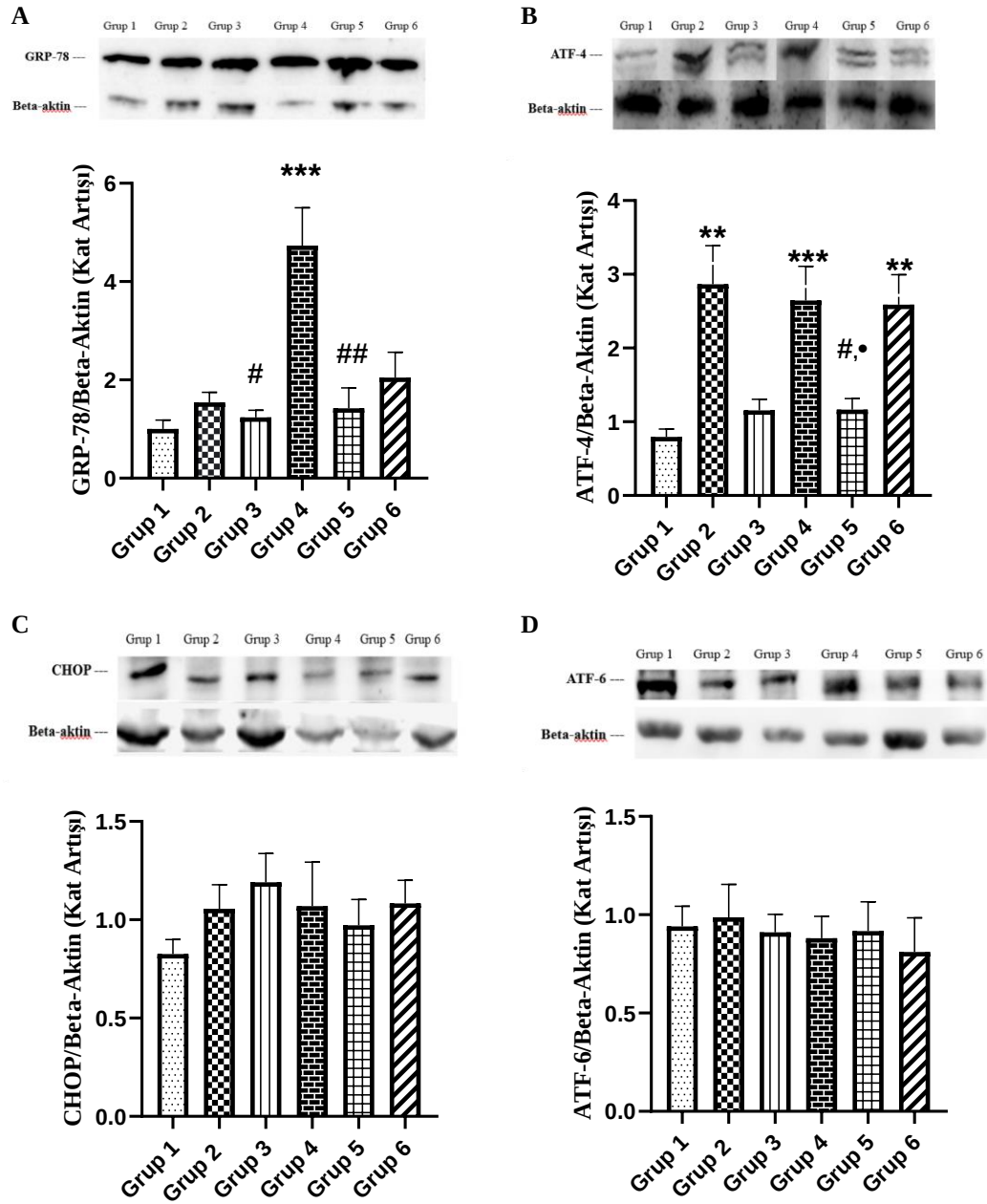


Şekil 3.6. Midkin ve HIF-1 α düzeylerine ait ROC Analizi

Şekil 3.6'da gösterildiği gibi kontrol ve DMH grubu arasında ayırıcı tanıda Midkin ve HIF-1 α düzeylerinin biyobelirteç olma durumu ve bu parametrelere ait ROC eğrilerine yer verilmiştir. Midkin için duyarlılık: 0,909, özgüllük: 0,889 ve sınır (cut-off) değeri: 631,26 ng/mL olarak belirlenmiştir ($p<0,01$). HIF-1 α için duyarlılık: 0,833, özgüllük: 0,667 ve sınır değeri: 2,87 ng/L olarak belirlenmiştir ($p<0,05$).

3.4. Western Blot Analizleri

ER sadece temel hücresel fonksiyonlar için hayati önem taşımaz, aynı zamanda hücre içi ortamı izleyerek metabolik ve stres yanıtlarını buna göre ayarlayan homeostatik bir cihaz olarak görev alır (Storm ve ark., 2016). Katlanmamış proteinlerin birikmesi (örneğin protein salgılanması yüksek olduğunda), ER Ca^{2+} seviyelerindeki dengesizlik, glukoz yoksunluğu veya hipoksi gibi stresli koşulların hepsi ER stresi olarak adlandırılarak ER fonksiyonunun bozulmasına yol açabilir (Storm ve ark., 2016). ER homeostazını ve normal hücresel fonksiyonu eski haline getirmek için sinyal iletim yolları etkinleştirilir. Bununla birlikte, stres çözülemezse, sağkalım sinyali hücre ölümü ile sonuçlanan pro-apoptotik bir sürece girer. Bu olası sonuçların her ikisine de UPR sinyal iletim yollarının düzenlenmesi aracılık eder. Kolon kanseri dokusunda bu sinyalizasyonun nasıl değiştiğini ortaya koymak için; UPR’de sinyal iletim yollarının düzenlenmesinden sorumlu olan GRP-78, p-PERK, IRE-1 α , ATF-4, ATF-6 ve CHOP proteinlerini inceledik. Ayrıca kolon kanseri kök hücrelerinin çoğunlukla, Lgr5⁺ hücre yüzeyi belirtecine sahip bağırsak kök hücrelerinden türetildiği bildirilmiştir. GA’nın etkinliğini kök hücre düzeyinde de analiz etmek istediğimiz için LGR5 proteini de incelenmiştir.

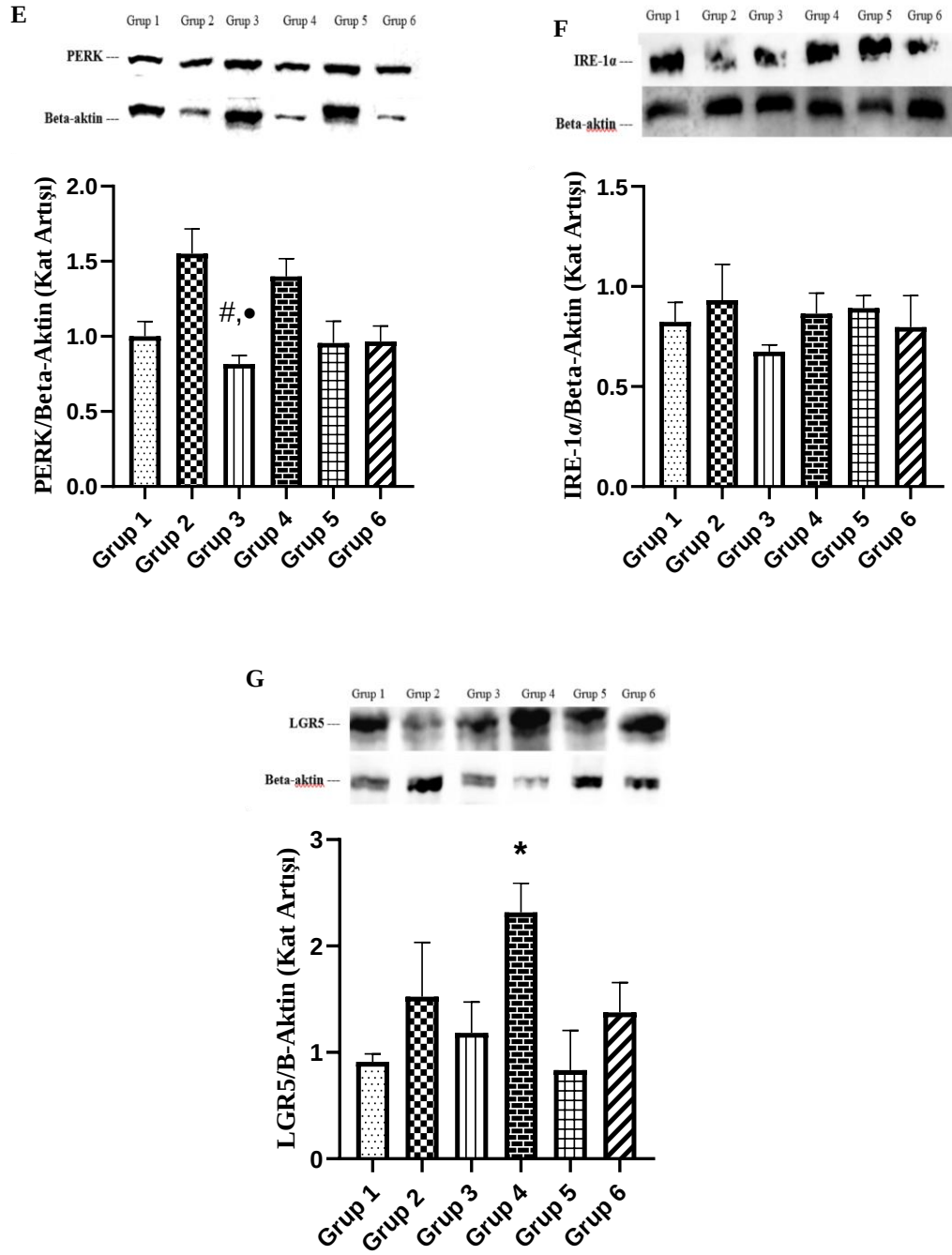


Şekil 3.7. Gruplar arası GRP-78, ATF-4, CHOP ve ATF-6 protein ifadelerinin incelenmesi. A) GRP-78 proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi B) ATF-4 proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi C) CHOP proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi D) ATF-6 proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi verilmiştir

Grup1: Kontrol, Grup 2: İlk aşama GA, Grup 3: Son aşama GA, Grup 4: DMH, Grup 5: DMH+GA, Grup 6: İlk DMH sonra GA. Sonuçlar B-Aktin protein ifadesine oranlanarak hesaplanmıştır. Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. *P<0,05 kontrol grubuna göre, #p<0,05 DMH grubuna göre, *p<0,05 ilk aşama GA grubuna göre.

Şekil 3.7’de gösterilen GRP-78 ve ATF-4 protein ifadelerinin kontrol grubuna göre DMH uygulanan grupta anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür (Kontrol: $1\pm0,55$, n=5; DMH: $4,73\pm2,67$, n=5; $p=0,001$ ve Kontrol: $1\pm0,37$, n=5; DMH: $2,83\pm1,81$, n=5; $p<0,001$). GRP-78 protein ifadesinin GA uygulamasıyla birlikte DMH+GA ve ilk DMH sonra GA uygulanan grupta azaldığı ancak sadece DMH+GA’da (DMH: $4,73\pm2,67$, n=5; DMH+GA: $1,42\pm1,23$, n=5; $p<0,01$) anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Ayrıca ilk ve son aşama GA uygulanan gruplarda da DMH grubuna göre GRP-78 proteinin ifadesinin azaldığı ancak sadece son aşama GA’da (Son aşama GA: $1,24\pm0,39$, n=5; $p<0,05$) anlamlı olarak düştüğü görülmektedir. ATF-4 protein ifadesinin kontrol grubuna göre ilk aşama GA ve ilk DMH sonra GA verilen grupta anlamlı derecede yükseldiği görülmektedir (Kontrol: $1\pm0,37$, n=5; ilk aşama GA: $2,87\pm1,38$, n=5; $p<0,001$, ilk DMH sonra GA: $2,35\pm1,04$, n=5; $p<0,01$). DMH+GA uygulanan gruba göre ilk aşama GA ve DMH grubunda ATF-4 protein ifadesinin anlamlı olarak yükseldiği görülmektedir (DMH+GA: $1,16\pm0,53$, n=5, İlk aşama GA: $2,87\pm1,38$, n=5; $p<0,05$, DMH: $2,83\pm1,81$, n=5; $p<0,05$).

Şekil 3.7’de gösterilen ATF-6 ve CHOP protein ifadelerinde ise gruplar arasında anlamlı bir değişimin olmadığı görülmektedir.



Şekil 3.8. Gruplar arası PERK, IRE-1α ve LGR5 protein ifadelerinin incelenmesi. E) PERK proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi F) IRE-1α proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi G) LGR5 proteinine ait immuno-blot görüntüsü ve protein ifadesi verilmiştir

Grup1: Kontrol, Grup 2: İlk aşama GA, Grup 3: Son aşama GA, Grup 4: DMH, Grup 5: DMH+GA, Grup 6: İlk DMH sonra GA. Sonuçlar B-Aktin protein ifadesine oranlanarak hesaplanmıştır. Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. *P<0,05 kontrol grubuna göre, #p<0,05 DMH grubuna göre, • p<0,05 ilk aşama GA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Şekil 3.8’de gösterilen IRE-1 α protein ifadesinde gruplar arasında anlamlı bir değişimin olmadığı gözlenmektedir. PERK protein ifadesinin ise son aşama GA olan grupta ilk aşama GA ve DMH grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmektedir (Son aşama GA: 0,81 $\pm$ 0,16, n=5, ilk aşama GA: 1,55 $\pm$ 0,44, n=5; p<0,05, DMH: 1,4 $\pm$ 0,37, n=5; p<0,05).

LGR5 protein ifadesinin DMH uygulanan gruba göre GA verilen tüm gruplarda azaldığı gözlenmektedir fakat anlamlı değildir. Kontrol grubuna göre DMH grubunda LGR5 protein ifadesinin anlamlı derecede yükseldiği görülmektedir (Kontrol: 1 $\pm$ 0,26, n=5, DMH: 2,24 $\pm$ 1,02, n=5; p<0,05).

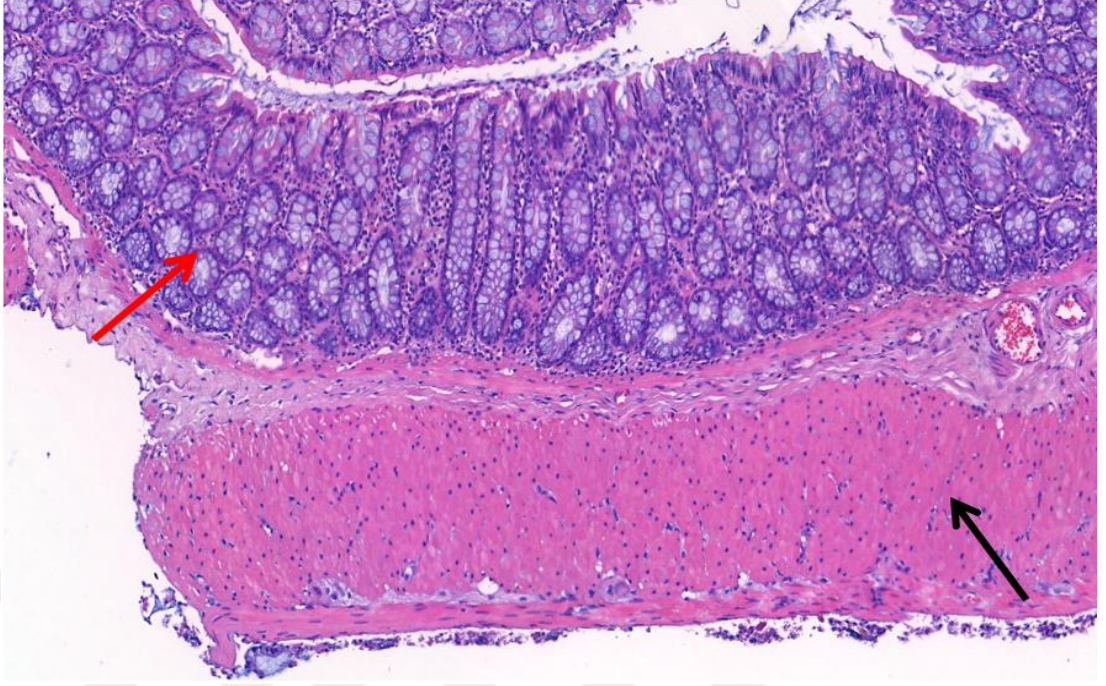
Çizelge 3.4. Gruplar arası korelasyon analizi

	GRP-78	LGR5
GRP-78	-	p<0,01; r=0,575
ATF-4	p<0,05; r=0,352	p<0,05; r=0,310
HIF-1α	P<0,01; r=0,450	p>0,05; r= 0,137
Midkin	p<0,05; r= -0,294	p<0,01; r= 0,394
Tümör Sayısı	p<0,01; r= 0,414	p<0,05; r= 0,350

Çizelge 3.4’te GRP78 ve LGR5’in ATF-4, HIF-1 α , midkin ve tümör sayısı ile aralarındaki korelasyon değerleri ifade edilmiştir. Ayrıca ATF-4 ile PERK ve tümör sayısı arasında da pozitif korelasyon bulunmaktadır (sırasıyla p<0,01; r=0,415 ve p<0,01; r=0,405).

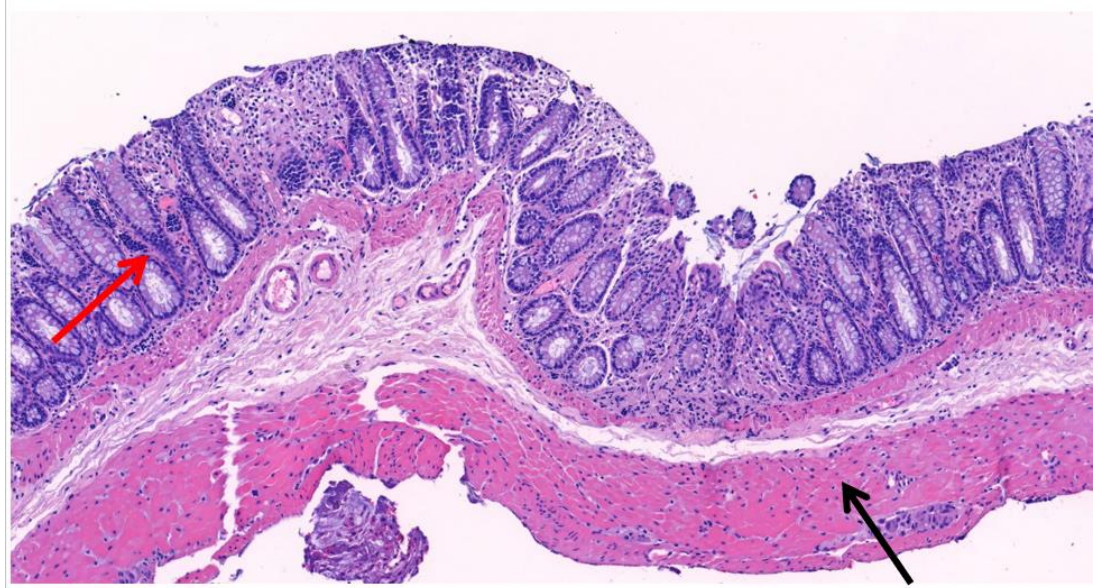
3.5. Histopatolojik Açıdan Değerlendirme

Çalışmamızda Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kolon dokusu histopatolojik açıdan tümör oluşumu TNM sınıflandırması (Çizelge 2.1) ve Grade bakımından değerlendirilmiş olup gruplar arası veriler incelenmiştir.



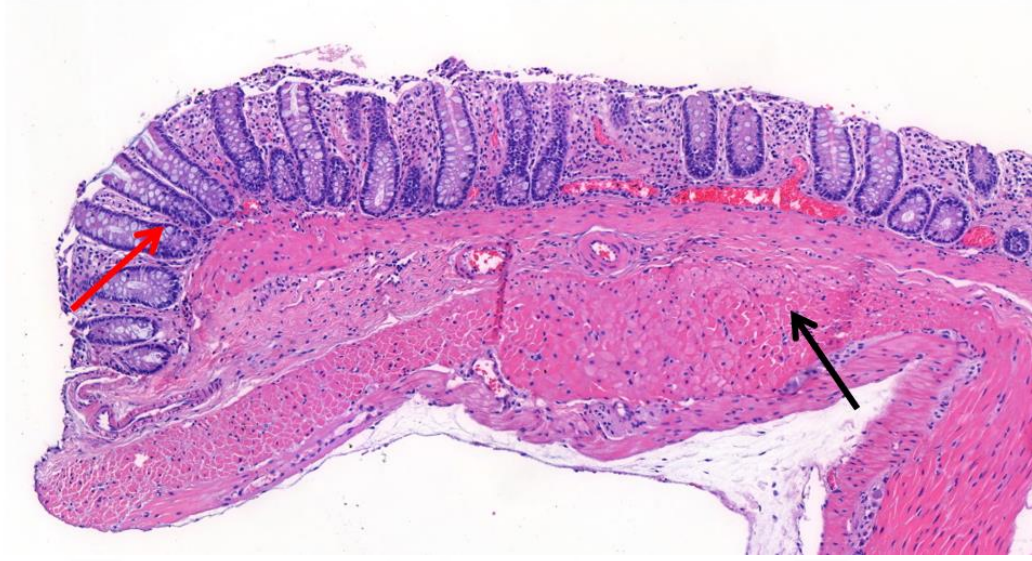
Şekil 3.9. Kontrol grubu ratlarda kolon dokusunun görünümü

Normal mukoza (), muskulus propria (). (X10)



Şekil 3.10. İlk aşama GA uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü

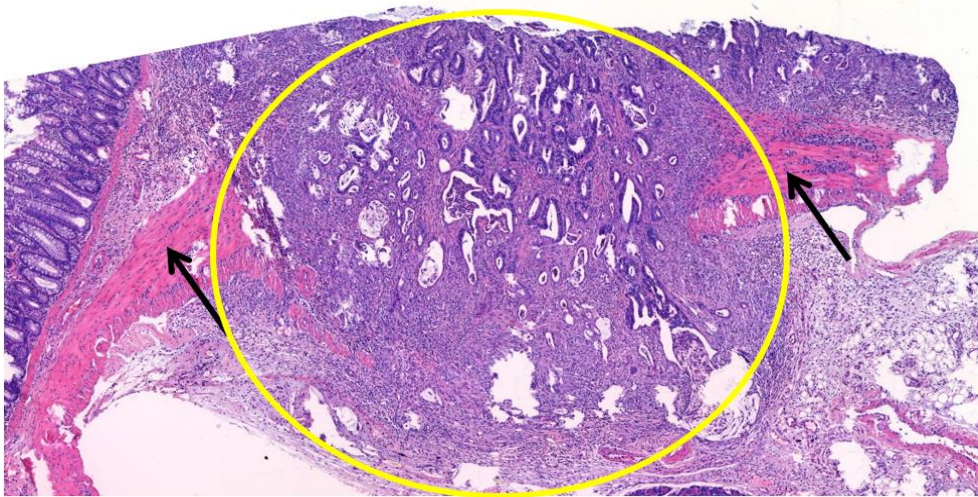
Normal mukoza (), muskulus propria (). (X10)



Şekil 3.11. Son aşama GA uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü

Normal mukoza (↑), muskularis propria (↑). (X10)

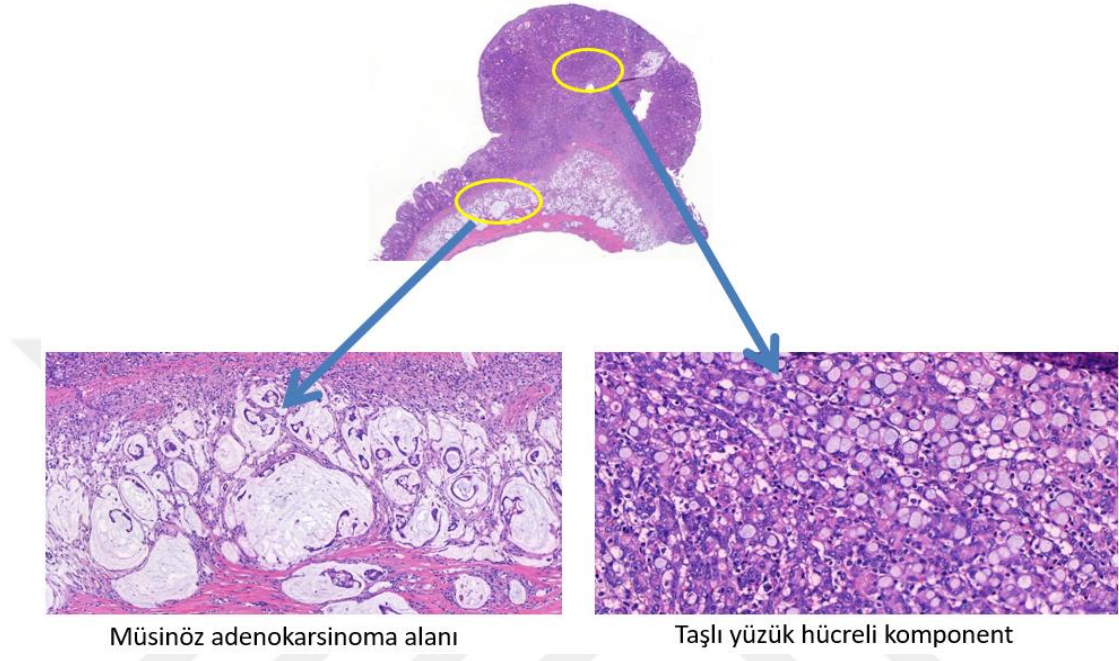
Kontrol, ilk aşama GA ve son aşama GA gruplarına ait Hematoksilen Eozin ile boyanan kolon dokularının histolojik incelemesi sonucunda kolon histolojik yapısının normal görünümüne sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11). Polip/tümör oluşumu bu gruplarda gözlenmemiştir.



Şekil 3.12. DMH uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü

Tümör alanı (○), muskularis propria (↑). (X4,2)

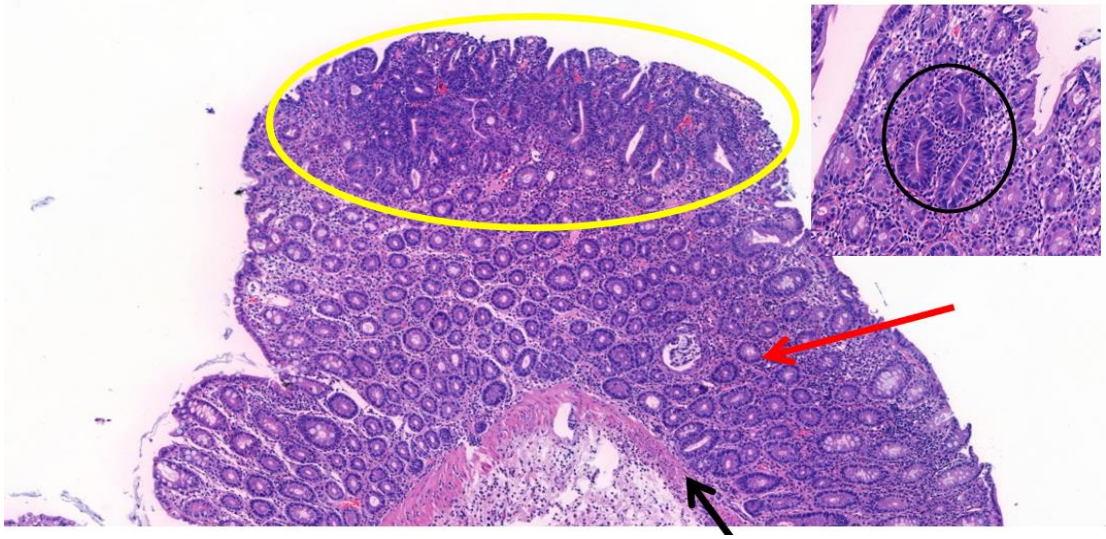
Şekil 3.12’de DMH uygulanan gruptaki ratlardan birine ait olan kolon dokusunda Grade I ve T3 evresinde olan konvansiyonel adenokarsinom oluşumu görülmektedir. Tümör kas tabakasını geçip submukozaya invaze olmuştur.



Şekil 3.13. DMH uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü

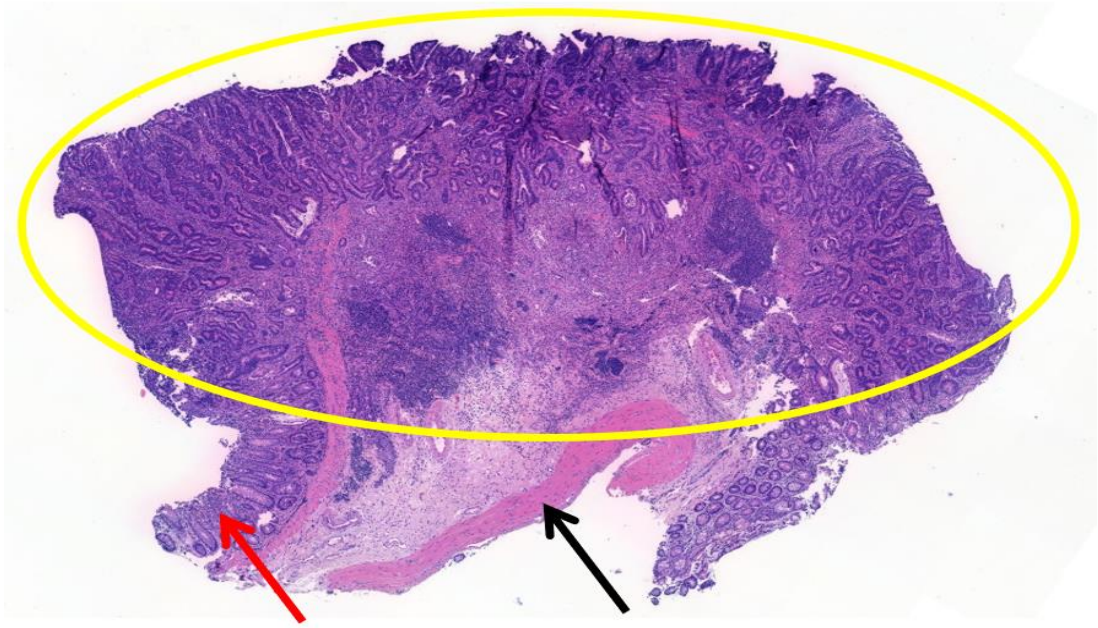
Tümör alanı (○). (X10)

Şekil 3.13’te DMH uygulanan gruptaki ratlardan birine ait olan kolon dokusunda Grade III ve T2 evresinde olan müsinöz ve taşlı yüzük hücreli adenokarsinom oluşumu görülmektedir. Tümör muskulis propriyaya invaze olmuştur. DMH uygulanan gruptaki tüm ratların kolon dokusuna ait histolojik değerlendirme yapıldığında; oluşan tümör dokularının T2 veya T3 evresinde oldukları gözlenmiştir.



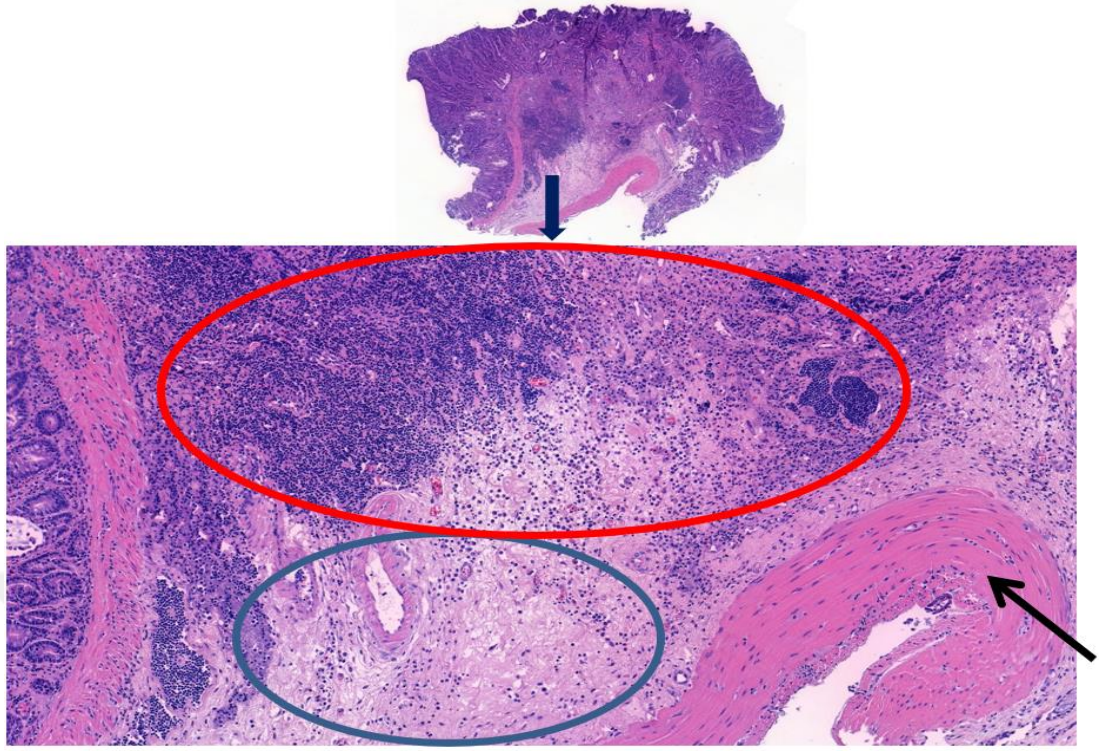
Şekil 3.14. DMH+GA uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü

Normal mukoza (↑), muskulis propria (↑), şiddetli displazi (○) ve yakınlaştırılmış bölgede aberran kript odakları (○) (X15).



Şekil 3.15. İlk DMH sonra GA uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü

Normal mukoza (↑), muskulis propria (↑), şiddetli displazi (○) (X2,7).



Şekil 3.16. İlk DMH sonra GA uygulanan ratlarda kolon dokusunun görünümü

Muskuloris propria (), iltihap hücreleri (), hyalinizasyon alanı () (X9).

DMH grubundan farklı olarak; DMH+GA ve ilk aşama DMH sonra GA uygulanan gruplarda adenokarsinom içeren kolon dokularının olmasıyla birlikte; adenokarsinoma ilerlemeden şiddetli displazi ile aberran kript odaklarının görülmesi ve iltihap hücrelerinin hasarlanan dokularda onarım sürecini başlatması GA'nın bu dokular üzerindeki etkinliğini veya geciktiriciliğini göstermektedir. Ancak bu gruplardaki tüm ratların dokularında bu oluşumlara rastlanmamış olup adenokarsinom gösteren rat sayısı daha fazladır. DMH+GA uygulanan gruptaki tüm ratların kolon dokusuna ait histolojik değerlendirme yapıldığında; on iki kesitten dördünde aberran kript odakları ve şiddetli displazi alanı yer alırken diğerlerinde adenokarsinom oluşumu gözlenmiştir. İlk DMH sonra GA uygulanan grupta ise alınan on iki kesitten histolojik değerlendirme yapıldığında sadece iki kesitte iltihap hücrelerinin olduğu, bir kesitte şiddetli displazi alanı yer alırken diğerlerinde adenokarsinom oluşumu gözlenmiştir.

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda ilk olarak 20 haftalık toplam sürenin ilk 10 haftası boyunca haftada bir kez sağ subkutan olarak uyguladığımız DMH ile deneysel kolon kanseri modelinin oluşmasını amaçladık. Deney protokolü tamamlanınca hem makroskopik hem de histopatolojik olarak ilk hedefimizi gerçekleştirdiğimizi gösterdik. GA'nın deneysel olarak oluşturulan kolon kanseri modelimizde ne denli etkin olabileceğini gösterebilmek için; kontrol, deney protokolünün ilk 10 haftası boyunca GA uygulanan, deney protokolünün son 10 haftası boyunca GA uygulanan, ilk 10 hafta sadece DMH enjeksiyonu yapılan, ilk 10 hafta boyunca DMH+GA birlikte uygulanan ve ilk 10 hafta DMH enjeksiyonu yapıp devamındaki 10 hafta boyunca GA uygulanan olmak üzere 6 deney grubu oluşturduk. Tüm gruplar 20 haftalık deney süresinin sonunda sakrifiye edildi. İlk olarak gruplar arası antropometrik ölçümler açısından ve kolon dokusundaki polip/tümör sayıları bakımından değerlendirme yapıp sonrasında araştırdığımız parametrelerle GA'nın kolon kanseri üzerindeki etkisini gözlemlemeyi hedefledik.

Grupları antropometrik ölçümler açısından karşılaştırdığımızda; başlangıç ($p<0,001$) ve son ($p<0,05$) vücut ağırlıkları açısından gruplar arası anlamlı fark bulunurken kilo alımı ve büyüme hızı arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Gruplar arası kilo alımı ve büyüme hızı arasında anlamlı farklılıkların olmaması deney protokolünün sağlıklı bir şekilde gerçekleştiğini gösterirken başlangıç vücut ağırlıkları arasında fark olması çalışmamızı etkileyebilecek bir sonuç değeri taşımamaktadır. Ancak büyüme hızlarına bakıldığında özellikle sadece DMH uygulanan grupta bu oranın diğer gruplara göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuçta kolon kanseri modeli oluşturulan grupta beklenen bir durumdur (Sivaranjani ve ark., 2016). Sakrifikasyon işlemi sonrası kolon dokusunun tamamen çıkarılması ile ölçülen kolon ağırlığının ve kolon ağırlığının son vücut ağırlığına bölünmesi ile elde edilen oranın DMH uygulanan gruplarda diğer üç gruba göre yüksek olduğu görülmektedir (Çizelge 3.1). Bu durum da Çizelge 3.2'de verilen tümör/polip sayılarıyla doğru orantılıdır.

Ratlar sakrifiye edildikten sonra makroskopik inceleme yapıldığında DMH uygulanan grupların hepsinde en az bir polip/tümöre rastlanmıştır. Toplam ve rat başına düşen polip/tümör sayısının GA uygulanan gruplarda sadece DMH uygulanan gruba göre yaklaşık %50 olarak azaldığı gözlenmiştir (Çizelge 3.2). Bu bulgu Giftson ve ark. (2011), tarafından yapılan deneysel kolon kanserinde GA'nın ksenobiyotik metabolizması üzerine etkinliğinin araştırıldığı çalışmanın bulgularıyla uyumlu bulunmuştur (Giftson ve ark., 2011).

Gruplar arası, serumda baktığımız total kalsiyum, total protein ve bu iki değeri kullanarak Zeisler metoduyla hesapladığımız iyonize kalsiyum düzeyleri karşılaştırıldığında bu parametrelerin kontrol grubunda DMH grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu izlenmiştir (her biri için; $p < 0,05$). Kalsiyum, tümör progresyonu için temel süreçler olan hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz, göç ve farklılaşmada rol alan pay sahiplerinden biridir. İntraselüler Ca^{2+} homeostazının önemli bir bileşeni, mikromolar seviyede Ca^{2+} depolayan ER'dir. ER'nin mikromolar Ca^{2+} içeriği, protein sentezi, katlanması ve trafiği için gerekli olduğundan, ER Ca^{2+} içeriğinin tükenmesi, UPR'yi indükleyerek, ER'deki protein katlanma durumunu çekirdeğe ve sitoplazmaya ileten entegre bir hücre içi sinyal yolunu başlatır ve hücrenin hayatta kalması için gerekli olan adaptif mekanizmaların aktivasyonuna yol açar (Kaur ve Sanyal, 2011). Kaur ve Sanyal (2011), tarafından yapılan çalışmada; DMH ile kolon kanseri oluşturulan ve tedavi edici olarak diklofenak kullanılan ratlarda intraselüler kalsiyum konsantrasyonu floresan özelliği taşıyan fura-2 AM yöntemi ile ölçülmüştür. Diğer tüm gruplara kıyasla sadece DMH uygulanan gruba ait kolon hücrelerinde Ca^{2+} seviyesinin önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir (Kaur ve Sanyal, 2011). Rivera-Huerta ve ark. (2017), tarafından kolon kanseri modeli oluşturulan sıçanlarda inülinin tedavi edici etkisi araştırılmış ve çalışmamıza benzer şekilde serum kalsiyum düzeylerine bakılmıştır. Ama gruplar arası serum kalsiyum düzeylerinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Rivera-Huerta ve ark., 2017). Bizim çalışmamızda da serum iyonize kalsiyum düzeylerinde DMH+GA ve ilk DMH sonra GA uygulanan gruplarda DMH grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Oksidatif stres, vücudun antioksidan aktivitelerinin zararlı bir uyarıcı tarafından üretilen aktif oksidanlarla baş edemediği durumlarda oluşan oksidatif hasara yanıt olarak ortaya çıkar. Oksidatif stres, doku protein denatürasyonunu, DNA hasarını ve lipid peroksidasyonunu indükleyen makromoleküler oksidatif hasarı içerir ve vücudun normal metabolik aktivitesine müdahale ederek hastalıkların ortaya çıkmasına ve/veya gelişmesine yol açar. Oksidatif stresin pnömoni, pankreatit, diyabetik nefropati, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi çeşitli hastalıklarda rol oynadığı doğrulanmıştır (Wu ve ark., 2017). TOS ve TAS vücudun genel oksidan ve antioksidan durumunu ortaya çıkarmak için ölçülmektedir. TOS'un TAS'a olan oranı da OSİ'yi vermektedir. TOS, TAS ve OSİ vücuttaki genel oksidatif stres durumunu değerlendirmek için kullanılan oksidatif stres parametreleridir. Biz de çalışmamızda, bu oksidatif stres parametreleri ile kolon kanseri arasındaki ilişkiyi ve gallik asidin bu parametreler üzerine olan etkisini değerlendirdik.

Çalışmamızda serum TAS düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmazken, kolon TAS düzeylerinde DMH+GA ve ilk DMH sonra GA verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir (sırasıyla $p<0,05$; $p=0,001$). DMH uygulanan ratlarda ise kontrol grubuna göre kolon TAS düzeyleri düşmüş ancak anlamlı fark bulunmamıştır (Çizelge 3.3). Serum TOS düzeylerinde ise beklenenin aksine kontrol grubunda DMH grubuna göre daha yüksek TOS düzeylerine sahip olduğu bulunmuştur ancak anlamlı değildir. Ayrıca DMH uygulanan gruplarda GA'nın serum TOS düzeylerini yükselttiği görülmektedir. Benzer şekilde kolon TOS düzeylerinde de kontrol grubunun DMH grubuna göre daha yüksek ama anlamlı olmadığı görülmektedir. OSİ'ye baktığımızda serum indeksinin DMH grubunda kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlenirken kolondaki indeks değeri bunun tam tersini yansıtmaktadır (Çizelge 3.3). Ek olarak DMH ve GA'nın uygulandığı gruplarda (Grup 5 ve 6); GA verilmesinin hem serum hem de kolonda OSİ'yi arttırdığı görülmektedir. Literatüre baktığımızda deneysel kolon kanseri oluşturulan ve GA ile tedavi etkinliğine bakılan ratlarda TAS ve TOS parametrelerinin araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızın bulguları bu açıdan değerli olup, çalışma bulguları antioksidan/oksidan indeksi değerlendiren diğer parametrelerin (MDA, SOD, katalaz gibi) çalışıldığı araştırmaların bulgularıyla

karşılaştırılmıştır. Manju ve ark. (2005), tarafından yapılan; çalışmamıza benzer şekilde deneysel kolon kanseri oluşturmak için DMH kullanılan ve luteolinin etkisine bakılan çalışmada; MDA'ya ek olarak lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonu sırasında oluşan lipid hidroperoksitler ve konjuge dienler gibi reaktif moleküllerin düzeyleri değerlendirilmiştir ve kontrol grubuna göre DMH grubunda bu parametrelerin anlamlı olarak azaldığını belirtmişlerdir. DMH uygulanan ratlara luteolin verildiğinde ise bu parametrelerin yükseldiği ve kontrol grubundakilere yakın değerler bulduklarını bildirmişlerdir (Manju ve ark., 2005). Nirmala ve Ramanathan (2011), tarafından yapılan çalışmada ise DMH ile kolon kanseri oluşturulan ratlarda kamferolün etkisi araştırılmıştır. MDA seviyesinin DMH uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı bildirilirken, kamferol uygulanmasıyla birlikte DMH grubuna göre MDA seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Nirmala ve Ramanathan, 2011).

Çalışmamızdaki veriler, TOS ile hücresel proliferasyon hızı arasında ters bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır, yani, yüksek oranda çoğalan tümör hücreleri, normal hücrelere kıyasla belirgin şekilde düşük seviyede oksidan statü göstermiştir. Artan hücre proliferasyonunun kolon kanserinin patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Kanser hücreleri, çoğalmalarına fayda sağlayan belirli özellikler kazanırlar ve lipid peroksidasyon seviyesi düşük olduğunda daha hızlı çoğalma eğilimindedirler (Manju ve ark., 2005; Nirmala ve Ramanathan, 2011). Bu nedenle, DMH grubundaki ratlarda gözlenen azalmış kolon ve serum TOS düzeyleri, artan hücre proliferasyonuna bağlı olabilir. Böylece kötü huylu dokular serbest radikal saldırılarına karşı daha az duyarlı daha dirençlidir ve dolayısıyla lipid peroksidasyonu daha az yoğundur. Sonuçlarımız, malign hücrelerin serbest radikallere karşı normal muadillerinden daha iyi korunduğuna ilişkin örnek verilen çalışmalarla uyumludur (Manju ve ark., 2005; Nirmala ve Ramanathan, 2011). Buna ek olarak, DMH uygulanan ratlarda azalan TOS seviyeleri, hedef organların serbest radikal saldırısına karşı artan direnç ve/veya azalan duyarlılığından da kaynaklanabilir. Proliferasyon ve TOS seviyeleri ters orantılı olduğundan ve GA bilinen bir antiproliferatif ajan olduğundan, kolon ve serumda gözlenen oksidan statünün artışına katkıda bulunabilir. Bu durum, tümör hücrelerinin serbest radikal

saldırısına karşı direncini azaltıp, duyarlılığını artırabilir ve bu da hücre proliferasyonunun azalmasına neden olabilir. Bu nedenle, GA'nın antiproliferatif etkileriyle DMH'nin neden olduğu kolon kanserini önlediğini düşünmekteyiz.

Hipoksi, çoğu solid tümörün mikro çevresinin önemli bir faktörüdür. HIF-1 α alt birimi, hipoksik koşullar altında stabil olan ancak normoksik koşullar altında hızla bozulan oksijen tarafından düzenlenir. HIF-1 α , hipoksik ortam altında tümörün transkripsiyonel yanıtını düzenlemek için önemli bir faktördür ve birçok tümörün gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Du ve ark., 2020). Du ve ark. (2020), tarafından HIF-1 α ve Annexin A3'ün kolon kanseri üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı çalışmada; HIF-1 α ekspresyon seviyelerinin kolon kanseri dokularında normal kolon dokularındaki ekspresyon seviyelerinden daha yüksek olduğu ve HIF-1 α 'nın susturulduğu Nude fare modelinde ksenograft tümör hacminin azaldığı bildirilmiştir (Du ve ark., 2020). He ve ark. (2016), tarafından yumurtalık kanseri hücre hatları üzerinde GA'nın etkisinin araştırıldığı çalışmada; HIF-1 α ekspresyonunun GA ile down-regüle edildiği bildirilmiştir ve sonucunda yumurtalık kanserinin önlenmesi ve tedavisinde GA'nın yüksek bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varmışlardır (He ve ark., 2016). Seyfi ve ark. (2018), tarafından HT29 kolon kanseri hücre hatları üzerine verbascosidenin etkinliğinin araştırıldığı çalışmada; HT29 hücre hatlarında HIF-1 α 'nın aşırı eksprese edildiği ama verbascosidenin HIF-1 α sinyal yolunu baskılanmasıyla kolon kanseri metastatik fenotipini bastırmak için uygun bir aday olabileceğini belirtmişlerdir (Seyfi ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda da bu bulgulara benzer şekilde DMH ile kolon kanseri oluşturulan grupta HIF-1 α düzeyleri diğer gruplara göre yüksek olmasına rağmen anlamlı fark bulunamamıştır. Ayrıca DMH+GA ve ilk DMH sonra GA uygulanan gruplarda da DMH grubuna göre HIF-1 α düzeyleri azalmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde DMH ile deneysel kolon kanseri oluşturulan Yang ve ark. (2013), tarafından yapılan çalışmada yumurtalıkları alınmış ratlar; kontrol, DMH, östrojen+DMH olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Bu çalışmada HIF-1 α ekspresyonlarına real time PCR ile bakılmış ve DMH grubunda HIF-1 α ekspresyonu yüksek bulunurken DMH+östrojen grubunda seviyesinin azaldığı bulunmuştur (Yang ve ark., 2013). Bizim çalışmamızı literatürdeki diğer çalışmalardan ayıran kısım kolon kanseri

oluşturulan ratlarda HIF-1 α ölçümünün ilk defa ELISA ile belirlenmiş olması ve GA'nın bu yolak üzerindeki etkinliğini göstermiş olmamızdır.

Midkin, kanser gibi çeşitli hastalıklarda oldukça yüksek olan çözünabilir salgılanan bir proteindir ve bu nedenle değerli bir hastalık biyobelirteci olarak görev yapabilir. Birçok kanser türünde midkinin, özellikle tümörün daha ileri aşamalara ilerlemesi sırasında aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir (Filippou ve ark., 2020). Ito ve ark. (2019), tarafından mide kanseri tanısı almış ve evre I, II, III ve IV olarak gruplara ayırdıkları hastalarda serum midkin seviyeleri ölçülmüştür. Daha sonra bir cut-off değeri belirleyerek yüksek ve düşük serum midkin düzeyine sahip gruplar şeklinde hastaları iki gruba ayırmışlardır. Çalışmalarında yüksek serum midkin düzeylerinin, yüksek CEA ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bulunmuştur ($p<0.01$). Ayrıca yüksek serum midkin düzeyine sahip olan hastaların, düşük serum midkin düzeyine sahip olanlardan daha kötü genel sağkalım gösterdiği ama istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı bildirilmiştir (Ito ve ark., 2019). Benzer şekilde Stern ve ark. (2021), tarafından küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olan hastalarda serum midkin düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçülmüş ve yüksek serum midkin konsantrasyonuna sahip hastalar, düşük serum midkin konsantrasyonu olan hastalara kıyasla önemli ölçüde daha kısa bir genel sağkalım göstermişlerdir ($p<0.05$). Ayrıca çalışmada serum midkin düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre bu hastalarda anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (Stern ve ark., 2021). Çalışmamıza benzer şekilde Dik ve ark. (2022), tarafından yapılan bu çalışmada, Tarantula cubensis alkollü ekstraktı (TCAE) ve Nerium oleander (NO) distilatının azoksimetanla (AZM) deneysel olarak kolon kanseri oluşturulan ratlarda karaciğer ve kolon dokuları üzerindeki etkilerine midkin düzeyleri de dahil olmak üzere bakılmıştır. Çalışmada kontrol, kolon kanseri (AZM), AZM+TCAE ve AZM+NO olmak üzere dört gruba yer verilmiştir. AZM grubunda kolon ve karaciğer dokularındaki midkin seviyelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu ve TCAE ile NO verilmesinin kolonda midkin düzeylerindeki artışı önlediği bildirilmiştir ($p<0.05$). Bizim çalışmamızda da DMH grubunda kontrol grubuna göre serum midkin düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). DMH+GA ve ilk aşama DMH sonra GA uygulanan gruplarda ise DMH grubuna göre midkin

seviyelerinde azalma gözleendiği ama anlamlı fark olmadığı bulunmuştur. GA'nın hem tek başına uygulanan gruplarda anlamlı olmasa da kontrole göre yüksek olması hem de önleyici ve tedavi edici gruplarda DMH grubuna göre anlamlı bir azalmanın olmaması nedeniyle GA'nın midkin yolağı üzerinde kolon kanseri oluşumunun engellenmesinde pozitif etkisi vardır sonucuna varamayız. Çalışmamız GA'nın serum midkin düzeyleri üzerindeki etkinliğini değerlendiren ilk çalışma olması bakımından değerlidir. Ancak bu çalışmada sadece serum midkin düzeyleri ölçülerek değerlendirilmiş, kolon dokusundaki midkin düzeyleri ölçülememiştir. GA'nın bu yolaktaki midkin üzerinden olası etkinliğini aydınlatabilmek için direkt olarak kolon dokusu üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalar faydalı olabilir.

Çalışmamızdaki en önemli bulgulardan biri de HIF-1 α ve midkin düzeylerinin kontrol grubu ve DMH grubu karşılaştırıldığında ROC eğri altındaki kalan alanlarının anlamlı olmasıdır. HIF-1 α için AUC=0,785; $p<0,05$ ve midkin için AUC=0,909; $p<0,01$ olarak Şekil 3.6'da gösterildiği üzere bulunmuştur. Bu değerler gerek HIF-1 α gerekse midkin için kolon kanserinde tarama ve tanıda kullanılabilecek parametreler olduklarını işaret etmektedir. Toplu olarak 1119 kanser hastasını ve uygun kriterleri karşılayan 1441 kontrol içeren on çalışmanın verilerinin kullanıldığı bir kohort çalışmasında serum midkin değerlerinin kanserin teşhisinde tanısal değerinin fazla olduğu belirtilmiştir. Ancak serum midkin düzeyinin tanısal doğruluğunu değerlendirmek için daha geniş kohortta daha güvenilir çalışmalar yapılması gerektiğini belirtmişlerdir (Jing ve ark., 2017). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri olan 153 hasta, iyi huylu akciğer hastalığı olan 23 hasta ve 95 sağlıklı kontrolde serum midkin düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. ROC eğrisi analizinde küçük hücreli dışı akciğer kanseri varlığını öngörmek için cut-off serum midkin konsantrasyonunu 400 pg/mL, duyarlılığı ve özgüllüğünü ise sırasıyla %71,2 ve %88,1 olarak belirtmişlerdir (Xia ve ark., 2016). Bu çalışmaların sonucu bizim bulgularımızla uyumlu olup midkinin spesifik olarak tek bir kanser türünden ziyade tüm kanserlerde ortak bir prognostik parametre olarak kullanılabileceğini öngörmektedir. Serum HIF-1 α düzeylerini belirten çok kısıtlı sayıda çalışma olup, tanısal olarak değerini ifade eden çalışma literatürde yer almamaktadır. Bu bağlamda çalışmamızın sonuçları önem kazanmaktadır.

UPR, hücre içi sinyal iletim yollarını aktive ederek ER lümenindeki katlanmamış proteinlerin yüküne yanıt veren düzenleyici bir sistemdir. Bazı fizyolojik çevrelerde, hücrenin hayatta kalması veya ölümü hücre içi redoks koşulları ve UPR tarafından kontrol edilir (Sharma ve ark., 2020). Anormal ER stres yanıtı, diyabet, inflamasyon, ateroskleroz, karaciğer hastalığı, kanser, Alzheimer ve Parkinson gibi çeşitli hastalık durumlarından kaynaklanan genetik mutasyon, yaşlanma ve patolojik durumlar tarafından indüklenebilir (Kim ve ark., 2016). Tüm bu süreçte GRP-78, UPR'de primer sensör görevi görür. Aktif hale gelen GRP-78; ATF-6, PERK ve IRE-1 α sinyal yollarını indükler. GRP-78'in aktivasyonu, ER stresi altında hücre canlılığının korunmasında önemli bir rol oynar. Apoptozun inhibisyonu yoluyla GRP-78, tümör proliferasyonu, tümör anjiyogenezi, bağışıklık direnci ve antitümör ilaç direncinde önemli bir rol alır. Çalışmamızda UPR sinyal yolağında yer alan GRP-78, ATF-6, PERK, IRE-1 α , ATF-4 ve CHOP proteinlerinin ratlarda deneysel kolon kanseri oluşumuyla birlikte oluşan ER stresine verdikleri yanıt ve GA'nın bu proteinler üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızda Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de gösterildiği gibi GRP-78 protein ifadesine baktığımızda; kontrol grubuna göre DMH uygulanan grupta yüksek ($p<0,001$) iken DMH uygulanan gruba göre DMH+GA ($p<0,01$) ve son aşama GA ($p<0,05$) uygulanan grupta anlamlı derecede düştüğü görülmektedir. Ayrıca DMH uygulanan grupta ilk aşama GA ve ilk DMH sonra GA uygulanan gruba göre de anlamlı olmasa da GRP-78 protein ifadelerinin düştüğü görülmektedir. Genel olarak baktığımızda GA uygulanan tüm gruplarda GRP-78 ifadesinin düştüğünü söyleyebiliriz. ATF-4 protein ifadesine baktığımızda; kontrol grubuna göre ilk aşama GA ($p<0,01$), DMH ($p<0,001$) ve ilk DMH sonra GA ($p<0,01$) gruplarında anlamlı derecede arttığı görülmektedir. Ayrıca DMH ve ilk aşama GA grubuna göre de DMH+GA grubunda ATF-4 protein ifadesinin anlamlı olarak azaldığı görülmektedir (her ikisi için $p<0,05$). CHOP, ATF-6 ve IRE-1 α protein ifadelerine baktığımızda ise gruplar arası anlamlı bir farkın olmadığı görülmektedir. PERK protein ifadesine baktığımızda; ilk aşama GA ve DMH grubuna göre son aşama GA grubunda anlamlı derecede azaldığı görülmektedir (her ikisi için $p<0,05$). Ayrıca kontrol grubuna göre DMH grubunda artarken, DMH grubuna göre de DMH+GA ve ilk DMH sonra GA

gruplarında PERK protein ifadesinin azaldığı ama anlamlı olmadığı görülmektedir. Bulgularımıza benzer şekilde Sharma ve ark. (2018), tarafından yapılan çalışmada p-kumarik asidin kolon kanseri oluşturulan ratlarda GRP-78 üzerine etkisine bakıldığında; GRP-78'in tümör dokularında aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir. p-Kumarik asidin, tek başına DMH uygulanan ratlara kıyasla GRP-78 ekspresyonunu aşağı regüle ettiği bulunmuştur (Sharma ve ark., 2018). Bu çalışmanın bulguları bizim çalışmamızla uyumlu olup, GRP78'in DMH uygulanan sıçanların kolon dokusunda yukarı regüle edildiğini ve bu durumda GRP78'in aşırı ekspresyonunun tümör hücrelerinin zorlu koşullara uyum sağlamasına yardımcı olduğunu ve homeostazı sürdürerek hayatta kalma eğilimi sağladığını göstermektedir.

Kolon kanseri hücre hatlarına dihidroksi fenil etanolün (DPE) 24 ve 48 saat süreyle 50 ve 100 μ M uygulandığı çalışmada; ATF-6 ekspresyonunun hem zaman hem de doz miktarı arttıkça kontrol grubuna göre ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, CHOP'un ekspresyon seviyesinin, daha yüksek dozlarda gözlenen hücre sağkalımındaki bozulma ile bağlantılı olarak, kolon kanseri hücre hatlarında doza ve zamana bağlı bir şekilde arttığını bulmuşlardır. CHOP'tan farklı olarak, GRP-78 ekspresyonunun ise doza ve zamana bağlı olarak etkilenmediğini belirtmişlerdir. Stresin yoğunluğuna ve süresine bağlı olarak UPR, CHOP'u yukarı regüle ederek hücre sağkalımında bir azalmaya neden olabilir veya GRP-78'i yukarı doğru düzenleyerek hücrelerin strese uyum sağlamasına yardımcı olabilir (Benedetti ve ark., 2021). Aynı çalışmada ceapinin DPE ile etkisini araştırdıklarında; tek başına ceapin uygulanmasının kontrol grubuna göre GRP-78 ekspresyonunda anlamlı derecede azalmaya neden olduğu görülürken hem ceapin hem de DPE+ceapin uygulanmasında CHOP ekspresyonunun kontrole göre değişmediği gözlenmektedir. Normal hücrelere kıyasla temelde stres altında olan kanser hücrelerinde ER stresini şiddetlendirerek hücre ölümünün uyarılması veya bu etkiyi elde etmek için UPR sinyal yolağının aktivasyonu, umut verici antikanser stratejileri olarak ortaya çıkmaktadır. Çalışmamıza benzer şekilde GRP-78 ekspresyonunun DMH grubuna göre GA uygulananlarda azaldığı gözlenirken CHOP ve ATF-6 ekspresyonunun değişmediği gözlenmiştir. Kanser progresyonunun ileri evrelerinde, kanser hücreleri aşırı ER stresine maruz kaldığında, GRP-78'in hayatta

kalma yanlısı ve metastatik işlevler aracılığıyla kanserin ilerlemesini desteklediği keşfedilmiştir. Kanser hücresi yüzeyindeki GRP-78, hücre membranı sinyal yollarında aktiftir. Böylece proliferasyonu, apoptozu ve tümör bağışıklığını düzenler (Huang ve ark., 2021).

Normal koşullar altında ER'ye bağlı sensörler, yani PERK, IRE-1 α ve ATF-6, GRP-78 ile ilişkilendirilerek etkin olmayan durumda tutulur. ER stres koşulları sırasında ise GRP-78 ayrılarak UPR etkinleştirilir. UPR, strese bağlı olarak hücre adaptasyonunu veya stresin yoğunluğuna ve süresine bağlı olarak apoptoz yoluyla hücre ölümünü indükleyebilir. Böylece UPR sinyal ağı, sitoprotektif ve apoptotik olmak üzere iki farklı yola ayrılır (Sharma ve ark., 2018). Bazı çalışmalarda, UPR sinyal yollarının aktivasyonunun ve eIF2 α fosforilasyonunun solid tümör büyümesi, istilas ve anjiyogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu bulgular, eIF2 α 'nın fosforilasyonun ER stres koşullarında hücre adaptasyonunun sağlanmasında ana düzenleyici olduğunu ve UPR'nin PERK/eIF2 α /ATF-4 ekseninin bu bakımdan daha etkin olduğunu göstermektedir (Ozcan ve Tabas, 2012; Sharma ve ark., 2018). GRP-78'in aşağı regülasyonu ise, ER lümeninde yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine ve dolayısıyla uzun süreli ER stresine neden olabilir. Çalışmalar, uzun süreli ER stresinin ise mitokondriyal aracılı apoptoza yol açan PERK/eIF2 α /ATF-4/CHOP yolunu aktive ettiğini göstermiştir (Rozpedek ve ark., 2016; Sharma ve ark., 2018).

Bizim çalışmamızda da aktif olarak kullanılan yolağın artan ekspresyonlarına baktığımızda PERK/eIF2 α /ATF-4/CHOP olduğu görülmektedir. ATF-4, stres koşullarında hücre adaptasyonunda yer alan çok çeşitli genleri düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür, ancak uzun süreli ER stresi sırasında ATF-4, ER stresinin neden olduğu apoptozu düzenleyen ana bir molekül olan CHOP genlerini de uyarabilir. CHOP'un artan ekspresyonu, proapoptotik Bim'in transkripsiyonuna neden olur ve apoptozu tetikleyen antiapoptotik Bcl-2'nin ekspresyonunu azaltır. Sharma ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada; DMH uygulanan sıçanlarda artan p-PERK, p-eIF2 α , ATF-4 ve CHOP ekspresyonu ile ilişkili GRP-78 ekspresyonunun azalmasının p-kumarik asit takviyesinin uzun süreli ER stresini indükleyerek

adaptasyon tepkisini geçersiz kıldığını ve böylece apoptoz indükleyicisini uyguladığını gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da; GRP-78 ekspresyonunun DMH uygulanan ratlarda artmasıyla birlikte, PERK/eIF2 α /ATF-4/CHOP yolağındaki PERK ve ATF-4 proteinlerinin ifadesinin kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir. Gallik asidin uygulanmasıyla birlikte GRP-78 ekspresyonunun özellikle DMH+GA grubunda DMH grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir ($p<0,001$). PERK ve ATF-4 ekspresyonlarında DMH+GA ve ilk DMH sonra GA uygulanan gruplarda ise anlamlı olmasa da DMH grubuna göre azalış söz konusudur. Bu bulgularla çalışmamızda GA takviyesinin uzun süreli ER stresini indükleyerek adaptasyon tepkisini geçersiz kıldığını ve böylece hücreleri apoptoza sürüklediğini düşünmekteyiz. Western-blot analizlerindeki örneklem sayıları artırılarak ileri çalışmalar yapılırsa sonuçların etkinliği daha iyi ortaya konulmuş olacaktır.

En iyi karakterize edilmiş doku kök hücre popülasyonlarından biri, homeostatik bağırsak epitelindeki tüm farklılaşmış hücre tiplerine yol açan gastrointestinal sistemdeki LGR5 kript hücreleridir. LGR5+ hücrelerinin bağırsak kanserlerinin ve kolorektal kanserin orjinindeki hücreler olarak görev yaptığı öne sürülmüştür, bu da LGR5+ hücrelerinin elimine edilmesinin tümör büyümesi ve devamlılığı üzerinde derin bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir (Junttila ve ark., 2015). LGR5'in kolon kanser kök hücreleri için bir belirteç olduğu hipotezi, LGR5+ tümör popülasyonunu hedeflemenin kolon kanserlerini tedavi etmede etkili bir yol sağlayabileceğini düşündürmektedir. Junttila ve ark. (2015), tarafından LGR5'in normal ve kolon kanserine sahip insanlarda immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesinin yapıldığı araştırmada, normal insan kolon dokusunda, kolon kanseri hastalarının kolon dokusuna göre ekspresyon seviyesinin daha az olduğunu bulmuşlardır (Junttila ve ark., 2015). Feima ve ark. (2015), tarafından DMH ile kolon kanseri oluşturulan ratlarda yapılan çalışmada; normal kolon mukozasına sahip olan ratlarda tümör olanlara kıyasla LGR5 ekspresyonlarının anlamlı derecede düşük olduğunu bildirmişlerdir. Casonava-Marti ve ark. (2020)'nin yaptığı çalışmada; bağırsak organoidlerinde üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstraktına uzun süreli maruz bıraktıklarında L-Hücre farklılaşmasının arttığı ve kontrol grubuna göre üzüm

çekirdeği proantosiyanidin ekstraktı verilen grupta LGR5+'ın gen ekspresyon ifadesinin anlamlı derecede azaldığını belirmişlerdir. Çalışmamızın bulguları bu sonuçlarla uyumlu olup; kontrol grubuna göre DMH uygulanan ratlarda LGR5 ekspresyonun yaklaşık iki kat arttığı (Şekil 3.8.G) ve anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca çalışmamızda DMH enjekte edilen ratlara GA uygulanmasıyla birlikte LGR5 ekspresyonunun azaldığı gözlenmektedir. Özellikle DMH+GA grubunda DMH grubuna göre ekspresyonunda anlamlı fark bulunmamasına rağmen yaklaşık iki kat azalma gözlenmektedir. Bu bulgu çalışmamız açısından çok değerli olup, takviye olarak sağlanabilecek gallik asidin kolon kanseri tedavisinde etkin olabileceğini işaret etmektedir.

Çizelge 3.4'te gösterildiği gibi gruplar arası korelasyon analizine baktığımızda; tümör sayısı ile GRP-78, LGR5 ve ATF-4 protein ifadeleri arasında pozitif korelasyon olduğu gözlenmektedir (sırasıyla $r=0,414$, $p<0,01$; $r=0,350$, $p<0,05$; $r=0,405$, $p<0,01$). Ayrıca ATF-4 protein ifadesinin de GRP-78, LGR5 ve PERK protein ifadeleriyle de pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (sırasıyla $r=0,352$, $p<0,05$; $r=0,310$, $p<0,05$; $r=0,415$; $p<0,01$). Bu bulgular çalışmamız açısından önemlidir çünkü tümör sayısı arttıkça UPR sinyal yolağının aktif hale geldiğini ve GA uygulanmasıyla birlikte DMH+GA ve ilk DMH sonra GA uygulanan gruplardaki tümör sayılarının azalması da bu yolaktaki protein ifadelerinin azaldığını ve GA'nın bu yolakta etkin olabileceğini göstermektedir. Ek olarak GRP-78 protein ifadesinin serum HIF-1 α ile pozitif ($r=0,450$; $p<0,01$) ve serum midkin düzeyi ile de negatif ($r= -0,294$; $p<0,05$) korele olduğu gözlenmektedir. Midkin hücrel süreçlerde rol oynayan heparin bağlayıcı bir büyüme faktörüdür. DMH uygulanan grupta benzer şekilde hem midkin düzeyinin hem de GRP-78 ifadesinin kontrole göre yüksek olmasına rağmen negatif korelasyon görülmesi; sadece GA uygulanan gruplarda birlikte ve sonrasında uygulanan GA'ya göre daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Oksijen konsantrasyonu ER stresini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. HIF-1 α alt birimi de, büyük ölçüde oksijen konsantrasyonu tarafından düzenlenir ve hipoksi belirteci olarak hizmet etmektedir. Serum HIF-1 α düzeylerinin GRP-78 protein ifadesiyle pozitif korele olması literatür bilgisiyle uyumludur.

Tüm ratlar 20 haftalık deney süresi boyunca hayatta kalmıştır. Kontrol grubundaki (Grup 1) ve GA uygulanan gruplardaki ratlarda (Grup 2 ve 3) hiç tümöre rastlanmamıştır. DMH enjekte edilen ve GA uygulanan (Grup 5 ve 6) gruplarda ise, tek başına DMH enjekte edilen ratlara kıyasla tümör sayısında yaklaşık olarak % 50 oranında azalma göstermiştir (Çizelge 3.2). Şekil 3.9'da, kontrol grubundaki ratlara ait kolon dokusunun Hematoksilen ve Eozin ile boyanması (H&E) gösterilmiştir. Kontrol ratlarının kolonu, normal histopatolojik görünüme sahip normal mukozal bezler göstermektedir. Aynı durum Şekil 3.10 ve Şekil 3.11'de sadece GA uygulanan ratların kolon dokusunda da gözlenmektedir. Tek başına DMH uygulanan ratların kolonu, Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'te görüldüğü gibi konvansiyonel, müsinöz ve taşlı yüzük görünümlü adenokarsinom içermektedir. Adenokarsinomlar submukozaya ve muskularis propriyaya invaze haldedir. GA takviyeli DMH ratlarına ait kolon dokularının H&E ile boyanmasına baktığımızda ise; Şekil 3.14, Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'da görüldüğü gibi adeno karsinomlarının daha yüzeysel olduğu, şiddetli displazi alanlarıyla birlikte iltihap hücrelerinin yer almasıyla bir inflamatuvar yanıt oluşturdıkları görülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Deneyisel kolon kanseri oluşturulan ratlarda; makroskopik inceleme yapıldığında ilk olarak GA'nın tümör sayısı üzerindeki etkisi ve DMH grubuna göre yaklaşık % 50 oranında tümör sayılarında azalma olması önemlidir. Bu bulgu histopatolojik inceleme yapıldığında da; GA'nın önleyici ve tedavi edici olarak uygulandığı gruplarda, tümör oluşumun yüzeysel olması ve iltihap hücrelerinin yer alarak tedavi etmede de etkin olduğunun gösterilmesi çalışmamız açısından dikkat çekicidir.

Total protein ve kalsiyum değerlerini kullanarak iyonize kalsiyum hesaplaması yapılmıştır. Literatürde; intraselüler kalsiyum düzeylerinin ER stresi üzerindeki etkisine yönelik çalışmalar mevcutken, serum iyonize kalsiyumun etkisini değerlendiren çalışmaya rastlanmamıştır. Araştırmamızda DMH grubunda kontrol grubuna göre iyonize kalsiyum değerleri anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Serumdaki iyonize kalsiyum değerinin intraselüler iyonize kalsiyum düzeyi ile olan korelasyonunun ER stresi üzerindeki etkinliğini öğrenebilmek için bu alanda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Araştırmamızda serum midkin ve HIF-1 α düzeyleri DMH grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. GA'nın önleyici ve tedavi edici olarak uygulanmasıyla birlikte her iki parametrenin de DMH grubuna göre azaldığı görülmektedir. Literatürde GA'nın bu parametreler üzerindeki etkinliğini değerlendiren çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu parametreler üzerine etkinliğinin araştırıldığı ve tanı ve tedavide ne derece yol gösterici olabileceğini ortaya çıkarmak için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Literatüre baktığımızda deneyisel kolon kanseri oluşturulan ve GA ile tedavi etkinliğine bakılan ratlarda TAS ve TOS parametrelerinin araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızın bulguları bu açıdan değerli olup, çalışma bulguları antioksidan/oksidan indeksi değerlendiren diğer parametrelerin çalışıldığı

araştırmaların bulgularıyla karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda serum TAS düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmazken, kolon TAS düzeylerinde DMH+GA ve ilk DMH sonra GA verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. DMH uygulanan ratlarda ise kontrol grubuna göre kolon TAS düzeyleri düşmüş ancak anlamlı bulunmamıştır. Serum TOS düzeylerinde ise beklenenin aksine kontrol grubunda DMH grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek TOS düzeylerine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca DMH uygulanan gruplarda GA'nın serum TOS düzeylerini yükselttiği görülmektedir.

Çalışmamızdaki veriler, TOS ile hücresel proliferasyon hızı arasında ters bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır, yani, yüksek oranda çoğalan tümör hücreleri, normal hücrelere kıyasla belirgin şekilde düşük seviyede oksidan statü göstermiş olabilirler. Artan hücre proliferasyonunun kolon kanserinin patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. DMH ile tedavi edilen ratlarda gözlenen azalmış kolon ve serum TOS düzeyleri, artan hücre proliferasyonuna bağlı olabilir. Böylece kötü huylu dokular serbest radikal saldırılarına karşı daha az duyarlı ve daha dirençlidir ve dolayısıyla lipid peroksidasyonu daha az yoğunur. Bu durum, tümör hücrelerinin serbest radikal saldırısına karşı direncini azaltıp, duyarlılığını artırabilir ve bu da hücre proliferasyonunun azalmasına neden olabilir. Bu nedenle, GA'nın antiproliferatif etkileriyle DMH'nin neden olduğu kolon kanserini önlediğini düşünmekteyiz. Ancak literatürde lipid peroksidasyon ürünlerine ek olarak TAS ve TOS'un değerlendirileceği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda DMH uygulanan grupta kontrol grubuna göre GRP-78 ve ATF-4 protein ifadelerinin anlamlı derecede yükseldiği görülmüştür. PERK protein ifadesinin de kontrol grubuna göre yüksek olduğu ama anlamlı olmadığı görülmektedir. Ayrıca CHOP, ATF-6 ve IRE-1 α protein ifadelerinde gruplar arası fark olmadığı görülmektedir. GRP-78 protein ifadesine baktığımızda DMH grubuna göre GA alımının ekspresyonunu azalttığı görülmektedir. Literatürde GRP-78'in DMH uygulanan sıçanların kolon dokusunda yukarı regüle edildiğini ve bu durumun GRP-78'in aşırı ekspresyonunun tümör hücrelerinin zorlu koşullara uyum

sağlamasına yardımcı olduğunu ve homeostazı sürdürerek hayatta kalma eğilimi sağladığını göstermektedir.

GRP-78 ekspresyonunun kontrol grubuna göre DMH uygulanan grupta yüksek iken DMH uygulanan gruba göre DMH+GA ve son aşama GA uygulanan grupta anlamlı derecede düştüğü görülmektedir. Ayrıca DMH uygulanan grupta ilk aşama GA ve ilk DMH sonra GA uygulanan gruba göre de anlamlı olmasa da GRP-78 protein ifadelerinin düştüğü görülmektedir. Genel olarak baktığımızda GA uygulanan tüm gruplarda GRP-78 ifadesinin düştüğünü söyleyebiliriz. ATF-4 protein ifadesine baktığımızda; kontrol grubuna göre ilk aşama GA, DMH ve ilk DMH sonra GA gruplarında anlamlı derecede arttığı görülmektedir. Ayrıca DMH ve ilk aşama GA grubuna göre de DMH+GA grubunda ATF-4 protein ifadesinin anlamlı olarak azaldığı görülmektedir. CHOP, ATF-6 ve IRE-1 α protein ifadelerine baktığımızda ise gruplar arası anlamlı bir farkın olmadığı görülmektedir. PERK protein ifadesine baktığımızda; ilk aşama GA ve DMH grubuna göre son aşama GA grubunda anlamlı derecede azaldığı görülmektedir. Ayrıca kontrol grubuna göre DMH grubunda artarken, DMH grubuna göre de DMH+GA ve ilk DMH sonra GA gruplarında PERK protein ifadesinin azaldığı ama anlamlı olmadığı görülmektedir. Bu bulgularla çalışmamızda; GA takviyesinin uzun süreli ER stresini indükleyerek adaptasyon tepkisini geçersiz kıldığını ve böylece hücreleri apoptoza yönlendirdiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda etkinliğini araştırdığımız bir diğer parametre LGR5 protein ekspresyonudur. LGR5'in kolon kanser kök hücreleri için bir belirteç olduğu hipotezi, LGR5+ tümör popülasyonunu hedeflemenin kolon kanserlerini tedavi etmede etkili bir yol sağlayabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda; kontrol grubuna göre DMH uygulanan ratlarda LGR5 ekspresyonun yaklaşık iki kat arttığı ve anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda DMH enjekte edilen ratlara GA uygulanmasıyla birlikte LGR5 ekspresyonunun azaldığı gözlenmektedir. Özellikle DMH+GA grubunda DMH grubuna göre ekspresyonunda yaklaşık iki kat azalma gözlenmektedir. Bu bulgu çalışmamız açısından çok değerli olup, takviye olarak sağlanabilecek gallik asidin kolon kanseri tedavisinde etkin

olabileceğini işaret etmektedir. Fakat LGR5 pozitifliğini immünohistokimyasal olarak değerlendirmek istediğimizde gruplar arası anlamlı bir farkın olmadığı ve gruplarda pozitif hücrenin saptanmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle GA'nın kolon kanseri kök hücreleri üzerindeki etkinliğini değerlendirebilecek daha ileri çalışmaları yapılmasına gerek vardır.

Sonuç olarak bu çalışmanın bulguları oksidatif stres, kök hücre ve endoplazmik retikulum stresine ilişkin yolaklarda deneysel kolon kanseri oluşturulan ratlar ile gallik asit uygulanan gruplar ve kontrol grupları arasında önemli farklılıklara işaret ettiği için diyetle verilen gallik asidin kolon kanserinde önleyici rolü ve/veya tedavide yeri olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmanın bulgularından yola çıkılarak yapılacak daha ileri çalışmalar gallik asidin kolon kanseri profilaksisi ve/veya tedavisindeki olası faydalarını daha iyi ortaya koyabilecektir.

ÖZET

Gallik Asidin Deneysel Kolon Kanseri Oluşturulan Ratlarda Endoplazmik Retikulum Stres Yolağı ve Bağırsak Epitel Kök Hücreleri Üzerine Etkileri

Kolon kanseri normal işleyen kolon epitelinin adenomatöz poliplere dönüşmesinden kaynaklanmaktadır. Kolorektal kanserin, gıda bileşenleri veya diyet tarafından indüklenen bağırsak mikrobiyotasının bileşiminin kademeli olarak bozulmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Yeni parametrelerinin araştırılması, hastalığın patofizyolojisini daha iyi ortaya koymamızın yanı sıra erken teşhis ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Özellikle çay, üzüm ve mor renkli meyvelerde yoğun olarak bulunan gallik asit polihidroksifenolik bileşikler içerisinde sınıflandırılmaktadır. Araştırmamızda deneysel kolon kanseri oluşturduğumuz ratlarda gallik asidin (GA) hastalığı önleyici ve/veya tedavi edici etkilerini araştırdık.

Çalışmamızda 72 adet wistar erkek rat randomize olarak 6 gruba ayrılmıştır. Deney süresi toplam 20 haftadır. Birinci grup kontrol grubu olarak yer almaktadır. İkinci ve üçüncü gruptaki ratlara ise sırasıyla deney süresinin ilk ve son 10 haftası olmak üzere 50 mg/kg GA verilmiştir. Dördüncü gruba ilk 10 hafta boyunca haftada bir kez 30 mg/kg DMH enjekte edilmiştir. Beşinci gruba ilk 10 hafta boyunca GA+DMH verilmiştir. Altıncı gruba ise ilk 10 hafta DMH sonraki 10 hafta GA verilmiştir. Ratlardan alınan örneklerde oksidatif stres parametreleri, kalsiyum, total protein, HIF-1 α ve midkin düzeyleri analiz edilmiştir. Ratlardan alınan kolon dokusunda western blot analiziyle UPR sinyal yolağındaki proteinlerin ve LGR5 proteinin ifadesine bakılmıştır.

Midkin düzeylerinin DMH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,05$). GRP-78, ATF-4 ve LGR5 protein ifadelerinin kontrol grubuna göre DMH uygulanan grupta anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür (sırasıyla Kontrol: $1,00\pm0,55$, DMH: $4,73\pm2,67$; Kontrol: $1,00\pm0,37$, DMH: $2,83\pm1,81$; Kontrol: $1,00\pm0,26$; DMH: $2,24\pm1,02$). PERK protein ifadesinin ise DMH grubuna göre son aşama GA olan grupta anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir (DMH: $1,4\pm0,37$; Son aşama GA: $0,81\pm0,16$). Araştırmamızda sadece DMH enjekte edilen gruba göre GA verilen gruplarda tümör/polip sayılarında anlamlı azalma görülmektedir.

Sonuç olarak oksidatif stres, kök hücre ve endoplazmik retikulum stresine ilişkin yolaklarda gruplar arasında önemli farklılıklar görüldüğü için gallik asit kolon kanserindeki önleyici rolü veya tedavideki yeri açısından yol gösterici olabilir. Bu bulguların daha ileri araştırmalar ile desteklenmesi gereklidir.

Anahtar kelimeler: ER Stresi, Gallik asit, Kolon kanseri, LGR5, UPR.

SUMMARY

Effect of Gallic Acid on Endoplasmic Reticulum Stress Pathway and Intestinal Epithelial Stem Cell with Experimentally Induced Colon Cancer

Colon cancer results from transforming of normally functioning colon epithelium to adenomatous polyps. It has been reported that colorectal cancer may result from the gradual deterioration of the gut microbiota composition induced by food components or diet. Investigation of new parameters is important in terms of early diagnosis and development of new treatment methods, as well as revealing the pathophysiology of the disease. In this study, we investigated the possible prophylactic and therapeutic effects of gallic acid (GA) in rats with experimental colon cancer.

Seventy-two Wistar male rats were randomly divided into 6 groups. The duration of the experiment is 20 weeks. The first group is the control group. Rats in the second and third groups were given 50 mg/kg GA in the first and last 10 weeks of the experiment, respectively. Rats in the fourth group was injected with 30 mg/kg dimethylhydrazine (DMH) once a week for the first 10 weeks. Rats in the fifth group was given GA+DMH during the first 10 weeks. Rats in the sixth group was given DMH for the first 10 weeks and GA for the next 10 weeks. Oxidative stress parameters, calcium, total protein, HIF-1 α and midkine levels were analyzed in samples taken from rats. The expression of proteins in the UPR signaling pathway and LGR5 protein were analyzed by western blot method in colon tissue from rats.

Midkine levels were found to be significantly higher in the fourth group than in the control group ($p < 0.05$). It was observed that GRP-78, ATF-4 and LGR5 protein expressions were significantly increased in the fourth group compared to the control group (Control: 1.00 ± 0.55 , DMH: 4.73 ± 2.67 ; Control: 1.00 ± 0.37 , DMH: 2.83 ± 1.81 ; Control: 1.00 ± 0.26 , DMH: 2.24 ± 1.02), respectively).

As a result, pathways related to oxidative stress, stem cell and endoplasmic reticulum stress may be a guide in prophylactic or therapeutic effects of gallic acid in the colon cancer since they show significant differences between groups. These findings need to be clarified by further researches.

Keywords: Colon cancer, ER Stress, Gallic acid, LGR5, UPR.

KAYNAKLAR

- ABDELRAHMAN AE, EL-AZONY A, ELSEBAI E, IBRAHIM HM (2022). Prognostic Impact of LGR5, Prox1, and Notch1 Biomarkers in Stage II to III Colon Cancer. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, **30**(2): 126-135.
- ARGILÉS G, TABERNERO J, LABIANCA R, HOCHHAUSER D, SALAZAR R, IVESON T, LAURENT-PUIG P, QUIRKE P, YOSHINO T, TAIEB J, MARTINELLI E, ARNOLD D (2020). Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, **31**(10): 1291-1305.
- BENEDETTI R, GILARDINI MONTANI MS, ROMEO M A, ARENA A, SANTARELLI R, D'ORAZI G, CIRONE M (2021). Role of UPR Sensor Activation in Cell Death-Survival Decision of Colon Cancer Cells Stressed by DPE Treatment. *Biomedicines*, **9**(9): 1262.
- BENEDETTI R, ROMEO MA, ARENA A, GILARDINI MONTANI MS, DI RENZO L, D'ORAZI G, CIRONE M (2022). ATF6 prevents DNA damage and cell death in colon cancer cells undergoing ER stress. *Cell Death Discov*, **8**(1): 295-306.
- BLAS-VALDIVIA V, FRANCO-COLÍN M, ROJAS-FRANCO P, CHAO-VAZQUEZ A, CANO-EUROPA E (2021). Gallic Acid Prevents the Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stresses in the Hippocampus of Adult-Onset Hypothyroid Rats. *Front Pharmacol*, **12**: 671614.
- CAO W, LI M, LIU J, ZHANG S, NOORDAM L, VERSTEGEN M, WANG L, MA B, LI S, WANG W, BOLKESTEIN M, DOUKAS M, CHEN K, MA Z, BRUNO M, SPRENGERS D, KWEKKEBOOM J, VAN DER LAAN L, SMITS R, PEPPELENBOSCH MP, PAN Q (2020). LGR5 marks targetable tumor-initiating cells in mouse liver cancer. *Nature communications*, **11**(1): 1961.
- CASANOVA-MARTÍ À, GONZÁLEZ-ABUÍN N, SERRANO J, BLAY MT, TERRA X, FROST G, PINENT M, ARDÉVOL A (2020). Long Term Exposure to a Grape Seed Proanthocyanidin Extract Enhances L-Cell Differentiation in Intestinal Organoids. *Mol Nutr Food Res*, **64**(16): e2000303.
- CHAI X, WU X, REN J, DU K, WU X, FENG F, ZHENG J (2022). Expression of HIF-1 α , ANXA3, CD133 and their associations with clinicopathological parameters in human colon carcinoma. *Transl Cancer Res*, **11**(6): 1644-1651.
- CHANG YJ, CHEN WY, HUANG CY, LIU HH, WEI PL (2015). Glucose-regulated protein 78 (GRP78) regulates colon cancer metastasis through EMT biomarkers and the NRF-2/HO-1 pathway. *Tumor Biology* **36**(3): 1859-1869.
- CHATTOPADHYAY I, DHAR R, PETHUSAMY K, SEETHY A, SRIVASTAVA T, SAH R, KARMAKAR S (2021). Exploring the Role of Gut Microbiome in Colon Cancer. *Appl Biochem Biotechnol*, **193**(6): 1780-1799.
- CHEN M, LIU Y, YANG Y, QIU Y, WANG Z, LI X, ZHANG W (2022). Emerging roles of activating transcription factor (ATF) family members in tumourigenesis and immunity: Implications in cancer immunotherapy. *Genes Dis*, **9**(4): 981-999.
- CHRISTUDOSS P, CHACKO G, SELVAKUMAR R, FLEMING JJ, PUGAZHENDHI S, MATHEW G (2018). Expression of Metallothionein after Administration of Aspirin, Vitamin C or Zinc Supplement in the DMH Induced Colon Carcinoma in Rat. *Asian Pac J Cancer Prev*, **19**(11): 3237-3244.

- CONTRERAS L, CALDERON RI, VARELA-RAMIREZ A, ZHANG HY, QUAN Y, DAS U, DIMMOCK JR, SKOUTA R, AGUILERA RJ (2018). Induction of apoptosis via proteasome inhibition in leukemia/lymphoma cells by two potent piperidones. *Cell Oncol (Dordr)*, **41**(6): 623-636.
- ÇOKLUK E, TUNCER FB, ŞEKEROĞLU MR, IRMAK GÖZÜKARA S, ÖZDİN M (2020). Can Ionized Calcium Level Calculated by Zeisler Method be an Alternative to Direct Ionized Calcium Measurement?, *Van Medical Journal*, **27**(1): 68-73.
- DARBAND SG, SADİGHPARVAR S, YOUSEFİ B, KAVİANİ M, GHADERİ-PAKDEL F, MİHANFAR A, RAHİMİ Y, MOBARAKİ K, MAJİDİNİA M (2020). Quercetin attenuated oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis, *Life Sciences*, **253**: 117584.
- DİK B, COSKUN D, ER A (2022). Protective Effect of Nerium oleander Distillate and Tarantula cubensis Alcoholic Extract on Cancer Biomarkers in Colon and Liver Tissues of Rats with Experimental Colon Cancer. *Anticancer Agents Med Chem*, **22**(10): 1962-1969.
- DONG P, ZHANG Y, YAN D Y, WANG Y, XU X, ZHAO YC, XIAO TT (2020). Protective Effects of Human Milk-Derived Exosomes on Intestinal Stem Cells Damaged by Oxidative Stress, *Cell Transplantation*, **29**: 963689720912690.
- DU K, REN J, FU Z, WU X, ZHENG J, LI X (2020). ANXA3 is upregulated by hypoxia-inducible factor 1- α and promotes colon cancer growth. *Transl Cancer Res*, **9**(12): 7440-7449.
- EREL O (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clinical Biochemistry*, **37**(4): 277-285.
- EREL O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clinical Biochemistry*, **38**(12): 1103-1111.
- EROĞLU M, YILMAZ N, YALCINKAYA S, AY N, AYDIN O, SEZER C (2013). Enhanced HDL-cholesterol-associated anti-oxidant PON-1 activity in prostate cancer patients, *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, **29**(7): 368-373.
- ESMEETA A, ADHIKARY S, DHARSHNAA V, SWARNAMUGHI P, UMMUL MAQSUMMIYA Z, BANERJEE A, DUTTARROY AK (2022). Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. *Biomed Pharmacother*, **153**: 113384.
- FILIPPOU PS, KARAGIANNIS GS, CONSTANTINIDOU A (2020). Midkine (MDK) growth factor: a key player in cancer progression and a promising therapeutic target. *Oncogene*, **39**(10): 2040-2054.
- FORESTER SC, CHOY YY, WATERHOUSE AL, OTEIZA PI (2014). The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals. *Mol Carcinog*, **53**(6): 432-439.
- GANAIIE MA, AL SAEEDAN A, MADHKALI H, JAN BL, KHATLANI T, SHEIKH IA, REHMAN MU, WANI K (2019). Chemopreventive efficacy zingerone (4-[4-hydroxy-3-methylphenyl] butan-2-one) in experimental colon carcinogenesis in Wistar rats. *Environ Toxicol*, **34**(5): 610-625.

- GAO H, HE C, HUA R, GUO Y, WANG B, LIANG C, GAO L, SHANG H, XU JD (2022). Endoplasmic Reticulum Stress of Gut Enterocyte and Intestinal Diseases. *Front Mol Biosci*, **9**: 817392.
- GIFTSON SENAPATHY J, JAYANTHI S, NALINI N (2010). Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Invest New Drugs*, **28**(3): 251-259.
- GIFTSON SENAPATHY J, JAYANTHI S, VISWANATHAN P, UMADEVI P, NALINI N (2011). Effect of gallic acid on xenobiotic metabolizing enzymes in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon carcinogenesis in Wistar rats--a chemopreventive approach. *Food Chem Toxicol*, **49**(4): 887-892.
- HE Z, CHEN AY, ROJANASAKUL Y, RANKIN GO, CHEN YC (2016). Gallic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenic effects via the PTEN/AKT/HIF-1 α /VEGF signaling pathway in ovarian cancer cells. *Oncol Rep*, **35**(1): 291-297.
- HEIKAL L, GHEZZI P, MENGGOZZI M, FERNS G (2018). Assessment of HIF-1 α expression and release following endothelial injury in-vitro and in-vivo. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, **24**(1): 22.
- HETZ C, ZHANG K, KAUFMAN RJ (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **21**(8): 421-438.
- HSU CL, YEN GC (2007). Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *The British Journal of Nutrition*, **98**(4): 727-735.
- HUANG J, PAN H, WANG J, WANG T, HUO X, MA Y, LU Z, SUN B, JIANG H (2021). Unfolded protein response in colorectal cancer. *Cell & Bioscience*, **11**(1): 26.
- ISLAM MR, AKASH S, RAHMAN MM, NOWRIN FT, AKTER T, SHOHAG S, RAUF A, ALJOHANI ASM, SIMAL-GANDARA J (2022). Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products. *Chem Biol Interact*, **368**: 110170.
- ITO M, OSHIMA Y, YAJIMA S, SUZUKI T, NANAMI T, SHIRATORI F, FUNAHASHI K, SHIMADA H (2019). Diagnostic impact of high serum midkine level in patients with gastric cancer. *Ann Gastroenterol Surg*, **3**(2): 195-201.
- IURLARO R, MUÑOZ-PINEDO C (2016). Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *Febs j*, **283**(14): 2640-2652.
- JAHANAFROOZ Z, MOSAFER J, AKBARI M, HASHEMZAEI M, MOKHTARZADEH A, BARADARAN B (2020). Colon cancer therapy by focusing on colon cancer stem cells and their tumor microenvironment. *J Cell Physiol*, **235**(5): 4153-4166.
- JAKOBSEN CH, STØRVOLD GL, BREMSETH H, FOLLESTAD T, SAND K, MACK M, OLSEN KS, LUNDEMO AG, IVERSEN JG, KROKAN HE, SCHØNBERG SA (2008). DHA induces ER stress and growth arrest in human colon cancer cells: associations with cholesterol and calcium homeostasis. *Journal of Lipid Research*, **49**(10): 2089-2100.
- JANION K, STRZELCZYK JK, WALKIEWICZ KW, BIERNACKI K, COPIJA A, SZCZEPAŃSKA E, NOWAKOWSKA-ZAJDEL E (2022). Evaluation of Malondialdehyde Level, Total Oxidant/Antioxidant Status and Oxidative Stress Index in Colorectal Cancer Patients. *Metabolites*, **12**(11): 1118.

- JI L, GU L, ZHANG X, WANG J (2020). Evaluation of serum midkine and carcinoembryonic antigen as diagnostic biomarkers for rectal cancer and synchronous metastasis. *Translational Cancer Research*, **9**(4): 2814-2823.
- JI X, PENG Q, WANG M (2018). Anti-colon-cancer effects of polysaccharides: A mini-review of the mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, **114**: 1127-1133.
- JIANG Y, PEI J, ZHENG Y, MIAO YJ, DUAN BZ, HUANG LF (2022). Gallic Acid: A Potential Anti-Cancer Agent. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, **28**(7): 661-671.
- JIN Y, SAATCIOGLU F (2020). Targeting the Unfolded Protein Response in Hormone-Regulated Cancers. *Trends Cancer*, **6**(2): 160-171.
- JING X, CUI X, LIANG H, HAO C, HAN C (2017). Diagnostic accuracy of ELISA for detecting serum Midkine in cancer patients. *PLoS One*, **12**(7): e0180511.
- JUNTILA MR, MAO W, WANG X, WANG BE, PHAM T, FLYGARE J, YU SF, YEE S, GOLDENBERG D, FIELDS C, EASTHAM-ANDERSON J, SINGH M, VIJ R, HONGO JA, FIRESTEIN R, SCHUTTEN M, FLAGELLA K, POLAKIS P, POLSON AG (2015). Targeting LGR5+ cells with an antibody-drug conjugate for the treatment of colon cancer. *Sci Transl Med*, **7**(314): 314ra186.
- KAUR J, SANYAL SN (2011). Intracellular pH and calcium signaling as molecular targets of diclofenac-induced apoptosis against colon cancer. *Eur J Cancer Prev*, **20**(4): 263-276.
- KEMPER M, HENTSCHEL W, GRAß JK, STÜBEN BO, KONCZALLA L, RAWNAQ T, GHADBAN T, IZBICKI JR, REEH M (2020). Serum Midkine is a clinical significant biomarker for colorectal cancer and associated with poor survival. *Cancer Med*, **9**(6): 2010-2018.
- KIM JE, GO J, SUNG JE, LEE HA, SEO EJ, YUN WB, HWANG DY (2016). Laxative effects of Liriope platyphylla are tightly correlated with suppression of endoplasmic reticulum stress in loperamide-induced constipation of SD rats. *Lab Anim Res*, **32**(1): 16-23.
- KRZYSZEK-KORPACKA M, DIAKOWSKA D, GRABOWSKI K, GAMIAN A (2012). Tumor location determines midkine level and its association with the disease progression in colorectal cancer patients: a pilot study. *Int J Colorectal Dis*, **27**(10): 1319-1324.
- KUMAR S, RAINA K, AGARWAL C, AGARWAL R (2014). Silibinin strongly inhibits the growth kinetics of colon cancer stem cell-enriched spheroids by modulating interleukin 4/6-mediated survival signals. *Oncotarget*, **5**(13): 4972-4989.
- LEE J, KIM YS, LEE J, HEO SC, LEE KL, CHOI SW, KIM Y (2016). Walnut Phenolic Extract and Its Bioactive Compounds Suppress Colon Cancer Cell Growth by Regulating Colon Cancer Stemness. *Nutrients*, **8**(7): 439.
- LEUFKENS AM, VAN DUJNHOFEN FJ, WOUTDT SH, SIERSEMA PD, JENAB M, JANSEN EH, PISCHON T, TJØNNELAND A, OLSEN A, OVERVAD K, BOUTRON-ROUAULT MC, CLAVEL-CHAPELON F, MOROIS S, PALLI D, PALA V, TUMINO R, VINEIS P, PANICO S, KAAKS R, LUKANOVA A, BOEING H, ALEKSANDROVA K, TRICHOPOULOU A, TRICHOPOULOS D, DILIS V, PEETERS PH, SKEIE G, GONZÁLEZ CA, ARGÜELLES M, SÁNCHEZ MJ, DORRONSORO M, HUERTA JM, ARDANAZ E, HALLMANS G, PALMQVIST, R., KHAW KT, WAREHAM N, ALLEN NE, CROWE FL,

- FEDIRKO V, NORAT T, RIBOLI E, BUENO-DE-MESQUITA HB (2012). Biomarkers of oxidative stress and risk of developing colorectal cancer: a cohort-nested case-control study in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition. *American Journal of Epidemiology*, **175**(7): 653–663.
- LIN X, WANG G, LIU P, HAN L, WANG T, CHEN K, GAO Y (2021). Gallic acid suppresses colon cancer proliferation by inhibiting SRC and EGFR phosphorylation. *Exp Ther Med*, **21**(6): 638.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**(1): 265-275.
- MANDAL P (2017). Potential biomarkers associated with oxidative stress for risk assessment of colorectal cancer. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **390**(6): 557-565.
- MANJU V, BALASUBRAMANIYAN V, NALINI N (2005). Rat colonic lipid peroxidation and antioxidant status: the effects of dietary luteolin on 1,2-dimethylhydrazine challenge. *Cell Mol Biol Lett*, **10**(3): 535-551.
- MARPAUNG B, GINTING AR, SJAH OM (2018). Serum Midkine Levels in Systemic Lupus Erythematosus. *Open Access Maced J Med Sci*, **6**(8): 1323-1327.
- MI C, CAO X, MA K, WEI M, XU W, LIN Y, WANG TY (2022). Digitoxin promotes apoptosis and inhibits proliferation and migration by reducing HIF-1 α and STAT3 in KRAS mutant human colon cancer cells. *Chem Biol Interact*, **351**: 109729.
- MOKARRAM P, ALBOKASHY M, ZARGHOONI M, MOOSAVI MA, SEPEHRI Z, CHEN QM, HUDECKI A, SARGAZI A, ALIZADEH J, MOGHADAM AR, HASHEMI M, MOVASSAGH H, KLONISCH T, OWJI AA, ŁOS MJ, GHAVAMI S (2017). New frontiers in the treatment of colorectal cancer: Autophagy and the unfolded protein response as promising targets. *Autophagy*, **13**(5): 781–819.
- MURPHY N, ACHAJNTRE D, ZAMORA-ROS R, JENAB M, BOUTRON-RUAULT MC, CARBONNEL F, SAVOYE I, KAAKS R, KÜHN T, BOEING H, ALEKSANDROVA K, TJØNNELAND A, KYRØ C, OVERVAD K, QUIRÓS JR, SÁNCHEZ MJ, ALTZIBAR JM, MARÍA HUERTA J, BARRICARTE A, KHAW KT, BRADBURY KE, PEREZ-CORNAGO A, TRICHOPOULOU A, KARAKATSANI A, PEPPA E, PALLI D, GRIONI S, TUMINO R, SACERDOTE C, PANICO S, BUENO-DE-MESQUITA HBA, PEETERS PH, RUTEGÅRD M, JOHANSSON I, FREISLING H, NOH H, CROSS AJ, VINEIS P, TSILIDIS K, GUNTER MJ, SCALBERT A (2018). A prospective evaluation of plasma polyphenol levels and colon cancer risk. *Int J Cancer*, **143**(7): 1620-1631.
- NAGTEGAAL ID, ARENDS M, ODZE R (2019). Tumours of the Colon and Rectum: WHO classification of tumours of the colon and rectum, TNM staging of carcinomas of the colon and rectum and the Introduction. In Arends M, Ozde RD, Lam AK, editors, *World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System*. 5 ed. IARC Press. 2019. p. 157-162
- NIRMALA P, RAMANATHAN M (2011). Effect of kaempferol on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethyl hydrazine induced colorectal carcinoma in rats. *Eur J Pharmacol*, **654**(1): 75-79.
- O'KEEFE SJ (2016). Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **13**(12): 691-706.
- OBAFEMI TO, JAIYESIMI KF, OLOMOLA AA, OLASEHINDE OR, OLAOYE OA, ADEWUMI FD, AFOLABI BA, ADEWALE OB, AKINTAYO CO, OJO OA

- (2021). Combined effect of metformin and gallic acid on inflammation, antioxidant status, endoplasmic reticulum (ER) stress and glucose metabolism in fructose-fed streptozotocin-induced diabetic rats. *Toxicol Rep*, **8**: 1419-1427.
- OZCAN L, TABAS I (2012). Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med*, **63**: 317-328.
- PITON N, WASON J, COLASSE É, CORNIC M, LEMOINE F, LE PESSOT F, MARGUET F, SABOURIN JC (2016). Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response and development of colon adenocarcinoma. *Virchows Archiv*, **469**(2): 145–154.
- RIVERA-HUERTA M, LIZÁRRAGA-GRIMES VL, CASTRO-TORRES IG, TINOCOMÉNDEZ M, MACÍAS-ROSALES L, SÁNCHEZ-BARTÉZ F, TAPIA-PÉREZ GG, ROMERO-ROMERO L, GRACIA-MORA MI (2017). Functional Effects of Prebiotic Fructans in Colon Cancer and Calcium Metabolism in Animal Models. *Biomed Res Int*, **2017**: 9758982.
- RODRIGUES MA, SILVA LA, SALVADORI DM, DE CAMARGO JL, MONTENEGRO MR (2002). Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res*, **35**(3): 351-355.
- ROSMAN R, SAIFULLAH B, MANIAM S, DORNIANI D, HUSSEIN MZ, FAKURAZI S (2018). Improved Anticancer Effect of Magnetite Nanocomposite Formulation of Gallic Acid (Fe₃O₄-PEG-GA) Against Lung, Breast and Colon Cancer Cells. *Nanomaterials*, **8**(2): 83.
- ROZPEDEK W, PYTEL D, MUCHA B, LESZCZYNSKA H, DIEHL JA, MAJSTEREK I (2016). The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Mol Med*, **16**(6): 533-544.
- RUAN H, LEIBOWITZ BJ, ZHANG L, YU J (2020). Immunogenic cell death in colon cancer prevention and therapy. *Mol Carcinog*, **59**(7): 783-793.
- SABRY D, EL-DEEK SEM, MAHER M, EL-BAZ MAH, EL-BADER HM, AMER E, HASSAN EA, FATHY W, EL-DEEK HEM (2019). Role of miRNA-210, miRNA-21 and miRNA-126 as diagnostic biomarkers in colorectal carcinoma: impact of HIF-1 α -VEGF signaling pathway. *Mol Cell Biochem*, **454**(1-2): 177-189.
- SAKAMOTO K, KADOMATSU K (2012). Midkine in the pathology of cancer, neural disease, and inflammation. *Pathology International*, **62**(7): 445–455.
- SÁNCHEZ-GUILLÉN L, ARROYO A (2020). Immunonutrition in patients with colon cancer. *Immunotherapy*, **12**(1): 5-8.
- SEMENZA GL (2002). HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*, **8**(4 Suppl): 62-67.
- SEYFI D, BEHZAD SB, NABIUNI M, PARIVAR K, TAHMASEB M, AMINI E (2018). Verbascoside Attenuates Rac-1 and HIF-1 α Signaling Cascade in Colorectal Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem*, **18**(15): 2149-2155.
- SHARMA SH, CHELLAPPAN DR, CHINNASWAMY P, NAGARAJAN S (2017). Protective effect of p-coumaric acid against 1,2 dimethylhydrazine induced colonic preneoplastic lesions in experimental rats. *Biomed Pharmacother*, **94**: 577-588.
- SHARMA SH, RAJAMANICKAM V, NAGARAJAN S (2018). Antiproliferative effect of p-Coumaric acid targets UPR activation by downregulating Grp78 in colon cancer. *Chem Biol Interact*, **291**: 16-28.

- SHARMA SH, SURESH KUMAR J, MADHAVAN S, NAGARAJAN S (2020). Morin supplementation modulates PERK branch of UPR and mitigates 1,2-dimethylhydrazine-induced angiogenesis and oxidative stress in the colon of experimental rats. *Toxicol Mech Methods*, **30**(4): 306-315.
- SHREE A, ISLAM J, VAFA A, MOHAMMAD AFZAL S, SULTANA S (2020). Gallic acid prevents 1, 2-Dimethylhydrazine induced colon inflammation, toxicity, mucin depletion, and goblet cell disintegration. *Environ Toxicol*, **35**(6): 652-664.
- SIVARANJANI A, SIVAGAMI G, NALINI N (2016). Chemopreventive effect of carvacrol on 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *J Cancer Res Ther*, **12**(2): 755-762.
- SRIVASTAVA S, NATU SM, GUPTA A, PAL KA, SINGH U, AGARWAL GG, SINGH U, GOEL MM, SRIVASTAVA AN (2009). Lipid peroxidation and antioxidants in different stages of cervical cancer: Prognostic significance. *Indian Journal of Cancer*, **46**(4): 297-302.
- STERN L, MUELLER E, BELLON E, REEH M, GROTELUESCHEN R, GUENGOER C, MELLING N, GOETZ M, PEREZ DR, IZBICKI JR, RAWNAQ-MÖLLERS T, GHADBAN T (2021). Serum midkine as non-invasive biomarker for detection and prognosis of non-small cell lung cancer. *Sci Rep*, **11**(1): 14616.
- STORM M, SHENG X, ARNOLDUSSEN YJ, SAATCIOGLU F (2016). Prostate cancer and the unfolded protein response. *Oncotarget*, **7**(33): 54051-54066.
- SUBRAMANIAN AP, JAGANATHAN SK, MANDAL M, SUPRIYANTO E, MUHAMAD II (2016). Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells. *World J Gastroenterol*, **22**(15): 3952-3961.
- TAKAHASHI H, WANG JP, ZHENG HC, MASUDA S, TAKANO Y (2011). Overexpression of GRP78 and GRP94 is involved in colorectal carcinogenesis. *Histology and Histopathology*, **26**(6): 663-671.
- TÜRK KANSER DERNEĞİ. Erken Tanı ve Tarama. <http://www.turkkanserdernegi.org/tr/erken-tani-ve-tarama.html>, Son erişim tarihi: 13 Nisan 2021.
- VECE MM, AGNOLI C, GRIONI S, SIERI S, PALA V, PELLEGRINI N, FRASCA G, TUMINO R, MATTIELLO A, PANICO S, BENDINELLI B, MASALA G, RICCI F, SACERDOTE C, KROGH V (2015). Dietary Total Antioxidant Capacity and Colorectal Cancer in the Italian EPIC Cohort. *PLoS One*, **10**(11): e0142995.
- VOČKA M, LANGER D, FRYBA V, PETRTYL J, HANUS T, KALOUSOVA M, ŽÍMA T, PETRUZELKA L (2019). Serum levels of TIMP-1 and MMP-7 as potential biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer. *The International Journal of Biological Markers*, **34**(3): 292-301.
- WAHAB S, ALSHAHRANI MY, AHMAD MF, ABBAS H (2021). Current trends and future perspectives of nanomedicine for the management of colon cancer. *Eur J Pharmacol*, **910**: 174464.
- WANG Z, SONG J, AZAMI NLB, SUN M (2022). Identification of a Novel Immune Landscape Signature for Predicting Prognosis and Response of Colon Cancer to Immunotherapy. *Front Immunol*, **13**: 802665.

- WANG D, FENG JF, ZENG P, YANG YH, LUO J, YANG YW (2011). Total oxidant/antioxidant status in sera of patients with thyroid cancers. *Endocrine-Related Cancer*, **18**(6): 773–782.
- WANG M, LAW ME, CASTELLANO RK, LAW BK (2018). The unfolded protein response as a target for anticancer therapeutics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **127**: 66–79.
- WEI TT, LIN YT, TANG SP, LUO CK, TSAI CT, SHUN CT, CHEN CC (2020). Metabolic targeting of HIF-1 α potentiates the therapeutic efficacy of oxaliplatin in colorectal cancer. *Oncogene*, **39**(2): 414–427.
- WU R, FENG J, YANG Y, DAI C, LU A, LI J, LIAO Y, XIANG M, HUANG Q, WANG D, DU XB (2017). Significance of Serum Total Oxidant/Antioxidant Status in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS One*, **12**(1): e0170003.
- XIA X, LU JJ, ZHANG SS, SU CH, LUO HH (2016). Midkine is a serum and urinary biomarker for the detection and prognosis of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, **7**(52): 87462–87472.
- YANG J, XIONG LJ, XU F, ZHAO X, LIU B, CAI KL, WANG GB (2013). Estrogen inhibits colon polyp formation by reducing angiogenesis in a carcinogen-induced rat model. *Int J Endocrinol*, **2013**: 453898.
- YAO Y, SHU X, WANG D, KAN W, SU P, HU H, CHEN X, WANG D, HUANG S, WU L (2021). Non-enzymatic Transformation of Aflatoxin B1 by *Pseudomonas geniculata* m29. *Front Microbiol*, **12**: 724103.
- YAZİHAN N, EROL SA, AKDAS S, GONCU AYHAN S, ATALAY A, YİLDİRİM M, BİRİKEN D, AKİN I, ALTİNER S, CEYLAN MN, TANACAN A, KESKİN HL, MORALOĞLU TEKİN O, SAHİN D (2022). Serum midkine level might be a diagnostic tool for COVID19 disease in pregnancy: From the disease severity, hospitalization and disease progression respects. *Cytokine*, **149**: 155751.
- YOSHIOKA K, KATAOKA T, HAYASHI T, HASEGAWA M, ISHI Y, HIBASAMI H (2000). Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. *Oncol Rep*, **7**(6): 1221–1223.
- ZAMORA-ROS R, CAYSSİALS V, JENAB M, ROTHWELL JA, FEDİRKO V, ALEKSANDROVA K, TJØNNELAND A, KYRØ C, OVERVAD K, BOUTRON-RUAULT MC, CARBONNEL F, MAHAMAT-SALEH Y, KAAKS R, KÜHN T, BOEİNG H, TRİCHOPOULOU A, VALANOU E, VASILOPOULOU E, MASALA G, PALA V, PANİCO S, TUMİNO R, RİCCERİ F, WEİDERPASS E, LUKİC M, SANDANGER TM, LASHERAS C, AGUDO A, SÁNCHEZ MJ, AMİANO P, NAVARRO C, ARDANAZ E, SONESTEDT E, OHLSSON B, NİLSSON LM, RUTEGÅRD M, BUENO-DE-MESQUİTA B, PEETERS PH, KHAW KT, WAREHAM NJ, BRADBURY K, FREİSLİNG H, ROMİEU I, CROSS AJ, VİNEİS P, SCALBERT A (2018). Dietary intake of total polyphenol and polyphenol classes and the risk of colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Eur J Epidemiol*, **33**(11): 1063–1075.
- ZHANG R, CHUNG Y, KIM HS, KIM DH, KIM HS, CHANG WY, HYUN JW (2013). 20-O-(β -D-glucopyranosyl)-20(S)-protopanaxadiol induces apoptosis via induction of endoplasmic reticulum stress in human colon cancer cells. *Oncol Rep*, **29**(4): 1365–1370.
- ZHONG H, DE MARZO AM, LAUGHNER E, LİM M, HİLTON DA, ZAGZAG D, BUECHLER P, ISAACS WB, SEMENZA GL, SİMONS JW (1999).

Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*, **59**(22): 5830-5835.

ZHOU P, XIE W, HUANG HL, HUANG RQ, TIAN C, ZHU HB, DAI YH, LI ZY (2020). circRNA_100859 functions as an oncogene in colon cancer by sponging the miR-217-HIF-1 α pathway. *Aging*, **12**(13): 13338-13353.



EKLER

Ek-1: Etik Kurul Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 26/08/2020
TOPLANTI NO : 2020-14
DOSYA NO : 2020-100
KARAR NO : 2020-14-126

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Erdiç DEVRİM'in yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI, Prof. Dr. Berna SAVAŞ, Arş. Gör. Çiğdem FİDAN, Öğr. Gör. Ceylan Verda BİTİRİM ve Uzm. Dr. Seher YÜKSEL'in katıldığı "Gallik Asidin Deneyisel Kolon Kanseri Oluşturulan Ratlarda Endoplazmik Retikulum Stres Yolağı ve Bağırsak Epitel Kök Hücreleri Üzerine Etkileri" başlıklı çalışma Kurulumuzca değerlendirilmiş ve söz konusu çalışmanın Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 72
Geçerlilik Süresi : 04/01/2021-04/01/2022

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	

Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K
Doç. Dr. Halit KANCA (Üye)	Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E
Dr. Vet. Hek. Nigar YERLİKAYA (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	K
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E
Uzm. Vet. Hek. Attila İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K

ÖZGEÇMİŞ

