



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**BAZI TIBBİ BİTKİSEL AROMATİK YAĞLARIN KOLOREKTAL
KANSER HÜCRE HATLARINDA APOPTOTİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI VE POTANSİYEL HEDEF GEN
EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burcu BAL

Danışman: Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN

TOKAT- 2023



Bu tez çalışması, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünü tarafından 2021/09 no'lu proje ile desteklenmiştir.

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Ercan ÇAÇAN danışmanlığında hazırlamış olduğum “Bazı Tıbbi Bitkisel Aromatik Yağların Kolorektal Kansere Hücre Hatlarında Apoptotik Etkilerinin Araştırılması ve Potansiyel Hedef Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

.../02/2023

Burcu BAL

JÜRİ KABUL VE ONAY

Burcu BAL tarafından hazırlanan “**Bazı Tıbbi Bitkisel Aromatik Yağların Kolorektal Kansere Hücre Hatlarında Apoptotik Etkilerinin Araştırılması ve Potansiyel Hedef Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 02/02/2023 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Danışman: Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN

Üye: Doç. Dr. Dursun KISA

Üye: Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR

ONAY

...../...../.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimde yolumu aydınlatacak insanlar ile karşılaştırdığı için merhum Prof. Dr. Necmettin YILMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimimde yolumu aydınlatan, bana benden daha çok inanarak destekleyen, sahip olduğu akademik bilgi ve tecrübelerinden koşulsuz fayda sağlayabildiğim değerli danışmanım Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunmamı kabul eden, kattıkları engin bilgileri ve düşünceleri için sayın jüri üyelerine teşekkür ederim.

Çalışmalarında bana bilgi ve desteklerini esirgemeyen ve her koşulda yardımlarını gösteren başta Arş. Gör. Çağlar BERKEL, Arş. Gör. Burak KÜÇÜK, Arş. Gör. Feyzanur YILDIRIMTEPE ve Doç. Dr. Adem KESKİN'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmam süresince desteklerini yardımlarını esirgemeyen Gökçe ULUSOY, Çağla SEVİNÇ, F. Nihan ÇELİK, Aysun KESKİN, Esra YILMAZ ve Bahra NAJİ'ye çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sonsuz sevgi, anlayışları ile beni kuvvetlendirenip yüreklendiren, bana benden çok inanarak destekleyen babam Ömer BAL, annem Gülüzar BAL, babaannem, Ayşe BAL'a teşekkürlerimi sunarım. Her tökezlediğimde en büyük desteği ve sevgiyi benimle paylaşan sevgili Abdulhamit ÇAVDAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tezi canım aileme ithaf ediyorum.

Burcu BAL
ŞUBAT 2023

ÖZET

BAZI TIBBİ BİTKİSEL AROMATİK YAĞLARIN KOLOREKTAL KANSER HÜCRE HATLARINDA APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE POTANSİYEL HEDEF GEN EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ

Bal, Burcu

Yüksek Lisans, Biyoloji Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ercan Çağan
Şubat 2023, xii + 85

Son yıllarda, gelişmekte olan ülkelerde kolorektal kanser insidansı ve ölüm oranı artış göstermektedir. Bu durum kolorektal kanserini, dünyada en sık rastlanılan üçüncü kanser türü yaparken, ölüme neden olan kanserler arasında ikinci sırada yerini korumasını sağlamaktadır. Kolorektal kanser hastalarına cerrahi, kemoterapi ya da radyasyon tedavisi gibi tedaviler uygulansa dahi metastaz veya tekrar nöksler meydana gelebilmektedir. Dolayısıyla kanser patogenezi üzerinde yapılan çalışmalarda, etkili sonuç verebilecek alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alternatif tedavi yöntemlerinden biri de tıbbi bitkilerden elde edilen doğal biyoaktif bileşiklere/fitokiyasallara sahip esansiyel yağlar olarak görülmektedir. Esansiyel yağlar içerdikleri birçok biyoaktif bileşikler sayesinde antimikrobiyal, antiviral, antifungal gibi çeşitli biyolojik aktivite gösterdikleri bildirilmektedir. Bu tez çalışmasında, karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları (HCT-116 ve SW620) üzerindeki apoptotik etkilerin araştırılması hedeflenmiştir. Kolorektal kanserin patogenezi oldukça kompleks olduğundan inflamasyonda ve apoptoziste rol oynayan genlerin ekspresyon düzeyleri bu süreci etkileyebilmektedir. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında apoptosis ve inflamasyonda etkili olan bazı genlerin (*COX-2*, *BCL-2*, *FAS*, *DR4* ve *DR5*) ekspresyon seviyeleri incelendi. Bu amaç doğrultusunda, öncelikli olarak hücre canlılığı MTT testi ile belirlenirken, gen ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile belirlendi. Elde edilen verilere göre, uygulanan her iki esansiyel yağ konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki gösterdi. Uygulanan esansiyel yağlardan karanfil, kekik esansiyel yağına göre HCT-116 hücre hattında daha fazla sitotoksisite gösterirken kekik esansiyel yağı ise karanfile göre SW620 hücre hattında daha fazla sitotoksisite göstermiştir. Buna ek olarak esansiyel yağların HCT-116 ve SW620 hücre hatları üzerinde apoptozu inhibe edici (*BCL-2*) ve *COX-2* genlerin ekspresyon seviyelerinde azda olsa bir düşüş gözlemlendi ancak bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı analiz edildi. Öte taraftan, kekik esansiyel yağının pro-apoptotik gen olan *DR4* ekspresyon seviyelerini her iki kolorektal kanser hücre hatlarında anlamlı bir şekilde arttırdığı, buna ek olarak HCT-116'da *FAS*

ekspresyonunu indükleyebildiği ortaya koyuldu. Sonuç olarak, mevcut çalışmada kullanılan esansiyel yağlardan kekik esansiyel yağın karanfile kıyasla kolorektal kanseri üzerinde potansiyel apoptotik etkileri olduğu ve kanser tedavisinde rol oynayabileceği ortaya koyuldu. Ancak karanfil ve kekik esansiyel yağlarının aktif bileşikleri tanımlamak ve etkinliklerini çözümlmek için daha ileri çalışmaların gerekli olduğunu ifade etmek gerekir.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal Kanser, Inflamasyon, Apoptoz, Esansiyel Yağ, Karanfil Esansiyel Yağı, Kekik Esansiyel Yağı



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE APOPTOTIC EFFECTS OF SOME MEDICINAL HERBAL AROMATIC OILS ON COLORECTAL CANCER CELL LINES AND DETERMINATION OF POTENTIAL TARGET GENE EXPRESSIONS

Bal, Burcu

Master's Thesis, Department of Biology

Advisor: Associate Prof. Dr. Ercan Cacan

February 2023, xii + 85

In recent years, the incidence and death rate of colorectal cancer has increased in developing countries. This makes colorectal cancer the third most common type of cancer in the world while keeping it the second most common cause of death among cancers. Although treatments such as surgery, chemotherapy or radiation therapy are useful to treat colorectal cancer patients, metastases or recurrences may still take place. Therefore, there is a need for alternative treatment methods that can give effective results in cancer pathogenesis studies. One of these alternative treatment modalities is known as essential oils with natural bioactive compounds/phytochemicals which are obtained from medicinal plants. It is reported that essential oils show various biological activities such as antimicrobial, antiviral and antifungal due to the many bioactive compounds they contain. In this thesis, it was aimed to investigate the apoptotic effects of clove and thyme essential oils on the colorectal cancer cell lines (HCT-116 and SW620). Since the pathogenesis of colorectal cancer is quite complex, the expression levels of genes that play a role in inflammation and apoptosis may affect this process. In this thesis study, the expression levels of some genes (*COX-2*, *BCL-2*, *FAS*, *DR4* and *DR5*) that are effective in apoptosis and inflammation were examined. For this purpose, cell viability was determined by MTT test and gene expression levels were determined by qRT-PCR. According to the obtained data, both essential oils that applied showed dose-dependent cytotoxic activities. Clove essential oils showed more cytotoxicity than thyme essential oil. In addition, essential oils treatment slightly decrease the expression levels of apoptosis-inhibiting gene (*BCL-2*) and *COX-2* genes in HCT-116 and SW620 cell lines, but this change was not statistically significant. On the other hand, it was revealed that thyme essential oil significantly increased the expression levels of the pro-apoptotic gene *DR4* in both colorectal cancer cell lines, in addition, it was able to induce *FAS* expression in HCT-116. As a result, it was revealed that thyme essential oil, one of the essential oils used in the current study, has potential apoptotic effects on colorectal cancer compared to clove and may play a role in cancer treatment. However, it should be stated that further

studies are required to identify the active compounds of clove and thyme essential oils and to analyze their efficacy.

Keywords: Colorectal Cancer, Inflammation, Apoptosis, Essential Oil, Clove Essential Oil, Thyme Essential Oil



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK SÖZLEŞMESİ.....	
JÜRİ KABUL ve ONAY	
ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR.....	
ÖZET (TÜRKÇE)	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	
2.1 Kolorektal Kanser	4
2.1.1. Kolorektal kanser epidemolojisi	4
2.1.2. Histolojik ve moleküler yapısına göre sınıflandırma.....	6
2.1.3. Genetik kararsızlık	8
2.1.4. Çevresel ve kalıtsal risk faktörleri	10
2.2. Kolorektal Kanser ve İnflamasyon	11
2.3.Apoptoz.....	12
2.3.1 İntinsik apoptotik yol.....	14
2.3.2 Ekstrinsik apoptotik yol	16
2.4. Tedavi Yöntemleri/Yaklaşımları	18
2.5. Esansiyel Yağlar (Tıbbi Aromatik Bitkiler).....	18
2.5.1. Esansiyel yağların genel özellikleri	18
2.5.2. Esansiyel yağların elde edilme yöntemleri.....	19
2.5.3. Esansiyel yağların biyolojik aktiviteleri ve kullanım alanları.....	22
2.5.4 Karanfil yağı.....	25
2.5.5.Kekik yağı	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal	30
3.2. Metod	30
3.2.1.Hücre kültüre eldilmesi ve yağ dozlarının hazırlanması	30
3.2.2. Hücre ekimi ve MTT uygulaması.....	32
3.3.RNA İzolasyonu ve PCR Analizi	34
3.4. Migrasyon.....	37

3.5. İstatiksel Analiz ve Veri Görselleştirme	37
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	39
4.1. Hücre Canlılık Testleri.....	39
4.1.1. Kekik esansiyel yağının farklı konsantrasyonlarda kolorektal kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi	41
4.1.2. Karanfil esansiyel yağının farklı konsantrasyonlarda kolorektal kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi	43
4.2. Bazı Esansiyel Yağların Apoptotik Genlerin Ekspresyonu Üzerindeki Analizler	44
4.2.1. Karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamele edilen HCT-116 ve SW620 hücrelerinde anti-apoptotik gen Bcl-2 ekspresyon miktarlarının regülasyonu üzerinde potansiyel etkileri	45
4.2.2. Karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamele edilen HCT-116 ve SW620 hücrelerinde inflamasyon ve apoptozda rol oynayan Cox-2 geninin regülasyonu üzerinde potansiyel etkileri	46
4.2.3. Karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamele edilen HCT-116 ve SW620 hücrelerinde proapoptotik bir gen olan Fas geninin regülasyonu üzerinde potansiyel etkileri	47
4.2.4 Karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamele edilen HCT-116 ve SW620 hücrelerinde Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü DR4 geninin regülasyonu üzerinde potansiyel etkileri	48
4.2.5 Karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamele edilen HCT-116 ve SW620 hücrelerinde Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü DR5 geninin regülasyonu üzerinde potansiyel etkileri	49
4.3. Kekik ve Karanfil Esansiyel Yağları İle Muamele Edilen Hücrelerin (HCT-116) Migrasyonu Üzerindeki Etkisi	50
4.4. Veri Tartışması	56
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	61
6. KAYNAKÇA	63
7. ÖZGEÇMİŞ.....	82

Kısaltmalar ve Simgeler Listesi

KISALTMALAR

ATP: Adenozin Tri Fosfat
Bax: Bcl-2 ile ilişkili X
Bcl-2: B Hücreli Lenfoma-2
CIMP: CpG Adası Metilatör Fenotipi
CIN: Kromozomal Kararsızlık
Cox-2: Siklooksijenaz-2
DcR: Yem Reseptörü
DISC: Ölüme Neden Olan Sinyal Kompleksi
DMSO: Dimetil Sülfoksit
DNA: Deoksiribonükleik Asit
DR: Ölüm Reseptörü
EDTA Etilendiamin Tetraasetik Asit
EY: Esansiyel Yağ
FADD: Fas ile ilişkili Ölüm Alanı
FBS: Fetal Bovine Serum
GAPDH: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
IL: İnterlökin
KRK: Kolorektal Kanser
MMR: Yanlış Eşleşme Tamiri
MOMP: Mitokondriyal Dış Membrane Geçirgenliği
MSI: Mikro Uydu Kararsızlığı
MTT: (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür)
NF-kB: Nükleer Faktör Kappa B
OPG: Osteoprotegerin
PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PGE-2: Prostaglandin E-2
RNA: Ribonükleik Asit
TNF: Tümör Nekroz Faktör
TNFRSF: Tümör Nekroz Faktörü Süper Ailesi
TRADD: TNF-1 ile ilişkili Ölüm Alanı
TRAIL: Tümör Nekroz Faktör ile ilişkili Apoptozu İndükleyen Ligand
WHO: World Health Organization
µL: mikro litre

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 2.1. Global kanser vakaları ve ölüm sayıları (WHO - World Health Organization, 2020)	5
Şekil 2.2. Dünya’da yaşa göre standardize edilen kolorektal kanserin insidans ve mortalitesi (WHO - World Health Organization, 2020)	6
Şekil 2.3. Apoptotik Sürecin Şematik Gösterimi	14
Şekil 2.4. Kekik esansiyel yağın bazı ana bileşenleri.....	28
Şekil 4.1. Farklı kekik konsantrasyonlarının kolorektal kanser hücre hatlarında canlılık yüzdesi ve IC50 değerinin belirlenmesi	40
Şekil 4.2. Karanfil konsantrasyonlarının kolorektal kanser hücre hatlarında canlılık yüzdesi ve IC50 değeri belirlenmesi	40
Şekil 4.3. HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi ile kekik yağının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	41
Şekil 4.4. SW620 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi ile kekik yağının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	42
Şekil 4.5. HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi ile karanfil yağının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	43
Şekil 4.6. SW620 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi ile karanfil yağının hücresel sitotoksik etki verileri	44
Şekil 4.7. Karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları HCT-116 ve SW620 üzerinde uygulanması ile anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2 gen ekspresyon miktarları.....	46
Şekil 4.8. Karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları HCT-116 ve SW620 üzerinde uygulanması ile inflamatuvar bir gen olan Cox-2 gen ekspresyon miktarları.....	47
Şekil 4.9. Karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları HCT-116 ve SW620 üzerinde uygulanması ile apoptotik bir gen olan Fas gen ekspresyon miktarları..	48
Şekil 4.10. Karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları HCT-116 ve SW620 üzerinde uygulanması ile apoptotik bir gen olan DR4 gen ekspresyon miktarları	49
Şekil 4.11. Karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları HCT-116 ve SW620 üzerinde uygulanması ile apoptotik bir gen olan DR5 gen ekspresyon miktarları	50
Şekil 4.12. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamelesinin ardından ilk 0., ve 24., saatte hücre mikroskopik görüntüleri	51
Şekil 4.13. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamelesinin ardından ilk 48., ve 96., saatte hücre mikroskopik görüntüleri	52
Şekil 4.14. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında karanfil ve kekik esansiyel yağlarının 0.1 µl’lik konsantrasyonu ile muamelesinin ardından ilk 0., ve 24., saatte hücre mikroskopik görüntüleri	53

Şekil 4.15.HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamelesinin ardından ilk 48., ve 96., saatte hücre mikroskopik görüntüleri 55



TABLO LİSTESİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 2.1. Çeşitli yöntemler kullanılarak elde edilen bazı esansiyel yağların ekstraksiyonları	19
Tablo 2. 2. Bazı esansiyel yağların ekstrakte edildiği bitkiler, önemli bileşikleri ve esansiyel yağ miktarları	21
Tablo 2.3. Bazı bitkilerin antimikrobiyal aktivite gösteren bileşenleri ve bileşen sınıfları. 23	
Tablo 3.1. Deney çalışmasında kullanılan ekipman ve malzemeler	30
Tablo 3.2. Yağ konsantrasyonlarının hazırlanması	32
Tablo 3.3. qRT-PCR analizinde kullanılan primer sekansları	35
Tablo 3.4. qRT-PCR deneylerinde kullanılan her reaksiyonun hacimleri.....	36
Tablo 3.5. Tek adımlı PCR işlemi için gereken aşamaları	36
Tablo 4.1. Karanfil ve kekik yağı uygulanan kolorektal kanser hücre hatları için IC50 değerleri...41	

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK), kolon ve rektum kanserlerini içine alan ve dünyada ölüme neden olan kanserler arasında ikinci sırada yer almaktadır (Shaukat & Levin, 2022). KRK'nin sıklıkla tekrar etmesi ve diğer organlara (karaciğer, akciğer yumurtalık vb.) metastaz yapması ile ileri aşamalarda kanser hastalarının beş yıllık sağ kalımını %10'a düşürmektedir (Y. Liu ve ark., 2022). Kolorektal epitelyumun, karsinoma dönüşmesinde progresif inhibisyon ya da apoptozdan kaçmanın neden olduğu ileri sürülmektedir (Hanahan & Weinberg, 2000). Bu durum apoptoz disfonksiyonunun kolorektal tümör oluşumunda önemli etken olduğunu göstermektedir. Bu yüzden apoptozun kolorektal kanserin gelişmesindeki rolünün anlaşılması, KRK tedavisinde yeni yaklaşımlar için hedef haline gelmektedir (S. Y. Yang ve ark., 2009).

Programlanmış hücre ölümü olarak da ifade edilen apoptoz, çok hücreli organizmalarda stresi yönetmek ve aynı zamanda doku homeostazını korumak için gerekli, korunmuş bir programlı hücre ölüm şeklidir (L. Zhang & Yu, 2013). Apoptotik sürecin başlatılması ve devam ettirilmesi düzenleyici ve efektör bileşenler tarafından sağlanmaktadır. Düzenleyicilerden biri hücre içi çeşitli sinyalleri algılayan ve entegre eden içsel yolak, diğeri de hücre dışı ölümü tetikleyen sinyalleri alan ve işleyen dışsal yolaaktır (Hanahan & Weinberg, 2011). İçsel apoptotik yolağın düzenleyicisi BCL-2 protein ailesi, anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerden oluşmaktadır (Tian ve ark., 2020). Bu pro- ve anti- apoptotik protein seviyelerinde oluşabilecek dengesizlik kolorektal kanserin ilerlemesine neden olabilmektedir (Yu ve ark., 2022). Dışsal apoptotik yolağın üyeleri de, kolorektal kanserin potansiyel biyobelirteci olan terapötik hedeflerdendir (Abraha & Ketema, 2016). Dışsal apoptotik yolağın indüklenmesi ise TRAIL, FasL veya TNF gibi ligandların ölüm reseptörleri ile etkileşime girmesiyle gerçekleşmektedir. Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL), normal hücrelerde değil fakat birçok tümöral hücrelerde eksprese olup apoptozu indükleyen tip iki transmembran proteinidir. TRAIL reseptörlerinden ölüm reseptörleri DR4 (TRAIL-R1) ve DR5 (TRAIL-R2)'e bağlanarak apoptozu indüklemektedir (Koornstra ve ark., 2005). Bununla birlikte, kolorektal kanser dahil birçok kanser hücresinde bu ölüm reseptörlerinin azaltılmış ekspresyonu ya da TRAIL yolağı ile ilişkili anti-apoptotik proteinlerin artan ekspresyonu nedeni ile TRAIL tarafından indüklenen apoptoz sinyallere direç gösterebilmektedir (Stolfi ve ark., 2012). Tümör nekroz faktörü reseptör aile üyelerinden bir diğeri FAS (CD95, TNFRSF6)'dır. FAS ligandı ve agonistik reseptörü ile etkileşimi

apoptozu tetiklemektedir. FAS ligandı ve agonistik reseptörü arasındaki bu etkileşimin bozulması ile tümöral gelişim gözlenmektedir (Cacan, 2016). Dolayısıyla, TRAIL ve Fas reseptörlerinin işlev bozukluğu, tümöral hücrelerin bağışıklık tepkilerinden kaçmasına ve bu sayede gelişmesine avantaj sağlamaktadır. Apoptozun baskılanması, kolorektal kanserin başlaması ve gelişim gösterebilmesi için önem teşkil etmektedir. Apoptozun baskılanmasında etkin role sahip olan birçok faktörlerden biri de COX-2 ekspresyonudur (S. Y. Yang ve ark., 2009). COX-2, büyüme faktörleri ve proinflatuar sitokinler tarafından tetiklenir ve başta kolorektal kanser olmak üzere birçok premalign ve malign lezyonlarda aşırı eksprese edilmektedir (Koehne & Dubois, 2004). Kolonik epitel hücrelerde, COX-2'nin aşırı ekspresyonunun apoptoza direnç oluşturduğu ve böylece de hücrenin yapısal özelliklerinde değişimlere neden olarak tümöral yayılmaya katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Eberhart ve ark., 1994). Dolayısıyla apoptozun aktivasyonu, kolorektal kanser dahil kanser tedavisi için hedef bir yaklaşımdır. Bu yüzden tümöral hücrelerde apoptozun uyarılması, radyasyon tedavisi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler için önemli bir sitotoksik mekanizmadır (L. Zhang & Yu, 2013).

Kanserin yapı ve evresine bağlı olarak cerrahi müdahaleden sonra en çok tercih edilen tedavi yöntemleri arasında kemoterapi ve radyoterapi yer almaktadır. Fakat bu tedavi yöntemleri, hedefe spesifik olmadıkları zaman tümöral hücrelerle birlikte sağlıklı hücreleride hedef alabilmektedir (Cacan & Ozmen, 2020). Bu yüzden, kanser patogenezi üzerinde yapılan çalışmalarda etkili yeni doğal bileşiklerin ön planda olduğu alternatif tedavi yöntemlere ihtiyaç vardır.

Tıbbi bitkiler ve yapılarında bulunan fitokimyasallar/biyobileşikler, kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri bildirilmiştir. Dolayısıyla, bu tıbbi bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar; anti-inflatuar, anti-oksidan ve anti-kanser etkileri nedeniyle popülerlik kazanmaktadır (Jamali ve ark., 2021; Süntar ve ark., 2018). Karanfil (*Syzygium aromaticum* L.) esansiyel yağı mutfakta ve geleneksel tıpta en çok tercih edilen aromatik bileşiklere sahip esansiyel yağlardan biridir. Geleneksel tıpta özellikle güçlü analjezik ve antiseptik yapısından dolayı diş tedavilerinde kullanılırken sonraki çalışmalarda, karanfilin zengin fitokimyasal içeriği sayesinde, antibakteriyel, antioksidan, antiinflatuar, antiviral, antifungal gibi özellikleri de bildirilmiştir. Karanfile atfedilen tıbbi ve farmakolojik işlevselliğin çoğunu, ana bileşenlerinden öjenol başta olmak üzere biyoaktivlik gösteren bileşikler tarafından gerçekleştirilmektedir (Kunnumakkara ve ark., 2009; Otunola, 2022; Ouadi ve ark., 2022). Yakın zamanda yapılan araştırmalarda

karanfil esansiyel yağının kanser hücrelerinde apoptotik etki gösterebildiği de bildirilmiştir (Abadi ve ark., 2022; Banerjee ve ark., 2006; Ghosh ve ark., 2005). Bir diğeri ise, kekik (*Thyme vulgaris* L.) esansiyel yağıdır. Yaygın farmakolojik etkileri sebebiyle uzun yıllardır geleneksel tıpta üst solunum yolları enfeksiyonuna ve diş eti iltihabına karşı antiseptik bileşen olarak kullanılmaktadır (Russo ve ark., 2015). Birçok çalışmaya konu olan kekik esansiyel yağı, güçlü antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antiinflamatuvar gibi özellikleri de bulunmaktadır (Niksic ve ark., 2021). Önce ki çalışmalar, kekik esansiyel yağının kanser hücre hatları üzerinde sitotoksitesini bildirmektedir. Ayrıca kekik yağının kanser hücrelerinde gösterdiği antiproliferatif etkisi farklı sinyal yolları ile de ilişkilendirmiştir (Sertel ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasında, karanfil esansiyel yağı ve kekik esansiyel yağlarının farklı miktarlarda uygulanan konsantrasyonları, kolorektal kanser hücre hatları üzerinde apoptotik etkisi araştırılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, kolorektal kanserinin gelişmesi ile ilişkilendirilmiş inflamasyonda ve apoptotik mekanizmada rol oynayan genlerin (BCL-2, COX-2, FAS, DR4 ve DR5) ekspresyon seviyelerine etkileri incelenmiştir. Uzun yıllardır alternatif tedavi yöntemlerinde kullanılan karanfil ve kekik esansiyel yağların kolorektal kanser hücre hatlarının apoptotik süreç ve bu süreçte apoptozda ve inflamasyonda rol oynayan hedef genlerin ekspresyon seviyelerine de etki edebildiği gözlemlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kolorektal Kanser

Kolon ve rektum kanseri kolorektal kanser adı altında sınıflandırılmaktadır. Kolorektal kanserin meydana gelişi, üç farklı durum ile bağdaştırılmaktadır. Birinci durum, kolon ve rektal kanserleri kalın bağırsakta oluşması, ikinci durum, mukoza ve kas tabakasını içerisinde bulunduran kolon ve rektum duvarlarının anatomik ve histolojik yapısının birbirine benzer olması, üçüncü olarak da sıvı emilimi, dışkının konsantrasyonu, dışkının taşınması ve dışkının atılımı gibi benzer sistemler tarafından meydana gelmektedir (Alzahrani ve ark., 2021). Kolonik epitel yapısı, hücresel poliferasyonun apoptoz tarafından dengede tutulmasıyla korunmaktadır (Ramachandran ve ark., 2000). Bu denge birçok sinyal yollarının işlevselliğiyle korunurken, bağırsak kriptası yapısındaki hücrelerin çoğalmasına, farklılaşmasına ve apoptotik yolların koordinasyonuna etki etmektedir (Augenlicht ve ark., 1999). Dolayısıyla kolorektal patogenezi gelişmesinde özellikle genomik ve epigenomik kararsızlık söz konusuysa, hücre çoğalması, farklılaşması ve programlı hücre ölümü gibi hücresel olaylarda yer alan genlerin mutasyonları ve beraberinde değişim gösteren sinyal yolları önem arz etmektedir (Yılmaz, 2019).

2.1.1.Kolorektal kanser epidemolojisi

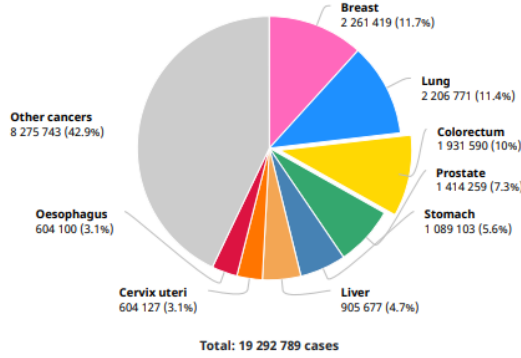
Kolorektal kanser, 2020 yılı verilerine göre; yılda 1,931,590 yeni vaka ile en çok rastlanılan 3. kanser ve aynı zamanda, yılda yaklaşık 935,173 ölüm ile en çok ölüme neden olan 2. kanserdir. Bu istatistiksel verilere göre, 10 kanser hastasından 1'inin kolorektal kanser nedeniyle öldüğüne karşılık gelmektedir (Şekil 2.1.) (Sung ve ark., 2021; Ünlü, 2022).

Colorectal cancer

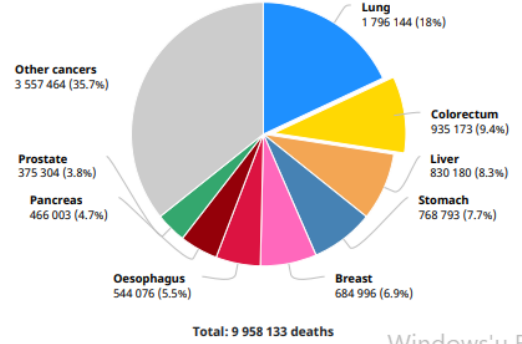
Source: Globocan 2020



Number of new cases in 2020, both sexes, all ages



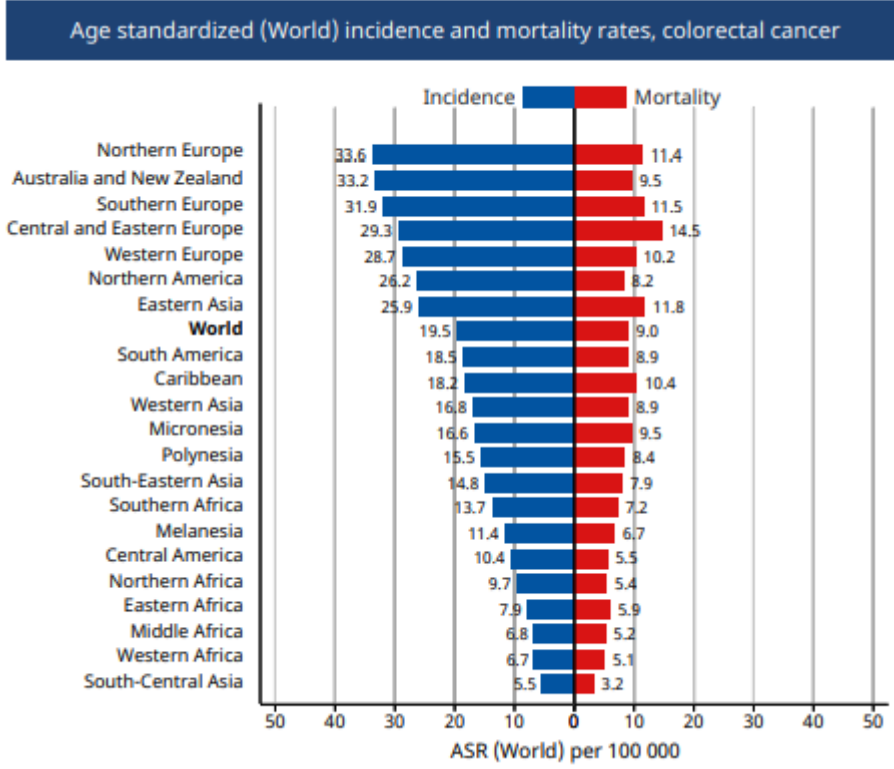
Number of deaths in 2020, both sexes, all ages



Windows'u Etkir

Şekil 2.1. Global kanser vakaları ve ölüm sayıları (WHO - World Health Organization, 2020)

Kolorektal kanser, ABD’de verilerine göre, en sık görülen kanserler arasında 4., en çok ölüme neden olan kanser çeşitleri arasında 2. sıradadır (Sung ve ark., 2021; Ünlü, 2022). Türkiye verilerine göre ise, kadın ve erkeklerde üçüncü sırada yerini almaktadır (Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2021). Kolorektal kanserin, 50 yaş ve üzeri bireylerde görülme olasılığı genç bireylerde görülme olasılığından yüksektir ve ölümlerin %90’ı 50 yaşından sonra ortaya çıkarken, aynı zamanda sosyal ve ekonomik bakımdan gelişmiş ülkelerde, %70 gibi daha düşük bir oran sergilemektedir (Şekil 2.2.) (Keum & Giovannucci, 2019; Yılmaz, 2019).



Şekil 2.2. Dünya’da yaşa göre standardize edilen kolorektal kanserin insidans ve mortalitesi (WHO - World Health Organization, 2020)

Kolorektal kanser Avrupa, Kuzey Amerika ve okyanus ülkelerinde yüksek insidans gösterirken; Güney, orta Asya ve Avrupa’daki ülkelerin bir kısmı daha düşük insidans göstermektedir (Yılmaz, 2019), Amerika birleşik devletlerinde ise, insidans ve mortalite yavaş bir azalma göstermektedir (Şekil 2.2.) (J. Zhang & Yang, 2021). Dünya genelinde kanser insidansının ve mortalitesinin artışına, nüfus çoğalması, yaş artışı ve sosyoekonomik durum sebep olabilmektedir (Sung ve ark., 2021).

2.1.2. Histolojik ve moleküler yapısına göre sınıflandırma

Kolorektal kanser tümörleri, önceki yıllarda homojen tümör olarak benimsenirken daha sonra aslında homojen olmadığı, aksine histolojik ve moleküler olarak heterojen yapısı olduğu bildirilmiştir (Harpaz ve ark., 2020). Kolorektal kanser histolojik özelliklerine göre; müsinöz adenokarsinom, medüller karsinom, skuamöz hücreli karsinom, taşlı yüzük hücreli karsinom, adenoskuamöz karsinom, farklılaşmamış karsinom ve küçük hücreli karsinom olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Alzahrani ve ark., 2021; Fleming ve ark., 2012). Kolorektal kanserin büyük bölümü karsinomdur ve bu karsinomun %90’ından daha fazlasını ise adenokarsinom oluşturmaktadır. Geriye kalan

adenoskuamöz, içsi skuamöz gibi karsinomlara çok rastlanılmamaktadır (Recio-Boiles ve Cagır 2021). Adenokarsinom, histolojik tümörün gelişimsel sürecinin sınıflandırmasında orijin olarak glandülerin (bez) gelişmesini baz alınmaktadır. Bu farklılaşma sürecinde çoğunlukla iyi (>%95), orta (%50-95) ve kötü (<%50) bez oluşumuna göre de derecelendirilmektedirler (Fleming ve ark., 2012).

2.1.2.1 Kolorektal Kanserin Moleküler Yapısına göre Sınıflandırılması

Protoonkogenler, büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi hücresel süreçlerin sinyal ileti mekanizmasında rol oynayan birçok proteinin sentezinde görev üstlenmektedirler (Yokuş & Çakır, 2012). Proonkogene herhangi bir mutasyondan kaynaklı, DNA replikasyonunda, genlerin transkripsiyonunda ve translasyonunda ya da aktivitelerinde değişiklikler meydana gelebilmektedir. Yapısal ya da fonksiyonel değişiklikler sonucunda ekspresyonlarda gözlemlenen bozulmalar sonucunda kanser hücrelerinde etkin olan onkogenlere dönüşebilmektedir (Aliustaoğlu, 2009; Kontomanolis ve ark., 2020). Hücre büyümesi, çoğalması veya farklılaşması gibi hücre gelişimde rolü olan bu onkogenlerden kaynaklı mutasyonlar tümöral gelişmeye neden olurken, tümör baskılayıcı genlerde oluşum gösteren mutasyonlar ise hücre döngüsünün inhibe olmasını engelleyerek hücrenin anormal büyümesine neden olmaktadır (Cabadak, 2008).

Tümör baskılayıcı genler, hücrenin poliferasyonunda, büyümesinde, hücre döngüsünde rol alan aynı zamanda DNA tamir mekanizmasını tetikleyen ve işlevselliği sorun teşkil ettiğinde hücreyi apoptoza yönlendiren genlerdir (Kacı, 2018). Fakat mutasyonların meydana gelmesi ile gözlemlenen onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile birçok kanser gelişim gösterebilmektedir (Bütüner, Debeleş & Kantarcı, 2006). Ayrıca DNA onarımında işlevsellik gösteren genler de kanser gelişmesinde hedef genler arasındadırlar (Yokuş & Çakır, 2012). DNA tamir genleri, hücre döngüsünde rol alan ve aynı zamanda DNA hasara maruz kaldığında tamirinde görevi bulunan proteinlerin o bölgeye yönlendirerek, genin işlevselliğini tekrardan kazandırmayı sağlayan gen grubudur. DNA tamir mekanizmasında oluşabilecek işlevsizlik hücrenin apoptoza ya da nekroza sürüklenmesini sağlamaktadır (Kacı, 2018; Baykara, 2016). DNA onarım genlerinde oluşan hatalar genetik kararsızlığa sebebiyet verebilmektedir. Örneğin, onarım mekanizmalarından biri olan hatalı eşleşmenin onarımında meydana gelen bir bozukluk, kalıtsal non-polipozal kolorektal kansere sebep olurken, baz çıkarma onarımında gelişen bozukluk kolorektal kansere neden

olabilmektedir (Bütüner, Debeleş & Kantarcı, 2006). Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım mekanizmaları ile ilişkili genleri hedef alan mutasyonlar tarafından kolorektal kanser gelişebilmektedir (Alzahrani ve ark., 2021). Mutasyon kaynağı olarak kolorektal karsinom %70 sporatik, %25 ailesel ve %5 kalıtsal olarak kategorize edilebilir. Bu gelişimsel süreçte genetik ve epigenetik mekanizmalar rol oynamaktadır (Mármol ve ark., 2017).

2.1.3. Genetik kararsızlık

Kolorektal kanser, genetik ve epigenetik kararsızlıklarla karakterize olan heterojen ve karmaşık bir yapıya sahiptir. Kolorektal kanserin gelişmesine neden olan genomik kararsızlık üç ana tip: kromozomal kararsızlık (CIN), mikrosatellit instabilite (MSI) CpG-ada medilatör fenotip (CIMP)'ı içermektedir (Picard ve ark., 2020).

2.1.3.1. Kromozomal İnstabilite (CIN)

Kolorektal kanserlerin %85'ini oluşturan en yaygın genomik instabilite tipidir (Migliore ve ark., 2011; Singh ve ark., 2021). Aynı zamanda sporatik kolorektal kanserlerin %65-70'ini kapsamaktadır (El Bali ve ark., 2021). CIN, kromozomal seviyede inversiyon, delesyon, insersiyon gibi genetik düzenlemeleri veya kromozomal bileşimleri sıklıkla değişmektedir. CIN'a sebep olarak görülen gen, hücre döngüsü kontrol noktaları, mitotik iğ kontrol noktası genleri, kromozom yoğunlaşması veya ayrılması ile ilgili genlerle karakterize edilmiştir. İstatiksel veriler, kromozomal kararsızlık ile ilişkilendirilmiş tümörlerde APC, KRAS, SMAD4 ve TP53 genlerindeki mutasyonların anlamlı derecede artışının temsil ettiğini tanımlamışlardır (Geigl ve ark., 2008; Hagland ve ark., 2013). Tümör süpressör genlerin inaktivasyonu (APC ve TP53), onkogenlerin aktivasyonu (KRAS ve BRAF) ve heterozigotluk kaybı (LOH) ile kolorektal karsinogenez oluşumu teşvik edilebilmektedir (Malki ve ark., 2020).

2.1.3.2. Mikrosatellit İnstabilitesi (MSI) ara yolu

Mikrosatellitler, genom boyunca yayılmış kısa tekrarlar sahip nükleotid dizileridir (Al-Sohaily ve ark., 2012). 1-6 baz çiftinden oluşan bu tekrarlı DNA dizileri, insan genomun %3'ünü kapsamaktadır (Nouri Nojadedh ve ark., 2018). Tekrarlı diziler replike olurken hataya meyillidirler. DNA uyumsuzluk onarım sistemi (DNA mismatch repair) (MMR), replike sırasında oluşan baz çifti uyumsuzluklarını ve mikrosatellitlerin tekrarlayan

dizilerindeki çerçeve kaymalarını tanımlayıp, onarmaktadır (Al-Sohaily ve ark., 2012). MMR onarım sisteminin ana proteinleri MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 ve PMS2'dir. Bu ana proteinlerde oluşabilecek germline mutasyonları, kalıtsal polipoz olmayan kolorektal kanser (Lynch sendromu) oluşumuna sebep olabilmektedir (Vilar & Gruber, 2010). MMR somatik mutasyonu ya da hipermetilasyon susturulması sporatik kolorektal kanserlerin %15-20'sini karakterilize etmektedir (Al-Sohaily ve ark., 2012). MMR genlerindeki eksiklik, diğer mutasyonları da beraberinde getirebilmektedir. Örneğin, MSI bulunan genlerde BAX ve TGF β R2 genlerinin kodlama dizileri de bulunmaktadır. Dolayısıyla oluşan bir çerçeve kayması mutasyonu, MSI tümöral gelişmelerin yaklaşık %35'inde, BAX genini etkisizleştirmektedir. BAX genindeki ekspresyon değişiklikleri, BCL-2 aracılığıyla apoptoz yolağına etki ederek karsinogenezin gelişimini destekleyebilmektedir (Fernández-Peralta ve ark., 2005).

2.1.3.3. Epigenetik Kararsızlık (CpG Adası Metilatör Fenotipi (CIMP))

DNA, bir organizmanın oluşması için gerekli olan tüm bilgileri yapısında kodlamaktadır. Bu kodlanan bilgiler ile normal dokularda uygun gelişim ve hücrel farklılaşma gibi süreçlerin gerçekleşebilmesi için epigenetik mekanizma gereklidir (Iacobuzio-Donahue, 2009). Epigenetik mekanizmalar, DNA dizisinde herhangi bir değişikliğe neden olmadan gen ifadesindeki kalıtsal değişikliklerdir (Kwon & Shin, 2011). Epigenetik mekanizmalarda meydana gelen modifikasyonlar bazıları, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, kodlanmayan RNA'ları ve kromatinin yeniden modellenmesini içermektedir (Ghadiri Moghaddam ve ark., 2022). Epigenetik modifikasyonlardan biri olan DNA metilasyonu, hedef geni susturmak için hücreler tarafından kullanılan bir mekanizmadır (Ali ve ark., 2013; Cacan ve ark., 2014). İnsan tümörlerinde, tümör baskılayıcı genlerin CpG motiflerince zenginleştirilmiş promotor bölgelerinde meydana gelen DNA hipermetilasyonu transkripsiyonel inaktivasyon ile ilişkilendirilmektedir (Berkel ve Cacan, 2020; Pancione ve ark., 2012).

Kolorektal kanserde CIMP (CpG ada metilatör fenotipi), CIN ve MSI 'ye ek olarak ayrı bir epifenotiptir. Ayrıca kolorektal kanserin gelişmesi bu hipermetilasyon ile desteklenmektedir (Advani ve ark., 2021). Bununla birlikte, DNA'nın CpG metilasyonu, BRAF ve MLH1 gibi birçok genlerin ekspresyonu aktive ya da inhibe edebilmektedir (Lotfollahzadeh ve ark., 2022). Örneğin, CpG ada metilasyonu tarafından oluşan BRAF mutasyonu kolorektal kanserinin %10-15'inde mevcuttur. Aynı zamanda RAF-MAPK yolağı ile düzenlenen BRAF mutasyonu, inflamasyonla ilişkilendirilen COX-2

ekspresyonunu tetikleyebilmektedir (Kosumi ve ark., 2019). Aşırı COX-2 ekspresyonu ise kolorektal kanserin gelişmesini engellemek için terapötik hedef olarak görülmektedir (Eberhart ve ark., 1994).

2.1.4. Çevresel ve kalıtsal risk faktörleri

Kolorektal kanserin heterojen yapısı hem genetik hemde çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Diyet ve yaşam tarzı kolorektal kanser instabilitesine etki eden unsurlardan biridir (Keum ve giuvanucci, 2019). Yüksek diyet lifi, balık ve kalsiyum kolorektal kanserinin insidansında azaltma ile ilişkili gösterilirken, yüksek kalorili beslenme ve yağ tüketimi kolonda epigenetik düzenlemelere sebep olabilecek genom kararsızlıkları ile ilişkilendirilmiştir (Aran ve ark., 2016). Buna ek olarak, yeterli tahıl veya süt ürünleri tüketimi de risk oranını azaltabilmektedir (Sung ve ark., 2021). Bunların dışında sigara tüketmek, kolorektal kanser insidansını ve mortalitesini etkileyen risk faktörlerinden biridir (Murphy ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda aşırı sigara içenlerde kolorektal kanserin görülme riski 2-3 kata çıktığı bildirilirken (Giovannucci, 2001). kolorektal kanser ölümlerinin %12'sinin sigara kullanımından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Thélin & Sikka, 2015). Bir diğer faktör alkol tüketimidir. Alkol kullanımı kolon patolojisinin erken aşaması ile ilişkilendirilir ve adenomu olan hastalarda aşırı alkol tüketimi kolorektal kanser gelişimini arttırabilmektedir (Bardou ve ark., 2002; Rueda ve ark., 2012). Aynı zamanda bağırsak mikrobiyomu, cinsiyet ırk, yaş ve sosyoekonomik durumlar da kolorektal kanser riskini arttırabilmektedirler (Sawicki ve ark., 2021).

2.2. Kolorektal Kanser ve İnflamasyon

Fiziksel, kimyasal ya da enfeksiyöz doku yaralanmalarında inflamasyon oluşumunu tetikleyen reaksiyonlar meydana gelmektedir. İnflamasyon, bu yaralanmalara sebep olan ajanı ortan kaldıran doğal/adaptif bağışıklık tepkisini indükleyerek doku onarımını gerçekleştiren önemli mekanizmadır. Yaralanmaya neden olan istilacının ortandan kaldırılması ve yara iyileşmesi ile iltihaplanma azalmaktadır (Eiró & Vizoso, 2012). Ancak bağışıklığın kontrol halinde tutamadığı bir inflamasyon kronikleşmektedir. Kronikleşen inflamatuvar yanıt ise, tümöral oluşumların gerçekleşmesinde gerekli olan,

poliferasyon, invazyon, anjiyogenez ve metastaz gibi adımlarda işlev görmektedir (Hirano ve ark., 2020).

Tümör ile ilişkili inflamasyon, tümör büyümesini ve anjiyogenezi yönlendirir, bu yönlendirme sırasında çeşitli sinyallere yanıt olarak immün, stromal ve tümör hücreler tarafından oluşturulan geniş bir sitokin ve kemokin ağı sayesinde süreci devam ettirebilmektedir. Bu inflamasyonda sitokinler (IL-1, TNF, IL-6, IL-23) ve transkripsiyon faktörleri (AP-1, NF- κ B, STAT3) hem inflamasyonda hemde tümöral büyümede önemli role sahiptir (Grivennikov ve ark., 2010). TNF- α (Tümör nekroz faktörü alfa) TNF süper aile üyeleri arasında en güçlü proinflamatuvar sitokinlerden biridir (X. Liu ve ark., 2022). TNF- α , hücre poliferasyonu, farklılaşması ve hücre ölümü gibi süreçlerin gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. Ancak TNF- α ve reseptörleri arasındaki etkileşim, iki farklı yolu tetikleyebilmektedir (Ivanov & Hei, 2006). Bunlardan ilki, ölüm sinyal yolu; TNF R-1 ölüm reseptörü, ya TNF1 ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) proteini ya da Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) proteini tarafından tanınıp etkileşim gösteren, serin/treonin protein kinaz 1 (RIPK1) ve prokaspaz-8'i bulunduran sinyal kompleksinin meydana gelmesini tetiklemektedir. Kompleksin aktivasyonu ardı sıra, efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) dahil olmakta ve proteolitik bölünme meydana gelebilmektedir ya da BCL-2 protein ailesini (içsel yolağı) dahil ederek de apoptoza neden olabilmektedir (Bertheloot ve ark., 2021).

İkinci tektiklediği yol ise, TNF- α 'nın TNFR1'i uyarmasının ardından TRAF2 de ardarda inhibitör nükleer faktör kappa B kinaz (NF- κ B) ve jun N terminal kinazın tetiklenmesi ile transkripsiyon faktörler, NF- κ B ve c-Jun'un aktivasyonu gerçekleşmektedir (Ivanov & Hei, 2006). Aynı zamanda bu NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonu tümöral hücreler de COX-2 aktivasyonu tetiklenebilmektedir (Kaneura ve ark., 2002).

COX-2, hücre poliferasyonu, hücre transformasyonu, tümöral büyüme, tümöral metastazda ve tümöral invazyonda düzenleyici olarak görev alarak kanserin gelişmesine ve ilerlemesine katkı sağlayabilmektedir (Roelofs ve ark., 2014). COX-2'nin ekspresyon seviyelerindeki artış insan kanser hücrelerinin poliferasyonunu arttırmakta, apoptoz inhibisyonunu sağlayarak serviks, yumurtalık, akciğer, kolon ve rektum gibi birçok katı tümörlerin gelişmesine olanak tanımaktadır (Chou ve ark., 2006). Yapılan araştırmalarda COX-2 ekspresyonunun kolorektal kanserin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili olup prognozunda rol oynadığı bildirilmiştir (Sheehan ve ark., 1999). Ek olarak, COX-2 geni,

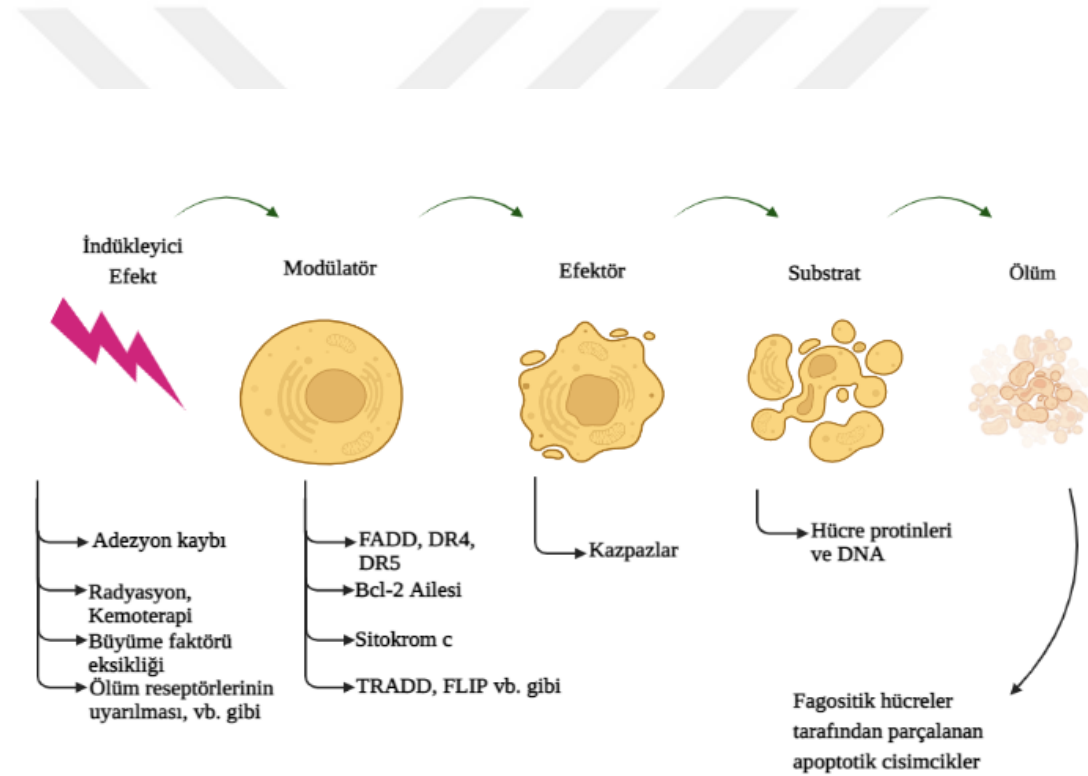
kolon karsinom inflamasyonunda görev alan prostaglandin üretimi için önem teşkil eden bir faktördür. PGE2 (prostaglandin E2) diğer dokulardan farklı olarak kolorektal kanserin gelişimi ve ilerlemesinde direkt ilişkisi vardır (Hagland ve ark., 2013; Y. Liu ve ark., 2008). Kolorektal kanserin oluşmasını tetikleyen bu mekanizma hücre içi sinyal transdüksiyon yollarının aktivasyonunu sağlayarak hücrelerin artan poliferasyonunu ve hücre büyümesini tetiklerken apoptozun inhibisyonuna neden olabilmektedir (Koehne & Dubois, 2004). Dolayısıyla, COX-2 enzim aktivitesinin spesifik farmakolojik inhibitörler tarafından inhibe edilebilmesi, hem inflamasyonun hem de bazı durumlarda kanser gelişiminin kontrol altında tutulabilmesi için etkili bir araç olabileceğini göstermektedir (Ivanov & Hei, 2006).

2.3.Apoptoz

Apoptoz terimi ilk olarak Kerr ve arkadaşları tarafından 1972’de, “hücre ölümünün morfolojik bir formu” olarak ifade edilmiştir (Eröz, 2012; Elmore, 2007; Kerr ve ark., 1972). Başka bir ifade ile apoptoz, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçler sonucunda programlı bir hücre ölüm biçimidir (Fulda & Debatin, 2006). Bu apoptotik süreçte, kromatin materyalinin yoğunlaşması, çekirdekte bulunan DNA’nın fragmentlerine ayrılması, hücre büzülmesinin ardından dinamik membran kabarması ile hücre dışındaki matrisinde yapışma yetisinin kaybolması ile karakterilizedir. Bazı biyokimyasal olaylar; fosfotidilserin dışa aktarımı ve hücre ölümü aktivasyonuna katılan kaspazlar dahil olmaktadır (Jan & Chaudhry, 2019; Kerr ve ark., 1972).

Apoptozun ışık ve elektron mikroskobu ile izlemesi sonucunda çeşitli morfolojileri saptanmıştır. Morfolojik değişimler, ölüme yol açan birçok düzenleyici moleküler ajanlar tarafından desteklenmektedir (Häcker, 2000). Bu morfolojik değişimlerin ilk aşamasında sodyum, potasyum, klor gibi moleküllerin taşınamaması, taşıyıcı sistemin durdurduğunu bildirmektedir. Hücrenin iç ve dış ortamı arasındaki ilişkinin bozulması, alışveriş olmadığını ifade etmekte ve böylece de hücre büzülmesi gerçekleşmektedir (Bakır, 2018; Elmore, 2007). Hücrenin büzülmesi beraberinde, hacim küçülmesini, sitoplazma yoğunlaşmasını ve organellerin sıkışmasını meydana getirmekte, sonucunda piknoz (pyknosis) oluşturmaktadır. Piknoz, apoptozun karakteristik bir özelliğidir ve kromatin kondenzasyonu sonucudur (Elmore, 2007; Kerr ve ark., 1972). Piknoz geçirmiş hücre, çevresi ile iletişimde bulunamaz ve hücreler ile bağlantısını kaybetmektedir.

“DNA ladder” olarak adlandırılan ip merdiveni oluşması için, DNA nükleozomlardan endonükleozomlara (~180-200 baz çifti) kesilmektedir. Kromatin kondenzasyonunun erken fazında, elektronca zengin nükleer materyal membran altında agregat oluşturmaktadır. Transglutaminaz enzimi yardımı ile mebranda “zeiozis” adı verilen tomurcuklanma oluşur, sitoplazma ile çevrilen kromatin parçaları apoptotik cisimciklere dönüşmektedir (Bakır, 2018; Elmore, 2007). Fosfotidilserin ve membranın iç bölgesinde bulunan aminofosfolipid enzimi ile membranın dış tarafına geçiş yaparlar bu da apoptotik işlem için fagositozu aktifleştirici bir uyarıdır. Meydana gelmiş olan apoptotik cisimciği fagositte etmek için makrofaj, parankimal hücreler devreye girerler ve fagozomlar içerisinde parçalanırlar (Bakır, 2018; Eröz ve ark., 2012; Bratton ve ark., 1997). Şekil 2.3.’de apoptotik süreç şematize edilmiştir.



Şekil 2.3. Apoptotik Sürecin Şematik Gösterimi (Öncül, 2008’den modifiye edildi).

Apoptotik mekanizma iki önemli yol tarafından indüklenmektedir. Bunlardan biri $TNF\alpha$ reseptörü, Fas-L reseptörü, TRAIL reseptörleri gibi TNF reseptör süper ailesinin çeşitli ölüm reseptörleri tarafından başlatılan “Dışsal yol” ve apoptojenik faktörlerin membranlar arası boşluktan serbest bırakan mitokondrinin aracılık ettiği “İçsel yol”dur

(Yaacoub ve ark., 2016). Bu iki farklı yolak aynı zamanda birbirinden de etkilenebilmektedir. Yolaklar birbirini takip eden; kaspaz-3 bölünmesi, DNA fragmentasyonu, hücre iskeletinin degrede olması, apoptotik cisimcikleri oluşması, fagositik hücrelerin bağlanması için ligand ifadesi ve fagositik hücreler tarafından imha ile sonlama gibi hücresel biyolojik süreçler meydana gelmektedir (Süt, 2019; Elmore, 2007).

2.3.1. İntrinsik apoptotik yol (içsel yolak; mitokondriyal yol)

İntrinsik yolak, mitokondrinin zarları arasındaki boşlukta çözünen proteinlerin (sitokrom c) sitozole aktarımını indükleyen mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) ile karakterilizedir. BCL-2 aile üyeleri, bu dış mitokondriyal membranın bütünlüğünü belirleyen etkileşimleri ile apoptozun mitokondriyal yolağını düzenlemektedir (Nikoletopoulou ve ark., 2013). BCL-2 protein aileleri, BCL-2 homolog dominlerinden bir ya da daha fazla homoloji göstermekte ve homolog domoainlerine göre de sınıflandırılmaktadırlar (Ramesh & Medema, 2020). İlk grup, apoptotik promotor olarak aktivasyon gösteren, BID ve BIM gibi yalnızca BH3 bölgesine sahip proteinlerdir. BH3 motifinin var olması, proapoptotik proteinlerin aktivitesi için gerekli temel özelliktir. BH3 motifleri, moleküler nöbetçi gibi davranmakta ve diğer proteinlerden daha erken aktive edilmektedir. İkinci grup, BAX ve BAK, 3 BH alanı (BH1, BH2 ve BH3) içeren proapoptotik proteinlerden meydana gelmektedirler. Üçüncü grupta ise, 4 BH alanı (BH1, BH2, BH3, BH4) içeren BCL-2, Bcl-xl ve Mcl-1 gibi anti-apoptotik proteinlerden oluşmaktadır (Yuan ve ark., 2020). Proapoptotik ve anti-apoptotik de rol oynayan proteinlerin arasındaki dengenin bozulması apoptozun başlamasında ya da inhibe olmasında rol oynamaktadır (Al-Alem ve ark., 2019). BCL-2 bileşenlerinin arasındaki bu denge ve etkileşim hücre ölümünü tetikliyorsa BCL-2 aile üyelerinden BAX ve BAK aktifleşmektedir (Gurzov & Eizirik, 2011; H. Kim ve ark., 2009) Bu proteinlerin aktivasyon sıralaması mevcuttur: BID ilk BAK'ı aktive ederken, BIM önce BAX'ı aktifleştirmektedir. Aktive edilmiş bu pro-apoptotik proteinler mitokondriye göç ederler. Bu sırada mitokondrinin dış membran geçirgenliği aktivitesini kaybetmekte ve dış mitokondriyal membran bütünlüğü bozulmaktadır (Yuan ve ark., 2020).

Mitokondri içerisinde bulunan Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase), Omi/HtrA2, Endonükleaz G (Endo-G), AIF(apoptoz indükleyici faktör) ve sitokrom-c porlardan sitoplazmaya gönderilmektedir (C. Wang & Youle, 2009). Sitozole salınan Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2, XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)’ye bağlanarak kaspaz-9, kaspaz-3 ve -7’nin XIAP tarafından oluşan inhibisyonunu hafifleterek, apoptozom tarafından genel kaspaz aktivasyonunu hızlandırmaktadır (Green & Llambi, 2015). Endo-G, DNA’yı fragmentlerine ayırarak hücreyi apoptotik sürece sürüklemektedir. Sitoplazmaya salınan sitokrom c aktifleşmesi ise Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) ve prokaspaz-9 ile “apoptozom” kompleksini oluşturmaktadırlar. Prokaspaz-9 hızlı bir şekilde kaspaz-9’a dönüşmektedir. Kaspaz-9 aktifleştğinde ise, efektör kaspazların aktivasyonunu sağlamaktadır (Yuan ve ark., 2020; C. Wang & Youle, 2009; Küçük ve ark., 2006).

Kaspaz aktivasyonu apoptotik süreçte kritik noktadır ve aktiviteleri hücre ölümüne neden olan birçok yolu vardır bunlardan biri de, DNA parçalanmasıdır ve en etkili hücre öldürme yolu olduğu ileri sürülmektedir. Apoptoza girmeye tetiklenen hücrelerde kaspazlar (özellikle kaspaz-3) CAD:ICAD kompleksini ayırmak için ICAD (CAD alanı ile inhibitörü)’ı parçalayarak, CAD’ın aktivasyonunu gerçekleştirmektedir. Aktifleşen CAD (kaspazla aktive edilmiş deoksiribonükleaz), nükleozomal DNA’yı fragmentlerine ayırarak DNA bozulmasına neden olur ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (Nagata, 2000).

Tümör hücreleri BCL-2 ailesinin deregülasyonu ile apoptoza karşı daha dayanıklı hala gelerek çeşitli onkojenik transformasyonlara uyum sağlamaktadır (Ramesh & Medema, 2020). Kolorektal kanser başta olmak üzere birçok kanserin gelişmesinde önemli role sahip olan bu deregülasyona karşı etkili tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

2.3.2.Extrinsik apoptotik yol (dışsal yolak)

Apoptoz sinyallemesinin dışsal yolu, hücre dışında bulunan sinyallerin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin ligand aracılı aktivasyonu, sitotoksik T lenfosit ve radyasyon gibi dış etkenler ile indüklenebilmektedir (Kacı, 2018). Dışsal apoptotik yolakta ölüm reseptörleri, hücre zarındaki konformasyonel değişikliği tetikleyen aynı kökenli ölüm ligandları tarafından karakterilize edilmekte ve bu reseptörlerin kaspaz ile iş birliği, ölüme yol açmaktadır. Dışsal apoptotik yolakta, işlevlik gösteren Tümör Nekroz Faktörü

Reseptör Süper Aile (TNFRSF) üyeleri olan, üç ana spesifik hücre ölüm reseptör-ligand çifti bildirilmiştir. Bunlar, Fas reseptörü-ligandı, Tümör Nekroz Faktör (TNF) reseptörü-ligandı, TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) reseptörü-ligandı'dır (G. Xu & Shi, 2007). FasL (CD95 ligandı), TNF süper ailesinin tip 2 transmembran proteinidir. Bu protein, aktifleşmiş T lenfositleri, ve doğal öldürücü (NK) hücreler tarafından ifade edilirken aynı zamanda bağışıklık dışı hücreler (testis, kornea ve kanser hücreleri gibi) tarafından da ifade edilmektedir (Z. Liu ve ark., 2009). TRAIL ise, tümör nekroz faktörü (TNF) sitokin ailesinin bir üyesi ve tip II transmembran proteinidir, Fas ligandı dahil diğer TNF ile ilişkili proteinler ile yüksek oranda homologluk göstermektedir (Jin ve ark., 2004). TRAIL, FasL ve TNF α 'dan farklı olarak normal hücrelerde hücreleri koruma görevi görürken, tercihen tümör hücrelerinde apoptozu indükleyebilmektedir (Tomek ve ark., 2004). İnsanlarda TRAIL, zara bağlı dört farklı TRAIL reseptörlerine (DR4, DR5, DcR1 ve DcR2) ve bir de çözünür reseptör osteoprotegerine (OPG) bağlanabilmektedir. Bu reseptörler ölümü indükleyen reseptörler (ölüm reseptörü 4 (DR4, TRAIL-R1), ölüm reseptörü 5 (DR5, TRAIL-R2)) ve ölümü inhibe eden reseptörler (yem reseptörü 1 (DcR1), yem reseptörü 2 (DcR2) ve osteoprotegerin (OPG)) olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır (Cretney ve ark., 2002; Jin ve ark., 2004; Montinaro & Walczak, 2022).

Ekstrinsik yol, uygun bir ligandın TNF reseptör süper ailesi reseptörlerinden (Fas (CD95/Apo-1) TNFR1, DR4 (TNFRSF10A/TRAIL-R1) ve DR5 (TNFRSF10B/TRAIL-R2)) birine bağlanması ile başlatılmaktadır (Cacan, 2015). Ligandın reseptör ile etkileşime girmesi sonucu oluşan konformasyonel değişiklikler, farklı adaptör proteinlerin (FADD)/(TRADD) toplanmasına yardımcı olmaktadır (Guicciardi & Gores, 2009). Adaptör protein (FADD/TRADD) kaspaz proteaz aile üyelerinin aktif olmayan formlarını (pro-kaspaz-8 ve/veya pro-kaspaz-10) dahil ederek hücre ölümüne neden olan sinyal kompleksinin (DISC) meydana gelmesini tetiklemektedir (Johnstone ve ark., 2008; Guicciardi & Gores, 2009; Li ve ark., 2011; J. Yang ve ark., 2016). DISC'e alınan başlatıcı kaspazlar (pro-kaspaz-8) otokatalitik bölünme ile aktive olmaktadır (Igney & Krammer, 2002). Aktifleşen kaspaz-8 daha sonra kaspaz-3 gibi efektör kaspazların aktivasyonunu başlatmaktadır ve sonuç olarak ekstrinsik yol ile apoptozu tetiklemek için yeterlidir (Cacan ve ark., 2015; Fulda & Debatin, 2006). Alternatif yol olarak kaspaz-8, proapoptotik protein olan Bid'i parçalayabilmekte, böylece de kesilmiş olan Bid (tBid)'ın, intrinsik apoptozu başlatabilmesi için mitokondriye geçiş yolunu işlevselleştirmektedir (L. C. Li ve ark., 2011). Bid'in mitokondriye taşınmasıyla sitokrom

c'nin ve SMAC (ikinci mitokondri türevli kaspaz aktivatörü)'ın sitoplazmaya salınması kolaylaşmaktadır. SMAC, X'e bağlı apoptoz inhibitörü (XIAP)'nü etkisiz hale getirirken sitokrom c, pro-kaspaz-9 ve adaptör protein apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1)'den oluşan kompleks yapı işlevsellik gösteren kaspaz-9'un aktivitesi apoptozun tetiklenmesi için pro-kaspaz-3'ü parçalayarak efektör kaspaz-3'ü aktifleştirmektedir. Kaspaz 3'de kaspas-6 ve-7'yi aktivasyonunu sağlayarak apoptozu gerçekleştirmektedir (Montinaro & Walczak, 2022).

Aynı zamanda, tümöral hücreler ölüm reseptörlerinin ekspresyonlarını baskılayarak FASL ve TRAIL aracılı apoptoza karşı direnç gösterirler. Bu durumda kanserin gelişmesi ile beraber ölüm reseptörleri ve ligandları arasındaki etkileşimin zayıflatılmaktadır (Cacan, 2017; Kykalos ve ark., 2012; Zhu ve ark., 2005). Kanser gelişmesinde önemli rol üstlenen bu apoptozun işlevsizliğine karşı etkili tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

2.4.Tedavi Yöntemleri/ Yaklaşımları

Kanser tedavisinde cerrahi yöntemler ve radyoterapiler tümöral gelişmenin durdurulmasında başarı sağlamış olsalar da bazı kanser türleri, metastaz yetenekleri ve karakteristik özelliklerinin sayesinde hastalık tekrardan nüksetmektedir. Dolayısıyla, bu yöntemlere kemoterapi ile kombinasyonlu tedavi uygulanmaktadır (Barbaros & Dikmen, 2015). Fakat bu tedavi yöntemleri, tümöral hücreleri ve sağlıklı hücreleri birbirinden ayırt etmeksizin işlem uygulamakta ve sağlıklı hücrelere de büyük zarar verebilmektedirler (Cacan & Ozmen, 2020; Rejhová ve ark., 2018; Woods & Turchi, 2013). Bu yüzden, kanser patogenezi üzerinde yapılan çalışmalarda etkili yeni doğal bileşiklerin ön planda olduğu alternatif tedavi yöntemlere ihtiyaç vardır. Etkin tedavi sağlayabilmek için, yan etkilerin daha az olduğu düşünülen, bitkisel kaynaklı alternatif tedavi yöntemleri fayda sağlayabildiği düşünülmüştür. Alternatif yaklaşımlar arasında tıbbi bitkisel kaynakların kullanılma nedenlerinden biri de esansiyel yağlardır (Yaman ve ark., 2018).

2.5. Esansiyel Yağlar (Tıbbi Aromatik Bitkiler)

2.5.1. Esansiyel yağların genel özellikleri

Esansiyel yağlar (essantial oil, EO, UY), bitkilerin materyallerinden (çiçek, yaprak, dal, tomurcuk, tohum, meyve, kök, ot ve odun) çeşitli yöntemlerle elde edilen aromatik yağlardır (Burt, 2004). Genellikle oda sıcaklığında sıvı formdadırlar. Çoğu zaman renksiz ya da açık sarı renkte olabilir ve kolayca kristalleşmektedirler (Şengezer & Güngör, 2008).

Halk dilinde, uçucu yağ, aromatik yağ, esans yağ, eterik yağ ya da ruh gibi çeşitli adlarla ifade edilebilmektedir ve ayrıca bitki esansiyel yağları bitkilerin önemli bileşenleri arasındadır (Bayaz, 2014). Esansiyel yağlar bitkilerin salgı sistemlerinde (salgı tüyleri, salgı hücreleri, salgı kanalları ve salgı ceplerinde) salgılanmaktadır (Duru,1993). Bitkilerde hangi amaçla salgılandığı tam anlamıyla bilinmemesine rağmen bitkinin yaralanmalarına karşı meydana gelen reçine için çözücü görevi olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda yaydıkları aromatik koku ile böcekleri cezbederek tozlaşmayada katkı sağlarlar ya da zararlı böcekleri bitkiden uzaklaştırarak koruyabilmektedirler (Turhan 2015; Duru, 1993).

2.5.2. Esansiyel yağların elde edilme yöntemleri

Esansiyel yağlar, damıtma yöntemi ile üretilmesi ilk olarak Doğu'da (Mısır, Hindistan ve İran) kullanılmaya başlamış daha sonra 9. yüzyılda Araplar tarafından geliştirilmiştir. Esansiyel yağların üretimi 13. yüzyılda eczacılar tarafından yapılmış ve farmokolojik etkileri tıbbi ilaç kitaplarında tanımlamışlardır fakat 16. yüzyıla kadar kullanımları yaygınlaşmamıştır (Burt, 2004).

Esansiyel yağlar bitkilerin farklı kısımlarından elde edilirken, buhar damıtma, su damıtma, mikrodalga destekli damıtma, maserasyon (yumuşatma), anfloraj, soğuk pres ekstraksiyon, solvent ekstraksiyon (çözücü ekstraksiyonu), süper kritik sıvı ekstraksiyon gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Shankar ve ark., 2021). Ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen esansiyel yağların içerik analizi ise, gaz kromatografisi, kütle spektrofotometrisi ya da headspeace(gaz kromatografisi) analiz yöntemi ile belirlenebilmektedir (Seow ve ark., 2013). EY'ların içerdiği bileşenlerin yüzdesi, elde edildiği bitkinin türüne ve o bitkinin hangi materyalinden elde edildiğine göre değişim gösterebilmektedir (Solórzano-Santos & Miranda-Novales, 2012). Dolayısıyla, aynı bitkiden elde edilen yağların bile özelliklerinde değişken aktiviteler gözlemlenmesi, farklı coğrafi kaynaklar, iklim, genotip, hasat mevsimi gibi durumlardan kaynaklanabilmektedir. Tüm bu değişkenlik gösteren durumlar, kimyasal bileşimini

etkilediği gibi esansiyel yağların her bir bileşenin konsantrasyonlarını da etkileyebilmektedir (Oussalah ve ark., 2007). Bu nedenle, esansiyel yağların kimyasal profili, ekstraksiyon tipine göre sadece molekül sayısında değil aynı zamanda ekstrakte edilen moleküllerin stereokimyasal tiplerinde de farklılık gösterebildiğinden, ekstraksiyon tipi kullanım amacına göre seçilmelidir (Bakkali ve ark., 2008). Bu yüzden uçucu yağların içerik analizinde ekstraksiyon yöntemi önemli bir faktördür ve ekstraksiyon için uygun olmayan yöntemlerin kullanılması, biyolojik aktivite kaybına neden olabilir (Shankar ve ark., 2021). Çeşitli yöntemler kullanılarak elde edilen bazı esansiyel yağların ekstraksiyonları Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Çeşitli yöntemler kullanılarak elde edilen bazı esansiyel yağların ekstraksiyonları (Tongnuanchan & Benjakul, 2014)

Ekstraksiyon yöntemleri	Bitkiler
Solvent ekstraksiyon (Çözücü ekstraksiyonu – Çözücü)	Adaçayı (<i>Salvia officinalis</i>), apiaceae (<i>Ptychotis verticillata</i>), limon (<i>Citrus x limon</i>)
Süperkritik CO ₂	Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>), adaçayı (<i>Salvia officinalis</i>), limon (<i>Citrus x limon</i>), mercanköşk (<i>Majorana hortensis</i> Moench), kekik (<i>Origanum vulgare</i> L.), kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.), karanfil (<i>Eugenia caryophyllata</i>)
Subkritik su	Mercanköşk (<i>Origanum majorana</i>), kişniş tohumları (<i>Coriandrum sativum</i> L.)
Damıtma - Buhar	Kekik (<i>Thymus kotschyanus</i>), biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>), rezene (<i>Foeniculum vulgare</i>), okaliptüs (<i>Eucalyptus citriodora</i>), lavanta (<i>Lavandula dentata</i> L.), karanfil (<i>Eugenia caryophyllata</i>),
Hidrodistilasyon	Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>), limon (<i>Citrus x limon</i>), kekik (<i>Origanum vulgare</i> L.), adaçayı (<i>Salvia officinalis</i> L.), karanfil (<i>Eugenia caryophyllata</i>), kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.), fesleğen (<i>Ocimum basilicum</i> L.), bahçe nanesi (<i>Mentha Crista</i> L.)

Hidrodifüzyon	Portakal (<i>Citrus sinensis</i>), biberiye yaprağı (<i>Rosmarinus officinalis</i>)
Solventsiz mikrodalga	Kekik (<i>Origanum vulgare</i> L.), biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>), fesleğen (<i>Ocimum basilicum</i> L.), bahçe nanesi (<i>Mentha Crista</i> L.), kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.), nane (<i>Mentha spicata</i> L.)
Kombinasyon yöntemleri Solvent + Buhar	Kimyon (<i>Cuminum cyminum</i>), tütün (<i>Nicotiana tabacum</i>)

Tablo 2.1. (Devam) Çeşitli yöntemler kullanılarak elde edilen bazı esansiyel yağların ekstraksiyonları (Tongnuanchan & Benjakul, 2014)

Bazı bitkilerden ekstrakte edilen esansiyel yağlar, bu esansiyel yağların önemli bileşenleri ve esansiyel yağların yüzdelik miktarları Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Bazı esansiyel yağların ekstrakte edildiği bitkiler, önemli bileşikleri ve esansiyel yağ miktarları (Burt, 2004; Şengezer & Güngör, 2008)

Bitki adı	Elde edildiği bitki	Önemli bileşikleri	Esansiyel yağ miktarı, %
Adaçayı	<i>Salvia officinalis</i> L.	Camphor α -Pinene β -Pinene 1,8-Cineole α -tujone	6 – 15 4 – 5 2 – 10 6 – 14 20 – 42
Ardıç	<i>Juniperus communis</i> L. (yumuşak meyveleri)	α -Pinene Sabinene Myrcene	34 28 6
Biberiye	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -Pinene Bomyl acetate	2 – 25 0 – 17

		Camphor	2 – 14
		1,8-Cineole	3 – 89
Karabiber	<i>Piper nigrum L.</i>	α -Pinene	9
		β -Pinene	10
		Sabinene	19
		δ -3-Carene	5
		Limonene	18
		β -Caryophyllene ²¹	15
Karanfil	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	75 – 85
		Eugenyl acetate	8 – 15
Kekik	<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol	10 – 64
		Carvacrol	2 – 11
		γ -Terpinene	2 – 31
		p-Cymene ²¹	10 – 56
Keklik otu	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	iz – 80
		Thymol	iz – 64
		γ -Terpinene	2 – 52
		p-Cymene ²¹	iz – 52
Ökalyptus	<i>Eucalyptus citriodora</i> (yaprakları)	Citronellal	73
		Citronellol	15
Tarçın	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	Trans-cinnamaldehyde Eugenol	65 – 77
			7

Tablo 2.2. (Devam) Bazı esansiyel yağların ekstrakte edildiği bitkiler, önemli bileşikleri ve esansiyel yağ miktarları (Burt, 2004; Şengezer & Güngör, 2008)

2.5.3. Esansiyel yağların biyolojik aktiviteleri ve kullanım alanları

Tıbbi bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar, biyoaktif bileşikler (Monoterpen, seskiterpenler ve aromatik moleküller vb.) bakımından zengindirler ve bu bileşikler sayesinde antibakteriyal, antifungal, antiviral, böcek öldürücü, antioksidan, antikanser gibi özellikler gösterebilmektedirler (Prabuseenivasan ve ark., 2006; Petrocelli ve ark., 2021). Esansiyel yağların bu özellikleri, geleneksel tıpta, aromaterapide, kozmetikte (parfüm ve diş macunlarında), tarımda (böcek öldürücü(aerosol)) ve gıda (yiyecek ve içeceklerde tatlandırıcı ve çeşni) kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Bakkali ve ark., 2008)

Bazı bitki ve türevlerinden ekstrakte edilen çeşitli esansiyel yağlarda bulunan fitokimyasallar (timol, öjenol, anetol, mentol, sitral, pinenler, izotiyosinatlar, sinnamealdehitler, karvakrol ve fenolik asitler gibi) antimikrobiyal özellikleri bazı bakteri ve mantarlara karşı etkinliği bildirilmiştir (Souza ve ark., 2005). Bazı bitkiler ve bu bitkilerin antimikrobiyal özellik gösteren bileşenleri Tablo 2.3’de verilmiştir.

Tablo 2.3. Bazı bitkilerin antimikrobiyal aktivite gösteren bileşenleri ve bileşen sınıfları (Cowan, 1999)

Yaygın Adı	Bilimsel Adı	Temel Bileşen	Bileşen Sınıfı
Karanfil	<i>Syzygium aromaticum</i>	Öjenol	Terpenoid
Okaliptüs	<i>Eucalyptus globulus</i>	Tanen	Polifenol
Yeşil çay	<i>Camellia sinensis</i>	Catechin	Flavonoid
Kekik	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol	Fenolik alkol
		Tanenler	Polifenoller
		Kafeik asit	Terpenoid
Zerdeçal	<i>Curcuma longa</i>	Kurkumin	Terpenoid
Nane	<i>Mentha piperita</i>	Mentol	Terpenoid

Esansiyel yağlar, komplike kimyasal bileşenleri (terpenoid, polifenol, flavonoid vb.) sebebi ile hücresel ligandlara sahip değildir, fakat lipofilik özellikleri ile hücre zarından geçebilir ve polisakkarit, fosfolipit ve yağ asitlerinin katmanlarını bozarak membran geçirgenliğini daha da arttırabilirler. Membran geçirgenliği, iyon kaybı ve membran potansiyelinin azalması, proton pompasının inhibe olması ve ATP havuzunun tükenmesi ile ilişkilidir. Bu olaylar hücresel moleküllerin sızmasına neden olur, özellikle bakteri hücrelerinde belirli bir miktara kadar sızıntı tolere edilebilsede hücre içeriğinin daha fazla kayıp yaşanması ya da iyonların kritik kaybı hücre ölümüne neden olabilmektedir (Dhifi ve ark., 2016; Ultee ve ark., 2002). Ayrıca, birçok farklı esansiyel yağların bakteri türüne karşı anti bakteriyel aktivite sergiledikleri bildirilmiştir (Prabuseenivasan ve ark., 2006). Doğal esansiyel yağlar bu antibakteriyel özellikleri sayesinde tıpta ve diş hekimliğinde kullanımı artmaktadır. Esansiyel yağlı ağız gargaralarının, oral mikroorganizmaların hücre duvarlarını parçalayıp ve enzimatik aktivitelerini engelleyerek öldürebildiği ileri sürülmüştür (Kouidhi ve ark., 2010).

Eski zamanlarda peynir gibi gıdaları daha uzun süre muhafaza edebilmek için otlarla, baharatlarla ya da yağlarla fiziksel olarak ovulmaktaydı. Daha sonradan yapılan çalışmalarda, bu işlemde kullanılan esansiyel yağların ana bileşenlerinin fungal büyümeye engel olabileceği kanıtlanmıştır (Vázquez ve ark., 2001). Esansiyel Yağlar uzun yıllardır yiyecek ve içeceklerde tatlandırıcı ajanlar olarak da kullanılırken aynı zamanda çoklu antimikrobiyal içeriği nedeniyle de hala daha gıdaların muhafaza edilmesinde etkin doğal ajanlardır (Oussalah ve ark., 2007).

Esansiyel yağların, viral enfeksiyonu ve poliferasyonu gibi süreçlerdeki etkin mekanizması ise, viral protein sentezinin inhibisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir (Seow ve ark., 2013). Yapılan bir çalışmada, yağ ile muamele edilmiş bir virüs, viral mRNA ifadesine devam ettiği fakat viral proteinlerin minimal düzeyde eksprese olduğunu ve bunun sebebinde, antiviral etkinliğin viral protein translasyonunun inhibisyonundan kaynaklanabileceği bildirmişlerdir (Wu ve ark., 2010). Esansiyel yağlarda bulunan çeşitli bileşenlerin bir diğer özelliği de, antioksidan aktiviteye sahip iyi bilinen bitki fenollerini taklit eden yapıya sahip olmalarıdır. Bu sayede, uçucu yağlar serbest radikal süpürücü, indirgeyici ajan ve peroksitlerin sonlandırılması gibi antioksidan özellikleri ile çok çeşitli işlevlere sahiptirler. Esansiyel yağların sahip oldukları bu işlevler, gıda sistemlerinde lipid peroksidasyonunu önlenmesi için potansiyel doğal antioksidan olarak hizmet edebilmektedirler (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

Son zamanlarda, romatizma, alerji ya da artrit gibi inflamatuvar hastalıkların klinik tedavisinde de esansiyel yağlar kullanılmaktadır. Esansiyel yağlarda bulunan aktif bileşiklerin iltihaplanmaya yol açan aracılardan üretimini azaltarak etki edebildiği bildirilmiştir (Maruyama ve ark., 2005). Esansiyel yağların anti-inflamatuvar aktivite sergilemesi sadece antioksidan aktivitelerinde etki etmediği aynı zamanda sitokinlere ve düzenleyici transkripsiyon faktörlerini barındıran sinyal kaskatları ile etkileşime girmeleri ve proinflamatuvar genlerin ekspresyonlarına etki edebildiği ileri sürülmektedir. Böylece de uçucu yağların anti-inflamatuvar hastalıkların tedavilerinde yeni alternatif tercihi olabilmektedir (Dhifi ve ark., 2016).

Farklı bitkilerden elde edilen bazı esansiyel yağlar, göstermiş oldukları antiproliferatif, antioksidan ve antimetastatik etkileri ile kanserlerde kemopreventif ajan olarak da nitelendirilmiştir (Yaman ve ark., 2021). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda kolorektal kanser başta olmak üzere birçok kansere karşı antikanser etki gösterdikleri bildirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada esansiyel yağların kanser hücrelerine yönelik seçici sitotoksik etki gösterdiği ve bu etki, hem içsel hemde dışsal apoptotik yollarla reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artışına, mitokondriyal membran depolarizasyonuna ve kaspaz bağımlı hücre ölümünün tetiklenmesine yol açabileceğini bildirmişlerdir (Sœur ve ark., 2011). Bir başka çalışmada esansiyel yağların kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebildiği buna ek, BCL-2 geninin ekspresyonunu azaltabildiği ve BAX geninin ekspresyonunu arttırabildiği bildirmişlerdir (Wei ve ark., 2008). Bu bilgiye paralel yapılan bir çalışmada, esansiyel yağın kolon kanser hücrelerinde anti-proliferatif aktivasyon gösterdiğini bu aktivasyonunu da COX-2 ifadesini inhibe ederek gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir (Yaman ve ark., 2021).

Tıbbi bitkilerin etkileri geleneksel ve tamamlayıcı tıpta birçok çeşitli hastalık için tedavi ya da önleyici yöntem olarak kabul edilmiş ve insanlığın başlangıcından itibaren tercih edilmiştir (Ugbogu ve ark., 2021). Günümüzde, özellikle 300'ü farmasötik, agronomik, gıda, sağlık, kozmetik ve parfüm gibi endüstriler için ticari öneme sahip yaklaşık 3000 esansiyel yağ bilinmektedir (Bakkali ve ark., 2008). Bu tez çalışmasında ise etkin tedavi yöntemlerinde tercihlerin başında gelen karanfil ve kekik esansiyel yağlarından bahsedilmektedir.

2.5.4. Karanfil esansiyel yağı

Karanfil (*Syzygium aromaticum* Linn), Myrtaceae familyasına ait aromatik özelliğe sahip olan çiçek tomurcuklarının kurutulmuş halidir (Chatterjee & Bhattacharjee, 2015). Doğu Endonezya’da Maluka adalarına özgü olan “spice islands” olarak da adlandırılan karanfil, çok eskiden beri kullanılan ve ticareti yapılan bir baharattır (Ouadi ve ark., 2022). Karanfil çok eski yıllardan beri geleneksel tıpta ve mutfakta kullanılmaktadır, bununla beraber gıda tatlandırıcı, geleneksel tıpta ve parfümeri üretiminde çokça iyi bilinen bir esansiyel yağ (%~20 oranında) üretmektedir (Vicidomini ve ark., 2021; Mittal ve ark., 2014). Karanfil esansiyel yağı seskiterpenler, monoterpenler, hidrokarbonlar gibi çeşitli fitokimyasallar bakımından zengindir ve ana bileşenlerini karvakrol, timol, öjenol ve sinnemaldehit vb. gibi fenilpropanoidler olmak üzere çok çeşitli biyoaktif bileşikler oluşmaktadır. Etkin maddesi ise öjenol karanfil yağının %90-95’ni kapsamaktadır (Batiha ve ark., 2020; Jimoh ve ark., 2017; Mittal ve ark., 2014). Karanfil esansiyel yağı, içerisinde barındırdığı bu fitokimyasal bileşikler sayesinde birçok işlevsel özelliğe sahiptir. Yapılan birkaç çalışmada karanfil esansiyel yağının güçlü antibakteriyal, antifungal, antiviral ve antioksidan gibi çeşitli aktiviteler gösterdiğini bildirmektedir (Chaieb ve ark., 2007; Gülçin ve ark., 2012; Hoskonen ve ark., 2015; Y. Wang ve ark., 2017; J.-G. Xu ve ark., 2016).

Syzygium aromaticum’un bakterilerde antibakteriyal aktivitesinin oksidatif strese ve membran geçirgenliğine sebep olduğunu bildirmişlerdir (Ajiboye ve ark., 2016). Dolayısıyla antibakteriyal etkisi ile kontamine olmuş gıdalardan kaynaklı meydana gelen bakteri enfeksiyonuna karşı öldürücü etki gösterebilmektedir. Bunun yanı sıra, antiseptik özelliği sayesinde böcek ısırıklarını ve sokmalarını veya enfeksiyon ve yaralara karşı etkinliği de bulunmaktadır. Bu bilgilere ek, anti-inflamatuar özelliği ile üstsolunum yollarında balgam söktürücü olarak rol alarak solunum yollarını temizleyebilmektedir. Öte yandan kan arındırıcı, bağışıklık sistemi güçlendirici, hazımsızlık giderici, stres giderici ve çevre kirliliğine bağlı toksisiteyi önleme, diş ağrısı ve ağız ülseri vb. rahatsızlıkların giderilmesi de işlevsel özellikleri arasındadır (Kumar ve ark., 2012).

Yakın zamanda yapılan araştırmada, karanfil yağının karyojenik bakteriler ve oral streptokoklara karşı antibakteriyel ve antifungal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Kouidhi ve ark., 2010). Karanfil esansiyel yağ bileşenlerinin lipofilik yapısı ile hücre zarı üzerinde antifungal aktivite gösterdiği ve aynı zamanda bazı kanser hücre hatlarında önemli sitotoksik etkiler gösterdiği bildirilmektedir. Bu sitotoksik etkinin, esansiyel yağın

içerisindeki yüksek konsantrasyonda bulunan fenolik bileşiklere, özellikle de öjenole atfedilmektedir (Kouidhi ve ark., 2010).

Syzigium aromaticum' da bulunan doğal bileşiklerden biri olan öjenol, geleneksel tıpta kullanılan ve esas antiseptik, analjezik ve anti-bakteriyel özellikleri ile bilinmektedir. Yaygın olarak tercih edilen bu bileşik, anti-viral, anti-oksidan, anti-inflamatuar ve anti-kanser özellikleri ile farmasötik etkiler sağlayan biyolojik aktiviteleri de bulunmaktadır (Fangjun & Zhijia, 2017; Ogata ve ark., 2000; Okada ve ark., 2005; Ou ve ark., 2006). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda öjenol ile tedavi edilen kolon kanser hücrelerinin (HT-15 ve HT-29), antipoliferatif etkileri MMP (mitokondriyal membran potansiyeli)'nin dağılması, tiyol tükenmesi, lipid tabakasının kırılması, ROS (reaktif oksijen türleri) oluşumu gibi birçok olayları tetiklediği bildirmiştir. Ayrıca ROS miktarının artışı p53, PARP ve kaspaz-3 aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Jaganathan ve ark., 2011). Bir diğer çalışmada, insan akciğer kanser hücreleri üzerinde *Syzigium aromaticum*' da bulunan öjenolün akciğer kanserine karşı güçlü anti-kanser özelliği gösterdiği bununla birlikte, akciğer kanser hücrelerinin canlılığını, invazyonunu ve migrasyonunu, PI3K/Akt yolağının baskılanmasını ve MMP-2 (matriks metalloproteinazlar) aktivasyonunun engellenmesinde tümöral baskılayıcı olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (Fangjun & Zhijia, 2017).

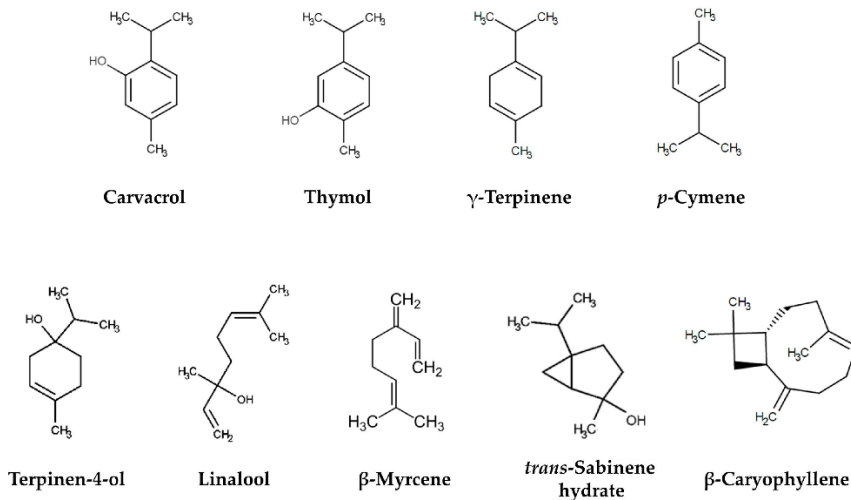
Başka bir çalışmada da öjenol ile sisplatin (kemoterapötik ilaç) kombinasyonunun meme kanser kök hücrelerinin inhibisyonunu güçlendirebildiği, bunu ek olarak, öjenol'ün NF- κ B sinyal yolağının inhibisyonunda sisplatin gücünü arttırdığı gösterilmiştir (Islam ve ark., 2018). Karanfil yağında bulunan öjenol, antioksidan etkisi ile bazı sinyal yollarına (NF- κ B) etki ederek ve COX-2 gen ekspresyonu dahil birçok reaksiyonu inhibe etmesi ile kanseri inhibe etmekte ve kemoterapide etkili ajan olabilmektedir (Fathy ve ark., 2019).

Öjenol'ün, sitotoksik ve antipoliferatif etkisi ile beraber sisplatin ve iyonlaştırıcı radyasyon ile sinerjizm gösterdiği böylelikle de kemo- ve radyo- duyarlaştırıcı ajan olabileceği de bildirilmektedir (Fathy ve ark., 2019). Birçok araştırmalarda karanfilin, kanser hücrelerinde apoptozu arttırması ve hücre poliferasyonunu engellemesi önemli ideal bir tedavi olabileceği sonucuna varmıştır.

2.5.5. Kekik yağı

Yaygın adı “kekik” olarak bilinen *Thymus vulgaris*, aromasıyla mutfakta ve biyoaktif özellikleri sayesinde tıpta uzun yıllardır kullanılmaktadır. Akdeniz bölgesinde genellikle baharat olarak kullanılırken, daha sonra tüm dünyaya yayılmaya başlamıştır. *Thymus vulgaris* genellikle dik, odunsu tabanlı bir gövdeye sahip olan çok yıllık yaprak dökme bir çalıdır ve ana bileşimlerini ise bulunduğu iklime ve coğrafi bölgeye göre değişim gösteren çeşitli kimyasal bileşikler ve esansiyel yağlar oluşturmaktadır (Hammoudi Halat ve ark., 2022).

Kekik türlerinde bulunan esansiye yağların ana bileşeni, monoterpenler, monoterpen alkoller, fenol türevleri, ketonlar, aldehytler, eterler ve esterler gibi çok çeşitli kimyasal gruplar oluşturmaktadır (Kowalczyk ve ark., 2020). Kekik esansiyel yağlarında tanımlanan başlıca bileşikler aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Leyva-López ve ark., 2017).



Şekil 2.4. Kekik esansiyel yağın bazı ana bileşenleri

Kekik içinde bulunan bileşiklerden özellikle Karvakrol ve Timol, %78-85' ini kapsayan ana monoterpen fenolik bileşiklerdir. Hem antimikrobiyal hem de antioksidan özellikleri gösteren bu iki bileşik, hidrojen atomlarını ya da elektronlarını bağışlamaları ile serbest radikallerin söndürülmesini sağlayarak lipid peroksidasyonunun geciktirebilen antioksidan ajanlar olarak görev alabilirler. Sahip oldukları antimikrobiyal aktivite ise, lipofilik özelliğine atfedilmektedir. Bu lipofilik özellik, hücre zarı için çekici hal alır, membran genişlemesi meydana getirir, membrana gömülü proteinleri bozar ve membran

akışkanlığının artışı ile iyon taşınımına etki göstermektedirler (Cristani ve ark., 2007; Rodriguez-Garcia ve ark., 2016). Dolayısıyla hücrel değişimlerde, ATP tüketimi ve proton hareketine etki ederek bitki ya da insanlarda patojenlere karşı biyosidal etki göstermektedir (Ultee ve ark., 1999). Bu bilgiye paralel bir çalışmada farklı yerlerde bulunan farklı türlerdeki kekik esansiyel yağların farklı tür mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkileri bildirilmiştir. Buna ek olarak, yüksek miktarda karvakrol bulunan esansiyel yağlarda daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve karvakrolün membran faaliyetlerine etki ettiği, lipid membran geçirgenliğini ve hücrel adenosin trifostatı arttırdığı ve sonucunda da hücreyi ölüme sürüklediği için mikroorganizmalarda ölümcül bir bileşik olarak nitelendirilmektedir (Mahboubi ve ark., 2017).

Karvakrol, antimikrobiyal özelliği ile beraber anti-oksidan ve antiviral etki gösterebilmektedir (Sökmen ve ark., 2004). Buna ek olarak, birçok kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif aktivitesi de bildirilmektedir. Kekik esansiyel yağı dahil birçok bitki türünde aktiflik gösteren timol ve karvakrolünün over kanseri üzerinde potansiyel sitotoksik etki gösterdiği bildirilmektedir (Elbe ve ark., 2020). Yapılan bir çalışmada karvakrolün, insan hepatoselüler karsinom hücre hattı (HepG-2) üzerindeki antiproliferatif ve pro-apoptotik etkilerini araştırmışlardır. Apoptotik etkilerini incelemek için western blot analizinde karvakrolün artan konsantrasyonu ile BCL-2 protein ekspresyon seviyelerindeki azalmayı bildirmişlerdir. Bununla beraber, apoptoza giren hücrelerde ayırt edici özelliklerden kaspaz-3 aktivasyonun ve poli-(ADPriboz)-polimerazın (PARP) bölünmesinden de bahsedilmiştir. Karvakrolün apoptoz indüksiyonundaki etki mekanizması olarak MAPK yolağını incelemiş ve karvakrolün ERK1/2-MAPK fosforilasyonunu azaltabildiği ve P38-MAPK fosforilasyonunu aktive edebildiği fakat HepG2 hücre hattında JNK-MAPK üzerinde etkisi olmadığını bildirmişlerdir (Yin ve ark., 2012). Bu çalışmaya paralel olarak meme kanseri hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkisi gösterilmiştir. Bu karvakrolün gösterdiği antiproliferatif etki, S fazında hücre döngüsünü durdurma, membran permeabilitesinde azalma, sitokrom-c salınımında artış BCL-2/BAX oranında azalma PARP bölünmesi ve DNA parçalanması gibi birçok süreç üzerinden aktivitesini gerçekleştirebildiği bildirilmiştir (Arunasree, 2010). Dolayısıyla yapılan birçok çalışma kekik esansiyel yağının ve bileşenlerinin kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivite gösterebileceğini savunmaktadır.

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Materyal

Bu tez çalışmasında kullanılan ekipman ve kimyasallar aşağıdaki Tablo 3.1.'de verilmiştir

Tablo 3.1. Deney çalışmasında kullanılan ekipman ve malzemeler

Ekipman	Malzemeler
Güvenlik Kabini (ESCO, Class II, Type A2)	Mc Coys 5'A Media (Sigma Life Science),
Serolojik Pipet(Costar)	Penisilin/Streptomisin (Biological Industries)
Ependorf Tüp, (İsolap),	FBS (Biological Industries)
Thoma Lamı (Bright-Line)	PBS (Alfa Aesar)
Vorteks (Velp Scientifica)	Tripsin (Biological Industries)
100-1000 µl, 20-200 µl ve 0.5-10 µl Mikropipet (Isolab Instruments)	Trypan Blue Boyası (Biological Industries)
96 Kuyucuklu ve 6 Kuyucuklu Kültür Plağı (Nest)	MTT (Metiltiazoldifenil Tetrazolyum Bromid) Boyası (Biofrox),
Heidolph Unimax 1010	DMSO (Dimetil Sülfoksit) (Serva)
Santrifüj (Micro 200 R Hettich Zentrifugen)	Hibridizol (Hibrigen MG-HBRZ-01)
Thermo Scientific Multiskan Go	Kloroform (Amresco)

Tablo 3.1(devam). Deney çalışmasında kullanılan ekipman ve malzemeler

Thermo Scientific µdrop™ N12391	İzopropanol (Amresco)
A.B.T.(Atlas Biyoteknoloji) qRT-PCR Kiti	%75’lik Etanol (İsolab)
Roche Light Cycler 1,5	Nükleaz Free Water (Thermo Scientific)
Centrifuge Adapters 11 909 312 001	Forward Revers Primerleri (Macrogen),
PCR Tüpleri (Lot No: 110802-383),	RNA Template
Leica DFC295 S 40/0.45 Floresans Mikroskobu	Karanfil Yağı (İbrahim Saraçoğlu), Kekik Yağı (İbrahim Saraçoğlu).

3.2. Metod

3.2.1 Hücre kültüre eldilmesi ve yağ dozlarının hazırlanması

Hücrelerin kültüre eldilmesi

Hücre kültürü kapsamında yapılan bütün işlemler güvenlik kabin içerisinde gerçekleştirildi. Hücre kültür ortamı ve güvenlik kabini kullanılmadan önce ve sonra UV ışın uygulandı. Çalışmaya başlamadan önce kullanılacak materyaller %70’lik EtOH ile steril hale getirilerek kabin içerisine alındı. Hücre kültürü laboratuvarında meydana gelebilecek kontaminasyon riskini en aza indirmek için yüzey alanları %10’luk çamaşır suyu ile iki günde bir temizliği yapıldı. İşlem sonunda tek kullanımlık materyaller otoklavlandı ve atık kutusuna atılarak, uzaklaştırıldı.

Bu çalışmada kullanılan hücre hatları Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde, Kanser Araştırma Laboratuvarı stoklarından kolorektal kanser hücre hattı HCT-116 ve SW620 hücre hatları kullanıldı (Kumari ve ark., 2013; Cacan ve ark., 2015; Cacan ve Ozmen, 2020; Kucuk ve ark., 2021; Caldıran and Cacan, 2022). Kültürü aşamasında SW620 hücre hattı için %10 FBS (Biological Industries), %1 penisilin/streptomisin (Biological Industries) ile zenginleştirilen sıvı MEM (Minimum

Essential Medium) besiyeri kullanılırken, HCT-116 hücre hattı için %10 FBS (Fötal sığır serumu) ve %1 penicilin/streptomycin ile zenginleştirilen McCoy's 5A besiyeri kullanıldı. McCoy's 5A besiyerine, ekstra 2gr/L sodyum bikarbonat eklendi ve oluşabilecek kontaminasyon riskini engellemek için vakum filtreleri (TPP Vacuum Filtration "hızlı" Filtermax, 0,22 µm gözenek boyutu) kullanılarak filtreden geçirildi. Filtreden geçen besiyeri etiketleme yapıldı ve kullanılmak üzere +4 °C'ye kaldırıldı.

-80°C dondurucunun içerisinde cryovial tüplerde bulunan SW620 ve HCT-116 hücre hatları çıkartıldı. Cryovial tüplerin içerisinde bulunan hücreler, önceden hazırlanmış olan 50 ml falkon içerisindeki 10 ml besiyeri ile çözündürüldü. Çözündürülen hücreler, 3 dakika 3000 rpm'de santrifüje koyuldu. Dibe çökmesi sağlanan hücrelerin içerisinde bulunduğu besiyeri dökülerek uzaklatıldı. Pellet yeni 15 ml besiyeri ile pipetaj yapılarak çözündürüldü ve 75cm²'lik flasklara aktarıldı. Flasklar daha sonra %5 CO₂ ve 80-90'lık nem saturasyona sahip inkübatöre kaldırılarak adherent haline geçmesi ve çoğalmaları amaçlandı. 3 günlük inkübasyonun ardından hücrelerin bulunduğu eski besiyeri uzaklaştırıldı. Tripsinin aktifliğini sağlayabilmesi için flask 1X fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandı. Daha sonra 3-5 ml tripsin-EDTA hücrelerin protein bağlantılarının parçalaması için eklendi ve 2-5 dakika 37°C'lik inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyonun ardından mikroskopta hücrelerin zeminden ayrıldığı gözlemlenmesi ile tripsini inaktive etmek için flaskın içerisinde 10ml yeni besiyeri eklendi. Flask içerisinde pipetaj yapıldıktan sonra 50 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı. 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı döküldü ve geriye kalan pellet kısmının yoğunluğuna göre 10 ml yeni besiyeri eklemesi yapıldı. Daha sonra hemositometre yardımı ile hücre sayımı yapılarak 1.000.000/ml hücre olacak şekilde yeni kültür ortamlarına aktararak pasaj işlemi gerçekleştirildi.

Pasaj işlemi yapıldıktan sonra 3-4 gün inkübasyona bırakılan hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında, pasajlama işlemi sırasında gerçekleşen adımlar tekrarlandı, fakat bu defa farklı olarak 1.000.000/ml'lik hücrelerin konsantrasyonu freezing medium (dondurma solüsyonu; Biological Industries) içerisinde 1,8 ml'lik cryovial tüplere aktarıldı. Hücrelerin içerisinde bulunan cryovial tüpler ilk olarak -20°C'de yarım saat bekletildikten sonra tekrardan kullanılmak üzere -80°C'lik dondurucuya kaldırıldı.

Yağ Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan kekik ve karanfil yağları çalışmaya başlamadan önce 90 °C’de bir saat otokavlandı. Otoklavlanan kekik ve karanfil yağları MEM besiyeri içerisinde belirli konsantrasyonlarda seyreltilti. Aşağıdaki tabloda detaylı olarak verilmiştir.

Tablo3.2. Yağ konsantrasyonlarının hazırlanması

	Konsantrasyon (µl)	Yağ Miktarı (µl)	Dilüsyon Oranı	MEM (µl)	Total
Kekik Yağı ve Karanfil Yağı	0.5 µl	100 µl	1:10	900 µl	1000 µl
	0.1 µl	20 µl	1:50	980 µl	1000 µl
	0.05 µl	10 µl	1:100	990 µl	1000 µl
	0.01 µl	2 µl	1:500	998 µl	1000 µl
	0.005 µl	1 µl	1:1000	999 µl	1000 µl

3.2.2. Hücre ekimi ve mtt uygulaması

Kekik ve karanfil esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları HCT-116 ve SW620 üzerinde potansiyel etkilerini belirleyebilmek için MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) testi yardımı ile analizi yapıldı. Sitotoksite belirleme testlerinden biri olan MTT testi, tetrazolyum tuzu kullanılarak hücrelerin renklenmesi esasına dayalı ölçüm yapmaktadır. Tetrazolyum tuzları mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından parçalanır, böylece formazan kristallerine indirgenir ve renk değişimi gösterir. Ancak, tetrazolyum halkası canlı mitokondri tarafından parçalanabildiğinden sadece canlı hücreler oluşturulabilir. MTT tuzları sarı renktedir fakat meydana gelen formazan kristalleri mor renktedir ve suda çözülmezler. Bu yüzden absorbans ölçümü yapılabilmesi için uygun bir çözücü (Dimetilsülfoksit DMSO) içerisinde çözdürülür. Çözünen formazan miktarı ile hücre canlılığı doğru orantılıdır ve spektrofotometrede belirli dalga boylarında ölçüm yapılır.

İnkübasyonda yeterli yoğunluğa ulaşmış olan hücreler, inkübatörden çıkartılarak laminar kabin içerisinde eski besiyerinden uzaklaştırıldı. Tripsin aktivitesini gösterebilmesi için

öncesinde 1X'lik 10 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile flask içerisi yıkandı. 3ml'lik tripsin eklendi ve 2-5 dakika 37°C'lik inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon sonrası hücrelerin bulunduğu flaskın içerisine tripsini inaktive etmek için yeni besiyeri eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra 50ml'lik falkon tüpüne aktarıldı. 3000rpm'de 3 dakika santrifüje koyuldu. Santrifüj sonrası süpernatantı dökülen pellet yeni 10ml'lik besiyeri ile çözdürüldü ve hemositometri yardımı ile ölçümü yapıldı. MTT analizleri daha önce ifade edildiği gibi uygulandı (Berkel ve ark., 2020; Al-Janabi ve ark., 2020; Berkel ve Cacan, 2021; Kucuk ve ark., 2021; Saygi ve Cacan, 2021). Kısaca özetlemek gerekirse; her bir kuyucuk başına 7500 hücre olacak şekilde hesaplama yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu plakların her bir kuyucuk başına 200 µl'de 7500 hücre ekimi yapıldı. 96 kuyucuklu plak inkübatöre kaldırıldı ve 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyonun ardından kullanılan karanfil ve kekik uçucu yağları, eklenmeden önce 4°C'den çıkartılarak vortexlendiler ve 0.5 µl, 0.1 µl 0.05 µl, 0.01 µl, 0.005 µl konsantrasyonlara sahip yağlardan hücrelerin bulunduğu kuyucuklara ekleme yapıldı. Yağ eklenledikten sonra 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonunda, MTT basamaklarının geriye kalan kısmı gerçekleştirildi: MTT tozudan 10 mg hassas terazi yardımı ile tartıldı. Laminar kabinde 10 mg MTT tozu, 2 ml 1X PBS'de çözdürüldü. Daha sonra fenol kırmızı içermeyen RPMI 1640 ile birleştirilmeden önce filtreden geçirildi ve çözelti hazır hale getirildi. İnkübatörden çıkartılan 96'lık plak içerisinde bulunan besiyerleri mikropipet yardımı ile çekilerek uzaklaştırıldı. Ardından kuyucukların içerisine 100 µl 1X PBS eklenip yıkandı. Daha sonra hazırlanmış olan MTT karışımı her kuyucuk için 100 µl eklendi ve 4 saatlik inkübasyona bırakıldı. 4 saatin sonunda, canlı hücrelerde koyu mavi/mor renk değişimi gözlemlendi. Kuyucuklarda bulunan MTT karışımının hepsi çekildi ve 100 µl'lik DMSO çözücüsü eklendi ve pipetaj yapıldı. Bir saat shaker'da (çalkalamalı inkübatör) bekletildi. 1 saatin sonunda spektrofotometrede 540 ve 570 nm'de ölçüm yapıldı. Ölçümde elde edilen değerler excel ve GraphPad programında elde edilen verilerin analizi yapıldı, grafiğe döküldü ve verilerden IC50 değerlerine göre RNA izolasyonunda kullanılacak uygun konsantrasyon 0.01 µl belirlendi.

3.3.RNA İzolasyonu ve PCR Analizi

RNA İzolasyonu

İnkübatörde yeterli yoğunluğa ulaşmış olan kolorektal kanser hücre hatları (SW620 ve HCT-116) için yukarıda belirtilen pasaj tekniği kullanıldı. Ardından hücre sayımı hemositometri yardımı ile yapıldı. 6 kuyucuklu plakaların her kuyucuk başına, 10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda MTT testinden elde edilen verilere göre belirlenen konsantrasyonda kuyucuklara kekik ve karanfil yağ eklemesi yapıldı ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından daha önce ifade edildiği şekliyle RNA izolasyon protokolüne geçildi (Morgan ve ark., 2015; Cacın ve Özmen, 2020; Karatas ve ark., 2021). Uygulanan protokole göre ilk olarak plaka kuyucuklarında bulunan hücrelerin medyaları çekildi ve her kuyucuk için 1 ml PBS eklendi, bekletildi ve dikkatli şekilde geri çekildi. Hücrelerin yüzeyden ayrılıp, parçalanmasını ve böylece hücre içerisindeki moleküllerin dış ortama geçmesini sağlamak için 500 µl'lik Hibrizol eklendi, yavaşça plaka çalkalandı. Daha sonra Hibrizol ile muamele sonrası yüzeyden kalkan hücreler ependorflara aktarıldı ve birkaç dakika hafifçe alt-üst edildi. Proteinleri çöktürmek için 200 µl kloroform eklendi, birkaç saniye vortexlendi ve 2-3 dakika bekletildi ve 4°C'de 12000 rpm'de 15 dakika santrifüje alındı.

Santrifüj sonrası faz ayrımı (RNA, DNA ve protein fazı) gözlemlendi ve dikkatli bir şekilde RNA fazı çekilerek yeni ependorfa aktarıldı. Ayrı bir ependorfa aktarılan RNA'nın çökmesini sağlamak için 500 µl izopropanol eklendi. Ependorflar birkaç saniye vortexlendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi ardından 4°C'de 12000 rpm'de 10 dakika santrifüje alındı.

Santrifüjden çıkarılan ependorf tüplerinin içerisinde bulunan süpernatant döküldü. Tüplerde bulunan RNA'ları saf elde etmek için 1 ml %75'lik etanol eklendi. Etanol ile muamele edilen RNA'lar 4°C'de 9000 rpm'de 3 dakika santrifüje alındı. Santrifüj sonrası süpernatant döküldü ve laminar kabin içerisinde 5-10 dakika arası ependorfların kapakları açık bırakılarak kurumaları için bekletildi. Daha sonra pellet çözdürmek için 30 µl Nükleaz Free H₂O eklendi ve pipetaj yapıldı. Çözeltiden 2 µl alınarak mikropilaya okuyucusuna yüklendi, konsantrasyon ölçümü yapıldı. 230, 260 ve 280 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü, elde edilen absorbans değerlerinden 260 nm dalga boyu değerleri 40 ile çarpılarak ng/µl olarak konsantrasyon hesaplaması excel'de yapıldı.

İzole edilmiş olan RNA örnekleri -80°C dondurucuda muhafaza edildi. RNA'nın kalitesini düşürmemek için gereksiz dondurma-çözdürme aşamalarından kaçınıldı.

qRT-PCR Analizleri

Kantitatif gerçek zamanlı PCR deneyleri için transkriptleri çoğaltmayı sağlayacak olan primerler önceden sipariş edildi. A.B.T. 2X One-step qRT-PCR MasterMix (without SYBR) Kit' kullanıldı. Bu Kite uygun olan protokol ve bileşen konsantrasyonları işleme alındı. qRT-PCR analizinde kullanılan primerler protokollerinde verilen bilgiler doğrultusunda çözdürüldü ve konsantrasyonları ayarlandı (humanizing genomics macrogen tarafından temin edilmiştir).

Gruplar arasındaki gen ekspresyonlarının analizini yapmak için GAPDH geni kalibratör olarak kullanıldı. qRT-PCR analizinde kullanılan primerlere ait olan sekanslar Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.3. qRT-PCR analizinde kullanılan primer sekansları

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Referans
BCL-2	GGTGGGGTCATGTGTGTGG	CGGTTTCAGGTACTCAGTC ATCC	Lv ve ark., 2021
COX-2	GAATGGGGTGATGAGCAGT T	CAGAAGGGCAGGATACA GC	Ikeya ve ark., 2018
DR-4	TCCAGCAAATGGTGCTGAC	GAGTCAAAGGGCACGAT GTT	Abd-Rabou ve ark., 2021
DR-5	CCAGCAAATGAAGGTGATC C	GCACCAAGTCTGCAAAG TCA	
FAS	GGCATCTGGACCCTCCTACC TCTG	CCTTGGAGTTGATGTCAG TCACTTGG	Liu ve ark., 2017
GAPDH	AATGAATGGGCAGCCGTTA	TAGCCTCGCTCCACCTGA CT	Cacan, 2016

Protokole göre hazırlanan bileşen konsantrasyonları toplam hacmi kapiller PCR tüplerine içerisinde 20 µl'ye tamamlandı. Her bir reaksiyon için kullanılan miktarlar ve konsantrasyonları Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.4. qRT-PCR deneylerinde kullanılan her reaksiyonun hacimleri

Kullanılan Bileşenler	Her Bir Reaksiyon İçin Kullanılan Miktar	Konsantrasyon
A.B.T. 2X One-Step qRT-PCR MasterMix (without SYBR)	10 µl	1X
10X fluorescent Dye (SYBR-Green)	2 µl	1X
Forward Primer	1 µl	
Revers Primer	1 µl	
RNA template	2 µl	
RNase-Free Distilled Water	2 µl	

Protokole göre hazır hale gelen bileşenler kapiller tüplere aktarıldı ve PCR aşamalarının gerçekleşmesi için PCR cihazına (Roche LightCycler 1.5 Instrument (Roche Diagnostics GmbH)) yerleştirildi. Tablo 3.4.'de PCR aşamaları verilmiştir.

Tablo 3.5. Tek adımlı PCR işlemi için gereken aşamaları

Program Aşamaları	Döngü Sayısı	Analiz Modu	Sıcaklık (°C)	Süre	Acquisition Mode
Ters Transkripsiyon Aşaması	1	None	55°C	30 Dakika	None
Başlangıç Denatürasyonu	1	None	95°C	15 Dakika	None
Amplifikasyon Aşaması	40	Quantification	Denatürasyon, 95°C	15 Saniye	None

			Bağlanma, 55°C	30 Saniye	None
			Amplifikasyon, 72°C	35 Saniye	Single
Soğuma Aşaması	1	None	37°C	30 Saniye	None

Deney süreci tamamlandıktan sonra elde edilen Ct değerleri baz alınarak işlem yapıldı. Bununla birlikte, Relative genlerin Ct değerleri analiz yapılırken housekeeping geni olan GAPDH geni Ct kalibratör olarak belirlendi. Rölative genlerin ekspresyonları için Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) metodu kullanıldı.

3.4. Migrasyon

12 kuyucuklu plak içerisine ekimi yapılan hücreler 24 saatlik inkübasyona tabii tutuldu. 24 saat inkübasyonun ardından hücrelerin adherent oldukları gözlemlendi. En ince uçlu steril pipet ucu ile plak zemininin tam ortasına çizgi çizildi. Yağ eklemesi yapılmadan önce hücrelerin floresan mikroskopunda çekimi yapıldı. Her bir yağ için iki farklı konsantrasyon (0.01 µl ve 0.1 µl) ve iki kuyucukta kontrol grubu seçildi. Çizme tekniği kullanılarak, Her bir kuyucukta 1ml'de 500.000 hücre ekimi yapıldı (hücrelerin tüm zemini kaplaması için). Çekim sonrası her bir kuyucuğa yağ eklemesi yapıldı. Yağ eklendikten sonra 0. saat, 24. saat, 48. saat, 72. saat ve 96. saat Leica DFC295 S 40/0.45 floresans mikroskobu ile hücrelerin poliferasyonu ve apoptotik görüntüleri incelendi.

3.5. İstatiksel Analiz ve Veri Görselleştirme

Bu çalışmada, MTT testlerinde deney grupları ile kontrol grupları kıyaslanarak analizi yapıldı. Bu doğrultuda, kontrollerin canlılıkları %100 olarak baz alınarak, deney gruplarında karşılaşılan değişimler gözlemlendi. qRT-PCR deneylerinde Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) metodu kullanılarak analiz gerçekleştirildi. Bununla birlikte, livak metodunda kontrol grupları 1'e eşitlenerek hedef genleride gözlemlenen ekspresyon miktarları değerlendirildi. İstatistiksel olarak karşılaştırması yapılan verilerin kontrol grubu ile hedef genlerin arasındaki Student's T-test metodu kullanıldı. P değerlerinin 0.05 ve altındaki

durumlar istatistiksel olarak anlamlı olduğunda yıldızlı simgelerle grselleştirildi. (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Grselleřtirmelerde GraphPad programı tercih edildi. Mikroskop grntleri ise yağ uygulamaları sonrası 0-24-48-96. saat aralıkları Leica DFC295 S 40/0.45 ile çekildi. Leica Application Suite v+ yazılımı kullanılarak fotoğraflar hazırlandı.

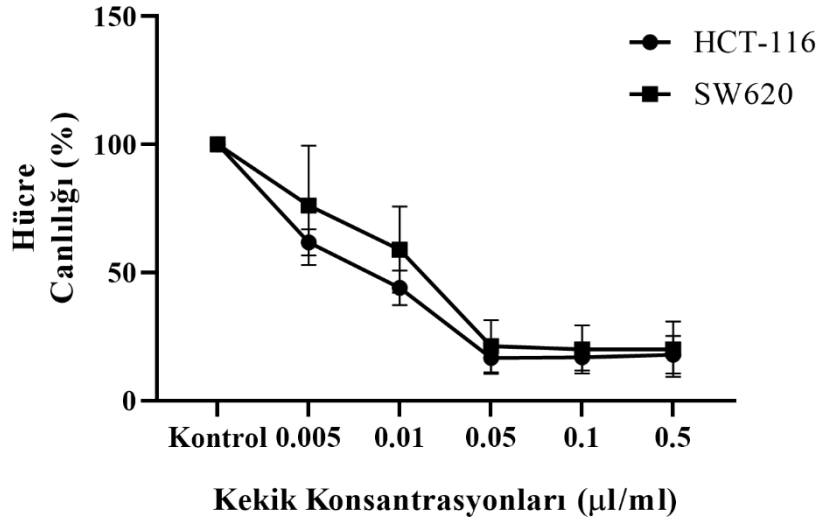


4. BULGULAR ve TARTIŞMA

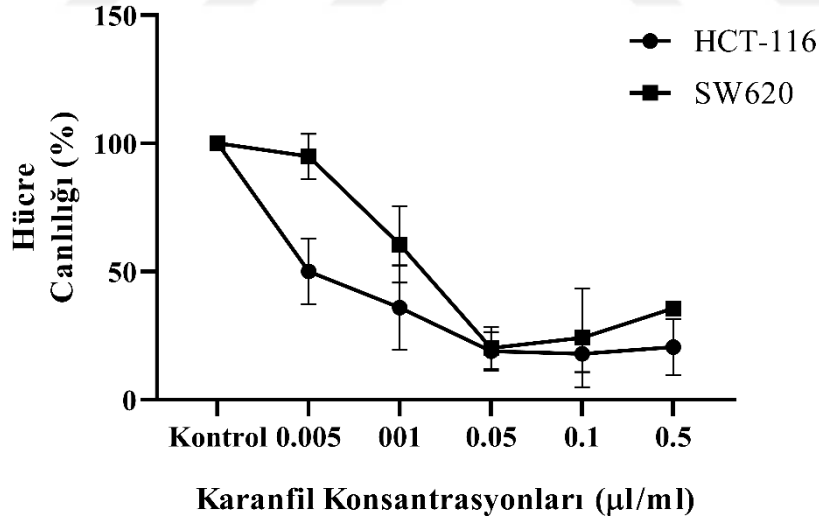
4.1. Hücre Canlılık Testleri

Kekik ve karanfil esansiyel yağlarının artan dozları ile iki farklı kolorektal kanser hücre hattında MTT yöntemi kullanılarak çeşitli dozlara karşı canlılık düzeyleri incelendi. Bu amaç doğrultusunda HCT-116, SW620 kolorektal kanser hücre hatlarında esansiyel yağların 0.005 μ L, 0,01 μ L, 0.05 μ L, 0.1 μ L ve 0.5 μ L konsantrasyonları kullanıldı. İnkübatörde yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler sayıma tabii tutuldu ve deney için gerekli miktarlar hesaplandı. Ardından 96'lık plaklara ekim yapıldı daha sonra inkübatöre kaldırıldı. 24 saatlik inkübasyondan ardından yağ uygulaması yapıldı ve tekrardan inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyonun sonunda, MTT'nin geri kalan prosedürü uygulandı ve spektrofotometre yardımı ile ölçüm yapıldı.

Kekik ve karanfil esansiyel yağ uygulamalarının ardından iki hücre hattı üzerindeki yüzde canlılık oranları, MTT testlerinde elde edilen verilerin analizleri göre belirlendi. İstatistiksel verilerde, kekik ve karanfil esansiyel yağlarının iki hücre hattı (HCT-116 ve SW620) üzerinde 0.01 μ L'lik konsantrasyonunda hücre canlılığının yaklaşık %50 oranında bir düşüş olduğu gözlemlendi. İstatistiksel veriler baz alınarak kekik ve karanfil esansiyel yağlarının HCT-116 ve SW620 kolorektal kanser hücre hatlarında gösterdikleri sitotoksik etkilerin analizi sonucunda IC₅₀ dozları belirlendi (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. Farklı kekik konsantrasyonlarının kolorektal kanser hücre hatlarında canlılık yüzdesi ve IC₅₀ değerinin belirlenmesi. Kekik esansiyel yağının 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 ve 0.5 µl konsantrasyonları HCT-116 hücre hattında (daire) ve SW620 hücre hattında (kare) gözlemlendi. Her bir konsantrasyona karşılık gelen hücre canlılık yüzdesi gösterilmektedir. Hata çubukları ise SD değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel analizler GraphPad programında hesaplanarak t testi analizi yapıldı.



Şekil 4.2. Karanfil konsantrasyonlarının kolorektal kanser hücre hatlarında canlılık yüzdesi ve IC₅₀ değeri belirlenmesi. Karanfil esansiyel yağının 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 ve 0.5 µl konsantrasyonları HCT-116 hücre hattında (daire) ve SW620 hücre hattında (kare) gözlemlendi. Her bir konsantrasyona karşılık gelen hücre canlılık yüzdesi gösterilmektedir. Hata çubukları ise $\pm$ SD değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel analizler GraphPad programı kullanılarak t testi analizi yapıldı.

Tablo 4.1. Karanfil ve kekik yağı uygulanan kolorektal kanser hücre hatları için IC₅₀ değerleri

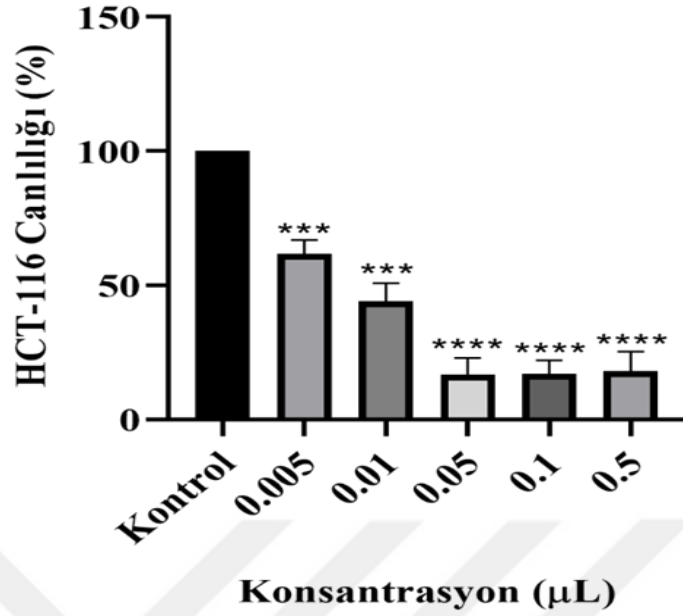
Hücre Hattı	Karanfil	Kekik
HCT-116	0.011 ± 0.004 µl/ml	0.012 ± 0.002 µl/ml
SW620	0.019 ± 0.003 µl/ml	0.017 ± 0.003 µl/ml

4.1.1. Kekik esansiyel yağının farklı konsantrasyonlarda kolorektal kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

Kekik esansiyel yağı kolorektal hücre hatlarında sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT testi prosedürü uygulandı. Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışmada HCT-116 ve SW620 hücre hatları üzerinde yüksek sitotoksitesi belirlenmiştir.

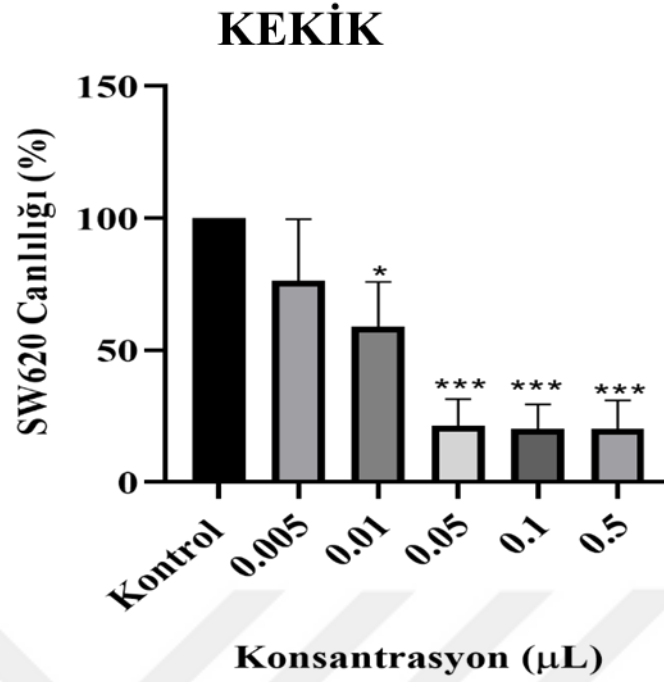
HCT-116 hücre hattında 0.05 µL’lik konsantrasyondan itibaren, kekik esansiyel yağının sitotoksik etkisine karşı duyarlılığı gözlemlenmeye başlanmıştır (Şekil 4.3). HCT-116 hücre hattının canlılık oranı 0.01 µL’lik konsantrasyonda %50 eşiğinin altına düşmektedir. 0.05-0.1 µL konsantrasyonlarının üstünde bu oran %25’in altına düşmektedir. HCT-116 hücrelerinin kekik esansiyel yağının artan konsantrasyonlarına maruz kalmasıyla sitotoksite de artış gözlemlenmiştir.

KEKİK



Şekil 4.3. HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi ile kekik yağının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HCT-116 kolorektal kanser hücreleri 0.005 µL, 0.01 µL, 0.05 µL, 0.1 µL ve 0.5 µL konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrarlanmıştır

SW620 kolorektal kanser hücre hattında 0.005 µL 'lik konsantrasyonda sitotoksik etki görülmeye başlanmıştır fakat HCT-116'ya göre sağ kalım oranı daha yüksektir. 0.01 µL'lik konsantrasyonda hücrelerde %50'ye yakın canlılık oranında azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.). Özellikle, 0.05 µL ve artan konsantrasyonlarda %25'den daha az hücre sağ kalımı gözlenirken sitotoksik etki %50'den fazla olduğu tespit edildi. Ayrıca kekik, karanfil esansiyel yağına göre SW620 hücre hattı üzerinde daha fazla sitotoksik etkisi gözlemlendi (Şekil 4.4.).



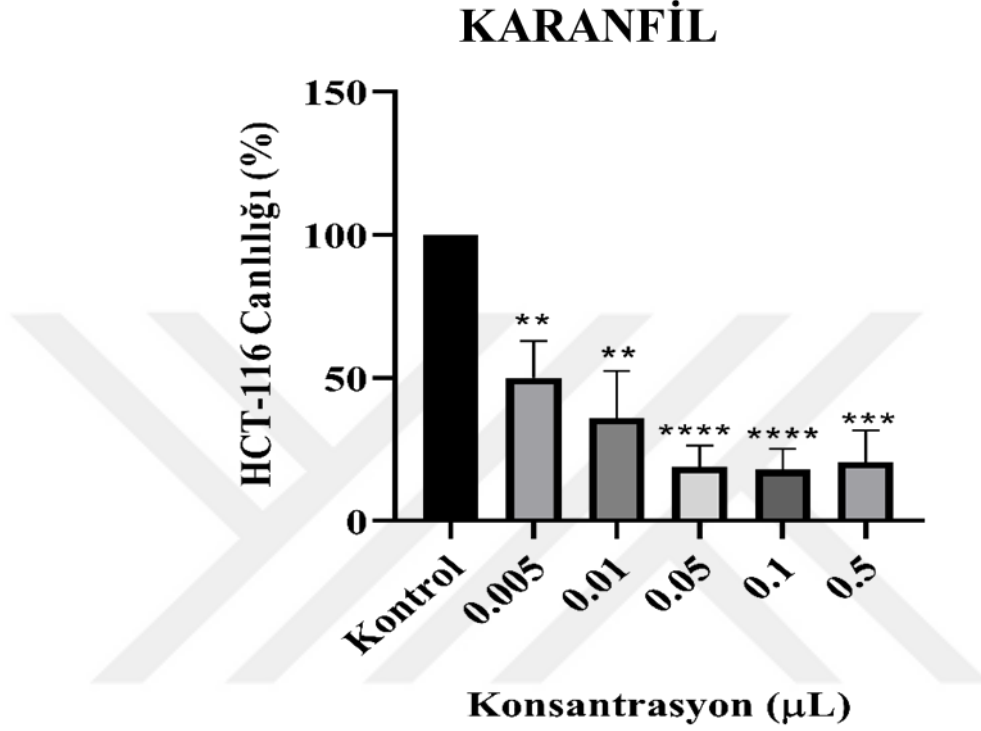
Şekil 4.4. SW620 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi ile kekik yağının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. Kolorektal kanser hücreleri 0.005 µL, 0.01 µL, 0.05 µL, 0.1 µL ve 0.5 µL konsantrasyonlarındaki kekik yağı ile muamele edildi. Bar çubukları hücre canlılığını gösterirken, hata çubukları SD değerlerini göstermektedir. Elde edilen veriler için istatistiksel analizler GraphPad yardımıyla kontrol gruplarına göre t-testi uygulanarak hesaplandı (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler birbirinden bağımsız olarak üç kez tekrarlandı.

4.1.2. Karanfil esansiyel yağının farklı konsantrasyonlarda kolorektal kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

Karanfil yağı uygulamayan alınan HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde yüksek sitotoksik etki göstermiştir. Öncelikle hücreler 96 kuyucuklu plaklara ekildi, 24 saat inkübatörde bekletildikten sonra karanfil esansiyel yağının farklı konsantrasyonlarda işlem uygulandı. 48 saatlik inkübasyonun ardından, MTT'nin geri kalan prosedürü gerçekleştirildi ve spektrofotometre yardımı ile ölçüm yapıldı.

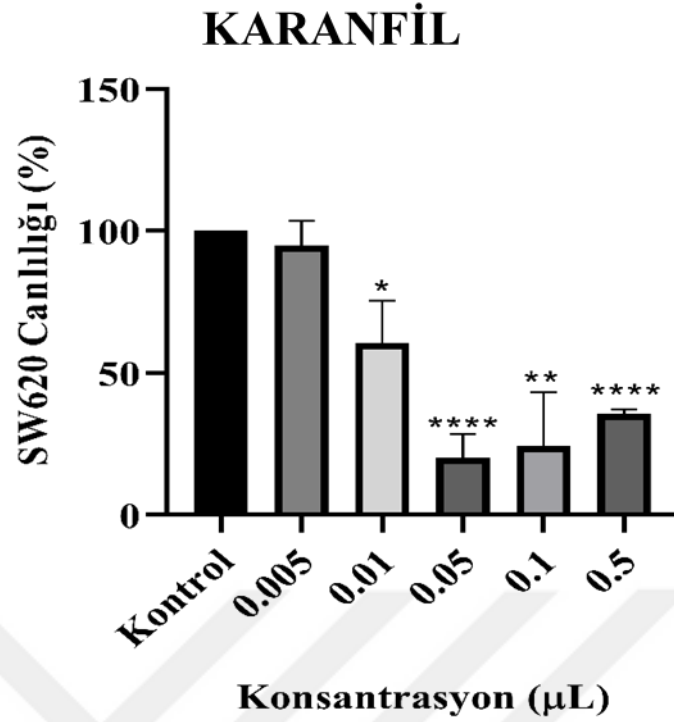
Karanfil esansiyel yağı uygulanan HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde 0.005 µL'lik konsantrasyondan itibaren sitotoksik etki görülmeye başlamıştır. %50'lik sağ kalım oranı ise 0.01 µL gözlemlenirken (Şekil 4.2.) artan konsantrasyonlar ile beraber sitotoksik artış

gözlemlendi (Şekil 4.5.). Uygulamaya tabi tutulan karanfil ve kekik esansiyel yağlarında aynı konsantrasyonlarda karanfil yağının HCT-116 hücre hattı üzerinde konsantrasyon artışı ile beraberinde daha fazla sitotoksik etkisi gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5. HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi ile karanfil yağının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HCT-116 kolorektal kanser hücreleri 0.005 µL, 0.01 µL, 0.05 µL, 0.1 µL ve 0.5 µL konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Karanfil esansiyel yağı uygulanan SW620 kolorektal kanser hücre hattı üzerinde sitotoksitesi gözlemlenmiştir. 0.01 µL’de %50 canlılık gözlemlenirken (Şekil 4.2.) 0.05 µL, 0.1 µL ve 0.5 µL’de canlılık %50’den daha az sağ kalım oranı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). (Şekil 4.6.).



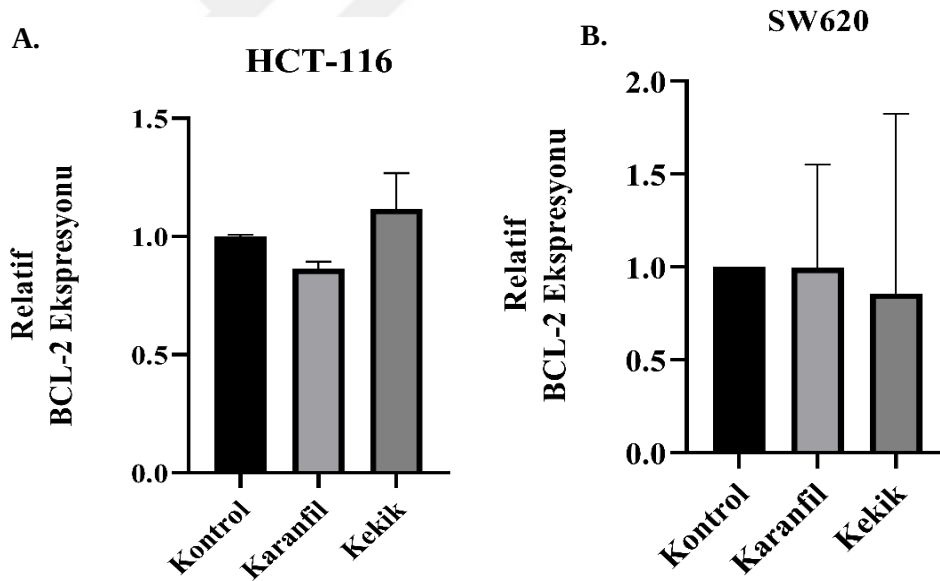
Şekil 4.6. SW620 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi ile karanfil esansiye yağının hücresel sitotoksik etki verileri. kolorektal kanser hücreleri 0.005 µL, 0.01 µL, 0.05 µL, 0.1 µL ve 0.5 µL konsantrasyonları ile işlem yapıldı. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (****: $P < 0.0001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.1$)

4.2. Bazı Esansiyel Yağların Apoptotik Genlerin Ekspresyonu Üzerindeki Analizleri

Bir sonraki aşamada, karanfil ve kekik esansiyel yağlarının inflamasyonda ve apoptozda etkin rolü olan *BCL-2*, *COX-2*, *FAS*, *DR4* ve *DR5* genlerin regülasyonu üzerindeki etkileri incelendi. Karanfil ve kekik yağlarının belirlenen genler üzerindeki potansiyel etkilerinin belirlemek için MTT testinin sonuçlarına göre karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal hücre hatlarında (HCT-116 ve SW620) canlılık oranını %50'nin altına düşürmeyen 0.01µl'lik konsantrasyonları seçildi ve RNA izolasyon deneyleri yapıldı. RNA izolasyon aşamasının hemen ardından qRT-PCR analizlerine geçildi.

4.2.1. Karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamele edilen HCT-116 ve SW620 hücrelerinde anti-apoptotik gen BCL-2 ekspresyon miktarlarının regülasyonu üzerinde potansiyel etkileri

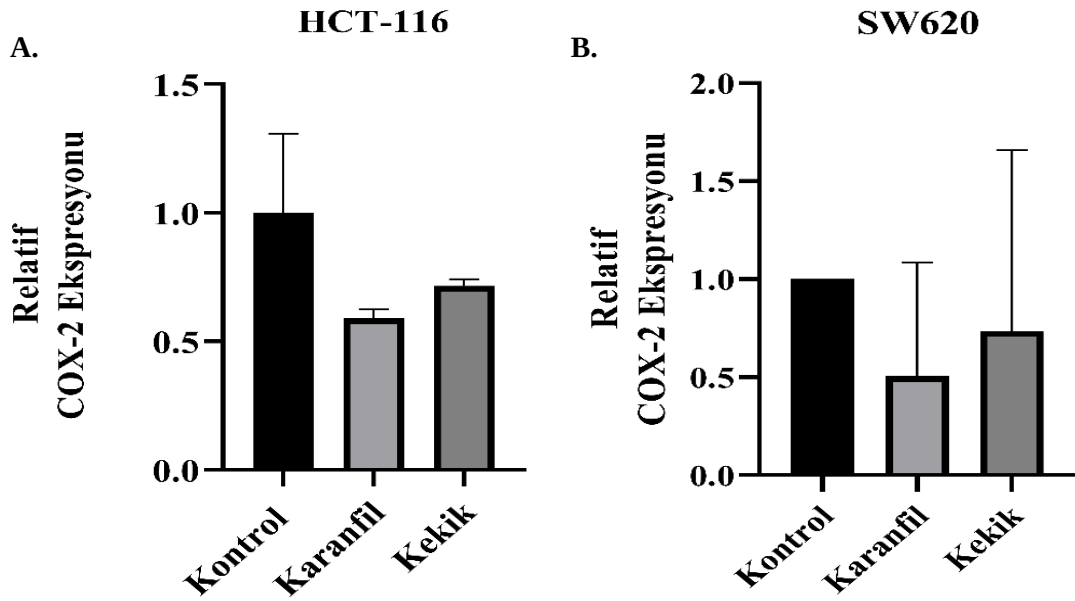
BCL-2 geni, hücrenin sağ kalım ya da ölümünü düzenleyen geniş bir protein ailesinin kurucu üyesidir. Bu onkoprotein hem patofizyolojik hemde fizyolojik olarak apoptozun tetiklenmesinde rol alabilmektedir. Kolorektal kanser hücre hatları HCT-116 ve SW620 üzerinde karanfil ve kekik esansiyel yağ uygulaması yapıldı. Uygulama yapılan hücrelerden RNA izole edildi ve izole edilen RNA'lerden qRT-PCR analizi ile cDNA elde edildi. Elde edilen verilerde, karanfil ve kekik esansiyel yağı uygulanan HCT-116 hücre hattında karanfil esansiyel yağı uygulanan grubun kontrol grubuna kıyasla BCL-2 gen ekspresyon seviyesini düşürdüğü, kekik esansiyel yağı uygulanan grubun ise kontrole göre BCL-2 ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Bir diğer kolorektal kanser hücre hattı SW620'de ise karanfil yağı uygulanan grubun BCL-2 gen ekspresyon seviyesinde kontrole oranla değişim gözlenmezken, kekik esansiyel yağı uygulanan grubun ise, hem kontrol grubuna hemde karanfil esansiyel yağı uygulanan gruba nazaran BCL-2 gen ekspresyon seviyesini azalttığı tespit edildi. Fakat istatistiksel analizlerde gözlemlenen ekspresyon seviyelerindeki değişimler anlamlı sonuç vermedi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları HCT-116 ve SW620 üzerinde uygulanması ile anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2 gen ekspresyon miktarları. A. HCT-116 hücre hattı üzerinde karanfil ve kekik esansiyel yağ uygulamalarında Bcl-2 ekspresyon seviyeleri B. SW620 hücre hattı üzerinde karanfil ve kekik esansiyel yağı uygulamaları ile Bcl-2 ekspresyon seviyelerini belirtilmektedir. Deney gruplarına 0.01 µl/mL karanfil ve kekik yağı eklendi. Kıyaslamalar için Livak ($2^{-\Delta\Delta CT}$) metodu kullanıldı ve hata çubukları +SEM değerini belirtmektedir. Sonuçlar GAPDH kontrol genine normalize edilerek hesaplandı ve kontrol 1 olarak sabit tutuldu. Deneyler üç kez tekrarlandı.

4.2.2. Karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamele edilen HCT-116 ve SW620 hücrelerinde inflamasyon ve apoptozda rol oynayan COX-2 geninin regülasyonu üzerinde potansiyel etkileri

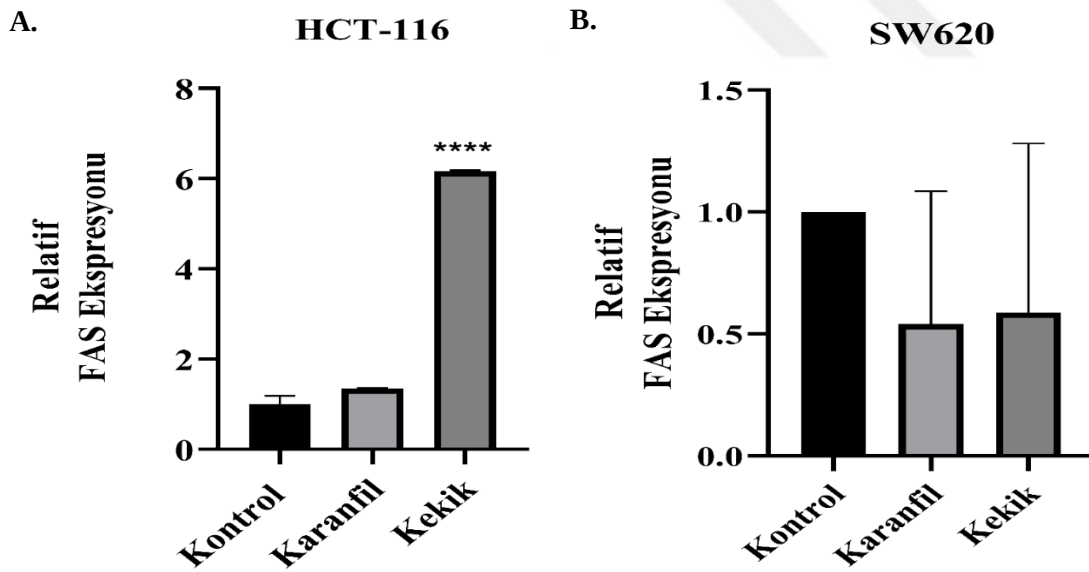
Siklooksijenazlar, prostaglandin sentezinde anahtar role sahiptir. Siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonu inflamasyon dahil anjiyogenez ve tümörjenez içeren birçok patofizyolojik süreçlerle ilişkilidir. Kolorektal kanser hücre hatları alternatif ve tamamlayıcı tedavi yöntemlerinde tercih edilen karanfil ve kekik esansiyel yağlar ile muamele edildikten sonra qRT-PCR ile COX-2 geni ifadesine bakıldı. HCT-116 ve SW620 kolorektal kanser hücre hatlarında karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamele edilen grupların kontrol grubuna kıyasla COX-2 gen ekspresyon seviyelerinde değişim tespit edilsede istatistiksel olarak anlamlı sonuç gözlemlenmedi (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları HCT-116 ve SW620 üzerinde uygulanması ile inflamatuvar bir gen olan COX-2 gen ekspresyon miktarları. A. HCT-116 hücre hattı üzerinde karanfil ve kekik esansiyel yağ uygulamalarında COX-2 ekspresyon seviyeleri B. SW620 hücre hattı üzerinde karanfil ve kekik uygulamaları ile COX-2 ekspresyon seviyeleri belirtilmektedir. Analiz için Livak (2^{-ddCT}) metodu ile analiz edildi ve kontrol grubunun değeri 1'e eşitlendi. Deneyler üç kez tekrarlandı.

4.2.3. Karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamele edilen HCT-116 ve SW620 hücrelerinde proapoptotik bir gen olan Fas geninin regülasyonu üzerinde potansiyel etkileri

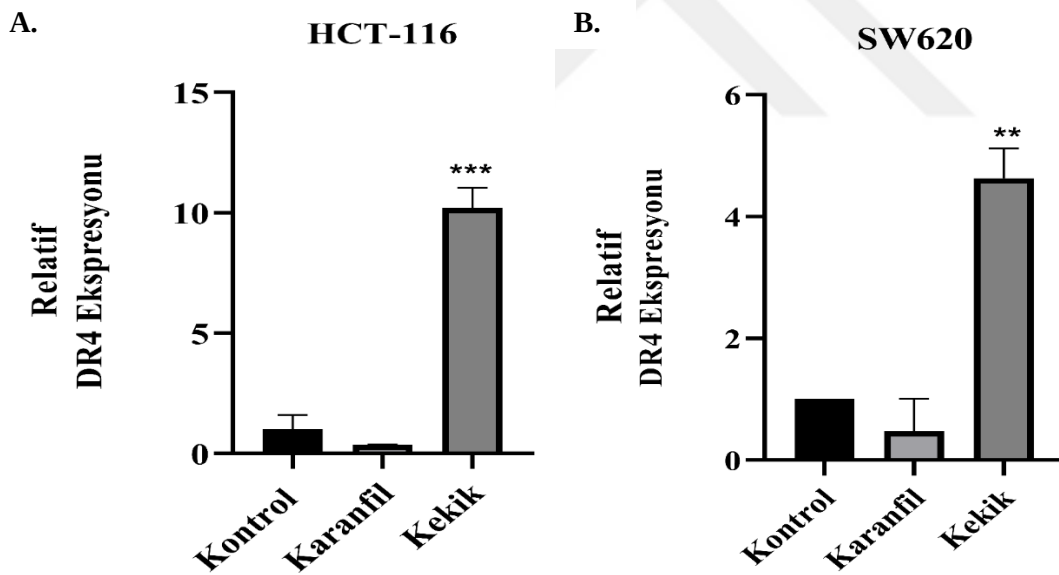
Tümör Nekroz Faktörü Reseptör süper ailesinin (TNFRS) ölüm reseptörlerinde biri olan Fas (CD95) tip bir transmembran proteinidir. Fas-FasL etkileşimi, programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoza yol açan sinyal zinciri indüklemektedir. Uzun yıllardır alternatif tedavi yöntemlerinde kullanılan karanfil ve kekik yağı uygulanan kolorektal hücre hatlarında apoptotik yolun indükleyicilerinden biri olan Fas geninin ekspresyon seviyelerinde pozitif anlamda regülasyonunu amaçlandı. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında, kontrol grubuna göre kekik esansiyel yağı FAS geninin ekspresyon seviyelerindeki artış istatistiksel analizler sonucunda anlamlı olduğu belirlendi. Kekik yağının diğer hücre hattında ise anlamlı değişim gözlemlenmediği gibi karanfil esansiyel yağı uygulanan her iki hücre hattında da FAS gen ekspresyonunda anlamlı bir değişim gözlemlenmedi (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları HCT-116 ve SW620 üzerinde uygulanması ile apoptotik bir gen olan Fas gen ekspresyon miktarları. A. HCT-116 hücre hattı üzerinde karanfil ve kekik esansiyel yağ uygulamalarında Fas ekspresyon seviyeleri B. SW620 hücre hattı üzerinde karanfil ve kekik uygulamaları ile Fas ekspresyon seviyeleri belirtilmektedir. Bar çubukları Livak (2^{-ddct}) değerini gösterirken hata çubukları ise +SEM değerini belirtmektedir. Deneyler üç kez tekrarlandı.

4.2.4 Karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamele edilen HCT-116 ve SW620 hücrelerinde Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü DR4 geninin regülasyonu üzerinde potansiyel etkileri

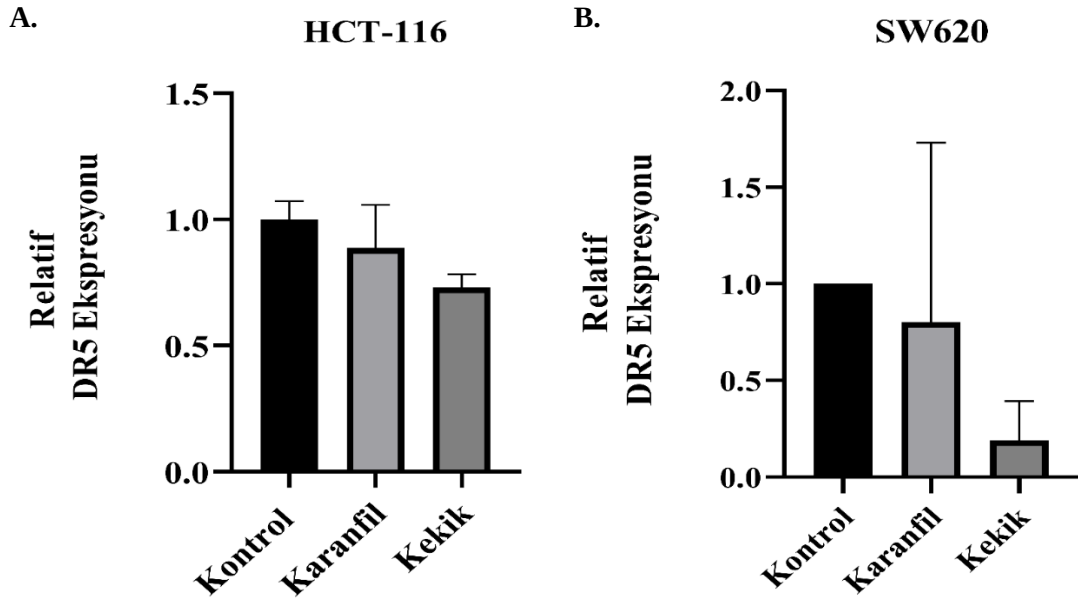
Tümör nekroz faktörü sitokin süper aile üyelerinden biri olan TRAIL ligandı, ölüm reseptörleri DR4 ve DR5'e bağlanarak apoptozu indükleyebilmektedir. Karanfil ve kekik esansiyel yağlar ile muamele edilen kolorektal kanser hücre hatlarında bu ölüm reseptörlerinden DR4 gen ifadesinin regülasyonunu ortaya koymayı amaçladık. Kolorektal kanser hücre hatlarında kontrol grubuna kıyasla kekik esansiyel yağı ile muamele edilen gruplarda DR4 gen ekspresyonları istatistiksel anlamda artış gösterirken, kontrol grubuna kıyasla karanfil yağı uygulanan her iki hücre hattında DR4 ekspresyonunda düşüş meydana geldi fakat anlamlı bir azalış değildi. Kekik esansiyel yağının HCT-116 hücre hattında DR4 gen ekspresyonunu SW620 kanser hücre hattına göre iki kat daha fazla arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları HCT-116 ve SW620 üzerinde uygulanması ile apoptotik bir gen olan DR4 gen ekspresyon miktarları. A. HCT-116 hücre hattı üzerinde karanfil ve kekik esansiyel yağ uygulamalarında DR4 ekspresyon seviyeleri B. SW620 hücre hattı üzerinde karanfil ve kekik uygulamaları ile DR4 ekspresyon seviyeleri belirtilmektedir. Deney gruplarına 0.01 µl/mL karanfil ve kekik yağı eklendi. Analiz için Livak (2^{-ddCT}) metodu ile analiz edildi ve kontrol grubunun değeri 1'e eşitlendi. Hata çubukları ise +SEM değerini belirtmektedir. Deneyler üç kez tekrarlandı.

4.2.5 Karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamele edilen HCT-116 ve SW620 hücrelerinde Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü DR5 geninin regülasyonu üzerinde potansiyel etkileri

Tümör Nekroz Faktörü reseptörü protein ailesi (TNFRS) farklı biyolojik süreçlerde apoptozda önemlidir. TRAIL ile indüklenen apoptoz yolağında önemli role sahip olan ölüm reseptörlerinden bir diğeri olan DR5 geninin karanfil ve kekik esansiyel yağı ile muamele edilen kolorektal kanser hücre hatlarındaki ekspresyonu üzerindeki etkilerini inceledik. Karanfil ve kekik esansiyel yağ uygulamaları yapılan HCT-116 ve SW620 kolorektal kanser hücre hatlarında kontrol grubuna kıyasla her iki hücre hattında da DR5 ekspresyon seviyelerinde azalış gözlemlendi. SW620 kolorektal kanser hücre hattında ise kekik esansiyel yağı uygulanan grupta DR5 gen ekspresyonunda aşırı bir düşüş gözlemlenirken HCT-116 hücre hattında kontrol grubuna kıyasla ekspresyon seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir. Karanfil esansiyel yağı SW620 hücre hattına göre



Şekil 4.11. Karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları HCT-116 ve SW620 üzerinde uygulanması ile apoptotik bir gen olan DR5 gen ekspresyon miktarları A. HCT-116 hücre hattı üzerinde karanfil ve kekik esansiyel yağ uygulamalarında DR5 ekspresyon seviyeleri B. SW620 hücre hattı üzerinde karanfil ve kekik uygulamaları ile DR5 ekspresyon seviyeleri belirtilmektedir. Kıyasamalar için kontrol grubu referans alındı. Bar çubukları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerini, hata çubukları ise $\pm$ SEM değerini göstermektedir. Deneyler üç kez tekrarlandı.

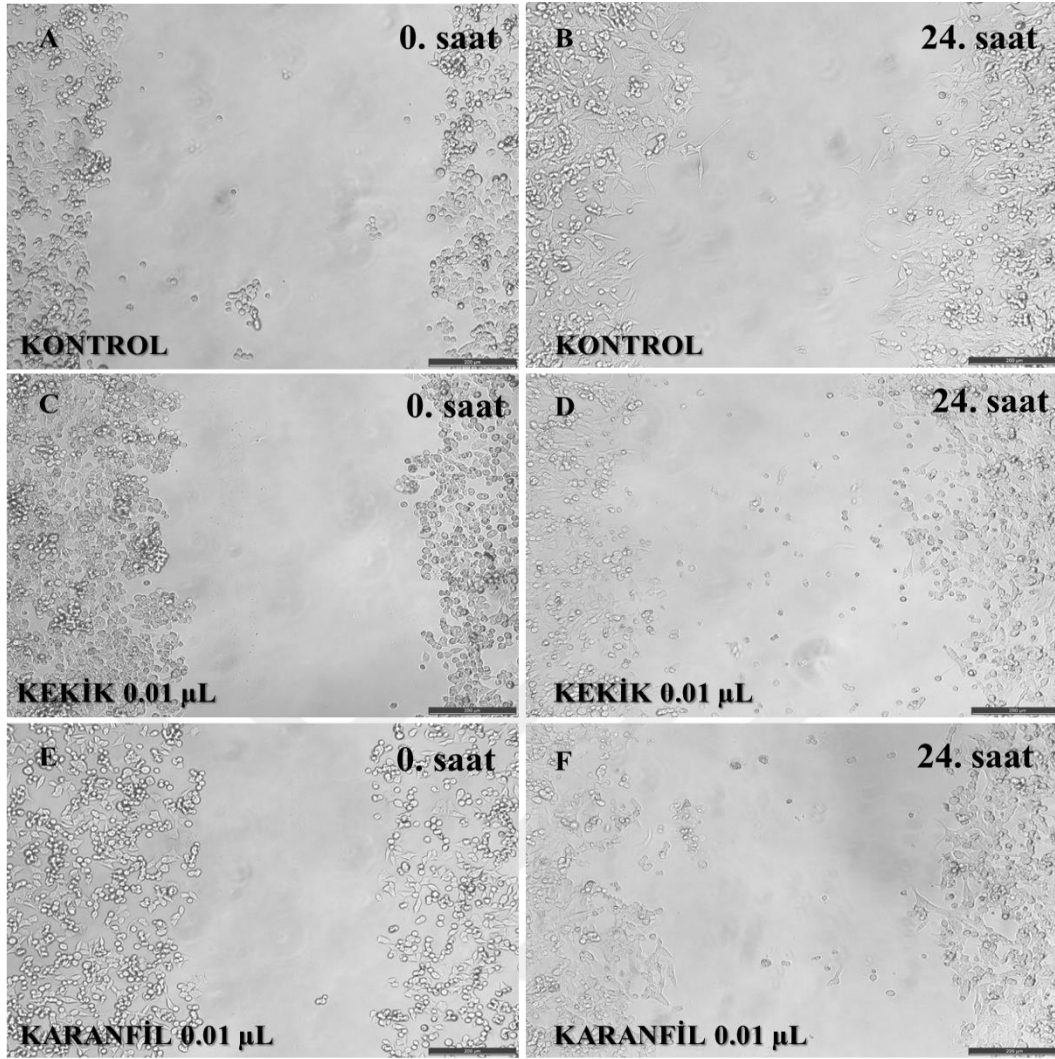
HCT-116 hücre hattında kontrol grubuna oranla DR5 ekspresyonunu daha az düşürdüğü tespit edildi. Ancak her iki esansiyel yağ için istatistiksel açıdan anlamlı sonuç vermedi (Şekil 4.11).

Sonuç olarak, tıbbi bitkilerden elde edilen karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatlarında anti-apoptotik ve inflamatuvar genlerin ekspresyon seviyelerinde değişimler gözlemlense dahi istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim görülmedi. Ayrıca, karanfil ve kekik yağlarının apoptotik süreçte rol oynayan genlerin ekspresyon seviyelerinde hücre hatlarına göre farklılık gösterebildikleri gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu iki esansiyel yağların bazı apoptotik genlerin bazı apoptotik genlerin ekspresyonlarını arttırabildikleri ve böylece kanser hücre hatlarında apoptozu tetikleyebildiğini düşündürmektedir (Şekil 4.11.).

4.3. Kekik ve Karanfil Esansiyel Yağları ile Muamele Edilen Hücrelerin (HCT-116) Migrasyonu Üzerindeki Etkisi

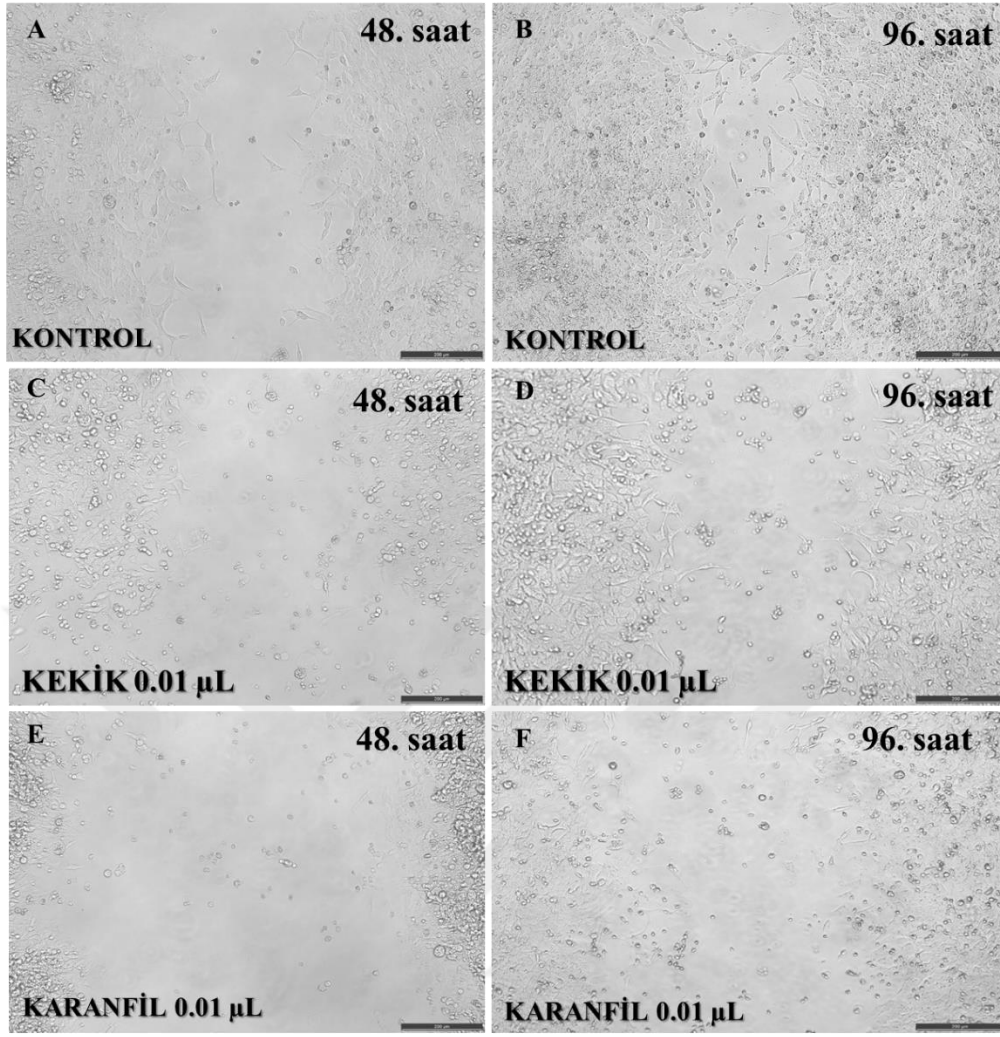
Hücreler üzerinde sitotoksik etkisi MTT sonuçları ile belirlenen konsantrasyonlardan yüksek sitotoksiklik göstermeyen 0.01 μ L ve 0.1 μ L konsantrasyonlar seçildi. Hücreler 12 kuyucuklu plakalara ekimi yapıldı. 24 saat'lik inkübasyonun sonunda kekik ve karanfil eklemesi yapıldı. 0., 24., 48. ve 96. saatler arasında hücrelerin göçüne etkileri floresan mikroskobu yardımı ile görüntülendi.

HCT-116 kolorektal hücre hattında yapılan hücre migrasyon deneylerinde kekik ve karanfil yağlarının 0.01 μ L'lik konsantrasyonu ile muamele sonrası ilk saat ve 24. saat sonunki mikroskobik görüntülerini inceledik. HCT-116 kolorektal hücre hattında yapılan hücre migrasyon deneylerinde kekik ve karanfil yağının 0.01 μ L'lik konsantrasyonu ile muamele sonrası ilk saat ve 24 saat sonundaki mikroskobik görüntüleri kontrol grubuna oranla hücre büyümesini ve poliferasyonunu yavaşlattığı, böylece de hücre göçünü azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.12.).



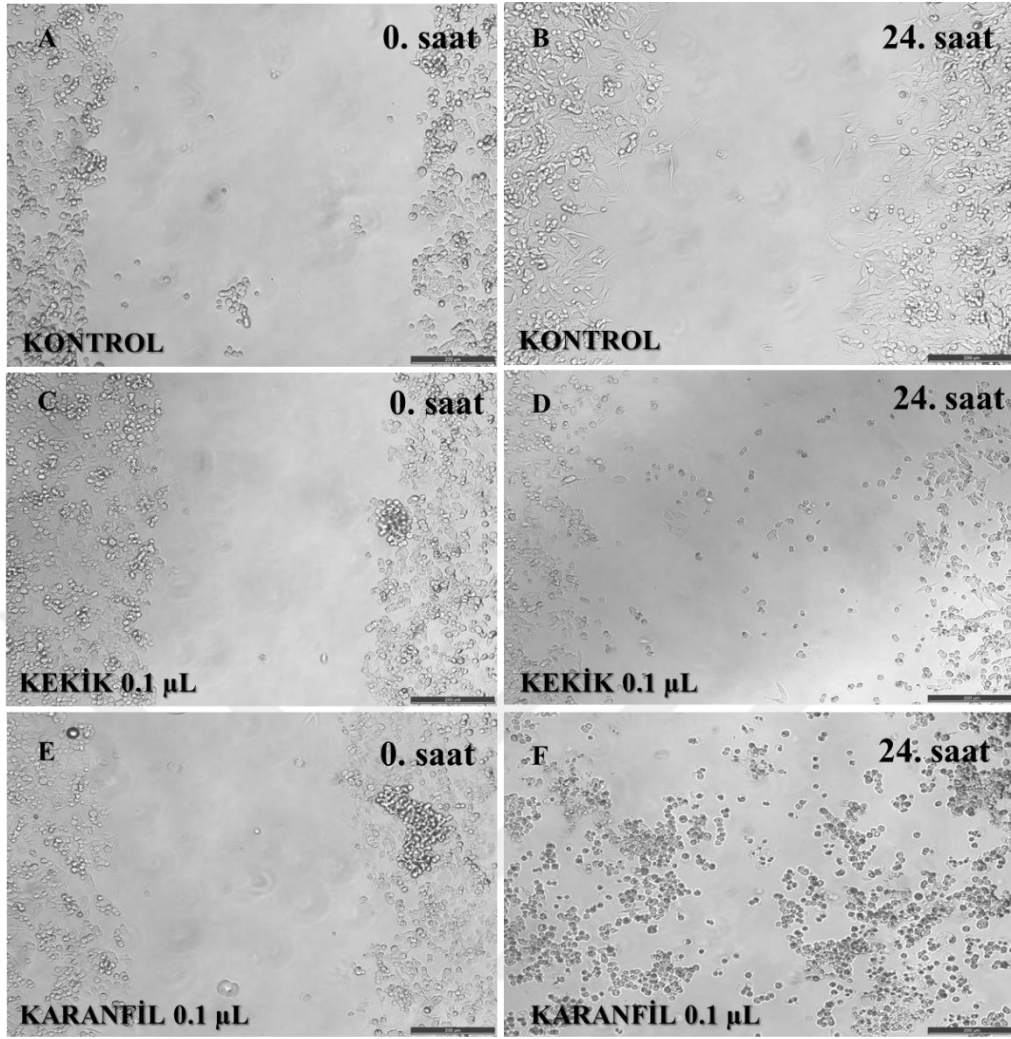
Şekil 4.12. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamelesinin ardından ilk 0. ve 24. saatte hücre mikroskopik görüntüleri. A- 0. saatlik kontrol grubu HCT-116 hücre hatlarının mikroskopik görüntüsü B- 24 saat sonra kontrol grubunun mikroskopik görüntüsü C- 0 saatlik Deney gruplarında kekik (0.01 µl/mL) ile muamele sonrası HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü D- 24 saatlik kekik (0.01 µl/mL) ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü E- 0 saatlik karanfil (0.01 µl/mL) ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü F-24 saatlik karanfil (0.01 µl/mL) ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (10x'lik objektif 200 µm ölçek).

HCT-116 kolorektal hücre hattında yapılan hücre migrasyon deneylerinde kekik ve karanfil yağlarının 0.01 µl'lik konsantrasyonu ile muamele sonrası 48. saat ve 96. saat sonunki mikroskopik görüntülerini inceledik. Kontrol grubunda 96. Saat sonunda gözle görülür bir hücre göçü olduğu ve migrasyon aralığının kapandığı bununla birlikte, kekik ve karanfil yağının 0.01 µl'lik konsantrasyonu ile muamele edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla hücre göçünün azaldığı ve hücrelerin morfolojilerinde ölüme giden hücrelerin arttığı gözlemlenmiştir. (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamelesinin ardından ilk 48. ve 96. saatte hücre mikroskopik görüntüleri. A- 48. saatlik kontrol grubu HCT-116 hücre hatlarının mikroskopik görüntüsü B- 96 saat sonra kontrol grubunun mikroskopik görüntüsü C- 48 saatlik kekik (0.01 µl/mL) ile muamele sonrası HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü D- 96 saatlik kekik (0.01 µl/mL) ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü E- 48 saatlik karanfil (0.01 µl/mL) ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü F-96 saatlik karanfil (0.01 µl/mL) ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (10x'lik objektif 200 µm ölçek).

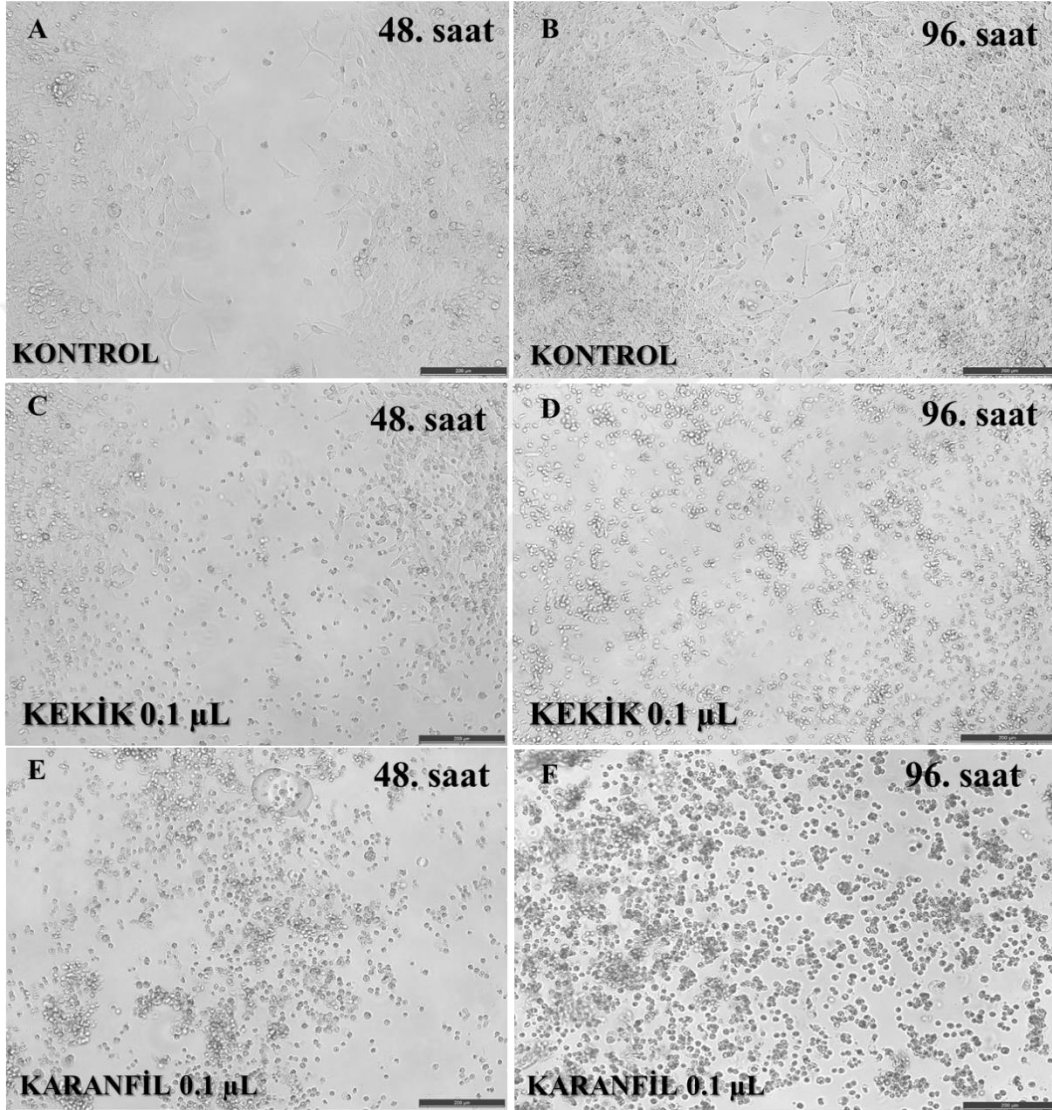
HCT-116 kolorektal hücre hattında yapılan hücre migrasyon deneylerinde kekik ve karanfil esansiyel yağlarının 0.1 µl'lik konsantrasyonu ile muamele sonrası ilk saat ve 24 saat sonundaki mikroskopik görüntüleri incelendi. Kekik yağı ile muamele edilen grupta kontrole kıyasla hücre göçünde azalma olduğu gözlemlendi. Karanfil yağının 0.1 µl'lik konsantrasyonu ile muamele edilen grubun, kontrol grubuna kıyasla hücre göçünün azaldığı ve 24 saatlik maruz sonunda hücrelerin morfolojilerinde ölüme gitmeye başladıkları gözlemlendi (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında karanfil ve kekik esansiyel yağlarının 0.1 µl’lik konsantrasyonu ile muamelesinin ardından ilk 0. ve 24. saatte hücre mikroskopik görüntüleri. A- 0. saatlik kontrol grubu HCT-116 hücre hatlarının mikroskopik görüntüsü B- 24 saat sonra kontrol grubunun mikroskopik görüntüsü C- 0 saatlik kekik (0.1 µl/mL) ile muamele sonrası HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü D- 24 saatlik kekik (0.1 µl/mL) ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü E- 0 saatlik karanfil (0.1 µl/mL) ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü F-24 saatlik karanfil (0.1 µl/mL) ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (10x’lik objektif 200 µm ölçek).

HCT-116 kolorektal hücre hattında yapılan hücre migrasyon deneylerinde kekik ve karanfil yağlarının 0.1 µl’lik konsantrasyonu ile muamele sonrası 48 saat ve 96 saat sonunki mikroskopik görüntülerini inceledik. Kontrol grubunda 96. saat sonunda gözle görülür bir hücre göçü olduğu ve migrasyon aralığının kapandığı bununla birlikte, kekik ve karanfil yağının 0.1 µl’lik konsantrasyonu ile muamele edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla hücre göçünün azaldığı ve hücrelerin morfolojilerinde ölüme giden hücrelerde gözlemlenen morfolojik değişiklik olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca karanfil ve

kekik yağlarına uzun saat maruz kalmalarından dolayı ölüme giden hücreler migrasyon eğrisinin netliğini kapatmıştır. Sonuç olarak, kontrol grubunun tipik hücre morfolojilerine kıyasla karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamele edilen gruplarda kolorektal kanser hücreler üzerinde zamana bağlı olarak sitotoksik etki sergiledikleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında karanfil ve kekik esansiyel yağları ile muamelesinin ardından ilk 48. ve 96. saatte hücre mikroskopik görüntüleri. A- 48. Saatlik kontrol grubu HCT-116 hücre hatlarının mikroskopik görüntüsü. B- 96 saat sonra kontrol grubunun mikroskopik görüntüsü. C- 48 saatlik kekik (0.1 µl/mL) ile muamele sonrası HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü. D- 96 saatlik kekik (0.1 µl/mL) ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü. E- 48 saatlik karanfil (0.1 µl/mL) ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü F-96 saatlik karanfil (0.1 µl/mL) ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (10x’lik objektif 200 µm ölçek).

4.4. Verilerin Tartışılması

Son zamanlarda kanserin tedavisi için terapötik tedavilerin başında kemoterapi gelmektedir. Bununla birlikte, tıbbi bitkiler ve onların özleri gibi birçok doğal ürünler, yüksek kemoterapötik aktivite ve düşük toksisiteye sahip terapötik çalışmalarının hedefi haline gelmiştir (Fan ve ark., 2015). Bu tez çalışmasında, tıbbi bitkilerden elde edilen ve birçok alternatif veya tamamlayıcı tedavi yöntemlerinde antimikrobiyal, antiviral, antiseptik ve antiproliferatif vb. özellikleri ile tercih edilen karanfil ve kekik esansiyel yağları incelenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, karanfil esansiyel yağını bir çok kanser hücre hatlarına (Ham264.7, HT-29, Hep-2, A549), karşı sitotoksik etkileri olduğu bildirilmiştir (Kouidhi ve ark., 2010). Çalışmamızda, tıbbi bitkilerden elde edilen karanfil esansiyel yağının kolorektal kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerini incelemek için belirli konsantrasyon aralığı (0.005, 0.01, 0.05, 0.1 ve 0.5 µl/mL) seçilerek MTT testlerine tabii tutuldu. MTT verilerine göre, karanfil esansiyel yağının artan konsantrasyonu ile birlikte kolorektal hücre hatlarında (HCT-116 ve SW620) sitotoksitesinin de arttığı gözlemlenmiştir. Daha sonradan bu artan konsantrasyona karşı sitotoksik yanıt eğrisini gösteren IC₅₀ değer grafiği oluşturuldu. IC₅₀ verilerine göre karanfil esansiyel yağ için etkin konsantrasyon 0.01 µl/mL'in kolorektal hücre hatları üzerinde önemli sitotoksik etkileri belirlendi.

Çalışmanın diğer önemli yağı olan ve birçok alternatif tedavilerde kullanılan kekik esansiyel yağının sitotoksik etkileri ayrı olarak incelenmiştir. Kekik esansiyel yağı ile ilgili yapılan çalışmalarda akciğer, lösemi ve meme kanser hücre hatlarında konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik aktivitesi bildirilmiştir (Niksic ve ark., 2021). Kekik esansiyel yağların kolorektal kanser hücre hatları üzerinde sitotoksitesini belirlemek için seçilen geniş konsantrasyon aralığı (0.005, 0.01, 0.05, 0.1 ve 0.5 µl/mL) ile uygulama yapıldı ve MTT testine tabii tutuldu. MTT test verilerine göre kolorektal kanser hücre hattı olan HCT-116 ve SW620 üzerinde kekik esansiyel yağının artan konsantrasyonlarına bağlı olarak hücresel sitotoksitesini gözlemlendi. Kekik yağının artan konsantrasyonları ve hücrenin artan konsantrasyona karşı sitotoksik yanıt eğrisini gösteren IC₅₀ değer grafiği oluşturuldu. IC₅₀ verilerine göre kekik esansiyel yağı için ise etkin konsantrasyon 0.01 µl/mL'in kolorektal hücre hatları üzerinde önemli sitotoksik etkileri belirlendi.

Böylelikle, karanfil ve kekik esansiyel yağların etkin değeri 0.01 µl/mL’lik konsantrasyon qRT-PCR analizi için referans olarak seçildi. Belirlenen konsantrasyonda karanfil ve kekik yağlarının kolorektal kanser hücre hatlarında apoptotik etkilerini aydınlatabilmek için *BCL-2*, *COX-2*, *FAS*, *DR4* ve *DR5* genlerin ifadeleri değerlendirildi. Yaygın olarak kullanılan housekeeping geni GAPDH diğer genlerin karşılaştırılması için kalibratör olarak kullanıldı.

Apoptoz mekanizması hem düzenleyici hem de efektör bileşenler tarafından düzenlenmektedir. Kanser hücreleri ise apoptozdan kaçmak ya da apoptozu sınırlamak için çeşitli stratejiler geliştirir. Anti- veya pro- apoptotik düzenleyici faktörlerini aşağı ya da yukarı düzenlemek bu stratejilerden birisidir (Hanahan & Weinberg, 2011). Gerçekten de, neoplastik olmayan hücrelerin aksine displastik ve kanser hücrelerinde yaygın olarak anormal seviyede eksprese olan anti-apoptotik protein BCL-2’nin neoplastik hücrelerin gelişmesi ve ilerlemesinde etken bir olay olabileceği ileri sürülmüştür (Sinicrope ve ark., 1995). Bu nedenle BCL-2 ekspresyonunu azaltabilen veya kanser hücrelerinde tekrardan apoptoz sürecini geri kazandırabilen yeni sitotoksik ajanların keşfi hayati önem taşımaktadır (Hussain ve ark., 2011). Daha önceki yapılan çalışmalarda kolorektal kanser hücre hatları üzerinde bitkiler ve türevlerinin apoptozun içsel ve dışsal yolları üzerinde düzenleyici etki gösterebildikleri ortaya koyuldu (Bagheri ve ark., 2018; Hajiaghaalipour ve ark., 2015; X. Li ve ark., 2018). Bu çalışmada, bitkilerden elde edilen karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücrelerinde anti-apoptotik gen BCL-2 ekspresyonu üzerindeki etkileri incelendi. qRT-PCR verilerine göre, kullanılan hücre hatları üzerinde genel olarak BCL-2 ekspresyonuna istatistiksel açıdan anlamlı etkileri tespit edilemedi (Şekil 4.7.). Banarjee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2006), karanfil infüzyonunun akciğer kanserinde BCL-2 ekspresyon seviyelerini azalttığı, BAX ekspresyonunu arttırdığı ve böylece BCL-2/BAX oranında düzenleyici etki göstererek apoptozu tetikleyebildiğini bildirmişlerdir (Banerjee ve ark., 2006). Ayrıca karanfil tomurcuk ekstraktlarının da MCF-7 hücrelerinde mitokondriyal stres oluşturduğu ve BCL-2’nin deaktivasyonu ile apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Kubatka ve ark., 2017). Karanfil esansiyel yağının ana bileşenlerinden öjenolün farklı kanser hücre hatlarını apoptoza sürükleyerek antiproliferatif etki gösterebildiği de rapor edilmiştir (Jaganathan ve ark., 2011; Park ve ark., 2005). Mevcut çalışmamızda karanfil esansiyel yağının kolorektal hücre hatlarına göre BCL-2 ekspresyonunda değişikliğe neden olsa dahi istatistiksel olarak anlamlı bir etki gözlemlenmemiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda kekik esansiyel yağlarında bulunan karvakrolün HCT-116 ve LoVo

koloraktal kanser hücre hatlarında BCL-2 ekspresyonunu azalttığı ve böylece de mitokondriyal yolağı ve MAPK ve PI3K/AKT sinyal yolağı ile apoptozu tetikleyebileceği bildirilmiştir (Fan ve ark., 2015). Çalışmamızda, HCT-116'ya nazaran SW620'nın kekik esansiyel yağına karşı daha duyarlılık gösterdiği ve anti-apoptotik gen BCL-2 ekspresyon seviyelerinde düşüş gözlemlenmiştir. Ancak uygulama yapılan her iki esansiyel yağın BCL-2 gen ekspresyonu üzerindeki apoptotik etkisi incelendiğinde istatistiksel açıdan anlam ifade etmemiştir. Sonuç olarak mevcut çalışmamız literatür çalışmaları ile eş değer sonuç göstermemiştir. Bu durum kullanılan karanfil ve kekik yağlarının HCT-116 ve SW620 hücre hatlarında anti-apoptotik gen BCL-2 ekspresyonu dışında başka anti-apoptotik gen ekspresyonları ile etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür.

Siklooksijenaz-2 (COX-2) mitojenler, sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından eksprese edilmektedir. İnflamatuar bölgelerde prostaglandin üretiminden sorumlularından biri olan COX-2, aynı zamanda kolonik epitel hücrelerinde yüksek ifade edilmesi ile apoptozu karşı direnç oluşumunu tetikleyerek tümöral gelişimi destekleyebilmektedir (Hussain ve ark., 2011). COX-2, iltihaplanma, karsinogenez ve apoptoz ile ilişkili olması, COX-2 inhibisyonunun umut verici bir antikanser tedavisi olduğu öne sürülmektedir (Totzke ve ark., 2003). Mevcut çalışmada, karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları üzerinde COX-2 gen ekspresyonunu aşağı regüle etmek amaçlandı. HCT-116 hücrelerinde karanfil yağının kekik yağına göre COX-2 ekspresyonunu daha güçlü baskılayabildiği ve dahi istatistiksel açıdan anlam ifade etmemektedir. Buna ek olarak karanfil esansiyel yağının etkinliği diğer kolorektal kanser hücre hattı olan SW620'de de benzer etkileri söz konusudur. Sonuçlarımıza göre kolorektal hücre hatları HCT-116 ve SW620'de kekik ve karanfil yağının her ikisinde COX-2 geninin ekspresyonunu üzerinde anlamlı etkisi söz konusu değildi (Şekil 4.8.). Önceki yapılan çalışmalarda karanfil yağının anti-inflamatuar etkisini ana bileşen, olan öjenole atfetmişlerdir. Öjenolün, RAW264.7 (makrofaj hücreleri) ve HT-29 hücrelerinde COX-2 ekspresyonunu doza bağlı olarak baskılayabildiği bildirilmiştir (S. S. Kim ve ark., 2003). Öjenol ile yapılan başka bir çalışmada HeLa hücrelerinde BCL-2 ve COX-2 ekspresyonunu aşağı regüle edebildiği de rapor edilmektedir (Fathy ve ark., 2019). Farklı bir çalışmada karanfil ve kekik yağlarının COX-2 gen ekspresyonunu regüle edebildiği bildirilmiştir. Kekiğin antiinflamatuar etkisi ise ana bileşenlerinden biri olan karvakrole atfedilmiştir. Karvakrolün COX-2 ekspresyonunu baskıladığı ve böylece anti-inflamatuar etkisini gösterebildiği bildirilmiştir (Hotta ve ark., 2010). Karvakrolün COX-

2' ye karşı güçlü bir inhibitör etki gösterebildiği bir başka çalışmada da bildirilmektedir (Landa ve ark., 2009). Ancak, bu çalışmada karanfil ve kekik yağlarının COX-2 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri önceki bulgular ile istatistiksel olarak tutarlı değildir.

Apoptoz mekanizması onkogeninin önlenmesinde önemli bir mekanizma olduğuna inanılmaktadır. Dolayısıyla dışsal apoptozun indüklenmesinde rol oynayan FAS (CD95) ve TRAIL ekspresyonu kolorektal kanserinde potansiyel hedef olarak görülmektedir (Koornstra, Kleibeuker, ve ark., 2003; O'connell ve ark., 1996). Kansere yönelik yapılan bir çok çalışmada bitki kaynaklı ajanların apoptozun hem içsel hem de dışsal yolağını regüle edebildiği kayıtlara geçmiştir (Chen ve ark., 2016; Lee ve ark., 2008; Mou ve ark., 2011). Bununla birlikte uzun yıllardır kullanılan esansiyel yağlar ve bileşenleri terapötik ajan olarak değerlendirilmiş ve kanseri önlemede ve tedavi yöntemlerinde etkili olabileceği ileri sürülmüştür (Gautam ve ark., 2014). Bu çalışmada, kekik ve karanfil esansiyel yağlarının kolorektal kanseri üzerinde antitümöral potansiyeli hakkında fikir edinmek için FAS, DR4 ve DR5 aracılı apoptotik hücre ölümü üzerindeki etkilerini inceledik. Bizim bulgularımızda kekik ve karanfil esansiyel yağlarından kekik esansiyel yağının apoptoz mekanizmasında etkin role sahip olabileceği ve hedef gen FAS, DR4 ve DR5 ekspresyonlarını aşağı ve yukarı regüle ederek apoptoza aracılık ettiği tespit edilmiştir.

TRAIL normal hücrelerden ziyade çeşitli tümör hücrelerinde ölüm reseptörleri (DR4 ve DR5) aracılığı ile dışsal apoptotik yolağı indükleyebilmektedir (Koornstra ve ark., 2005). Bu yüzden, TRAIL ölüm reseptörlerinin ekspresyonunu arttıran ajanların insan kanser hücrelerini TRAIL kaynaklı apoptoza duyarlı hale getirilebileceği ileri sürülmüştür (S. Wang & El-Deiry, 2003). Yapılan bir çalışmada, kekik esansiyel yağının kolon kanser hücre hatlarında antitümöral etkisi incelenmiş ve kekik yağının TRAIL aracılı apoptozda kemo-duyarlaştırıcı olarak hareket ettiği bildirilmiştir (Guesmi ve ark., 2021). Bizim bulgularımızda, karanfil esansiyel yağı her iki hücre hattında da FAS, DR4 ve DR5 gen ekspresyonu üzerinde etkileri istatistiksel analiz sonucunda anlamlı değildi. Bununla beraber, kekik esansiyel yağının kolorektal kanserin her iki hücre hattında da istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde DR4 ekspresyonunu aşırı arttırdığı tespit edilmiştir. Ancak, DR5 ekspresyonunu düşürdüğü gözlemlenmiştir. Kekik yağının FAS aracılı apoptoz üzerindeki etkisi kolorektal kanser hücre hatları üzerinde incelenmiştir. Kekik esansiyel yağının HCT-116 hücre hattı üzerinde istatistiksel açıdan FAS ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterildi. Fakat SW620 hücre hattı üzerinde bu durum söz konusu

değildi. Önceki verilerde SW620 hücre hattında apoptotik yollarda kusur olduğu bildirilmiştir (Cacan ve ark., 2015; Cacan & Ozmen, 2020). Bu durum bizim çalışmamız ile de tutarlı sonuç gözlenmiş ve Fas sinyal yolağının işeysiz olması dolaylı olarak FAS ekspresyonunu da engellemiş olabileceğini düşürtmüştür. Dolayısıyla, kekik esansiyel yağının neden olduğu apoptozun indüklenmesi, TRAIL aracılı apoptozu indükleme kabiliyeti ile ilişki olduğu düşünülmektedir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kolorektal kanserin gelişmesi, hücrelerin büyümesine, farklılaşmasına ve apoptozdan kaçmalarına olanak tanıyan moleküler genetik değişiklikler ile karakterilizedir (Koornstra, De Jong, ve ark., 2003). Kolorektal kanserin gelişmesinde işlevsellik gösteren genlerin çoğu neoplastik hücrelerin büyümelerine avantaj sağlayarak bir şekilde apoptozu tetikleme eşiğini inaktive edebilmekte ya da yükseltebilmektedir (Watson, 2006). Bunlardan ilki, apoptotik yolun anahtar bileşenlerinden olan BCL-2 protein aile üyeleridir. Yapılan çalışmalarda BCL-2, kolorektal adenomlardan ziyade karsinomlarda daha fazla eksprese edilmesi (S. Y. Yang ve ark., 2009) özellikle BCL-2 ailesinin kolorektal kanserin başlamasında ve gelişmesinde önemli yere sahip olduğunu düşündürmektedir. Apoptozun diğer düzenleyicileri olan ölüm reseptörlerinin ekspresyonları kolorektal kanserin gelişmesinde önemli role sahiptir. Normal kolon hücresinde apoptozda rol oynayan Fas ekspresyonu apoptozu düzenlerken kolon kanser hücrelerinde Fas ekspresyonlarının azalma ya da kayıplarına rastlanılmıştır (Möller ve ark., 1994). Ayrıca TRAIL kaynaklı apoptoza kanser hücreleri duyarlılık gösterirken normal hücreler direnç göstermektedirler (Koornstra, De Jong, ve ark., 2003). Ayrıca COX-2'nin kolorektal kanser hücrelerinde BCL-2 ekspresyon seviyelerini yükselmesini tetiklerken membran ölüm reseptörlerinin ekspresyonu üzerinde transkripsiyonel baskı ile apoptozu modüle edebilmektedir (Tang ve ark., 2002). Dolayısıyla, COX-2 inhibisyonunun apoptozu teşvik edici etkisi hem ölüm reseptörlerinin aktivasyonuna hem de BCL-2 inhibisyonuna yanıt olabileceğinden hedef olarak görülmektedir. Bu yüzden kolorektal kanserin önlenmesinde BCL-2, COX-2 ve TNF ligand aile üyeleri kilit rol oynamaktadır.

Dünya genelinde artan kolorektal kanser malignitesinin yayılımı yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesini elzem kılmıştır. Yapılan araştırmalarda bitkisel kaynaklardan elde edilen alternatif ya da tamamlayıcı tedaviler onkojenik moleküler yollara etki edebilmeleri nedeniyle ilgi uyandırmıştır (Sadeghi ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında ise, kekik ve karanfil esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücre hatları üzerinde apoptotik rolleri vurgulanmaktadır. Mevcut çalışmanın ilk aşamasında kolorektal kanser hücre hatları, HCT-116 ve SW620 üzerinde sitotoksik etkileri MTT testi ile ortaya konuldu. Ardından esansiyel yağların kolorektal kanser hücre hatları üzerinde apoptotik etkileri qRT-PCR analizi ile hedef genlerin (BCL-2, COX-2, FAS, DR4 ve DR5) ekspresyon seviyeleri incelendi.

Genel anlamda esansiyel yağlar lipofilik yapılı ve düşük ağırlıklı olmaları sayesinde fosfolipit katmanlarını değiştirebilmekte ve hücre zarından geçebilmektedir. Böylelikle sitoplazmik içeriğin sızıntısı meydana gelerek ATP azalmasına, pH gradyanın değişmesine ve mitokondriyal potansiyelin kaybına yol açmaktadır (Garzoli ve ark., 2022). Verilerimizde karanfil ve kekik esansiyel yağlarının, kolorektal kanser hücre hatlarında mitokondriyal yolu hedefleyen BCL-2 ve COX-2'nin ekspresyonuna etkileri olduğu ancak bu etkileri istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterdik. Ayrıca, tedavi amaçlı kullanılan bu esansiyel yağlardan özellikle kekik esansiyel yağının karanfile kıyasla kolorektal kanseri üzerinde potansiyel apoptotik etkileri olduğu ve kanser tedavisinde rol oynayabileceği hissini uyandırmaktadır.

Sonuç olarak, karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser hücrelerinin büyümelerini ve çoğalmalarını engelleyerek sitotoksik etki gösterdiklerini bildiriyoruz. Esansiyel yağların başta sitotoksikite olmak üzere gösterdiği potansiyel etkileri kendi bileşenlerine atfedilir. Birçok çalışma da mevcut çalışmayı destekleyecek bitki ve materyallerinin kanser hücreleri üzerinde apoptozun düzenlenmesi için hem içsel hem de dışsal yolağı aynı anda hedefleyebildiğini göstermektedir (Rajabi ve ark., 2021). Aynı zamanda önceki çalışmalarda esansiyel yağların apoptoz indüksiyonunda etkili birçok yolağın düzenleyebilmelerine atfedilmesi ileri ki çalışmalar için kemoterapötik ajanlar olarak hizmet edebilecektir (M. Liu ve ark., 2018; Pathania ve ark., 2013). Bununla birlikte bu çalışmada tedavi amaçlı kullanılan bu esansiyel yağlardan özellikle kekik esansiyel yağının belirlediğimiz hedef gen ekspresyonları üzerinde etkileri olduğunu bildiriyoruz. Yukarıdaki gerçekler ışığında kullanılan bitkisel esansiyel yağlar kolorektal kanserine karşı koruyucu potansiyele sahip umut verici ajanlardır. Genel olarak bulgularımız, karanfil ve kekik esansiyel yağlarının kolorektal kanser için potansiyel bir adjuvant olabileceğini göstermektedir. Ancak bu esansiyel yağlarının aktif bileşikleri tanımlamak ve etkinliklerini çözümlemek için daha ileri çalışmaların gerekli olduğunu da ifade etmek gerekir.

6. KAYNAKLAR

- Abadi, A. V. M., Karimi, E., Oskoueian, E., Mohammad, G. R. K. S., & Shafaei, N. (2022). Chemical investigation and screening of anti-cancer potential of *Syzygium aromaticum* L. bud (clove) essential oil nanoemulsion. *3 Biotech*, 12(2), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S13205-022-03117-2/TABLES/4>
- Abd-Rabou, A. A., Abd El-Salam, N. M., Sharada, H. M., Samea, G. G. A. E., & Abdalla, M. S. (2021). Thymoquinone crosstalks with DR5 to sensitize TRAIL resistance and stimulate ROS-mediated cancer apoptosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 22(9), 2855.
- Abraha, A. M., & Ketema, E. B. (2016). Apoptotic pathways as a therapeutic target for colorectal cancer treatment. *World journal of gastrointestinal oncology*, 8(8), 583.
- Advani, S. M., Swartz, M. D., Loree, J., Davis, J. S., Sarsashek, A. M., Lam, M., Lee, M. S., Bressler, J., Lopez, D. S., & Daniel, C. R. (2021). Epidemiology and Molecular-Pathologic Characteristics of CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in Colorectal Cancer. *Clinical colorectal cancer*, 20(2), 137–147.
- Ajiboye, T. O., Mohammed, A. O., Bello, S. A., Yusuf, I. I., Ibitoye, O. B., Muritala, H. F., & Onajobi, I. B. (2016). Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* seed: Studies on oxidative stress biomarkers and membrane permeability. *Microbial Pathogenesis*, 95, 208–215. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2016.03.011>
- Al-Alem, L. F., Baker, A. T., Pandya, U. M., Eisenhauer, E. L., & Rueda, B. R. (2019). Understanding and targeting apoptotic pathways in ovarian cancer. *Cancers*, 11(11), 1631.
- Al-Janabi, A. S., Alheety, M. A., Osama'a, A. Y., Shaaban, S., Kibar, B., & Cacan, E. (2020). Anti-cancer and anti-fungal evaluation of novel palladium (II) 1-phenyl-1H-tetrazol-5-thiol complexes. *Inorganic Chemistry Communications*, 121, 108193.
- Al-Sohaily, S., Biankin, A., Leong, R., & Kohonen-Corish, M. (2012). Warusavitarne J. *Molecular pathways in colorectal cancer*. *JGH*, 27(9), 1423–1431.
- Ali, M. W., Cacan, E., Liu, Y., Pierce, J. Y., Creasman, W. T., Murph, M. M., Govindarajan, R., Eblen, S. T., Greer, S. F., & Hooks, S. B. (2013). Transcriptional suppression, DNA methylation, and histone deacetylation of the regulator of G-protein signaling 10 (RGS10) gene in ovarian cancer cells. *PloS one*, 8(3), e60185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060185>.
- Aliustaoğlu, M. (2009). Temel kanser fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim*, 22(3), 46–49.
- Alzahrani, S. M., Al Doghaither, H. A., & Al-Ghafari, A. B. (2021). General insight into cancer: An

- overview of colorectal cancer. *Molecular and Clinical Oncology*, 15(6), 1–8.
- Aran, V., Victorino, A. P., Thuler, L. C., & Ferreira, C. G. (2016). Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. *Clinical Colorectal Cancer*, 15(3), 195–203. <https://doi.org/10.1016/J.CLCC.2016.02.008>
- Arunasree, K. M. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*, 17(8–9), 581–588. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2009.12.008>
- Augenlicht, L., Velcich, A., Mariadason, J., Bordonaro, M., & Heerdt, B. (1999). *Colonic Cell Proliferation, Differentiation, and Apoptosis BT - Colon Cancer Prevention: Dietary Modulation of Cellular and Molecular Mechanisms* (ss. 15–22). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4149-3_2
- Bagheri, E., Hajiaghaalipour, F., Nyamathulla, S., & Salehen, N. (2018). The apoptotic effects of Brucea javanica fruit extract against HT29 cells associated with p53 upregulation and inhibition of NF- κ B translocation. *Drug design, development and therapy*, 12, 657.
- Bakır, E. (2018). Flurbiprofenin Sitotoksik, Genotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi. (Doktora Tezi), Hacettepe Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2007.09.106>
- Banerjee, S., Panda, C. K., & Das, S. (2006). Clove (*Syzygium aromaticum* L.), a potential chemopreventive agent for lung cancer. *Carcinogenesis*, 27(8), 1645–1654.
- Barbaros, B., & Dikmen, M. (2015). Kanser İmmünoterapisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31(4), 177–181.
- Bardou, M., Montembault, S., Giraud, V., Balian, A., Borotto, E., Houdayer, C., Capron, F., Chaput, J. C., & Naveau, S. (2002). Excessive alcohol consumption favours high risk polyp or colorectal cancer occurrence among patients with adenomas: a case control study. *Gut*, 50(1), 38–42.
- Batiha, G. E. S., Alkazmi, L. M., Wasef, L. G., Beshbishy, A. M., Nadwa, E. H., & Rashwan, E. K. (2020). *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 202, 10(2), 202. <https://doi.org/10.3390/BIOM10020202>
- Bayaz, M. (2014). Esansiyel yağlar: antimikrobiyal, antioksidan ve antitümör aktivite ve etkileri.

- Baykara, O. (2016). Current Modalities in Treatment of Cancer. *Balıkesir Health Sciences Journal*.
<https://doi.org/10.5505/bsbd.2016.93823>
- Berkel, C., Kucuk, B., Merve, U. S. T. A., Yilmaz, E., & Cacan, E. (2020). The effect of Olaparib and Bortezomib combination treatment on ovarian Cancer cell lines. *European Journal of Biology*, 79(2), 115-123.
- Berkel, C., & Cacan, E. (2020). DYNLL1 is hypomethylated and upregulated in a tumor stage- and grade-dependent manner and associated with increased mortality in hepatocellular carcinoma. *Experimental and molecular pathology*, 117, 104567.
<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104567>
- Berkel, C., & Cacan, E. (2021). Involvement of ATMIN-DYNLL1-MRN axis in the progression and aggressiveness of serous ovarian cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 570, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.07.004>
- Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology*, 18, 1106–1121.
<https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
- Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A., & Henson, P. M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26159–26165.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.03.022>
- Bütüner, Debeleş, B., & Kantarcı, G. (2006). Mutasyon, Dna Hasarı, Onarım Mekanizmaları Ve Kansere İlişkisi. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 35(2), 149–170.
- Cabadak, H. (2008). *Hücre siklusu ve kanser*. 9(3), 51–61.
- Cacan, E., Ali, M. W., Boyd, N. H., Hooks, S. B., & Greer, S. F. (2014). Inhibition of HDAC1 and DNMT1 modulate RGS10 expression and decrease ovarian cancer chemoresistance. *PloS one*, 9(1), e87455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087455>.
- Cacan, E., 2015. Combating the Epigenome: Elucidation of Mechanisms Underlying Chemoresistance and Enhancing Tumor Immunogenicity. (Ph.D. Diss.), Georgia State

- Cacan, E., Greer, S. F., & Garnett-Benson, C. (2015). Radiation-induced modulation of immunogenic genes in tumor cells is regulated by both histone deacetylases and DNA methyltransferases. *International journal of oncology*, 47(6), 2264–2275. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3192>
- Cacan, E. (2016). Histone deacetylase-1-mediated suppression of FAS in chemoresistant ovarian cancer cells. *Anticancer research*, 36(6), 2819–2826.
- Cacan, E. (2017). Enhancing sensitivity of chemoresistant ovarian cancer cells to TRAIL and FAS mediated apoptosis by radiation. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 74(3), 184–260.
- Cacan, E., & Ozmen, Z. C. (2020). *Regulation of Fas in response to bortezomib and epirubicin in colorectal cancer cells Anticancer Original Research Paper Regulation of Fas in response to bortezomib and epirubicin in colorectal cancer cells.* <https://doi.org/10.1080/1120009X.2020.1740389>
- Caldiran, F. Y., & Cacan, E. (2022). RGS10 suppression by DNA methylation is associated with low survival rates in colorectal carcinoma. *Pathology, research and practice*, 236, 154007. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154007>
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. Ben, Rouabhia, M., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(6), 501–506.
- Chatterjee, D., & Bhattacharjee, P. (2015). Use of eugenol-lean clove extract as a flavoring agent and natural antioxidant in mayonnaise: product characterization and storage study. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4945–4954. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1573-6>
- Chen, M., Wang, X., Zha, D., Cai, F., Zhang, W., He, Y., Huang, Q., Zhuang, H., & Hua, Z.-C. (2016). Apigenin potentiates TRAIL therapy of non-small cell lung cancer via upregulating DR4/DR5 expression in a p53-dependent manner. *Scientific reports*, 6(1), 1–17.
- Chou, Y.-C., Chen, Y.-J., Lai, C.-R., Wang, P.-H., & Yuan, C.-C. (2006). Cyclooxygenase-2 expression is higher in ovarian cancer tissue adjacent to endometriosis than in ovarian cancer without comorbid endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 124(1), 101–105.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564/ASSET/F93CA60E-FEB1-4F1E-814E->

- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J. J., & Smyth, M. J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *The Journal of Immunology*, 168(3), 1356–1361.
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A., & Trombetta, D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(15), 6300–6308.
- De Palma, F. D. E., D'argenio, V., Pol, J., Kroemer, G., Maiuri, M. C., & Salvatore, F. (2019). The molecular hallmarks of the serrated pathway in colorectal cancer. *Cancers*, 11(7), 1017.
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., Mnif, W., Nahar, L., Basar, N., & Sarker, S. D. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines 2016*, Vol. 3, Page 25, 3(4), 25.
<https://doi.org/10.3390/MEDICINES3040025>
- Duru, M., E.,(1993). Liquidambar Orientalis Var. Orientalis ve Liquidambar Orientalis Var. İntegriloba Yapraklarından Elde Edilen Uçucu Yağın Analizi.(Yüksek Lisan Tezi), Atatürk Üniversitesi. Fen Bilimleri Eğitimi Anabilim Dalı, Erzurum.
- Eberhart, C. E., Coffey, R. J., Radhika, A., Giardiello, F. M., Ferrenbach, S., & Dubois, R. N. (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 107(4), 1183–1188.
- Eiró, N., & Vizoso, F. J. (2012). Inflammation and cancer. *World journal of gastrointestinal surgery*, 4(3), 62.
- El Bali, M., Bakkach, J., & Bennani Mechita, M. (2021). Colorectal cancer: from genetic landscape to targeted therapy. *Journal of Oncology*, 2021.
- Elbe, H., Yigitturk, G., Cavusoglu, T., Baygar, T., Ozgul Onal, M., & Ozturk, F. (2020). Comparison of ultrastructural changes and the anticarcinogenic effects of thymol and carvacrol on ovarian cancer cells: which is more effective? *Ultrastructural pathology*, 44(2), 193–202.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516.
- Eröz, R., Karataş, A., Alkoç, O. A., Baltacı, D., Oktay, M., & Çolakoğlu, S. (2012). Apoptozis hakkında bilinenler (literatür taraması). *Duzce Medical Journal*, 14(2), 87–101.

- Fan, K., Li, X., Cao, Y., Qi, H., Li, L., Zhang, Q., & Sun, H. (2015). Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, 26(8), 813–823.
<https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000263>
- Fangjun, L., & Zhijia, Y. (2017). *Tumor suppressive roles of eugenol in human lung cancer cells*.
<https://doi.org/10.1111/1759-7714.12508>
- Fathy, M., Fawzy, M. A., Hintzsche, H., Nikaido, T., Dandekar, T., & Othman, E. M. (2019). Eugenol exerts apoptotic effect and modulates the sensitivity of HeLa cells to cisplatin and radiation. *Molecules*, 24(21), 3979.
- Fernández-Peralta, A. M., Nejda, N., Oliart, S., Medina, V., Azcoita, M. M., & González-Aguilera, J. J. (2005). Significance of mutations in TGFBR2 and BAX in neoplastic progression and patient outcome in sporadic colorectal tumors with high-frequency microsatellite instability. *Cancer genetics and cytogenetics*, 157(1), 18–24.
- Fleming, M., Ravula, S., & Tatishchev, S. F. (2012). dan Hanlin L. Wang. *Colorectal carcinoma: pathological aspect*. *J Gastrointest Oncol*, 3(3), 153–173.
- Fulda, S., & Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798–4811.
- Gautam, N., Mantha, A. K., & Mittal, S. (2014). Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *BioMed research international*, 2014.
- Garzoli, S., Alarcón-Zapata, P., Seitimova, G., Alarcón-Zapata, B., Martorell, M., Sharopov, F., ... & Vitalini, S. (2022). Natural essential oils as a new therapeutic tool in colorectal cancer. *Cancer Cell International*, 22(1), 1-20.
- Geigl, J. B., Obenauf, A. C., Schwarzbach, T., & Speicher, M. R. (2008). Defining ‘chromosomal instability’. *Trends in Genetics*, 24(2), 64–69.
- Ghadiri Moghaddam, F., Farajnia, S., Karbalaee-Mahdi, M., & Monir, L. (2022). Epigenetic insights in the diagnosis, prognosis, and treatment selection in CRC, an updated review. *Molecular Biology Reports*, 1–10.
- Ghosh, R., Nadiminty, N., Fitzpatrick, J. E., Alworth, W. L., Slaga, T. J., & Kumar, A. P. (2005). Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5812–5819.
- Giovannucci, E. (2001). An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 10(7), 725–

- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(12), a006080.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.025>
- Guesmi, F., Prasad, S., Ali, M. Ben, Ismail, I. A., & Landoulsi, A. (2021). Thymus hirtus sp. algeriensis Boiss. and Reut. volatile oil enhances TRAIL/Apo2L induced apoptosis and inhibits colon carcinogenesis through upregulation of death receptor pathway. *Aging (Albany NY)*, 13(18), 21975.
- Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*, 23(6), 1625–1637.
- Gülçin, İ., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2012). Antioxidant activity of clove oil—A powerful antioxidant source. *Arabian Journal of chemistry*, 5(4), 489–499.
- Gurzov, E. N., & Eizirik, D. L. (2011). Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of β -cell death and dysfunction. *Trends in cell biology*, 21(7), 424–431.
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research*, 301(1), 5–17.
- Hagland, H. R., Berg, M., Jolma, I. W., Carlsen, A., & Søreide, K. (2013). Molecular pathways and cellular metabolism in colorectal cancer. *Digestive surgery*, 30(1), 12–25.
- Hajiaghaalipour, F., Kanthimathi, M. S., Sanusi, J., & Rajarajeswaran, J. (2015). White tea (Camellia sinensis) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. *Food Chemistry*, 169, 401–410.
- Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. (2021). Türkiye Kanseri İstatistikleri 2017. *T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü*, 1–52. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf
- Hammoudi Halat, D., Krayem, M., Khaled, S., & Younes, S. (2022). A Focused Insight into Thyme: Biological, Chemical, and Therapeutic Properties of an Indigenous Mediterranean Herb. *Nutrients*, 14(10), 2104.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646–674.

- Harpaz, N., Gatt, Y. E., Granit, R. Z., Fruchtmann, H., Hubert, A., & Grinshpun, A. (2020). Mucinous histology, BRCA1/2 mutations, and elevated tumor mutational burden in colorectal cancer. *Journal of Oncology*, 2020.
- Hirano, T., Hirayama, D., Wagatsuma, K., Yamakawa, T., Yokoyama, Y., & Nakase, H. (2020). *Molecular Sciences Immunological Mechanisms in Inflammation-Associated Colon Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.3390/ijms21093062>
- Hoogwater, F. J. H., Steller, E. J. A., Westendorp, B. F., Rinkes, I. H. M. B., & Kranenburg, O. (2012). CD95 signaling in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1826(1), 189–198.
- Hoskonen, P., Heikkinen, J., Eskelinen, P., & Pirhonen, J. (2015). Efficacy of clove oil and ethanol against *Saprolegnia* sp. and usability as antifungal agents during incubation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) eggs. *Aquaculture Research*, 46(3), 581–589.
- Hotta, M., Nakata, R., Katsukawa, M., Hori, K., Takahashi, S., & Inoue, H. (2010). Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression [S]. *Journal of lipid research*, 51(1), 132–139.
- Hussain, A., Brahmabhatt, K., Priyani, A., Ahmed, M., Rizvi, T. A., & Sharma, C. (2011). Eugenol enhances the chemotherapeutic potential of gemcitabine and induces anticarcinogenic and anti-inflammatory activity in human cervical cancer cells. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 26(5), 519–527.
- Iacobuzio-Donahue, C. A. (2009). Epigenetic changes in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4, 229–249.
- Ignéy, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 277–288.
- Ikeya, S., Sakabe, J. I., Yamada, T., Naito, T., & Tokura, Y. (2018). Voriconazole-induced photocarcinogenesis is promoted by aryl hydrocarbon receptor-dependent COX-2 upregulation. *Scientific Reports*, 8(1), 5050.
- Islam, S. S., Al-Sharif, I., Sultan, A., Al-Mazrou, A., Remmal, A., & Aboussekhra, A. (2018). Eugenol potentiates cisplatin anti-cancer activity through inhibition of ALDH-positive breast cancer stem cells and the NF- κ B signaling pathway. *Molecular Carcinogenesis*, 57(3), 333–346. <https://doi.org/10.1002/MC.22758>
- Ivanov, V. N., & Hei, T. K. (2006). Dual treatment with COX-2 inhibitor and sodium arsenite leads to induction of surface Fas Ligand expression and Fas-Ligand-mediated apoptosis in human

- melanoma cells. *Experimental Cell Research*, 312(8), 1401–1417.
<https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2006.01.003>
- Jaganathan, S. K., Mazumdar, A., Mondhe, D., & Mandal, M. (2011). Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. *Cell Biology International*, 35(6), 607–615.
<https://doi.org/10.1042/CBI20100118>
- Jamali, T., Kavooosi, G., Jamali, Y., Mortezaazadeh, S., & Ardestani, S. K. (2021). In-vitro, in-vivo, and in-silico assessment of radical scavenging and cytotoxic activities of *Oliveria decumbens* essential oil and its main components. *Scientific reports*, 11(1), 1–19.
- Jan, R., & Chaudhry, G.-S. (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Tabriz University of Medical Sciences*, 7(2), 113–117.
<https://doi.org/10.15171/apb.2019.024>
- Jimoh, S. O., Arowolo, L. A., & Alabi, K. A. (2017). Phytochemical screening and antimicrobial evaluation of *Syzygium aromaticum* extract and essential oil. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 6, 4557–4567.
- Jin, Z., McDonald, E. R., Dicker, D. T., & El-Deiry, W. S. (2004). Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35829–35839.
- Johnson, C. M., Wei, C., Ensor, J. E., Smolenski, D. J., Amos, C. I., Levin, B., & Berry, D. A. (2013). Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes & Control* 24:6, 24(6), 1207–1222. <https://doi.org/10.1007/S10552-013-0201-5>
- Johnstone, R. W., Frew, A. J., & Smyth, M. J. (2008). The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(10), 782–798.
- Kanekura, T., Goorha, S., Kirtikara, K., & Ballou, L. R. (2002). The involvement of NF- κ B in the constitutive overexpression of cyclooxygenase-2 in cyclooxygenase-1 null cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1542(1–3), 14–22.
- Karatas, O., Yuce, H., Taskan, M., Gevrek, F., Yarkac, F., & Cacan, E. (2021). Detection of nuclear receptors in gingival samples of diabetic and nondiabetic periodontitis patients. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 24(2), 269–269.
- Kaur, G., Athar, M., & Alam, M. S. (2010). Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer

- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Keum, N., & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(12), 713–732.
- Kim, H., Tu, H.-C., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J.-D., & Cheng, E. H.-Y. (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Molecular cell*, 36(3), 487–499.
- Kim, S. S., Oh, O.-J., Min, H.-Y., Park, E.-J., Kim, Y., Park, H. J., Han, Y. N., & Lee, S. K. (2003). Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264. 7 cells. *Life sciences*, 73(3), 337–348.
- Koehne, C.-H., & Dubois, R. N. (2004). COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Seminars in Oncology*, 31, 12–21. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2004.03.041>
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., & Pagkalos, A. (2020). Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review. *Anticancer research*, 40(11), 6009–6015.
- Koornstra, J. J., De Jong, S., Hollema, H., De Vries, E. G. E., & Kleibeuker, J. H. (2003). Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature. *Critical reviews in oncology/hematology*, 45(1), 37–53.
- Koornstra, J. J., Jalving, M., Rijcken, F. E. M., Westra, J., Zwart, N., Hollema, H., De Vries, E. G. E., Hofstra, R. W. M., Plukker, J. T. M., De Jong, S., & Kleibeuker, J. H. (2005). Expression of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand death receptors in sporadic and hereditary colorectal tumours: Potential targets for apoptosis induction. *European Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.02.018>
- Koornstra, J. J., Kleibeuker, J. H., van Geelen, C. M. M., Rijcken, F. E. M., Hollema, H., de Vries, E. G. E., & de Jong, S. (2003). Expression of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and its receptors in normal colonic mucosa, adenomas, and carcinomas. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 200(3), 327–335.
- Kosumi, K., Hamada, T., Zhang, S., Liu, L., da Silva, A., Koh, H., Twombly, T. S., Mima, K., Morikawa, T., & Song, M. (2019). Prognostic association of PTGS2 (COX-2) over-expression

- according to BRAF mutation status in colorectal cancer: Results from two prospective cohorts and CALGB 89803 (Alliance) trial. *European Journal of Cancer*, 111, 82–93.
- Kouidhi, B., Zmantar, T., & Bakhrouf, A. (2010). Anticariogenic and cytotoxic activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*) against a large number of oral pathogens. *Annals of Microbiology*, 60(4), 599–604. <https://doi.org/10.1007/S13213-010-0092-6/TABLES/3>
- Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. *Molecules*, 25(18), 4125.
- Kubatka, P., Uramova, S., Kello, M., Kajo, K., Kruzliak, P., Mojzis, J., Vybohova, D., Adamkov, M., Jasek, K., & Lasabova, Z. (2017). Antineoplastic effects of clove buds (*Syzygium aromaticum* L.) in the model of breast carcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(11), 2837–2851.
- Kucuk, B., Kibar, B., & Cacan, E. (2021). A broad analysis in clinical and in vitro models on regulator of G-protein signalling 10 regulation that is associated with ovarian cancer progression and chemoresistance. *Cell biochemistry and function*, 39(3), 413–422. <https://doi.org/10.1002/cbf.3607>
- Kucuk, B., Yilmaz, E., & Cacan, E. (2021). Expression profiles of Natural Killer Group 2D Ligands (NGK2DLs) in colorectal carcinoma and changes in response to chemotherapeutic agents. *Molecular biology reports*, 48(5), 3999–4008. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06404-y>
- Küçük, Ü., (2006). Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Alt Tiplerinde Cox-2, Survivin, Ki-67, Bcl-2, Cd3 Ekspresyonu ve Prognoz Üzerine Etkileri. (Uzmanlık Tezi), Dokuz Eylül Üniversitesi. Patoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- Kumar, K. P. S., Yadav, A., Srivastava, S., Paswan, S., & sankar Dutta, A. (2012). Recent trends in Indian traditional herbs *Syzygium aromaticum* and its health benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(1), 13–22.
- Kumari, A., Cacan, E., Greer, S. F., & Garnett-Benson, C. (2013). Turning T cells on: epigenetically enhanced expression of effector T-cell costimulatory molecules on irradiated human tumor cells. *Journal for immunotherapy of cancer*, 1, 17. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-1-17>
- Kunnumakkara, A. B., Koca, C., Dey, S., Gehlot, P., Yodkeeree, S., Danda, D., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2009). Traditional uses of spices: an overview. *Molecular targets and therapeutic uses of spices: modern uses for ancient medicine*, 1–24.
- Kwon, M. J., & Shin, Y. K. (2011). Epigenetic regulation of cancer-associated genes in ovarian cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(2), 983–1008.

- Kykalos, S., Mathaiou, S., Karayiannakis, A. J., Patsouras, D., Lambropoulou, M., & Simopoulos, C. (2012). Tissue expression of the proteins fas and fas ligand in colorectal cancer and liver metastases. *Journal of gastrointestinal cancer*, 43(2), 224–228.
- Landa, P., Kokoska, L., Pribylova, M., Vanek, T., & Marsik, P. (2009). In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E2 biosynthesis. *Archives of pharmacal research*, 32(1), 75–78.
- Lee, J.-C., Won, S.-J., Chao, C.-L., Wu, F.-L., Liu, H.-S., Ling, P., Lin, C.-N., & Su, C.-L. (2008). Morusin induces apoptosis and suppresses NF- κ B activity in human colorectal cancer HT-29 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 372(1), 236–242.
- Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., & Basilio Heredia, J. (y.y.). *molecules Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties*. <https://doi.org/10.3390/molecules22060989>
- Li, L. C., Jayaram, S., Ganesh, L., Qian, L., Rotmensch, J., Maker, A. V., & Prabhakar, B. S. (2011). Knockdown of MADD and c-FLIP overcomes resistance to TRAIL-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 205(4), 362.e12-362.e25. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2011.05.035>
- Li, X., Qiu, Z., Jin, Q., Chen, G., & Guo, M. (2018). Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HT-29 Cells Induced by Dichloromethane Fraction From Toddalia asiatica (L.) Lam. *Frontiers in pharmacology*, 9, 629.
- Liu, M., Zhao, G., Zhang, D., An, W., Lai, H., Li, X., Cao, S., & Lin, X. (2018). Active fraction of clove induces apoptosis via PI3K/Akt/mTOR-mediated autophagy in human colorectal cancer HCT-116 cells. *International journal of oncology*, 53(3), 1363–1373.
- Liu, X., Wu, W., Fang, L., Liu, Y., & Chen, W. (2022). TNF- α Inhibitors and Other Biologic Agents for the Treatment of Immune Checkpoint Inhibitor-Induced Myocarditis. *Frontiers in Immunology*, 0, 3463. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.922782>
- Liu, Y., Borchert, G. L., Surazynski, A., & Phang, J. M. (2008). Proline oxidase, a p53-induced gene, targets COX-2/PGE2 signaling to induce apoptosis and inhibit tumor growth in colorectal cancers. *Oncogene*, 27(53), 6729–6737.
- Liu, Y., Li, J., Li, H., Zeng, S., Chen, Y., Han, M., Ye, Q., Zhou, J., Liu, S., & Zou, X. (2022). An analysis of the significance of the Tre2/Bub2/CDC 16 (TBC) domain protein family 8 in colorectal cancer. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15629-1>

- Liu, Z., Liu, G., Liu, X., & Li, S. (2017). The effects of hyperoside on apoptosis and the expression of Fas/FasL and survivin in SW579 human thyroid squamous cell carcinoma cell line. *Oncology letters*, 14(2), 2310-2314.
- Liu, Z., Liu, R., Qiu, J., Yin, P., Luo, F., Su, J., Li, W., Chen, C., Fan, X., & Zhang, J. (2009). Combination of human Fas (CD95/Apo-1) ligand with adriamycin significantly enhances the efficacy of antitumor response. *Cellular & Molecular Immunology*, 6(3), 167–174.
- Lotfollahzadeh, S., Recio-Boiles, A., & Cagir, B. (2022). *Colon Cancer*.
- Ly, D., Pal, P., Liu, X., Jia, Y., Thummuri, D., Zhang, P., ... & Zhou, D. (2021). Development of a BCL-xL and BCL-2 dual degrader with improved anti-leukemic activity. *Nature communications*, 12(1), 6896.
- Mahboubi, M., Heidarytabar, R., Mahdizadeh, E., & Hosseini, H. (2017). Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus species and Zataria multiflora essential oils. *Agriculture and Natural Resources*, 51(5), 395–401. <https://doi.org/10.1016/J.ANRES.2018.02.001>
- Malki, A., ElRuz, R. A., Gupta, I., Allouch, A., Vranic, S., & Al Moustafa, A.-E. (2020). Molecular mechanisms of colon cancer progression and metastasis: recent insights and advancements. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 130.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodríguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 197.
- Maruyama, N., Sekimoto, Y., Ishibashi, H., Inouye, S., Oshima, H., Yamaguchi, H., & Abe, S. (2005). Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of Inflammation*, 2(1), 1–11.
- Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., & Coppedè, F. (2011). Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Mittal, M., Gupta, N., Parashar, P., Mehra, V., & Khatri, M. (2014). Phytochemical evaluation and pharmacological activity of Syzygium aromaticum: a comprehensive review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(8), 67–72.
- Möller, P., Koretz, K., Leithäuser, F., Brüderlein, S., Henne, C., Quentmeier, A., & Krammer, P. H. (1994). Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *International Journal of Cancer*, 57(3), 371–377.
- Montinaro, A., & Walczak, H. (2022). Harnessing TRAIL-induced cell death for cancer therapy: a

- long walk with thrilling discoveries. *Cell Death & Differentiation*, 1–13.
- Morgan, J. E., Shanderson, R. L., Boyd, N. H., Cacan, E., & Greer, S. F. (2015). The class II transactivator (CIITA) is regulated by post-translational modification cross-talk between ERK1/2 phosphorylation, mono-ubiquitination and Lys63 ubiquitination. *Bioscience Reports*, 35(4).
- Mou, H., Zheng, Y., Zhao, P., Bao, H., Fang, W., & Xu, N. (2011). Celastrol induces apoptosis in non-small-cell lung cancer A549 cells through activation of mitochondria-and Fas/FasL-mediated pathways. *Toxicology in vitro*, 25(5), 1027–1032.
- Murphy, N., Moreno, V., Hughes, D. J., Vodicka, L., Vodicka, P., Aglago, E. K., Gunter, M. J., & Jenab, M. (2019). Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Molecular Aspects of Medicine*, 69, 2–9.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research*, 256(1), 12–18.
- Nakamoto, Y., Kaneko, S., Fan, H., Momoi, T., Tsutsui, H., Nakanishi, K., Kobayashi, K., & Suda, T. (2002). Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy. *The Journal of experimental medicine*, 196(8), 1105–1111.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3448–3459. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2013.06.001>
- Niksic, H., Becic, F., Koric, E., Gusic, I., Omeragic, E., Muratovic, S., Miladinovic, B., & Duric, K. (2021). Cytotoxicity screening of Thymus vulgaris L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92679-x>
- Nouri Nojadeh, J., Behrouz Sharif, S., & Sakhinia, E. (2018). Microsatellite Instability In Colorectal Cancer. *EXCLI Journal*, 17, 159–168. <https://doi.org/10.17179/excli2017-948>
- O’connell, J., O’sullivan, G. C., Collins, J. K., & Shanahan, F. (1996). The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *The Journal of experimental medicine*, 184(3), 1075–1082.
- Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S., & Endo, T. (2000). Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(10), 1467–1469.
- Okada, N., Hirata, A., Murakami, Y., Shoji, M., Sakagami, H., & Fujisawa, S. (2005). Induction of

- cytotoxicity and apoptosis and inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by eugenol-related compounds. *Anticancer Research*, 25(5), 3263–3269.
- Otunola, G. A. (2022). Culinary Spices in Food and Medicine: An Overview of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and L. M. Perry [Myrtaceae]. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 3817. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.793200/BIBTEX>
- Ou, H.-C., Chou, F.-P., Lin, T.-M., Yang, C.-H., & Sheu, W. H.-H. (2006). Protective effects of eugenol against oxidized LDL-induced cytotoxicity and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44(9), 1485–1495.
- Ouadi, S., Sierro, N., Goepfert, S., Bovet, L., Glauser, G., Vallat, A., Peitsch, M. C., Kessler, F., & Ivanov, N. V. (2022). The clove (*Syzygium aromaticum*) genome provides insights into the eugenol biosynthesis pathway. *Communications Biology* 2022 5:1, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03618-z>
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 414–420. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2005.11.009>
- Öncül, Ş., (2008). Zara Özgül Katkı Maddelerinin ve Apoptoz Sürecinin Zarda Oluşturduğu Değişimlerin Yeni Geliştirilen Floresans Problemlerle Belirlenmesi. (Doktora Tezi), Marmara Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul.
- Pancione, M., Remo, A., & Colantuoni, V. (2012). Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Pathology research international*, 2012.
- Park, B. S., Song, Y. S., Yee, S.-B., Lee, B. G., Seo, S. Y., Park, Y. C., Kim, J.-M., Kim, H. M., & Yoo, Y. H. (2005). Phospho-ser 15-p53 translocates into mitochondria and interacts with Bcl-2 and Bcl-xL in eugenol-induced apoptosis. *Apoptosis*, 10(1), 193–200.
- Pathania, A. S., Guru, S. K., Verma, M. K., Sharma, C., Abdullah, S. T., Malik, F., Chandra, S., Katoch, M., & Bhushan, S. (2013). Disruption of the PI3K/AKT/mTOR signaling cascade and induction of apoptosis in HL-60 cells by an essential oil from *Monarda citriodora*. *Food and chemical toxicology*, 62, 246–254.
- Picard, E., Verschoor, C. P., Ma, G. W., & Pawelec, G. (2020). Relationships between immune landscapes, genetic subtypes and responses to immunotherapy in colorectal cancer. *Frontiers in Immunology*, 11, 369.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some

- plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-39/COMMENTS>
- Rajabi, S., Maresca, M., Yumashev, A. V., Choopani, R., & Hajimehdipoor, H. (2021). The most competent plant-derived natural products for targeting apoptosis in cancer therapy. *Biomolecules*, 11(4), 534.
- Ramachandran, A., Madesh, M., & Balasubramanian, K. A. (2000). Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 15(2), 109–120.
- Ramesh, P., & Medema, J. P. (2020). BCL-2 family deregulation in colorectal cancer: potential for BH3 mimetics in therapy. *Apoptosis*, 25(5), 305–320.
- Recio-Boiles, A., & Cagir, B. (2021). Colon cancer. İçinde *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Rejhová, A., Opattová, A., Čumová, A., Slíva, D., & Vodička, P. (2018). Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *European journal of medicinal chemistry*, 144, 582–594.
- Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramirez, L. A., Leyva, J. M., Siddiqui, M. W., Cruz-Valenzuela, M. R., Gonzalez-Aguilar, G. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2016). Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(10), 1717–1727. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.800832>
- Roelofs, H. M. J., Te Morsche, R. H. M., van Heumen, B. W. H., Nagengast, F. M., & Peters, W. H. M. (2014). Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. *BMC gastroenterology*, 14(1), 1–6.
- Rueda, M., Robertson, Y., Acott, A., Rueda, S., Keikhoff, A., Guerrero, W., & Mancino, A. T. (2012). Association of tobacco and alcohol use with earlier development of colorectal pathology: should screening guidelines be modified to include these risk factors? *The American journal of surgery*, 204(6), 963–968.
- Russo, R., Corasaniti, M. T., Bagetta, G., & Morrone, L. A. (2015). Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/397821>
- Sadeghi, S., Davoodvandi, A., Pourhanifteh, M. H., Sharifi, N., ArefNezhad, R., Sahebhasagh, R., Moghadam, S. A., Sahebkar, A., & Mirzaei, H. (2019). Anti-cancer effects of cinnamon: Insights into its apoptosis effects. *European journal of medicinal chemistry*, 178, 131–140.

- Saygi, K. O., & Cacan, E. (2021). Antioxidant and cytotoxic activities of silver nanoparticles synthesized using *Tilia cordata* flowers extract. *Materials Today Communications*, 27, 102316.
- Şahin, E., (2019). 20-Hidroksi-20-Epi-Tingenon Molekülünün Kolon Kanseri Üzerinde Apoptotik Etkisinin Araştırılması.(Yüksek Lisans), İstinye Üniversitesi. Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi Anabilim Dalı, İstanbul.
- Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arlukowicz, T., & Przybyłowicz, K. E. (2021). A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers*, 13(9), 2025.
- Şengezer, E., & Güngör, T. (2008). Esansiyel yağlar ve hayvanlar üzerindeki etkileri (derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 48(2), 101–110.
- Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H. G. (2013). Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.599504>, 54(5), 625–644.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2011.599504>
- Sertel, S., Eichhorn, T., Plinkert, P. K., & Efferth, T. (2011). Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. *Anticancer research*, 31(1), 81–87.
- Shankar, S., Prasad, S., Owaiz, M., Yadav, S., Manhas, S., & Yaqoob, M. (2021). *Plant Archives Essential Oils, Components And Their Applications: A Review*. 21, 2027–2033.
<https://doi.org/10.51470/PLANTARCHIVES.2021.v21.S1.331>
- Shaukat, A., & Levin, T. R. (2022). Current and future colorectal cancer screening strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2022 19:8, 19(8), 521–531.
<https://doi.org/10.1038/s41575-022-00612-y>
- Sheehan, K. M., Sheahan, K., O'Donoghue, D. P., MacSweeney, F., Conroy, R. M., Fitzgerald, D. J., & Murray, F. E. (1999). The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *Jama*, 282(13), 1254–1257.
- Singh, M. P., Rai, S., Pandey, A., Singh, N. K., & Srivastava, S. (2021). Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine. *Genes & Diseases*, 8(2), 133–145.
- Sinicrope, F. A., Ruan, S. B., Cleary, K. R., Stephens, L. C., Lee, J. J., & Levin, B. (1995). bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer research*, 55(2), 237–241.
- Sœur, J., Marrot, L., Perez, P., Iraqui, I., Kienda, G., Dardalhon, M., Meunier, J. R., Averbek, D., &

- Huang, M. E. (2011). Selective cytotoxicity of Aniba rosaeodora essential oil towards epidermoid cancer cells through induction of apoptosis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 718(1–2), 24–32.
<https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2010.10.009>
- Sökmen, M., Serkedjieva, J., Daferera, D., Gulluce, M., Polissiou, M., Tepe, B., Akpulat, H. A., Sahin, F., & Sokmen, A. (2004). In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(11), 3309–3312.
- Solórzano-Santos, F., & Miranda-Navales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 136–141.
<https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2011.08.005>
- Souza, E. L. de, Lima, E. de O., Freire, K. R. de L., & Sousa, C. P. de. (2005). Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 48, 245–250.
- Stolfi, C., Pallone, F., & Monteleone, G. (2012). Molecular targets of TRAIL-sensitizing agents in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 7886–7901.
- Sun, Y., Tang, X. M., Half, E., Kuo, M. T., & Sinicrope, F. A. (2002). Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the cytochrome c-dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer research*, 62(21), 6323–6328.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Süntar, I., Nabavi, S. M., Barreca, D., Fischer, N., & Efferth, T. (2018). Pharmacological and chemical features of *Nepeta* L. genus: Its importance as a therapeutic agent. *Phytotherapy Research*, 32(2), 185–198.
- Süt, T., (2019). *Epilobium Parviflorum* Schreb. Ekstraktinin Farklı Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Terapötik Etkileri. (Yüksek Lisans Tezi), Akdeniz Üniversitesi. Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya.
- Tang, X., Sun, Y. J., Half, E., Kuo, M. T., & Sinicrope, F. (2002). Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer research*,

62(17), 4903–4908.

- Thélin, C., & Sikka, S. (2015). Epidemiology of colorectal cancer—Incidence, lifetime risk factors statistics and temporal trends. *Screening for colorectal Cancer with colonoscopy. London: IntechOpen Limited*, 61–77.
- Tian, R., Liu, X., Luo, Y., Jiang, S., Liu, H., You, F., Zheng, C., & Wu, J. (2020). Apoptosis exerts a vital role in the treatment of colitis-associated cancer by herbal medicine. *Frontiers in pharmacology*, 11, 438.
- Tomek, S., Horak, P., Pribill, I., Haller, G., Rössler, M., Zielinski, C. C., Pils, D., & Krainer, M. (2004). Resistance to TRAIL-induced apoptosis in ovarian cancer cell lines is overcome by co-treatment with cytotoxic drugs. *Gynecologic oncology*, 94(1), 107–114.
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), R1231–R1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Totzke, G., Schulze-Osthoff, K., & Jänicke, R. U. (2003). Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors sensitize tumor cells specifically to death receptor-induced apoptosis independently of COX-2 inhibition. *Oncogene*, 22(39), 8021–8030.
- Ugbogu, O. C., Emmanuel, O., Agi, G. O., Ibe, C., Ekweogu, C. N., Ude, V. C., Uche, M. E., Nnanna, R. O., & Ugbogu, E. A. (2021). A review on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.). *Heliyon*, 7(11), e08404.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1561–1568.
- Ultee, A., Kets, E. P. W., & Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4606–4610.
- Ünlü, A. (2022). Metastatik kolorektal kanserde yeni nesil sekanslama tekniğiyle saptanan gen mutasyonlarının prognoza ve sağ kalıma etkisi.(Uzmanlık Tezi), Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi. İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Denizli.
- Vázquez, B. I., Fente, C., Franco, C. M., Vázquez, M. J., & Cepeda, A. (2001). Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1–2), 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00429-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00429-9)

- Vicidomini, C., Roviello, V., & Roviello, G. N. (2021). Molecular Basis of the Therapeutical Potential of Clove (*Syzygium aromaticum* L.) and Clues to Its Anti-COVID-19 Utility. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 1880, 26(7), 1880. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26071880>
- Vilar, E., & Gruber, S. B. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence. *Nature reviews Clinical oncology*, 7(3), 153–162.
- Wang, C., & Youle, R. J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis. *Annual review of genetics*, 43, 95.
- Wang, S., & El-Deiry, W. S. (2003). TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, 22, 8628–8633. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207232>
- Wang, Y., Ding, Y., Wang, S., Chen, H., Zhang, H., Chen, W., Gu, Z., & Chen, Y. Q. (2017). Extract of *Syzygium aromaticum* suppress eEF1A protein expression and fungal growth. *Journal of Applied Microbiology*, 123(1), 80–91. <https://doi.org/10.1111/JAM.13478>
- Watson, A. J. M. (2006). An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 57(2), 107–121.
- Wei, F.-X., Liu, J.-X., Wang, L., Li, H.-Z., & Luo, J.-B. (2008). [Expression of bcl-2 and bax genes in the liver cancer cell line HepG2 after apoptosis induced by essential oils from *Rosmarinus officinalis*]. *Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials*, 31(6), 877–879. <http://europepmc.org/abstract/MED/18998574>
- WHO - World Health Organization. (2020). *GLOBOCAN - Colorectal Cancer Incidence in The World*. The Global Cancer Observatory.
- Woods, D., & Turchi, J. J. (2013). Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. *Cancer biology & therapy*, 14(5), 379–389.
- Wu, S., Patel, K. B., Booth, L. J., Metcalf, J. P., Lin, H. K., & Wu, W. (2010). Protective essential oil attenuates influenza virus infection: An in vitro study in MDCK cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-69/FIGURES/7>
- Xu, G., & Shi, Y. (2007). *Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis*. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.52>
- Xu, J.-G., Liu, T., Hu, Q.-P., & Cao, X.-M. (2016). Chemical composition, antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from clove buds against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 21(9), 1194.

- Yaacoub, K., Pedoux, R., Tarte, K., & Guillaudeux, T. (2016). Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. *Cancer letters*, 378(2), 150–159.
- Yaman, S., Özdemir, Z., Şit, M., Özer, B., Çatal, O., (2018). Kekik Yağı Karvakrol'ün İnsan Sağlığına Etkileri, SETSCI Conference Indexing System, Volume 2 (2018), 391-392.
- Yaman, T., Uyar, A., Kömüroğlu, A. U., Keleş, Ö. F., & Yener, Z. (2021). Chemopreventive efficacy of juniper berry oil (*Juniperus communis* L.) on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rat. *Nutrition and Cancer*, 73(1), 133–146.
- Yang, J., Li, G., & Zhang, K. (2016). Pro-survival effects by NF- κ B, Akt and ERK (1/2) and anti-apoptosis actions by Six1 disrupt apoptotic functions of TRAIL-Dr4/5 pathway in ovarian cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 1078–1087.
- Yang, S. Y., Sales, K. M., Fuller, B., Seifalian, A. M., & Winslet, M. C. (2009). Apoptosis and colorectal cancer: implications for therapy. *Trends in molecular medicine*, 15(5), 225–233.
- Yin, Q., Yan, F., Zu, X.-Y., Wu, Y., Wu, X., Liao, M., Deng, S., Yin, L., & Zhuang, Y. (2012). Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, 64(1), 43–51.
- Yılmaz, E. (2019). *Kolorektal Kanser Hücrelerinin Anti-Tümör İmmün Yanıtlarına Duyarlılığının Arttırılması*. (Yüksek Lisans Tezi), Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Biyoloji Anabilim Dalı, Tokat.
- Yokuş, B., & Çakır, D. Ü. (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1, 7–18.
- Yu, L., Zhang, M.-M., & Hou, J.-G. (2022). Molecular and cellular pathways in colorectal cancer: apoptosis, autophagy and inflammation as key players. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1–12.
- Yuan, J., Lan, H., Jiang, X., Zeng, D., & Xiao, S. (2020). Bcl-2 family: Novel insight into individualized therapy for ovarian cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 46(4), 1255–1265.
- Zhang, J., & Yang, G. C. H. (2021). Adenocarcinoma. *Lung and Mediastinum Cytohistology*, 122–144. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139023351.007>
- Zhang, L., & Yu, J. (2013). Role of apoptosis in colon cancer biology, therapy, and prevention. *Current colorectal cancer reports*, 9(4), 331–340.
- Zhu, Q., Liu, J.-Y., Xu, H.-W., Yang, C.-M., Zhang, A.-Z., Cui, Y., & Wang, H.-B. (2005).

Mechanism of counterattack of colorectal cancer cell by Fas/Fas ligand system. *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(39), 6125.

Zong, W.-X., & Thompson, C. B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes & development*, 20(1), 1–15.

