

T.C
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

RESVERATROL'UN KOLON KANSER HÜCRELERİNDEKİ NAV1.5
VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALLARI ÜZERİNE ETKİSİ: METASTATİK
DAVRANIŞ VE APOPTOZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATME MUSTAPHA

1800005528

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Seyhan ALTUN

TEMMUZ 2023

T.C
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

RESVERATROL'UN KOLON KANSER HÜCRELERİNDEKİ NAV1.5
VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALLARI ÜZERİNE ETKİSİ: METASTATİK
DAVRANIŞ VE APOPTOZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATME MUSTAPHA

1800005528

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Seyhan ALTUN

Jüri Üyeleri : Prof.Dr. Engin KAPTAN

Dr. Öğr Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ

TEMMUZ 2023

ÖNSÖZ

Yüksek lisans yapma hayalimi gerçekleştirme yolunda yabancı öğrenci olmam nedeniyle, birçok zorlukla karşılaştım. Ancak ısrarım ve kararlılığım tüm bunların üzerindeydi ve benden hiçbir şeyi esirmeyen bana sabırlı davranan bir danışmanla çalışacak kadar da şanslıydım.

Bana manevi olarak destek olan, her aşamada bana yol gösteren, tecrübe ve bilgileriyle bana fayda sağlayan, kendisiyle çalışmaktan onur duyduğum Prof. Dr. Seyhan ALTUN'a sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmaya ekip ruhu ve iş birliği katan laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma da ayrıca teşekkür ederim.

Bana maddi ve manevi destek olan, hayallerime ulaşma konusunda bana güvenen babam Hussam MUSTAFA'ya da teşekkürü borç bilirim.

Hedeflerime ulaşma konusunda her zaman kendime güvenmem için beni cesaretlendiren annem Hasnaa JUMAA'ya tüm kalbimle teşekkür etmek istiyorum. Bana her zaman destek olan halam Hiyam MUSTPHA, aileme ve dostlarıma şükranlarımı sunarım.

Temmuz, 2023

Fatme MUSTAPHA

Bu çalışma BAP-2207 ile T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR:.....	4
2.1. Kanser.....	4
2.2. Metastaz	11
2.3. Kolon Kanseri.....	15
2.3.1. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	16
2.3.2. Kolon Kanserin Oluşumu	24
2.3.3. Kolorektal Kanserde Metastaz	31
2.4. Apoptoz.....	34
2.4.1. Apoptotik Mekanizma.....	34
2.4.2. Apoptoz ve Kolorektal Kanseri	36
2.5. İyon Kanalları.....	39
2.5.1. VGSC	41
2.5.2. Nav1.5 ve Kolon Kanseri	46
2.6. Resveratrol (RSV)	48
2.6.1. Resveratrolün Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	49
2.6.2. Resveratrolün Biyoaralanımı	50
2.6.2. Doğada Resveratrol.....	51
2.6.3. Resveratrolün Farmakolojik Etkileri	52

2.6.4.	Resveratrol ve Kanser	54
3.	MALZEME VE YÖNTEMLER	59
3.1.	CRC Hücre Hatları ve Yetiştirilmesi	59
3.2.	Farmakolojik Ajanların Hazırlanması	60
3.3.	Hücre Büyüme Analizi	60
3.4.	Toksisite	61
3.5.	Hücre Proliferasyonu.....	62
3.6.	Apoptoz Analizi	62
3.7.	Koloni Oluşumu.....	63
3.8.	Lateral Hareket /Hücre Migrasyonu (Motilite)	64
3.9.	Transverse Migrasyon ile İnvazyonu.....	64
3.10.	İstatistiksel Analiz	65
4.	BULGULAR	66
4.1.	Hücrede Büyüme.....	66
4.2.	Hücrede Toksisite	68
4.3.	Hücre Proliferasyonunu.....	70
4.4.	Apoptoz Analizi	73
4.5.	Koloni Oluşumu.....	75
4.6.	Lateral Hücre Hareketi (Migrasyon = Motilite)	78
4.7.	Transverse Migrasyon ile İnvazyon.....	81
5.	TARTIŞMA	85
	KAYNAKÇA	92

KISALTMALAR

AKT	Serin/treonin-kinazların
AMPK	5' adenosin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
APC	Adenomatöz polipozis koli
Bak	BCL-2 homolog antagonist öldürücü
Bax	Bcl-2 ilişkili X-proteini
Bcl-2	B hücreli lenfoma-2
Bcl-xl	B hücreli lenfoma-ekstra büyük
BH3	Bcl-2 homoloji 3
BID	BH3 etkileşen etki alanı ölüm agonisti
Bim	BCL-2-etkileşimli hücre ölümü aracısı
c-FLIP	Hücrel FLICE-inhibitör proteini
CIMP	CpG adası metilatör fenotipi
CIN	Kromozomal kararsızlık
COX 2	Siklooksijenaz
CRC	Kolorektal kanser
DISC	Ölümü indükleyen sinyal kompleksi
DMSO	Dimetil sülfoksit
ECM	Hücre dışı matrinden
EMT	Epitelial mezenkimal transition (geçiş)
ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar
FAP	Ailesel adenomatöz polipozise
FAS	Fas hücre yüzeyi ölüm alıcısı

GTP	Guanozin trifosfat
HIF-1	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
IAP	Apoptoz proteinlerinin inhibitörünü
KRAS	Kirsten sıçan sarkomu viral onkogen homologu gen
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MALAT 1	Metastaz ilişkili akciğer adenokarsinom transkript 1
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinazlar
MET	Mezenkimal epitel geçişi
MLH1	MutL homologu 1
MMP	Matriks metalloproteinaz
MMP-7	Matriks metallopeptidaz 7
MMP-9	Matris metalloproteinaz-9
MSI	Mikrosatellit kararsızlığı
MYC	MYC proto-oncogene
NO	Nitrik oksit
P53/ TP53	Tümör proteini p53
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinazlar
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
RAF	Proto-onkogen serin/treonin-protein kinaz
RAS	Rat sarcoma virus
ROS	Reaktif oksijen türleri
RSV	Resveratrol
SIRT1	Sirtuin-1

SMAC	İkinci mitokondri türevli kaspaz aktivatörü
SNAIL	Çinko parmak proteini
STAT3	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3
TGF β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TSG	Tümör baskılayıcı genler
TTX	Tetrodotoksin
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VGSC	Voltaj kapılı sodyum kanallı

SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

%	Yüzde
±SE	Standart hata
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
°C	Santigrat derece
mg	Miligram
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nM/nm	Nanomolar
x g	Dakikadaki dönüş sayısı
mL	Mililitre

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1: Bir hücrenin çok basamaklı karsinogenez süreci (Byerley, 2022).....	4
Şekil 2. 2. Kanserın ayırt edici özellikleri (Hanahan ve Weinberg; 2011).	9
Şekil 2. 3. Kanserın ayırt edici özelliklerine eklenenler (Hanahan ve Weinberg; 2011).	10
Şekil 2. 4. Kanser tedavisi türleri.....	11
Şekil 2. 5. Epitelyal ve mezenkimal fenotip özellikleriyle EMT/MET dönüşümünün mekanizmaları (Martin v.d., 2013).	13
Şekil 2. 6. Metastatik Kaskad (Valastyan ve Weinberg, 2011).	14
Şekil 2. 7. 2020 yılında dünyada, her iki cinsiyette, (a) kanser vakasının insidansı16	
Şekil 2. 8. Kolon ve rektum kanseri hastalarının bölgelere göre dağılımı (Aykan v.d., 2015).	17
Şekil 2. 9. Kanser riskini tahmin etmek için bilinen risk faktörleri (Yalchin v.d., 2021’den değiştirilerek).	18
Şekil 2. 10. Poliplerin histolojik özellikleri ve genetik değişime göre sınıflandırılan polipozis sendromu (Moreira ve Castells 2014).	20
Şekil 2. 11. Kırmızı ve işlenmiş et ile kanser gelişimi arasındaki ilişki (Ding v.d , 2020).	22
Şekil 2. 12. CRC’de bakteri ve konakçı arasındaki etkileşim (Ternes v.d., 2020).	23
Şekil 2. 13. Kolesistektomi sonrasında CRC’nin etiyoloji ve patofizyolojisi (Aurif v.d., 2021’den değiştirilerek).	24
Şekil 2. 14. Farklı aşamalıdaki kolorektal neoplazi (Kuipers v.d., 2015).	25
Şekil 2. 15. Kolon ve rektumun geleneksel adenomu (Hamilton, 2000).	25
Şekil 2. 16. Kolorektal kanser oluşum modeli (Grady ve Markowitz, 2015).	27
Şekil 2. 17. Normal epitelden kolorektal kansere moleküler değişiklikler (Nguyen ve Duong, 2018).	28
Şekil 2. 18. Sporadik kolon kanser ile inflamatuvar bağırsak hastalığı olan (kolit ilişkili kolon kanseri) oluşumunun moleküler patogenezi (Kim ve Chang, 2014).	31
Şekil 2. 19. CRC’de metastaz mekanizmaları: hematojene karşı peritoneal yayılım (Pretzsch v.d., 2019).	32
Şekil 2. 20. Apoptozda İntrinsik yol (Pfeffer ve Singh, 2018).	35
Şekil 2. 21. Extrinsik yol (Pfeffer ve Singh, 2018).	37

Şekil 2. 22. VGSC şeması (Ruiz ve Kraus, 2015).....	42
Şekil 2. 23. Dokular ve eksprese olan Nav alt tipleri (Ruiz ve Kraus, 2015).....	45
Şekil 2. 24. Sağlıklı kolon epitelinde metastatik CRC ye ilerlemede nNav1.5 ekspresyonu (Lastraioli v.d., 2021).....	47
Şekil 2. 25. RSV'nin Stereoizomerleri (Gambini v.d., 2015).....	49
Şekil 2. 26. Trans Resveratrolün Modifikasyonu.	50
Şekil 2. 27. Bazı resveratrol kaynakları.	52
Şekil 2. 28. RSV'nin apoptotik aktivitesi.	56
Şekil 3. 1. Yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 kolon kanseri hücreleri (10x).....	59
Şekil 3. 2. DMSO ve glisin ilave edildikten sonra absorbansı ölçülecek hücre pleyti. ...	61
Şekil 3. 3. Lateral hücre hareketi migrasyon indeksi için petrinin alt yüzüne yapılan çizim.....	64
Şekil 3. 4. Transverse migrasyon protokolu.	65
Şekil 4. 1. Yüksek metastatik SW620 kolon kanseri hücrelerinin-zamana bağlı büyümesi.	67
Şekil 4. 2. Düşük metastatik HT29 kolon kanseri hücrelerinin zamana bağlı büyümesi.	68
Şekil 4. 3. RSV'nin SW620 hücreleri üzerindeki toksik etkisi.	69
Şekil 4. 4. RSV'nin HT29 hücreleri üzerindeki toksik etkisi.	69
Şekil 4. 5. RSV'nin SW620 hücre hattı üzerinde 24 saatteki anti proliferatif etkisi (* P<0.05).....	70
Şekil 4. 6. RSV'nin SW620 hücre hattı üzerinde 48 saatteki anti-proliferatif etkisi (* P<0.05).....	71
Şekil 4. 7. RSV'nin HT29 hücreleri üzerinde 24 saatteki anti-proliferatif etkisi (* P<0.05).....	72
Şekil 4. 8. RSV'nin HT29 hücreleri üzerinde 48 saatteki anti-proliferatif etkisi (* P<0.05).....	72
Şekil 4. 9. RSV'nin SW620 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisi.	74

Şekil 4. 10. RSV'nin HT29 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisi.....	75
Şekil 4. 11. RSV'nin SW620 hücre hattı üzerine koloni morfolojisi ve koloni yüzdesi (* P<0.05).	77
Şekil 4. 12. RSV'nin HT29 hücre hattı üzerine koloni morfolojisi ve koloni yüzdesi (* P<0.05).	77
Şekil 4. 13. Metastatik SW620 hücre hattının zamana bağlı migrasyonu.	79
Şekil 4. 14. RSV'nin SW620 hücrelerinin lateral hareketi/migrasyonu üzerine etkisi (*P<0.05).	80
Şekil 4. 15. RSV'nin HT29 hücrelerinin lateral hareketi/migrasyonu üzerine etkisi (* P< 0.05).....	81
Şekil 4. 16. Kristal viyole ile boyanmış invazyon yapan CRC hücreleri.	82
Şekil 4. 17. RSV'nin SW620 hücrelerinin invazyonu üzerine etkisi (*P<0.05).	83
Şekil 4. 18. RSV'nin HT29 hücrelerinin invazyonu üzerine etkisi (*P<0.05).	84

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1 Onkogenlerin aktivasyon mekanizmaları ve ilişkili olduğu kanser tipleri.	7
Tablo 2. 2. Tümör baskılayıcı genler, ve hücredeki aktiviteleri.....	8
Tablo 2. 3. Üç farklı tırtıklı polip tipinin özellikleri (Crockett ve Nagtegaal, 2019’dan değiştirilerek).	26
Tablo 2. 4. İnsan sodyum kanallarının (NaCh) α ve β alt birimlerinin türleri, doku dağılımları ve TTX duyarlılık (Wood ve Iseppon, 2018).	44
Tablo 4. 1. RSV'nin koloni yüzdesi üzerindeki etkisi (* $P<0.05$).	76
Tablo 4. 2. SW620 hücrelerine TTX ve RSV uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri (* $P< 0.05$).	79
Tablo 4. 3. HT29 hücrelerine TTX ve RSV uygulanması ile elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri (* $P< 0.05$).	81
Tablo 4. 4. RSV'nin göç eden hücre sayısı (%) üzerindeki etkisi (* $P<0.05$).	83

ÖZET

Kolorektal kanser (CRC); özellikle son yıllarda tüm dünyada, sindirim sistemine ait en yaygın malignitelerinden biri haline gelmiştir. CRC’de primer tümörden ayrılan hücrelerin kan veya lenf yolu ile bir başka organa giderek yerleşmesi ve çoğalması olarak tanımlanan metastaz kanser hastalarında yaşamı en çok tehdit eden olaydır ve ölümlerin de %90’ nından sorumludur. Bu nedenle, metastatik sürecin altında yatan mekanizmaları anlamak ve tedavi stratejileri geliştirmek önem taşımaktadır.

Hücre membranlarında eksprese olan voltaj kapılı sodyum kanallarının (VGSC), malignitenin görüldüğü yüksek metastatik kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildikleri saptanmıştır. Prostat, meme, akciğer gibi kanserlerde yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda, VGSC lerin bazı ilaç veya ajanlarla bloke edilmesi ile, metastaza neden olan hücre hareketinin (invazyon ve migrasyonun) baskılanabileceği gösterilmiştir.

Günümüzde bazı hastalıkların polifenoller gibi doğal bileşiklerle tedavisi alternatif ve komplementer tedavi araştırma alanında önemli bir yere sahiptir. Polifenollerden resveratrol, üzüm, kırmızı şarap, dut gibi bitkilerde bulunur. Resveratrol’ün, kanser progresyonunun başlaması, gelişmesi ve ilerlemesinde etkili olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada resveratrolun (RSV), kolon kanserinde ekspresyonu artan Nav1.5 VGSC üzerindeki rolünü; farklı metastatik özellikteki SW620 ve HT29 hücrelerinin apoptoz, koloni, migrasyon ve invazyonları ile metastatik davranışlarının in vitro olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için, RSV’nin SW620 ve HT29 hücrelerinin proliferasyonları MTT yöntemi ile, apoptoz ve koloni oluşumları araştırılmış ve migrasyon üzerindeki etkileri için yara analizi ve matrigel ile transvers invazyon metodları kullanılmıştır. Hücre proliferasyonu üzerinde toksik etki göstermeyen 0.5 μ M ve 1 μ M RSV konsantrasyonları ile sürdürülen çalışmalarda 1 μ M RSV’nin koloni oluşumunu inhibe ettiği, hücre migrasyon ve invazyonu üzerinde, sodyum kanal blokeri TTX seviyesinde inhibisyona neden olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak RSV’nin, VGSC’leri inhibe ederek, kolon kanseri metastazının azaltılmasında etken bir doğal bileşik olabileceği in vitro olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: RSV, kolon kanser hücreleri (HT29 ve SW620) , Nav 1.5 VGSC, migrasyon, invazyon, apoptoz.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) especially in recent years has become one of the most common malignancies of the digestive system all over the world. In CRC, metastasis, which is defined as the cells leaving the primary tumor by moving to another organ through the blood or lymphatic route and multiplying, is the most life-threatening event in cancer patients and is responsible for 90% of deaths. Therefore, it is important to understand the mechanisms underlying the metastatic process and develop treatment strategies.

It was found that voltage-gated sodium channels (VGSC) are expressed in cell membranes and are highly expressed in metastatic cancer cells with malignancy. In vitro and in vivo studies in cancers such as prostate, breast, and lung have shown that, by blocking VGSCs with some drugs or agents, cell movement (invasion and migration) that causing metastasis can be suppressed.

Today, the treatment of some diseases with natural compounds such as polyphenols has an important place in the field of research. Resveratrol, one of the polyphenols, is found in plants such as grapes, red wine, and mulberry. Resveratrol is known to be effective in the initiation, promotion and progression of cancer development.

The aim of this study was to evaluate the role of resveratrol (RSV) on Nav1.5 VGSC, whose expression is increased in colon cancer, by in vitro evaluating the apoptosis, colony, migration and invasion of metastatic behavior of SW620 and HT29 cells that have different metastatic properties. For this purpose, effect of RSV on SW620 and HT29 cell proliferation were investigated by MTT method, its effect on apoptosis and colony formation, its effect on migration by wound healing analysis and its effect on invasion by matrigel analysis methods were used. The studies carried out with 0.5 μM and 1 μM RSV concentrations, which do not have a toxic effect on cell proliferation. It was determined that 1 μM RSV inhibited colony formation and caused inhibition of cell migration and invasion as the sodium channel blocker TTX level. As a result, it has been determined that RSV may be an effective natural compound in reducing colon cancer metastasis by in vitro inhibiting VGSCs.

Keywords: RSV, colon cancer cells (HT29 and SW620), Nav 1.5 VGSC, migration, invasion, apoptosis.

1. GİRİŞ

Kanser, hücre fonksiyonlarında rol alan genlerdeki genetik değişiklikler sonucu oluşan ve kontrolsüz hücre büyümesine yol açan genetik bir hastalık olarak tanımlanır (Byerley, 2022). Hanahan ve Weinberg (2000) başlangıçta kanser hücrelerinin proliferatif sinyalleşmeyi sürdürmek, büyüme baskılayıcılardan kaçınmak, hücre ölümüne direnç, replikatif ölümsüzlüğü etkinleştirme, anjiyogenezi indüklemeye, invazyon ve metastaz yetenekleri altı ayırt edici özelliğini sınıflandırmış ancak daha sonra bunlara dört farklı özellik daha eklemişlerdir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Metastaz, kanserde primer tümörden ayrılan hücrelerin kan veya lenf yoluyla başka bir organa giderek yerleşmesi ve çoğalması olarak tanımlanır ve kanser hastalarında ölümlerin %90 neden olmaktadır (Djamgoz v.d., 2014; Fairhurst v.d., 2014; Koltai, 2015). Bu nedenle kanserdeki metastaz mekanizmasını anlamak ve tedavi stratejileri geliştirmek büyük önem taşımaktadır (Redig ve McAllister, 2013). Metastaz, hücrenin epitelyal-mezenkimal geçişi olarak tanımlanan mekanizma ile başlar ve böylece hücrelerin invazyon ve başka bölgelere migrasyon yetenekleri artar (Djamgoz v.d., 2014; Fairhurst v.d., 2014; Koltai, 2015).

Kolorektal kanser (CRC), kalın bağırsak olarak da bilinen kolonda ve/veya kolonu anüse bağlayan geçiş yolu olan rektumda meydana gelen kanserdir. Heterojen bir hastalıktır ve ortaya çıkması için fazla sayıda yıla ve farklı yollara ihtiyacı vardır (Kuipers v.d., 2015). Kanser, dünyadaki ölümlerde ikinci sırada yer alırken Dünya Sağlık Örgütü'ne göre CRC, 2020 yılında yeni kanser vakalarının %10'unundan sorumlu olduğu kanserden ölümlerin ise üçüncü nedeni olduğu saptanmıştır (Sung v.d., 2021). Türkiye'de de nüfusun artmasıyla birlikte CRC vakaları giderek artmaktadır. Türkiye'deki yeni kolorektal kanser vaka sayısı toplam kanser vakalarının %9 olduğu tespit edilmiştir (Thanikachalam ve Khan, 2019). CRC ailesel (kalıtsal) yada sporadik olabileceği gibi, riski artıran yaş, ırk, cinsiyet, iltihaplı bağırsak hastalıkları, ailesel kolorektal kanser sendromu gibi birçok faktör vardır. CRC, polip oluşumuna yol açan genetik ve epigenetik dengesizlik nedeniyle kolon veya rektumun iç tabakasında anormal çoğalmış hücrelerin birikmesidir (Kuipers v.d., 2015). CRC tipik olarak önce iyi huylu

prekanseröz poliplerle başlar ve ilerleyen aşamalarda prekanseröz polipler iki farklı kanseröz poliplere değişebilir bunlar; adenomatöz ve tırtıklı (serrated) poliplerdir (Simon, 2016; Crockett ve Nagtegaal, 2019). CRC’da hastaların yaklaşık %25’i teşhis esnasında metastatik hastalığa sahiptir. Hematojen veya peritoneal yayılımı ile CRC karaciğer, akciğer ve peritona metastaz yapmaktadır (Riihimäki v.d., 2016; Pretzsch v.d., 2019).

Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz normal olarak tüm hücre tiplerinde meydana gelmektedir (Atay v.d., 2021). Apoptoz, intrinsik (mitokondriyal yol) veya extrinsik (ölüm reseptörü yolu) yollar olarak farklı yollarla meydana gelebilmektedir (Wong 2011; Pfeffer ve Singh, 2018). Ancak CRC dahil olmak üzere, kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmalarını sağlayan birçok mekanizma bulunmakta ve kanser hücresi bu yolları kullanarak yaşamını sürdürebilmektedir (Wong 2011, Atay v.d., 2021).

Hücrenin bir dizi fizyolojik sürecini kontrol eden hücre membranlarındaki iyon kanalları temel transmembran protein grubudur. İyon kanallarındaki genetik ya da edinsel bozukluklar, kanalopatik hastalıklar başlığı altında sınıflandırılmaktadır (Petkov, 2009; Preverskaya v.d., 2010, 2018). Bunlardan voltaj kapılı sodyum iyon kanalları (VGSC), iyon kanallarından elektrokimyasal gradyanlarına geçişine göre sınıflandırılır ve membran potansiyeline göre açılıp kapanan bir transmembran protein kompleksidir (Yi ve Jan, 2002; Resta ve Bacchetti, 2010; Ruiz ve Kraus, 2015; Wand v.d., 2017). Son yirmi yılda giderek artan sayıdaki çalışma ile elde edilen birçok in vitro ve in vivo kanıt VGSC’lerin, kanalopatik hastalıkların yanı sıra, metastatik kanserdeki rolünü ortaya koymuştur (Grimes v.d., 1995; Fraser v.d., 2003; Djamgoz ve Onkal, 2013; Horne v.d., 2021).

SCN5A tarafından kodlanan VGSC alt tipi Nav1.5, kalp kasında eksprese edilmektedir. Kanser hücrelerinde ise aNav1.5 insan yetişkin izoformundan çok nNav1.5 neonatal isoformu ile karşılaşılır. Nav1.5’in kanserdeki yapısal farklılığı, olan bu nNav1.5 kanalı gibi VGSC lerin metastatik kanserler için terapötik bir hedef olabileceği ve bu hipotez çerçevesinde bazı ilaçların ve doğal bileşiklerin geliştirilmesine yol açabileceği belirtilmektedir (Djamgoz ve Onkal, 2013; Koltai, 2015; Horne v.d., 2021; Lopez-Charcas v.d., 2023).

Günümüzde komplementer veya alternatif tedavilerde hastalıkların polifenoller gibi doğal bileşiklerle tedavisi önemli bir yere sahiptir. Resveratrol (RSV) (3,5,4'-trihidroksistilben) flavonoid olmayan bir polifenolik fitoaleksindir. Bitkilerde stilben sentaz enzimi yardımıyla çevresel koşullara tepki olarak üretilen bir stilbenoiddir. 1997 yılında Jung ve arkadaşları RSV'nin kemo önleyici özelliklerini ilk kez keşfederek, RSV'nin kanser progresyonunun başlama, gelişme ve ilerlemesinde anti-özelliklere sahip olduğunu göstermişlerdir. Buna ek olarak, RSV'nin antioksidan, antiinflamatuvar, antidiyabetik ve nöroprotektif aktiviteye sahip olduğu da kanıtlanmıştır (Baxter, 2008; Abdur Rauf v.d., 2017).

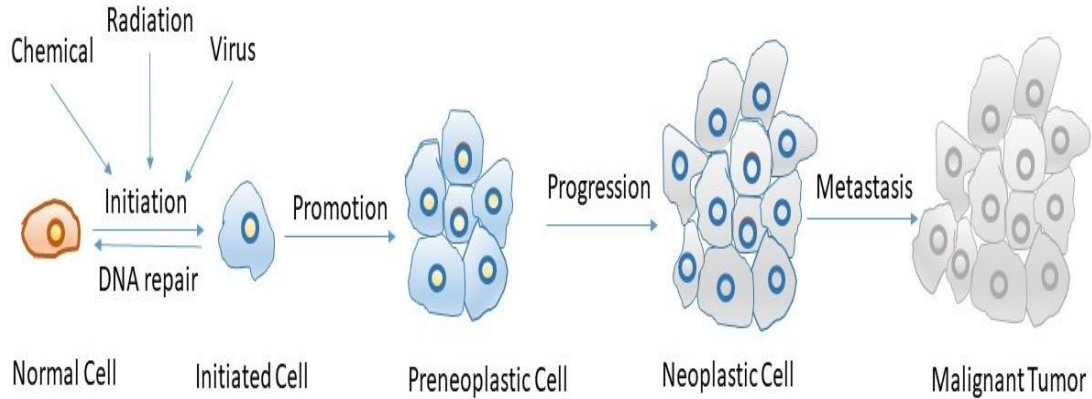
Bu çalışmada; kanser metastazının ana basamaklarından migrasyon ve invazyonda ekspresyonu artan VGSC'lerin sorumlu olduğunun in vitro ve in vivo çalışmalarla ortaya konulmuş olması ve bazı kanal blokerlerinin bu VGSC'leri bloke ederek, kanser hücrelerinin hareketlerini baskılaması temel fikrinden yola çıkarak, çeşitli bitkilerde yüksek oranda bulunan doğal polifenol RSV'nin, kolon kanserinde ekspresyonu artan nNav1.5 VGSC üzerindeki rolünü; ilk olarak yüksek (SW620) ve düşük (HT29) metastatik hücrelerin proliferasyonlarını ve apoptotik özelliklerinin yanı sıra koloni, migrasyon ve invazyon oluşumu metodlarıyla in vitro olarak belirlemek amaçlanmıştır. Böylece, doğal polifenol RSV'nin, anti-metastatik potansiyele olan etkilerini saptayarak, kolon kanseri metastazına karşı yeni bir tedavi protokolünün geliştirilmesine katkıda bulunmak hedeflenmiştir.

2. GENEL KISIMLAR:

2.1. Kanser

Kanserin tanımı MÖ 3000 yılına kadar uzanmaktadır. O günlerde Mısırlılar “Edwin Smith Papyrus” adlı tıp kitaplarında bazı tümör vakalarını tanımlamışlardır. Kanser ilk olarak Yunan Hekim ve tıbbın babası “Hipokrat” (MÖ 460-370) tarafından yengece benzetilerek, “carcinos” olarak adlandırılmıştır. Romalı doktor Celsus (MÖ 25- MS 50), tarafından yengecin latince karşılığı olan “cancer” terimi ile ifade edilmiştir. Daha sonraları, Galen (MS 130-200) ise, tümörleri tanımlamak için Yunanca’daki oncos (şişlik) kelimesini esas almış ve sonraları, kanserlerin tanı ve tedavisini tanımlamada onkoloji terimi kullanılmaya başlamıştır (Mandal, 2019).

Kanser, hücre fonksiyonlarında rol oynayan genlerdeki genetik değişiklikler sonucu oluşan ve kontrolsüz hücre büyümesine yol açan bir hastalıktır. Karsinogenez olarak adlandırılan normal bir hücrenin kanserli hücreye dönüşme sürecinde meydana gelen genetik değişiklikler kalıtsal olabileceği gibi farklı karsinojenlere de bağlı olabilmektedir. Karsinojenler, kanserin başlamasına ve daha sonra ilerlemesine yol açan farklı endojen ve eksojen faktörlerdir (Şekil 2.1) (Byerley, 2022).



Şekil 2. 1: Bir hücrenin çok basamaklı karsinogenez süreci (Byerley, 2022).

Endojen faktörler, vücudumuzda doğrudan veya dolaylı olarak DNA hasarına neden olabilen faktörlerdir. Birçok endojen faktörden yaş, kanser için en büyük risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Testosteron ve östrojen gibi hormonlar da endojen

faktörlerdendir ve meme prostat kanserlerine neden olmak tadırlar. Endojen hormonlar, eksojen faktörler tarafından indüklenebilmekle birlikte, vücuttaki bazı aktiviteler ve reaksiyonlar da kanser gelişiminde rol oynayan bu hormonların aşırı üretimine yol açabilmektedir. Pek çok kanıt genetik ve kalıtsal faktörlerin kansere neden olmadaki rolünü desteklenmiştir. Örneğin kolon kanseri gelişme riski; birinci derece akrabası kolon kanseri olan kişilerde kolon kanseri gelişme riski, akrabası olmayan kişilere göre üç kat daha fazladır (Baba ve Câtoi, 2007; Tubbs ve Nussenzweig, 2017).

Eksojen faktörler, çevresel faktörlerdir ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik karsinojenler olarak gruplanabilmektedir. Fiziksel karsinojenler iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyonlar olarak ikiye ayrılır. Ultraviyole radyasyonu, ışık radyasyonu ve kızılötesi radyasyon gibi iyonlaştırıcı olmayan radyasyonların yanında, beta ışınları, fotonlar, X ışınları ve Gama ışınları iyonlaştırıcı radyasyonlardır. Her iki tip radyasyon da hücre nükleusunu, kromozomları (delesyonlar, translokasyonlar) ve DNA'yı (timin peroksidasyonu, zincir seviyesinde fosforlanmış bir bağın kopması ve bir veya iki filamentin kırılması) etkileyebilir. Sitoplazmada ise, enzimatik moleküllerin yıkımından sonra metabolizmayı durdurarak veya mitokondri ve lizozom membranlarını değiştirerek etkileyebilir. Bu biyolojik değişiklikler hücrede mutasyonların oluşmasına ve dolayısıyla metaplastik, displastik değişikliklere ve hatta tümör proliferasyonuna yol açmaktadır (Baba ve Câtoi, 2007; Wo v.d., 2018).

Kimyasal faktörler, kimyasal maddenin etki mekanizmasına göre üç kategoride sınıflandırılabilir, birincisi, organizmada önceden bir metabolik aktivasyon olmadan kanseri tetikleyebilen nitrozaminler ve epoksitler gibi etkili karsinojenlerdir. İkincisi, önceki bir metabolik aktivasyondan sonra aktif hale gelen aromatik aminler ve üretan gibi prokarsinojenler ve son olarak da, diğer maddelerin karsinojen etkisini artırabilen ancak tek başlarına uygulandıklarında kansere neden olmayan kimyasal maddeler olan ko-kanserojenlerdir (Baba ve Câtoi , 2007; Wo v.d., 2018).

Biyolojik karsinojenler olarak, *Pteridium aquilinum* gibi bazı bitkiler, bitki fenolleri, alkaliodler ve reserpin gibi bitkisel ürünler, aflatoksinler gibi toksinler, bazı böcekler, *Epstein Barr virüsü*, *Bovine Leukosis virüsü*, *papilloma virüsleri*, *Hepatit B ve C virüsü*

ile insan immün yetmezlik virüsü gibi bazı virüsler ve *Helicobacter pylori* gibi bazı bakteriler sayılabilmektedir (Baba ve C toi, 2007; Das v.d., 2020)

Genetik değişikliklerin ortaya çıkmasında, tümör baskılayıcı genlerin (TSG) inaktivasyonu ve proto onkogenlerin aktivasyonu ile onkogenlerin aktif hale geçmesi karsinogeneze destek vermekte preneoplastik hücrelerin neoplastik hücelere dönüşmesine ve dolayısıyla kanserin ilerlemesine yol açmaktadır (Baba ve C toi, 2007; Byerley, 2020; Kontomanolis v.d., 2020).

Proto onkogenler, normal hücre proliferasyonunun düzenini sağlayan bir grup gen dir. Proto onkogenlerde değişiklikler meydana geldiğinde, aktive olur ve onkogen olarak adlandırılır, böylece normal işlevi değişir. Bu değişiklikler, RAS proto onkogeninde meydana gelen nokta mutasyonu gibi proto onkogenlerin yapısını etkileyen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Ayrıca Myc genlerinde olduğu gibi genlerin amplifikasyonu veya translokasyonuna bağlı olabilmektedir. Onkogenler, yapısal ve işlevsel olarak farklı proteinlerin ekspresyonuna yol açar, bu durum da hücrelerin normal büyümesinin kaybolmasına ve dolayısıyla tümör oluşmasına yol açmaktadır. Bugüne kadar yaklaşık 60 onkogen tanımlanmıştır. Tablo 2.1’de bazı onkogen örnekleri, bu onkogenlerin aktivasyon mekanizmaları ile hangi kanserle ilişkili oldukları verilmiştir (Cooper, 2000; Kontomanolis v.d., 2020).

Bazı onkogenler viral kaynaklı olabilir ve bunlara viral onkogenler denir. Viral onkogenler ilk olarak 1970 yılında Src protein-tirozin kinaz kodlayan src genini taşıyan *Rous Sarcoma Virüsü* keşfedilmiştir (Vogt, 2012). Onkojenik virüsler, hücreleri çoğaltıp yok ederek basit enfeksiyonlara neden olabilmekte veya hücrelerin biyokimyasal, morfolojik, fizyolojik özelliklerini değiştirerek, karsinogenezi teşvik edebilmektedir. Onkojenik virüs, karsinogenezi tetiklemek amacıyla Pi3K/AKT/mTor, MAPK, Notch, WNT/ -katenin ve NF- B gibi farklı sinyal yollarını etkilemekte düzenlenmektedir. Çalışmalarda belirlendiği gibi, tüm insan kanserlerinin yaklaşık %15-20’si onkojenik virüslerden kaynaklanmaktadır. (Cooper, 2000; Varmus v.d., 2005; Krump ve You, 2018; Kontomanolis v.d., 2020).

Tablo 2. 1 Onkogenlerin aktivasyon mekanizmaları ve ilişkili olduğu kanser tipleri.

Onkogenler	Aktivasyon Mekanizması	Kanser Türü
<i>abl</i>	Translokasyon	Lösemi
<i>Bcl-2</i>	Translokasyon	B Hücreli Lenfoma
<i>erbB-2</i>	Amplifikasyon	Meme ve Yumurtalık Kanserleri
<i>rasH</i>	Nokta Mutasyonu	Tiroid Kanser
<i>rasK</i>	Nokta Mutasyonu	Kolon, akciğer, pankreas ve tiroid kanserleri
<i>rasN</i>	Nokta Mutasyonu	Akut miyeloid ve lenfositik lösemiler, tiroid karsinomu
<i>ret</i>	DNA yeniden düzenlemesi	Tiroid kanseri
<i>EGFR</i>	Mutasyon	Glioblastom
<i>c-myc</i>	Amplifikasyon	Meme ve Akciğer Kanserleri
<i>L-myc</i>	Amplifikasyon	Akciğer kanseri

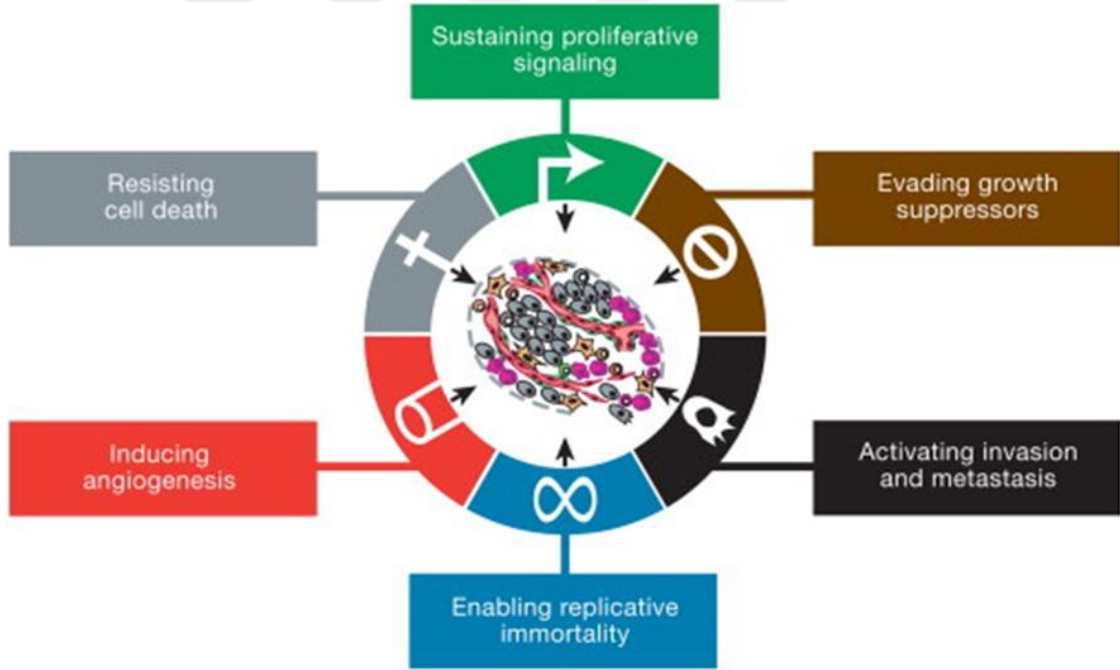
TSG'ler, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve durdurulmasında, apoptozun uyarılmasında, DNA'nın onarılmasında, hücre çoğalmasının engellenmesinde, mitojenik yolun engellenmesinde invazyon ve metastazın engellenmesinde rol oynayan proteinleri kodlayan büyük bir gen grubudur (Tablo 2.2) (Joyce v.d., 2021). TSG'lerin işlev kaybı veya inaktivasyonu sonucunda hücrenin kanser hücresine dönüşmesine neden olurlar.

Tablo 2. 2. Tümör baskılayıcı genler, ve hücredeki aktiviteleri.

Retinoblastoma (RB)	Hücre Döngüsünün Yöneticisi' olarak da adlandırılan RB geni.
TP53	“Genomun Koruyucusu” olarak bilinir
Fosfataz ve Tensin Homolog (PTEN) Gen	PTEN geni, fosfoinositid-3-kinaz (PI3K)-AKT'yi ve mTOR sinyal yollarının hedefini negatif olarak düzenleyen bir lipid fosfatazı kodlar
CDH1 (E-cadherin)	Temas inhibisyonu olarak bir rol oynar
NF1 ve NF2	RAS'ın negatif düzenleyicisi
BRCA 1, BRCA 2, PARP-1	DNA kırıklarının onarımı
APC	WNT sinyal yolunu düzenler.
CDKN2A	İki tümör baskılayıcı proteini, p16/INK4a ve ARF'yi kodlar
WT1	Transkripsiyonel düzenleme
PTCH1	Hedgehog sinyal yolunu negatif olarak düzenleyen proteini kodlar
VHL	Bir ubiquitin ligazın bir bileşenini kodlar

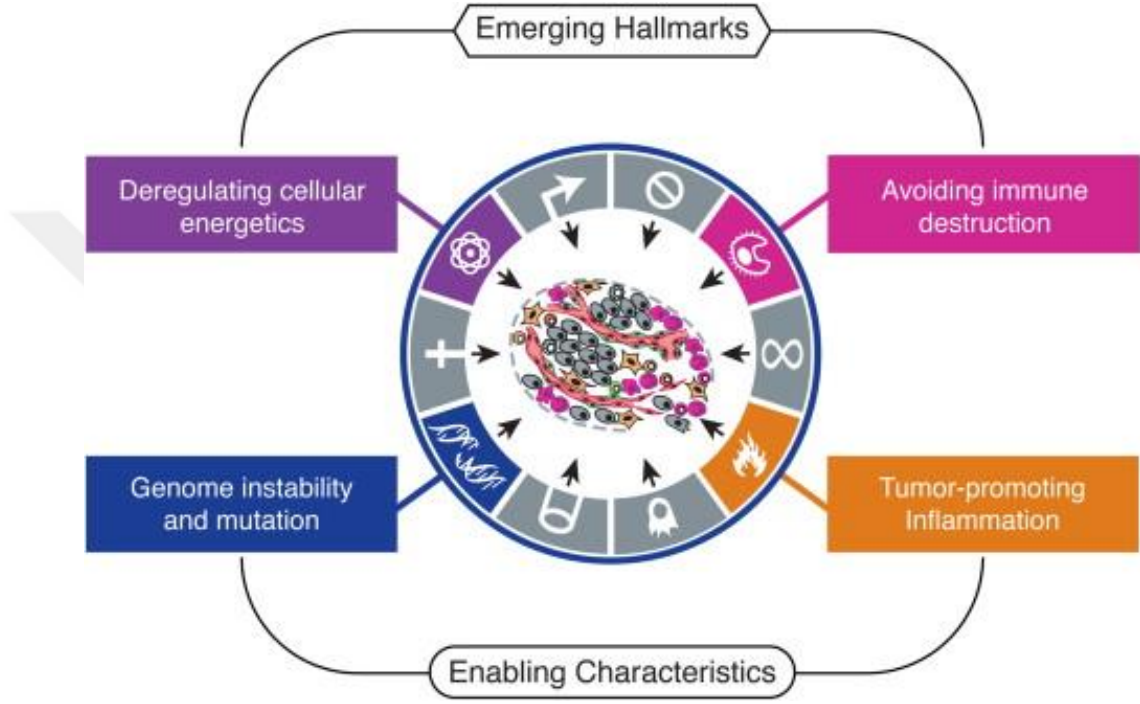
Normal bir hücre kanser hücresi haline geldiğinde, hücre membranının şekli, bozulur, mikroskopta çıkıntılı (kabarcıklar) ve kaba kromatinli düzensiz nükleuslu, organizasyonu bozulmuş hücre kitlesi şeklinde görülür. Hanahan ve Weinberg 2000 yılında, kanser hücreleri için ayırt edici altı özellik tanımlamıştır (Şekil 2.2). Bunlar; **devam eden proliferatif sinyaller** kanser hücreleri çoğalma sinyallerini farklı yollardan sürdürebilirler. Otokrin proliferatif stimülasyona yol açan büyüme faktörü ligandları üretirler. Büyüme faktörleriyle desteklemek üzere stromadaki normal hücreleri uyarırlar. Ayrıca bazı insan tümörlerinde bazı somatik mutasyonlar büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonuna da yol açmaktadır. **Büyüme baskılayıcılardan kaçmak**, TSG'ler tümör hücrelerinin çoğalmasını olumsuz etkiler, tümör hücreleri ise, genetik ve epigenetik mekanizmalar ile bu etkilerden kurtulmaya çalışırlar. **Hücre ölümüne direnç/apoptoz**, tümör hücreleri pro apoptotik proteini (Bax ve Bak) baskılayabilir, anti-apoptotik proteinleri (Bcl) aktive edebilir, hasarı tanımlayacak TP53 ortadan

kaldırabilir veya transkripsiyonel, translasyonel ve translasyon sonrası modifikasyonlar yapabilirler ve böylece apoptozdan kaçabilirler. **Replikatif ölümsüzlüğü etkinleştirme**, kanser hücreleri, telomerik DNA daki tekrar segmentlerini ekleme ve telomer uzunluğunu koruma yeteneğine sahiptir. Bununla apoptoz veya yaşlanmadan da kaçarak, proliferatif aktiviteye devam ederler. **Anjiyogenezin indüklenmesi**, tümör hücreleri daha fazla besin ve oksijene ihtiyaç duyarlar. Ayrıca metabolik atıklardan ve CO₂'den kurtulmaları gerekir. Anjiyojenik faktörlerin üretimini tetikleyerek, yeni kan damarlarının oluşumu için endotel hücrelerinin çoğalmasını uyarırlar. **İnvazyon ve metastaz aktivasyonu**, Tümör hücreleri istila ve yabancı doku mikro-ortamlarını kolonize etmek üzere invazyon ve migrasyon içeren çok aşamalı bir süreç metastatik kaskadı gerçekleştirirler (Hanahan ve Weinberg; 2011).



Şekil 2. 2. Kanser ayırt edici özellikleri (Hanahan ve Weinberg; 2011).

Hanahan ve Weinberg 2011 yılında kanser hücrelerinin bağışıklık yıkımından kaçma ve hücresel metabolizmayı daha fazla enerji üretmek için düzenleme, tümörle ilişkili bir inflammatuar yanıtı aracılık etme ile genom kararsızlığı ve mutasyonunu ilerletme yeteneği şeklinde dört özellik daha eklemiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3. Kanser ayırt edici özelliklerine eklenenler (Hanahan ve Weinberg; 2011).

Kanser tedavisi değişkenlik göstermekte, hatta son zamanlarda bireysel tedaviler dikkati çekmektedir. Tedavide tümörün tipi, tümörün evresi ve ne kadar ilerlemiş olduğu, metastaz yapıp yapmadığı gibi, birçok faktör önem taşımaktadır. Bu nedenle bazı kanser hastalarına tek tip tedavi uygulanırken, diğer hastalara iki veya daha fazla sayıdaki tedavinin kombinasyonu kullanılır (Şekil 2.4). Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiyi içeren konvansiyonel (geleneksel) kanser tedavisinin kanser üzerinde önemli derecede bir etkisi olmasına rağmen, özgüllük taşınamaması, ilaç direnci geliştirmesi nedeniyle sınırlıdır. Günümüzde immünoterapi, kök hücre tedavisi, nanoteknoloji ilaçlar gibi gelişmiş ve yenilikçi tedaviler, kanser tedavisinde daha fazla kullanılmaktadır. Tüm bu

yöntemlere rağmen, onkoloji daha güvenli ve etkili kanser ilaçlarının geliştirilmesine odaklanmaktadır (Debela v.d., 2021).



Şekil 2. 4. Kanser tedavisi türleri.

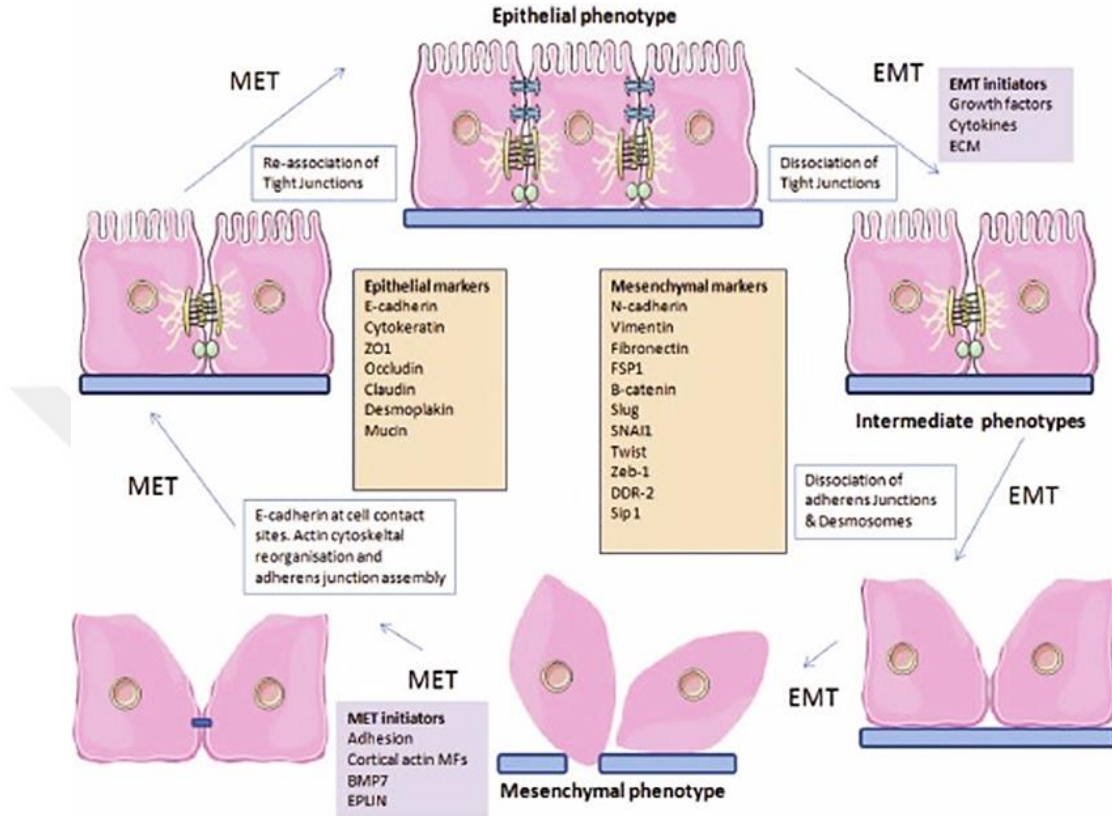
2.2. Metastaz

Kanserde primer tümörden ayrılan hücrelerin kan veya lenf yolu ile bir başka organa giderek yerleşmesi ve çoğalması olarak tanımlanan metastaz, kanser hastalarında yaşamı en çok tehdit eden olaydır ve ölümlerin de yaklaşık %90 nından sorumludur (Djamgoz v.d., 2014; Fairhurst v.d., 2014; Koltai, 2015). Dolayısıyla, metastatik sürecin altında yatan mekanizmaları anlamak ve tedavi stratejileri geliştirmek özellikle sağ kalımı artırmak için büyük önem taşımaktadır (Redig ve McAllister, 2013).

Metastaz oluşumunda özellikle hücrelerin epitelden mezenkimal geçişi (EMT) önemli bir adımdır (Şekil 2.5). Epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere dönüşmesi, böylece hücrelerin invazyon ve migrasyona gitme yani hareket yeteneğini kazandığı bir süreçtir. Ayrıca EMT, kanserin kemoterapiye direnci bakımından da önemli bir faktör olarak bilinmektedir. Hücre-hücre bağlantılarının kaybıyla başlayan EMT de, ekstraselular matriksten sinyaller ve sitokin, hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF β) gibi büyüme faktörlerinin salgılanması ile, genetik değişimler başlamaktadır. Meydana gelen bu değişimler, hücrenin bağlantı protein olan okludin, claudin ve ZO gibi, hücrelerin sıkı bağlantı proteinlerinin kaybına neden olmaktadır (Şekil 2.5) (Martin v.d., 2013).

Genlerde meydana gelen daha fazla değişiklik, adezyon bağlantısında önemli bir protein olan E-kadherinin kaybına, mezenkimal belirteçlerden biri olan N-kadherinin ekspresyonuna, β -katenin up regülasyonu ve nükleer lokalizasyonuna, desmoplakin gibi desmozomal bileşenlerin ekspresyonunda azalmayı ve gap junction kaybına sebep olmaktadır. EMT'nin ilerlemesi ile Slug, Snail ve Twist gibi önemli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) gibi hücre dışı matriks bozulmalarına yol açan proteinlerin ekspresyonu, integrin ekspresyonunun kaybı yoluyla hücre matriks etkileşiminin kaybı ve CD44 proteininin aşırı ekspresyona neden olur (Martin v.d., 2013).

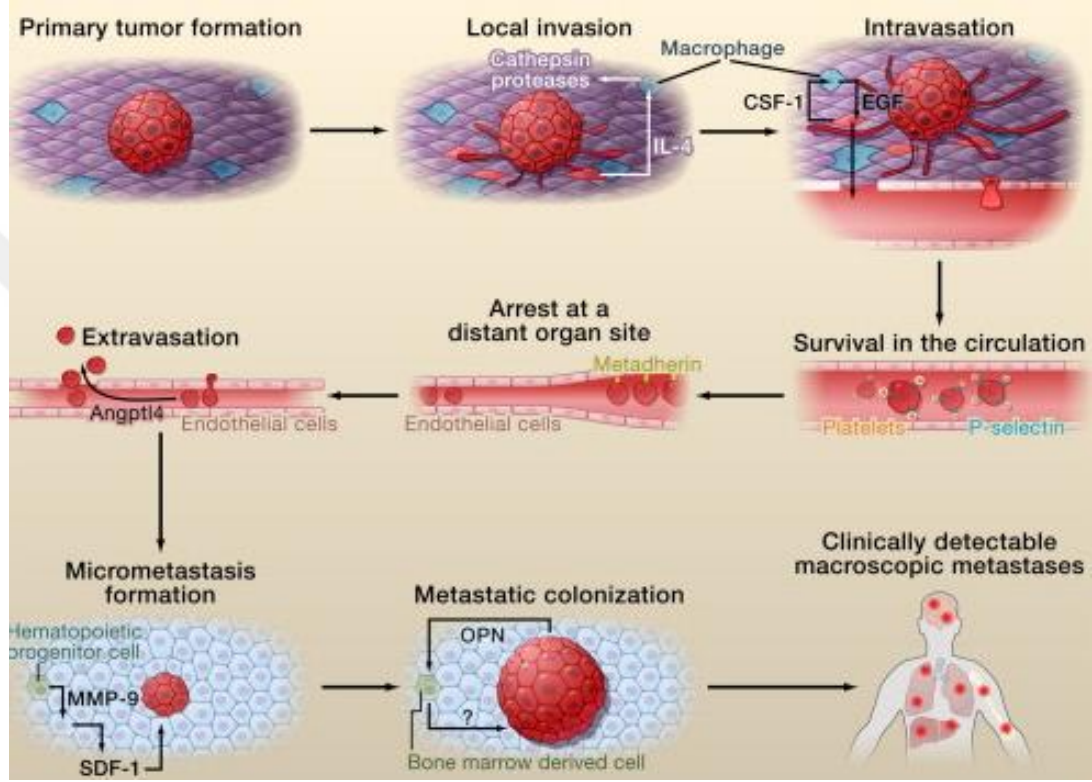
Metastazın ileri aşamalarında mezenkimal hücreler, mezenkimalden epitele geçiş (MET) olarak bilinen bir dönüşüm ile yeniden epitel hücrelerine geri de dönebilmektedir. Bu süreçte hücrelerde mezenkimal belirteçler kaybolarak, hücreler yeniden eski özelliklerine geri dönmektedir. Bu durum metastatik hücrelerin kolonizasyonunda büyük önem taşımaktadır (Martin v.d., 2013).



Şekil 2. 5. Epitelyal ve mezenkimal fenotip özellikleriyle EMT/MET dönüşümünün mekanizmaları (Martin v.d., 2013).

EMT oluşumu ve ECM ayrışması/bozulması, tümör hücrelerinin invazyona başlaması için önemli adımlardır. Adhezyonu azalan hücreler, özellikleri değişmiş olan ECM ve stromadan geçerek lenf veya kan dolaşımına “intravazasyon” ile girmektedir (Şekil 2.6) İntravazasyon büyüme faktörlerinin yardımı ile damarlardaki endotel hücrelerinin arasından tümör hücrelerinin filopodyumları ile geçmesi şeklinde olmasının yanı sıra pasif geçiş olarak tanımlanan bir diğer yol ile de gerçekleşmektedir. Pasif geçişte tümör hücreleri pasif itme ve çekme kuvvetleriyle dolaşım sistemine intravazyon yapmaktadırlar. Bir gram tümörden damar sistemine her gün $1-4 \times 10^6$ hücre girdiği tahmin edilmektedir. Dolaşım sistemine intravazyon yapan kanser hücreleri, tek hücre veya hücre kümeleri olarak aktif veya pasif mekanizmalarla hareket etmektedir ve

embolus adını alır. Bu embolus sadece tümör hücreleri arasında oluşuyorsa, homotipik özelliklere sahiptir. Ancak embolus, tümör hücreleri ile lökosit, trombosit veya fibrinlerin de katılımı ile meydana gelirse, heterotipik özelliklere sahiptir (Welch ve Hurst, 2019).



Şekil 2. 6. Metastatik Kaskad (Valastyan ve Weinberg, 2011).

Dolaşımdaki bazı tümör hücreleri, karmaşık bir süreç sonrasında hedef bölgeye ekstrasvasyon yapmaktadır. Tümör hücrelerinin migrasyonu ve ekstrasvasyonu birçok kemokin ve sitokin tarafından yönlendirilmektedir. Tümör hücrelerinin dolaşım sisteminden ayrılması için endotel hücrelerine yapışmalarına yardımcı olan selektinler, integrinler, kaderin ve immünoglobulin (Ig) süper ailesi reseptörleri gibi ligandları ve reseptörleri eksprese etmektedir. Tümör hücrelerinin endotelden geçebilmesi için endotel hücreleri arasında meydana gelen sıkı bağlantıyı bozması gerekirk, bu işlem transendotelial migrasyon olarak adlandırılmaktadır (Reymond v.d., 2013).

Metastazın meydana geleceği mikro-ortam metastatik niş olarak adlandırılmakta ve tümör hücrelerinin gelmesinden önce bile, bir pre-metastatik niş oluşmaktadır. Pre-metastatik nişin başlatılmasında türetilmiş eksozomlar, mikro veziküller, büyük onkozomlar ve tümör hücreleri (sitokinler ve kemokinler) tarafından üretilen inflamatuvar faktörler gibi primer tümör kaynaklı bileşenler, metastatik nişin oluşumunda rol almaktadır. Tümör hücreleri ile çevre bileşenleri arasındaki bağlantı, tümörün tipine ve oluştuğu yere göre farklı mekanizmalarla gerçekteşmektedir. Pre-metastatik niş oluşumu aynı zamanda, kemik iliği kaynaklı hücrelere, inflamatuvar sitokinlere, büyüme faktörlerine ve ikincil mikro ortamın yeniden şekillenmesinde rol oynayan proanjyogenik molekülleri salgılayan diğer bağışıklık hücrelerine ihtiyaç duymaktadır. Buna ek olarak, metastatik tümör hücrelerinin kolonizasyonunu ve büyümesini hızlandırabilen fibroblast, endotel hücreleri ve bunların bileşenleri dahil olmak üzere konakçı stromal hücreler metastatik nişteki önemli faktörlerdir (Liu ve Cao, 2016).

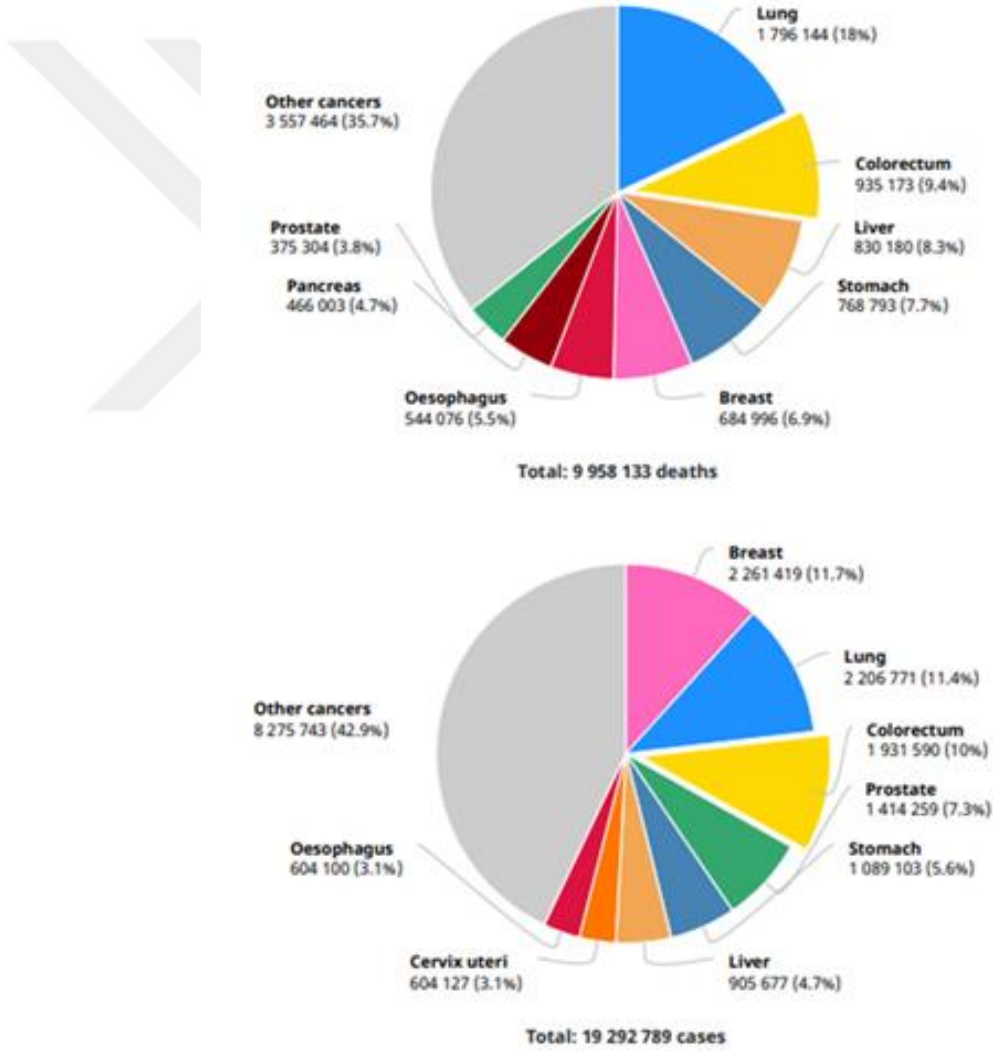
Pre-metastatik niş, dolaşımdan gelecek tümör hücrelerinin dormansi (uyku olarak da adlandırılan) aşamasına girip girmeyeceğini veya mikro metastaz ve ardından makro metastaz şeklinde kolonize olarak çoğalabileceğini belirleyen özelliklere de sahiptir. Bu özellikler anjiyogenez ve damar geçirgenliği, lenfanjiyogenez, immünosupresyon, inflamasyon, organotropizm ve yeniden programlama olarak tanımlanmaktadır (Liu ve Cao, 2016).

2.3. Kolon Kanseri

Kolorektal kanser (CRC), kalın bağırsak olarak da bilinen kolonda ve/veya kolonu anüse bağlayan geçiş kısmı olan rektumda meydana gelen kanserdir. Heterojen bir hastalıktır; dişkıda kan, bağırsak alışkanlığında değişiklik veya karın ağrısı gibi semptomların ortaya çıkması için birden fazla yıla ve farklı yollara ihtiyaç duyar. CRC ailesel (kalıtsal) yada sporadik olabilir. CRC ailesel (kalıtsal) olduğuunda ilk mutasyon kalıtsal olarak alınır ve aile üyelerinde ortaya çıkar ancak, CRC sporadik olarak meydana geldiğinde, kansere neden olan gen kalıtsal değildir (Kuipers v.d., 2015).

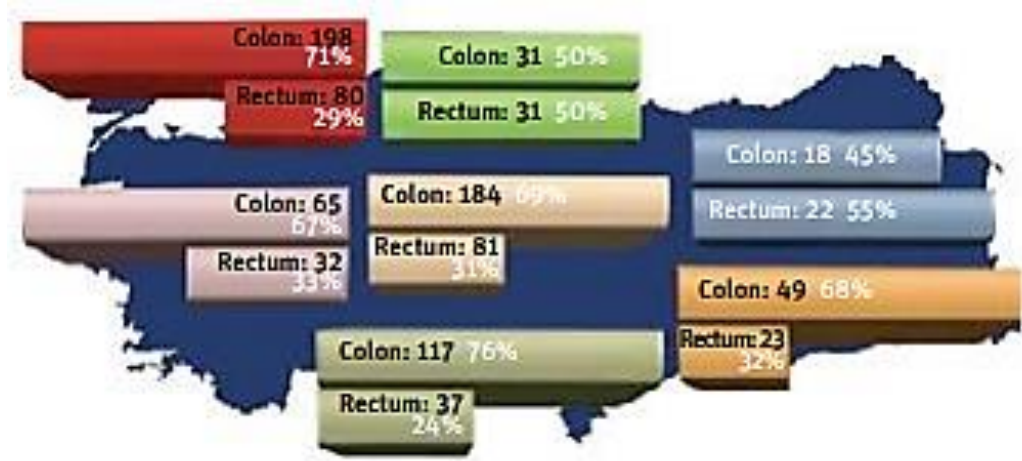
2.3.1. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Kanser, dünyadaki ölümlerin en önde gelen nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre 2020 yılında yaklaşık 20 milyon yeni vaka ile 10 milyon ölüm meydana gelmiştir (Şekil 2.7). Ayrıca, 2020'deki yeni kanser vakalarının %10'u kolorektal kanserden kaynaklanmaktadır. Kanserden ölümlerde kolorektal kanser üçüncü sırada yer almaktadır (Sung v.d., 2021).



Şekil 2. 7. 2020 yılında dünyada, her iki cinsiyette, (a) kanser vakasının insidansı (b) mortalitesini (WHO, 2020).

Koronavirüs pandemisi nedeniyle tüm dünyada kanser hastalığı tanı ve teşhislerinde gecikme yaşanmış ve bu durum kolon kanseri epidemiyolojisini de etkilemiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde pandemik koronavirüs hastalığının (COVID-19) gelişmesi, CRC dahil tüm kanserlerin tanı ve tedavisinde gecikmeye neden olmuştur ve ileri evre hastalık ile mortalitede artışa yol açmaktadır. 2023'te, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki tahmini yeni CRC vaka sayısı 153.020 ve tahmini ölüm oranı 52.550 ulaşmıştır (Siegel v.d., 2023). Türkiye'de nüfusun artmasıyla birlikte CRC vakaları da artmaktadır. Uluslararası kanser araştırma ajansına göre, 2020 yılında 84.339.067 olan toplam nüfusta, kanser insidansın 233.834 ve mortalitenin 126.335 olduğu kaydedilmiştir. Türkiye'deki yeni kolorektal kanser vaka sayısı toplam kanser vakalarının %9 (21191 kişi) olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'deki çalışmaya göre, Şekil 2.8'de gösterildiği gibi, tüm bölgelerde, kolon kanserinin rektum kanserinden daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır (Aykan v.d., 2015).



Şekil 2. 8. Kolon ve rektum kanseri hastalarının bölgelere göre dağılımı (Aykan v.d., 2015).

CRC riskini artıran yaş, ırk, cinsiyet gibi pek çok faktör vardır.

Yaş: CRC için önemli bir risk faktörüdür. CRC esas olarak ileri yaşta genellikle 50 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır. CRC tanısında medyan erkeklerde 66 yaş, kadınlarda ise 69 yaştır. CRC ile ilgili bir aile öyküsünün bulunması durumunda, CRC riski genç bireylerde de yükselir. Ancak son 20 yılda 50 yaş altı ve aile öyküsü olmayan kişilerde de görülme sıklığının arttığı belirlenmiştir. Bunun temel nedeninin çok kesin olmamakla

birlikte sigara, obezite ve diyetten kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (Gabriel v.d. 2018; Patel ve Ahnen, 2018).

İrk ve Cinsiyet: CRC erkeklerde kadınlardan daha yaygın, siyahlarda ise, beyazlardan daha yaygındır. Yahudi ve Aşkenaz Yahudileri dünyada CRC bakımından en yüksek riske sahip toplumlardır. Nedenleri kesin olmamakla birlikte, genetik vakalara ve toplumların kapalı olmasına bağlanmaktadır. Ayrıca, diğer gruplar arasında CRC riskini artıran bir diğeri ise Afrika kökenli Amerikan olmaktır. Bu durum, en fazla beslenme ve genetik yapı ile ilişlendirilmektedir (Locker ve Lynch, 2004; Carethers, 2021).

İltihaplı Bağırsak Hastalıkları: Sindirim sistemindeki dokuların (kronik) iltihaplanmasını içeren Crohn hastalığı ile ülseratif kolit olmak üzere iki hastalığı tanımlar. Bu hastaların kolorektal kansere dönüşme riskleri, 10 yılda % 0.02, 20 yılda % 4.81 ve 30 yılda % 13.91 olarak tahmin edilir (Bopanna v.d., 2017). Crohn hastalarında da riskler benzerdir (Canavan v.d., 2006). CRC'ye dönüşmesi için, iltihaplı bağırsak hastalıkları ile ilişkili birçok risk faktörü vardır. Bu faktörler, CRC'nin erken tespiti için kullanılan bazı yöntemlerde iltihaplı bağırsak hastalıklarına işaret eder (Şekil 2.9) (Yalchin v.d., 2021).



Şekil 2. 9. Kanser riskini tahmin etmek için bilinen risk faktörleri (Yalchin v.d., 2021'den değiştirilerek).

Ailesel Kolorektal Kanser Sendromu: CRC gelişim riskini artıran genetik bozuklukların kalıtımıdır. Aile öyküsü olan kolorektal kanser hastalarının %30'u bulunsa da, sadece %5-6'sının bilinen bir genetik temeli vardır (Stoffel ve Kastrinos, 2014).

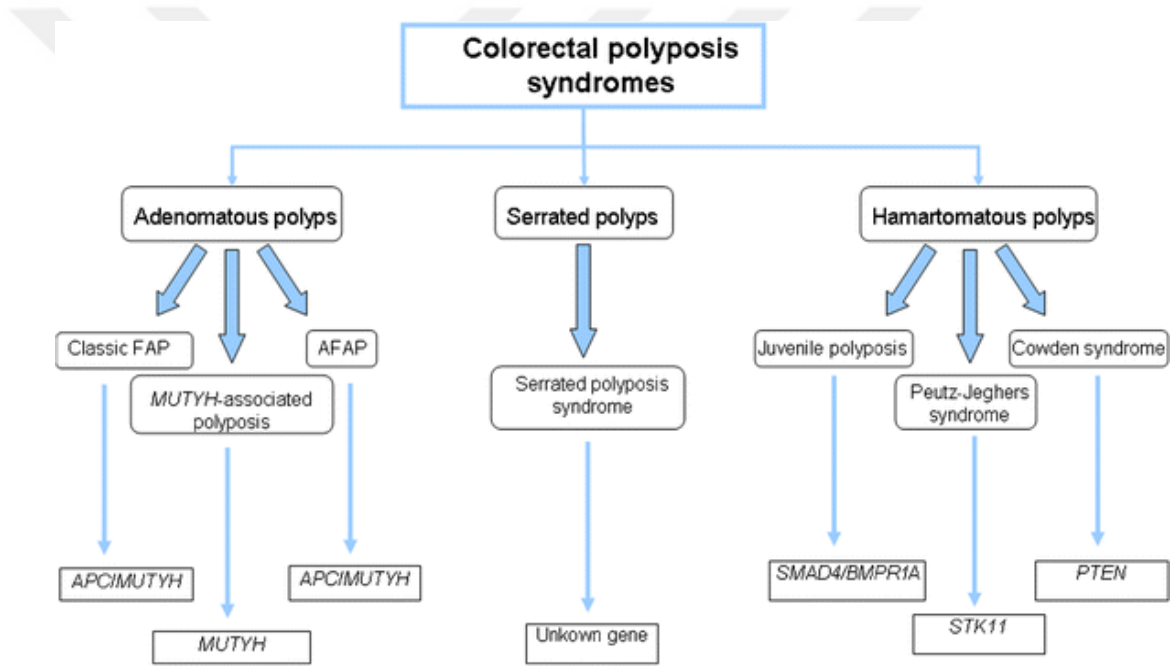
Lynch sendromu veya kalıtsal nonpolipöz kolorektal kanser (HNPCC) en yaygın ailesel CRC sendromudur ve CRC vakalarının yaklaşık %3'ünü içerir. Rahim, yumurtalık, mide, böbrek, idrar yolları, safra yolları, ince bağırsak ve deri tümörlerini içeren diğer tümörlerde % 2-3 oranında bulunur. Endoskopik olarak kolonun sağ tarafında yerleşim gösteren birkaç polip ile karakterizedir ve sporadik kolon poliplerinden ayırt edilemez.

Ailesel kolorektal kanser sendromu, polipozis sendromları olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.10). Bunlardan *Ailesel adenomatöz polipozis (FAP)*, ikinci en sık görülen ailesel CRC sendromudur. CRC vakalarının < %1'inden sorumludur. FAP, esas olarak APC genindeki germ hattı mutasyonlarının kalıtımı nedeniyle otozomal dominant bir hastalıktır. Yüzlerce hatta binlerce farklı boyutta adenomatöz polip gelişimi ile karakterizedir. Erken teşhis edilmezse, 40-50 yaşlarında CRC gelişme riski %100'dür. FAP, CRC'ye ek olarak, osteomlar, diş anormalileri, retina pigment epitelinin konjenital hipertrofisi (CHRPE), desmoid tümörler veya tiroid, karaciğer, safra kanalları, merkezi sinir sistemi gibi ekstrakolonik kanserler başka belirtilerle de ortaya çıkabilmektedir (Half v.d., 2009; Jang ve Chung 2010; Stoffel ve Kastrinos, 2014; Hall v.d., 2020).

MYH ile ilişkili polipöz (MAP), mutY homolog (MUTYH veya MYH) genindeki bialelik mutasyonların kalıtımı ile karakterize otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Bu gen, oksidatif stresin neden olduğu DNA hasarının onarılmasından sorumlu enzimi kodlamaktadır.

Hamartomatöz Polipozis Sendromları, tüm CRC vakalarının %0.5'inden daha azından sorumludur. Hamartomatöz polip gelişimi ile karakterize otozomal dominant bir sendromdur. Sendromlar arasında Peutz-Jeghers sendromu (PJS), Juvenil Polipozis Sendromu (JPS), ve Cowden Sendromu yer almaktadır. Peutz-Jeghers Sendromu (PJS) hamartomatöz Peutz-Jeghers poliplerinin gelişimi ile karakterize edilir, bu gen aracılığıyla enfekte olmuş gen, serin treonin kinaz 11 (STK-11 ayrıca LKB-1 olarak da bilinir) olarak adlandırılan tümör baskılayıcı gendir. Juvenil Polipozis Sendromu (JPS),

çoklu hamartomatöz Juvenil poliplerin gelişimi ile karakterize edilirken SMAD4, BMPR1a ve ENG genlerindeki germ hattı mutasyonlarının kalıtımından kaynaklanmaktadır. Hamartomatöz Polipozis Sendromunun her iki türü de kolon dışında tümörler geliştirebilir. Cowden Sendromu, PTEN genlerinde mutasyonlara sahiptir. Genellikle kolorektal hamartom sendromları arasında yer alır ancak farklı tipte polipler, hamartomlar, adenomlar, tırtıklı polipler, hiperplastik polipler ve ganglionörom görünümü ile karakterizedir (Half v.d., 2009; Jang ve Chung 2010; Stoffel ve Kastrinos, 2014; Hall v.d., 2020).



Şekil 2. 10. Poliplerin histolojik özellikleri ve genetik değişime göre sınıflandırılan polipozis sendromu (Moreira ve Castells 2014).

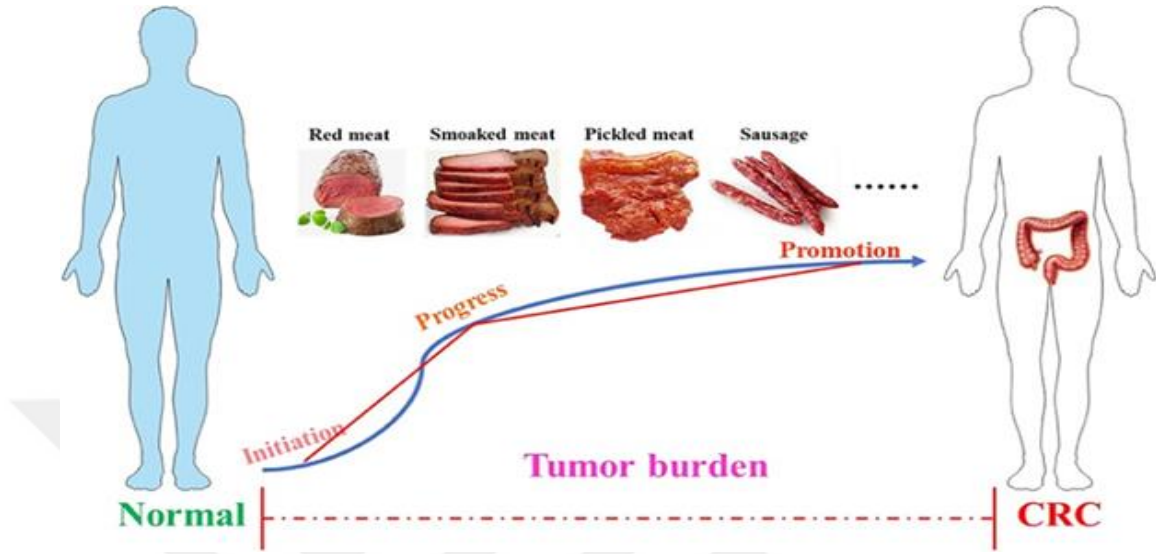
Obezite, Diabetes Mellitus ve İnsülin Direnci: Fazla kilo ve obezite, CRC dahil olmak üzere farklı kanser türlerinin gelişme riskini artırmaktadır. Obezitenin CRC gelişme riskini %7 ile %60 arasında artırdığı ve ayrıca CRC'den kaynaklı ölüm oranını da artırdığı tahmin edilmektedir. Buna ek olarak, obez erkeklerin, obez kadınlara göre CRC geliştirme riskinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. 70000 CRC vakasının bilgilerini içeren meta-analizlere göre, vücut kitle indeksi yüksek olan bireyler (BMI $\geq$ 30 Kg/m²), CRC bakımından %20 daha yüksek risk altındadırlar. Obezitenin CRC riskini artırma mekanizması çok net değildir. Tip 2 diabetes mellitus, kolorektal

tümörlerin büyümesini uyarabilen hiperinsülinemi ile karakterizedir. Yüksek insülin dolaylı olarak hücre proliferasyonunu artıran ve apoptozu inhibe eden insülin benzeri büyüme faktörlerinin (IGF) yükselmesine yol açmaktadır. Ayrıca hiperglisemi, reaktif oksijen türlerinin, oksidatif stresin ve inflamatuvar yolların üretimini indükleyerek CRC'nin ilerlemesini artırabilir (Moghaddam v.d., 2007; Ma v.d., 2013; Vu v.d., 2014; Guraya 2015).

Sigara ve Alkol Tüketimi: Sigara kullanımı doza, yoğunluğa ve süreye göre CRC gelişme riskini artırır. Sigara, kansere neden olan mutasyonları ve modifikasyonları artıran kanserojenler içermektedir (Amitay v.d., 2020). Alkol tüketimi ve metaboliti de CRC riskini % 60 oranında artırabilir. Alkol ve metabolitinin karsinogenezi desteklediği farklı mekanizmalar vardır. Mutasyonların uyarılması, doğrudan veya dolaylı DNA hasarları yoluyla genetik anormalliğe yol açmaktadır. Ayrıca DNA hipometilasyonu, mikroRNA'nın değiştirilmesi ve histon modifikasyonu ile çoklu epigenetik düzensizliğe neden olmaktadır. Bir de farklı hücre sinyal yolunu değiştirerek (IL6/STAT3, NOTCH, AKT/FAK ve RAS) veya tümör mikroçevresini değiştirerek CRC'nin ilerlemesini destekleyebilmektedir (Rossi v.d., 2018).

Sosyo-Ekonomik Durum: Gelişmiş ve sanayileşmiş ülkelerde CRC gelişim riski artmaktadır. Bu duruma Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya/Yeni Zelanda, Japonya ve bazı Doğu Asya bölgeleri (Hong Kong, Tayvan, kentsel Çin, Singapur ve Tayland) dahildir. Diyet, obezite, düşük fiziksel aktivite, sigara ve ağır alkol tüketimi gibi birçok çevresel faktörden kaynaklanmaktadır. Tüm bu çevresel faktörler, K-RAS ve P53 mutasyonları gibi genetik değişikliklere ve histon modifikasyonu ve DNA metilasyonu gibi epigenetik değişikliklere yol açmaktadır. Ayrıca CRC'nin karsinogenezi artıran bağırsak mikrobiyotasını da değiştirirler (Bishehsari v.d., 2014).

Batı Diyeti: Kırmızı ve işlenmiş et, patates ve yüksek yağlı besinler içeren batı / gelişmiş ülke diyetinin CRC riskini %20-40 oranında artırdığı tahmin edilmektedir. Bu risk obezite, sigara ve alkol tüketiminin varlığı ile değişim göstermektedir (Schwingshackl v.d., 2017). Kırmızı ve işlenmiş et açısından zengin sağlıklı diyet, CRC'nin karsinogenezi hızlandırır (Şekil 2.11) (Ding v.d., 2020).

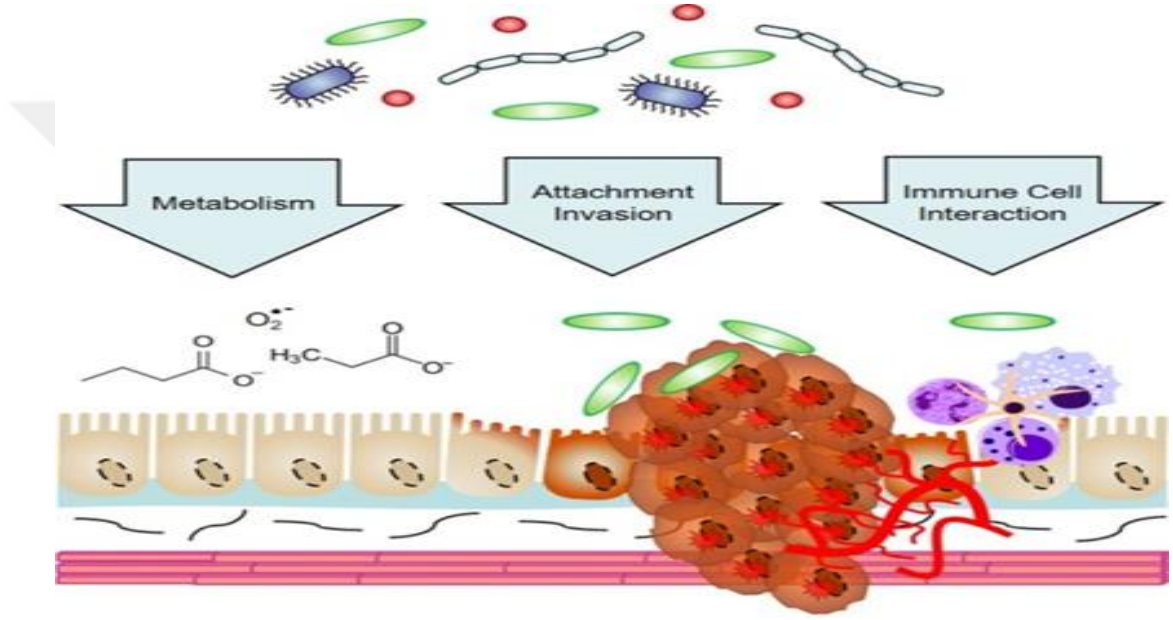


Şekil 2. 11. Kırmızı ve işlenmiş et ile kanser gelişimi arasındaki ilişki (Ding v.d , 2020).

Kırmızı ve işlenmiş etlerin, CRC geliştirme mekanizmalarında yer alan heme demiri ve kanserojen maddeler (polisiklik aromatik hidrokarbonlar, N-Nitroso bileşikler ve N-glikolilnöraminik asit) içerdiği tespit edilmiştir (Cascella v.d, 2018).

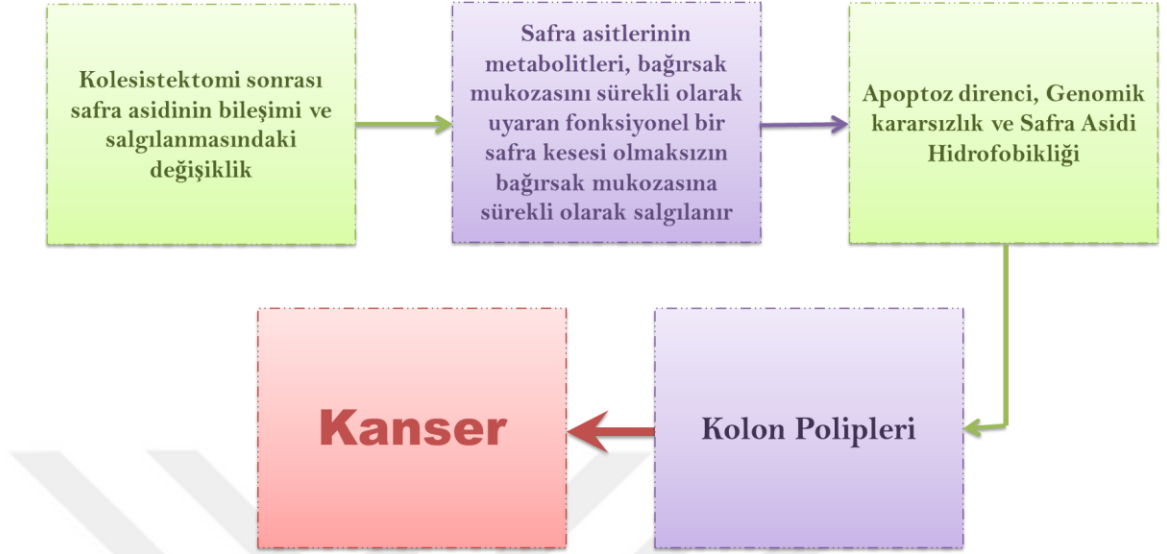
Bakteriyel ve Viral Ajanlar: Bakteri ve virüs enfeksiyonlarının CRC'ye neden olma rolü daha sınırlı olmakla birlikte, farklı mekanizmalarla CRC oluşumunda rol oynadıkları bildirilmektedir. Gastrointestinal sistemi kolonize eden yaklaşık 100 trilyon bakteri bulunur ve bunların yaklaşık 104'ü sadece kolonda yerleşmiştir. Bu yerleşik bakteriler, folik asit, biyotin, K vitamini gibi pek çok farklı mekanizmalar için çok önemlidir. Ancak, CRC gelişimini ve ilerlemesini teşvik eden *Enterococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Parvimonas* ve *Helicobacter pylori* gibi patojen bakteriler bilinmektedir (Antonic vd, 2013; Ternes vd, 2020). *John Cunningham virüsü*, *insan papilloma virüsleri*, *insan polyoma virüsleri*, *insan herpes virüsleri*, *insan bocavirüsü* ve *Inoue Melnick virüsü* bazı patojenik virüsler de rol alırlar. Bu bakteriler ve virüsler, farklı mekanizmalar yoluyla CRC karsinogenezinde rol oynadığı tahmin edilmektedir (Şekil 2.12) (Chen v.d., 2015). İlk olarak bakteriler oncometabolitler dahil olmak üzere metabolitler salgılar, bu oncometabolitler kanser hücrelerinde birikir ve kanser yakıtı görevi görür ve CRC'nin kötü prognozuna ve tedavinin zor olmasına yol açmaktadır.

Ayrıca, bakterilerin hücreye bağlanma, invazyon ve translokasyon yöntemi, CRC gelişiminde önemli bir rol oynar. Son zamanlarda, CRC tedavisi için etkili bir tedavinin uygulanmasında önemli bir rol oynadığı için bu mekanizmayı anlamaya çalışan birçok model vardır. Üçüncü mekanizma ise, bakteri-hücre etkileşimleri gibi konak savunma modülasyonudur. Bakteriler, bağışıklık hücresi proteinleri ile etkileşerek veya maddeler salarak bağışıklık hücrelerini etkilerler (Ternes v.d., 2020).



Şekil 2. 12. CRC'de bakteri ve konakçı arasındaki etkileşim (Ternes v.d., 2020).

Kolesistektomi: Kolesistektomi, safrayı toplayan ve depolayan organ olan safra kesesinin çıkarılması operasyonudur. Kolesistektomi ve CRC arasındaki ilişki çok net değildir. Ancak safra kesesinde depolanan safra asidi, CRC için kanserojen olarak bilinir. Kolesistektomi sonrası safra kesesinden salgılanan safra asitlerinin fizyolojik özelliklerinde, bileşiminde ve salgılanmasında değişiklik meydana gelir. Ayrıca CRC’de kanserojen olarak kabul edilen litokolik asit ve deoksikolik asit gibi sekonder metabolitler, bağırsak mukozasını sürekli olarak uyarmaktadır. Safra asitleri ve sekonder safra asitlerindeki bu fizyolojik artış, apoptoz direncine, genomlarda instabiliteye ve safra asidi hidrofobikliğine yol açmaktadır. Bu olay, glandüler epitelden kolonik poliplerin ortaya çıkmasında artışlara ve böylece CRC'nin gelişmesine ve ilerlemesine neden olmaktadır (Şekil 2.13) (Aurif v.d., 2021; Mandi v.d., 2021).



Şekil 2. 13. Kolesistektomi sonrasında CRC'nin etioloji ve patofizyolojisi (Aurif v.d., 2021'den değiştirilerek).

2.3.2. Kolon Kanserinin Oluşumu

CRC, iyi huylu prekanseröz poliplerde meydana gelen değişikliklerden gelişmektedir (Şekil 2.14). Polipler, genetik ve epigenetik dengesizlik nedeniyle oluşan kolon veya rektumun iç tabakasında anormal çoğalan hücrelerdir. Poliplerin boyutları büyüdükçe, genetik mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler de artar ve zamanla bu polipler bağırsak duvarına invazyon yeteneği kazanır, bu da lokal/primer kanserin ortaya çıkmasına ve yakındaki lenf düğümlerine yayılarak uzak bölgelere metastaz yapmasına yol açmaktadır (Kuipers v.d. , 2015; Simon, 2016). Prekanseröz poliplerin erken tespiti ve engellenmesi, CRC oluşumunu, gelişimini ve yayılmasını önlemek bakımından önemlidir.



Şekil 2. 14. Farklı aşamalarındaki kolorektal neoplazi (Kuipers v.d., 2015).

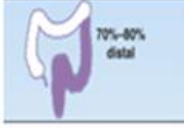
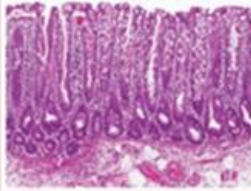
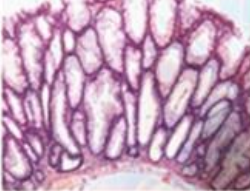
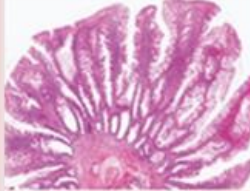
CRC gelişimi için iki tip kanseröz polip vardır bunlar adenomatöz ve tırtıklı (serrated) poliplerdir. Düşük derecede hücresel ve yapısal poliplerle karakterize adenomatöz poliplerdir. Kolorektal kanserlerin %60-70'i bu tipe bağlı olarak oluşur ve tübüler adenom (kansereleşme riski en düşük olan), villöz adenom (kansereleşme riski en yüksek olan) ve tübül-villöz adenom (orta riskli) olarak ayrılmaktadır (Şekil 2.15) (Simon, 2016).



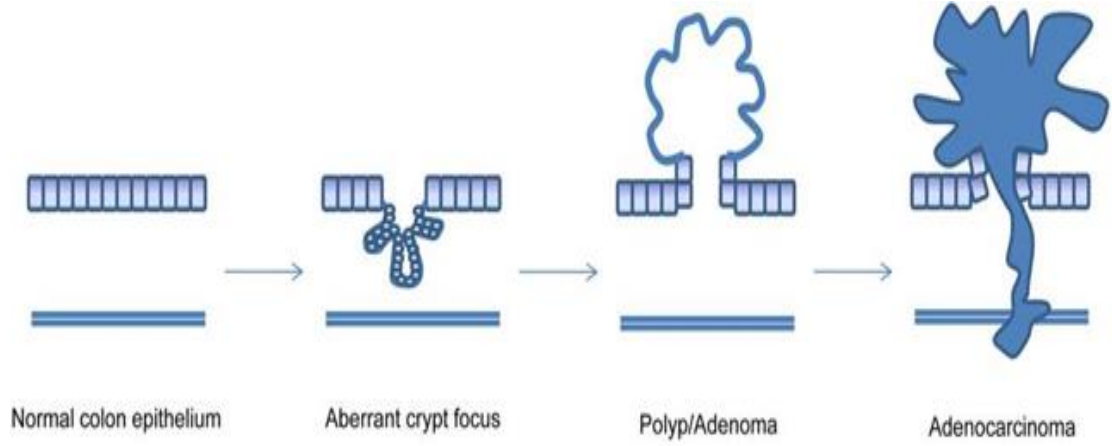
Şekil 2. 15. Kolon ve rektumun geleneksel adenomu (Hamilton, 2000).

Tırtıklı polipler ise, adenomlardan farklı moleküler ve histolojik olaylar sonucu oluşmaktadır. Tırtıklı polipler alt gruplara ayrılır (Tablo 2.3), en yaygın tipi mikrovasküler polipler olan ve goblet hücrelerinden zengin hiperplastik poliplerdir. İkinci tip ise, kript, mukozal prolapsus veya stromal proliferasyonlar ile tanınan tırtıklı sapsız lezyonlardır. Daha az yaygın olanı ise, diğer iki tipten farklı desende tırtıklı olan geleneksel tırtıklı poliplerdir (Crockett ve Nagtegaal, 2019).

Tablo 2. 3. Üç farklı tırtıklı polip tipinin özellikleri (Crockett ve Nagtegaal, 2019'dan değiştirilerek).

Özellikleri	Hiperplastik Polipler (HPs)	Sesil Tırtıklı Polipler (SSLs)	Geleneksel Tırtıklı Adenomlar (TSAs)
Klinik özellikler	Yaygınlık: %20 -%30. Boyut: Genellikle küçük ≤ 5 mm Morfoloji : düz veya sapsız	Yaygınlık: %5 -%15. Boyut: Genellikle HP'lerden daha büyük Morfoloji : ortalama çap 5-7 mm	Yaygınlık: $< \%1$ Boyut: Genellikle SSL'lerden daha büyük Morfoloji : Polipoid veya pedinküllü
Yer			
Histopatoloji			

CRC kanserinde tümörün ilerlemesini açıklayan ilk model, Vogelstein ve Fearon (1988) tarafından tanımlanmıştır. Bu model, bir CRC tümörünün oluşumunu üç temel adımda özetlemektedir: anormal kript oluşumuna yol açan başlatma adımı ile başlar, daha sonra erken ve geç adenoma gelişimi ile sonunda malign adenokarsinom haline gelir (Şekil 2.16). Bu modele göre sadece tübüler ve tübülovillöz adenomların invaziv hale gelebileceği ileri sürülmesine karşın, son on yılda öne sürülen yeni modeller tırtıklı poliplerin de invaziv olabileceğini göstermektedir. Tırtıklı poliplerin CRC'ye dönüşmesi ve invaziv hale gelmesi için, hiperplastik polipten sapsız polipe ve sonra adenokarsinomaya dönüşmesi gerektiği belirtilmiştir (Vogelstein v.d., 1988; Grady ve Markowitz, 2015; Kuipers v.d., 2015).

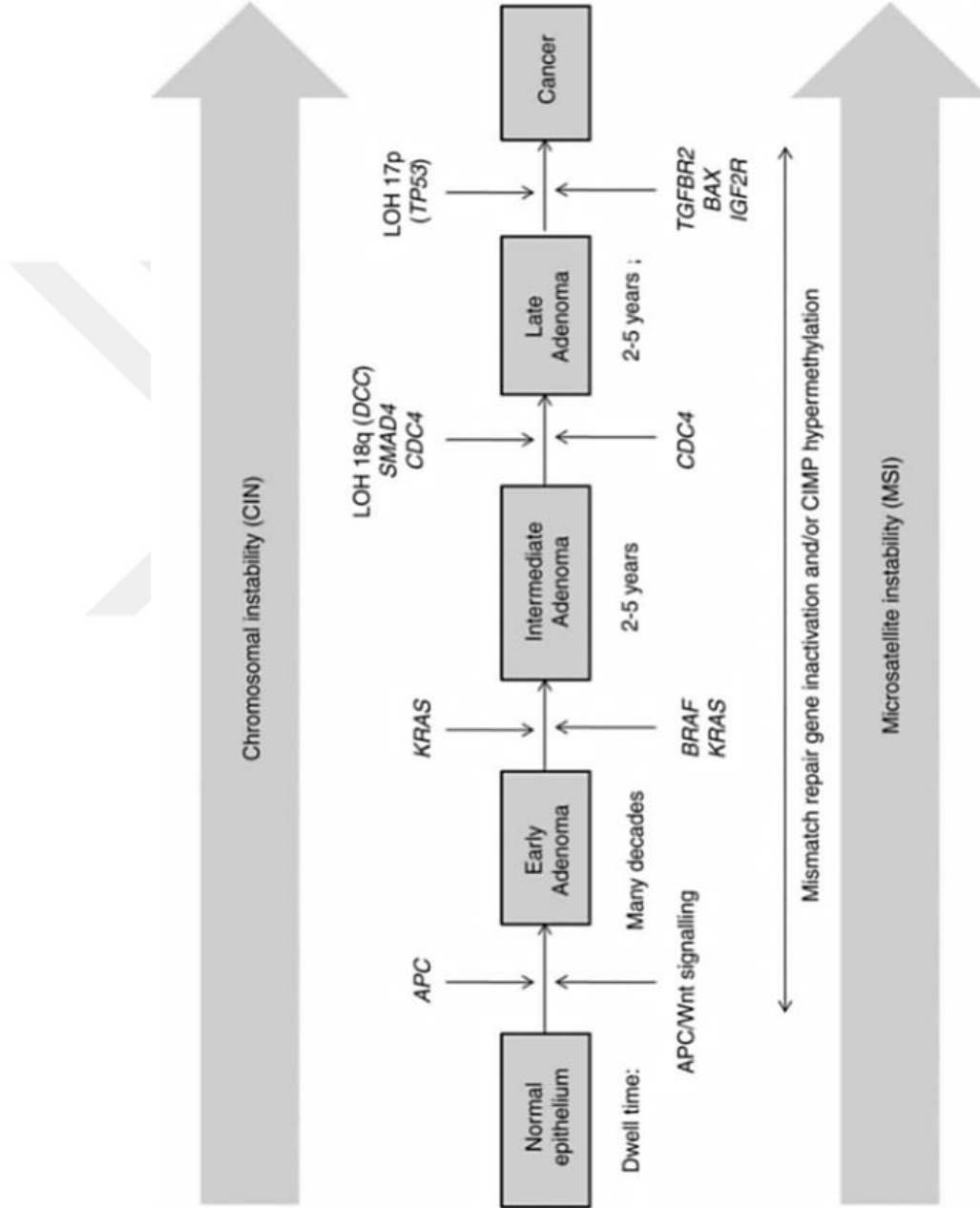


Şekil 2. 16. Kolorektal kanser oluşum modeli (Grady ve Markowitz, 2015).

Kanserli poliplerin ve dolayısıyla da CRC'nin oluşumuna yol açan WNT, MAPK, PI3K, TGF β ve P53 sinyal yollarını deregüle eden üç farklı genetik değişiklik görülür bunlar kromozomal kararsızlık (CIN), Mikrosatellit Kararsızlığı (MSI) ve CpG Adası Metilatör Fenotipi (CIMP)' dir (Şekil 2.17) (Grady ve Markowitz, 2015; Nguyen ve Duong, 2018).

Kromozomal kararsızlık (CIN): Sporadik kolorektal kanserlerin %85'inde kromozomal instabilite görülür. CIN, kromozomal segmentlerin kaybı veya kazanımı gibi kromozom sayısı ve yapısındaki değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca kromozomal yeniden düzenlemeler ve heterozigotluk kaybı (LOH) olarak da tanımlanabilmektedir. Bu değişiklikler, tümörle ilgili genler ve hücre çoğalmasında veya hücre döngüsü kontrol noktalarında temel rol alan genlerin bozulmasına yol açmaktadır (Nguyen ve Duong, 2018). CIN tümörleri, bazı onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde birikmiş mutasyonlar tarafından tanınmaktadır **(1) APC:** adenomatöz polipozis koli (APC), Wnt sinyal yolu için antagonist görev yapan tümör baskılayıcı proteini kodlayan bir genidir. Hücrenin migrasyon ile adezyonunda, transkripsiyonel aktivasyonda ve apoptozda rol oynamaktadır. Bu genin kusuru FAP neden olur, bu nedenle germ hattı kalıtsal olabilir. Ayrıca sporadik kolorektal kanserlerin ve adenomların %60 ila 80'inde görülmektedir. APC veya β -katenin mutasyonu, Wnt yolu ile β -katenin degrades edilmesi engeller ve böylece kontrolsüz hücre büyümesine yol açan genlerin uyarılmasını neden olmaktadır. Kromozom 5q21 lokusu üzerindeki bir APC

gen mutasyonu, normal epitelin erken adenomaya dönüşmesinden sorumludur. Karsinogenez için önemli bir başlangıç basamağı olarak kabul edilebilir (Narayan ve Roy, 2002).



Şekil 2. 17. Normal epitelden kolorektal kansere moleküler değişiklikler (Nguyen ve Duong, 2018).

(2) KRAS: KRAS proto-onkogen GTPaz, hücre çoğalması gibi hücresel olayları düzenleyen MAPK sinyal yolu gibi çeşitli hücre sinyal yollarında önemli bir rol oynayan bir sinyal dönüştürücü proteindir (Pantsar, 2020). CRC kanserlerin %35 ila %45'inde KRAS mutasyonları bulunur. Bu gendeki mutasyon, GTP'ye bağlanan KRAS proteinlerinin birikmesine ve dolayısıyla hücre proliferasyonunun yapıcı aktivasyonuna yol açmaktadır (Schubbert v.d., 2007). KRAS mutasyonları monoaleliktir (genlerden biri aktif, diğeri sessiz), çoğunlukla erken ve orta adenoma evreleri arasında kodon 12 ve 13'te meydana gelir (Inoue v.d., 2012). **(3) 18q kaybı:** DCC, SMAD2 ve SMAD4'ü içeren kromozom 18q kodlu tümör baskılayıcı genler. Geç adenoma konformasyonundan 18q kromozomunun kaybı sorumludur **(4) TP53:** "genomun koruyucusu" olarak da bilinir. Hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ve apoptoz gibi farklı hücre süreçlerinde rol oynayan birçok hedef geni kontrol eden bir transkripsiyon faktörü görevi görmektedir. Bu gendeki mutasyon, geç adenomlardan karsinomlara doğru ilerlemeye yol açmaktadır (Nguyen ve Duong, 2018; Liebl ve Hofman, 2021).

Mikrosatellit Kararsızlığı (MSI): MSI, tekrarlayan DNA dizisi mikrosatellitlerinin yüksek sıklıkta replikasyon hatalarından dolayı meydana gelen başka bir genomik instabilite türüdür (Şekil 2. 17). Bu genomik kararsızlığın, DNA replikasyonu sırasında genlerin stabilitesini desteklemede rol oynayan DNA mismatch repair sistemi (MMR) adı verilen bir sistemde meydana geldiği bulunmuştur. MSI, sporadik CRC'nin %15-20'sinde ve Lynch sendromunun > %90'ında görülür ve her ikisinde de farklı mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır. Lynch sendromu veya son zamanlarda Herediter nonpolipozis CRC (HNPCC) olarak tanımlanan hastalıkta mut S homolog 2 (MSH2), mut L homolog 1 (MLH1), mut S homolog 6 (MSH6) ve PMS1 Homolog 2 (PMS2) olarak bilinen dört MMR'de mutasyonlar meydana gelmektedir. MSI ile ilişkili sporadik kanserde, MLH1 geni gibi genlerin promotörlerinin metilasyonu ile ortaya çıkan CpG ada metilatör fenotipini (CIMP) içemektedir. MSI'li CRC, APC'de mutasyonlara sahip olabilir, normal APC'ye ancak β -katenin'de mutasyonlar vardır ve bunun APC'ye bağlanmasını engellenir, veya WNT yolundaki başka proteinlerde mutasyonlar olmaktadır. Erken adenomun ortaya çıkması için genellikle bu mutasyonlardan onlarca yıl geçmesi gerekir. Lynch sendromu durumunda KRAS proteinindeki veya sporadik

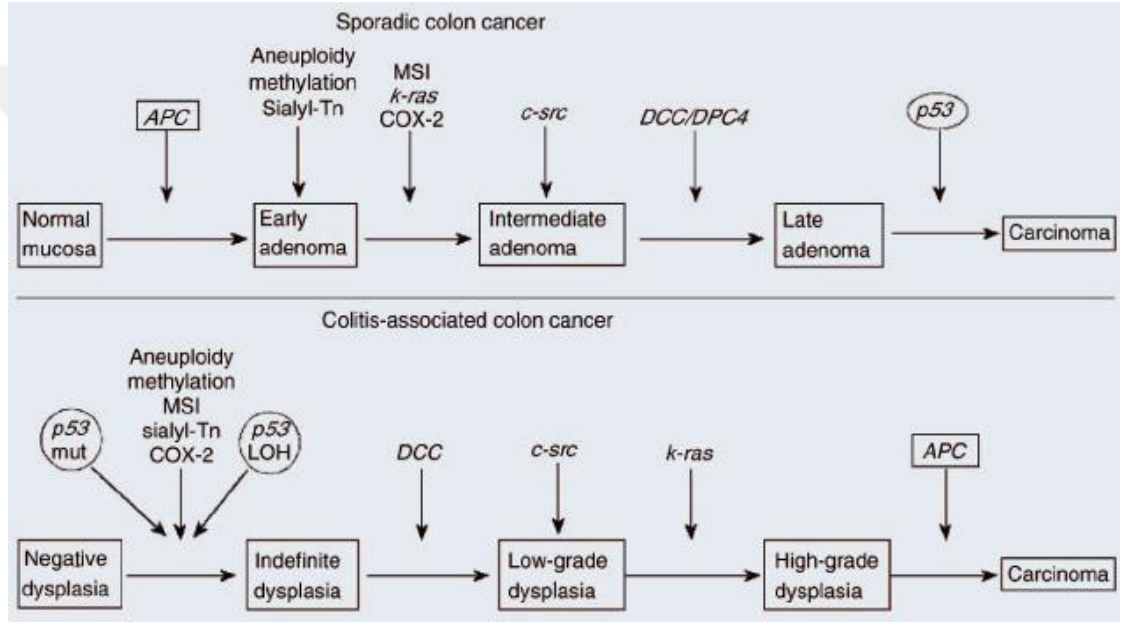
kanser durumunda B-raf proto-onkogen serin/treonin kinaz (BRAF) taki diğer mutasyonlar, adenomun ortaya çıkması daha fazla ilerlemesine neden olmaktadır. Transforming büyüme faktörü β - reseptörü (TGFB2) veya BCL2 ilişkili X apoptoz düzenleyici (BAX) gibi tümör baskılayıcı veya tümör ilişkili genlerin bölgelerindeki diğer mutasyonlar kanser oluşumuna yol açmaktadır (Boland ve Goel, 2010; Nguyen ve Duong, 2018)

MSI'li CRC'nin proksimal kolonda olduğu ve MSI CRC'li hastaların prognozunun daha iyi olduğu saptanmıştır. Ayrıca MSI, kalıtsal CRC'nin tanımlanmasında kullanılan ilk testtir. Tümörler, mikrosatellit kararsızlığının sayısına göre belirteçlerin $<30\%$ 'u kararsızlık gösterdiğinde MSI düşük olarak, belirteçlerin $\geq 30\%$ 'u kararsızlık gösterdiğinde yüksek MSI ve belirgin bir kararsızlığı olmayanlar mikrosatellit kararlı MSS olarak tanımlanmaktadır (Boland ve Goel, 2010; Nguyen ve Duong, 2018).

CpG Adası Metilatör Fenotipi (CIMP) : CIMP, transkripsiyonel gen sessizleşmesine yol açan, sinyal yollarını değiştiren ve CRC'nin ilerlemesine yol açan gen promotörünün hipermetilasyonudur (Baylin ve Ohm, 2006). CIMP $30\%-50\%$ kolorektal adenomda tanımlanmıştır ve sporadik yoldan sorumludur (Mundade v.d, 2014). CIMP alt gruplara ayrılmaktadır. Bunlar; CIMP-yüksek (CIMP-H): MSI, MLH1 DNA hiper metilasyonu ve BRAF mutasyonu ile ilişkilidir. CIMP-Düşük (CIMP-L), KRAS mutasyonları ile ilişkilidir ve CIMP olmayanlar TP53 ile ilişkilidir (Hinoue v.d., 2012).

İltihaplı bağırsak hastalıklarının CRC ye dönüşmesinin patogenezi sporadik CRC gelişimi ile çok yaygındır. Bazı farklılıklar vardır (Şekil 2.18). İlk fark, sporadik CRC'de bir veya iki kolit displazisinden gelişirken, enflamatuar bağırsak hastalığı ile ilişkili kolorektal kanser displazisi multifokal kolitten gelişir. Öte yandan, iki genomik dengesizlik CIN ve MSI, hem sporadik CRC'de hem de enflamatuar barsak hastalığına bağlı kanserde ortaya çıkar, ancak farklı bir zaman ve sıklıkta meydana gelir, örneğin, sporadik CRC'de ilk adımlarda APC kaybı meydana gelirken inflammatuar barsak hastalığına bağlı kanserde APC kaybı, karsinogenezin son aşamasında (Displazi-Karsinom aşaması) gelmektedir. Diğer bir fark ise, enflamatuar hastalıkla ilişkili kanserde, P53'teki mutasyonun displazinin ilk basamağının oluşumu için çok önemli

olmasıdır. İnflamatuvar barsak hastalığına bağlı CRC patogeneğinde rol oynayan diğerk önemli faktörler ise siklooksijenaz (COX)-2, inflamatuvar sitokinler ve kemokinlerin indüklenmesi gibi kronik inflamasyondur, ve enflamatuvar reaksiyonlara yanıt olarak ortaya çıkan ve proteinlere ve nükleik aside saldıran oksidatif stres. Enterococcus faecalis gibi bağırsak mikrobiyotasının, enflamatuvar barsak hastalıklarının CRC'ye dönüşmesinde da çok önemli bir indükleyici olduğu kabul edilmektedir. (Kim ve Chang, 2014).



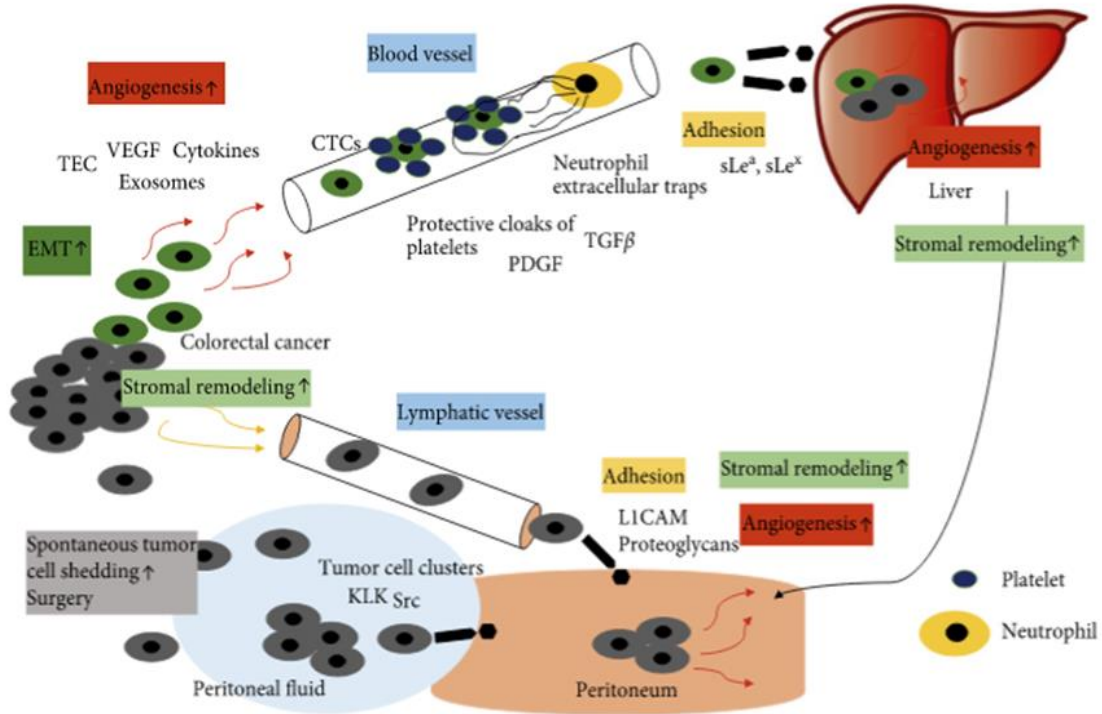
Şekil 2. 18. Sporadik kolon kanser ile inflamatuvar bağırsak hastalığı olan (kolit ilişkili kolon kanseri) oluşumunun moleküler patogenezi (Kim ve Chang, 2014).

2.3.3. Kolorektal Kanserde Metastaz

CRC'nin önde gelen ölüm nedeni metastazdır. CRC hastalarının yaklaşık %25'i teşhis esnasında metastatik hastalığa sahiptir. CRC metastazı için en yaygın bölge karaciğerdir ve CRC vakalarının yaklaşık %50'sini içerir. Bunun nedeni, bulunduğu yer ve ana damarlar yoluyla bol miktarda kan ile birlikte olmasıdır. Karaciğer aynı zamanda immünosupresif organ olarak kabul edilir, bu nedenle de metastazın kolayca büyüyebildiği belirtilmektedir (Riihimäki v.d., 2016; Dmello v.d., 2021). İkinci en sık metastaz yeri %10-15 ile akciğerde görülür ve %4-13 ile periton, CRC metastazının

üçüncü en yaygın bölgesidir (Riihimäki v.d., 2016; Testa v.d., 2018). Kemik, prostat, mesane veya uterus gibi bölgelere metastaz yapar, ancak bu organlara olan metastazlar, yaygın değildir (Sánchez v.d., 2015).

CRC metastazında rol oynayan iki farklı mekanizma tanımlanmıştır, bunlar hematojen ve peritoneal yayılımdır (Şekil 2.19). Normal metastatik yolda çok yaygın olan hematojen yayılma EMT'nin düzenlenmesi ile başlamaktadır. CRC hematojen yayılımında EMT'nin önemli düzenleyicilerinden biri, SNAIL, ZEB, E12/E47 ve AP4 gibi doğrudan baskılayıcılar veya TWIST, FOXC2, SOX2, Nanog ve OCT4 gibi dolaylı baskılayıcılar tarafından baskılanan E-Cadherin'dir. Ayrıca burada yeni kan damarlarının oluşumu olan anjiyogenez, yalnızca primer ve metastatik bölgelerdeki bir tümörü gerekli destek materyali ile desteklemekle kalmaz, aynı zamanda tümör hücrelerinin, mevcut kan damarlarına bağlı yeni damarların oluşumu yoluyla da dolaşım sistemine girmesini sağlamaktadır (Pretzsch v.d., 2019).



Şekil 2. 19. CRC’de metastaz mekanizmaları: hematojene karşı peritoneal yayılım (Pretzsch v.d., 2019).

Hematojen yayılımın birincil bölgesinde meydana gelen anjiyogenez, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), tümör endotel hücreleri (TEC'ler), sitokinler ve eksozomlar tarafından düzenlenmektedir. Daha sonra dolaşımdaki tümör hücreleri (CTCs) dolaşım sistemine girdiğinde, nötrofil hücreler tarafından ve TGF- β ve trombositlerden salınan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) tarafından oluşturulan koruyucu örtü tarafından natural killer hücreler gibi bağışıklık hücrelerinden korunmaktadır. Bu koruma aynı zamanda CTC'lerin invaziv özelliklerini ekstrasvazyon ve metastaz yapmalarını da sağlamaktadır. Ekstrasvazyon sonrası karaciğer hücrelerine tutunma, kan grubu antijenleri sLe ve Slex gibi CTC'lerin adezyon moleküllerinin ECM'ye bağlanmasıyla gerçekleşmektedir (Pretzsch v.d., 2019).

CRC metastazının diğer bir mekanizması, beş temel adımı içeren peritoneal yayılımdır. İlk adım, spontan tümör hücrelerinin dökülmesi yoluyla CRC hücrelerinin primer tümörden ayrılmasıdır. İkincisi, hücre dışı matriks ile uygun olmayan etkileşim sonucu meydana gelen apoptoz olan anoikis'ten kaçınmaktır. Periton sıvısında, tümör hücreleri anoikisten kaçmak için kallikrein ile ilişkili peptidazları (KLK7) aktive eder, Src'yi yukarı doğru düzenler ve kümeler oluşturur. Üçüncüsü, tümör hücrelerinin periton yüzeyine yapışmasıdır. Peritoneal yayılmadaki proteoglikanlar, L1CAM ve müsinler gibi adezyon molekülleri değişkendir ve hematojen yayılımdakinden farklıdır. Daha sonra, anjiyogenez oluşumu ve ECM'nin yeniden şekillenmesi sonucu tümör peritonda daha da büyümektedir. Son olarak peritonda proliferasyon ve metastaz oluşumu gerçekleşmektedir (Pretzsch v.d., 2019).

Kanser hücrelerinin stroma veya mikroçevresinin yeniden şekillenmesi, hem hematojen hem de peritoneal yayılımda rol oynayan, Şekil 2.19'da belirtilen bir diğer önemli mekanizmadır. CRC hücrelerinde stroma, fibroblast yüzey proteini (FSP-1) ve fibroblastla aktive edilmiş protein (FAP) gibi kanserle ilişkili fibroblastlar, nötrofiller ve makrofajlar gibi bağışıklık hücreleri, endotel hücreleri, hyaluronik asit gibi birçok bileşenden oluşmaktadır. CRC hücre stromasında, TGF- β , PDGF, ECM bileşenleri, sitokinler ve büyüme faktörleri onun yeniden şekillenmesini düzenlenmektedir (Tauriello v.d, 2017; Pretzsch v.d., 2019).

2.4.Apoptoz

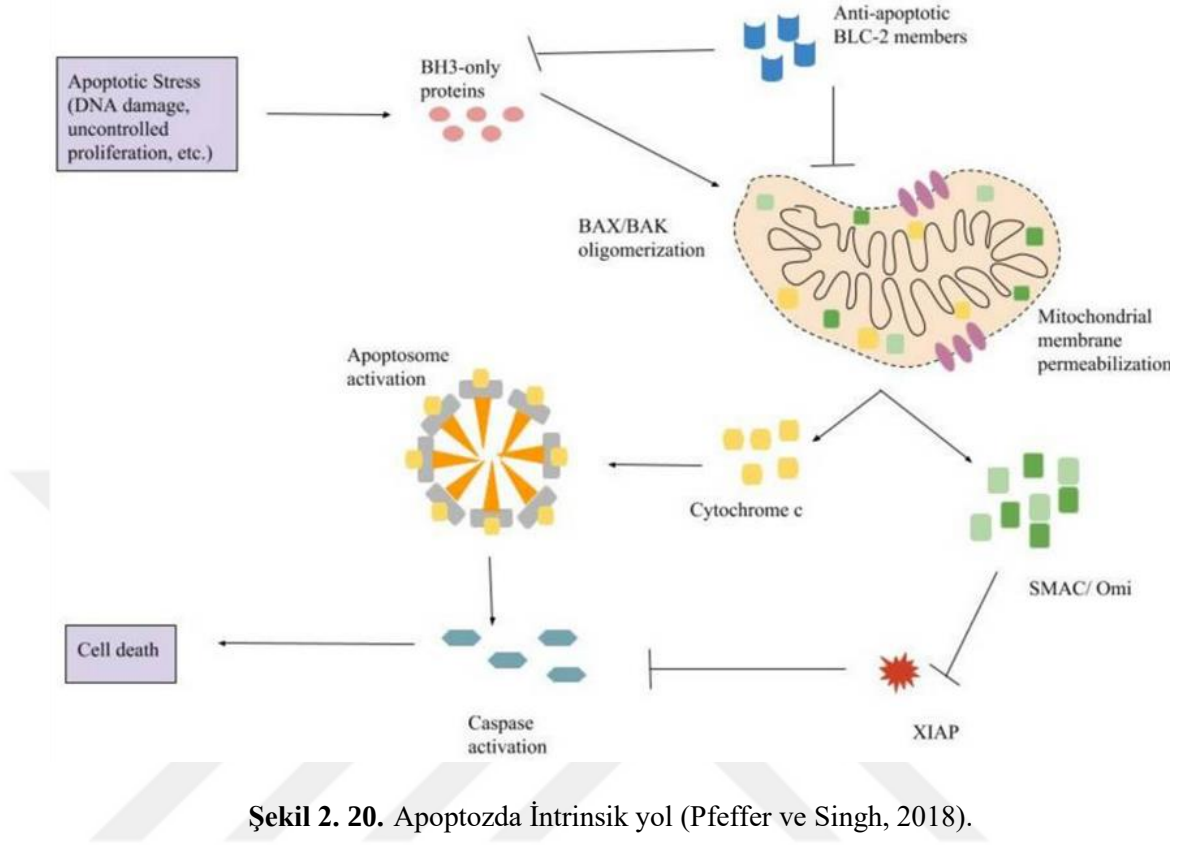
Apoptoz, sonbahardaki yaprak düşmesi anlamına gelen Yunanca apo "ayrı" ve pitoz "düşme" sözcüklerinden gelir. Apoptoz, programlanmış hücre ölümüdür, tüm hücre tiplerinde meydana gelir, embriyonik dönemde başlar ve yaşam boyunca devam eder. Hücrelerin farklı stresler ve hasarlar nedeniyle fonksiyonlarını kaybettiklerinde veya hücrelerin tüm biyolojik fonksiyonlarını tamamlayıp vücudun artık ihtiyaç duymadığı durumlarda hücrelerin yok edilmesini sağlayan çok önemli bir mekanizmadır (Atay v.d., 2021).

2.4.1. Apoptotik Mekanizma

Apoptozun morfolojik ayırt edici özellikleri çoğunlukla tüm hücre tipleri arasında yaygındır. Bunlar kromatinin yoğunlaşması, çekirdeğin parçalanması, hücrenin yuvarlaklaşması, hücre hacminde azalma (piknoz), psödopodların geri çekilmesi, sitoplazmik organların ultrastrüktürel modifikasyonu ve zar bütünlüğünün kaybı şeklinde özetlenmektedir (Wong, 2011).

Ayrıca, apoptoz sırasında üç ana biyokimyasal değişiklik meydana gelir, 1-proteini parçalayabilen ve DNAazı aktive edebilen sistein proteaz enzimleri grubu olan kaspazların aktivasyonu. 2- protein ve DNA'nın parçalanması ve 3- zardaki değişiklikler ve fagositik hücreler tarafından tanınmadır. Erken apoptozda hücreler, hücre zarının dış tabakasında fosfatidilserin eksprese edebilirler ve bu onları fagositik hücreler tarafından proinflamatuvar hücresel bileşenlerin salınımı olmaksızın fagositoza girmek üzere işaretlemektedir (Wong, 2011).

Apoptoz da intrinsik yol olarak adlandırılan mitokondriyal yol ve ekstrinsik yol olarak adlandırılan ölüm reseptörü yolu olmak üzere iki ana yol vardır. İntrinsik yol esas olarak proapoptotik efektör proteinleri, sadece proapoptotik BH3 proteinleri ve antiapoptotik BCL-2 proteinlerini içeren B hücreli lenfoma-2 (BCL-2) protein ailesi tarafından düzenlenmektedir (Şekil 2.20).



Şekil 2. 20. Apoptozda İntrinsik yol (Pfeffer ve Singh, 2018).

Antiapoptotik BCL-2 proteinleri, yalnızca BH3 proteinleri, BAX (BCL-2 ile ilişkili X proteini) ve BAK (BCL-2 homolog antagonist öldürücü) proteinlerinin inhibisyonu yoluyla apoptozu inhibe etmektedir (Wong 2011; Pfeffer ve Singh, 2018).

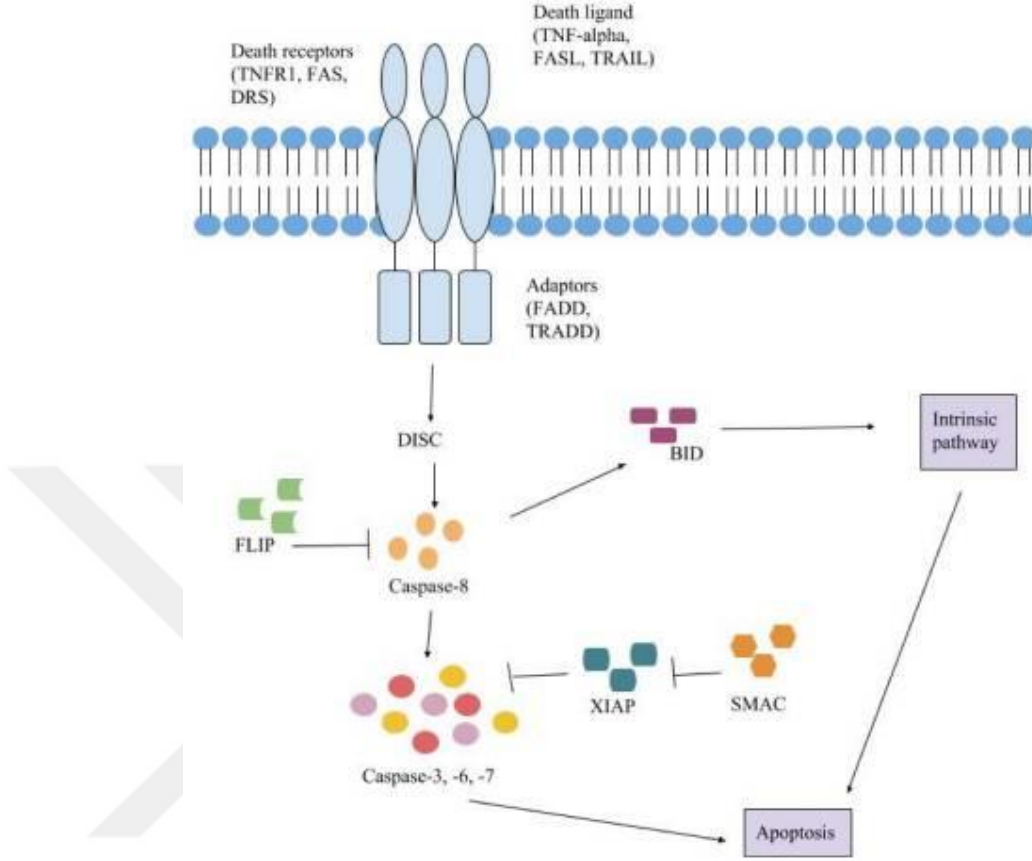
İntrinsik yol, DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu, yüksek konsantrasyonlarda sitozolik Ca^{2+} , bu yolda rol oynayan onkogenlerin yukarı regülasyonu, hipoksi ve oksidatif stres gibi farklı hücre içi stresler tarafından uyarılmaktadır. Bu uyarın, BAX ve BAK proteinlerini aktive eden sadece BH3 proteinlerinin düzenlenmesine yol açmaktadır. Bu iki proteinin aktivasyonu, onların oligomerizasyonuna yol açarak mitokondriyal dış zar geçirgenliğine neden olmaktadır. Böylece, sitokrom c, ikinci mitokondri türevli kaspaz aktivatörü (SMAC) ve Omi gibi intermembran proteinlerinin salınmasına izin vermektedir. Bunun üzerine sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1), dATP ve procaspaz-9 kombinasyonu ile apoptozom oluşturulur. Apoptozom içinde procaspaz-9, kaspaz-9'a dönüştürülür. Kaspaz-9, kaspaz-3 ve -7'yi aktive ederek hücre proteinlerini parçalayarak apoptozu yol açmaktadır. Buna ek olarak

SMAC, apoptoz proteinlerinin inhibitörünü (IAP) ve Omi, X'e bağı apoptoz protein inhibitörü (XIAP) gibi kaspaz fonksiyonunun endojen inhibitörünün fonksiyonunu inhibe etmektedir (Wong 2011; Pfeffer ve Singh, 2018).

Extrinsik yol ise hücre dışı sinyaller tarafından uyarılmaktadır (Şekil 2.21). Hücre dışı sinyaller, ölüm ligandları olarak bilinen Fas ligandı (Fas-L), TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) ve tümör nekroz faktörü (TNF) hücre zarı üzerindeki tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve Fas reseptörü gibi ölüm reseptörlerine bağlanır. Ölüm reseptörünün aktivasyonu, zarın hücrel bölgesinde adaptör proteinin (Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) ve TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD)) toplanmasına neden olmaktadır. Daha sonra ölüme neden olan sinyal kompleksi olan adaptör protein ve başlatıcı prokaspaz-8 ve -10'dan DISC oluşumu gerçekleşmektedir. Procaspaz-8'in aktivasyon formu, kaspaz-8, kaspaz -3, 6, 7'nin aktivasyonu veya BH3 etkileşen etki alanı ölüm agonisti (BID)'nin aktivasyonu ile intrinsik yolun başlatılmasıyla apoptozu başlatmaktadır. DISC, FLICE (FADD-benzeri IL-1beta-dönüştürücü enzim)-inhibitör proteini, c-FLIP inhibitörü tarafından düzenlenmektedir. Yani c-FLIP antiapoptotik aktiviteye sahiptir (Pfeffer ve Singh, 2018).

2.4.2. Apoptoz ve Kolorektal Kanser

Normal kolorektumda iki tip apoptoz meydana gelebilir: normal stressiz kolonda meydana gelen spontan apoptoz ve toksik uyaran olduğunda meydana gelen stres kaynaklı apoptozdur. Hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki denge kolonik kript normal şeklini korur (Yang v.d., 2009).



Şekil 2. 21. Extrinsik yol (Pfeffer ve Singh, 2018).

Hanahan ve Weinberg, (2011) (Şekil 2.2) tarafından belirtildiği gibi, kanser hücreleri, kanser hücrelerinin önemli bir özelliği olan programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kaçınmaktadır. Bu durum, tümör hücresinin ilerlemesini ve gelişimini indükleyebilir ve kanser hücrelerinin antikanser tedavilerine direnç göstermesini sağlayabilmektedir. Dolayısıyla apoptozun mekanizmalarını (Şekil 2.20 ve 2.21) ve kanser hücrelerinin apoptozdan kaçabileceği mekanizmaları anlamak, kansere karşı yeni tedavileri keşfetmeye yardımcı olabilecektir (Atay v.d., 2021).

Apoptozdan kaçmak karsinogenezde ve tümör patogeneğinde önemli bir rol oynadığından, CRC dahil tüm kanser hücreleri apoptozdan kaçmak için birçok mekanizma edinmektedir (Wong 2011, Atay v.d., 2021).

Tümör baskılayıcı gen olarak çalışan P53 apoptozda önemli bir gen düzenleyici olarak kabul edilmektedir. Üzerindeki mutasyon veya kusurlar apoptozu inhibe edebilir ve birçok kanser türünde hücre çoğalmasını indükleyebilmektedir (Wong 2011, Atay v.d., 2021). CRC'nin %75'inde P53'te mutasyon veya kusur olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle araştırmacılar, P53'ün işlevini geri yükleyerek CRC'yi tedavi etmeye çalışmaktadır (Yang v.d., 2009).

Bir başka mekanizma ise, apoptozun başlamasında rol oynayan kaspaz-2, -8, -9 ve -10 gibi kaspazlardaki bozukluklardır (Wong 2011, Atay v.d., 2021). Bazı kaspazların mRNA ekspresyonu, evre II CRC hastalarının prognozu için kullanılan kaspaz-9'un mRNA ekspresyonu gibi kanserli hastalar için bağımsız bir prognostik faktör olarak kullanılmaktadır (Chen v.d., 2010).

Apoptoz proteinlerinin inhibitörünün (IAP) ifadesindeki artması, CRC hücrelerinin apoptozdan kaçmasında da önemli bir mekanizmadır. IAP, seçici mekanizmalarla kaspazları inhibe eden bir kaspaz inhibitörleri ailesidir. Ayrıca IAP, hücre döngüsünü düzenleyerek apoptozu inhibe etmektedir (Wong 2011, Atay v.d., 2021). Survivin, IAP ailesinden olup, CRC dahil kanserlerde ifade edilmektedir. Düzenlenmiş hücre döngüsü ile dolaylı olarak apoptozu inhibe etmektedir (Yang v.d., 2009).

Diğer bir mekanizma olan intrinsik apoptoz yolundaki mutasyonlar, BCL-2 ailesi proteinlerinde dengesizliğe neden olmaktadır. Bu, antiapoptotik proteinlerin (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 ve Bfl-1/A1) aşırı ekspresyonu ve proapoptotik proteinlerin (Bax, Bak, Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk ve Bik) düşük ekspresyonu anlamına gelmektedir (Wong 2011, Atay v.d., 2021). Bcl-2, kolorektal adenomda yüksek oranda eksprese edilir ve kanser orta veya şiddetli displaziye ilerlediğinde azalmaya başlamaktadır. Tahmin edildiği gibi Bcl-2, CRC gelişiminin geç aşamasında anti-apoptotik bir rol oynamamaktadır. Bax için, CRC'nin başlama ve gelişme aşamasında ifade azalmaktadır. Ayrıca normal kolonda Bak, apoptozu düzenleyerek kript hiperplazisini önlemektedir. Ancak aktivitesi bozulduğunda, CRC gelişimini ve karsinogenezi uyarmaktadır (Yang v.d., 2009).

CRC’de extrinsik faktörlerdeki mutasyonlar, intrinsik yoldaki kadar yaygın değildir. Extrinsik yollarda değişiklikler ölüm reseptörü, ligand ifadesindeki azalma, veya hücre apoptoz direncine yol açan kaspaz-8’i bloke edebilen c-FLIP’nin yüksek ifadesi gibidir. Ancak bazı agonistik TRAIL reseptörü insan monoklonal antikorları veya bir ölüm reseptörü agonisti kullanarak CRC’de extrinsik yol aktivitesini aktive etmek için bazı denemeler yapılmıştır (Yang v.d., 2009; Wong, 2011; Atay v.d., 2021).

COX-2 ve prostaglandin E2 (PGE2), NF- κ B yolları ve bağımlılık reseptörleri de CRC apoptozunda rol oynamaktadır. COX-2 ve NF- κ B inhibitörleri, anti-apoptotik proteinleri aşağı regüle etmek ve böylece apoptozu indüklemek ve CRC gelişimini azaltmak için kullanılmaktadır. Kolorektal kanserde DCC ve Unc-5 homolog C’de (UNC5C) silinen iki bağımlılık reseptörü, kolonda tümör baskılayıcılar olarak tanımlanmıştır. Ligandı Netrin-1 bu reseptörlere bağlandığında apoptozun inhibisyonu ve adenomdan karsinomaya geçiş gerçekleşmektedir (Yang v.d., 2009).

2.5. İyon Kanalları

Hücre membranlarında bulunan iyon kanalları, hücrenin bir dizi fizyolojik sürecini kontrol eden temel transmembran protein grubudur. Uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin oluşumunu ve dolayısıyla kas ve sinir hücrelerinin uyarılabilirliğini, diğer hücrelerde kan basıncını, hormonların salgılanmasını da düzenlemektedirler. Ayrıca iyon kanalları hücre hacminin düzenlenmesinde fertilizasyon, hücre çoğalması, invazyon, metastaz, anjiogenez ve apoptoz gibi ölüm süreçlerinde de yer almaktadır (Petkov, 2009; Prevarskaya v.d., 2010, 2018).

İyon kanalları, seçilen iyonların elektrokimyasal gradyanlarından pasif olarak geçmesine izin veren porları oluşturmak üzere birçok alt birimin bir araya gelmesiyle meydana gelen integral membran protein kompleksleridir. Alt birim sayısı iyon kanalının tipine göre değişmektedir (Yi ve Jan, 2002; Resta ve Bacchetti, 2010). Her gün yenilerinin eklediği çok sayıda iyon kanalı türü bulunmaktadır. İyon kanallarından iyonların difüzyonu saniyede 100 milyon iyon kadar çıkabilen yüksek bir oranda gerçekleşmektedir. Bu kanallar tüm hayvan ve bitki hücrelerinde hatta

mikroorganizmaların plazma membranlarında ve tüm organel zarlarında bulunmaktadır (Alberts v.d., 2002).

Kapılı olan iyon kanalları ışık, sıcaklık, mekanik değişiklikler, membran potansiyeli, hormon ve nörotransmitterler gibi ligandlar, kalsiyum ve siklik nükleotitler gibi farklı uyaran türlerine göre açılıp kapanmaktadır (Kim, 2014). Kapılı kanallar kapının açılıp kapanma özelliğine bağlı olarak voltaj kapılı kanallar ve ligand kapılı kanallar şeklinde sınıflandırılmaktadır. Voltaj kapılı kanallar membran potansiyeline bağlı olarak açılır ve içinden geçen iyon tiplerine göre sodyum, kalsiyum, potasyum ve klorür kanalları olarak adlandırılır. Ligand kapılı kanallar ise, iyonotropik reseptörler olarak da bilinirler ve kanalın özel bir bağlanma alanına bağlanan spesifik ligand moleküllerine yanıt olarak açılmaktadır. γ -aminobütirik asit kapılı GABA reseptörleri, iyonotropik glutamat kapılı reseptörler ve aside duyarlı iyon kanalları (ASIC'ler) gibidir (Prevarskaya v.d., 2018; Shad v.d, 2018).

İyon kanallarında genetik veya edinsel nedenlerle oluşan işlev bozuklukları sonucu konjenital veya heterojen hastalıklar meydana gelmekte ve bunlar kanalopatik hastalıklar başlığı altında gruplanmaktadır. Başlangıçta voltaj kapılı sodyum iyon kanallarında (VGSC) saptanan bu hastalıklar Na^+ -kanalopatileri olarak adlandırılmış ise de, günümüzde bilinen tüm kanal genlerindeki mutasyonlar biyofiziksel özellik değişiklikleri, kanal protein ekspresyonlarındaki sapmalar sonucu oluşan tüm hastalıklar kanalopatiler olarak adlandırılmaktadır. Bunlar epilepsiden migren, paraliz, nöropatiler, kalp ritm bozukluklarına, hipertansiyon, diyabet, astım, Bartter sendromu ve sistik fibrozise kadar hemen hemen tüm organların hastalıklarını kapsamaktadır (Preverskaya, 2018). Kolon ve rektum dahil olmak üzere gastrointestinal sistem için de durum benzerdir. İyon kanalları, sıvı sekresyonu ve absorpsiyonu, motilite ve viseral hassasiyet dahil olmak üzere sindirimle ilgili birçok mekanizmayı da düzenlemektedir. Ancak bu iyon kanallarının işlev bozuklukları pek çok hastalığın yanı sıra, kanserin gelişmesine de yol açmaktadır (Fuentes ve Christianson, 2016; Zhang v.d., 2020).

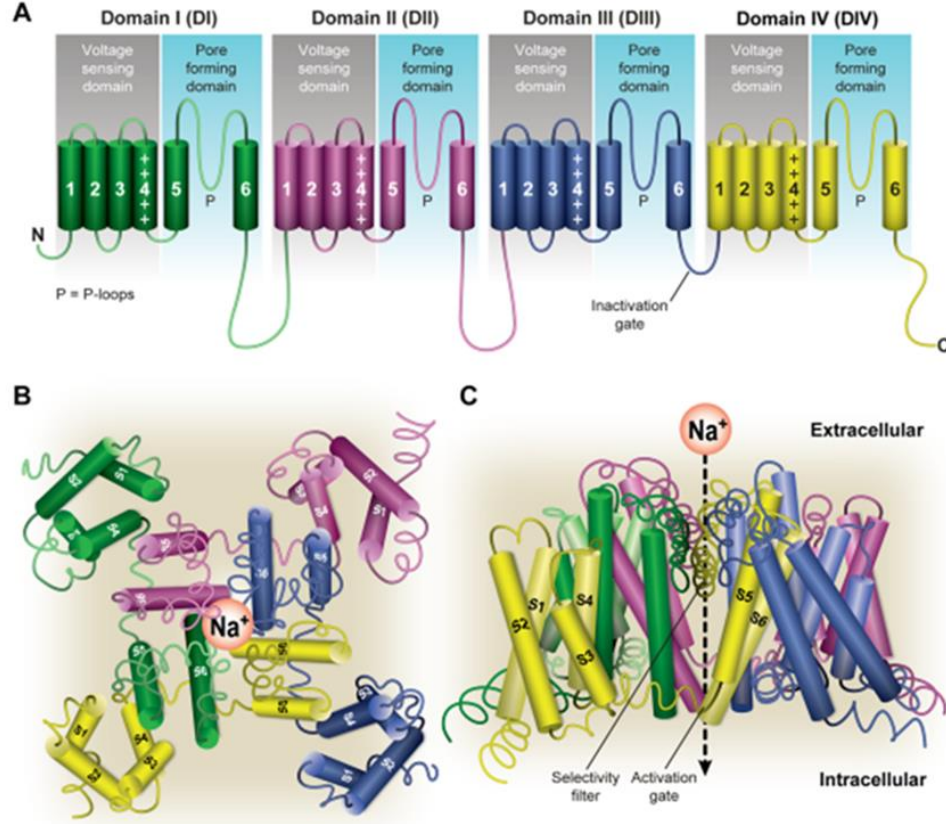
1990 larda kanser hücrelerinde bazı iyon kanallarının normalin dışında ekspresyon göstermeleri ve farmakolojik ajanlar ile bu kanalların bloke edilerek kanser hücrelerinin büyüme ve hareketlerinin engellenebileceğinin saptanması, kanserde iyon kanallarının

önemini ortaya koymuştur (Grimes v.d., 1995, Fraser v.d., 1999; Bennett v.d., 2004; Brackenbury v.d., 2007; Yıldırım v.d., 2012; Drifford v.d., 2014; Martin v.d., 2015; Mohammed v.d., 2016; Bagan v.d., 2019; Djamgoz v.d., 2019; Güzel v.d., 2019). Şekil 2.2’de verilen Hanahan ve Weinberg tarafından öne sürülen kanserin işaretlerinin de farklı iyon kanal patolojilerinden etkilendiğini gösteren pek çok çalışma sonucu, günümüzde kanser hastalığında etkili olan iyon kanalları onkokanalopatiler olarak adlandırılmaya başlamıştır (Preverskaya v.d., 2010, 2018).

2.5.1. VGSC

VGSC ler, 1952’de Hodgkin ve Huxley tarafından keşfedilen voltaj kapılı iyon kanalı alt grubudur ve bu ailede keşfedilen ilk iyon kanalıdır (Yu ve Catterall, 2003; Ruiz ve Kraus, 2015). VGSC; sinir, kas ve diğer kasılabilir hücrelerde membran depolarizasyonuna yanıt olarak aksiyon potansiyellerini başlatabilir ve yayabilir (Wise Chaisri v.d., 2020).

VGSC ler yapısal olarak 260 kDa por oluşturan büyük α alt birimi ile 30-40 kDa iki β alt biriminden oluşmaktadır. α alt birimleri, yaklaşık 2000 amino asit kalıntısından oluşan büyük, tek zincirli polipeptitlerdir. α alt biriminin oluşturduğu por psödotetramerik yapı oluşturmak üzere hücre içi bağlayıcılarla bağlanan dört homolog domain (DI- DIV), 2 si uzun loops, 1 si kısa loop olan üç hücre içi loops ile N-terminali ve C-terminalinden meydana gelir (Şekil 2.22 A ve B) (Ruiz ve Kraus, 2015; Wang v.d., 2017).



Şekil 2. 22. VGSC şeması (Ruiz ve Kraus, 2015).

Homolog dört alanın her biri, altı transmembran sarmaldan S1-S6 oluşmakta olup, α alt birimi, voltaj algılama alanı, por alanı, seçicilik filtresi, aktivasyon kapısı ve inaktivasyon kapısını kapsamaktadır. Her alandaki S1- S4 transmembran sarmal segmentler voltaj algılama alanını oluşturur. Bu segmentlerden S4 arjinin ve lizin kalıntıları içeren pozitif yüklü voltaj sensördür. Depolarizasyon ve repolarizasyona tepki olarak membran elektrik alanı boyunca hareket ederler ve porları açıp kapatmak için konformasyonel değişiklikleri başlatırlar. S4 ve S5 segmentleri arasındaki hücre içi bir bağlayıcı ile por alanına bağlanırlar. S5, S6 segmentleri, hücre dışı bağlantı por loopları ile arasındaki bağlanma yoluyla kanal, por ve seçicilik filtresini oluşturur (Şekil 2.22) (Ruiz ve Kraus, 2015; Wang v.d., 2017). Seçicilik filtresi benzer yüklere ve yarıçaplara sahip iyonları ayıran, porun en dar kısmıdır, DI'de aspartat, DII'de glutamat, DIII'de lizin ve DIV'de alaninden oluşur. Büzülme bölgesi de denilen bu kısım seçici olarak pordan hidratlı Na⁺ akışına izin vermektedir. Ayrıca glutamattan oluşan dış halka Na⁺ geçirgenliğinde önemli rol oynamaktadır. İnaktivasyon kapısı, hızlı inaktivasyon

sırasında kanal porlarını kapatan homolog alanlardan DIIS6 ve DIVS1'i birbirine bağlayan bir döngü tarafından gerçekleştirilir (Ruiz ve Kraus, 2015; Wisedchaisri v.d. 2019).

VGSC α alt birimi Na^+ iletimi ile ilgili gerekli tüm yapıyı oluştururken Na^+ kanalının kapılı kinetiğinin düzenlenmesi Na^+ kanallarının voltaj bağımlılığının düzenlenmesi, Na^+ kanal ifadesi ile hücrenin adezyon etkileşimlerinde rol alan β alt birimlerine bağlanır. Böylece hücre migrasyon ve agregasyonu düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Wang v.d., 2017). β alt birimleri temel olarak üç bölümden oluşur: bağımsız bir transmembran alan, küçük bir hücre içi C-ucu, ve büyük bir hücre dışı N-ucu. Memeli genomunda, beş β alt birim proteini ($\beta 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ ve $\beta 4$) kodlayan dört adet SCN1B, SCN2B, SCN3B ve SCN4B geni bulunur. $\beta 1$ geni 19q13 kromozomunda, $\beta 2$, $\beta 3$ genleri ise 11q22-23 kromozomunda yer almaktadır. $\beta 2$ veya $\beta 4$ alt birimleri, bir disülfid bağı yoluyla α alt birimine bağlanırken, $\beta 1$ ve $\beta 3$ alt birimleri, kovalent olmayan bir ilişki içerisinde (Yu ve Catterall, 2003; Ruiz ve Kraus, 2015; Wang v.d., 2017).

Hodgkin ve Huxley tarafından tanımlanan sodyum kanallarının voltaja bağlı aktivasyonu, hızlı inaktivasyon ve seçici iyon iletkenliği olmak üzere üç temel özelliği vardır. Hiperpolarize dinlenme durumunda açık olan sodyum kanallarının aktivasyonu çok düşüktür. Depolarizasyon sırasında, kanalların aktivasyonu, S4 segmentlerinin yüklü kalıntıları dışa doğru hareket ettiğinde meydana gelir, bu durum α alt biriminin konformasyonel değişikliklerini başlatır ve Na^+ seçici kanal porlarının açılmasında rol oynadığı bilinmektedir. Kanalin açılmasından milisaniyeler içinde sodyum kanalının inaktivasyonu gerçekleşir. Sodyum kanallarının, milisaniyeler içinde inaktive olan/kapanan transient/geçici kanallar olduğu bilinmektedir (Yu ve Catterall, 2003; Ruiz ve Kraus, 2015).

Uyarılabilen hücrelerde aksiyon potansiyelinin başlatılmasından sorumlu olan VGSC lerin α alt birimi amino asit dizilim benzerliğine bağlı olarak rakamlarla ifade edilen alt tipleri oluşturulmuştur. Kanalin geçirdiği iyonun kimyasal sembolu ve voltaj bağımlı olduğu Nav şeklinde gösterilmektedir. Daha sonraki rakam alt aile ve izoformuna (örn: Nav1.1) işaret etmektedir (Tablo 2.4). Aminoasit dizilimleri benzer olan Nav1.1den Nav1.9a kadar dokuz alt tip tanımlanmıştır. Bir de işlevsel olmayan alt tip Nax ile on

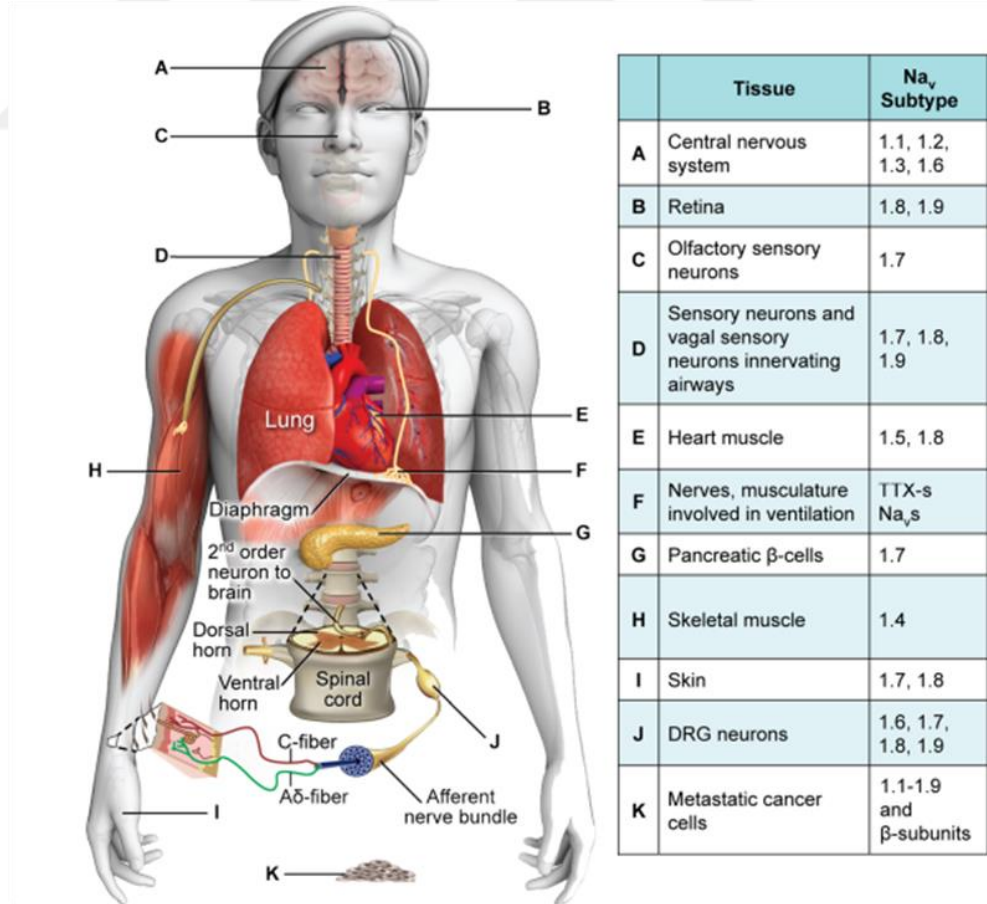
farklı α alt birim bulunmaktadır. İlk dokuz alt birim sırasıyla SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN4A, SCN5A, SCN8A, SCN9A, SCN10A ve SCN11A genleri tarafından kodlanmaktadır (Ruiz ve Kraus, 2015; Wisedchaisri v.d. 2019). Bunlardan Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 ve Nav1.7'yi kodlayan genler 2q23-24 kromozomunda yer alırken, Nav1.4 ve Nav1.6'yı kodlayan genler 17q23-25 ve 12q13 sırasıyla kromozomlarında bulunur. Bu altı kanal, yüksek oranda Na^+ kanal bloğuna sahip olan tetrodotoksine (TTX) karşı oldukça duyarlıdır (TTX-S). Nav1.5, Nav1.8 ve Nav1.9 kanalları, TTX'e değişen derecelerde dirençlidir (TTX-R) ve insanlarda 3p21-24 kromozomu üzerinde bulunan gen tarafından kodlanır. TTX-S olan VGSC α lar, düşük nM TTX konsantrasyonları tarafından inhibe edilir ve genellikle hızlı inaktivasyon kinetiğine sahiptir. Diğer taraftan, TTX-R VGSC α lar, TTX tarafından yalnızca μM konsantrasyonlarında inhibe edilir ve nispeten daha yavaş inaktivasyon kinetiği sergilerler. Ayrıca onuncu bir sodyum kanalı Nax geni, filogenetik olarak bu kromozom üzerindeki sodyum kanalları grubuyla yakından ilişkili olan insan kromozomu 2q23-24'ün sodyum kanallarının yakınında bulunmaktadır (Yu ve Catterall, 2003; Djamgoz ve Onkal, 2013; Catterall v.d., 2019).

Tablo 2. 4. İnsan sodyum kanallarının (NaCh) α ve β alt birimlerinin türleri, doku dağılımları ve TTX duyarlılık (Wood ve Iseppon, 2018).

Type	Gene	Expression pattern	TTX sensitive
Nav1.1	SCN1A	CNS and PNS	+
Nav1.2	SCN2A	CNS	+
Nav1.3	SCN3A	CNS and PNS	+
Nav1.4	SCN4A	Skeletal muscle	+
Nav1.5	SCN5A	Heart	-
Nav1.6	SCN8A	Nodes of Ranvier	+
Nav1.7	SCN9A	PNS and CNS	+
Nav1.8	SCN10A	Sensory Neurons	-
Nav1.9	SCN11A	PNS and CNS	-
Nax	Neuronal and non-neuronal tissues	SCN7A	

VGSC ler ve alt tipleri memeli ve memeli olmayan omurgalılar dahil olmak üzere farklı hayvan türlerinde tanımlanmıştır (Şekil 2.23) (Yu ve Catterall, 2003; Ruiz ve Kraus,

2015). Son yirmi yılda giderek artan sayıdaki çalışma ile elde edilen birçok in vitro ve in vivo kanıt VGSC'lerin, kanalopatik hastalıkların yanı sıra, metastatik kanserdeki rolünü de ortaya koymuştur. Kanser türleri ile ilişkisi, özellikle de zayıf metastatik hücreleri yüksek metastatik kanser hücreleri ile karşılaştıran deneylerde gösterilmiştir (Grimes vd., 1995; Fraser v.d., 1999; Fraser v.d., 2003; Bennet v.d., 2004; Diss v.d., 2005; Fraser v.d., 2005; Brackenbury & Djamgoz 2006; Yıldırım v.d., 2012; Djamgoz ve Onkal, 2013; Djamgoz v.d., 2019; Lastraioli v.d., 2021). Prostat, akciğer ve endometriyal kanserlerde ifade edilen Nav1.7, serviks kanserinde Nav1.6 ve meme, kolon ve ovaryum kanserinde Nav1.5 üzerinde yürütülen çalışmalarda bazı VGSC bloklarının etkileri de araştırılmıştır (Fraser v.d., 2003; Fraser v.d., 2005; Yang v.d., 2012; Djamgoz ve Onkal, 2013; Drifford v.d., 2014; Fairhurst v.d., 2014; Martin v.d., 2015; Nelson v.d., 2015; Bagan v.d., 2016; Mohammed v.d., 2016; Bagan v.d., 2019; Djamgoz v.d., 2019; Güzel v.d., 2019; Horne v.d., 2021).



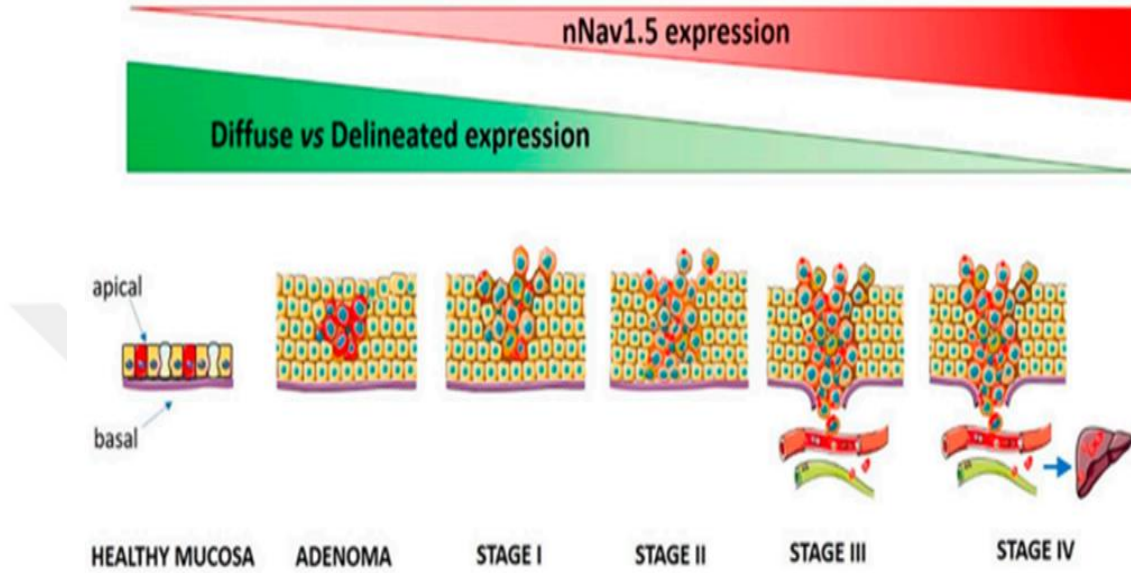
Şekil 2. 23. Dokular ve eksprese olan Nav alt tipleri (Ruiz ve Kraus, 2015).

2.5.2.Nav1.5 ve Kolon Kanseri

SCN5A tarafından kodlanan VGSC alt tipi Nav1.5, kalp dokusunda eksprese edilmektedir. Dahası Nav1.5 VGSC kalp hücrelerinde aksiyon potansiyelinin üretilmesinden sorumludur. Kanser hücrelerinde ise Nav1.5'in iki izoformu ile karşılaşılır. Bunlar aNav1.5 insan yetişkin izoformu ve nNav1.5 neonatal isoformudur. nNav1.5 alan-I'in S3 ve S4'ünde bulunan yedi amino asit bakımından aNav1.5 izoformundan farklıdır. Bu farklılıklar, embriyonik kanala aittir ve karşılaştırıldığında nNav1.5 kanal proteininin biyofiziksel özelliklerinde değişiklik göstermektedir. MDA-MB-231 metastatik meme kanseri hücrelerinde nNav1.5'in ekleme bölgeleri, erişkin insanların kalp hücrelerinde eksprese edilen aNav1.5'in ekleme bölgelerinden farklıdır. Bu yapısal farklılığın nNav1.5 kanalı içeren metastatik meme kanserinin ve kolon kanseri ve diğer kanser türleri için de terapötik hedef olarak iyi bir araç olabileceği ileri sürülmektedir (Horne v.d., 2021; Lopez-Charcas v.d., 2023). Bu hipotezin, kolon ve meme kanseri invazyonu ve metastazını engellemek için Nav1.5 VGSC blokerleri olan bazı ilaçların ve doğal bileşiklerin geliştirilmesine yol açabileceği bilinmektedir (Baptista-Hon v.d., 2014; Koltai v.d, 2015; Fraser v.d., 2016; Elajnaf v.d., 2018; Lopez-Charcas v.d., 2021).

Nav1.5'in CRC hücre hatlarında (SW620, HT29 ve SW480) yüksek düzeylerdeki ekspresyonu ilk olarak House ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur (House v.d., 2010). CRC'de çoğunlukla ifade edilen Nav1.5 alt tipi nNav1.5'tir. Sağlıklı mukozaya kıyasla kolorektal adenokarsinomda nNav1.5'in daha yoğun, yaygın ve farklı olduğunu ortaya koyan çok sayıda veri vardır. Şekil 2.24'te sağlıklı bir kolon epitelinin dördüncü aşama metastatik CRC ya ilerlemesi şematik olarak verilmiş ve fonksiyonel nNav1.5 proteinlerinin ekspresyonunun sağlıklı mukozada daha düşük seviyede iken, metastatik evrelerde en yüksek seviyeye ulaşmak üzere kanserin evresine bağlı olarak adım adım arttığı gösterilmiştir. Ayrıca nNav1.5'in hücresel dağılımındaki değişiklikleri göstermektedir. Kırmızı alanlar, fonksiyonel Nav1.5 proteininin artan ifadesini göstermekte ve yeşil alan ise, hücresel dağılımının yaygınlığının azaldığını tasvir etmektedir. nNav1.5 ifadesinin diğer CRC biyobelirteçleri olan hERG1, KCa3.1, VEGF-A, Glut-1 ve EGFR ile de ilişkili olduğu bilinmektedir. Elde edilen bu verilere göre

nNav1.5'in, CRC invazivliği için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Lastraioli v.d., 2021).



Şekil 2. 24. Sağlıklı kolon epitelinde metastatik CRC ye ilerlemede nNav1.5 ekspresyonu (Lastraioli v.d., 2021).

Lopez-Charcas v.d., 2023 yılında yayınladıkları makalelerinde CRC hücre hatları HCT116, HT29, SW480, SW620 ile kolon tümörü türevli birincil hücrelerde (CTDPC) Nav1.5 kanalının makroskopik Na^+ akımlarının üretilmesinden sorumlu ana izoform olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, SCN5A geni ekspresyon seviyeleri, kolorektal kanserin ilerlemesi ve invazivliği ile paralellik göstermektedir. Çalışmada ayrıca SW620 kanser hücrelerinde SCN5A geninin ekspresyon seviyelerinin, diğer hücre hatlarında bulunanlardan on kat kadar daha yüksek olduğu belirtilmiş ve bu proteinin ekspresyonunun esas olarak SW620 kolon kanseri hücrelerinin plazma zarında lokalize olduğunu da saptamışlardır. Ayrıca gen ekspresyonunun kolon tümörlerinin anatomik kökenlerine bağlı olduğu, sağ kolon tümörlerinde down regüle iken, sigmoid tümörlerde upregüle olduğu ifade edilmiştir (Lopez-Charcas v.d., 2023).

VGSC'lerin kanserin metastatik davranışındaki rolünü açıklayan birçok mekanizma önerilmiştir. İlk olarak, sodyum hidrojen değiştirici tip 1 (NHE1) aktivitesini artıran

VGSC'lerin yüksek ekspresyonu nedeniyle sodyum iyonu akışı meydana gelir. Böylece hücre içinde pH artışı ve hücre dışında pH azalması meydana gelir. Ayrıca hücre içinde Ca^{2+} konsantrasyonunda da bir artış görülür. Bunun nedeni: (1) voltaj kapılı kalsiyum kanallarından sodyum girmesi, (2) hızlı sodyum alımı nedeniyle mitokondriden kalsiyum salınımı ve (3) ters modda (hücre dışına sodyum ve hücre içine kalsiyum) çalışan sodyum kalsiyum değiştiricisinin (NCX) aktivitesindeki artışlardır. Ayrıca, VGSC'lerin aşırı ekspresyonu ve aktivitesi, bir sitoplazmik tirozin kinaz ailesi olan Src gibi bazı kinaz aktivitelerini arttırabilir. Src, aktin polimerizasyonunu kolaylaştırır. Tüm bu üç olay, hücre dışı matris bozulmasına ve kanser metastazında önemli bir rol oynayan aktin bakımından zengin yapı olan invadopodia ve podozomların oluşumuna ve aktivitesine neden olmaktadır (Horne v.d., 2021).

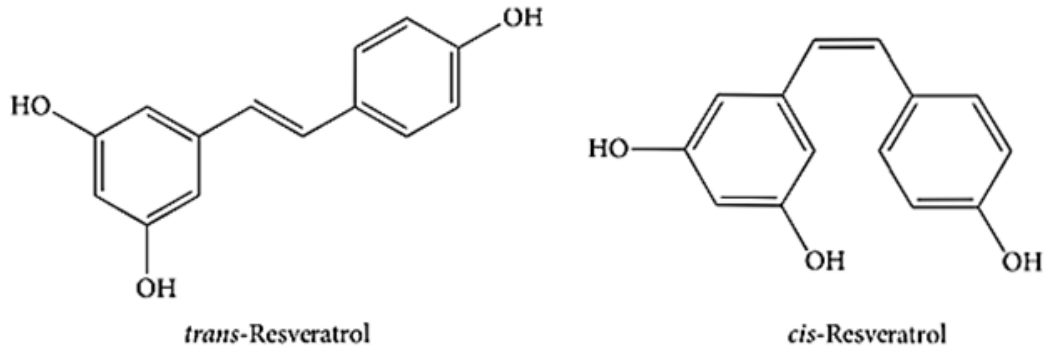
2.6. Resveratrol (RSV)

Resveratrol (RSV) (3,5,4'-trihidroksistilben), flavonoid olmayan bir polifenolik fitoaleksindir. Bitkilerde stilben sentaz enzimi yardımıyla çevresel koşullara tepki olarak üretilen bir stilbenoiddir. RSV ilk kez 1940 yılında Michio Takaoka tarafından beyaz karaca otunun (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) kökünden izole edilmiştir (Guerrero, 2009). 1992'de Siemann, fitoaleksinin olan RSV'nin kırmızı şarapta bulunduğunu tespit etmiştir. Daha sonra ileri sürülen "Fransız Paradoksu" teorisinde, Fransızların yüksek doymuş yağ diyeti kullanmasına ve sigara içme oranının çok yüksek olmasına rağmen, kardiyovasküler hastalıklarda düşük insidans ve mortalite oranların sahip olmasının nedeninin, fenoller açısından zengin, özellikle yüksek RSV konsantrasyonu olan kırmızı şarabın fazla tüketimi olduğu belirtilmiştir (Siemann 1992; Burr v.d., 1995). Jung ve arkadaşları (1997) RSV'nin kemo önleyici özelliklerini ilk kez keşfetmişler ve RSV'nin kanser progresyonunun başlama, gelişme ve ilerlemesinde rolünü göstermişlerdir. Buna ek olarak, RSV'nin antioksidan, antiinflamatuvar, antidiyabetik ve nöroprotektif aktiviteye sahip olduğu da kanıtlanmıştır (Baxter, 2008; Abdur Rauf v.d., 2017).

2.6.1. Resveratrolün Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

RSV iki halkadan oluşur. Bu halkalar, 3,4',5-trihidroksistilben üretmek için bir etilen bağı ile birbirine bağlanır. RSV'nin iki olası stereoizomeri vardır, cis ve trans-izoformlarıdır (Şekil 2.25). Trans-izoform (E) ana izoformdur, doğal olarak en kararlı olanı ve en çok çalışılan kimyasal formdur. Trans-resveratrol ısıya veya ultraviyole radyasyona maruz kaldığında, cis-izoforma (Z) dönüşmektedir (Soleas v.d.,1997: Figueiras v.d., 2011).

RSV, hücre zarını pasif olarak geçebilir ve hücrel mekanizmaları aktive etmek veya östrojen alfa ve beta reseptörleri gibi membran reseptörlerine bağlanmak için hücre içi moleküllerle etkileşime girebilir, bu durum da antioksidan aktiviteden sorumlu genlerin transkripsiyonuna yol açar. Bu nedenle de RSV fitoöstrojen olarak sınıflandırılmaktadır (Gambini v.d., 2015).



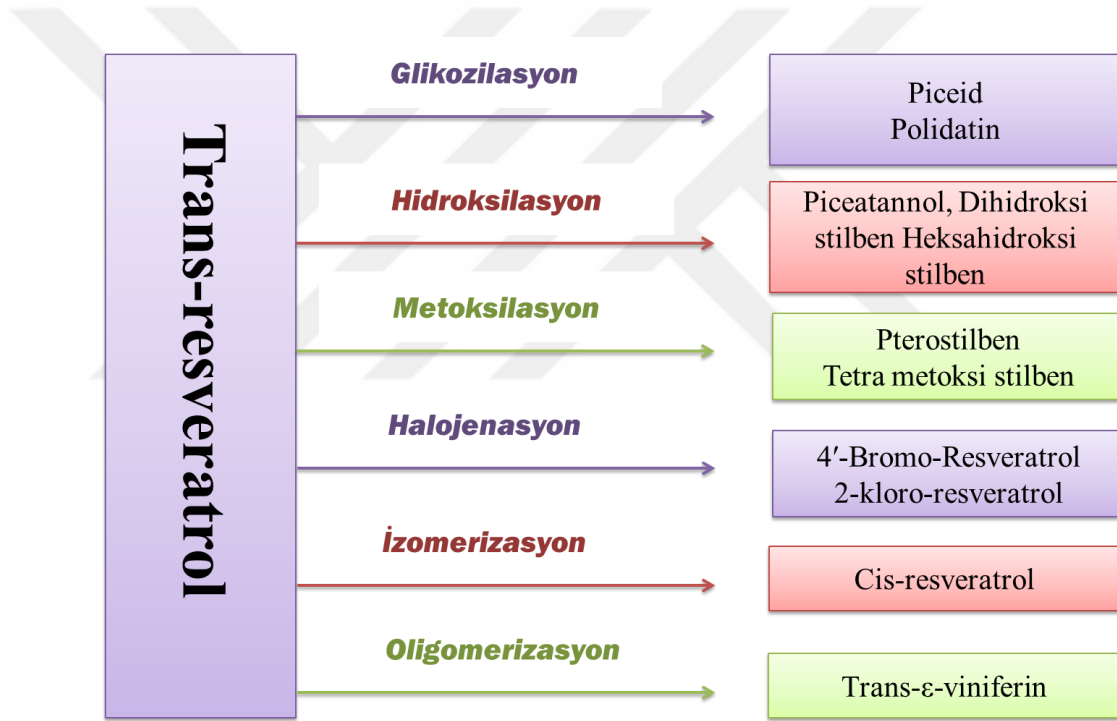
Şekil 2. 25. RSV'nin Stereoizomerleri (Gambini v.d., 2015).

2.6.2. Resveratrolün Türevleri

RSV, shikimate yolu ile sentezlenmektedir. Sentezi fenilalanin veya tirozinden başlatılabilir. Tirozinden RSV sentezi başladığında, iki enzim tirozin amonyak liyaz (TAL) ve 4-kumarat (4CL) tirozinin oluşum aşamalarını p-courmaroyl-CoA'ya katalize eder. Fenilalanin'den sentez başladığında fenilalanin amonyak liyaz (PAL) sinamik asit 4-hidroksilaz (C4H) ve 4-kumarat enzimlerinin aktivitesine ihtiyaç duymaktadır. P-

courmaroyl-CoA'nın trans-resveratrol'e dönüşümü, RSV sentezinde en önemli rolü oynayan stilben sentaz/resveratrol sentaz (STS) tarafından katalize etmektedir (Baek ve Hasan, 2013).

Trans-resveratrolün daha fazla modifikasyonu, farklı RSV türevlerinin üretilmesine neden olmaktadır (Şekil 2.26). RSV türevlerin üzerinde yapılan birçok denemeye göre, RSV türevlerinin biyoyararlanımı arttırdığını ve resveratrol ile karşılaştırılabilir veya hatta daha güçlü farmakolojik aktiviteler sunabileceği ortaya koymuştur (He ve Yan, 2013; Nawaz v.d.,2017; Arbo v.d., 2020).



Şekil 2. 26. Trans Resveratrolün Modifikasyonu.

2.6.2. Resveratrolün Biyoyararlanımı

RSV'nin kimyasal yapısı ve düşük biyoyararlanımı nedeniyle, sülfatlama ve glukuronidasyon yoluyla ince bağırsak enterosit hücrelerine absorbe ettikten sonra metabolizması başlatılmaktadır. Bazı RSV ve metabolitleri, bağırsak mikrobiyotası tarafından daha fazla metabolize edilmektedir. Diğer RSV ve RSV metabolitleri kan dolaşımına girerek lipoproteinler, hemoglobin ve albümin gibi kısımlara bağlanarak karaciğere ulaşır ve orada Faz II metabolizmasını gerçekleştirir. Ayrıca böbreğe giderek

orada polar RSV metabolitleri oluşmakta ve bir kısmı idrara geçmektedir (Springer ve MoCo, 2019).

RSV'nin düşük biyoyararlanımının, kararsızlığının ve çözünürlüğünün üstesinden gelmek için, araştırmacılar bu özellikleri geliştirmek, oral biyoyararlanımı artırmak ve hücrelere iletebilmek için farklı yöntemler araştırmışlardır. RSV, serum albümin, β -laktoglobulin, hemoglobin, fibrinojen ve LDL protein taşıyıcıları gibi (Urpí-Sardà v.d., 2005; Lu v.d., 2007; Pantusa v.d., 2014; Gligorijević v.d., 2020) ve emülsiyon bazlı sistemler, lipozom/noizom bazlı sistemler, inklüzyon kompleksi sistemleri ve biyopolimer partikül gibi kapsülleme teknolojisi sistemlerdir (Pardo ve McClements, 2014). Ayrıca enzim ve moleküllerin *Escherichia coli*, *Saccharomyces Cerevisiae* gibi mikrobiyal konakçılara indüklenmesi yoluyla daha fazla çözünmesi ve biyoyararlanımının artırılması yönünde denemeler yapılmıştır (Chimento v.d, 2019; Thapa v.d, 2019).

2.6.2. Doğada Resveratrol

RSV, 34 familyaya ait yaklaşık 100 bitki türünde farklı koşullara tepki olarak doğal şekilde üretilen bir fitoaleksine olarak yer alır. Genellikle mantar veya parazit enfeksiyonu gibi patojen enfeksiyonu nedeniyle üretilir. Ayrıca kesme, ezme, ultraviyole radyasyon, kimyasal maddeler, olumsuz hava koşulları gibi fiziksel zararlardan dolayı da üretilir (Buhrmann v.d., 2017).

RSV'nin en zengin kaynağı, "Hu Zhang" olarak da bilinen *Polygonum Cuspidatum* otunun kök ekstreleridir. Bu bitki, Çin ve Japonya'da geleneksel tedavide binlerce yıldır yaygın olarak kullanılmaktadır. Önce öksürük, hepatit, sarılık, adet görememe gibi birçok hastalığın tedavisinde daha sonra ise, kalp damar hastalıkları, iltihaplar, enfeksiyonlar ve sinir koruyucu olarak da uygulamışlardır (Zhang v. d., 2013).

RSV, taze üzüm, yer fıstığı, antep fıstığı, kakao içeren ve çikolata ürünleri, kızılçık, yaban mersini ve çilek türleri dahil olmak üzere birçok doğal üründe bulunmaktadır (Şekil 2.27) (Tokuşoglu v.d., 2005; Hurst v.d., 2008; Koushki v.d., 2018; Tian ve Liu, 2019). Kırmızı şarap, DNA'da mutasyonlara neden olmasına, birçok kanser türü ve

diğer hastalıklar için yüksek risk içermesine rağmen, yüksek oranda RSV, özellikle de trans-resveratrol içermektedir. Daha fazla RSV içeren diğer yiyeceklerin varlığına rağmen kırmızı şarap, hala en ünlüsüdür ve pek çok araştırmanın dikkatini çekmiştir (Geana v.d., 2015).



Şekil 2. 27. Bazı resveratrol kaynakları.

2.6.3. Resveratrolün Farmakolojik Etkileri

Fransız Paradoksunun ortaya çıkmasından sonra, RSV'nin kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki etkisine olan ilgi bilim adamları tarafından daha da artmıştır. RSV'nin hipertansiyon, ateroskleroz, iskemi/reperfüzyon ve kalp yetmezliği gibi birçok kardiyovasküler hastalık için terapötik stratejilerin geliştirilmesine yol açabilecek kardiyovasküler koruyucu bir kapasiteye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Das v.d.,2010; Petrovski v.d., 2011).

RSV, vazodilatasyon aktivitesinden sorumlu olan nitrik oksit (NO) biyoyararlanımını dolaylı olarak iyileştirir ve böylece kan basıncının yükselmesini önler. RSV, kolesterol sentezinden sorumlu enzim olan HMG-CoA redüktazın (HMGR) aşağı regülasyonu ile kolesterol seviyesini düşürür ve ox-LDL oluşumunu azaltır (Cho v.d., 2008). RSV ayrıca hücre içi ROS oluşumunu, LOX-1'in aşağı regülasyonunu inhibe ederek ve p38 MAPK sinyal yolunu bloke ederek makrofajların köpük hücrelere dönüşümünü de

engellemektedir (Guo v.d., 2014). RSV'nin interlökin (IL)-6 ve IL-8, PGE2, COX-2 ve matris metalloproteinaz-9 (MMP-9) gibi inflamasyonla ilgili bazı proteinleri düzenleyebileceği saptanmıştır (Scoditti vd, 2012; Wakabayashi ve Takeda, 2013). RSV dahil bazı polifenoller üzerinde yapılan çalışmalara göre bunlar VGSC'yi inhibe ederek kardiyoprotektif bir etki göstermektedir (Wallace v.d., 2006). 2020'de birçok analize RSV'nin kardiyovasküler hastalarda COVID-19'un hastalık şiddetini azaltmadaki aktivitesini bildirmiştir (Gligorijevic v.d., 2020).

RSV kan beyin bariyerini geçebildiğinden, nörodejeneratif bozukluklara karşı koruyucu veya engelleyici etkiye sahip olduğu saptanmıştır. RSV, Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalıkları, Amyotrofik Lateral Skleroz ve Epilepsi gibi farklı nörodejeneratif hastalıklarda etkinlik gösterir. RSV, Alzheimer hastalığında β -amiloid oluşumundaki yanlış katlanmış protein birikimini, Parkinson hastalığında ise lewy cisimciklerinin intrasitoplazmik birikimini ve Huntington hastalığında Huntingtin protein birikimini engelleyebileceği saptanmıştır. Ayrıca nörodejeneratif hastalıklarda görülen nöronal hücre ölümünü ve glial hücre inflamasyonunu önleyen antioksidan koruyucu bir aktivite gösterir. Bu koruyucu özelliğini, reaktif oksijen türlerinin (ROS) toksik aktivitesini veya nitrik oksit seviyelerini azaltarak gerçekleştirmektedir. RSV, sirtuin-1 (SIRT1), P53 ve glikojen sentaz kinaz 3 (GSK-3 β) ve inflamatuvar protein COX-2 gibi farklı protein ekspresyonunu değiştirerek mekanizmasını göstermektedir (Sun v.d., 2010; Tellone v.d., 2015).

RSV, farklı mekanizmalarla anti-obezite ve anti-diyabetik etkiye de sahiptir (Hoca v.d., 2021). RSV, yüksek kan şekeri seviyesini düşürebilir ve AMPK'yi aktive ederek hücreler tarafından alımını düzenler, pankreas β -hücrelerinin işlevini korur ve geliştirir, insülin seviyelerini ise SIRT-1'e bağlı bir şekilde düzenlemektedir. Ayrıca kolesterol ve vücuttaki yağ birikimini azaltabilir (Thadhani, 2019). RSV'nin diyabetin neden olduğu retinopati gelişimini azaltabileceği veya engelleyebileceği ortaya konmuştur (Nanjan ve Betz, 2014).

DNA hasarı, mutasyonlar, oksidatif stres ve protein birikimi, apoptoz, mitokondriyal hasar ve iltihaplanma gibi yaşlanmaya yol açan birçok faktör yaşlanmaya bağlı nörodejeneratif, kardiyovasküler, sarkopeni, osteoporoz ve infiltrasyon gibi hastalıkların

ortaya çıkmasına neden olmaktadır. (Pyo v.d., 2020). Hayvanlarda SIRT1 veya mayalarda veya diğerlerinde Sirt1'in, yaşlanma sürecini düzenlemek ve azaltmak için RSV tarafından aktive edilebilen büyük bir molekül olduğu kanıtlanmıştır. Ancak RSV'nin yaşlanma karşıtı olarak etki mekanizmaları çok karmaşıktır, çünkü AMPK gibi diğer yolları da aktive etmektedir (Kala v.d., 2012; Zhou v.d., 2021).

RSV'nin pro-oksidan ve antioksidan aktivitesi, ROS veya bakır gibi metal şelatlama ajanlarının neden olduğu DNA parçalanmasını engelleyerek kanserin başlamasını önlediği belirlenmiştir (Fukuhara v.d., 2005; Lastra v.d., 2007). RSV, ROS'u 1. antioksidan enzimlerin seviyelerini artırarak (Martinez ve Moreno, 2000; Yen v.d., 2003), 2. Lipid peroksidasyonunu inhibe ederek (Lastra v.d., 2007), 3. veya oksidoredüktaz enzimi kinon redüktaz 2'nin (QR2) doğrudan inhibisyonu ile olmak üzere üç mekanizma ile inhibe etmektedir (John v.d., 2014).

2.6.4. Resveratrol ve Kanser

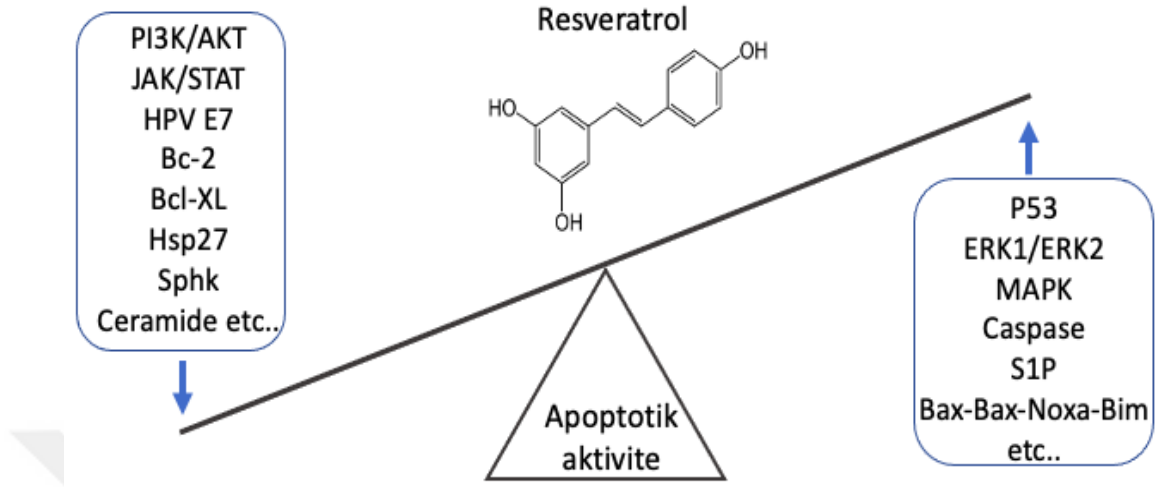
RSV'nin kemo önleyici etkisinin 1997 yılında ilk keşfedilmesinden sonra, araştırmacılar RSV'nin kemo önleyici doğal bir bileşik olarak kabul edilen yöntemler veya yollarını anlamaya çalışmışlardır. Pek çok araştırmayla, RSV'nin antioksidan, antiapoptotik ve anti-metastatik aktiviteye sahip olması, RSV'nin kemo önleyici önemli doğal bileşik olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır.

RSV apoptoz üzerinde yaptığı etki sonucu kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederek, anti-tümöral bir aktivite göstermektedir. Meme, kolon, prostat, pankreas, akciğer, ovaryum, mide, glial, deri, kan ve kemik iliği dahil olmak üzere pek çok kanserde apoptozu indüklediği kanıtlanmıştır (Ding ve Adrian, 2002; Garvin v.d., 2006; Shimizu v.d., 2006; Harper v.d., 2007; Juan v.d., 2008; Wu v.d., 2014; Zulueta v.d., 2015; Sinha v.d., 2016; Yousef v.d., 2017; Liu v.d., 2018; Chen v.d., 2019; Huang v.d., 2019). RSV bazı proteinleri aktive ederek veya inhibe ederek apoptotik aktiviteyi indüklemektedir (Şekil 2.28). Hücre siklusunu durdurarak veya apoptoz yoluyla kanser hücredeki proliferasyonunu inhibe eden, tümör baskılayıcı protein P53, RSV için önemli bir hedeftir. RSV, P53'ü integrine bağlanarak veya mitojenle aktive olan protein kinazı

(MAPK ve ERK 1/2) aktive ederek aktive edebilir. Daha sonra P53, bağımlı veya bağımsız mekanizmalarla apoptozu indükleyebilir. Bu, apoptoz ile ilgili genlerin aktivasyonları doğrudan veya anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerle etkileşim yoluyla yapılır. CRC hücre hatlarında yapılan çalışmada meydana geldiği gibi, RSV, sırasıyla Bcl2 ile ilişkili X, apoptoz düzenleyici (BAX) ve Bcl2 bağlayıcı bileşen 3 (PUMA) dahil olmak üzere apoptozu indükleyen P53'ü indüklediği saptanmıştır (Zhang v.d, 2004; Lin v.d., 2011; Ferraz da Costa v.d., 2017; Ferraz da Costa v.d., 2018; Liu v.d., 2019).

Ayrıca, BCL-2 ailesi proteinlerinin düzenlenmesi, RSV'nin apoptozu indüklemek için yaptığı mekanizmalardan biridir. İzole edilmiş kolorektal anormal kript odaklarında gösterildiği gibi RSV, BCL-2 ailesi proteininden Bax birinin ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır (Tessitore v.d., 2000). Prostat kanserinde Bax, Bak, Noxa ve Bim gibi BCL-2 ailesi pro apoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığını kanıtlanmıştır (Shankar v.d., 2007). RSV'nin insan prostat karsinomu (LNCaP) hücre hatlarında, diğerlerinde olduğu gibi apoptozun inhibisyonunda önemli bir rol oynayan fosfatidilinositol 3'-kinaz (PI3K/AKT) yolunun inhibisyonu yoluyla apoptozu indüklediği de tesbit edilmiştir (Aziz v.d., 2006). Ayrıca RSV, JAK/STAT fosforilasyonunu inhibe ederek mitokondriyal hücre ölüm yolunu indüklemiş ve böylece deri ve osteosarkom kanser hücrelerinde JAK/STAT hedef genlerinin transkripsiyonunu bloke etmiştir (Madan v.d, 2008; Peng ve Jiang, 2018).

RSV'nin, G1/S fazında hücre döngüsünün durmasını desteklediği ve HPV E6 ve HPV E7 proteinlerinin Hela serviks kanseri hücre hatlarında ve in vivo olarak farelerdeki ksenograftlarda ekspresyonu inhibe ederek apoptozu indüklediği ortaya konmuştur (Sun v.d., 2021). RSV, pro apoptotik proteinlerin düzenlenmesine ek olarak, Bcl2 ve Bcl-XL gibi anti apoptotik proteinlerin aşağı regülasyonunu da uyarır (Shankar v.d., 2007). Meme kanserinde ısı şoku proteini (Hsp27) anti-apoptotik aktiviteye, ilaç direncine ve tümör hücresi proliferasyonuna sahiptir. RSV, Hsp27 ekspresyonunu inhibe eder ve RSV'nin Hsp27 siRNA (Small interfering (si)RNA-aracılı susturma) ile kombinasyonu ayrıca kaspaz 3-bağımlı yol ile apoptozu indükleyebilmektedir (Uçar ve Şengelen; 2019).



Şekil 2. 28. RSV'nin apoptotik aktivitesi.

Tian ve Yu (2015), RSV'nin; K562 insan lösemi hücrelerinin proliferasyon ve apoptoz süreçlerinde rol alan hücre membranındaki sfingolipid metabolit ve kinazlarından sfingosin kinaz 1 (SphK1) ve sfingosin-1-fosfat (S1P) ve seramid seviyelerini düzenleyerek, apoptozun artmasını sağladığı ve kanser tedavisi için umut verici bir bileşik olduğunu belirtmiştir.

İn vivo çalışmalarla ilgili olarak, RSV anti proliferatif ve apoptotik aktivitesini incelemek üzere hayvanlarda birçok çalışma yapılmıştır (Carter v.d., 2014). Meme kanserli sıçanlara günlük 100 mg RSV verilmesi, hücre proliferasyonunda azalma ve apoptotik aktivitede artış göstermektedir (Chatterjee v.d., 2011). Karaciğer kanserinde, yüksek RSV ile tedavi edilen hayvanlarda, RSV apoptotik aktivitesini, Bax ekspresyonunu artırarak ve Bcl2 ekspresyonunu azaltarak ortaya koyar (Bishyee ve Dhir, 2009). İnsanlarda RSV'nin anti proliferatif aktivitesini inceleyen birkaç klinik çalışma bulunmaktadır. Ancak RSV'nin biyoyararlanımının düşük olması nedeniyle, bu klinik çalışmalar RSV'nin kanser önleyici tedavi olarak kullanılmasının yeterli olmadığını belirtmektedir (Ko v.d., 2017).

RSV, PI3K/AKT, MEK/ERK, WNT/ β -katenin, TGF- β 1/Smad, AKT/GSK-3 β /Snail benzeri yollardaki faktörleri, proteinleri ve enzimleri düzenleyerek EMT'yi inhibe

etmektedir (Ji v.d., 2015; Kim v.d.,2016; Cilibrasi v.d., 2017; Zhao v.d., 2018; Yuan v.d, 2019).

RSV tedavisi, EMT ile ilişkili bir belirteç olan β -katenin, vimentin ve fibronektin ekspresyonunu indükleyebilir ve bir epitel hücre adezyon molekülü olan E-cadherin ekspresyonunu baskılayabilir. Bunun, doksorubisine dirençli mide kanseri ve akciğer kanseri dahil olmak üzere birçok kanserde meydana geldiği gösterilmiştir (Wang v.d., 2013; Xu v.d., 2017). MDA-MB-231 insan meme ve A549 akciğer kanserinde, RSV tarafından dönüştürücü büyüme faktörü TCF- β 'nın inhibisyonu, EMT'yi indükleyen transkripsiyon faktörlerini Snail ve Slug ekspresyonunu inhibe ettiğini saptanmıştır (Wang v.d., 2013; Sun v.d., 2019). Ayrıca RSV'nin, ovaryum kanseri hücrelerinde Snail ekspresyonunun aşağı düzenlenmesine yol açan MAPK/Erk yolunun düzenlenmesi yoluyla sisplatin kaynaklı EMT'yi inhibe ettiğini göstermiştir (Baribeau v.d., 2014).

RSV farklı kanser türlerinde farklı proteinlerin ekspresyonunu düzenleyerek hücrelerin invazyon ve metastazını engelleyebileceği düşünülmektedir (Tang v.d., 2008; Wu, 2008; Sheth v.d, 2012; Ji v.d., 2013; Yeh v.d., 2013; Bai v.d., 2016; Buhraman v.d., 2017). RSV, prostat kanserinde Akt/MicroRNA-21 yolu gibi farklı yolları düzenleyerek veya hepatoselüler karsinomda SP-1 transkripsiyon faktörünü modüle ederek metastazı ve invazyonu düzenleyebileceği ifade edilmiştir (Sheth v.d, 2012; Yeh v.d., 2013). İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), ER-negatif insan meme kanseri hücrelerinde düşük düzeyde eksprese olmasına rağmen, PI-3K/Akt sinyal yolunu düzenleyebilir ve migrasyonu indükleyebilir. RSV, meme kanserinde IGF-1 aracılı hücre migrasyonu inhibe ettiğini göstermiştir (Tang v.d., 2008). T24 mesane kanseri hücrelerinde RSV, migrasyon ve invazyonun inhibisyonu ile anti-metastatik aktivite gösterir. Bu, MAPK (JNK ve ERK) fosforilasyonunun inhibisyonu ve dolayısıyla MMP-2 ve MMP-9'un doza bağlı bir şekilde inhibisyonu ile gerçekleşir (Bai v.d., 2016). Metastaz ile ilişkili olarak Akciğer Adenokarsinom Transkripsiyon 1 (RNA-MALAT1) CRC gibi metastatik kanserlerde aşırı eksprese edilmektedir. RSV (50 uM) ile MALAT1 inhibisyonu, invazyon ve metastazları düzenleyen başka bir protein olan β -katenin nükleer translokasyonunu inhibe ettiği gösterdi. Böylece β -katenin akış aşağı hedef genleri C-Myc ve MMP-7'nin ekspresyonunu inhibe eder (Ji v.d., 2013). Buhraman v.d. (2017),

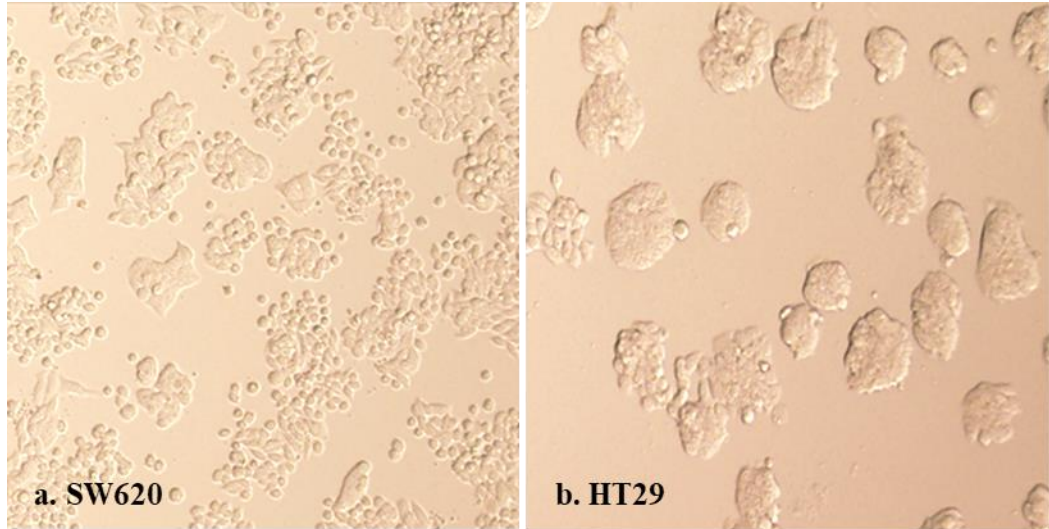
apoptozu, anti-proliferatif aktivitesi ve bazı hücre sinyal yolları üzerine RSV nin etkisi pek çok araştırma ile değerlerindirilmiştir. Literatürde, kanser hücrelerinde ekspresyonu yüksek olan VGSC ler, özellikle de metastatik aktivite üzerine RSV etkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. VGSC lerden Nav1.7 nin aşırı eksprese edildiği yüksek metastatik Mat-LyLu prostat kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada RSV, hücrelerin HCT116 ve SW480 kolon kanseri hücrelerinde RSV, fokal adezyon molekülü FAK, NF- κ B ve bağımlı gen ürünlerini inhibe ederek hücre invazyonu, metastazı ve apoptozu inhibe edebileceğini saptamıştır. Hipoksi ile indüklenen faktör-1 (HIF-1), hipoksi altındaki hücrelerde anjiyogenez, invazyon ve metastazda rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. RSV, kolon kanseri hücrelerinde hipoksi ile indüklenen metastazda HIF-1 ve regüle edilmiş genlerini (VEGF ve MMP-9) inhibe etmiştir (Wu, 2008).

Kanser hücrelerinin apoptozu, anti-proliferatif aktivitesi ve bazı hücre sinyal yolları üzerine RSV nin etkisi pek çok araştırma ile değerlerindirilmiştir. Literatürde, kanser hücrelerinde ekspresyonu yüksek olan VGSC ler, özellikle de metastatik aktivite üzerine RSV etkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. VGSC lerden Nav1.7 nin aşırı eksprese edildiği yüksek metastatik Mat-LyLu prostat kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada RSV, hücrelerin lateral ve transvers hareketlerini inhibe ederek, hücrenin migrasyon ve invazyonunu baskıladığı saptanmıştır (Fraser v.d., 2014).

3. MALZEME VE YÖNTEMLER

3.1. CRC Hücre Hatları ve Yetiştirilmesi

Çalışmada iki farklı CRC hücresi kullanmış olup, bunlardan SW620 hücreleri kolorektal adenokarsinomali bir erkek hastanın metastatik lenf nodundan (Dukes tip C) elde edilmiştir. Diğer hücre hattı ise, kolorektal adenokarsinomaya sahip kadın hastadan çıkarılan I. evre primer tümörden elde edilen HT29 hücreleridir. Yüksek metastatik özellikteki SW620 kolon kanseri hücre hattı (Şekil 3.1), Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarından ve düşük metastatik özellikteki HT29 kolon kanseri hücre hattı ise, İstinye Üniversitesi Kanser Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (Şekil 3.1) getirilmiştir. Her iki hücre hattı da 37°C de % 5 CO₂, ve % 95 nem içeren inkübatörde optimal kültür koşulları altında % 10 FBS ve % 1 L-glutamin ile desteklenmiş RPMI 1640 medyum (Capricorn) içeren petrilere yetiştirmiştir (Gao v.d, 2015; Clerici v.d., 2021).



Şekil 3. 1. Yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 kolon kanseri hücreleri (10x)

3.2. Farmakolojik Ajanların Hazırlanması

RSV (Sigma) satın alındıktan sonra, hücreler üzerindeki toksisitesi de dikkate alınarak 1ml dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 100 mM RSV hazırlanmıştır. RSV stok çözelti stabilitesini korumak üzere -21°C'de saklanmış ve deney esnasında kullanımdan hemen önce taze olarak medyum ile istenilen 0,5 µM ve 1 µM RSV konsantrasyonlarına seyreltilerek kullanılmıştır.

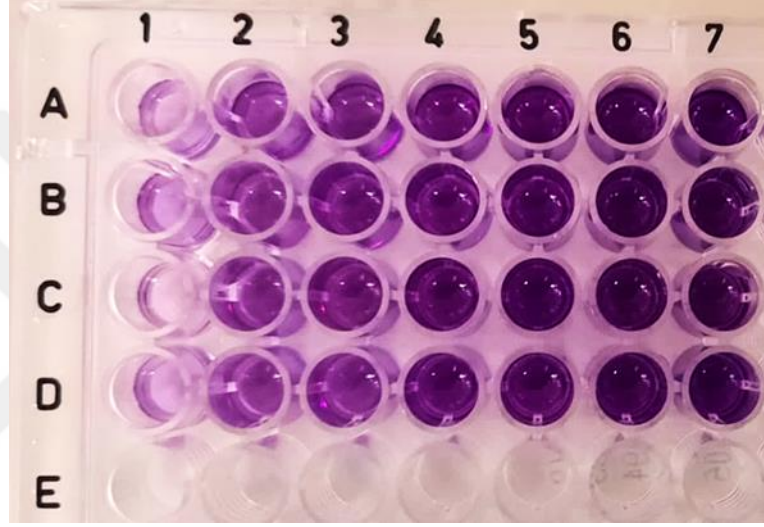
RSV, DMSO da çözündüğü için deneylerde kontrol grubunun yanı sıra bir de negatif kontrol olarak DMSO grubu yer almıştır. En yüksek konsantrasyon olan 300 µM RSV % 0,3 DMSO içermektedir ve bu miktar deneylerde negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Spesifik VGSC blokeri olan TTX hücrelerin migrasyon ve invazyonları üzerindeki bloke edici etkisini saptamak üzere çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Yıldırım v.d., 2012). Toz halde satın alınan 1 mg TTX (Alomone labs) 1 ml distile su içinde çözülerek 3mM stok solusyon elde edilmiştir. Hazırlanan TTX stok çözeltisi, stabilitesini korumak için küçük miktarlara bölünerek kullanılıncaya kadar -21°C'de saklanmıştır.

3.3. Hücre Büyüme Analizi

Hücrelerin büyüme eğrilerinin ortaya konulması için, SW620 ve HT29 hücreleri ile büyüme deneyi yapılmıştır. Büyüme deneyinde MTT yöntemi kullanılmış. 96 kuyucuklu hücre kültür pleyti kullanılmış ve her kuyucuğa 2×10^3 , 4×10^3 , 6×10^3 , 8×10^3 , 10×10^3 , 12×10^3 ve 14×10^3 hücre olmak üzere farklı sayıda hücre ekilmiştir. Yukarıda özellikleri açıklanan kültür medyumları eklenmiştir. Medyumlar her 24 saatte değiştirilmiştir. SW620 ve HT29 hücrelerinin 24. ve 48. saattaki büyümelerini saptamak üzere MTT yöntemi kullanılmış, pleytin kuyucuklarındaki medyumlar çıkarılarak, 3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) eklenmiş ve pleytler dört saat karanlıkta tutulmuştur. Bu süre esnasında sarı renkli tetrazolyum tuzu canlı hücrelerin mitokondri aktivitesi sonucunda, mor renkli formazan kristallerini oluşturmuştur. Dört saat sonra MTT çıkarılarak kuyucuklara organik çözücü olarak DMSO ve glisin

eklenmiştir. Canlı hücre sayısına paralel olarak oluşan mor formazan kristalleri organik çözücü DMSO ve glisin eklenmesi ile pembe-mor renk meydana gelmiştir (Şekil 3.2). Tüm kuyucuklar, bir mikropipetle absorban okuyucusunda (iMark™ BioRad) 570 nm dalga boyunda okunmuştur. Her hücre hattı için deney minimum üç kez tekrarlanmış ve elde edilen absorban değerlerinden hücre sayısı ile zamana bağlı olarak büyüme grafiği çizilmiştir.



Şekil 3. 2. DMSO ve glisin ilave edildikten sonra absorbanı ölçülecek hücre pleyti.

3.4. Toksisite

Kullanılan farmakolojik ajan, RSV'nin SW620 ve HT29 hücreleri üzerinde toksik etkisi olup olmadığını belirlemek üzere tripan mavisi yöntemi kullanılmıştır. Toksisite deneyi için altı kuyucuklu hücre kültürü pleytlerine kuyucuk başına 3×10^4 hücre ekilmiştir. Kültür medyumunu ile gece boyunca 37°C sıcaklıktaki % 5 CO_2 inkübatörde tutulmuştur. 24 saatte hücreler invert mikroskopta kontrol edildikten sonra kontrol grubu için hücrelere kültür medyumunu, deney gruplarına ise, $1 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ ve $100 \mu\text{M}$ RSV ile negatif kontrol olarak, DMSO içeren kültür medyumunu uygulanmıştır. Bundan sonraki her 24 saatte medyum değiştirilmiş ve 48 saatlik RSV uygulamasından sonra medyum kuyucuklardan çıkarılmış ve 0.2 ml tripan mavisi 0.8 ml kültür medyumunu ile 10 dakika bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra petrilerdeki tripan mavisi atılmış ve FBS içermeyen taze kültür medyum eklenmiştir. 40x objektifte invert mikroskop kullanarak,

40 alandaki mavi renkli ölü hücreler ile boyanmamış canlı hücreler sayılmıştır. Her hücre hattı için deneyler üç paralel olarak yürütülmüş ve ölü hücre yüzdesi hesaplanarak grafik çizilmiştir.

3.5. Hücre Proliferasyonu

Farmakolojik ajan olarak kullanılan RSV'nin kolon kanseri yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 hücre hatlarının proliferasyonu üzerindeki etkisi MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla, 96 kuyucuklu kültür pleytlerinin her kuyucuğuna 2×10^4 hücre ekmiştir. Kontrol grubuna kültür medyumunu, negatif kontrol grubu için DMSO ve deney gruplarına ise, 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M RSV konsantrasyonları içeren medyumlar eklenmiştir. 24. ve 48. saatlerde hücre proliferasyonunu saptamak amacıyla, her kuyucuktaki medyum çıkarılarak MTT solusyonu konulmuştur. 37°C de dört saatlik inkübasyon sonrasında MTT çıkarılarak DMSO ve glisin tamponu ilave edilmiştir. DMSO eklenmesi sonrasında oluşan boya absorbansı mikropilaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Proliferasyon deneylerinde her grup için 4 kuyucuk kullanmış ve deneyler minimum üç tekrarlı olarak yürütülmüştür. Kontrol grubundan elde edilen değerler bir (1) kabul edilerek deney grupları normalize edilmiştir. İki farklı özellikteki kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine RSV'nin etkisi 24. ve 48. saatlerde değerlendirilmiş, elde edilen sonuçlar kontrole oranla hesaplanmış. $\pm$ SE ile birlikte grafik haline getirilmiştir.

3.6. Apoptoz Analizi

RSV'nin yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 kolon kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin belirlenmesi için, Annexin V-FITC Apoptoz Tespit Kiti kullanılmıştır. Annexin V-FITC Kiti, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde kullanılarak akış sitometrisi ile hücre zarının dış katmanındaki fosfatidilserin saptanmıştır. Kit içerisinde ayrıca, degra edilmiş zara giren nükleus ve kromozomu karşı boyayan propidyum iyodür (PI) bulunmaktadır. 10×10^4 hücre altı kuyucuklu pleytlere

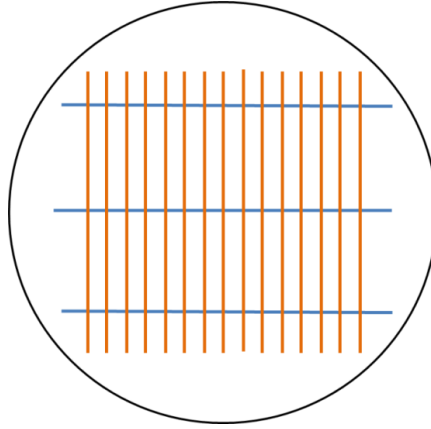
ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. 24 ve 48 saatlerde kontrol grubu kültür medyumunu ile değiştirilmiş, deney grupları ise, 0,5 μ M ve 1 μ M RSV uygulanmıştır. 48 saat sonrasında hücreler tripsin EDTA ile toplanıp 2500 x g'de santrüfj edilmiştir. PBS ile yıkandıktan sonra 200 μ L bağlama tamponu (1 $\times$) içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. 5 μ L Anneksin V-FITC eklenerek pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 15 dakikalık karanlıkta inkübasyondan sonra hücrelere 5 μ L propidium iyodür eklenmiştir. Apoptotik sonuçlar FACS (BD Accuri TM) analizi ile gerçekleştirilmiş ve grafikler çizilmiştir. Her hücre hattı için deney üç kez tekrarlanmıştır.

3.7. Koloni Oluşumu

Yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 hücre hatlarının koloni oluşumları üzerine RSV'nin etkisi, koloni oluşum testi ile değerlendirilmiştir. Koloni oluşum testinde altılı hücre kültür pleyti kullanılmış ve kuyucuk başına 400 hücre ekmiştir. Kültür medyum ile gece boyunca inkübatörde inkübe edilmiştir. 24. ve 48. saatlerde kontrol grubu kültür medyumunu ile deney grupları ise, 0,5 μ M , 1 μ M RSV ile, pozitif kontrol olan TTX grubu da 600 nM TTX içeren medyum ile değiştirilmiştir. 48 saatte tüm gruptaki medyumlar çıkarılarak normal kültür medyumunu eklenmiştir. Tüm gruptaki hücreler büyümeye bırakılmış ve her dört günde bir normal kültür medyumunu ile hücrelerin taze medyum alması sağlanmıştır. 15 gün sonunda tüm medyumlar çıkarılarak hücreler PBS ile yıkanmıştır. Koloni oluşturan hücreler 5 dakika boyunca metanol/asetik asit (3/1) ile tesbit edilmiştir. Metanol/asetik asit çıkarıldıktan sonra %0.5 kristal viyole ile 15 dakika boyanmıştır. Distile su ile yıkanıp, oda sıcaklığında kuruyuncaya kadar beklenmiş ve karanlıkta saklanmıştır. İnvert mikroskop kullanılarak rastgele 40 alandaki koloni sayısı tespit edilerek grafikleri çizilmiştir. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

3.8.Lateral Hareket /Hücre Migrasyonu (Motilite)

Yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 kolon kanseri hücre hatlarının lateral hareketini (migrasyon) in vitro olarak incelemek üzere “wound healing” yara iyileşme deneyi uygulanmıştır (Fraser v.d., 2003). Deney öncesinde 35 mm’lik petrilerin alt kısmına üç paralel çizgi, ardından bu üç çizgiye dik 15 paralel çizgi çizilerek (Şekil 3.3), her bir petriye 65×10^5 hücre ekilmiştir. Tüm gruplardaki hücrelere normal kültür medyumunu ilave edilmiştir. Normal kültür medyumunun eklenmesinden 24 saat sonra steril pipet ucu yardım ile üç çizginin bulunduğu yerde "yara" açılmıştır. Çizgilerin kesiştiği noktalardaki yara genişlikleri, invert mikroskopta mikrometrik oküler ile ölçülerek, 0. saatteki yara genişliği (W0) kaydedilmiştir. Petrilere kontrol, pozitif kontrol olarak TTX ile 0,5 μ M ve 1 μ M RSV medyumları taze şekilde ilave edilerek, 24. ve 48. Saatlerdeki yara genişliği (Wt) yeniden ölçülmüş ve medyumları değiştirilmiştir. Elde edilen değerler $MI = 1 - (Wt - W0)$ formülünde yerine konularak migrasyon indeksi (motilite indeksi=MI) hesaplanmıştır. (W0, 0. saatteki yara genişliği; Wt ise, 24. veya 48. saatlerdeki yara genişliği) (Fraser v.d, 2003). Her grup için üç petri kullanılmıştır ve deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır.

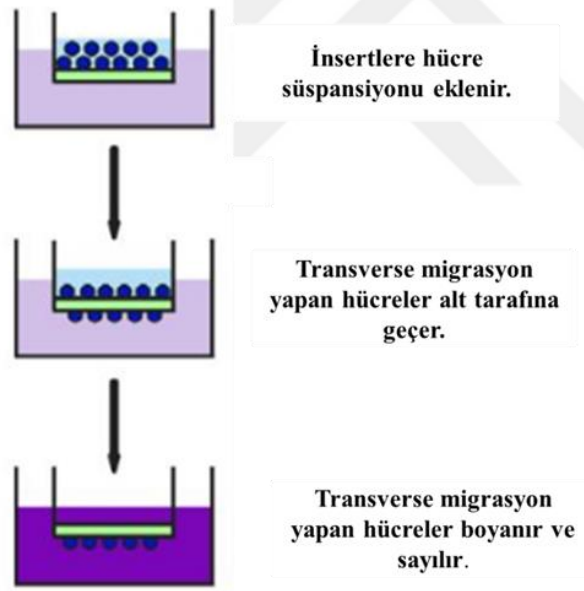


Şekil 3. 3. Lateral hücre hareketi migrasyon indeksi için petrinin alt yüzüne yapılan çizim.

3.9.Transverse Migrasyon ile İnvazyonu

Yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 hücrelerin bazal membrandan invaze olma kapasitelerinin yani hücrenin transverse hareketinin değerlendirilmesi için,

kontrol, TTX , 0,5 μM ve 1 μM RSV için plate içerisine yerleştirilen steril insertlere, medyum ile 1/8 oranında dilüe edilmiş +4 °C'deki matrigel konulmuştur. 37 °C'de gece boyunca beklenmiştir. Daha sonra insertler L-glutaminli serumsuz soğuk medyumla 6 saat rehidratasyon yapılmıştır. Her inserte 4×10^4 hücre ekilmiş ve hücrelerin hareketi için serum gradienti (insert % 0.1, pleyt ise % 1 serum içeren medyum ile) oluşturulmuştur (Şekil 3.4). 48 saat sonra medyumlar çıkarılmıştır, insertlerin içi pamuklu çubuk yardımı ile dikkatlice temizlenmiş ve -4°C'de olan metanol ile 15 dakika fikse edilmiştir. Kristal viyole ile 15 dakika boyandıktan sonra, invert mikroskopta 40× objektif ile insert başına 12 alanda hücre sayımı yapılmış ve gruplar arası farklar hesaplanmıştır (Fraser, v.d., 2016; Xu v.d, 2017; Rizaner v.d., 2020). Her deney grubu için minimum üç insert kullanılmış ve deney üç kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3. 4. Transverse migrasyon protokolu.

3.10. İstatistiksel Analiz

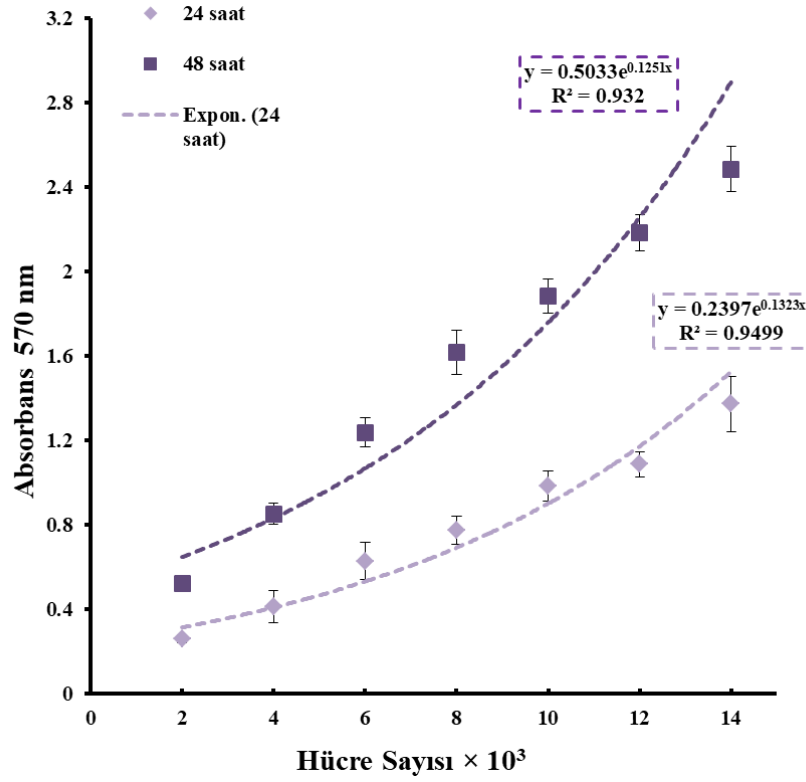
Tüm deneylerden elde edilen veriler, grupların aritmetik ortalamaları ve her bir ortamaya ait standart hata ($\pm\text{SE}$) şeklinde verilmiştir. İstatistiksel analiz, SPSS sürüm 13.0 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için t-testi ve paired t-testi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda $P < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmada, bitkilerde yüksek oranda bulunan doğal polifenollerden RSV'nin, kolon kanserinde ekspresyonu artan Nav1.5 VGSC üzerindeki rolünü belirlemek üzere yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 hücrelerinin proliferasyonları ve apoptotik özellikleri saptanmış ve metastatik davranışı etkileyen hücrenin lateral hareketi/migrasyonu, transvers invazyonu ile koloni oluşumu, in vitro olarak araştırılmıştır.

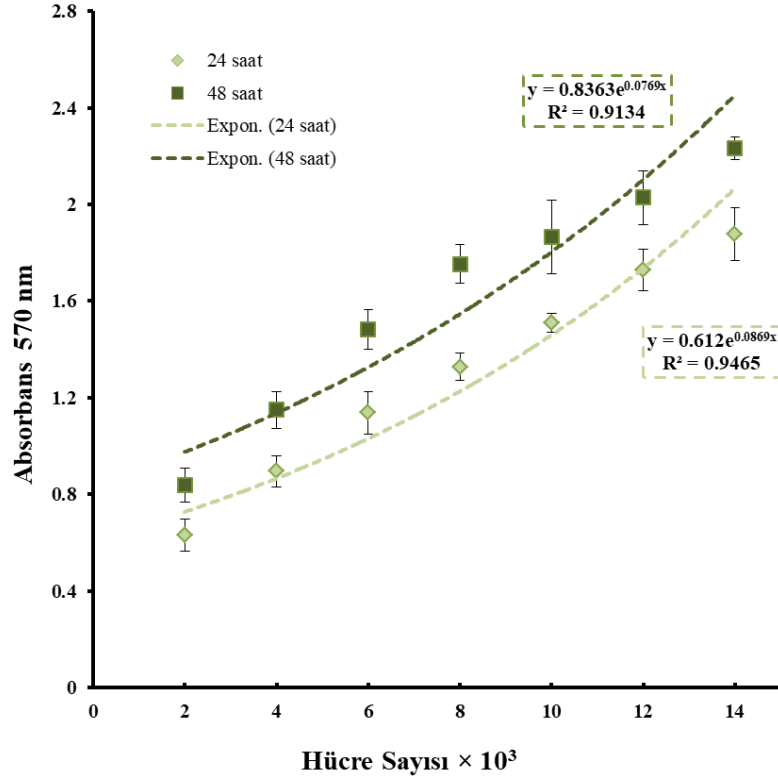
4.1. Hücrede Büyüme

RSV'nin etkisi araştırılmadan önce hem yüksek metastatik SW620 hem de düşük metastatik HT29 hücrelerinin in vitro ortamdaki büyüme özellikleri belirlenmiştir. Farklı sayıda ekilen hücrelerin MTT yöntemi ile absorbansı belirlenmiş olup grafik çizilerek, standart eğri ile ilişkisi verilmiş ve korelasyon katsayısı (R^2) saptanmıştır. SW620 hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki hücre sayısı ile absorbans arasında çizilen grafiği Şekil 4.1 de verilmiştir. Şekil 4.1 de görüldüğü gibi, SW620 hücre sayısının artışına bağlı olarak 24. ve 48. saatlerde absorbansın doğru orantılı olarak arttığı ve hücrelerin eksponansiyel bir büyüme gösterdikleri görülmektedir. SW620 hücrelerinden elde edilen korelasyon katsayısı (R^2), sırasıyla 0,9499 ve 0,932 olarak saptanmıştır. 48. saatte SW620 hücrelerinin hala eksponansiyel fazda olduğu dikkati çekmektedir.



Şekil 4. 1. Yüksek metastatik SW620 kolon kanseri hücrelerinin-zamana bağlı büyümesi.

Şekil 4.2 deki düşük metastatik HT29 hücrelerinde de 24. ve 48. saatlerde hücre sayısı ile absorbansın doğru orantılı olarak arttığı izlenmektedir. Çizilen standart eğri ile ilişkisi verilmiş ve hesaplanan korelasyon katsayıları da sırasıyla 0,9465 ve 0,9134 olmuştur. HT29 hücrelerinin de SW620 hücreleri gibi, 48 saatte halen eksponansiyel fazda olduğu görülmektedir.

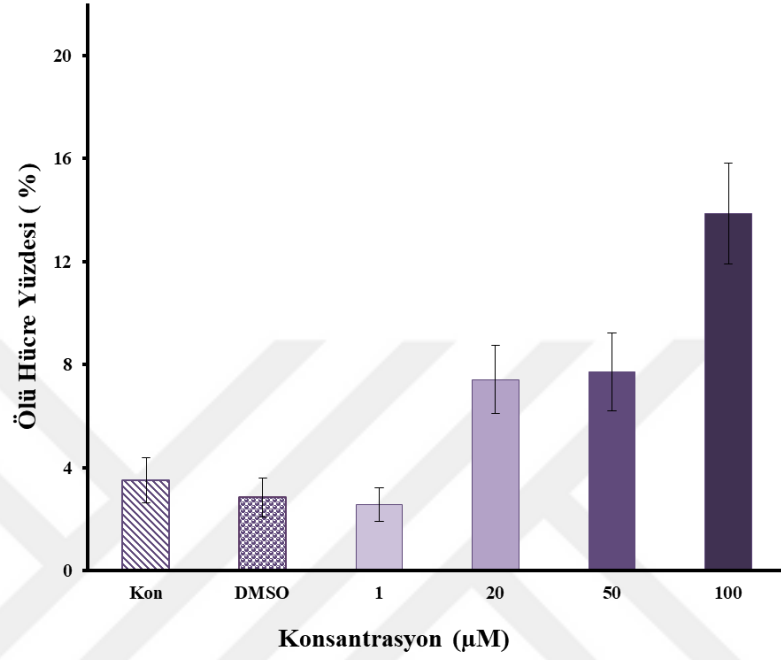


Şekil 4. 2. Düşük metastatik HT29 kolon kanseri hücrelerinin zamana bağlı büyümesi.

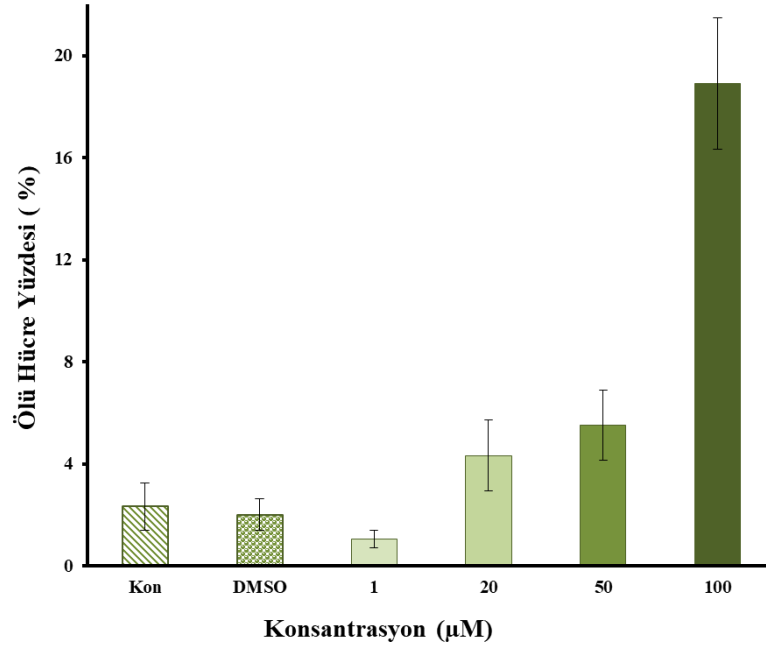
4.2. Hücrede Toksisite

Yüksek metastatik SW620 ile düşük metastatik HT29 kolon kanseri hücre hatlarında hem RSV'nin hem de çözücü olarak kullanılan DMSO'nun toksik etkisi tripan mavisi yöntemi ile saptanmıştır. Ölü hücre yüzdesi grafiğinden Şekil 4.3'te görüldüğü gibi, DMSO ve 1 μ M RSV'nin SW620 hücre hattı üzerinde kontrole göre toksik bir etki meydana getirmediği saptanmıştır. Konsantrasyonun 20 μ M RSV den 100 μ M RSV'ye artışı ile ölü hücre yüzdesinde bir artış meydana geldiği görülmektedir. Hem RSV hem de DMSO nun HT29 hücre hattı üzerindeki toksik etkisi incelediğinde SW620 hücre hattı ile benzerlik göstermektedir (Şekil 4.4). Ancak 100 μ M RSV'de, düşük metastatik HT29 hücrelerindeki ölü hücre yüzdesinin daha yüksek oranda olduğu görülmektedir.

100 μM konsantrasyondaki RSV HT29 ölü hücrelerinin yüzdesinin, 50 μM konsantrasyondaki ölü hücre yüzdesinde 3 kat daha fazla olduğu dikkati çekmektedir.



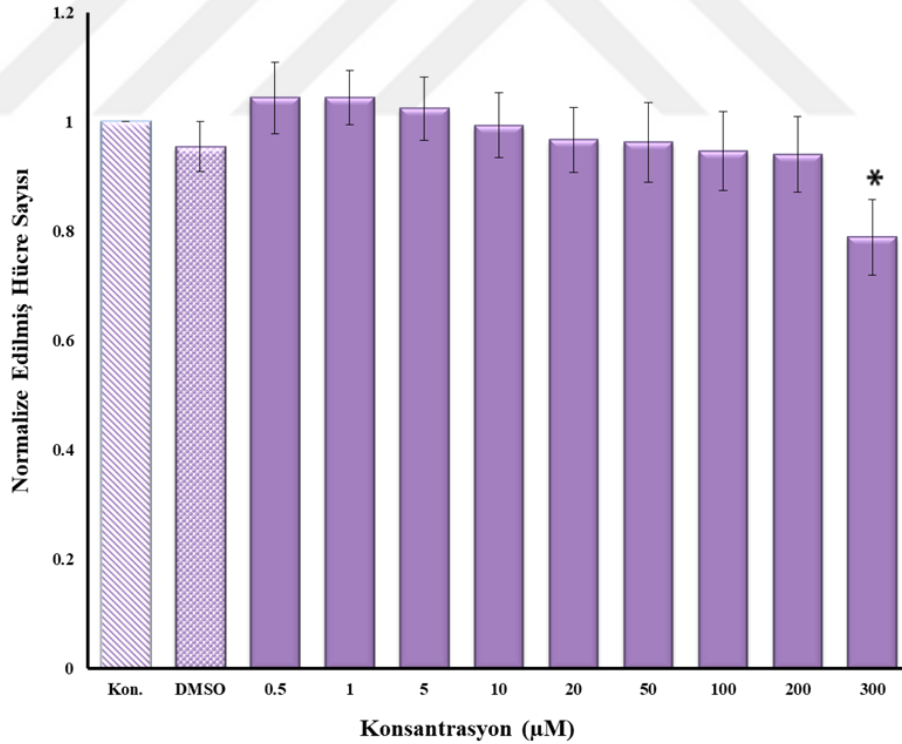
Şekil 4. 3. RSV'nin SW620 hücreleri üzerindeki toksik etkisi.



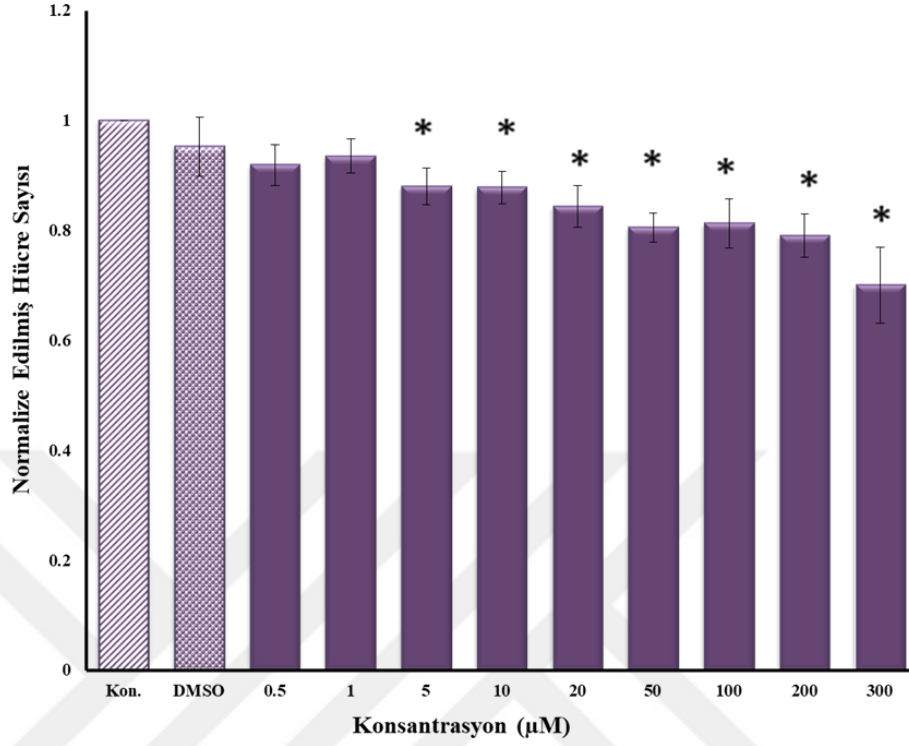
Şekil 4. 4. RSV'nin HT29 hücreleri üzerindeki toksik etkisi.

4.3. Hücre Proliferasyonunu

Belirlenen RSV konsantrasyonlarının yüksek metastatik SW620 hücrelerine Bölüm 3.5 de açıklandığı gibi, uygulanması sonucunda elde edilen veriler, normalize edilmiş hücre sayılarının konsantrasyon ile ilişkisi Şekil 4.5'te verilmiştir. Elde edilen hücre proliferasyonu verilerine göre, 24. saatte kontrol ile DMSO ve 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 200 μ M RSV uygulanan deney grupları arasında istatistik bakımdan anlamlı bir fark görülmediği ($P > 0.05$) belirlenmiştir. Kullanılan en yüksek konsantrasyon olan 300 μ M RSV uygulanan grubun hücre proliferasyonu ise kontrol grubuna oranla azaldığı ve bu azalmanın istatistik bakımdan anlamlı ($P < 0.05$) olduğu saptanmıştır. RSV nin SW620 hücrelerine 48. saat uygulanması ile ise, 5 μ M ve üzerindeki tüm RSV konsantrasyonlarında hücre proliferasyonu anlamlı olarak ($P < 0.05$) azalmakta, bu azalma konsantrasyon artışı ile paralellik göstermektedir (Şekil 4.6).

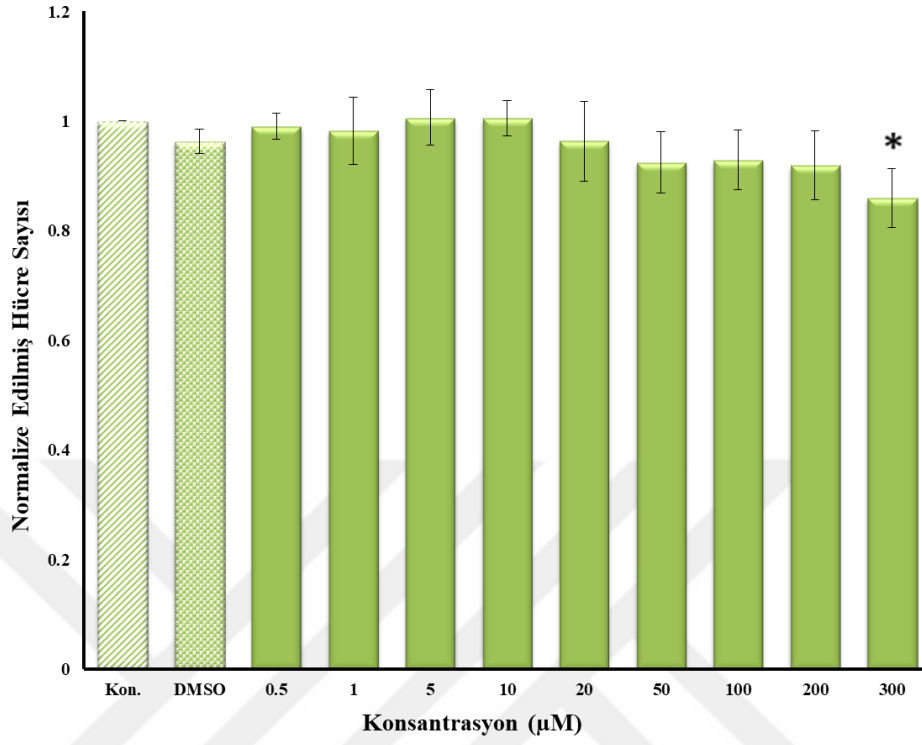


Şekil 4. 5. RSV'nın SW620 hücre hattı üzerinde 24 saatteki anti proliferatif etkisi (* $P < 0.05$).

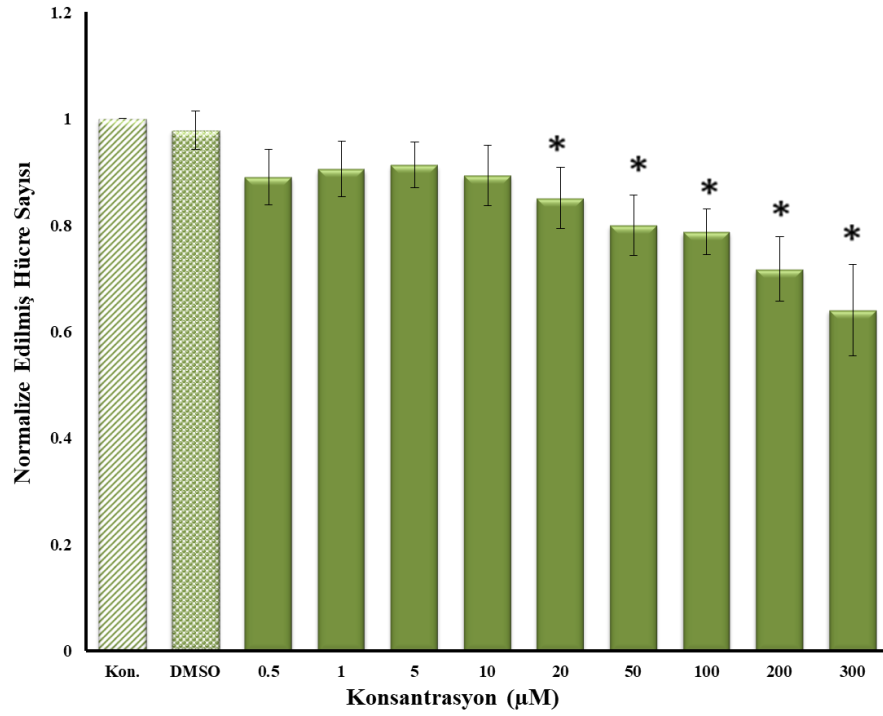


Şekil 4. 6. RSV'nin SW620 hücre hattı üzerinde 48 saatteki anti-proliferatif etkisi (* $P<0.05$).

Belirlenen RSV konsantrasyonlarının düşük metastatik HT29 hücrelerine 24 saat uygulanmasıyla elde edilen veriler ile çizilen grafik Şekil 4.7'da verilmiştir. 24. saatte elde edilen veriler yüksek metastatik hücre hattından elde edilenlere benzer olup, sadece 300 µM RSV, HT29 hücre poliferasyonu üzerinde etki göstermiş ve kontrol grubuna oranla istatistik bakımından anlamlı bir azalma meydana getirmiştir ($P<0.05$). RSV uygulama süresi uzadığında (48. saat) ise, HT29 hücrelerinin proliferasyonlarında azalma görülmüş ve 20 µM dan itibaren bu azalmanın anlamlı olduğu ($P<0.05$) saptanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4. 7. RSV'nin HT29 hücreleri üzerinde 24 saatteki anti-proliferatif etkisi (* P<0.05).

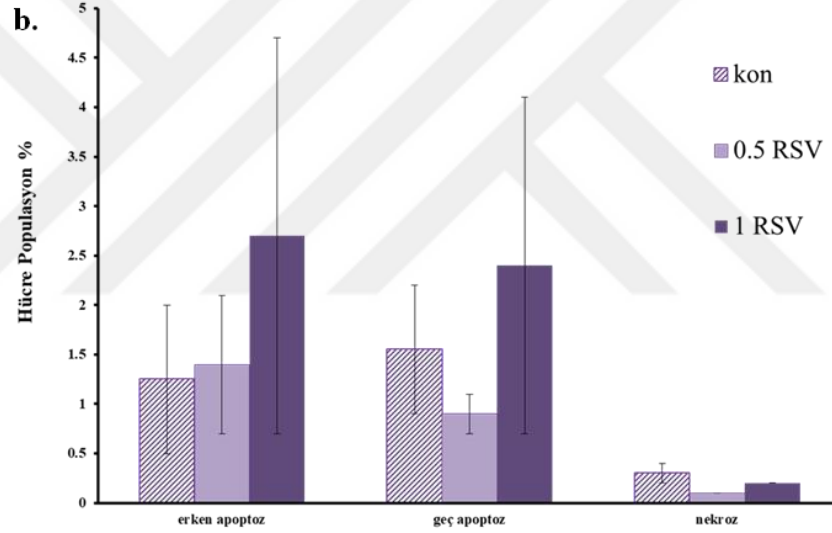
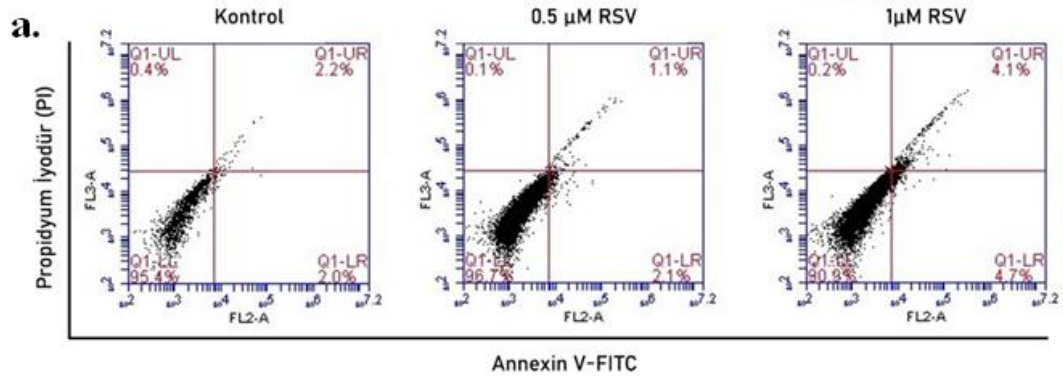


Şekil 4. 8. RSV'nin HT29 hücreleri üzerinde 48 saatteki anti-proliferatif etkisi (* P<0.05).

4.4.Apoptoz Analizi

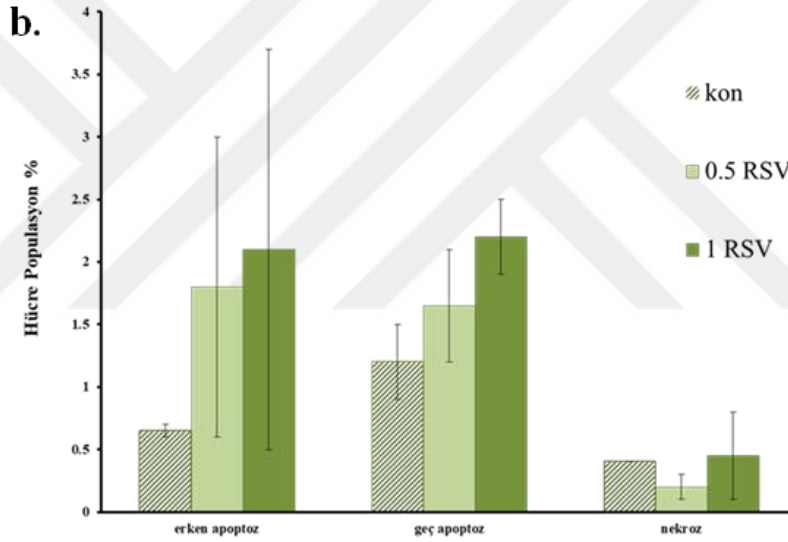
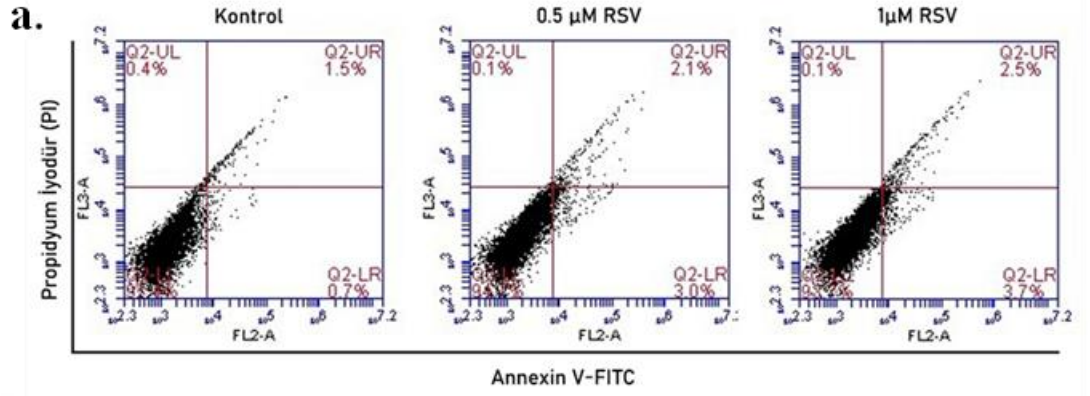
RSV'nin yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisi incelenmiştir. Annexin V-FITC kiti kullanarak, apoptotik hücre yüzdesi, akım sitometri analizi ile ölçülmüştür. Akım sitometri analizinde dört alana ayrılan diyagramda canlı hücreler ilk alanda görünmektedir. Erken apoptotik fazda Annexin V'in, membranın dış tabakasındaki fosfatidilserin'e bağlanması diyagramının sağ alt alanında geç aşaması ise, propidyum iyodürün (PI), membran bütünlüğü bozulduğundan hücre için hareket eder ve diyagramın sağ üst köşesinde yer alır. Nekrozda sadece PI olduğu için sol üst alanda bulunur (Şekil 4.9 a)

SW620 hücre hattında RSV'nin apoptotik etkisi Şekil 4.9'da gösterilmiştir. SW620 hücre hattında 48. saat süreyle 0,5 μ M ve 1 μ M RSV'ye maruz kalmanın, erken apoptozu arttırmakla beraber istatistiksel bakımından anlamlı bir fark göstermediği ($P>0.05$) belirlenmiştir. 0,5 μ M RSV'nin geç apoptozis üzerinde de etkisi bulunmazken, 1 μ M RSV'nin anlamlı olmamakla beraber, apoptozu arttırdığı ($P>0.05$) görülmüştür.



Şekil 4. 9. RSV'nin SW620 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisi.

HT29 hücre hattının 0,5 μ M ve 1 μ M RSV'ye 48 saat boyunca maruz bırakılması, erken ve geç apoptoz üzerinde istatistiksel bakımından anlamlı olmayan ($P>0.05$) bir artış göstermektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10. RSV'nin HT29 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisi.

4.5. Koloni Oluşumu

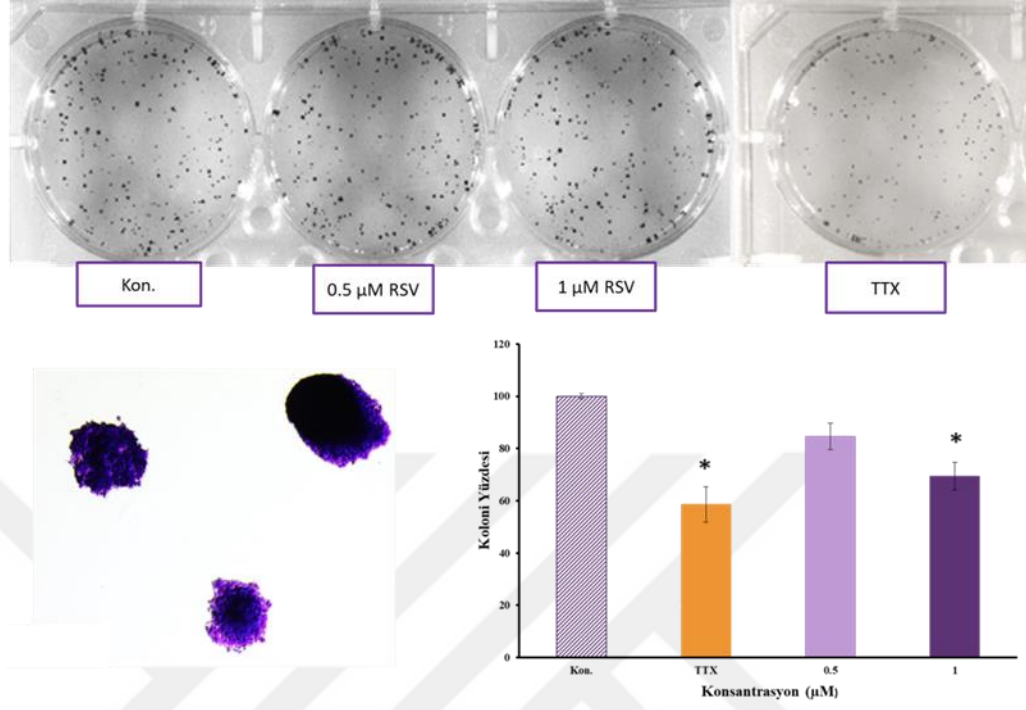
İn vitro olarak SW620 ve HT29 kolorektal hücre hatlarının koloni oluşumları üzerine de RSV'nin etkileri değerlendirilmiştir. SW620 ve HT29 hücrelerine 48. saat TTX, 0,5 µM ve 1 µM RSV uygulanması sonucu oluşan kolonilerin (≥ 50 hücre) yüzdeleri Tablo 4.1'de verilmiş ve grafikleri çizilmiştir. Yüksek metastatik SW620 hücrelerinin koloni morfolojileri ve koloni yüzdeleri Şekil 4.11'de verilmiştir. TTX, 0,5 µM ve 1 µM

RSV'nin koloni sayısını azalttığı görülmekte olup, TTX ve 1 μ M RSV'de bu azalmanın istatistik bakımdan anlamlı ($P<0.05$) olduğu saptanmıştır.

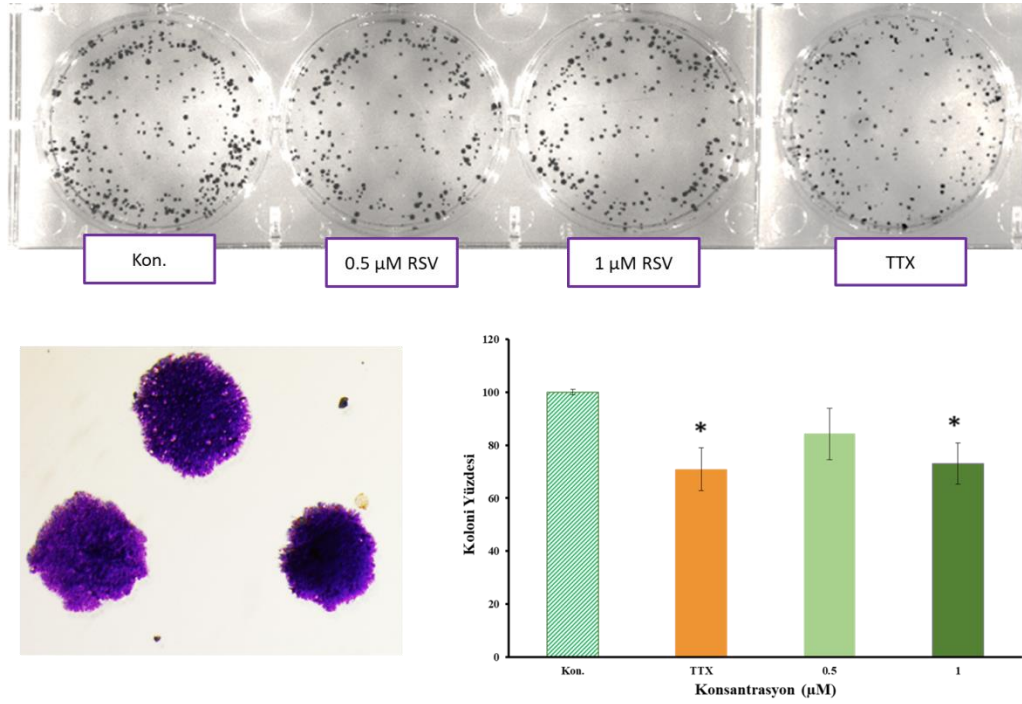
Tablo 4. 1. RSV'nin koloni yüzdesi üzerindeki etkisi (* $P<0.05$).

	Koloni Yüzdesi (%)			
	Kon	TTX	0.5 μM RSV	1 μM RSV
SW620	100	58 $\pm$ 6.7 *	84.6 $\pm$ 5.0	69.3 $\pm$ 5.2 *
HT29	100	70.9 $\pm$ 8.1 *	84.2 $\pm$ 9.7	73.1 $\pm$ 7.7 *

RSV'nin düşük metastatik HT29 hücrelerinin koloni morfolojisi ve koloni yüzdeleri üzerindeki etkisi ise, Tablo 4.1 ve Şekil 4.12'de görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre sadece, TTX ve 1 μ M RSV, düşük metastatik HT29 hücrelerinin koloni sayısı üzerinde anlamlı ($P<0.05$) bir etki meydana getirmektedir.



Şekil 4. 11. RSV'nin SW620 hücre hattı üzerine koloni morfolojisi ve koloni yüzdesi (* $P < 0.05$).

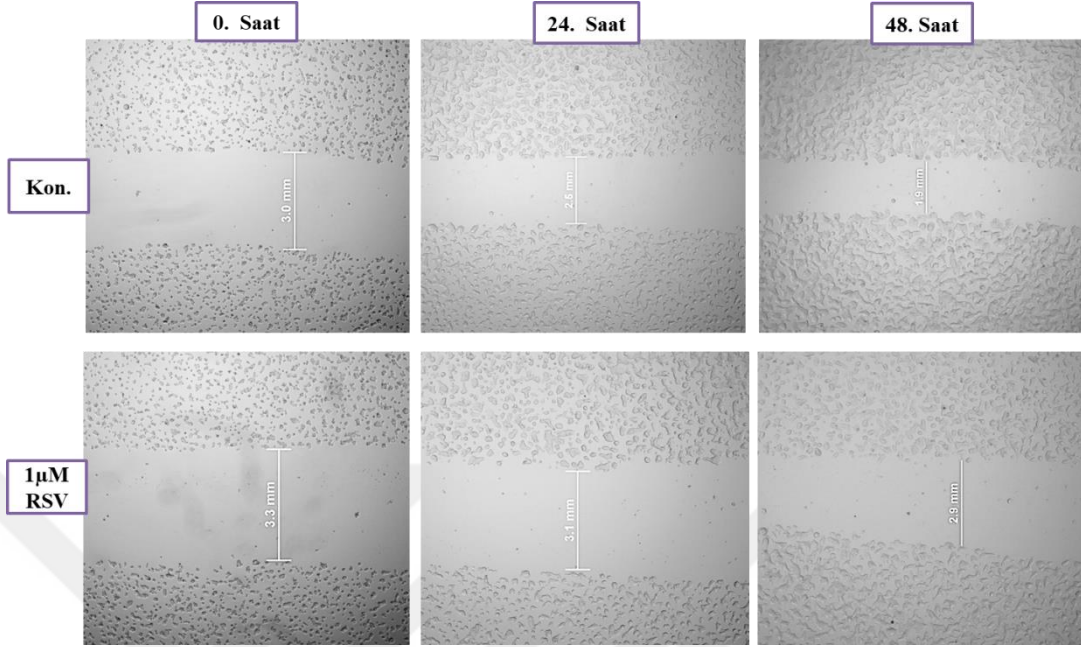


Şekil 4. 12. RSV'nin HT29 hücre hattı üzerine koloni morfolojisi ve koloni yüzdesi (* $P < 0.05$).

4.6.Lateral Hücre Hareketi (Migrasyon = Motilite)

Nav1.5 ekspresyonu olan yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 hücrelerinin lateral hareketi/migrasyonu üzerine RSV'nin etkisini değerlendirmek üzere yara iyileşme testi uygulanmış, motilite indeksi ve motilite yüzdesi hesaplanmıştır (Şekil 4.13).

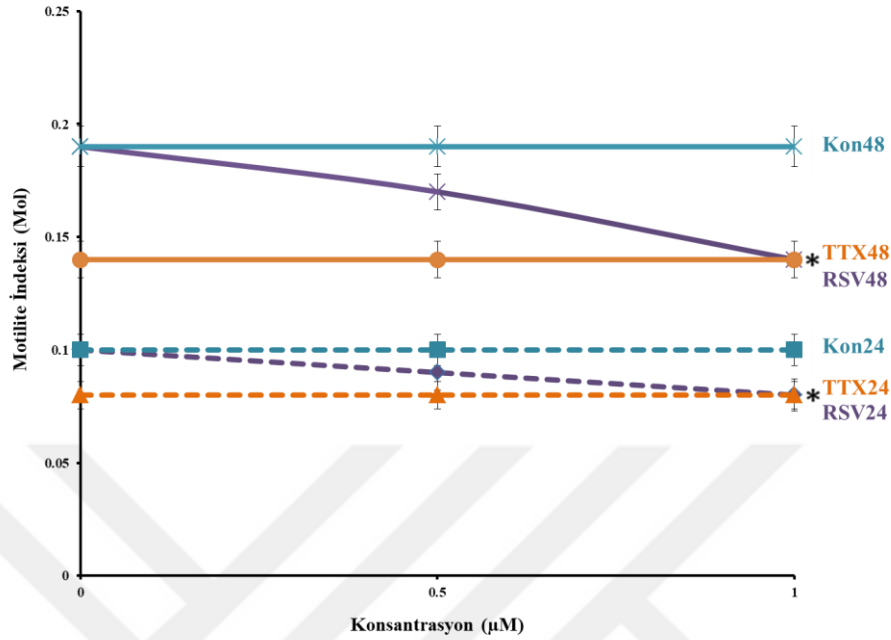
Yüksek metastatik SW620 hücrelerinden elde edilen motilite indeksi sonuçları Tablo 4.2 ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Kontrol grubunda 24. saatte 0.10 ± 0.007 olarak belirlenen motilite indeksi, 48. saatte 0.19 ± 0.009 olarak saptanmıştır. VGSC blokeri olan ve deneyde pozitif kontrol olarak kullanılan TTX ise, 24. saatte $0,08 \pm 0,006$ ve 48 saatte $0,14 \pm 0,008$ motilite indeksi ile kontrol grubuna oranla hücrelerin lateral hareketini 24 ve 48. saatte sırasıyla %20 ve %26 oranında anlamlı ($P<0.05$) olarak azaltmıştır. Deney grubu motilite indeksi, $0,5 \mu\text{M}$ ve $1 \mu\text{M}$ RSV de sırasıyla, 24 saatte $0,09 \pm 0,008$ ve $0,08 \pm 0,007$, 48 saatte ise, $0,17 \pm 0,008$ ve $0,14 \pm 0,008$ olarak saptanmıştır (Tablo 4.2). Yapılan istatistik değerlendirmelere göre, $0,5 \mu\text{M}$ ve $1 \mu\text{M}$ RSV uygulanması sonucu hücrelerin lateral hareketlerinin kontrol grubuna oranla 24. saatte %10 ve %20, 48 saatte ise, %10.5 ve %26 oranında azaldığı tesbit edilmiştir. Ancak bunlardan TTX ile $1 \mu\text{M}$ RSV uygulamasının hücrelerin lateral hareketi üzerinde anlamlı ($P<0.05$) bir etki meydana getirdiği belirlenmiştir. Yüzde inhibisyon değerleri dikkate alındığında, artan doz ile birlikte inhibisyon oranının arttığı ve $1 \mu\text{M}$ RSV'nin 48. saatte VGSC blokeri TTX ile benzer oranda hücrelerin lateral hareketini inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 4.14). RSV konsantrasyonunun artışıyla, hücrelerin lateral hareketindeki inhibisyonun paralellik gösterdiği ortaya konmuştur.



Şekil 4. 13. Metastatik SW620 hücre hattının zamana bağlı migrasyonu.

Tablo 4. 2. SW620 hücrelerine TTX ve RSV uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri (* P< 0.05).

	Motilte İndeksi (Mol)		Motilite İndeksindeki Değişim (%)	
	24. Saat	48. Saat	24. Saat	48. Saat
Kontrol	0.10 ± 0.007	0.19 ± 0.009	—	—
TTX (600 nM)	0.08 ± 0.006	0.14 ± 0.008	20 (↓) *	26 (↓) *
RSV (0.5 μM)	0.09 ± 0.008	0.17 ± 0.008	10 (↓)	10.5 (↓)
RSV (1 μM)	0.08 ± 0.007	0.14 ± 0.008	20 (↓) *	26 (↓) *

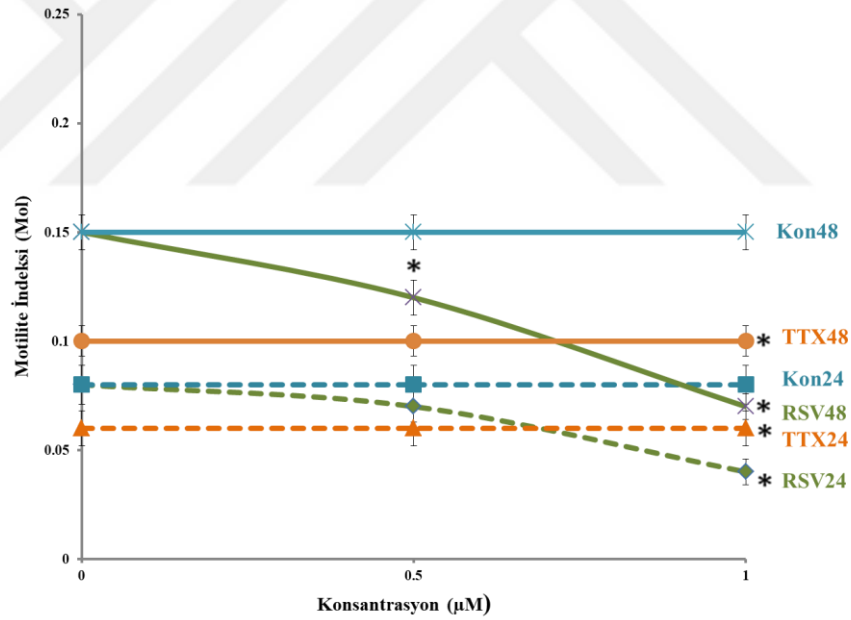


Şekil 4. 14. RSV'nin SW620 hücrelerinin lateral hareketi/migrasyonu üzerine etkisi (*P<0.05).

Düşük metastatik HT29 hücrelerinin lateral hareketi üzerine RSV'nin etkisi ise, Tablo 4.3'te ve Şekil 4.15'te gösterilmiştir. 24 ve 48. saatteki kontrol grubu motilite indeksi (Mol) sırasıyla $0,08 \pm 0,009$ ve $0,15 \pm 0,008$ olarak saptanmıştır. Nav1.5 blokeri olan TTX'in 24 ve 48. saatteki motilite indeksleri sırasıyla 0.06 ± 0.008 ve 0.10 ± 0.007 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu veriler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, TTX, HT29 hücrelerinin lateral hareketi üzerinde sırasıyla %25 ve %33 oranında inhibisyon meydana getirmekte ve bu inhibisyonun anlamlı olduğu ($P<0.05$) görülmektedir. Deney gruplarına 0,5 µM RSV uygulanması ile, hücrelerin motilite indeksi, 24 saatte $0,07 \pm 0,007$ ve 48 saatte ise, $0,12 \pm 0,008$ olmaktadır. Yapılan istatistik analize göre; 0.5 µM RSV nin hücrelerin lateral hareketinde azalmaya neden olduğu, kontrola oranla sadece 48 saatte %20 anlamlı ($P<0.05$) bir inhibisyon meydana getirdiği gözlemlenmiştir. 1 µM RSV ise, HT29 hücrelerinin lateral hareketini hem 24, hem de 48 saatte sırasıyla % 50 ve % 53 oranında inhibe etmiş ve bu inhibisyonun anlamlı ($P<0.05$) olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4. 3. HT29 hücrelerine TTX ve RSV uygulanması ile elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri (* P< 0.05).

	Motilte İndeks (Mol)		Motilite İndeksindeki Değişim (%)	
	24. Saat	48. Saat	24. Saat	48. Saat
Kontrol	0.08 ± 0.009	0.15 ± 0.008	—	—
TTX (600 nM)	0.06 ± 0.008	0.10 ± 0.007	25 (↓) *	33 (↓) *
RSV (0.5 µM)	0.07 ± 0.007	0.12 ± 0.008	12.5 (↓)	20 (↓) *
RSV (1 µM)	0.04 ± 0.006	0.07 ± 0.006	50 (↓) *	53 (↓) *



Şekil 4. 15. RSV'nin HT29 hücrelerinin lateral hareketi/migrasyonu üzerine etkisi (* P< 0.05).

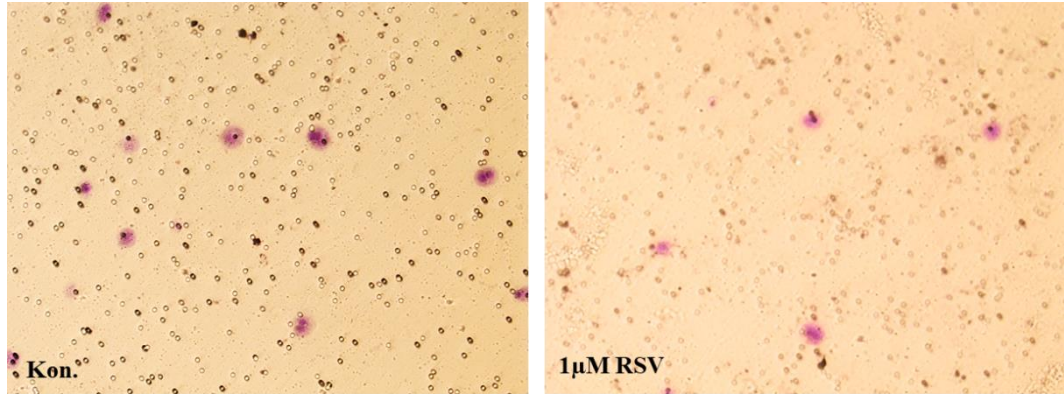
4.7. Transverse Migrasyon ile İnvazyon

Yüksek metastatik ve Nav1.5 ekspresyonu yüksek olan SW620 ve düşük metastatik ve Nav1.5 ekspresyonu düşük olan HT29 hücrelerinin transvers migrasyonu üzerinde RSV'nin etkisini değerlendirmek üzere, hücrelerin bazal membrandan invaze olma

kapasiteleri değerlendirilmiş (Şekil 4.16) ve göç eden hücre sayısı (%) Tablo 4.4'te verilmiş ve grafikleri çizilmiştir.

Yüksek metastatik SW620 hücrelerinin invazyonu üzerine RSV'nin etkileri Şekil 4.17'te gösterilmiştir. Genel VGSC blokeri olan TTX uygulanması ile, SW620 hücrelerinin invazyonu kontrole oranla %42 de kalmıştır ($P<0.05$). Deney gruplarından 0.5 μM RSV, hücrelerin invazyonu üzerinde fazla etki göstermemiş ve invazyon yüzdesi %93 olmuştur. RSV'nin 1 μM olarak uygulandığı grupta ise, %68 invazyon yüzdesi ile kontrol grubuna oranla anlamlı bir azalma göstermiştir ($P<0.05$).

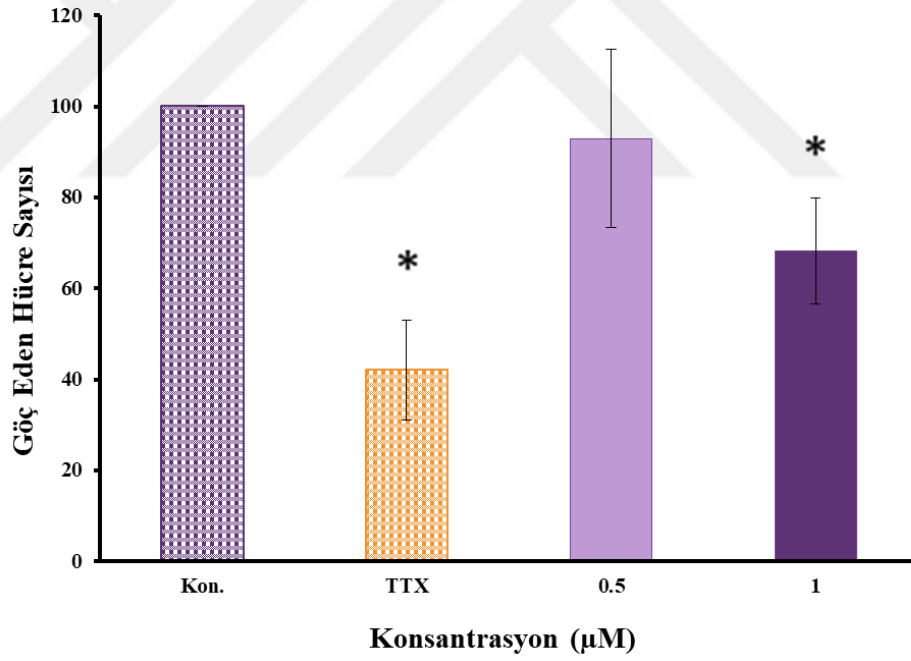
Düşük metastatik HT29 hücrelerinin invazyon hareketi üzerine RSV'nin etkisi Şekil 4.18'de verilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan TTX, HT29 hücrelerinin invazyonunu kontrol grubuna oranla azaltmış ve invazyon oranı %59 olarak saptanmıştır ($P<0.05$) (Tablo 4.4). Yüksek metastatik hücrelerde olduğu gibi, 0.5 μM RSV, HT29 hücrelerinin göçü üzerinde önemli bir etki göstermemiştir. RSV'nin 1 μM olarak uygulanması sonucunda ise, hücrelerin invazyonu %50 düzeyine kadar azalmış ve hem yüksek metastatik SW620 hücrelerinkinden hem de, kanal blokeri TTX'den daha yüksek bir azalma göstermiş ve anlamlı bir inhibisyon oranı ile karşılaşmıştır ($P<0.05$).



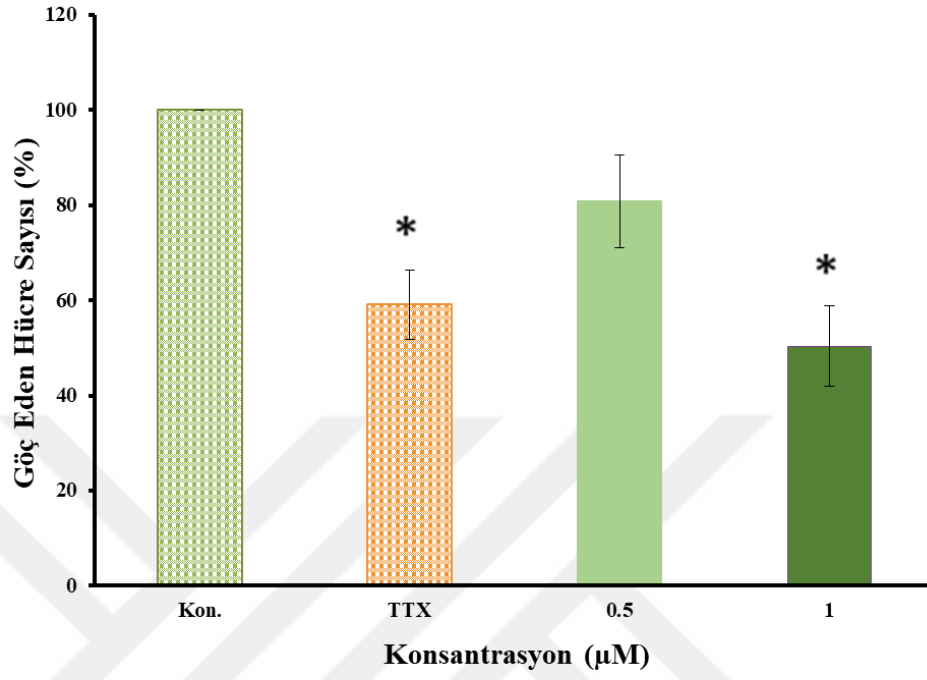
Şekil 4. 16. Kristal viyole ile boyanmış invazyon yapan CRC hücreleri.

Tablo 4. 4. RSV'nin göç eden hücre sayısı (%) üzerindeki etkisi (* P<0.05).

	Göç Eden Hücre Sayısı (%)			
	Kon	TTX	0.5 µM RSV	1 µM RSV
SW620	100	42 ± 11.0 *	93 ± 19.6	68 ± 11.6 *
HT29	100	59 ± 7.2 *	81 ± 9.8	50 ± 8.4 *



Şekil 4. 17. RSV'nin SW620 hücrelerinin invazyonu üzerine etkisi (*P<0.05).



Şekil 4. 18. RSV'nin HT29 hücrelerinin invazyonu üzerine etkisi (*P<0.05).

5. TARTIŞMA

Kanser, dünyadaki en yaygın genetik hastalıklardan biri haline gelmiştir ve insidans oranının giderek artmakta olduğu görülmektedir. Kolorektal kanser dahil olmak üzere kanserde meydana gelen farklı genetik değişiklikler ve farklı organlara yayılma yeteneği nedeniyle, kanserin gelişiminden metastatik durumuna kadar altında yatan mekanizmaları anlamak ve tedavi stratejileri geliştirmeye çalışılmaktadır. Yan etkileri olmayan bir tedavi stratejisi oluşturmada polifenoller gibi doğal bileşikler önemli bir yer tutmaktadır.

Bu çalışmada, VGSC'lerin invazyon ve migrasyondan sorumlu olduğu ve bazı doğal veya farmakolojik ajanların VGSC ekspresyonunu etkilediğine dair mevcut in vitro ve in vivo kanıtları dikkate alarak, RSV'nin yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 kolon kanseri hücrelerinin proliferasyon ve apoptozunun yanı sıra migrasyon, invazyon gibi metastatik özellikleri üzerinde RSV'nin etkisi araştırılmıştır.

RSV, kolon kanseri hücre hatlarından yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 hücreleri üzerinde toksik bir etki göstermediği saptandıktan sonra, hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. Anti-proliferatif aktivite için incelenen 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 200 μ M RSV konsantrasyonları hem yüksek metastatik SW620, hem de düşük metastatik HT29 hücreleri üzerinde 24. saatte anlamlı bir etki göstermemiş sadece, 300 μ M RSV, hücrelerin proliferasyonunu anlamlı olarak inhibe etmiştir. Hücrelerin RSV ile 48. saatlik inkübasyonu sonucunda, SW620 hücresinde 5 μ M RSV'den ve HT29 hücrelerinde ise, 20 μ M RSV konsantrasyonlarından itibaren hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir inhibisyon görülmektedir.

Literatürde, HCT116 ve SW480 kolorektal kanser hücrelerinde sitokalsin D, fokal kinaz inhibitörü ve RSV nin invazyon üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, 5 μ M RSV ile hücrelerin proliferasyonunun azaldığını saptamışlardır (Buhrmann, 2017). RSV'yi pro-apoptotik ajan olarak kullandığı çalışmasında Liu (2019) ise, 24 saat süresince 0-50 μ M RSV ile tedavi edilen HCT116, CO115 ve SW480 hücrelerini CellTiter-Glo Luminescent kiti ile incelemiş ve 12,5 μ M dan itibaren RSV'nin, CRC hücre canlılığında bir azalma meydana getirdiğini ortaya koymuştur. Yapılan bir

araştırmada ise, RSV'nin CRC hücrelerinin proliferasyonu, sitotoksitesi ve apoptozu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla floresan bazlı teknikler uygulanmış ve artan RSV konsantrasyonu (1-400 μ M) ile hücrenin 72 saatlik inkübasyonunda, 78.2 μ M RSV'nin hücrelerin proliferasyonunu %50 oranında inhibe ettiği belirtilmiştir (Juan v.d., 2008).

RSV'nin hücre proliferasyonuna olan etkisi pankreas, mide, ovaryum, prostat, meme, akciğer, glial, deri, kan ve kemik iliği dahil olmak üzere pek çok kanserde incelenmiştir (Ding ve Adrian, 2002; Garvin v.d., 2006; Shimizu v.d., 2006; Harper v.d., 2007; Wu v.d., 2014; Zulueta v.d., 2015; Sinha v.d., 2016; Yousef v.d., 2017; Liu v.d., 2018; Chen v.d., 2019). Bu çalışmalardan Sinha v.d. (2016), RSV'nin, ER α 'ya bağımlı PI3K/AKT yolu, telomeraz veya Wnt/ β -katenin gibi farklı mekanizmaları düzenleyerek meme kanseri proliferasyonunu engellediğini ifade etmişlerdir. RSV'nin proliferatif aktivitesi prostat kanseri üzerinde de araştırılmıştır. PC3 ve DU145 prostat kanseri hücre hatlarının 0-30 μ M RSV ile inkübe edildikten sonra, RSV'nin hücrelerin poliferasyonunu doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini saptamışlardır (Shankar v.d., 2007). MAT-LyLu prostat kanseri hücre hattının 20 μ M RSV ile inkübasyonunun hücre proliferasyonu üzerinde bir etki göstermediği de saptanmıştır (Fraser v.d., 2014).

RSV gibi, bitkisel biyoaktif bileşiklerden kurkumin ve piperine gibi bileşiklerin kanser üzerinde anti proliferatif ve sitotoksik aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Song v.d., 2019; Schmidt v.d., 2020). 24 ve 48 saat süresince MCF-7 meme kanseri hücre hatlarına artan kurkumin ve piperine konsantrasyonları uygulandıktan sonra, MTT testi ile, kurkumin ve piperinin anti-proliferatif aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (Schmidt v.d., 2020). Hücre proliferasyonu üzerinde elde edilen RSV sonuçlarımız mevcut literatürler ile paralellik göstermektedir.

RSV'nin apoptotik aktivite üzerindeki etkileri de değerlendirilmiş ve 0,5 μ M ve 1 μ M RSV hem SW620 hem de, HT29 hücrelerinin 48. saatte erken apoptotik aktiviteyi indüklediği saptanmıştır. Hem 0,5 μ M hem de, 1 μ M RSV, düşük metastatik HT29 hücre hattının geç apoptotik aktivitesini indüklerken, yüksek metastatik SW620 hücrelerinin geç apoptotik aktivitesi 1 μ M RSV tarafından indüklemektedir.

Literatürde RSV'nin belirli proteinleri aktive ederek veya inhibe ederek apoptotik aktiviteyi indüklediğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Zhang v.d, 2004; Aziz v.d., 2006; Lin v.d., 2011; Ferraz da Costa v.d., 2018; Liu v.d., 2019). RSV'nin apoptotik aktivite üzerine etkileri konusunda Liu v.d. (2019) tarafından yapılan araştırmada western blot analizi kullanılmış ve RSV'nin HCT116, CO115 ve SW480 gibi, diğer kolorektal hücre hatlarında P53 ve apoptotik belirteçlerin salınımını düzenlediğini göstermiştir. Ferraz de Costa ve arkadaşları (2018), floresan spektroskopi teknikleri kullanarak, MDA-MB-231, HCC-70 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında p53'ün agregasyonunun engellenmesi amacıyla 50 μ M ve 100 μ M RSV potansiyelini test etmişlerdir. RSV'nin hücre hatlarında p53 protein agregasyonunu azalttığını kanıtlamışlardır. *İn vivo* olarak, RSV'nin apoptoz ve tümör büyümesi üzerindeki etkilerini araştırmak üzere, yüksek metastatik MDA-MB-231 meme hücreleri ile oluşturulan tümörleri taşıyan fareler, 3 hafta boyunca günlük 25 mg/kg RSV ile tedavi edilmiştir. Tümör boyutunun haftalık ölçümü, RSV ile tedavi edilen grupta tümör büyümesinin önemli ölçüde engellendiğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca RSV ile tedavi edilen farelerden ve kontrollerden hazırlanan tümör kesitlerinde TUNEL boyaması yapılmış, RSV ile tedavi edilen tümörlerde apoptotik indekste artış gözlenmiştir (Garvin v.d., 2006).

Bu çalışmada, yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 kolorektal hücre hatlarının koloni oluşum kapasitesi üzerine 48 saat RSV uygulamasının etkisi incelenmiştir. VGSC blokeri TTX ile 1 μ M RSV'nin her iki hücre hattının da koloni oluşumu üzerinde inhibisyon meydana getirdiği saptanmıştır.

Literatürde RSV ve Vitamin E'nin ve bunların kombinasyonunun HCT-8 kolon kanseri hücresinin koloni oluşumu üzerindeki etkisi, 14 günlük kültürlemeden sonra kristal viyole ile analiz ederek kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, HCT-8 hücre kolonilerinin ve hücrelerinin sayısının önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. (Wang, 2021). Ayrıca, 12,5 μ M , 25 μ M ve 50 μ M RSV tedavisinin MCF-7 ve A549 hücre hatlarının koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkilerini belirlemek için %2 kristal viyole kullanılarak klonojenik deneyler yapılmıştır. Artan RSV dozu ile MCF-7 ve A549 hücre kolonilerinin sayısının azaldığı gösterilmiştir (Chen v.d., 2019).

RSV haricinde CRC hücrelerinin koloni oluşumları üzerine bazı bitkisel maddelerin etkilerinin araştırıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Bunlardan, *Eucalyptus macrocarpa* bitki türünden izole edilen organik bileşik olan macrocarpal I (20-80 μ M)'in, SW620 ve HCT116 hücrelerinin koloni sayısını azalttığı, hatta 100 μ M makrokarpal I'in koloni oluşumunu tamamen engelleyeceği ortaya konmuştur (Qi v.d., 2021). Bir başka çalışmada ise, küçük bir ağaç olan *Psidium guajava* L.'nin guava (GBA) adı verilen aseton ekstraktlarının hücrelerin koloni oluşturma kapasitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. HT29 hücrelerinde 50-250 μ g/ml GBA'nın 24 saat uygulanması ve 7 - 8 günlük inkübasyonu, doza paralel olarak koloni oluşumunun inhibisyonuna neden olduğu ve 250 μ g/ml GBA'nın koloni oluşumunu %91 inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Lee ve Park, 2010). SW620 ve HT29 hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri üzerine RSV etkilerini gösteren sonuçlarımız, literatür ile uyum içerisindedir.

Çalışmada, CRC de ekspresyonu yüksek olan Nav1.5 VGSC için polifenol RSV'nin, yüksek metastatik SW620 ve düşük metastatik HT29 kolorektal hücre hatlarının metastatik aktivitesinde önem taşıyan hücre migrasyon ve invazyonu üzerindeki etkisi ve bir VGSC blokeri olarak kullanılma potansiyeli değerlendirilmiştir. RSV'nin hücrelerin lateral hareketi/motilite/migrasyonu ile invazyonu üzerindeki etkisi; hücre proliferasyonu üzerinde etki göstermeyen yani, sitostatik veya sitotoksik aktiviteye sahip olmayan RSV konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan VGSC blokeri TTX, yüksek metastatik SW620 hücrelerinin lateral hareketini 24. ve 48. saatlerinde sırasıyla %20 ve %26 oranında inhibe ederken, hücrelerin invazyonunu %58 baskılamıştır. 1 μ M RSV ise, SW620 hücrelerinin motilitesini (24 ve 48. saat) sırasıyla %20 ve %26 oranları ile VGSC blokeri TTX'e benzer bir inhibisyon oluşturmuştur. Hücrelerin invazyonunu %32 inhibe etmiştir. Düşük metastatik HT29 hücrelerinin migrasyonu üzerinde TTX, sırasıyla %25 ve %33 invazyonu üzerinde ise, %41 oranında inhibisyon meydana getirmiştir. 1 μ M RSV, düşük metastatik HT29 hücrelerinin migrasyonunu sırasıyla %50 ve %53 gibi yüksek bir oranda etki göstermiş, %50 oranında da hücrelerin invazyonu inhibe etmiştir. Düşük metastatik HT29 hücrelerinin migrasyonu ve invazyonu üzerinde RSV'nin gösterdiği bu inhibisyonun, VGSC blokeri TTX'den de yüksek olduğu ortaya konmuştur.

RSV'nin CRC hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkilerini transwell insert testi ile inceleyen Ji ve arkadaşları (2013) 15 μ M, 30 μ M ve 50 μ M RSV'nin 24 saatte LoVo ve HCT116 hücrelerinin migrasyonunu inhibe ettiğini ancak, bu inhibisyonun Wnt/ β -Catenin sinyal yolunun RSV ile baskılanması sonucu meydana geldiğini ifade etmişlerdir. CRC hücre hatları olan HCT116 ve SW480 hücrelerinde RSV'nin hücre migrasyonu üzerindeki etkileri araştırılmış ve 5 μ M RSV'nin fokal adezyon moleküllerini düzenleyerek migrasyonu engellediği gösterilmiştir (Buhraman v.d., 2017). Bu çalışmalarla, RSV'nin, VGSC dışındaki farklı yolları inhibe ederek de migrasyonu baskıladığı ortaya konmuştur (Ji v.d., 2013; Buhraman v.d., 2017).

Sıçan prostat kanseri üzerinde çalışan Fraser ve arkadaşları (2014), yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinde RSV'nin hem tek başına hem de VGSC blokörü TTX ile kombine olarak migrasyon ve invazyona etkisi değerlendirmiştir. Hücre proliferasyonunu etkilemeyen 20 μ M RSV hücre migrasyonunu %25'e kadar inhibe etmiş, RSV ile TTX (20 μ M + 20 nM) kombine olarak uygulandığında ise, bu inhibisyon %44'e ulaşmıştır. Aynı çalışmada invazyon üzerinde de RSV'nin %37 oranında etki gösterdiği saptanmıştır (Fraser v.d., 2014).

Yine bir flavonoid olan naringenin'in Mat-LyLu prostat kanseri hücrelerinde; hücre proliferasyonunu etkilemeyen 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarının hücrelerin lateral hareketini sırasıyla %26,5 ve %10,5 oranında baskıladığı saptanmıştır. Hücrelerin invazyonları üzerindeki etki de değerlendirilmiş ve %47,8 ve %60,9 oranlarındaki inhibisyon ile karşılaşılmıştır. Ayrıca real-time PCR ile hücrelerin VGSC ekspresyonları ile naringenin (10 μ M) arasındaki ilişkiye bakıldığında, SCN9A mRNA ekspresyonunu inhibe ettiği ortaya konmuştur (Aktas ve Akgun, 2018).

Yüksek metastatik MDA-MB-231 meme hücrelerinin invazyon aktivitesi üzerine *Magnolia officinalis* (Mag) bitkisinin etkisi analiz edilmiştir. İnvazyon analizi, Mag (0 μ M ile 30 μ M) varlığında matrigel kaplı mikrokemotaksis kuyucukları ile araştırılan çalışmada 0 μ M ila 30 μ M konsantrasyonun MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonunu önemli ölçüde engellediği sonucuna varılmıştır (Liu v.d., 2013).

Lopez-Charcas ve arkadaşları (2023) tarafından yapılan bir çalışmada ise, küçük moleküllü Nav1.5 inhibitörü bileşik 1 (1 μ M), bileşik 4 (1 μ M) ile pozitif kontrol TTX'in (30 μ M) SW620 ve HCT116 kolon kanseri hücre hatlarının invazyonu üzerindeki etkisini, matrigel kaplı insertler kullanarak değerlendirmişlerdir. Sitotoksik olmayan konsantrasyonda kullanılan bileşik 1 ve bileşik 4'ün her iki hücre hattının invazyon yeteneğini azalttığını göstermiştir. Ayrıca aynı çalışmada hücreler Nav1.5 VGSC seviyeleri bakımından da değerlendirilmiş; HCT116, HT29, SW480 ve SW620 kolon kanseri hücrelerinde en fazla alfa alt birim kodlayan genin SCN5A olduğu, ikincisinin ise SCN8A olduğu gösterilmiştir. HT29 hücrelerinde SW620 hücrelerinden farklı olarak önemli ölçüde SCN4A geninin ifade edildiği ortaya konmuştur (Lopez-Charcas v.d., 2023).

Nav 1.5 VGSC'nin HT29, HCT116, SW620 hücrelerindeki mRNA seviyeleri ile sodyum kanal blokeri TTX aracılı hücre invazivliğinin değerlendirildiği çalışmada; ekspresyonu yüksek olan embriyonik nNav1.5 kanalının siRNA ile susturulması sonucu, TTX ile invazyonun %73, erişkin olan aNav1.5'in susturulması sonucu bu oranın %17 olduğu saptanmıştır. Ayrıca, hipoksik ortamın SW620 hücrelerinin invazyonunu artırdığı bu etkinin VGSC kanal blokeri ranolazin (5 μ M) ile %37 oranında baskılandığı belirlenmiştir (Güzel 2019). House ve arkadaşları (2010) SCN5A'nın SW620, HT29 ve SW480 kolon kanseri hücre hatlarının invazyonu üzerindeki rolünü incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada; hem 30 μ M TTX ile bloke edilmesi, hem de siRNA transfeksiyonu ile SCN5A susturulmasının, göç eden hücre yüzdesini azalttığını saptamışlar ve kolon kanseri ilerlemesini engellemede, lidocaine benzeri VGSC blokeri lokal anestetiklerin yeni tedavilerin geliştirilmesinde potansiyel hedefler olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

CRC'de, SCN5A geni tarafından kodlanan Nav1.5'in SW620 gibi yüksek metastatik CRC hücrelerinde yüksek oranda ifade edildiğini ve SW480, HCT116 ve HT29 gibi düşük metastatik CRC hücrelerinde düşük düzeyde ifade edildiğini kısacası; Nav1.5 ifade artışı ile metastatik aktivite artışının paralel olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır ve Nav1.5'in yüksek ekspresyonunun, CRC hastalarında kötü prognoza neden olduğuna işaret edilmektedir (House v.d., 2010; Lastraioli v.d., 2021; Lopez-Charcas v.d., 2023). Klinik bir çalışmada, insan CRCa örneklerindeki nNav1.5

ekspresyonunun normal mukozadan anlamlı derecede yüksek olduğu, ilginç bir şekilde, Nav1.5 ekspresyonunun, hERG1, KCa3.1, VEGF-A, Glut1 ve EGFR dahil olmak üzere metastazla ilişkili patolojik öneme sahip biyobelirteçlerle birlikte ortaya çıktığı ve CRC hastalarında sağ kalımın Nav 1.5 kanal ekspresyonu ile ters orantılı olduğu belirtilmiştir (Lastraioli v.d., 2021)

Yaklaşık 43 yıl önce Cameron ve arkadaşları (1980) kanser hücrelerinde Na⁺ konsantrasyonunun yüksek olduğunu ve bu durumun karsinogeneze yol açabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu hipotezin doğrulanmasının yanı sıra, günümüze kadar, kanser hücrelerinin metastatik aktivitelerinde rol alan VGSC ekspresyonları; kolon, meme, prostat, akciğer, ovaryum gibi pek çok kanserde araştırılmış ve hatta, ilaç, ajan veya bitkisel kökenli flavanoidler gibi bazı maddelerin bu VGSC ekspresyonlarını bloke etmesine yönelik pek çok çalışma yapılmıştır (Grimes v.d., 1995; Fraser v.d., 1999; Fraser v.d., 2005; Yıldırım v.d., 2012; Djamgoz ve Onkal, 2013; Bagan v.d., 2019; Djamgoz v.d., 2019; Güzel v.d., 2019; Fraser v.d., 2021; Horne v.d., 2021; Lastraioli v.d., 2021; Lopez-Charcas v.d., 2023).

Bu çalışmada, SW620 ve HT29'un proliferasyonunun farklı RSV konsantrasyonları ile inhibe olabileceği, sitostatik veya sitotoksik aktiviteye sahip olmayan düşük dozdaki RSV'nin apoptozu indükleyebileceği gösterilmiştir. Metastatik aktiviteye yönelik olarak yürütülen ve yukarıda belirtilen çalışmalarla paralellik gösteren, koloni oluşumu, migrasyon ve özellikle de invazyon sonuçlarımız, RSV'nin, Nav 1.5 aktivitesini bloke ederek, inhibisyon meydana getirdiğini ortaya koymuştur. Düşük metastatik olmakla birlikte HT29 hücrelerinde migrasyon ve invazyonun daha yüksek oranda bloke olması ise, muhtemelen ya önemli düzeyde SCN4A geni ifade etmesinden yada VGSC den başka yolları inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır. RSV'nin, kolon kanseri metastazının azaltılmasında etken bir doğal bileşik olabileceği in vitro olarak ortaya konmuş olmakla birlikte, daha ayrıntılı çalışmalarla irdelenmesi ve in vivo sonuçlarla desteklenmesine ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

Abdur Rauf, Imran M., Suleria, H.A.R., Ahmad, B., Peters, D.G. & Mubarak M.S. (2017). A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol. *Food Funct.*,8,4284-4305.

Aktas, H.G. & Akgun, T. (2018). Naringenin inhibits prostate cancer metastasis by blocking voltage-gated sodium channels. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 770-775.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York:Garland Science.

Amitay, E.L., Carr, P.R., Jansen, L., Roth, W., Alwers, E., Herpel E., Kloor, M., Bläker, H., Claude, J.C., Brenner, H. & Hoffmeister, M. (2020). Smoking, alcohol consumption and colorectal cancer risk by molecular pathological subtypes and pathways. *British Journal of Cancer*, 122,1604–1610.

Anderson, J. D., Hansen, T. P., Lenkowski, P. W., Walls, A. M., Choudhury, I. M., Schenck, H. A., Friehling, M., Holl, G. M., Patel, M. K., Sikes, Brown, M. L. A. (2003). Voltagegated sodium channel blockers as cytostatic inhibitors of the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. *Mol. Cancer Ther.* 2, 1149–1154.

Antonic,V., Stojadinovic, A., Kester, K.E., Weina, P.J., Brücher, B. L.D.M., Protic, M., Avital, I., & Izadjoo, M. (2013). Significance of Infectious Agents in Colorectal Cancer Development. *J Cancer*, 4(3), 227–240.

Arbo, B.D., André-Miral, C., Nasre-Nasser, R.G., Schimith, L.E., Santos, M.G., Costa-Silva, D., Muccillo-Baisch, A.L. & Hort, M.A. (2020). Resveratrol Derivatives as Potential Treatments for Alzheimer’s and Parkinson’s Disease. *Aging Neurosci*;12:103.

Atay, İ.N.G., Gezer, A.H., & Kasap E. (2021). The Importance of Apoptosis in Cancer Development and Treatment. *Turk J Oncol*, 36(3):381–88

Aurif, F., Kaur, H., Chio, J.P.G., Kittaneh, M., & Malik, B.H. (2021). The Association Between Cholecystectomy and Colorectal Cancer in the Female Gender. *Cureus*, 13(12), e20113.

Aykan, N.F., Yalçın, S., Turhal, N.S., Özdoğan, M., Demir, G., Özkan, M., Yaren, A., Camcı, C., Akbulut, H., Artaç, M., Meydan, N., Uygun, K., Işıkdoğan, A., Ünsal, D., Özyılkan, Ö., Arıcan, A., Seyrek, E., Tekin, S.B., Manavoğlu, O., Özet, A., Elkıran, T., Dişçi, R.(2015). Epidemiology of colorectal cancer in Turkey: A cross-sectional disease registry study (A Turkish Oncology Group trial). *Turk J Gastroenterol*, 145-53.

Aziz, M.H., Nihal, M., Fu, V.X., Jarrard, D.F., & Ahmad, N. (2006). Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(5), 1335-41.

Baba, A.L., & Cătoi, C. (2007). Chapter 2; CARCINOGENESIS. Comparative Oncology. *The Publishing House of the Romanian Academy*. Bookshelf ID: NBK9557.

Bai, Y., Yang, H., Zhang, G., Hu, L., Lei, Y., Qin, Y., Yang, Y., Wang, Q., Li, R. & Mao, Q. (2016). Inhibitory effects of resveratrol on the adhesion, migration and invasion of human bladder cancer cells. *Mol Med Rep.*, 15(2):885-889.

Baptista-Hon, DT., Robertson, FM., Robertson, GB., Owen, SJ., Rogers, GW., Lydon, EL., Lee, NH., Hales, TG. (2014). Potent inhibition by ropivacaine of metastatic colon cancer SW620 cell invasion and NaV1.5 channel function. *Br J Anaesth.* 113:139-148.

Baribeau, S., Chaudhry, P., Parent, S. & Asselin, É. (2014). Resveratrol inhibits cisplatin-induced epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cell lines. *PLoS One.*, 9(1):e86987

Baroni, D., Moran, O. (2015). On the multiple roles of the voltage gated sodium channel $\beta 1$ subunit in genetic diseases. *Front Pharmacol*, 6:108.

Baxter R.A. (2016). Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 7, 2–7.

Baylin, S.B. & Ohm, J.E. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer.*, 6(2):107-16.

Bennett, E.S., Smith, B.A., Harper, J.M. (2004). “Voltage-gated Na^+ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells”, *Pflügers Archiv - European journal of physiology*, 447, 908-914.

Bishayee, A., & Dhir, N. (2009). Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 179, 2–3, 131-144.

Bishehsari, F., Mahdavinia, M., Vacca, M., Malekzadeh, R., & Costantini R.M. (2014). Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: Environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. *World J Gastroenterol*, 20(20), 6055-6072 .

Boland, C.R. & Goel, A. (2010). Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073–2087.e3.

Bopanna, S., Ananthakrishnan, A.N., Kedia, S., Yajnik, V., & Ahuja, V. (2017). Risk of colorectal cancer in Asian patients with ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* ; 2(4): 269–276.

Brackenbury, W.J., Djamgoz, & M.B.A. (2006). “Activity-dependent regulation of voltage-gated Na^+ channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line”, *Journal of physiology*, 573, 343-356.

Brackenbury, W.J., Chioni, A.M., Diss, J.K., Djamgoz, M.B. (2007) “The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells”. *Breast Cancer Res Treat.* 101(2):149-60.

Bugan, I., Karagoz, Z., Altun, S. & Djamgoz, M.B.A., (2016). Gabapentin, an analgesic used against cancer-associated neuropathic pain: effects on prostate cancer progression in an in vivo rat model, *Basic Clinical Pharmacology&Toxicology*, 118(3), 200-207.

Bugan, I., Kucuk, S., Karagoz, Z., Fraser, S.P., Kaya, H., Dodson, A., Foster, C.S., Altun, S., Djamgoz, M.B.A. (2019). “Anti-metastatic effect of ranolazine in an in vivo rat model of prostate cancer, and expression of voltage-gated sodium channel protein in human prostate”. *Prostate Cancer and Prostatic Dis*, 22(4):569-579

Buhrman, C., Shayan, P., Goel A. & Shakibaei M. (2017). Resveratrol Regulates Colorectal Cancer Cell Invasion by Modulation of Focal Adhesion Molecules. *Nutrients*, 9(10), 1073.

Burr, M.L. (1995). Explaining the French paradox. *Journal of the Royal Society of Health*;115 (4), 217-219.

Byerley, L. (2020). APUS: An Introduction to Nutrition: Carcinogenesis. America. American Public University.

Byerley, L. (2022). APUS: An Introduction to Nutrition: Carcinogenesis. America. American Public University.

Cameron, IL., Smith, NK., Pool, TB., Sparks, RL. (1980). Intracellular concentration of sodium and other elements as related to mitogenesis and oncogenesis in vivo. *Cancer research*. 40(5):1493–500.

Canavan, C., Abrams, K.R., & Mayberry, J. (2006). Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology&Therapeutics*, 23(8),1097-1104.

Carethers, J.M. (2021). Racial and ethnic disparities in colorectal cancer incidence and mortality. *Advances in Cancer Research*. 151, 197-229.

Carter, L.G., D’Orazio, J.A. & Pearson K.J. (2014). Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Resveratrol and cancer*. 21:3 R209–R225. DOI:10.530/ERC-13-0171.

Cascella, M., Bimonte, S., Barbieri, A., Vecchio, V.D., Caliendo, D., Schiavone, V., Fusco, R., Granata ,V., Arra, C. & Cuomo, A. (2018). Dissecting the mechanisms and molecules underlying the potential carcinogenicity of red and processed meat in colorectal cancer (CRC): an overview on the current state of knowledge. *Infectious Agents and Cancer*, 13,3

Catterall, W.A., Goldin, A.L., & Waxman, S.G. (2019). Voltage-gated sodium channels (NaV) (version 2019.3) in the IUPHAR/BPS. Guide to Pharmacology Database. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE.

Chatterjee, M., Das, S., Janarthan M., Ramachandran, H.K., & Chatterjee M. (2011). Role of 5-lipoxygenase in resveratrol mediated suppression of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats. *European Journal of Pharmacology*, 668 (1–2), 99-106.

Chen, G., Xia, H., Zhang, Z. & Yu H.L.(2019). Resveratrol in management of bone and spinal cancers. *Natural Product Research*, 33:4, 516-526.

Chen, H., Chen, X.Z., Waterboer, T., Castro, F.A. & Brenner, H. (2015). Viral infections and colorectal cancer: a systematic review of epidemiological studies. *Int. J. Cancer*: 137(1):12-24.

Chen, K.Y., Chen, C.C., Chang, Y.C. & Chang, M.C. (2019). Resveratrol induced premature senescence and inhibited epithelial-mesenchymal transition of cancer cells via induction of tumor suppressor Rad9. *PLOS ONE*, 14(7): e0219317.

Chen, W., Yeo, S.C.M., Elhennawy, M.G.A.A., Xiang, X.Q., & Lin, H.S (2015). Determination of naturally occurring resveratrol analog trans-4,4'-dihydroxystilbene in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a pharmacokinetic study. *Anal. Bioanal. Chem* ;407:5793–5801.

Chen, X.G., Wang, C., Li, Y., Wang, L., Zhou, B., Xu, B., Jiang, X., Zhou, Z.G., & Sun, X.F. (2010). Downregulation of caspase-9 is a frequent event in patients with stage II colorectal cancer and correlates with poor clinical outcome. *Colorectal Dis.*, 12(12):1213-8.

Chimento, A., De Amicis, F., Sirianni, R., Sinicropi, M.S., Puoci, F., Casaburi, I., Saturnino, C., & Pezzi, V. (2019). Progress to Improve Oral Bioavailability and Beneficial Effects of Resveratrol. *Int J Mol Sci.*, 19;20(6):1381.

Cho, I.J., Ahn, J.Y., Kim, S., Choi, M.S., & Ha T.Y. (2008). Resveratrol attenuates the expression of HMG-CoA reductase mRNA in hamsters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(1),190-194.

Cilibrasi, C., Riva, G., Romano, G., Cadamuro, M., Bazzoni, R., Butta, V., Paoletta, L., Dalprà, L., Strazzabosco, M., Lavitrano, M., Giovannoni, R., & Bentivegna, A. (2017). Resveratrol Impairs Glioma Stem Cells Proliferation and Motility by Modulating the Wnt Signaling Pathway. *PLoS One*,12(1):e0169854.

Clerici, S., Peppelenbosh, M., Fuhler, G., Consonni, S.R. & Halder C., (2021). Colorectal cancer cell derived small extracellular vesicles educate human fibroblasts to stimulate migratory capacity. *Front. Cell Dev. Biol*, 9:696373.

Cooper, G.M. (2000). *Oncogenes. The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition.

Crockett, S.D. & Nagtegaal, I.D. (2019). Terminology, Molecular Features, Epidemiology, and Management of Serrated Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology*, 157,949–966.

Das, M., & Das, D.K. (2010). Resveratrol and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 503-512.

Das, S., Kundu, M., Jena, B.C., & Mandal, M.(2020). Chapter 25 - Causes of cancer: physical, chemical, biological carcinogens, and viruses. *Materials Today*,607-641.

de la Lastra, C.A., & Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans.*, 35(Pt 5):1156-60.

Debela D.T., Muzazu SG, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, Kitui SK, Manyazewal T.(2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med.*, 12;9:20503121211034366.

Ding, S., Xu, S., Fang, J. & Jiang, H. (2020). The Protective Effect of Polyphenols for Colorectal Cancer. *Front. Immunol.*, 1- 11:1407.

Ding, X.Z. & Adrian, T.E. (2002). Resveratrol Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas* , 25(4), e71–e76.

Diss, J.K., Stewart, D., Pani, F., Foster, C.S., Walker, M.M., Patel, A., Djamgoz, M.B.A, (2005). Potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Diseases*, 8, 266- 273.

Djamgoz, M.B.A. & Onkal, R. (2013). Persistent Current Blockers of Voltage-Gated Sodium Channels: A Clinical Opportunity for Controlling Metastatic Disease. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 8, 66-84

Djamgoz, M.B.A., Coombes, R.C. & Schwab, A. (2014). Ion transport and cancer: from initiation to metastasis. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 369: 20130092.

Djamgoz, MBA., Fraser, SP., & Brackenbury, WJ. (2019). In vivo Evidence for Voltage-Gated Sodium Channel Expression in carcinomas and Potentiation of Metastasis. *Cancers*, 11: 1675.

Dmello, R.S., To, S.Q. & Chand, L.A. (2021). Therapeutic Targeting of the Tumour Microenvironment in Metastatic Colorectal Cancer. *Int.J.Mol.Sci*, 22,67.

Driffort, V., Gillet, L., Bon, E., Marionneau-Lambot, S., Oullier, T., Joulin, V., Collin, C., Pagès, J.C., Jourdan, M.L., Chevalier, S., Bougnoux, P., Le Guennec, J.Y., Besson, P., & Roger, S. (2014). “Ranolazine inhibits NaV1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization”, *Molecular cancer*, 11;13(1):264.

Elajnaf, T., Baptista-Hon, D.T., & Hales T.G. (2018). Potent Inactivation-Dependent Inhibition of Adult and Neonatal NaV1.5 Channels by Lidocaine and Levobupivacaine. *Anesth Analg.*,127(3):650-660.

Fairhurst, C., Watt, I., Martin, F., Bland, M. & Brackenbury W. J. (2014). Exposure to sodium channel-inhibiting drugs and cancer survival: protocol for a cohort study using the QResearch primary case database. *BMJ*.4.

Ferraz da Costa, D.C., Campos, N.P.C., Santos, R.A., Guedes-da-Silva, F.H., Martins-Dinis, M.M.D.C., Zanhforlin, L., Ramos, C., Rangel, L.P. & Silva J.L. (2018). Resveratrol prevents p53 aggregation in vitro and in breast cancer cells. *Oncotarget.*, 9(49): 29112–29122.

Ferraz da Costa, D.C., Fialho, E., & Silva, J.L. (2017). Cancer Chemoprevention by Resveratrol: The p53 Tumor Suppressor Protein as a Promising Molecular Target. *Molecules*, 18;22(6):1014.

Figueiras, T.S., Petersen, M.T.N., & Petersen, S.B. (2011). Activation energy of light induced isomerization of resveratrol. *Journal of fluorescence*, 21,1897-1906.

Fraser, S.P., Ding, Y., Liu, A., Foster, C.S., & Djamgoz, M.B.A. (1999). “Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic Mat-LyLu rat prostate cancer cell line”, *Cell & Tissue Research*, 295: 505-512.

Fraser, S.P., Salvador, V, Manning, E.A., Mizal, J., Altun, S., Raza, M., Berridge, R.J. & Djamgoz M.B.A. (2003). Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. lateral motility. *Journal of cellular physiology*, 195(3), 479-487.

Fraser, SP., Diss, JK., Chioni, AM., et, al. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res.*11(15):5381–9.

Fraser, S.P., Alex Peters, A., Jones, S.F., Mukhey, D., & Djamgoz, M.B.A. (2014). Resveratrol: Inhibitory Effects on Metastatic Cell Behaviors and Voltage-Gated Na⁺ Channel Activity in Rat Prostate Cancer in Vitro. *Nutr Cancer*;66(6):1047-58.

Fraser, S.P., Hemsley, F., & Djamgoz, M. B.A. (2016). Caffeic acid phenethyl ester: Inhibition of metastatic cell behaviours via voltage-gated sodium channel in human breast cancer in vitro. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 71, 111-118.

Fraser, S.P., Rustem Onkal, R., Theys, M., Bosmans, F. & Djamgoz, M.,B.,A. (2022). Neonatal NaV1.5 channels: pharmacological distinctiveness of a cancer-related voltage-gated sodium channel splice variant. *Br J Pharmacol.*,179:473–486.

Fuentes I.M. and Christianson J.A. (2016). Ion channels, ion channel receptors, and visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*; 28(11): 1613–1618.

Fukuhara, K. , Nagakawa, M., Nakanishi, I., Ohkubo, K., Imai, K., Urano, S., Fukuzumi S., Ozawa T., Ikota N., Mochizuki M., Miyata N., & Okuda H. (2005). Structural basis for DNA-cleaving activity of resveratrol in the presence of Cu(II). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(5):1437-1443.

Gabriel, E., Attwood, K., Al-Sukhni, E., Erwin, D., Boland, P.,& Nurkin, S.(2018). Age-related rates of colorectal cancer and the factors associated with overall survival. *J Gastrointest Oncol.*;9(1):96-110.

Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K. M, Gomez-Cabrera, M. C. , Vina, J. , & Borras, C.(2015). Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:837042.

Gao, F., Huang, W., Zhang, Y., Tang, S., Zheng, L., Ma, F., Wang, Y., Tang, H. & Li X., (2015). Hes1 promotes cell proliferation and migration by activating Bmi-1 and PTEN/AKT/GSK3 β pathway in human colon cancer. *Oncotarget*, 6(36): 38667–38680.

Garvin, S., Öllinger, K., & Dabrosin, C. (2006) Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer Lett*, 231: 113–122.

Geana, E. I. , Dinca, O.R. , Ionete, R.E. , Artem, V., & Niculescu, V.C. (2015). Monitoring trans-Resveratrol in Grape Berry Skins During Ripening and in Corresponding Wines by HPLC. *Biotechnol*. 53 (1) 73–80.

Gligorijević, N., Radomirović, M., Rajković, A., Nedić, O., Ćirković Veličković, T. (2020). Fibrinogen Increases Resveratrol Solubility and Prevents it from Oxidation. *Foods*, 9(6):780.

Grady, W.M., & Markowitz S.D. (2015). The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. *Dig Dis Sci*. 60(3): 762–772.

Grimes, J.A., Fraser, S.P., Stephens, G.J., Downing, J.E., Laniado, M.E., Foster, C.S., Abel, P.D. & Djamgoz, M.B., (1995). Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Letters*, 7;369 (2-3), 290-4.

Guerrero, R.F., Garcia-Parrilla, M.C., Puertas, B., Cantos-Villar, E. (2009). Wine, resveratrol and health: A review. *Nat. Prod. Commun.*, 4, 635–658.

Guo, R., Su, Y., Liu, B., Li, S., Zhou, S., & Xu, Y. (2014). Resveratrol Suppresses Oxidised Low-Density Lipoprotein-Induced Macrophage Apoptosis through Inhibition of Intracellular Reactive Oxygen Species Generation, LOX-1, and the p38 MAPK Pathway. *Cell Physiol Biochem* ; 34:603-616.

Guraya, S.Y. (2015). Association of type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis and systematic review. *World J Gastroenterol*, 21(19), 6026–6031.

Güzel, R.M., Ogmen, K., Ilieva, K.M., Scott, P., Fraser, S.P., & Djamgoz M.B.A. (2019). Colorectal cancer invasiveness in vitro: Predominant contribution of neonatal Nav1.5 under normoxia and hypoxia. *Journal of cellular physiology*, 234:6582–6593.

Half, E., Bercovich, D. & Rozen P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4, Article number: 22.

Hall, M.J., Neumann, C.C., Lamont, J.T., & Grover, S. (2020). Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer): Clinical manifestations and diagnosis.

Hamilton S.R. (2000). Conventional Colorectal Adenoma in :WHO Classification of digestive System 5th edition . Page 170-173

Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 647-674.

Harper, C.E., Patel, B.B., Wang, J., Arabshahi, A., Eltoum, I.A. & Lamartiniere, C.A. (2007). Resveratrol suppresses prostate cancer progression in transgenic mice. *Carcinogenesis*, 28, 1946–1953.

Hasan, M. & Baek, K.H., (2013). Induction of Resveratrol Biosynthesis in Grape Skins and Leaves by Ultrasonication Treatment. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 31(4):496-502.

Hinoue, T. , Weisenberger, D.W. , Lange, C.P.E. , Shen, H. , Byun, H.M. , Berg, D.V.D. , Malik, S. , Pan, F., Noushmehr, H. , Dijk, C.M.V., Tollenaar, R.A., & Laird P.W. (2012). Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res.*, 22(2), 271–282.

Hoca, M., Becer, E. & Vatansever, H.S.(2021). The role of resveratrol in diabetes and obesity associated with insulin resistance. *Arch Physiol Biochem.*, 15:1-7

Horne, J., Mansur, S., Bao, Y. (2021). Sodium ion channels as potential therapeutic targets for cancer metastasis. *Drug Discov Today*, 26(5):1136-1147.

House, C.D., Vaske, C.J., Schwartz, A.M., Obias, V., Frank, B., Luu, T., Sarvazyan, N., Irby, R., Strausberg, R.L., Hales, T.G., Stuart, JM & Lee NH. (2010). Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res*, 1;70(17):6957-67.

Hurst, W.J., Glinski, J.A., Miller, K.B., Apgar, J., Davey M.H. & Stuart D.A. (2008). Survey of the trans-resveratrol and trans-piceid content of cocoa-containing and chocolate products. *J Agric Food Chem* , 56(18):8374-8.

Inoue, Y., Saigusa, S., Iwata, T., Okugawa, Y., Toiyama, Y., Tanaka, K., Uchida, K., Mohri, Y., & Kusunoki, M. (2012). The prognostic value of KRAS mutations in patients with colorectal cancer. *Oncology reports*, 28(5), 1579-1584.

Jang, E. & Chung, D.C. (2010). Hereditary Colon Cancer: Lynch Syndrome. *Gut Liver*, 4(2): 151–160.

Ji, Q., Liu, X., Fu, X., Zhang, L., Sui, H., Zhou, L., Sun, J., Cai, J., Qin, J., Ren, J. & Li Q (2013). Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via MALAT1 mediated Wnt/ β -catenin signal pathway. *PLoS One*. 11;8(11):e78700..

Ji, Q., Liu, X., Han, Z., Zhou, L., Sui, H., Yan, L., Jiang, H., Ren, J., Cai, J. & Li, Q. (2015). Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- β 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression. *BMC Cancer*, 5;15:97..

John, S.E.S., Jensen, K.C., Kang, S., Chen, Y., Calamini, B., Andrw, D. Mesecar, A.D., & Lipton M.A. (2014). Design, synthesis, biological and structural evaluation of functionalized resveratrol analogues as inhibitors of quinone reductase 2. *Bioorg Med Chem.*, 21(19): 6022–6037.

Joyce, C., Rayi, A., & Kasi, A. (2021). Tumor-Suppressor Genes. *StatPearls*.

Juan, M.E., Wenzel, U., Daniel, H., & Planas, J.M. (2008). Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *J Agric Food Chem.*, 56(12):4813-8.

Kala, R., Tollefsbol, T.O. & Li, Y. (2012). Potential of Resveratrol in Inhibiting Cancer and Slowing Aging. *J Nutr Food Sci*, 2155-9600.

Kim, C.W., Hwang K., & Choi K.C. (2016). Anti-metastatic potential of resveratrol and its metabolites by the inhibition of epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of malignant cancer cells. *Phytomedicine*, 23(14), 1787-1796.

Kim, E.R. & Chang, D.K. (2014). Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J Gastroenterol.*; 20(29): 9872–9881.

Kim, J.B. (2014). Channelopathies. *Korean J Pediatr*, 57(1):1-18.

Ko, J.H., Sethi, G., Um, J.Y., Shanmugam, M.K., Arfuso, F., Kumar, A.P., Bishayee, A. & Ahn K.S. (2017). The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 2589;

Koltai, T. (2015). Voltage-gated sodium channel as a target for metastatic risk reduction with re-purposed drugs. *F1000Res.*, 4:297.

Kontomanolis, E.N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., 3, Garmpis, N., Michail Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A.,

Ntounis, T., & Fasoulakis, Z. (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research*, 40: 6009-6015.

Koushki, M., Dashatan, N.A., Ahmadi, N., Abbaszadeh, H.A. & Taviran, M.R. (2018). Resveratrol: A miraculous natural compound for diseases treatment. *Food Sci Nutr*, 6:2473–2490.

Krump, N.A., & You, J. (2018). Molecular mechanisms of viral oncogenesis in humans. *Nat Rev Microbiol*, 16(11):684-698.

Kuipers, E.J., Grady, W.G., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J.J., Boelens, P.G., van de Velde, C.J.H., & Watanabe, T. (2015). COLORECTAL CANCER. *Nat Rev Dis Primers*, 1: 15065.

Lastraioli, E., Fraser, S.P., Guzel, R.M., Iorio, J., Bencini, L., Scarpi, E., Messerini, L., Villanacci, V., Cerino, G., Ghezzi, N., Perrone, G., Djamgoz, M.B.A., Arcangeli, A. (2021). Neonatal Nav1.5 Protein Expression in Human Colorectal Cancer: Immunohistochemical Characterization and Clinical Evaluation. *Cancers*, 13, 3832.

Lee, S.B., & Park H.R. (2010). Anticancer activity of guava (*Psidium guajava* L.) branch extracts against HT-29 human colon cancer cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(10), 891-896.

Liebl, M.C. & Hofmann, T.G. (2021). The Role of p53 Signaling in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*, 13(9), 2125.

Lin, H.Y., Tang, H.Y., Davis, F.B., & Davis P.J. (2011). Resveratrol and apoptosis. *New York Academy of science*;1215(1), 79-88.

Liu, Y., & Cao, X. (2016). Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell*, 30,668-681.

Liu, Y., Cao, W., Zhang, B., Liu, Y., Wang, Z., Wu, Y., Yu, X., Zhang, X., Ming, P., Zhou, G. & Huang, L.(2013). The natural compound magnolol inhibits invasion and exhibits potential in human breast cancer therapy. *Sci Rep*, 3, 3098.

Liu, Y., Tong, L., Luo, Y., Li, X., Chen, G., & Wang Y. (2018). Resveratrol inhibits the proliferation and induces the apoptosis in ovarian cancer cells via inhibiting glycolysis and targeting AMPK/mTOR signaling pathway. *J Cell Biochem.*,119:6162–6172.

Liu, Z., Wu, X., Lv, J., Sun, H. & Zhou F., (2019). Resveratrol induces p53 in colorectal cancer through SET7/9. *Oncology letters* ,17(4), 3783-3789.

Locker, G.Y. & Lynch, H.T. (2004). Genetic factors and colorectal cancer in Ashkenazi Jews. *Familial Cancer*, 3, 215–221.

Lopez-Charcas, O., Pukkanasut, P., Velu, S.E., Brackenbury, W.J., Hales, T.G., Besson, P., Gomora, J.C., & Roger S. (2021) Pharmacological and nutritional targeting of voltage-gated sodium channels in the treatment of cancers. *iScience*,6;24(4):102270.

Lopez-Charcas, O., Poisson, L., Benouna, O., Lemoine, R., Chadet, S., Pétereau, A., Lahlou, W., Guyétant, S., Ouaiissi, M., Pukkanasut, P., Dutta, S., Velu, S.E., Besson, P., Moussata, D., Roger, S. (2023). Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.5 Controls NHE-1-Dependent Invasive Properties in Colon Cancer Cells. *Cancers (Basel)*,15(1):46.

Lu Huang, L., Zhanga, S., Zhoua, J., & Li, X. (2019). Effect of resveratrol on drug resistance in colon cancer chemotherapy. *RSC Adv.*, 9, 2572-2580

Luo, Y., Liu, D., Wang, X. , Ye, X., , Li, N., Zhang Y., SONG, Y. & Wang, Q. (2020). Resveratrol Exerts An Antiproliferative Effect In Pancreatic Cancer Cells By Inducing Mitochondrial-Mediated Apoptosis. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 77 (6),879.

Ma, Y., Yang, Y., Wang F., Zhang, P., Shi, C., Zou, Y., & Qin H. (2013). Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *PLoS ONE*, 8(1), e53916.

Madan, E., Prasad, S., Roy, P., George, J., & Shukla Y. (2008). Regulation of apoptosis by resveratrol through JAK/STAT and mitochondria mediated pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 26;377(4):1232-7.

Mandal A (2019). Cancer History. News Medical life science. Retrived from <https://www.news-medical.net/health/Cancer-History.aspx>

Mándi, M.,Keleti, G., &Juhász, M. (2021). The role of appendectomy and cholecystectomy in the pathogenesis of colorectal carcinomas. *Annals of Medicine and Surgery*, 72, 102991.

Martin, F., Ufodiana, C., Watt, I., Bland, M., & Brackenbury, WJ. (2015). “Therapeutic Value of Voltage-Gated Sodium Channel Inhibitors in Breast, Colorectal, and Prostate Cancer: A Systematic Review”. *Front Pharmacol.* 12;6:273.

Martin, T.A., Ye, L., Sanders, A.J., Lane, J., & Jiang, W.G. (2000-2013). Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience.*

Martinez, J. & Morenoa, J.J. (2000). Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production . *Biochemical Pharmacology* ,59(7), 865-870.

Moghaddam, A.A., Woodward, M. & Huxley, R. (2007). Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis of 31 Studies with 70,000 Events. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. American Association for Cancer Research*, 16(12), 2533-2547.

Mohammed, F.H., Khajah, M.A., Yang, M., Brackenbury, W.J., & Luqmani, Y.A.,(2016) “Blockade of voltage-gated sodium channels inhibits invasion of endocrine-resistant breast cancer cells” *International J. of Oncology*, 48, 73-83.

Moreira, L., Castells, A. (2014). The Clinical Evaluation of Polyposis Syndromes. *Curr Colorectal Cancer*, 10, 36-44.

Mundade, R., Imperiale, T.F., Prabhu, L., Loehrer, P.J. & Lu, T. (2014). Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*, 1(6), 400-406.

Nanjan, M.J. & Betz, J. (2014). Resveratrol for the Management of Diabetes and its Downstream Pathologies. *Eur Endocrinol.*, 10(1), 31–35.

Narayan, S. & Roy, D. (2002). Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular Cancer*, 2, Article number: 41, 1-15.

Nawaz, W., Zhou, Z., Deng, S., Ma, X., Ma, X., Li, C. & Shu, X. (2017). Therapeutic Versatility of Resveratrol Derivatives. *Nutrients*, 9(11): 1188.

Nelson, M., Yang, M., Dowle, A.A., Thomas, J.R., & Brackenbury, W.J., (2015). The sodium channel-blocking antiepileptic drug phenytoin inhibits breast tumour growth and metastasis. *Molecular Cancer*, 14, 13.

Nguyen, H.T., & Duong, H.Q. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy (Review). *Oncology letters*, 16(1), 9-18.

Pantsar, T. (2020). The current understanding of KRAS protein structure and dynamics. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 189-198.

Pantusa, M., Bartucci, R. & Rizzuti, B.J. (2014). Stability of trans-resveratrol associated with transport proteins. *Agric Food Chem*, 62(19):4384-91

Pardo, G.D. & McClements, D.J. (2014). Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. *Trend in food and science technology*; 38(2), 88-103

Patel, S.G., & Ahnen, D.J. (2018). Colorectal Cancer in the Young. *Curr Gastroenterol Rep*, 20, 15.

Peng, L. & Jiang D. (2018). Resveratrol eliminates cancer stem cells of osteosarcoma by STAT3 pathway inhibition. *PLoS One*; 13(10): e0205918

Petkov, G.V. (2009). Chapter 16 - Ion Channels. *Pharmacology* , Pages 387-427. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369521-5.00016-6>.

Petrovski, G., Gurusamy, N. & Das D.K., (2011). Resveratrol in cardiovascular health and disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1215:22-33.

Pfeffer, C.M. & Singh, A.T.K. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci.*, 19(2): 448

Pretzsch, E., Bösch, F., Neumann, J., Ganschow, P., Bazhin, A., Guba, M., Werner, J. & Angele, M. (2019). Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *Journal of Oncology*, 13, 2019.

Prevarskaya, N. , Skryma, R. & Shuba, Y. (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 16 (3).

Prevarskaya, N., Skryma, R. & Shuba, Y.(2018). Ion channels in cancer: are cancer hallmarks oncochannelopathies? *Physiol Rev*, 98, 559-621.

Pyo, I.S., Yun, S., Yoon, Y.E., Choi, J.W., & Lee S.J. (2020). Mechanisms of Aging and the Preventive Effects of Resveratrol on Age-Related Diseases. *Molecules*, 25(20): 4649.

Qi, L., Zhang, Y., Zhang, W., Wang Y., Han Y., & Ding Y. (2021). The inhibition of colorectal cancer growth by the natural product macrocarpal I. *Free Radical Biology and Medicine*, 162, 383-391

Redig, A.J. & McAllister S.S. (2013). Breast cancer as systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med*, 274(2);113-26.

Resta, C.D., & Becchetti A. (2010). Introduction to ion channels. *Adv Exp Med Biol*, 674:9-21.

Reymond, N., d'Água, B. & Ridley, A. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* 13, 858–870.

Riihimäki, M., Hemminki, A., Sundquist, J., & Hemminki, K. (2016). Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci. Rep*, 6, 29765.

Rizaner, N., Uzun, S., Fraser, S.P., Djamgoz, M.B.A. & Altun S. (2020). Riluzole: Anti-invasive effects on rat prostate cancer cells under normoxic and hypoxic conditions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 127(4):254-264.

Rossi, M., Anwar, M.J., Usman, A., Keshavarzian, A., & Bishehsari, F. (2018). Colorectal Cancer and Alcohol Consumption—Populations to Molecules. *Cancers (Basel)*, 10(2): 38.

Ruiz, M.D.L.& Kraus, R.L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J. Med. Chem.*, 58, 7093–7118.

Sánchez, L., Dellamea, M., Moreno, L., Osorio, C., Toranzo, R.G. & Sosa, M.(2015). Unexpected destinies:unusual sites of colorectal cancer metastases.*IMAGENES*, 4(12),37-47.

Schmidt, B., Ferreira, C., Alves Passos, C.L., Silva, J.L., Fialho, E. (2020). Resveratrol, Curcumin and Piperine Alter Human Glyoxalase 1 in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5244.

Schubbert, S, Shannon, K. & Bollag, G. (2007): Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*, 7, 295–308.

Schwingshackl, L., Schwedhelm, C., Hoffmann, G., Knüppel, S., Preterre, A.L., Iqbal K., Bechthold, A., De Henauw, S., Michels, N., Devleesschauwer, B., Boeing, H., & Schlesinger, S. (2017). Food groups and risk of colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 142, 1748–1758 .

Scoditti, E ., Calabriso, N., Massaro, M., la Pellegrino, M. , Storelli, C., Martines, G., De Caterina, R., Carluccio, M.A (2012). Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 527(2), Pages 81-89.

Shad, K.F., Salman, S., Afridi, S., Tariq, M. & Asghar, S. (2018). Introductory Chapter: Ion Channels. *Ion Channels in Health and Sickness*. DOI: 10.5772/intechopen.80597

Shankar, S., Chen, Q. , Siddiqui, I., Sarva, K. & Srivastava R.K. (2007). Molecular mechanisms of resveratrol (3,4,5-trihydroxy-trans-stilbene) and its interaction with TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in androgen-insensitive prostate cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 304, 273–285

Sheth, S., Jajoo, S., Kaur, T., Mukherjea, D., Sheehan, K., Rybak, L.P., & Ramkumar V. (2012). Resveratrol Reduces Prostate Cancer Growth and Metastasis by Inhibiting the Akt/MicroRNA-21 Pathway. *PLoS One*, 7(12): e51655.

Shimizu, T., Nakazato, T., Xian, M.J., Sagawa, M., Ikeda, Y. & Kizaki, M. (2006). Resveratrol induces apoptosis of human malignant B cells by activation of caspase-3 and p38 MAP kinase pathways. *Biochem Pharmacol*, 71(6):742-50.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Wagle, N.S., & Jemal, A. (2023) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.*, 73(1): 17- 48.

Siemann, E.H. & Creasy, L.L.(1992).Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine.*American Journal of Enology and Viticulture*, 43(1),49-52.

Simon, K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging*, 11: 967–976.

Sinhaa, D., Sarkar, N., Biswas, J. & Bishaye, A. (2016). Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Seminars in Cancer Biology*, 40–41, 209-232 .

Soleas, G.J., Diamandis, E.P. & Goldberg, D.M. (1997). Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone?. *Clin. Biochem.*, 30:91–113.

Song, X., Zhang, M., Dai, E., Luo, Y. (2019).Molecular targets of curcumin in breast cancer (Review). *Mol. Med. Rep.* 19, 23–29.

Springer, M. & Moco, S. (2019). Resveratrol and Its Human Metabolites—Effects on Metabolic Health and Obesity. *Nutrients*, 11(1): 143.

Stoffel, E.M., & Kastrinos, F. (2014). Familial CRC—Beyond the Lynch Syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 12(7): 1059–1068.

Sun, A.Y., Wang, Q., Simonyi, A. & Sun G.Y.(2010). Resveratrol as a Therapeutic Agent for Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 41, 375–383.

Sun, Y., Zhou, Q.M., Lu, Y.Y., Zhang, H., Chen, Q.L., Zhao, M. & Su, S.B. (2019). Resveratrol Inhibits the Migration and Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer by Reversing TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecules*,24(6):1131.

Sun, X., Fu, F., Xie, L., Chai, S., Xu, Q., Zeng, L., Wang, X., Jiang, N. & Sang M. (2021). Resveratrol inhibits the progression of cervical cancer by suppressing the transcription and expression of HPV E6 and E7 genes. *Int J Mol Med*, 47(1): 335–345.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Braym F (2021). Global Cancer statistics: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *A Cancer Journal For Clinicians*, 71(3), 209-249.

Tang, F.Y., Su, Y.C., Chen, N.C., Hsieh, H.S. & Chen, K.S. (2008). Resveratrol inhibits migration and invasion of human breast-cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res*, 683 52, 683 – 691.

Tauriello, D.V.F., Calon, A., Lonardo, E., & Batlle, E. (2017). Determinants of metastatic competency in colorectal cancer. *Mol Oncol*. 217,11(1), 97–119.

Tellone, E., Galtieri, A., Russo, A., Giardina, B. & Ficarra S. (2015). Resveratrol: A Focus on Several Neurodegenerative Diseases. Hindawi Publishing Corporation .*Oxidative Medicine and Cellular Longevity*,2015, 14.

Ternes, D., Karta, J., Tsenkova, M., Wilmes, P., Haan, S., & Letellier, E., (2020). Microbiome in Colorectal Cancer: How to Get from Meta-omics to Mechanism?. *Trends in Microbiology*, 28(5),401-423.

Tessitore, L., Davit, A., Sarotto, I. & Caderni, G. (2000). Resveratrol depresses the growth of colorectal aberrant crypt foci by affecting bax and p21CIP expression. *Carcinogenesis*, 21(8), 1619–1622,

Testa, U., Pelosi, E., & Castelli G. (2018). Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Med. Sci.*,6, 31

Thadhani, V.M. (2019). Resveratrol in Management of Diabetes and Obesity: Clinical Applications, Bioavailability, and Nanotherapy. *IntechOpen*.

Thapa, S.B., Pandey, R.P., Park, Y.I. & Sohng J.K.,(2019). Biotechnological Advances in Resveratrol Production and its Chemical Diversity. *Molecules*; 24(14): 2571.

Tian, B. & Liu, J. (2019). Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *Science of food and nature*, 100(4):1392-1404.

Tian, H. & Yu, Z. (2015). Resveratrol induces apoptosis of leukemia cell line K562 by modulation of sphingosine kinase-1 pathway. *Int J Clin Exp Pathol.* , 8(3): 2755–2762.

Tokuşoglu, O., Unal, M.K. & Yemiş F. (2015). Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J Agric Food Chem.*53(12):5003-9.

Tubbs, A. & Nussenzweig, A. (2017). Review; Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell press*, 168(4), 644-656.

Uçar, E.Ö. & Şengelen A. (2019). Resveratrol and siRNA in combination reduces Hsp27 expression and induces caspase-3 activity in human glioblastoma cells. *Cell Stress Chaperones*, 24(4): 763–775.

Urpí-Sardà, M., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R.M., Jaeger, W., Miksits, M., Covas, M.I. & Andres-Lacueva, C. (2005). Uptake of Diet Resveratrol into the Human Low-Density Lipoprotein. Identification and Quantification of Resveratrol Metabolites by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*,77:3149–3155

Valastyan, S., & Weinberg, R.A. (2011). Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell Press*, 147(2), 275-292.

Varmus, H., Pao, W., Politi K., Podsypanina K., & Du Y.C.N. (2005). Oncogenes Come of Age. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 70, 1–9.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., & Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.*, 319(9),525-32.

Vogt, P.K. (2012). Retroviral oncogenes: a historical primer. *NATURE REVIEWS . CANCER*, 12, 639-648.

Vu, H.T., Ufere, N., Yan, Y., Wang, J.S., Early, D.S., & Elwing, J.E. (2014). Diabetes mellitus increases risk for colorectal adenomas in younger patients. *World J Gastroenterol.*, 20(22), 6946–6952.

Wakabayashi, I. & Takeda, Y. (2013). Inhibitory effects of resveratrol on MCP-1, IL-6, and IL-8 production in human coronary artery smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 386, 835–839 .

Wallace, CH., Baczkó, I., Jones, L., Fercho, M., Light, PE. (2006). Inhibition of cardiac voltage-gated sodium channels by grape polyphenols. *Br J Pharmacol*, 149(6):657-65.

Wang, H., Zhang, H., Tang, L., Chen, H., Wu, C., Zhao, M., Yang, Y., Chen, X. & Liu, G. (2013). Resveratrol inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses lung cancer invasion and metastasis. *Toxicology*, 303:139-46.

Wang, J., Ou, S.W., & Wang, Y.J. (2017). Distribution and function of voltage-gated sodium channels in the nervous system. *Channels (Austin)*, 11(6): 534–554.

Wang, C., Wang, N., Li, N., Yu, Q. & Wang, F. (2021) . Combined Effects of Resveratrol and Vitamin E From Peanut Seeds and Sprouts on Colorectal Cancer Cells. *Front. Pharmacol.* 12:760919.

Welch, D.R. & Hurst, D.R. (2019). Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res*, 79(12):3011-3027.

Wisedchaisri, G., Tonggu, L., McCord, E., El-Din, T.M.G., Wang, L., Zheng, N. & Catterall, W.A. (2019). Resting State Structure and Gating Mechanism of a Voltage-gated Sodium Channel. *Cell*, 178(4), 993–1003.e12.

Wong, R.S.Y. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30 (87).

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Colorectal cancer. Globocan 2020.

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Turkey. Globocan 2020.

Wu, H., Liang, X., Fang, Y., Qin, X., Zhang, Y. & Liu J. (2008). Resveratrol inhibits hypoxia-induced metastasis potential enhancement by restricting hypoxia-induced factor-1 α expression in colon carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(9), 613-621.

Wu, Z., Liu, B., Cailing, E., Liu, J., Zhang, Q., Liu, J., Chen, N., Chen, R., & Zhu, R. (2014). Resveratrol inhibits the proliferation of human melanoma cells by inducing G1/S cell cycle arrest and apoptosis. *Molecular medicine reports*, 11: 400-404.

Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., & Hannun, Y.A. (2018) Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nat Commun* 9, 3490.

Xu, J., Liu, D., Niu, H., Zhu, G., Xu, Y., Ye, D., Li, J. & Zhang, Q. (2017). Resveratrol reverses Doxorubicin resistance by inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT) through modulating PTEN/Akt signaling pathway in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res.*, 26;36(1):19.

Yalchin, M., Baker, A.M., Graham, T.A., & Hart, A. (2021). Predicting Colorectal Cancer Occurrence in IBD. *Cancers (Basel)*; 13(12), 2908.

Yang, M., Kozminski, D.J., Wold, L.A., Modak, R., Calhoun, J.D., Isom, L.L., Brackenbury, W.J. (2012). Therapeutic Potential for Phenytoin: Targeting Nav1.5 Sodium Channels to Reduce Migration and Invasion in Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*;134:603–615.

Yang, S.Y., Sales, K.M., Fuller B., Seifalian A.M., & Winslet M.C. (2009). Apoptosis and colorectal cancer: implications for therapy (review). *Cell press, Trends in Molecular medicine*, 15(5), 225-233.

Yeh, C.B., Hsieh, M.H., Lin, C.W., Chiou, H.L., Lin, Y.P., Chen, T.Y., & Yang S.F.(2013). The Antimetastatic Effects of Resveratrol on Hepatocellular Carcinoma through the Downregulation of a Metastasis-Associated Protease by SP-1 Modulation. *PLoS One.* , 8(2): e56661.

Yen, G.C., Duh, P.D. & Lin, C.W. (2003). Effects of Resveratrol and 4-hexylresorcinol on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative DNA Damage in Human Lymphocytes. *Free Radical Research* , 37(5), 509-514.

Yıldırım, S., Altun, S., Gumushan, H., Patel, A. & Djamgoz, M. (2012). Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis in vivo. *Cancer letters*, 323(1), 58–61.

Yi, B.A.& Jan, L.Y. (2002). Ion Channels. *Encyclopedia of the Human Brain*.599-615.

Yousef, M., Vlachogiannis, I.A. & Tsiani E. (2017). Effects of Resveratrol against Lung Cancer: In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrients*, 9(11), 1231.

Yuan, L., Zhou, M., Huang, D., Wasan, H.S., Zhang, K., Sun, L., Huang, H., Ma S., Shen. M., & Ruan, S. (2019). Resveratrol inhibits the invasion and metastasis of colon cancer through reversal of epithelial- mesenchymal transition via the AKT/GSK-3 β /Snail signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 20, 2783-2795.

Zhang S., Cao H.J., Davis F.B., Tang H.Y., Davis P.J., and Lin H.Y. (2004). Oestrogen inhibits resveratrol-induced post-translational modification of p53 and apoptosis in breast cancer cells. *Br J Cancer*, 91(1): 178–185.

Zhang, H., Li, C., Kwok, S.T., Zhang, Q.W. & Chan S.W. (2013). A Review of the Pharmacological Effects of the Dried Root of *Polygonum cuspidatum* (Hu Zhang) and Its Constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013,13.

Zhang, M., Li, T., Zhu, J., Tuo, B., & Liu, X. (2020). Physiological and pathophysiological role of ion channels and transporters in the colorectum and colorectal cancer. *J Cell Mol Med*. 24(17): 9486–9494.

Zhao, Y., Tang, H., Xin, Zeng., Ye, D. & Liu J. (2018). Resveratrol inhibits proliferation, migration and invasion via Akt and ERK1/2 signaling pathways in renal cell carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*,98, 36-44.

Zhou, D.D., Luo, M., Huang, S.Y., Saimaiti, A., Shang, A., Gan, R.Y. & Li H.B. (2021). Effects and Mechanisms of Resveratrol on Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2021: 9932218.

Zulueta, A., Caretti, A., Signorelli, P. & Ghidoni R. (2015). Resveratrol: A potential challenger against gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 21(37): 10636–10643.

