



T.C
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE AOM-DSS KANSER MODELİNDE BACOPA
MONNIERİ'NİN TÜMÖR MİKROÇEVRESİNDE
ANJİYOGENEZ, APOPTOZ VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Sinem GÜLTEKİN

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

BURDUR-2025

T.C
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE AOM-DSS KANSER MODELİNDE BACOPA
MONNİERİ’NİN TÜMÖR MİKROÇEVRESİNDE
ANJİYOGENEZ, APOPTOZ VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sinem GÜLTEKİN

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

Bu Araştırma “Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü” tarafından “0968-DR-23” numaralı proje ve TÜBİTAK tarafından “123O526” nolu proje numaraları ile desteklenmiştir.

BURDUR-2025

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Sinem GÜLTEKİN tarafından *Prof. Dr. Özlem ÖZMEN* yönetiminde hazırlanan *“Farelerde AOM-DSS Kanser Modelinde Bacopa monnieri’nin Tümör Mikroçevresinde Anjiyogenez, Apoptoz ve Oksidatif Stres Üzerine Etkilerinin Araştırılması”* başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalında *Doktora Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Veterinerlik Patolojisi AD
Başkan

Doç. Dr. Volkan İPEK
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Veterinerlik Patolojisi AD
Jüri

Doç. Dr. Dilara AKÇORA YILDIZ
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji AD
Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ... / ... / Tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan ADANIR
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübesiyle yalnızca bilimsel değil, insani anlamda da bana rehberlik eden; akademik titizliği, vizyonu ve adanmışlığıyla her adımda yanımda olan, karşılaştığım her zorlukta hem yol gösteren hem güç veren çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e en derin şükranlarımı sunarım. Sadece bir danışman değil, aynı zamanda ilham aldığım bir bilim insanı, güçlü bir rol model ve bu zorlu süreçte varlığına her zaman güvenebildiğim bir akıl hocası olduğu için kendisine sonsuz teşekkür ederim. Öğrencisi olmak benim için bir ayrıcalıktı; bu ayrıcalığın sorumluluğunu ve kıymetini her zaman taşıyacağım. Jüri üyeleri olarak tezime katkı sunan Sayın Doç. Dr. Volkan İPEK'e ve Sayın Doç. Dr. Dilara AKÇORA YILDIZ'a, ayrıca eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bana her zaman destek olan Sayın Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a teşekkür ederim. Tez çalışmamda kullandığım bazı materyallere katkı sağlayan Öğr. Gör. Dr. Leyla Elif Özgü AYÖZGER'e, tezimin tüm aşamalarında gerek teknik gerek manevi desteğini esirgemeyen değerli meslektaşım Burak YILDIRIM'a, laboratuvar ve nekropsi süreçlerinde yanımda olan doktora arkadaşlarıma ve süreç boyunca bana uzaktan ya da yakından destek olan tüm dostlarıma teşekkür ederim. Bu akademik yolculuğumda en büyük motivasyon kaynağım olan, her zaman yanımda duran ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen babam Em. Kd. Alb. Celal Abbas GÜLTEKİN başta olmak üzere, tüm kıymetli aileme sonsuz teşekkür ederim. Bu doktora tezi, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı bünyesinde yürütülmüş olup, 0968-DR-23 numaralı BAP projesi ile Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen 1230526 numaralı 1001 proje kapsamında fonlanmıştır. Bu bağlamda projelerin desteklenmesinde emeği geçen tüm kişi ve kurumlara teşekkür ederim.

ETİK BEYAN

“Farelerde AOM-DSS Kanseri Modelinde Bacopa monnieri’nin Tümör Mikroçevresinde Anjiyogenez, Apoptoz ve Oksidatif Stres Üzerine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Özlem ÖZMEN danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Sinem GÜLTEKİN

Tarih:

İmza:

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL ve ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	ix
SİMGELEr ve KISALTMALAR	x
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kolorektal Kanseri	5
2.2. Kanseri ve Kolon Kanseri	6
2.3. Kanseri Geneli Yaygınlığı ve Etkileri	6
2.4. Kolorektal Kanseri Özellikleri ve Sınıflandırılması	8
2.5. <i>Bacopa monnieri</i> (BM)	10
2.5.1. <i>Bacopa monnieri</i> 'nin Biyolojik Özellikleri ve Kimyasal Yapısı	11
2.6. <i>Bacopa monnieri</i> 'nin Önceki Araştırmalardaki Potansiyel Anti-Kanseri Etkileri	12
2.6.1. <i>Bacopa monnieri</i> ve Kolorektal Kanseri Etkileri	15
2.6.2. <i>Bacopa monnieri</i> 'nin Antioksidan ve İmmunmodulator Etkileri	15
2.7. Kolorektal Kanseri Etkileri İmmun Kaçış Mekanizmaları: MHC-1, PD-1/PD-L1 ve Terapötik Hedefler	17
2.8. Kolon Kanseri ve Tümör Mikroçevresi	18
2.9. Tümör Mikro Çevresinin ve Bağırsak Mikrobiyotasının Kanseri Etkileri	20
2.10. Kolorektal Kanseri Etkileri Mevcut Tedavi Seçenekleri ve Sınırlamaları	23
2.11. Fare Modelleri Üzerindeki Çalışmalar	24
2.12. KRK Oluşturulması ve AOM/DSS Kimyasallarının Uygulanması	24
2.13. Farelerde AOM/DSS ile KRK Oluşturulması, Uygulama Süreci ve Zamanlaması	25
2.14. İmmunohistokimya markırları ve seçim gerekçeleri	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Deney Dizaynı	28
3.2. Hemogram Analizi	33
3.3. Histopatolojik Yöntem	34
3.4. İmmunohistokimya Yöntemi	36
3.5. İstatistik Analizler	38
4. BULGULAR	39
4.1. Klinik Bulgular	39
4.2. Ağırlık Değişimleri	39
4.3. Hemogram Analiz Bulguları	40
4.4. Makroskobik Bulgular	41
4.5. Histopatolojik Bulgular	43

4.6. İmmunohistokimyasal Bulgular	45
4.6.1. CD-31 İmmunohistokimyasal Bulguları	45
4.6.2. VEGF İmmunohistokimyasal Bulguları	46
4.6.3. 4HNE İmmunohistokimyasal Bulguları	48
4.6.4. 8OHDG İmmunohistokimyasal Bulguları	49
4.6.5. KASPAZ-3 İmmunohistokimyasal Bulguları	51
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	77



ŞEKİLLER

Şekil 4.1.	Ağırlık artışı verilerinin normal dağılım grafiği	39
Şekil 4.2.	Gruplara ve günlere göre ağırlık artış grafiği.	40
Şekil 4.3.	Gruplara göre kolonların makroskopik görünümeleri. (A) Grup 1'de normal kolon mukozası, (B) Grup 2'de bir farenin kolonunda proliferatif lezyonlar (oklar), (C) Grup 3'te azalmış proliferatif lezyonlar (ok), (D) Grup 4'te normale yakın kolon mukozası, (E) Grup 5'te normal kolon mukozası, (F) Grup 6'da kolon mukozasının normal görünümü.	43
Şekil 4.4.	Gruplar arasında kolonların mikroskopik görünümeleri. (A) Grup 1'de normal görünümde kolon histolojisi. (B) Grup 2'de kolonda yaygın adenokarsinomatöz proliferasyonlar (ok). (C) Grup 3'de küçük adenomatöz proliferasyonlar (ok). (D) Grup 4'te küçük adenomatöz odaklar (ok). (E) Grup 5'te normal kolon mikroskopik görünümü. (F) Grup 5'te normal kolon histolojisi, HE, barlar =100µm.	44
Şekil 4.5.	Gruplara göre histopatolojik skorların grafiği, **: p<0.01, ***: p<0.001.	44
Şekil 4.6.	Gruplara göre CD-31 immunoekspresyonlarının görünümü. (A) Grup 1'de çok hafif ekspresyon. (B) Grup 2'de belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Grup 3'de orta düzeyde ekspresyonlar (oklar). (D) Grup 4'de daha hafif ekspresyonlar (oklar). (E) Grup 5'de çok hafif ekspresyonlar. (F) Grup 6'da çok hafif ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, barlar =50µm.	45
Şekil 4.7.	Gruplara göre CD-31 immunohistokimya skorlarının istatistik analizi, **: p<0.01, ***: p<0.001	46
Şekil 4.8.	VEGF ekspresyonlarının gruplar arasındaki görünümü. (A) Grup 1'de çok hafif ekspresyon. (B) Grup 2'de epitel hücrelerinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok). (C) Grup 3'de epitel hücrelerinde belirgin ekspresyonlar (ok). (D) Grup 4'de epitellerde orta düzeyde ekspresyonlar (ok). (E) Grup 5'de çok hafif ekspresyonlar. (F) Grup 6'da çok hafif ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, barlar =50µm.	47
Şekil 4.9.	Gruplara göre VEGF immunohistokimya skorlarının istatistik analizi, **: p<0.01, ***: p<0.001.	47
Şekil 4.10.	4HNE ekspresyonlarının gruplara göre görünümeleri. (A) Grup 1'de orta düzeyde ekspresyon. (B) Grup 2'de özellikle epitel hücrelerinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok). (C) Grup 3'de özellikle epitel hücrelerinde belirgin ekspresyonlar (ok). (D) Grup 4'de epitellerde belirgin ekspresyonlar (ok). (E) Grup 5'de orta düzeyde ekspresyonlar. (F) Grup 6'da orta düzeyde ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, barlar =50µm.	48
Şekil 4.11.	Gruplara göre 4HNE immunohistokimya skorlarının istatistik analizi, **: p<0.01, ***: p<0.001.	49

- Şekil 4.12.** Gruplara göre 8OHdG ekspresyonlarının görünüşleri. (A) Grup 1'de çok hafif ekspresyon. (B) Grup 2'de epitelial ve mezenkimal hücrelerinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Grup 3'de hücrelerde ekspresyonlarda azalma ve hafif ekspresyonlar (ok). (D) Grup 4'de ekspresyonlarda azalma ve bazı epitel hücrelerinde pozitif ekspresyonlar (ok). (E) Grup 5'de çok hafif ekspresyonlar. (F) Grup 6'da negatife yakın ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, barlar =50µm. **50**
- Şekil 4.13.** Gruplara göre 8OHdG immunohistokimya skorlarının istatistik analizi, **: p<0.01, ***: p<0.001. **50**
- Şekil 4.14.** Grupların kaspaz-3 ekspresyonlarının görünüşleri. (A) Grup 1'de çok hafif ekspresyon. (B) Grup 2'de epitelial ve mezenkimal hücrelerinde artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Grup 3'de hücrelerde belirgin ekspresyonlar (ok). (D) Grup 4'de belirgin ekspresyonlar (ok). (E) Grup 5'de çok hafif ekspresyonlar. (F) Grup 6'da negatife yakın ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, barlar =50µm. **51**
- Şekil 4.15.** Gruplara göre kaspaz-3 immunohistokimya skorlarının istatistik analizi, **: p<0.01, ***: p<0.001. **52**

TABLÖLAR

Tablo 3.1.	Çalışma grupları ve uygulanan işlemler	33
Tablo 3.2.	Deney Akış Tablosu.	33
Tablo 3.3.	Histopatolojik bulguların tanımı ve skorları (Remke vd., 2024).	36
Tablo 3.4.	İmmünohistokimyasal inceleme için kullanılan markerlar ile ilgili bilgiler.	37
Tablo 4.1.	Gruplara göre hemogram verilerinin istatistik analiz sonuçları.	41
Tablo 4.2.	Grupların histopatolojik ve immünohistokimyasal skorlarının istatistik analiz verileri.	52
Tablo 4.3.	Histopatolojik ve immünohistokimyasal skorların korelasyon analiz sonuçları	53

SİMGELER ve KISALTMALAR

4-HNE	4-Hidroksi-2-nonenal
8-OHdG	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
AChE	Asetilkolinesteraz
AgNP	Biyolojik yöntemlerle sentezlenen gümüş nanopartikül
AIF	Apoptoz indükleyici faktör (Apoptosis-inducing factor)
Akt	Protein kinaz B
AKT1	RAC-alfa serin/treonin protein kinaz 1
ALP	Alkalın fosfataz
ALT	(Alternative Lengthening of Telomeres)
AOM	Azoksimetan
APC	Adenomatous Polyposis Coli geni
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
AuNP	Üzüm çekirdeği ekstraktı kullanılarak üretilen altın nanopartikülü
Aβ	Amiloid beta
B[a]P	Benzo[a]piren
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BM	Bacopa monnieri
BME	Bacopa monnieri ekstraktı
BMH	Bacopa monnieri Hidrometanolik ekstresi
BMWE	Bacopa monnieri su ekstraktı
CAC	Kolitise bağlı kolorektal kanser
CAD	Caspase-activated DNase
CAF	Cancer-Associated Fibroblast
CASP3	Kaspaz-3
CAT	Katalaz
CD31	Cluster of Differentiation 31
CI	Tahmini güven aralığı
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
COX	Siklooksijenaz
CpG	Sitozin-Fosfat-Guanin
KRK, KRK	Kolorektal kanser
CREB	cAMP Response Element-Binding protein, cAMP Tepki Elemanı Bağlayıcı Protein
CUS	Kronik belirsiz stres
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCX	Doublecortin
DLA	Dalton's Lymphoma Ascites hücre hattı
DMBA	7,12-dimetil benz(a)antrasen
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
DSS	Dekstran Sülfat Sodyum
EAT	Ehrlich ascites tümör
ECM	Ekstraselüler matriks

EDX	Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi
EEBM	Bacopa monnieri etanolik ekstraktı
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMS	Etil Metan
EMT	Epitel-mezenkimal geçiş
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EROD	7-etoksiresorufin-o-deetilaz
EtOH	Etanol – Solvent olarak kullanılır
FGF1	Fibroblast Growth Factor 1
FOXP3	Forkhead box P3
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
FST	Forced Swim Test
GO	Gen Ontolojisi
Gpx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon – Hücresel antioksidan
H&E	Hematoksilen ve Eozin
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HAZ	Jun proto-onkogen
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HIF-1α	Hipoksiye İndüklenebilir Faktör 1 alfa
HL	İnsan lenfositleri
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HSP70	Isı şoku proteini 70
HSP90AA1	Isıyı etkileyen shot proteini 90 AA1
IC₅₀	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu
IFN-γ	İnterferon gama
IHC	İmmünohistokimya
IKK	Sitokinlerle uyarılan kinaz kaskadı
IL	İnterlökin
İED	İnsan eşdeğer dozu
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İYE	İdrar yolları enfeksiyonu
KA	Kromozom aberasyonu
KOGG	Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi
KZYA	Kısa zincirli yağ asitleri
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPT	Microtubule-Associated Protein Tau
MDA	Malondialdehit
MDSCs	Myeloid-derived suppressor cells, Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler
MHC-I	Major Histocompatibility Complex Class I
Mİ	Mitotoik indeks
miRNA	Eksozom kaynaklı mikroRNA'lar
MLH1	MutL homolog 1
MMP-9	Matriks metalloproteinaz-9
MMR	DNA uyumsuzluk onarımı
MSI	Mikrosatellit instabilitesi

MSI-H	Mikrosatellit instabilitesi yüksek – DNA tamir bozukluğu göstergesi
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MVD	Mikrovasküler yoğunluk
NaN₃	Sodyum Azid
NB	Nitrobenzen
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NO	Nitrik oksit
NQNO	Nitrokinolin-N-oksit
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
OR	Ortalama Referans
P450	Sitokrom P450
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
PBS	Fosfat tamponlu salin
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
p-ERK1/2	Fosforile Ekstraselüler Sinyal Düzenlemeli Kinaz ½
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PP2A	Fosfataz 2A
PROD	7-pentoksiresorufin-o-dealkilaz
PTPN1	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 1
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RAD1	Kontrol Noktası DNA Ekzonükleazı
RAGE	Advanced glycation end-products reseptörü
RNS	Reaktif azot türleri
RO	Rosmarinus officinalis
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SCFA	Kısa zincirli yağ asitleri
SEM	UV-Vis spektrofotometri, taramalı elektron mikroskopu
sIgA	Salivary immunoglobulin A
SOD	Süperoksit dismutaz
SRC	SRC proto-onkogen
STAT3	Sinyal iletimi ve transkripsiyon aktivatörü 3
TAMs	Tümörle ilişkili makrofajlar
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
TIL	Tümör infiltrate eden lenfosit
TMÇ/ TME	Tümör mikroçevresi
TME	Cerrahi olarak total mezokolik eksizyon
TNF	Tümör nekroz faktörü
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa
TNM	Tümör, Nod, Metastaz
TP53	Tümör baskılayıcı gen p53
Trx	Tioredoksin
TSP-1	Trombospondin-1
TST	Tail Suspension Test
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
VEGFA	Vasküler endotelial büyüme faktörü A
WB	Western Blot

WBC
XPF

Beyaz kan hücresi
Xeroderma pigmentosum tamamlama grubu F



ÖZET

Farelerde AOM-DSS Kanseri Modelinde *Bacopa monnieri*'nin Tümör Mikroçevresinde Anjiyogenez, Apoptoz ve Oksidatif Stres üzerine Etkilerinin Araştırılması

Kolorektal kanserler (KRK), dünya genelinde yüksek insidans ve mortalite oranlarına sahip; çok faktörlü bir patogeneze sahip malignitelerdendir. Modern onkolojide tümör biyolojisinin yalnızca genetik mutasyonlarla açıklanamayacak kadar kompleks olduğu görülmüş ve buna göre bir yaklaşım geliştirilmiştir. Tümör mikroçevresinde (TMÇ, TME) yer alan stromal hücrelerin, immün yanıt elemanları, vasküler yapılar ve ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşimler tümör progresyonda belirleyici ölçüde etkilidir. *Bacopa monnieri* (BM) geleneksel tıpta uzun yıllardır kullanılan bir bitkidir. BM'nin bazı kanserlerde olumlu etkileri tanımlanmıştır. Bu çalışmanın amacı BM'nin KRK'deki etkilerinin incelenmesidir. Çalışmada kontrol; AOM-DSS; AOM-DSS ve 0,5mg/kg BM; AOM-DSS ve 2mg/kg BM; 0,5mg/kg BM ve 2mg/kg BM olmak üzere 6 deney grubu oluşturulmuştur. Deneyde her grupta 10 fare olmak üzere toplam 60 Balb/c fare kullanılmıştır. Çalışma sonunda farelerden kan ve kolon örnekleri toplanmış kan örneklerinde hücre sayımı yapılmıştır. Kolon örnekleri ise makroskopik, histopatolojik ve VEGF, CD31, kaspase-3, 8-OHdG ve 4-HNE ekspresyonları açısından immunohistokimyasal olarak incelenmiştir. AOM-DSS uygulamaları özellikle distal kolonda yoğunlaşan şekilde adenomatöz-adenokarsinomatöz ürelemelere sebep olurken BM uygulamalarının tümör oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca BM uygulaması hem tümörün yayılımını ve VEGF, CD31, 8-OHdG ve 4-HNE ekspresyonlarında azalmaya kaspaz-3 ekspresyonlarında ise artışa sebep olmuştur. Bu bulgulara göre BM uygulaması KRK'de anjiyogenezi baskılayıcı, oksidatif stres seviyesini azaltıcı ve apoptotik aktiviteyi artırıcı etki göstererek iyileşme üzerinde olumlu etkiler göstermiştir. BM'nin 2mg/kg dozda uygulamasının 0,5mg/kg dozda uygulanmasına göre daha etkili olduğu saptanmıştır. BM'nin KRK'de kullanımı ile ilgili umut verici bilgiler elde edilmiştir. Bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: AOM-DSS Kanseri Modeli, *Bacopa monnieri*, İmmünohistokimya, Kolorektal Kanseri (KRK), Tümör Mikroçevresi (TMÇ)

ABSTRACT

Investigation of the Effects of *Bacopa Monnieri* on Angiogenesis, Apoptosis and Oxidative Stress in Tumour Microenvironment in Aom-Dss Cancer Model in Mice

Colorectal cancers (CRC) are malignancies with high incidence and mortality rates worldwide and exhibit a multifactorial pathogenesis. In modern oncology, it has become evident that tumor biology is too complex to be explained solely by genetic mutations, leading to the development of more comprehensive approaches. The interactions between stromal cells, immune components, vascular structures, and the extracellular matrix within the tumor microenvironment (TME) play a critical role in tumor progression. *Bacopa monnieri* (BM) is a plant that has been used in traditional medicine for many years, and its beneficial effects have been reported in several cancer types. The aim of this study was to investigate the effects of BM in CRC. In the experimental design, six groups were established: Control; AOM-DSS; AOM-DSS + 0.5 mg/kg BM; AOM-DSS + 2 mg/kg BM; 0.5 mg/kg BM; and 2 mg/kg BM. A total of 60 Balb/c mice were used, with 10 mice per group. At the end of the experiment, blood and colon samples were collected from the animals. Complete blood counts were performed on the blood samples, and the colon samples were examined macroscopically, histopathologically, and immunohistochemically for the expression of VEGF, CD31, caspase-3, 8-OHdG, and 4-HNE. AOM-DSS administration led to the development of adenomatous to adenocarcinomatous lesions, particularly concentrated in the distal colon. In contrast, BM administration was observed to reduce tumor formation. Additionally, BM treatment resulted in decreased tumor spread and reduced expression levels of VEGF, CD31, 8-OHdG, and 4-HNE, while increasing caspase-3 expression. These findings suggest that BM exerts beneficial effects in CRC by suppressing angiogenesis, reducing oxidative stress, and enhancing apoptotic activity. The 2 mg/kg dose of BM was found to be more effective than the 0.5 mg/kg dose. Overall, the study provides promising insights into the potential use of BM in CRC, although further studies are warranted to fully elucidate its therapeutic potential.

Keywords: AOM-DSS Cancer Model, *Bacopa monnieri*, Colorectal Cancer (CRC), Immunohistochemistry, Tumor Microenvironment (TME)

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK), dünya genelinde hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık görülen malignitelerden biri olup, kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenleri arasında yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, her yıl milyonlarca yeni KRK vakası tanısı konulmakta ve önemli bir kısmı ileri evrelerde saptanarak tedaviye dirençli hale gelmektedir. KRK'nin etiyolojisi multifaktöriyel olup; genetik mutasyonlar, epigenetik değişiklikler, diyet ve yaşam tarzı alışkanlıkları, inflamasyon ve bağırsak mikrobiyotası gibi birçok faktörün etkileşimi sonucunda geliştiği kabul edilmektedir. Bu kompleks patogenez, yalnızca tümör hücrelerinin kendisini değil, aynı zamanda çevresindeki stromal bileşenleri de içeren bir bütüncül yaklaşımı zorunlu kılmaktadır.

Modern onkolojik yaklaşımlar, kanserin yalnızca hücre içi sinyal yollarının bozulmasıyla değil, aynı zamanda tümör hücrelerinin içinde bulunduğu mikroçevreyle olan etkileşimleri yoluyla geliştiğini ve sürdüğünü ortaya koymuştur. Tümör mikroçevresi (TMÇ); fibroblastlar, endotelial hücreler, immun sistem elemanları, perisitler ve ekstrasellüler matriks gibi çeşitli hücreler ve hücre dışı bileşenlerden oluşur. TMÇ'deki bu yapılar, tümör hücreleri ile sürekli etkileşim içerisinde olarak hücre proliferasyonu, anjiyogenez, apoptoz, invazyon ve metastaz gibi süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. Bu nedenle, TMÇ'yi hedef alan tedavi yaklaşımları, KRK'nin önlenmesi ve tedavisine yönelik stratejiler arasında giderek daha fazla önem kazanmaktadır.

Doğal bileşikler, kanser tedavisinde hedefe yönelik ve daha az toksik ajanlar olarak değerlendirilmekte; fitokimyasalların TMÇ üzerindeki düzenleyici etkileri araştırmalarda ön plana çıkmaktadır. Bitkisel kökenli ajanlar, antioksidan, antiinflamatuvar, anti-proliferatif ve anti-anjiyogenik etkileri sayesinde kanser hücreleri üzerinde doğrudan veya mikroçevre aracılığıyla dolaylı etkilere sahip olabilirler. Bu bağlamda, geleneksel tıpta yüzyıllardır kullanılan ve biyolojik etkileri bilimsel olarak araştırılmaya devam edilen bitkilerden biri de *Bacopa monnieri*'dir (BM).

Tümör mikroçevresi, tümör hücreleriyle çevresindeki stromal doku (kan damarları, immun hücreler, fibroblastlar ve çeşitli sinyal molekülleri) ile ekstrasellüler matriksten oluşan karmaşık bir yapıdır. TMÇ ile tümör hücreleri arasındaki etkileşim, tümör büyümesi, invazyon ve metastaz sürecinde kritik rol oynar. Örneğin, TMÇ'deki anjiyogenez tümörün beslenmesini sağlarken, immun hücrelerin polarizasyonu ve salgıladıkları sitokinler tümör progresyonunu ya hızlandırabilir ya da engelleyebilir. Ayrıca TMÇ'de yüksek seviyede bulunan reaktif oksijen türleri (ROS), DNA hasarına yol açarak tümör gelişimini destekler. Bu nedenle, anjiyogenez, inflamasyon/immun yanıt ve oksidatif stres gibi faktörler, kolon kanserinin gelişimi ve tedavi yanıtı açısından önemli temel bileşenlerdir (Anderson ve Simon, 2020).

Bacopa monnieri (BM), Türkçede “Brahmi” olarak bilinen ve Ayurveda tıbbında binlerce yıldır kullanılan tıbbi bir bitkidir. “Su çördük otu” olarak da anılan bu bitki, Scrophulariaceae familyasına ait çok yıllık bir tür olup, başta Hindistan, Nepal ve Çin olmak üzere Güneydoğu Asya'nın nemli bölgelerinde doğal olarak yetişmektedir. Geleneksel kullanımı kapsamında hafıza güçlendirici, yatıştırıcı, ağrı kesici, antiepileptik ve antiinflamatuvar amaçlarla değerlendirilmiş olan BM, son yıllarda modern farmakolojik araştırmaların da odağı haline gelmiştir.

Fitokimyasal analizler, BM'nin dammaran tip triterpenoid saponinler (özellikle bakozit A ve B) ile çeşitli flavonoidler ve alkaloidler gibi biyolojik olarak aktif bileşenler içerdiğini ortaya koymuştur. Bu bileşenlerin; serbest radikallerin temizlenmesi, mitokondriyal disfonksiyonun önlenmesi, apoptotik yolların modülasyonu ve tümör anjiyogenezinin baskılanması gibi çoklu mekanizmalar üzerinden etkili olduğu bildirilmektedir. Söz konusu biyolojik aktiviteler, BM'nin yalnızca nörolojik hastalıklarda değil, aynı zamanda inflamasyonla ilişkili kompleks hastalıklarda ve kanserde de potansiyel terapötik faydalar sunabileceğini düşündürmektedir.

Nitekim, son yıllarda yapılan prelinik ve in vitro çalışmalar, BM'nin kemopreventif ve antineoplastik potansiyelini giderek daha fazla gündeme getirmiştir.

Literatürde BM'den izole edilen bileşiklerin çeşitli kanser hücre hatlarında anti-proliferatif, anti-metastatik ve anti-anjiyogenik etkiler gösterdiği; bu etkilerin hem doğrudan tümör hücrelerini hedef alarak hem de tümör mikroçevresini düzenleyerek ortaya çıktığı belirtilmiştir (Smith ve ark., 2018; Ghosh ve ark., 2021). Bu bağlamda BM, düşük toksisite profili ve çoklu etki mekanizmaları nedeniyle, doğal kaynaklı tamamlayıcı veya alternatif anti-kanser ajan arayışlarında dikkat çeken bir aday haline gelmiştir.

KRK'de BM'nin etkinliği üzerine literatürde sınırlı sayıda in vitro çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda BM'den saflaştırılmış triterpen saponinler olan bacopaside I ve II'nin KRK hücrelerinde apoptozu indüklediği ve BMsaponin II'nin hücre büyümesini durdurduğu bildirilmiştir (Smith ve ark., 2018; Palethorpe ve ark., 2019). Ancak BM'nin in vivo modellerde, özellikle tümör hücreleri ve TMC üzerindeki etkileri yeterince araştırılmamıştır. Bu alandaki eksiklik, BM'nin kolorektal tümör biyolojisi ve TMC hedefli potansiyel etkilerini ortaya koymak için önemli bir bilimsel boşluk oluşturmaktadır.

KRK'ye yönelik deneysel modeller arasında en sık tercih edilen modellerden biri, kimyasal ajanlarla indüklenen AOM-DSS (Azoksimetan-Dekstran Sülfat Sodyum) modelidir. Bu model hem sporadik tümör oluşumunu hem de inflamasyon ilişkili kolorektal karsinogenez süreçlerini taklit etmesi nedeniyle, insan KRK patofizyolojisine benzerliği açısından büyük avantaj sağlamaktadır. AOM, DNA metilasyonu yoluyla mutasyonlara neden olarak karsinojenik etki gösterirken; DSS, bağırsak mukozasında inflamatuvar yanıt oluşturarak tümör gelişimini hızlandırmaktadır.

Bu çalışmada, azoksimetan (AOM) ve dekstran sülfat sodyum (DSS) ile indüklenmiş kolitis ilişkili kolorektal kanser modelinde, BM ekstrelerinin tümör hücreleri ve TMC üzerindeki etkileri çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. KRK patogenezinde yalnızca neoplastik hücrelerin değil, aynı zamanda stromal hücreler, immun yanıt elemanları, vasküler yapılar ve oksidatif stres yanıtı gibi TMC dinamiklerinin de belirleyici rol oynadığı bilinmektedir. Bu bağlamda çalışmanın temel amacı, BM'nin kolorektal tümör gelişiminde kritik öneme sahip anjiyogenez

(CD31 ve VEGF ekspresyonları), apoptoz (kaspaz-3 düzeyleri) ve oksidatif stres (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin [8-OHdG] ve 4-hidroksi-2-nonenal [4-HNE] immunreaktiviteleri) gibi biyolojik süreçler üzerindeki düzenleyici etkilerini araştırmaktır.

Çalışmada elde edilmesi planlanan verilerin, BM'nin deneysel kolorektal kanser modelinde TMC'yi nasıl modüle ettiğine dair yeni bilgiler sunması beklenmektedir. Özellikle anti-anjiyogenik, pro-apoptotik ve antioksidan etkiler üzerinden TMC'deki tümör destekleyici sinyallerin baskılanması, bu bitkinin kemopreventif ve tamamlayıcı tedavi potansiyelini ortaya koyacaktır.

Bu tez çalışmasının özgünlüğü, BM'nin kolitis ilişkili kolon kanseri modelinde, tümör hücreleri ve TMC'nin çoklu bileşenlerine yönelik etkilerinin ilk kez sistematik ve in vivo düzeyde araştırılmasıdır. Geleneksel tıpta uzun süredir kullanılan bir bitkisel ajanın modern onkoloji bağlamında bilimsel olarak değerlendirilmesiyle, kolorektal kanserin tedavi edici veya tedaviye destek yaklaşımlarına yönelik yeni, çok hedefli ve doğal temelli stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlanması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser (KRK), hem insanlarda hem de hayvanlarda çok sayıda çevresel faktörle ilişkilendirilen ciddi bir hastalık olup, güncel literatür yaşam tarzı ve küresel risk örüntülerinin bu hastalığın gelişiminde önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Çevresel ve gıda kaynaklı mutajenler, bağırsak parazitleri, patojenler ve inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi etkenler, KRK gelişiminde kritik risk faktörleri arasında yer almaktadır. Son yıllarda KRK'nın sadece genetik temelli bir hastalık olmayıp, karmaşık hücre dışı sinyaller, stromal doku etkileşimleri ve immun kaçış mekanizmalarının da hastalık progresyonunda etkili olduğu keşfedilmiştir. KRK'nın küresel yaygınlığı, yüksek mortalite oranları, risk faktörleri ve tümör mikroçevresinin (TMÇ) tümör progresyonu üzerindeki etkileri, araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Bhullar ve ark., 2011; Anderson ve Simon, 2020).

KRK tedavisinde en önemli zorluklardan biri, tümörün moleküler heterojenitesidir. TNM sınıflandırması ile anatomik yayılım değerlendirilse de benzer evreye sahip hastalar arasında prognoz ve tedavi yanıtları önemli ölçüde farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılıkların temel nedenlerinden biri, TMÇ'de yer alan hücresel ve moleküler bileşenlerin değişken oranlarda bulunması ve işlev göstermesidir (Colangelo ve ark., 2017). Bu bağlamda, *Bacopa monnieri* (BM) gibi bitkisel kökenli bileşiklerin tümör hücreleri ve tümör mikroçevresindeki immunmodülatör, antioksidan ve apoptotik etkileri, tedaviye duyarlılığın artırılması ve yeni nesil destekleyici tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

İnsanlarda KRK, dünya genelinde en sık tanı konan kanser türlerinden biridir ve kansere bağlı ölümler arasında da ön sıralarda yer almaktadır. KRK'lar, dünya çapında üçüncü en sık teşhis edilen kanser türü olup, buna bağlı ölüm oranları da oldukça yüksektir. Mevcut tedavi stratejilerine rağmen, özellikle metastatik hastalığı olan olgularda beş yıllık sağkalım oranları %15'in altında seyretmekte ve bu durum yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (Smith ve ark., 2018).

2.2. Kanser ve Kolon Kanseri

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla karakterize edilen ve genetik, çevresel ile yaşam tarzına bağlı faktörlerin etkileşimi sonucu gelişen kompleks bir hastalık grubudur. Küresel düzeyde ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan kanser, günümüzde önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. Bu hastalık grubu içerisinde yer alan KRK ise hem sıklığı hem de mortalite oranı açısından öne çıkmaktadır. KRK, kolon veya rektumun mukozal epitelinden köken alır ve genellikle adenomatöz poliplerin zamanla malign dönüşüm geçirmesiyle ortaya çıkar (Sung ve ark., 2021).

Hastalığın ilerleyişinde genetik mutasyonlar, kronik inflamasyon, epigenetik değişiklikler, oksidatif stres ve TMC'deki etkileşimler belirleyici rol oynamaktadır. Özellikle gelişmiş ülkelerde KRK insidansındaki artışın; batı tipi beslenme alışkanlıkları, obezite, hareketsiz yaşam tarzı ile alkol ve sigara tüketimi gibi yaşam tarzı faktörleriyle doğrudan ilişkili olduğu bildirilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, kolorektal kanserin gelişiminde yalnızca genetik yatkınlık değil, aynı zamanda tümör mikroçevresinde meydana gelen biyolojik süreçlerin de kritik bir rol oynadığını göstermektedir (Nasrallah ve El-Sibai, 2014; Sung ve ark., 2021; Siegel ve ark., 2023). Bu nedenle KRK'nin anlaşılması ve tedavisine yönelik stratejilerde, hücre dışı matriks bileşenleri, bağışıklık yanıtı ve anjiyogenez gibi mikroçevresel faktörlerin dikkate alınması, daha bütüncül ve etkili yaklaşımların geliştirilmesine olanak tanıyacaktır.

2.3. Kanserin Genel Yaygınlığı ve Etkileri

KRK, dünya genelinde en sık görülen malignitelerden biri olup (Sung ve ark., 2021), erken tanı konulmadığında yüksek mortaliteye neden olan ciddi bir sağlık sorunu olarak öne çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda, KRK gelişiminde yaşlanma, sağlıksız beslenme alışkanlıkları (yüksek miktarda kırmızı et ve doymuş yağ tüketimi), obezite, sigara ve alkol kullanımı gibi yaşam tarzı faktörlerinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca inflamatuvar bağırsak hastalıklarının (örneğin Crohn hastalığı ve ülseratif kolitis) bu kanser türüne yakalanma riskini artırdığı bildirilmiştir

(Nasrallah ve El-Sibai, 2014). KKK oluşumunda çevresel ve yaşam tarzına bağlı etmenlerin %80’den fazla etkili olduğu vurgulanmakta olup, bu durum hastalığın onlenmesinde halk sağlığı stratejilerinin ne denli onemli olduğunu ortaya koymaktadır.

KKK, kansere bağlı olmler arasında Amerika’da ikinci, dünya genelinde ise nc sırada yer almaktadır (Siegel ve ark., 2023). Vakaların büyük çoğunluğu kalıtsal genetik mutasyonlardan ziyade, çevresel ve yaşam biçimi ile ilişkili nedenlerden kaynaklanmaktadır. Özellikle hayvansal gıdaların fazla tüketilmesi, fiziksel aktivite eksikliği, yüksek kalorili diyetler, yoğun alkol ve sigara kullanımı, kırmızı ve işlenmiş et tüketimi gibi faktörler risk artışına neden olmaktadır. Buna karşın, yeterli düzeyde tam tahıl, lif, süt ve kalsiyum alımı KKK riskini azaltıcı etki göstermektedir (Siegel ve ark., 2023). Ayrıca, kronik inflamasyon ile kolorektal kanser arasında güçlü bir ilişki olduğu ortaya konmuş; KKK olgularının yaklaşık %20’sinin inflamasyonla ilişkili öncül durumların ardından geliştiği belirtilmiştir (Robertis ve ark., 2011).

Fusco ve ark., (2024) yaptığı bir çalışmada, gelişmiş ülkelerde artan KKK sıklığının, Batı tipi yaşam tarzının benimsenmesiyle doğrudan ilişkili olduğu ifade edilmiştir. “Western diyet” olarak adlandırılan, yüksek yağlı ve düşük lifli işlenmiş gıdaların ağırlıkta olduğu beslenme biçimi, bağırsak mikrobiyotasında ciddi değişikliklere yol açmakta ve bu durum kolon kanseri gelişimini kolaylaştırmaktadır. Mikrobiyotadaki dengenin bozulması, yani disbiyozis, koruyucu bakterilerin azalmasına ve proinflamatuvar, prokanserojen mikroorganizmaların çoğalmasına neden olmaktadır. Bu ortamda inflamatuvar süreçler tetiklenerek tümöral değişiklikler hızlanmakta ve adenoma-karsinoma dönüşüm süreci desteklenmektedir. Bu bulgular, mikrobiyota temelli yaklaşımların KKK’nin onlenmesi ve erken tanısında stratejik bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Hayvanlarda KKK insidansı, insanlara kıyasla daha düşük olsa da son yıllarda çevresel kirlilik ve insan kaynaklı etkenler nedeniyle artış göstermektedir. Örneğin, Saint Lawrence Nehri’nde yaşayan Beluga balinalarının %27’sinde çevresel toksinlere bağlı olarak kanser geliştiği raporlanmıştır (Martineau ve ark., 1999). Kaliforniya

deniz aslanlarında ise klorlu pestisitlere maruziyetin ürogenital kanser sıklığını artırdığı; tilki ve zebra gibi türlerde genetik çeşitliliğin azalmasıyla birlikte kanser vakalarının arttığı bildirilmiştir (Martineau ve ark., 1999; Bernanke ve Köhler, 2009). Bu veriler, kolorektal kanserin yalnızca insanları değil, hayvanları da etkileyen önemli bir sağlık sorunu olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, çevresel etkenler ve insan faaliyetleri hem insanlarda hem de hayvanlarda KRK riskini artıran ortak belirleyicilerdir.

2.4. Kolorektal Kanserinin Özellikleri ve Sınıflandırılması

KRK tanısında tümörün yayılım derecesini belirlemek, prognozu öngörmek ve uygun tedaviyi seçmek için TNM evreleme sistemi temel bir araçtır. Uluslararası Kanser Ajansı (UICC) ve Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) tarafından tanımlanan bu sistem; tümör invazyon derinliği (T), lenf nodu tutulumu (N) ve uzak metastaz (M) kriterlerine dayanır. Özellikle kolon ve rektum gibi tabakalı organlarda invazyon derinliği, lenfatik yayılım ve metastaz durumu; cerrahi ve sistemik tedavi kararlarını doğrudan etkiler. Örneğin T3N1M0 evresi, barsak dışı yayılım ve sınırlı nodal tutulumla birlikte metastazın olmadığı bir durumu yansıtırken; T4N2M1 evresi, komşu organlara invazyon, ileri lenfatik tutulum ve uzak metastazını ifade eder. Bu sistem, bireyselleştirilmiş tedavi stratejilerinin planlanmasına olanak tanır (Brierley ve ark., 2025).

TNM sınıflaması yalnızca evreleme için değil, aynı zamanda sağkalım tahmini açısından da önemlidir. Örneğin evre I hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı %90 iken, evre IV'te bu oran %10'un altına düşmektedir (Siegel ve ark., 2023). Ancak bu sistemin biyolojik ve moleküler belirteçlerle desteklenmedikçe KRK'nın karmaşık yapısını tam olarak yansıtamamaktadır. Apoptoz direnci, proliferatif avantajlar, telomeraz aktivitesi ve hücresel yaşlanmanın devre dışı kalması gibi olaylar, tümörün progresyonunda etkili olmaktadır (Robertis ve ark., 2011).

KRK tedavisi klasik cerrahi ve kemoterapiden, moleküler ve immunolojik alt tiplere yönelik hedefe yönelik yaklaşımlara evrilmiştir. Ancak tedavi yanıtı, tümör heterojenliği, biyobelirteç eksikliği ve bağışıklık baskılayıcı mikroçevre nedeniyle

sınırlı kalabilmektedir. Bu nedenle başarılı bir tedavi yaklaşımı; anatomik evreleme yanında genetik, epigenetik ve bağışıklık yanıtı gibi faktörleri kapsayan bütüncül bir değerlendirme gerektirir (Robertis ve ark., 2011; Siegel ve ark., 2023).

Yaşam tarzı faktörlerinin KRK üzerindeki etkisi de oldukça belirgindir. İspanya'nın Albacete bölgesinde yapılan gözlemsel bir çalışmada; alkol tüketimi (OR: 1.79), haftada 2 günden fazla pirinç/makarna (OR: 2.23), yumurta/omlet (OR: 2.68) ve günde 2 litreden fazla su tüketiminin (OR: 2.87) KRK riskini artırdığı; düzenli fiziksel aktivitenin ise riski azalttığı (OR: 3.38) saptanmıştır (Fusco ve ark., 2024).

KRK'nin gelişiminde yalnızca genetik değil, mikrobiyal faktörler de belirleyicidir. KRK hastalarında *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* ve *Escherichia coli* gibi bakterilerin artışı, mukozada inflamasyon ve DNA hasarını artırarak hem kanserleşmeyi hem de tedaviye direnci desteklemektedir. Buna karşın SCFA [Short-Chain Fatty Acids - (Kısa Zincirli Yağ Asitleri)] üreten koruyucu bakteriler azalmaktadır. Mikrobiyota temelli biyobelirteçler, erken tanı ve hedefe yönelik tedavilerde yeni olanaklar sunmaktadır (Fusco ve ark., 2024).

KRK gelişimi, normal mukozal epitelin hiperproliferatif değişimi ve adenom-karsinom sekansı üzerinden ilerler. Bu süreçte ortaya çıkan moleküler değişiklikler hastalığın alt tiplerini belirlemekte ve hedefe yönelik tedavi stratejilerine temel oluşturmaktadır. Bu süreçte p53 geninin mutasyonu, apoptotik yanıtı baskılayarak hücrelerin hayatta kalmasına neden olur (Sluyser, 2002). Ayrıca Bcl-2/Bax oranı, hücrenin kaderi belirleyen kritik bir mekanizmadır. BM'nin bu yollara etki edebilmesi, apoptoz üzerinden terapötik potansiyel taşıyabileceğini düşündürmektedir (Robertis ve ark., 2011; Siegel ve ark., 2023).

KRK'nin incelenmesinde hayvan modelleri önemli bir rol oynamaktadır. Kimyasal ajanlar (DMH ve AOM) kullanılarak oluşturulan modeller, DNA metilasyonu ve genetik mutasyonlarla KRK'yi taklit eder. Bu modeller, tümör mikroçevresinin insan hastalığına benzerliği nedeniyle prelinik tedavi araştırmalarında yaygın olarak tercih edilmektedir (Boopathy ve ark., 2024).

2.5. *Bacopa monnieri* (BM)

Bacopa monnieri (L.) Pennell, güncel sınıflandırmayla Plantaginaceae familyasından, çok yıllık ve sulu ortamları seven tıbbi bir bitkidir. Sanskritçede “Brahmi” olarak adlandırılan bu bitki, özellikle Ayurveda ve Siddha tıbbında binlerce yıldır nootropik, antioksidan, antiepileptik ve antiinflamatuvar etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. BM’nin terapötik etkileri esasında içerdiği triterpenoid saponinler, flavonoidler ve alkaloidlere atfedilmektedir. Özellikle bacopaside I, bacopaside II ve bacopasaponin C gibi bitkiden izole edilmiş bileşikler, son yıllarda antikanser etkiler açısından ilgi odağı hâline gelmiştir. Güncel farmakolojik çalışmalarda, BM’nin hücre proliferasyonunu baskılayıcı, apoptotik mekanizmaları aktive edici ve oksidatif stresle ilişkili biyolojik yolları düzenleyici etkileri ortaya konulmuştur. Bu bitkinin gösterdiği bu çoklu biyolojik etki mekanizmaları, onu yalnızca geleneksel tıpta değil, modern onkolojik araştırmalarda da önemli bir doğal bileşik kaynağı haline getirmektedir. BM’nin çok yönlü biyolojik etkileri özellikle onkolojik araştırmalarda doğal ürün temelli yeni tedavi yaklaşımlarının önemini destekler (Mirza, 2020).

BM, geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan bir bitki olmasının ötesinde, farmakolojik potansiyeli nedeniyle güncel bilimsel araştırmalarda da dikkat çeken bir model haline gelmiştir. Antioksidan, nöroprotektif ve anti-inflamatuvar etkileriyle öne çıktığı bilinen bu bitki; aynı zamanda genetik varyasyonlara açık yapısı ve sekonder metabolit üretimindeki plastisitesi sayesinde biyoteknolojik araştırmalar için oldukça uygun bir zemin sunmaktadır. Nitekim, etil metansülfonat (EMS) ve sodyum azid (NaN_3) gibi kimyasal mutajenlere maruz bırakılmış varyantlarının sekonder metabolit profillerinde gözlenen değişiklikler, BM’nin genetik stabiliteye verdiği yanıtları kavrayıp değerlendirmede önemli bilgiler sağlamaktadır. Bu yönüyle BM, tedavi edici etkisinin yanı sıra genetik ve metabolik düzeydeki tepkileriyle de geniş kapsamlı bir bilimsel araştırma alanı sunmaktadır (Emsen ve Dogan, 2018; Mirza, 2020).

2.5.1. *Bacopa monnieri*'nin Biyolojik Özellikleri ve Kimyasal Yapısı

Bacopa monnieri, Ayurveda tıbbında en çok bilinen bitkilerden biri olup; prokognitif, antioksidan, antiinflamatuvar, nöroprotektif ve antikonvülsan etkileri ile dikkat çekmektedir. Scrophulariaceae ailesine ait olan bu çok yıllık sürünen bitki, genellikle bataklık ve nemli bölgelerde yetişmekte olup Brahmi olarak da adlandırılmaktadır (Pandey ve ark., 2022). BM, merkezi sinir sistemi üzerinde düzenleyici etkiler gösteren doğal bir ajan olarak tanımlanmakta ve son yıllarda kanserin önlenmesi ve tedavisinde de potansiyel taşıdığı bildirilmektedir (Banerjee ve ark., 2021). Bu bağlamda, BM'nin geleneksel kullanımı ile modern farmakolojik etkileri bir araya getirilerek özellikle kompleks hastalıklar, örneğin kanser, için potansiyel bir doğal terapötik ajan olarak değerlendirilmesi hedeflenmektedir. BM'nin farmakolojik etkilerinin biyolojik temelleri, cheminformatics ve sistem farmakolojisi yaklaşımlarıyla da incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda bitkide tanımlanmış 52 aktif bileşiğin, insan proteomu üzerinde 780 farklı hedef proteinle etkileşime girdiği gösterilmiştir. Bu bileşikler arasında en çok dikkat çekenler bacoside A, asiatic acid ve loliolide olup; özellikle nörolojik fonksiyonlar, hücrel sinyal iletimi ve immun yanıt düzenlenmesi ile ilişkili proteinleri etkilemektedir (Jeyasri ve ark., 2020).

Bu durum, BM'nin yalnızca geleneksel kullanım alanlarında değil, aynı zamanda modern tedavi stratejilerinde de potansiyel taşıyan bir kaynak olabileceğini göstermektedir. Bitkinin farmakolojik etkileri, içeriğinde bulunan başlıca triterpenoid saponinler (örneğin bacoside A, bacopaside I), flavonoidler (örneğin luteolin) ve alkaloidler (örneğin loliolide) gibi bileşiklerle ilişkilidir. Bu bileşikler; antioksidan savunma sistemlerinin aktivasyonu, oksidatif stresin baskılanması, apoptozun indüklenmesi ve proinflamatuvar yolların inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalar üzerinden etki gösterir. Bu etkiler, özellikle kolorektal kanser gibi kompleks hastalıkların tedavisinde hücrel proliferasyonun sınırlanması ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesi açısından önemlidir (Mirza, 2020).

Ayrıca, BM'nin içerdiği sekonder metabolitlerin sinerjik etkileri sayesinde inflamasyon, oksidatif stres ve nörolojik bozukluklarla ilişkili durumlarda terapötik potansiyel sunduğu bildirilmektedir. Özellikle bacosidlerin, nöronal yenilenmeyi

destekleyerek bilişsel işlevleri iyileştirdiği ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda fayda sağlayabileceği vurgulanmaktadır. BM'nin antioksidan ve nöroprotektif özellikleri, aynı zamanda mutajenlere bağlı oluşabilecek genotoksik etkilerin azaltılmasında da etkili olabilir. Nitekim, BM ekstraktlarının insan lenfositlerinde sitotoksik ve genotoksik etkileri azalttığı gösterilmiştir (Dogan ve Emsen, 2018).

Bitkisel kaynaklı biyoaktif bileşiklerin karakterizasyonu ve ilaç geliştirme sürecindeki rolleriyle ilgili literatürde, bu tür sekonder metabolitlerin terapötik potansiyelleri vurgulanmıştır (Ramawat ve Merillon, 2008). Bu doğrultuda, BM üzerinde yapılan bazı çalışmalarda, etil metansülfonat (EMS) ve sodyum azid (NaN_3) gibi kimyasal mutajenlerin kullanımı ile bitkinin genetik çeşitliliği ve sekonder metabolit üretiminin artırılması hedeflenmiştir. EMS, DNA'da alkilasyon yoluyla nokta mutasyonlarına neden olurken, NaN_3 DNA replikasyonu sırasında mutasyon oluşturabilmektedir. Bu mutasyonlar, bitkinin morfolojik ve fizyolojik özelliklerinde çeşitli değişikliklere yol açmaktadır. Örneğin, EMS'nin 0.10 mg/L konsantrasyonunda 60 dakika uygulanması maksimum sürgün sayısını sağlarken; 0.20 mg/L konsantrasyonda 120 dakikalık uygulama maksimum sürgün uzunluğu, boğum ve yaprak sayısında artışa neden olmuştur. Benzer şekilde, NaN_3 'ün 0.025 mg/L ve 0.05 mg/L konsantrasyonlarında 120 dakika uygulanması da olumlu sonuçlar vermiştir (Mirza ve ark., 2023).

2.6. *Bacopa monnieri*'nin Önceki Araştırmalardaki Potansiyel Anti-Kanser Etkileri

BM'den izole edilen bacopaside I ve II, meme kanseri modelinde sinerjistik antiproliferatif etkiler sergilemiş, DNA metilasyonu ve epigenetik profiller üzerinde düzenleyici roller üstlenmiştir (Palethorpe ve ark., 2019). Bacoside A ve B gibi triterpen saponinleri, nöroprotektif özellikleriyle reaktif oksijen türlerini (ROS) baskılayarak SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırmaktadır (Fatima ve ark., 2022).

BM'nin apoptozu indükleyici etkileri, Ehrlich tümör hücreleri (EAT) üzerinde yapılan çalışmalarla açıkça ortaya konmuştur. Kalyani ve ark., (2013) yürüttüğü araştırmada, BM su ekstraktının (BMWE) kaspaz-3 aktivasyonunu artırdığı, Bax/Bcl-2 oranını değiştirdiği ve DNA fragmentasyonuna yol açarak apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada, VEGF seviyelerindeki anlamlı düşüş ile tümör anjiyogenezinin baskılandığı da rapor edilmiştir. Bu bulgular, BM'nin hem hücreSEL düzeyde apoptozu uyararak tümör büyümesini engellediğini hem de vaskülarizasyonu azaltarak tümör mikroçevresini hedef aldığını göstermektedir (Kalyani ve ark., 2013). Ayrıca, carrageenan ile oluşturulan inflamatuvar modellerde, BM'nin inflamasyon aracılı kanserlerde potansiyel taşıdığına dair ön veriler elde edilmiştir (Özfırat ve ark., 2022). Stigmasterol, Ehrlich Ascites Karsinomu (EAC) modelinde 5 ve 10 mg/kg dozlarında tümör hacmini sırasıyla %60.52 ve %83.68 oranında azaltırken, yaşam süresini %109–132 oranında uzatmış, karaciğer histolojisinde iyileşme sağlamıştır (Ghosh ve ark., 2011). Benzer şekilde, kanser modellerinde G2/M fazı hücre döngüsü arresti, AQP1 inhibisyonu ile hücre migrasyonu ve invazyonun baskılanması gibi etkiler gözlenmiştir (Ghosh ve ark., 2021). BM ekstraktı, DU145 prostat kanseri hücre hattında hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu baskılamış, ayrıca *Vibrio harveyi* testleriyle güçlü anti-mutajenik etkiler ortaya konmuştur (Koczurkiewicz ve ark., 2017).

BM'nin kemoterapötik ajanlarla kombinasyon potansiyeli, düşük dozlarda bile etkinlik göstermesiyle desteklenmektedir. Dalton's Lymphoma Ascites hücrelerinde doza bağlı sitotoksite oluşturduğu gösterilmiştir (Kumar ve ark., 1998). Stigmasterol gibi bileşenleri, lipid peroksidasyonunu azaltmakta ve apoptotik yolları aktifleştirmektedir (Ghosh ve ark., 2011).

BM; ERK, PI3K ve Notch1 sinyal yollarını inhibe ederek özellikle glioblastoma gibi agresif tümörlerde terapötik potansiyel göstermektedir (Ghosh ve ark., 2021). Fenolik bileşikler ve terpenoidler, antioksidan savunmayı artırmakta, serbest radikalleri nötralize etmekte ve kaspaz-3 aktivasyonu ile Bcl-2 ailesi proteinlerini modüle ederek apoptozu desteklemektedir (Ramawat ve Merillon, 2008).

Anti-kanser etkileri, PI3K/Akt/mTOR, Notch ve MAPK gibi proliferasyonla ilişkili sinyal yollarının inhibisyonuna dayanmaktadır. Bu yolların baskılanması ile apoptoz artmakta, proliferasyon azalmakta ve anjiyogenez engellenmektedir (Singh ve ark., 2021). Karaciğer kanseri üzerine yapılan ağ farmakolojisi çalışmalarında, TP53, AKT1, IL6 ve JUN gibi genlerin yanı sıra p53, PI3K-Akt, MAPK ve VEGF yollarının BM bileşenleriyle düzenlendiği gösterilmiştir. Ayrıca beta-sitosterol ve luteolin gibi bileşiklerin, HSP90AA1 ve JUN proteinlerine yüksek afiniteyle bağlandığı saptanmıştır (Sadaqat ve ark., 2023).

DU145 hücre hattıyla yapılan bir çalışmada, yapay sindirim sıvılarından elde edilen BM ekstraktları düşük dozlarda hücre hareketliliğini baskılamış ve güçlü antimutajenik etki göstermiştir (Koczurkiewicz ve ark., 2017). Aynı zamanda DLA ve solid tümör modellerinde tümör büyümesini geciktirdiği, hematolojik parametreleri normale döndürdüğü bildirilmiştir (Kumar ve ark., 1998).

Genetik duyarlılığı yüksek modellerde de antikanser etkiler değerlendirilmiş; *Saccharomyces cerevisiae* modelinde BM'nin DNA tamir eksikliği olan hücrelerde seçici büyüme baskılayıcı etkiler oluşturduğu, vakuolar yapı bozulmalarına yol açarak hücre ölümünü hızlandırdığı gösterilmiştir (Huangteerakul ve ark., 2021).

Nanoteknoloji destekli kombinasyon tedavilerinde ise, altın nanopartiküllerle (AuNP) birlikte uygulanan BM bileşenlerinin, gemcitabin ile birlikte HT-29 kolon kanseri hücrelerinde apoptozu belirgin şekilde artırdığı gösterilmiştir (Genç ve ark., 2021). BM türevi Bacosine'in 4T1 metastatik meme kanseri hücrelerinde IC50 değerinin 21 μ M olduğu, MMP-9 ekspresyonunu baskıladığı ve doza bağlı sitotoksite oluşturduğu rapor edilmiştir (Mishra ve ark., 2019).

BM'nin sahip olduğu flavonoidler, triterpenoid saponinler ve fenolik bileşikler, yalnızca tümör mikroçevresine etkileriyle değil, aynı zamanda genotoksik strese karşı dayanıklılığı ile dikkat çekmektedir. EMS ve NaN₃ gibi mutajenlerle muamele edilen BM bitkilerinde, sekonder metabolit üretimi ve özellikle Bacoside A düzeylerinde artış gözlenmiştir (Mirza, 2020). Ayrıca BM'nin EMS kaynaklı DNA hasarını baskıladığı

ve insan lenfosit kültürlerinde sitogenotoksisiteyi azalttığı da rapor edilmiştir (Dogan ve Emsen, 2018).

2.6.1. *Bacopa monnieri* ve Kolorektal Kanserlerde Epigenetik Mekanizmalar

Son yıllarda özellikle DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik düzenleyicilerin, KRK gelişiminde merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir. CpG adacıklarının hipermetilasyonu sonucu tümör baskılayıcı genlerin susturulması, KRK'nin erken evrelerinde yaygın karşılaşılan bir durumdur. BM; içerdiği triterpen saponinler ile bu epigenetik düzenleyiciler üzerinde etki potansiyeli taşımaktadır. Özellikle bacopasaponin C'nin, RAD1 eksik *Saccharomyces cerevisiae* modellerinde sentetik öldürücü etki göstererek DNA onarım yetersizliklerinin taklit edildiği epigenetik ortamlarda antikanser etkinlik gösterdiği belirtilmiştir. Bu durum, BM'nin yalnızca proliferasyonu baskılamadığını ve aynı zamanda DNA onarım ve apoptozla ilişkili genlerde epigenetik yeniden düzenleme yapabileceğini de düşündürmektedir. KRK gibi yüksek metilasyon fenotipi gösteren kanserlerde BM'nin bu özelliği onun hem terapötik hem de önleyici potansiyelini artırmaktadır. Sonuçta BM'nin triterpen saponin içerikleri sayesinde DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaları etkileyerek kolorektal kanserin gelişiminde tümör baskılayıcı genlerin yeniden düzenlenmesine katkıda bulunabilecek doğal bir ajan olarak öne çıkması, onun epigenetik düzeyde antikanser etkiler gösterebilme potansiyelini vurgulayarak, özellikle bu tip kolorektal kanserlerde yeni tedavi yaklaşımlarına kapı aralamaktadır (Ghosh ve ark., 2021; Smith ve ark., 2018).

2.6.2. *Bacopa monnieri*'nin Antioksidan ve İmmunmodulatör Etkileri

BM, COX-2 inhibitörü etkisiyle bilinen, aynı zamanda antibakteriyel ve anti-inflamatuvar özelliklere sahip tıbbi bir bitkidir (Williams ve ark., 2014). *Klebsiella pneumoniae* ve *Proteus mirabilis* gibi patojenlere karşı etkinliği gösterilen BM'nin, oroxindin gibi bileşenleri idrar yolu enfeksiyonlarında potansiyel tedavi edici ajanlar arasında gösterilmiştir (Mehta ve ark., 2022).

BM'nin anti-inflamatuvar ve antioksidan özellikleri, KRK gibi inflamasyon temelli hastalıklarda da değerlendirilmiş; apoptoz indüksiyonu ve epigenetik düzenleyici etkileri sayesinde umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Kinslechner, 2011; Lemberger, 2010; Wadhonkar ve ark., 2023). Curcumin ve EGCG gibi fitokimyasallar yalnızca belirli moleküler yolları hedef alırken, BM'nin çok sayıda moleküler hedefi etkileyebilmesi, onu daha kapsamlı bir terapötik ajan haline getirmektedir.

BM'nin biyolojik aktivitesi, büyük oranda antioksidan ve immunmodülatör özelliklerine dayanmaktadır. Bitki ekstraktları, özellikle triterpenoid saponinleri sayesinde süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri ve lipid peroksidasyon ürünleri gibi ROS temizlenmesinde yoğun etkili olarak oksidatif stres düzeylerini düşürmektedir. 8-OHdG ve 4-HNE gibi oksidatif stres biyobelirteçleri üzerine yapılan çalışmalar, BM'nin bu belirteçlerde anlamlı düzeyde azalma sağladığını kanıtlamıştır. Diğer yandan, immun yanıtı şekillendirme yeteneği ile BM hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık üzerinde modulator etki göstermektedir. BM'nin TNF- α , IL-6 ve IL-10 gibi sitokinlerin seviyelerinde değişiklik oluşturabilmesi, inflamasyonla ilişkili kanser modellerinde immunmodülasyon yoluyla TMÇ'yi olumlu yönde değiştirme kapasitesini ortaya koymaktadır. Bu etkiler, BM'nin antioksidan özelliğine ek olarak aynı zamanda potansiyel bir immunoterapötik ajan olarak da değerlendirilmesini sağlamaktadır. Bu sonuçlar BM'nin antioksidan ve immunmodülatör özelliklerini göstermiş olup onu KRK gibi inflamatuvar kökenli malignitelerde çift yönlü terapötik bir ajan adayı haline getirmektedir (Ghosh ve ark., 2021; Mishra ve ark., 2019; Smith ve ark., 2018).

BM'nin antioksidan etkisini endojen antioksidan sistemleri destekleyerek serbest radikal oluşumunu baskılayarak ve özellikle SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak hücre içi oksidatif hasarı sınırlayarak göstermektedir. Bu etkilerin hem lipid peroksidasyonunun önlenmesine hem de hücresel bütünlüğün korunmasına katkı sağladığı bildirilmiştir. Aynı zamanda BM'nin immunmodülatuar etkiler taşıdığı ve inflamatuvar yanıtı düzenleyici potansiyel sunduğu da çeşitli preklinik çalışmalarda ortaya konmuştur (Ramawat ve Merillon, 2008). Bu çift yönlü etkinin özellikle TMÇ'de oksidatif stres ve immun

aktivitenin dengelenmesinde BM'yi değerli bir fitoterapötik ajan olarak öne çıkarmaktadır (Ramawat ve Merillon, 2008).

Sıçanlarda yapılan bazı çalışmalarda, %55-60 oranında bakosid içeren özütün SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi endojen antioksidan enzimlerin aktivitesini artırdığı ve bunun da oksidatif stres kaynaklı hasarı azalttığı belirtilmiştir. Alüminyumun neden olduğu nörotoksisiteye karşı koruyucu etki gösteren BM özütü, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu baskılayarak hücresel bütünlüğü korumuştur. Bunun yanında glutatyon düzeylerinde artış ve lipofuskin birikiminin azalması, antioksidan etkinliğin moleküler düzeydeki etkilerini de desteklemektedir (Emsen ve Dogan, 2018). Bu bulgular, bitkinin oksidatif stresle ilişkili patolojilerde tamamlayıcı tedavi ajanı olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (Ramawat ve Merillon, 2008).

2.7. Kolorektal Kanselerde İmmun Kaçış Mekanizmaları: MHC-1, PD-1/PD-L1 ve Terapötik Hedefler

KRK hücreleri, bağışıklık sisteminin denetiminden kaçabilmek için çeşitli immün kaçış mekanizmalarını uyandırmaktadır. Bu mekanizmalar üç ana başlıkta toplanır ise ilki tümör antijen sunumunun bozulması (özellikle MHC-I kaybı), bir diğeri immün kontrol noktası yollarının devreye girmesi (örneğin PD-1/PD-L1), ve sonuncu olarak da immunsupresif hücre popülasyonlarının baskın hale gelmesidir (Treg, MDSC ve M2 makrofajlar). Bu yollar, tümör hücrelerinin CD8⁺ sitotoksik T lenfositler veya doğal öldürücü hücreler tarafından tanınmasını ve elimine edilmesini önler ve bu şekilde de tümör progresyonunu kolaylaştırır. Tümörlerin saklanmak için kullandığı ilk ve en temel kaçış mekanizması, MHC sınıf I (MHC-I) moleküllerinin yüzey ekspresyonunun kaybıdır. Normalde MHC-I molekülleri, tümör hücrelerinde sentezlenen antijenleri hücre yüzeyine taşıyarak CD8⁺ T hücrelerine sunar fakat KRK hücrelerinde TAP1, TAP2, tapasin, β 2-mikroglobulin ya da ERAP1 gibi antijen sunumunda görevli proteinlerdeki genetik veya epigenetik bozukluklar, bu sürecin aksamasına neden olur. Bu durum, tümör hücrelerini bağışıklık sisteminde “görünmez” hâle getirerek immün gözetimin atlatılmasını sağlar (Garrido ve ark., 2016).

Tümörlerin immun sistemden kaçışında bir diğer bağışıklık kontrol noktası yolları üzerinden gelişen baskılayıcı sinyallerdir. Bu konuda en çok çalışılan eksen, programlanmış hücre ölümü reseptörü (PD-1) ve onun ligandı PD-L1'dir. Tümör hücreleri veya tümörle ilişkili bağışıklık hücreleri (ör. TAM'ler), PD-L1 ekspresyonunu artırarak T hücreleri üzerindeki PD-1 reseptörlerine bağlanır ve bu etkileşimin sonucunda T hücreleri "exhausted" yani işlevsel olarak tükenmiş hale gelir (Topalian ve ark., 2016). Bahsedilen bu tükenme etkisi özellikle mikrosatellit instabilitesi yüksek (MSI-H) kolorektal kanser alt tiplerinde daha belirgindir. Syn ve arkadaşları ise PD-1'in PD-L1'e bağlanmasının lenfositlerin etkili işlevini devre dışı bıraktığını ve bunun da T hücresi tükenmesi olarak bilinen bozulmuş bağışıklık aktivitesine neden olduğunu ifade ederek mekanizmayı immun sistem fonksiyonları üzerinden tanımlamaktadır (Syn ve ark., 2017).

Tüm bu bahsedilen mekanizmaların terapötik olarak hedeflenmesi, son yıllarda kanser immunoterapisinde temel oluşturmuştur. FDA tarafından onaylanan nivolumab ve pembrolizumab gibi PD-1 inhibitörleri, özellikle MSI-H KRK hastalarında aktif etkinlik göstermektedir. Ancak mikrosatellit stabil (MSS) tümörlerde bu ajanların etkisi sınırlı kalmaktadır ve bu nedenle PD-1/PD-L1 inhibitörlerinin kemoterapi, bevacizumab gibi etkili anti-angiogenik ajanlar veya CTLA-4 inhibitörleri ile kombinasyonu, MSS alt tiplerde immun cevabı yeniden canlandırma amacıyla güncel olarak araştırılmaktadır. PD-1/PD-L1 yolunun tıkanmasıyla, tümör hücrelerine karşı sitotoksik T hücrelerinin yeniden aktive olması kolaylaştırılabileceği bildirilmiştir. Bunun neticesinde; PD-1 ve PD-L1 inhibitörleri çeşitli solid tümörlerin tedavisi için FDA onayı almıştır (Sharma ve Allison, 2020).

2.8. Kolon Kanseri ve Tümör Mikroçevresi

TMÇ, stromal hücreler ve hücre dışı matriks bileşenlerinin karşılıklı etkileşimiyle şekillenen; yüksek hücre yoğunluğu, yoğun ECM yapısı ve artmış interstisyel basınç gibi karakteristik özellikler gösteren bir tümör içi mikro ortamdır. Bu yapı, kemoterapötik ajanların tümör hücrelerine penetrasyonunu ciddi ölçüde sınırlayarak ilaç direnci gelişimine neden olur. Tümör hücrelerinin salgıladığı sitokinler, fibroblast aktivasyonu, bağışıklık hücre göçü, stromal yeniden yapılanma

ve vaskülogenez gibi süreçleri tetikleyerek tümörün hayatta kalmasını sağlayan TMÇ'nin sürekliliğini destekler. TMÇ bu yönüyle pasif bir ortam değil, tümör biyolojisini şekillendiren aktif ve hedeflenebilir bir unsur olarak değerlendirilmelidir. KRK, yalnızca genetik mutasyonlarla değil, aynı zamanda çevresel faktörlerin etkisiyle gelişen çok aşamalı bir süreçtir. Son yıllarda, bu sürecin yalnızca tümör hücrelerinden ibaret olmadığı, aksine TMÇ'nin de kanser biyolojisinde merkezi bir rol oynadığı anlaşılmıştır. TMÇ; fibroblastlar, immun hücreler, endotel hücreleri, ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenleri ve çeşitli sitokinlerden oluşan kompleks ve dinamik bir yapıdır. Bu yapı, tümörün büyümesi, anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi süreçlerin düzenlenmesinde aktif rol oynar (Meyiah ve ark., 2025).

Özellikle IL-6, TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinler ile VEGF gibi anjiyojenik mediatörlerin, kolon kanserinde agresif tümör fenotiplerinin gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, tümörle etkileşen immun hücrelerin özellikle M2 fenotipine yönelmiş tümöre yardımcı makrofajların (TAM'lar) TMÇ'yi immun baskılayıcı bir ortama dönüştürerek immunoterapilere karşı direnç geliştirdiği de rapor edilmiştir. Dolayısıyla TMÇ, yalnızca tümör gelişimini etkileyen bir unsur değil, aynı zamanda terapötik hedefleme açısından stratejik bir bileşen olarak öne çıkmaktadır (Anderson ve Simon, 2020; Meyiah ve ark., 2025).

Son dönem araştırmalar, TMÇ'nin bileşimine intestinal mikrobiyotanın da dahil olduğunu göstermiştir. TMÇ, stromal ve bağışıklık hücrelerinin yanı sıra mikrobiyal ajanlar tarafından da şekillendirilir. *Fusobacterium nucleatum* gibi patojenlerin TMÇ üzerinde pro-inflamatuvar etkiler oluşturarak tümör progresyonunu hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu bakteriler, immun yanıtı baskılayarak tümör hücrelerinin immun tanınmadan kaçışını kolaylaştırmakta; *Bacteroides fragilis* tarafından salgılanan toksinler ise epitelyal DNA hasarını tetikleyerek kronik inflamasyonu artırmaktadır (Fusco ve ark., 2024). Bu bağlamda, mikrobiyal bileşenlerin hedeflenmesi, TMÇ modifikasyonunu amaçlayan yeni nesil anti-kanser stratejilerin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır (Meyiah ve ark., 2025).

Direnç mekanizmalarına karşı hedefe yönelik ilaç taşıma sistemleri, özellikle nanopartikül bazlı platformlar, etkili bir çözüm olarak değerlendirilmektedir.

Nanopartiküller, ilaçların fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek doku bariyerlerini aşmasını kolaylaştırmakta ve tümör bölgelerinde lokal ilaç konsantrasyonunu artırarak terapötik etkiyi güçlendirmektedir. Aynı zamanda, yan etkileri azaltmakta ve biyoyararlanımı artırarak tedavi güvenliğini iyileştirmektedir. Guo ve ark., (2022) çalışmasında, TMC'deki stromal hücreler ve infiltratif bağışıklık hücrelerinin KRK'de oluşturduğu kemoterapi direnç bariyerleri tartışılmış ve hedeflenmiş nanopartiküllerin bu engelleri aşma potansiyeli detaylı şekilde değerlendirilmiştir.

2.9. Tümör Mikro Çevresinin ve Bağırsak Mikrobiyotasının Kanserdeki Rolü

TMC, kolorektal kanserin ilerleyişi ve tedavi başarısını doğrudan etkileyen kritik bir yapıdır. Burlaka ve ark. (2019), iskemi süresinin uzamasıyla TMC'de oksidatif stres ve inflamasyonun arttığını; bunun da MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu ile hücre dışı matriksin yeniden yapılandırılmasını ve invazyonu desteklediğini bildirmiştir. Bu nedenle MMP'ler terapötik hedefler arasında önem kazanmıştır.

TMC'deki oksidatif stres, TGF- β , VEGF ve Wnt gibi sinyal yollarıyla etkileşerek tümör hücrelerinin proliferasyon, metastaz ve anjiyogenezini düzenler. Özellikle TGF- β yolundaki SMAD2/4 mutasyonları, immun baskılayıcı ortamın güçlenip metastatik potansiyelin artmasına katkı sağlar (Nur, 2022).

TMC; epitelyal, stromal ve immun hücreler ile damar yapıları arasında karmaşık etkileşimler barındırır. Stromal hücre proliferasyonu, sitokin dengesizliği ve immun baskılanma metastaz riskini artıran başlıca mekanizmalardır (Anderson ve Simon, 2020). Epigenetik değişiklikler de TMC'nin yapısını dinamik biçimde etkiler. Örneğin, CIMP-pozitif tümörler mikroçevresel baskılarla ilişkili olarak metastaz yapmadan daha sık görülmektedir (Lemberger, 2010).

İmmun sinyal yolları ve epigenetik etkiler TMC'yi daha karmaşık hale getirir. Huynh ve ark. (2013) CSF-1R sinyalinin kolonik inflamasyonda kritik olduğunu;

erkek farelerde CSF-1R haploinsufficiensinin kolonik hasarı azalttığını göstermiştir. Bu da immun yanıtın cinsiyet ve moleküler yollara bağlı farklılaştığını ortaya koyar.

TMÇ, mikrobiyal bileşenlerin etkisiyle de şekillenir. Kinslechner (2011), p53 eksik farelerde zengin mikrobiyota içeriğinin tümör oluşumunu hızlandırdığını ve DNA hasarını artırdığını raporlamıştır. Mikrobiyotanın TMÇ üzerindeki etkileri, eksozom kaynaklı miRNA'lar aracılığıyla makrofajların tümör destekleyici M2 fenotipe yönlendirilmesiyle daha da derinleşir (Wadhonkar ve ark., 2023).

Mikrobiyal disbiyozis TMÇ'de inflamasyon ve immunsupresyonu artırır. Fusco ve arkadaşları (2024), faydalı kısa zincirli yağ asidi (KZYA) üreten bakterilerin azalmasının, inflamatuvar bakteri artışının ve bağışıklık fonksiyonlarının bozulmasının tümör progresyonuna katkı sağladığını göstermiştir. Bu nedenle, mikrobiyota modülasyonu anti-inflamatuvar ve immun destekleyici tedavi yaklaşımlarında önem taşımaktadır.

TMÇ'de tümör hücrelerinin glikoz ve aminoasit tüketimi, CD8⁺ T hücreleriyle metabolik rekabet yaratarak onların fonksiyonunu azaltır. Ayrıca, laktat birikimi ile oluşan asidik ve hipoksik ortam, immun baskılanmaya ve T hücrelerinde tükenmişlik ile epigenetik değişikliklere neden olur (Kao ve ark., 2022).

NF-κB sinyal yolu, inflamasyon ve metabolik stresin merkezindedir. Malinin ve arkadaşları (1997) ROS üretiminin NF-κB'yi aktive ettiğini ve inflamatuvar yanıtları tetiklediğini göstermiştir. BM'nin bu yollar üzerindeki etkisi, TMÇ terapilerinde potansiyel hedef oluşturmaktadır (Malinin ve ark., 1997).

Genetik mutasyonlar da TMÇ dinamiklerini şekillendirir. APC, KRAS ve p53 mutasyonları hücre proliferasyonu, farklılaşma ve immun kaçışı etkileyerek tümör progresyonunu destekler (Nasrallah ve El-Sibai, 2014). Kansere ilişkili fibroblastlar (CAF'ler) ise TGF-β, PI3K/AKT/mTOR ve diğer sinyal yolları aracılığıyla stromal desteği artırır (Wu ve ark., 2021).

Apoptozun baskılanması, M2 makrofaj fenotipine dönüşümle bağlantılıdır. M2 makrofajlar tümörde anjiyogenez, immunsupresyon ve invazyonu desteklerken, BM'nin immun modülasyon yeteneği tedavi başarısını artırabilir (Church ve Casey, 2004). TMC'deki inflamatuvar sitokinler (IL-6, TNF- α) ve anjiyogenez, tümör progresyonuna katkıda bulunmaktadır (Heber, 1999). Antioksidanlar ve BM gibi doğal bileşikler bu süreçleri baskılayabilir. Anti-VEGF tedavileri (Bevacizumab) TMC'de çift yönlü etkilere sahiptir. Ancak sistemik hipertansiyon ve organ hasarına neden olabilen yan etkiler bildirilmiştir (Balci ve ark., 2019). Bu nedenle TMC'ye yönelik tedavilerde mikroçevresel heterojenitenin dikkate alınması gerekir (Hurwitz, 2012).

Nanopartikül temelli kombinasyon terapileri, TMC'de hücrel değişimleri hedefleyerek kanser gelişimini engellemeye yöneliktir (Genç ve ark., 2021). Hücrel senesens, TMC'de inflamasyon ve immun baskı oluşturur (Ergün, 2008). BM ise inflamasyon ve oksidatif stresi azaltarak TMC'yi olumlu yönde modüle edebilmektedir (Agarwal, 2013; Banerjee ve ark., 2021).

BM'nin stres yanıtlarını düzenlemesi, HSP70 seviyelerini düşürmesi ve antioksidan enzim aktivitelerini artırması TMC'de inflamasyonun azalmasına katkı sağlar (Chowdhuri ve ark., 2002). Ayrıca BM, hücrel savunmayı güçlendirerek oksidatif stres kaynaklı hücre hasarını engeller (Das ve ark., 2016).

Ülseratif kolitis modellerinde BM inflamasyonu azaltıp doku bütünlüğünü koruyarak tümör progresyonunu önleyebilir (Devi ve ark., 2023). Genotoksik risk taşımaması da BM'nin güvenliğini destekler (Emsen ve Doğan, 2018).

Epigenetik biyobelirteçlerin dışkı DNA'sından non-invaziv takibi TMC'deki değişimleri izlemeyi kolaylaştırır (Liu ve ark., 2024). AOM-DSS deneysel modelleri TMC inflamasyon, anjiyogenez ve stromal yeniden yapılanmayı göstererek BM'nin etkilerinin değerlendirilmesine olanak tanır.

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) translasyonel modelleri, TMC immun modülasyonunun klinik önemi hakkında bilgi verir (Cerquetella ve ark., 2010). Çoklu

patojenlerin sinerjik etkileri TMC'nin karmaşıklığını artırır (Cuvertoret-Sanz ve ark., 2019).

2.10. Kolorektal Kanselerde Mevcut Tedavi Seçenekleri ve Sınırlamaları

KRK tedavisinde cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, radyoterapi ve hedefe yönelik tedaviler bir arada kullanılmaktadır. Erken evre hastalarda cerrahi genellikle küratif olurken, ileri evrelerde 5-FU, oksaliptatin ve irinotekan içeren sistemik kemoterapi temel tedavi yöntemidir. Son dönemde EGFR inhibitörleri (cetuximab, panitumumab) ve VEGF hedefli ajanlar (bevacizumab) tedaviye eklenmiştir. Ancak moleküler heterojenite, direnç gelişimi ve sadece belirli hasta gruplarının yanıt vermesi bu tedavilerin etkinliğini sınırlamaktadır. Ayrıca kemoterapötiklerin yol açtığı mukozit, nötropeni ve periferik nöropati gibi sistemik yan etkiler, hasta yaşam kalitesini olumsuz etkiler. Bu sebeple, daha hedeflenmiş, yan etkisi düşük ve TMC ile etkileşim potansiyeli olan doğal bileşiklere ihtiyaç duyulmaktadır. *Passiflora edulis* gibi doğal ürünlerin anti-inflamatuvar ve mikroçevre düzenleyici özelliklerinin araştırılması bu bağlamda önemlidir (Fadlallah ve ark., 2024).

Günümüzde KRK tedavisi, cerrahi (özellikle total mezokolik eksizyon-TME), kemoterapi ve hedefe yönelik ajanların kombine kullanımıyla yürütülür. Cerrahi sonrası fekal kontinans kaybı, üriner disfonksiyon ve yaşam kalitesi azalması gibi komplikasyonlar sık görülürken, minimal invaziv teknikler morbiditeyi azaltır ancak ileri evrelerde sınırlı uygulanabilir. Kemoterapiye direnç gelişimi ve hedefe yönelik tedavilerin yüksek maliyeti, tedavi yönetiminde zorluklar yaratır (Anderson ve Simon, 2020; Fadlallah ve ark., 2024).

Kronik inflamasyonu hedefleyen doğal bileşiklerden *Passiflora edulis*, TMC düzenleyici moleküler mekanizmalar sunabilir. Kronik inflamasyon, KRK'nin başlangıç ve progresyonunda temel rol oynar. Mevcut kemoterapötik ajanlar inflamasyonu hedeflerken, yan etkileri nedeniyle alternatif doğal yaklaşımlara ilgi artmaktadır. *Passiflora edulis*'in polifenol zengini özütleri, inflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılayarak TMC'de COX-2 ve iNOS gibi inflamasyonla ilişkili hedefleri inhibe eder (He ve ark., 2020).

2.11. Fare Modelleri Üzerindeki Çalışmalar

AOM-DSS modeli, inflamasyon ve kanser ilişkisini araştırmak için ideal bir platform sağlamaktadır. AOM-DSS kombinasyonu, KRK araştırmalarında yaygın kullanılan bir kimyasal indüksiyon modelidir. Boopathy ve ark., (Boopathy ve ark., 2024) derlemesine göre AOM, DNA alkilasyonu yoluyla mutasyonları tetiklerken DSS, kolon mukozasında inflamasyon oluşturarak TMÇ’de malign transformasyonu hızlandırmaktadır. Bu kombinasyon, inflamasyon destekli tümör gelişimini etkili şekilde modellemekte ve immun yanıtların, oksidatif stresin ve apoptotik süreçlerin analizi için uygun bir temel sağlamaktadır.

2.12. KRK Oluşturulması ve AOM/DSS Kimyasallarının Uygulanması

Kolitise bağlı KRK araştırmalarında yaygın olarak kullanılan AOM-DSS modeli, inflamasyon kaynaklı tümör gelişimini deneysel olarak taklit etmek için güçlü ve esnek bir araçtır. Bu modelde, DNA metilasyonu yoluyla mutasyon indükleyen karsinogen Azoksimetan (AOM) ile bağırsak epitel hasarı ve kronik inflamasyon tetikleyicisi Dextran Sülfat Sodyum (DSS) farelere uygulanır. Genel protokolde, farelere intraperitoneal olarak 10-12 mg/kg AOM tek doz enjekte edilmekte, ardından DSS içeren (%2-2.5) içme suyu verilerek inflamasyon döngüleri başlatılmaktadır (Thaker ve ark., 2012; Mittal ve ark., 2015; Parang ve ark., 2016).

AOM, kolon mukozasında KRAS ve β -catenin gibi onkogenlerde DNA alkilasyonu yoluyla genetik mutasyonlara neden olurken, DSS epitel bariyerinin bozulmasına bağlı lokal inflamasyonu tetikleyerek tümör gelişimini hızlandırır. Bu çift etkili yaklaşım, insanlarda inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) ilişkili KRK patogenezi yüksek oranda taklit eder ve modelde 10-12 hafta içinde distal kolonda displastik ve invaziv adenokarsinom benzeri tümörler gelişir (Parang ve ark., 2016; Robertis ve ark., 2011).

Literatür analizlerinde, AOM-DSS modelinin inflamasyonla ilişkili KRK’da moleküler ve histopatolojik özelliklerini başarılı şekilde yansıttığı, düşük maliyetli, kolay uygulanabilir ve yüksek tekrarlanabilirlikte olduğu belirtilmiştir. Ancak

protokol parametreleri (AOM dozu, DSS konsantrasyonu ve süresi) laboratuvarlar arasında farklılık gösterebilmekte ve bu durum sonuçların karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, modelin klinik translasyonunu güçlendirmek için dozaj standartizasyonu ve ek olarak genetik mühendislik ya da transgenik fare modelleri önerilmektedir (Dzhalilova ve ark., 2023).

AOM-DSS modeli, TMÇ immun hücre kompozisyonu ve inflamasyon dinamiklerini incelemek için ideal bir sistem sunar. Bu açıdan, immunmodülatör ve anti-inflamatuvar potansiyele sahip doğal bileşiklerin (örneğin *Bacopa monnieri*) prelinik değerlendirmesinde translasyonel bir köprü işlevi görür (Clapper ve ark., 2007; Erdman ve ark., 2009).

2.13. Farelerde AOM/DSS ile KRK Oluşturulması, Uygulama Süreci ve Zamanlaması

Birçok çalışmada AOM ve DSS kullanılarak farelerde KRK modeli oluşturulmuştur. Protokolde, farelere önce intraperitoneal olarak AOM enjekte edilir ve 7. günden itibaren DSS içeren içme suyu üç döngü halinde verilerek kronik inflamasyon tetiklenir. Bu tekrarlayan inflamasyon döngüleri, kolitis kaynaklı tümör gelişimini destekleyen uygun bir ortam sağlar (Thaker ve ark., 2012; Mittal ve ark., 2015).

Modelde, tümörler özellikle distal kolonda yoğunlaşmakta olup histopatolojik incelemeler, gelişen tümörlerin insan kolon adenokarsinomuna benzer displastik değişiklikler gösterdiğini ortaya koymaktadır. DSS döngülerinin tekrar edilmesi inflamasyonun kanser gelişimindeki rolünü daha belirgin kılarken, AOM'un DNA metilasyonu yoluyla indüklediği genetik hasar tümör oluşumuna zemin hazırlar (Parang ve ark., 2016).

AOM-DSS modelinin sunduğu bu metodolojik esneklik, dozaj, DSS konsantrasyonu ve zamanlama gibi parametrelerin optimize edilmesine olanak tanır; böylece inflamasyon ve kanser etkileşimi daha etkili şekilde incelenebilir. Örneğin, bazı çalışmalarda 12 mg/kg AOM IP enjeksiyonu ardından %3 DSS içeren suyun 25-

30 ve 45-50. günlerde uygulanması ile tümör gelişimi hızlandırılmıştır (Parang ve ark., 2016).

2.14. Immunohistokimya markırları ve seçim gerekçeleri

Bu çalışmada immunohistokimyasal olarak vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit endotel hücre yapışma molekülü ve damar markırı CD31, apoptoz belirteci kaspase-3, endojen oksidatif DNA hasarının etkisini ölçmek ve karsinogenezisin başlatılmasını değerlendirmek için 8-OHdG ve oksidatif stresi değerlendirmek için 4-hidroksinonenal (4-HNE) seçilmiştir. Kaspaz-3, apoptozun hücresel düzeydeki yürütücü kaskadında yer alır ve hücre ölümünün morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini yöneten temel bir efektör enzimdir. Aktif forma dönüşmüş kaspaz-3 varlığı, apoptotik sürecin geri döndürülemez fazını temsil ederek bu yönüyle tümör dokularındaki apoptotik aktivitenin objektif bir göstergesi olarak değerlendirilir. VEGF ve CD31 ise anjiyogenezin moleküler ve yapısal boyutlarını ortaya koymak amacıyla birlikte değerlendirilir. VEGF, hipoksiye yanıtta eksprese edilen pro-anjiyogenik bir büyüme faktörüdür ve tümörlerin vasküler adaptasyon mekanizmasını başlatan başlıca etkindir. CD31 ise endotel hücrelerine özgü bir adezyon molekülüdür, mikrovasküler yoğunluğun sıcak nokta bölgelerinde sayılmasını sağlayan kantitatif bir göstergedir (Cameron, 2011; Hurwitz, 2012).

Oksidatif stresin dokudaki izlenimi için seçilen 8-OHdG ve 4-HNE belirteçleri, sırasıyla DNA hasarını ve lipid peroksidasyonunu yansıtan iki tamamlayıcı biyomoleküldür. 8-OHdG, oksidatif DNA hasarının en yaygın göstergesi olarak, serbest radikal aktivitesinin genetik düzeydeki etkilerini ortaya koyarken; 4-HNE, lipid peroksidasyonu sonrası oluşan toksik aldehit yapısıyla hücresel proteinleri ve membran bütünlüğünü hedefleyerek tümör mikroçevresinde kalıcı yapısal değişimlere yol açar (Das ve ark., 2016; Banerjee ve ark., 2021). Bu belirteçler aynı zamanda epigenetik değişimlerle ve bağışıklık sistemi aktivitesiyle etkileşimde bulunur ve TMÇ'nin immun-metabolik düzenlemesinde önemli bir rol oynar (Lemberger, 2010; Wu ve ark., 2021).

İmmunohistokimyasal yöntemlerin tercih edilmesi, hem protein düzeyindeki ekspresyonun doku bağlamında lokalizasyonunu sağlayarak hedef biyobelirteçlerin TMÇ'deki dağılımını görselleştirmekte, hem de elde edilen verilerin morfolojik analizle bütünleştirilmesine olanak sağlamaktadır. Kaspaz-3, VEGF, CD31, 8-OHdG ve 4-HNE belirteçleri ile yapılan boyamalar, BM'nin terapötik potansiyelinin çok yönlü olarak değerlendirilebilmesine imkân tanıyarak TMÇ'deki yapısal ve işlevsel değişikliklerin moleküler düzeyde gösterilmesini mümkün kılmak için seçilmiştir. Literatürde sıklıkla kullanılan bu panel, tümör dokusunun biyolojik davranışlarını değerlendirmek adına uygun bir çerçeve sunarak çalışmanın bilimsel güvenilirliğini artırmaktadır (Kasai, 1997; Agarwal, 2013; Tepebaşı ve ark., 2023).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Dizaynı

Bu çalışma, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 116. toplantısında, 25.10.2023 tarihli ve 1199 sayılı kararı doğrultusunda yürütülmüştür. Bu çalışmada, 6-8 haftalık, Balb/c cinsi erkek fareler kullanılmıştır.

Örneklem sayısını belirlemek için G-power programından faydalanılmıştır. G-power 3.1.9.4 programıyla yapılan analiz sonucunda %95 ve üzeri güç elde etmek için toplamda en az 36 hayvan gerekmekte olduğu görülmüştür. Çalışmada kanser modeline yönelik uygulanacak ilaçlara bağlı ölümlerin şekillenme olasılığından dolayı her bir grup için 10 hayvan, toplamda ise 60 hayvan kullanılmıştır ve bu sayede çalışmanın bu anlamda yüksek etki gücüne ve istatistik öneme sahip olması amaçlanmıştır.

Çalışmada 60 adet 8-12 haftalık konvansiyonel tip Balb/c fare kullanılarak gruplara ayrılmıştır. Bu fareler, kullanılacak AOM'un toksik etki gösterip göstermediğini gözlemek ve deney sonunda kanser gelişiminin olup olmadığının kontrolü amacıyla çalışmaya dâhil edilmiştir. Farelerde, 1mg/ml'lik AOM solüsyonu ve %3'lük dekstran sodyum sülfat kullanılarak ortalama 65 günde KKK oluşturulmuştur. Ardından son DSS siklusunun bitiş süresi olan 50. günden itibaren bazı gruplardaki farelere 15 gün boyunca 0.5 ve 2 mg (hayvan başına) olmak üzere farklı dozlarda *Bacopa monnieri* oral gavaj yoluyla verilmiştir. Ardından hayvanlar 66. günde sakrifiye edilmiştir.

Çalışma sırasında ve sonrasında hayvanların takibi şu şekilde gerçekleştirilmiştir; fareler, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü olan, sıcaklık kontrollü ve nem kontrollü (22±2 °C sıcaklık, %55±10 nem) ortamda tutulmuş ve standart pelet yem ile suya ad libitum erişim sağlanmıştır. Tüm fareler deney süresince patojenden arındırılmış bir ortamda barındırılmıştır. İçme suyu günlük olarak taze olarak sunulmuş ve yem tüketimi her gün kontrol edilmiştir. Yem kapları ve su şişeleri

düzenli olarak temizlenmiş ve hijyenik koşulların sağlandığından emin olunmuştur. Fareler, genel sağlık, vücut ağırlığı ve anormal davranış veya rahatsızlık belirtileri açısından da günlük olarak incelenmiştir. Hastalık belirtileri, toksisite, letarji, zayıflık, kilo kaybı ve dehidrasyon açısından izlenmiştir. Bunun yanında dışkı, idrar, deri, tüyler, gözler ve solunum gibi fiziksel belirtilerin kontrolü sağlanmıştır. Anormal dışkı (örneğin, kanlı veya sulu dışkı), idrar renginde değişiklik, deri ve tüylerde yıpranma, gözlerde akıntı veya şişme ve hızlı veya zorlu solunum vb. açısından sürekli izlenmiştir. Herhangi bir fare ağır hastalık belirtileri gösterirse veya başlangıç vücut ağırlığının %20'sinden fazla kilo kaybı yaşadığında, acı çekmelerini en aza indirmek için insani yöntemlerle ötenazi uygulanması açısından kontrol edilmiştir.

Deneyisel uygulama protokolünün tamamlanmasının akabinde etik ilkeler doğrultusunda tüm hayvanlar değerlendirilmiş ve belirlenen son gün olan 66. günde deney ksilazin-ketamin anestezisi altında sonlandırılmıştır. Nekropsi öncesi tüm farelerin intrakardiyak kan örnekleri etilen diamin tetra asetikasitli (EDTA) tüplere alınmıştır. Hemen akabinde kan sayımları yapılmıştır. Hayvan refahı gözetilerek insancıl ötenazi prosedürleri uygulanmıştır ve deneyin tüm aşamalarında gözlemlenen fizyolojik değişimler ve olası toksik etkiler sistematik olarak kayıt altına alınmıştır. Bu süreçteki amaç hem çalışma güvenliğini sağlamak hem de biyolojik örneklerin analiz için zamanında ve uygun koşullarda alınmasını temin etmek olmuştur. Deneyin sonlanmasıyla birlikte doku örnekleme, tümör ölçümü ve ileri analizlere yönelik işlemler yapılmıştır.

Kolorektal kanserin inflamasyonla ilişkili patogenezi ve *Bacopa monnieri*'nin potansiyel terapötik etkilerinin değerlendirmesi için, bu tez çalışmasında AOM/DSS protokolüne dayalı bir fare modeli tasarlanmıştır. Bu çalışmada, kolorektal kanserin deneysel olarak oluşturulması ve BM'nin tümör mikroçevresi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla, konvansiyonel tip Balb/c erkek fareler kullanılmıştır. Deneyisel model, Parang ve arkadaşları (Parang ve ark., 2016) tarafından geliştirilen AOM/DSS protokolüne dayandırılarak, KRK oluşumunun indüklenmesi sağlanmıştır. Tümör gelişiminin ardından BM'nin oral yolla uygulanması planlanmış ve farklı doz grupları belirlenerek 15 gün süreyle uygulama gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca hayvanların ağırlık değişimleri kaydedilmiştir. Deney sonunda ötenazi uygulanan

hayvanlardan elde edilen kolon dokuları, makroskopik, histopatolojik ve immunohistokimyasal analizlerin incelenmesi için toplanmıştır. Ayrıca deney grupları, dozlamalar, immunohistokimyasal belirteçlerin seçimi (VEGF, CD31, kaspaz-3, 8-OHdG, 4-HNE) ve istatistiksel analizler, literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırmalı şekilde yapılandırılmıştır (Parang ve ark., 2016; Aytaç, 2020).

KRK'nın deneysel olarak modellenmesi amacıyla geliştirilen hayvan modellerinin hastalığın etiopatogenezi, ilerleyişi ve potansiyel tedavi yaklaşımlarının değerlendirilmesi açısından kritik bir öneme sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, insan KRK'larını patofizyolojik açıdan yakından taklit eden ve inflamasyon ilişkili tümör gelişimini modelleyebilen AOM/DSS (azoksimetan/dextran sülfat sodyum) modeli kullanılmıştır. AOM, DNA metilasyonu yoluyla mutasyonlara neden olan bir prokarsinojendir ve tek başına uygulandığında tümör oluşumu için uzun süre gerektirir. Bu nedenle DSS ile birlikte kullanıldığında, kolon mukozasında inflamasyon oluşturularak karsinogenez süreci hızlandırılır ve invaziv adenokarsinom benzeri lezyonların daha kısa sürede oluşması sağlanır. Bu kombinasyonun sağladığı avantaj, tümör mikroçevresinde oluşan yangısal yanıtların ve bağışıklık sisteminin tümör gelişimine etkilerinin de eşzamanlı olarak değerlendirilebilmesine imkân tanınmasıdır ve bu model, BM gibi potansiyel terapötik ajanların tümör hücreleri ve TMC üzerindeki etkilerini değerlendirmek için uygun bir platform oluşturur.

Bilimsel dayanaklar doğrultusunda, çalışmamızda kullanılan KRK modeli Parang ve arkadaşları tarafından geliştirilen zamanlama ve doz şemasına göre oluşturulmuştur. Tek başına AOM veya tek başına DSS kullanımı optimal sürede KRK oluşumunu indüklememektedir. Bir başka çalışmada modelin ilk metodolojisi verilmiştir. Bu çalışmada deneklerde tek AOM uygulamasından sonra 3 kez %3'lük DSS verilmesi denenmiş, diğer gruplarda oluşan patolojilere karşın AOM uygulamasından sonra 3 kez DSS verilen grupta kolonun çeşitli bölümlerinde tümör oluşumları gözlenmiştir. Tanaka ve ark., yaptıkları çalışmada tek doz AOM uygulamasından sonra 1 haftalık süre DSS kullanımının etkileri araştırılmıştır (Tanaka ve ark., 2003; Parang ve ark., 2016). Bu çalışmada ise AOM/DSS KRK modeline göre gün 1 mg/ml PBS ile sulandırılmış AOM enjeksiyonu (12 mg/kg) tek doz intraperitoneal olarak yapılmış, 3. günde içme suyu %3'lük DSS'li suyla değiştirilmiş

ve 8. gün normal suya dönmüştür. İlk iyileşme periyodu 9-12. günler arasında gerçekleşmiştir. 13-24. günlerde hayvanların kiloları ölçülmüş ve 25. günde ikinci DSS döngüsü başlamıştır. 30. gün normal suya dönmüş ve ikinci iyileşme periyodu 30-44. günlerde gerçekleşmiştir. 45. günde üçüncü DSS siklusu başlamış ve 50. gün normal suya dönmüştür. 51-65. günlerde ise son iyileşme periyodu başlamış ve 66. günde hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

Bu çalışmada KRK oluşturmak için kullanılan AOM/DSS protokolünün her siklusunda doz ve süre hesaplamaları ayrıntılı biçimde yapılmış ve uygulanan DSS miktarları bireysel su tüketimi baz alınarak hayvanlara uyarlanmıştır. Farelerin vücut ağırlıkları haftalık izlenmiş, ölüm ve davranış değişiklikleri günlük takip edilerek dikkatle kaydedilmiştir. DSS uygulamalarında ilk siklus %1,5, sonraki sikluslar %2 konsantrasyonda verilmiş ve bunun sayesinde kolon epiteline kronik inflamasyon yoluyla stabil tümör formasyonu sağlanmıştır. Bu protokol, insanlarda gözlenen kronik inflamatuvar kolitise benzer özellikler gösterdiği için translasyonel açıdan da uygun ve geçerlidir. Bu çalışmada, AOM/DSS modeli ile oluşturulan KRK protokolünde kullanılan doz ve sikluslar hem hayvan refahı hem de tümör oluşumunun kronikleşmesi açısından optimize edilmiştir ve DSS oranları, ilk siklusta %1,5, sonraki sikluslarda %2 olarak belirlenmiş ve tüm sikluslar arasında 2 hafta iyileşme periyodu bırakılmıştır. Bu düzenleme sayesinde kolon mukozasında kronik inflamasyon oluşturularak insanlarda gözlenen kolitis ile ilişkili KRK patogeneze benzer bir fenotip yaratmak hedeflenmiştir. Deneyin tüm süreci ve uygulanan işlemler deney akış tablosunda gösterilmiştir.

BM'nin doz belirleme sürecinde, daha önce gerçekleştirilen hayvan çalışmaları önemli bir referans noktası olarak yer almıştır. Özellikle Vishnoi ve Agarwal'ın yaptığı bir deneyde, DMBA (7,12-dimetilbenz(a)antrasen) ile indüklenen deri papillomagenezi modelinde BM hidrometanolik ekstresi 120 mg/kg ve 240 mg/kg dozlarında topikal olarak uygulanmış ve tümör insidansı ile tümör sayısında anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Agarwal, 2013).

Bu veriler doğrultusunda bu çalışmada BM'nin KRK modeli üzerinde potansiyel etkilerini değerlendirmek amaçlanarak literatürde raporlanan dozlar ile

insan eşdeğer doz dönüşüm formülleri birlikte göz önünde bulundurulmuştur. İnsanlarda BM'nin yetişkin bir kişide günlük 300-450 mg uygulaması önerilmektedir. Bu da dönüşüm formülüne göre farelerdeki dozu 0,5 mg'a denk gelir. İnsan eşdeğer dozunun (İED) fare dozuna dönüşüm formülü olarak daha önce bildirilen formülasyondan yararlanılmıştır: $\text{İED (mg/kg)} = \text{Fare dozu (mg/kg)} \times (\text{Fare ağırlığı [kg]})^{(1-0.67)}$ (Vücut yüzey düzeltme faktörü 0.67 olarak kabul edilmiştir). Bu formülasyonlardan yola çıkılarak hesaplamalar yapılmış, çalışmada 0,5 mg/kg dozun yanı sıra ek olarak 2 mg/kg (Chatterjee ve ark., 2010) hayvan başına, 2 farklı grup olarak çalışılması planlanmıştır.

Çalışmada BM uygulaması, deney hayvanlarının fizyolojik davranışlarını korumak ve farmakolojik etkinliği sağlamak amacıyla içme suyu yoluyla gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta hayvanlar 6'lı ve 10'lu gruplar halinde barındırılmış, ancak deney sürecinde bazı gruplarda gözlenen aşırı agresyon ve ölümcül yaralanmalar nedeniyle grup düzenlemelerinde sonradan değişiklik yapılmıştır. Hayvanların refahını sağlamak, deneysel kayıpları azaltmak ve stres faktörünü minimize etmek amacıyla bazı hayvanlar tekli veya üçlü gruplar halinde yeniden organize edilmiştir. Grup değişiklikleri, deney bütünlüğünü ve bilimsel geçerliliği korumak amacıyla kontrollü şekilde gerçekleştirilmiştir. İçme suyu aracılığıyla uygulama hem doğal alım davranışını desteklemiş hem de sistemik dolaşıma geçişin fizyolojik koşullarda gerçekleşmesini sağlamıştır.

Çalışmada seçilen BM dozları (0,5 mg/kg ve 2 mg/kg), literatürde bildirilen insan eşdeğer dozları ve deneysel güvenlik sınırları dikkate alınarak belirlenmiştir. Bu iki doz hem etkili doz aralığında kalmak hem de potansiyel toksik etkilerden kaçınmak için yeterli olarak değerlendirilmiştir. BM uygulamasının altı haftalık uzun süreli protokole göre uygulanması, doz yanıt ilişkisini daha güvenli ve anlamlı bir biçimde incelemeyi mümkün kılmıştır. Bu güvenlik profili, BM'nin toksik olmadığını gösteren deneysel gözlemlerle de desteklenmiştir. AOM-DSS Modeli ile kanser oluşturup oluşturulmamasına ve verilen BM dozajlarına göre belirlenmiş hayvan grupları tablosu, kronolojik deney akış tablosu ve DSS verilisine dair çizelge sunulmuştur (Tablo 3.1 ve Tablo 3.2).

Tablo 3.1. Çalışma grupları ve uygulanan işlemler.

Gruplar	Uygulanan İşlem
1. Grup	Kontrol grubu hiçbir işlem yapılmadı çalışma sonunda ötenazi edilerek örnekler toplandı.
2. Grup	Kanser kontrol grubu, AOM DSS verildi BM uygulanmadı
3. Grup	Kanser indüklenen ve 0,5mg/kg BM verilen grup
4. Grup	Kanser indüklenen ve 2 mg/kg BM ile tedavi edilen grup
5. Grup	Kanser indüklenmeyen 0,5 mg/kg BM uygulanan grup
6. Grup	Kanser indüklenmeyen 2 mg /kg BM uygulanan grup

Tablo 3.2. Deney Akış Tablosu.

Aşama	Süreç Başlığı	Tarih/Zam anlama	Açıklama
1	Hazırlık Aşaması	Eylül-Şubat 2025	Deney planı oluşturularak gruplar belirlendi (Balb/c) farelerin kuyruk boyamaları yapıldı ve kafesler düzenlendi.
2	AOM Uygulaması ve Bacopa Başlangıcı	Eylül 2024 ve Şubat 2025	AOM (10 mg/kg) IP uygulandı (2 doz + 1 destek dozu). BM (0.5–2 mg/kg) uygulamaları başlatıldı.
3	Takip ve Ön Gözlem Dönemi	Şubat 2025	Günlük tartım, ölüm/agresyon kaydı, grup içi transferler yapıldı.
4	DSS Siklusları (Kolitisi)	Şubat, Mart, Nisan, Mayıs 2025	3 siklus: DSS (%1,5–%2) suda uygulandı. 2 günde bir değişim yapıldı ve su ve yem tüketimleri takip edildi.
5	Gözlemsel Kayıtlar	Süreç boyunca devam etti	Günlük sağlık durumu kontrol edilerek yem ve su takibi düzenli yapıldı bu esnada hayvanların altlık değişimi yapılarak haftalık gram cinsinden tartımlar yapıldı.
6	Deneyin Sonlandırması ve Nekropsiler	Mayıs 2025	Siklus sonrası takip eden haftalarda Bacopalar verildi, daha sonraki süreçte nekropsi yapıldı. Dokular alınarak kasetleme ve lam hazırlığı başlatıldı.

3.2. Hemogram Analizi

Nekropsi öncesi tüm farelerin intrakardiyak kan örnekleri etilen diamin tetraasetikasitli (EDTA) tüplere alındı. Hiç zaman geçirmeden kan sayımları yapıldı.

3.3. Histopatolojik Yöntem

Nekropsi sırasında tüm farelerin kolonları dikkatlice alındı ve lümenleri açılarak makroskopik olarak incelendi ve tek tek fotoğraflandı. Mukozasına formaldehid dökülerek birkaç dakika beklendi ve sertleşmesi sağlandı. Bu işlemin ardından sertelip düzleşen tüm kolon örnekleri %10 tamponlu nötr formaldehit solüsyonuna alınarak tespit işlemine başlandı. Örnekler iki gün süre ile bu solüsyonda bekletildi ve her gün solüsyon yenilendi. İki günün sonunda kolon örnekleri tekrar dikkatlice incelendi ve lezyonlu olan örneklerde lezyonlu bölgelerden lezyonsuz olanlarda ise distal kolol bölgelerinden trimlemeler yapıp doku takip kasetlerine alındı. Bu aşamada her bir kasete hayvan numarası ve gruplar dikkatlice not edildi.

Tüm kasetler, doku takibine başlayana kadar tekrar formaldehit solüsyonuna alındı. Trimlemenin yapıldığı günün akşamında örnekler tam otomatik kapalı sistem doku takip cihazına (Leica ASP300S; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) alınarak doku rutin doku takip aşamasına alındı. Cihaz vakumlu programa ayarlanarak solüsyonların tüm hücrelere en iyi şekilde penetre olması sağlandı.

Doku takibi aşamasında tüm örnekler, öncelikle %70'likten başlayarak, dereceleri artan etanol serilerinden geçirilerek %100'lük etanole geçirilerek dokuda bulunan suların uzaklaştırılması sağlandı. Bu aşamanın ardından, iki seri ksilolden geçirilerek yağın temizlenmesi gerçekleştirildi. Son aşamada ise sıcak parafin infiltrasyonu ile doku boşlukları doldurularak, yapının korunması sağlandı.

Ertesi sabah, işlemi tamamlanan kasetler doku gömme cihazının (Leica Histocore Arcadia H, Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) sıcak ünitesine aktarıldı. Eritilmiş parafin ile metal kalıplara yerleştirilen dokular, düzgün pozisyonda sabitlenerek bloklama işlemi yapıldı. Bu bloklar daha sonra cihazın soğuk tablasına alınarak yaklaşık 2 saat boyunca soğutulularak parafinin donması ve sertleşmesi sağlandı.

Donmuş bloklar kalıplarından ayrıldı ve +4°C'de buzdolabında saklandı. Kesit alma işleminden önce bloklar soğuk tabla üzerine alınarak yaklaşık 2 saat bekletildi.

Ardından hem histopatolojik hem de immunohistokimyasal incelemeler için tam otomatik rotary mikrotom (Leica 2155, Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) ile 5 µm kalınlığında seri kesitler hazırlandı. Kesitlerin bir bölümü normal lamlara alınarak hematoksilen-eozin (HE) boyama için, diğerleri ise polilizinli lamlara alınarak immunohistokimyasal analizler için ayrıldı. Tüm kesitler oda sıcaklığında bir gece kurutularak lamlara yapışmaları sağlandı.

Ertesi gün, normal lamlara alınan HE kesitleri boyama işlemine alınmadan önce 60°C’de ısıtılmış etüvde yaklaşık 1,5 saat bekletildi. Parafin kalıntılarının temizlenmesi amacıyla kesitler sırasıyla üç ayrı ksilol serisinden geçirildi. Deparafinizasyon sonrası, kesitler %100, 96, 90, 80 ve 70’lik etanol serileri ile dereceli olarak rehidre edildi. Ardından 15 dakika Harris hematoksilen ve 3 dakika eozin ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyanan kesitler tekrar %70’ten başlayarak %100’e kadar artan alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi, ardından ksilol ile şeffaflaştırıldı. Son olarak üzerine entellan damlatılıp lamel kapatılarak boyama işlemi tamamlandı.

Boyanmış preparatlar bir gün boyunca kurumaya bırakıldıktan sonra mikroskop altında incelemeye hazır hale geldi. Tüm kesitler, ışık mikroskobu ile lezyon bölgelerindeki histopatolojik değişiklikler açısından değerlendirildi. Uygun görülen alanlar trinoküler mikroskop ve dijital görüntüleme sistemleri kullanılarak fotoğraflandı ve bilgisayar ortamına aktarıldı. Histopatolojik lezyon skorlamaları Tablo 3.3’deki kriterlere göre yapıldı (Remke ve ark., 2024).

Tablo 3.3. Histopatolojik bulguların tanımı ve skorları (Remke ve ark., 2024).

Skor	Lezyon Tipi	Tanım
1	Hiperplazi	Mukozada kalınlaşma, bazal hücrelerde sınırlı mitoz, atipi yok.
2	Düşük dereceli displazi	Çekirdeklerde uzama, hiperkromazi, mitotik aktivitede artış, mütinaz azalma.

3	İntraepitelyal karsinom	Dallanma, belirgin sitolojik atipi, belirgin çekirdekçikler, artmış mitotik aktivite, yer yer nekrotik alanlar
4	İnvaziv adenokarsinom	Neoplastik hücrelerin lamina muskularisi geçerek invazyon yapması, desmoplastik stroma

3.4. İmmunohistokimya Yöntemi

Bu çalışmada immunoperoksidaz boyama için streptavidin-biotin kompleks peroksidaz yöntemi uygulanmıştır. İmmunohistokimyasal analizler kapsamında doku örnekleri; CD-31, VEGF, 4HNE, 8OHdG ve Kaspaz-3 primer antikorları kullanılarak boyanmıştır.

Bu tez çalışmasında, KRK'in TMC'sine yönelik değerlendirmede üç temel patobiyolojik sürece odaklanılmıştır: apoptoz, anjiyogenez ve oksidatif stres incelenmiştir. Bu süreçlerin hücrel ve moleküler düzeyde ortaya konulabilmesi için immunohistokimyasal olarak kaspaz-3, VEGF, CD31, 8-OHdG ve 4-HNE belirteçlerinin analizi seçilmiştir. Söz konusu belirteçler bu biyolojik süreçlerin göstergeleridir ve aynı zamanda tümör progresyonu, tedavi yanıtı ve mikroçevresel yeniden programlanmanın nesnel olarak değerlendirilmesine olanak sunan, literatürde yaygın, etkili ve güvenilir kabul edilen moleküler işaretçilerdir (Esterbauer ve ark., 1991; Kasai, 1997; Porter ve Jänicke, 1999; Folkman, 2002).

Kullanılan primer antikorlarla ilgili açıklamalar Tablo 3.4'de verilmiştir. Sekonder antikor olarak EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (ab80436, Abcam, İngiltere), kromojen olarak ise 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Negatif kontrollerde, primer antikor yerine sadece antikor seyreltme tamponu ile inkübasyon yapıldı.

Tablo 3.4. İmmunohistokimyasal inceleme için kullanılan markerlar ile ilgili bilgiler.

Parametre	Antikor	Dilüsyon	Firma	Katalog No
Angiogenez	Anti-CD31	1:100	Santa Cruz	sc-376764 mouse monoclonal

Angiogenez	Anti VEGF	1:100	Affinity	AF5131 rabbit polyclonal antibody
Apoptozis	Anti - Caspase-3	1:100	Proteintech	19677-1-AP Rabbit / IgG
Oksidatif DNA Hasarı	Anti 8-OHdG	1:200	Bioss	bs1278r Rabbit
Lipid peroksidasyonu	Anti 4-HNE	1:200	Bioss	bs6313r Rabbit

Polilizin kaplı lamalar üzerine alınan beş ayrı seri doku kesiti, önce bir gün boyunca oda sıcaklığında kurutuldu, ardından 60°C'deki etüvde yaklaşık 1,5 saat bekletildi. Parafin kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla, kesitler ksilol serisinden geçirilerek deparafinize edildi, ardından %100 etanolden başlanarak azalan derecelerdeki (%95, %80, %70) alkol serilerinden geçirilerek rehidrasyon sağlandı. Bu aşamayı takiben, tüm kesitler distile suya alınarak yaklaşık 10 dakika bekletildi.

Endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitler %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) içeren metanol solüsyonunda 20 dakika inkübe edildi. Sonrasında, fosfat tamponlu salin (PBS) ile iki kez 10'ar dakika yıkama yapıldı. Antijen geri kazanımı için kesitler, pH 6 olan sitrat tampon çözeltisinde mikrodalga fırında 700 W gücünde, iki kez 5'er dakika kaynatıldı. Ardından, yine iki kez 10'ar dakikalık PBS yıkaması uygulandı.

Non-spesifik bağlanmaların önüne geçmek amacıyla normal serum ile yaklaşık 20 dakika inkübasyon yapıldı. Ardından serum fazlası uzaklaştırılarak yıkama yapılmaksızın primer antikorlar kesitler üzerine damlatıldı ve +4°C'de gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kesitler tekrar PBS ile yıkandı ve ardından biotinli sekonder antikor ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Yine PBS ile iki kez 10 dakika yıkama yapıldı ve streptavidin çözeltisiyle 30 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. Bu işlemleri takiben, PBS ile son kez yıkama yapıldı.

DAB substratı (1 damla substrat/1 ml solüsyon oranında hazırlanarak) kullanılarak her bir antikor için ayrı ayrı ve mikroskop altında kontrollü boyama

yapıldı. Mikrodalga aşaması dışındaki tüm işlemler nemli kamarada yürütüldü. Boyama tamamlandıktan sonra kesitler Harris hematoksilen ile yaklaşık 5 dakika karşı boyamaya tabi tutuldu. Dehidrasyon işlemi sonrasında kesitler ksilol ile şeffaflaştırıldı ve ardından entellan damlatılarak kesitlerin üzeri lamel ile kapatıldı. Preparatlar oda sıcaklığında 1 gün bekletilerek kurutuldu ve ışık mikroskobu ile değerlendirmeye hazır hale getirildi.

İmmunohistokimyasal boyama şiddeti 0–3 arası bir skorla değerlendirildi. Kaspaz-3, TLR-4 ve HSP-70 için yapılan boyamalar, x20 objektif büyütmesinde lezyonlu bölgelerdeki yoğunluk ve yaygınlık dikkate alınarak değerlendirildi: Boyanma gözlenmemesi durumunda 0, sadece sınırlı bir bölgede hafif/orta şiddette boyanma varsa +1, iki veya üç bölgede hafif/orta yoğunlukta boyanma varsa +2, yaygın ve değişen şiddette boyanma gözlenirse +3 olarak puanlandırıldı. Skorlama işlemleri ImageJ (v1.48, NIH, ABD) yazılımı kullanılarak yapıldı, mikrofotografi ve morfometrik analizler için ise Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Co., Tokyo, Japonya) yazılımı kullanıldı.

3.5. İstatistik Analizler

İstatistik analizler SPSS 22.00 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Pozitif hücre sayılarının belirlenmesi ve grafiklerin oluşturulmasında ise GraphPad Prism programından yararlanıldı. Öncelikle verilerin dağılımının normalliği Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Verilerin normal dağılım gösterdiği ($P>0.05$) belirlendiğinden, gruplar arası karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Gruplar arasındaki farkların belirlenmesinde Duncan testi kullanıldı ve $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

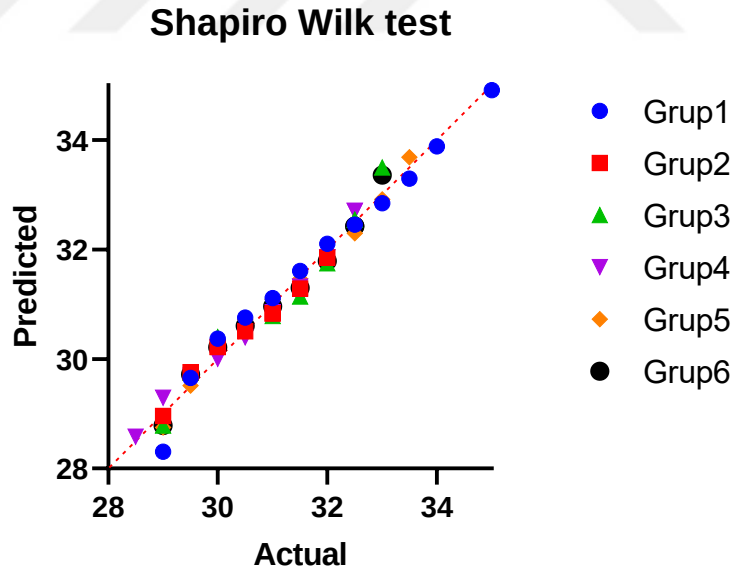
4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

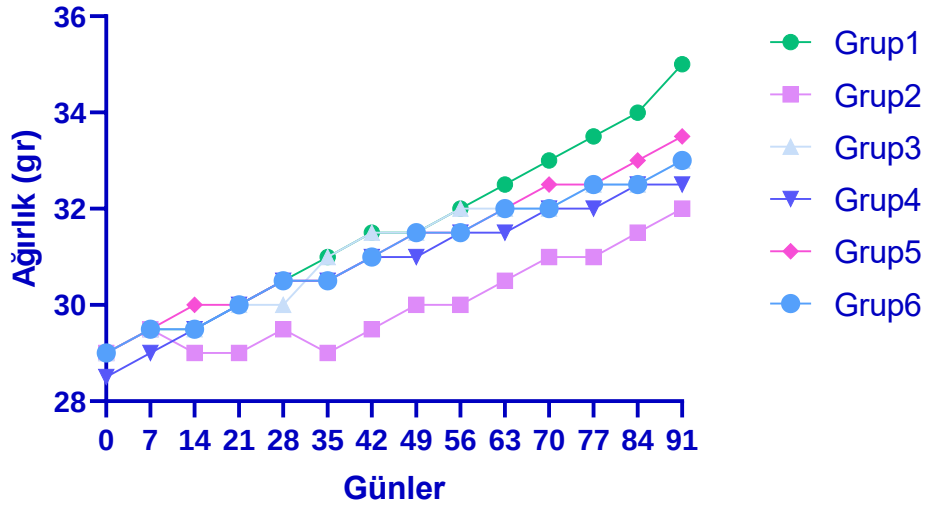
Bu çalışmada denemenin başından itibaren tüm fareler günde en az ikikez herhangi bir klinik semptom gösterip göstermemelerine göre değerlendirildi. AOM uygulamasının ardından DSS uygulandığında sadece tedavi uygulanmayan gruptaki hayvanlarda 3-5 gün süren bir kanlı dışkı gözlemlendi.

4.2. Ağırlık Değişimleri

Denemenin başlangıcından itibaren her 7 günde bir farelerin ağırlık değişimleri kaydedildi. Kontrol grubunda ağırlık artışı gözlenirken diğer gruplar bu düzenli ağırlık artışına ulaşamadı. Grup 2 ise ağırlık artışının en az ve düzensiz olduğu grup oldu. Gruplara göre ağırlık artışı verilerinin normal dağılım gösterdiği ve verilerin grafik halinde sunumu gösterildi (Şekil 4.1 ve 4.2).



Şekil 4.1. Ağırlık artışı verilerinin normal dağılım grafiği



Şekil 4.2. Gruplara ve günlere göre ağırlık artış grafiği.

4.3. Hemogram Analiz Bulguları

Gruplar arasında hemogram verileri incelendiğinde grup1 ve 2 arasında özellikle hücre sayıları açısından önemli farklar şekillendiği saptandı. BM uygulamasının ise bu değerlerin düzelmesinde etkili olduğu gözlemlendi. Sadece BM uygulaması yapılan gruplarda kan değerleri açısından pek önemli bir farkın şekillenmediği görüldü. Gruplara göre kan değerlerinin istatistik analiz sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Gruplara göre hemogram verilerinin istatistik analiz sonuçları.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	P değeri
Lökosit	9.40±3.66 ^a	2.77±1.46 ^b	2.96±0.63 ^b	4.14±1.56 ^b	2.83±0.85 ^b	5.31±0.62 ^b	0.004
Nötrofil	2.97±2.04 ^a	0.88±0.66 ^b	0.51±0.29 ^b	1.06±0.54 ^{ab}	0.57±0.11 ^b	1.53±0.88 ^{ab}	0.079
Lenfosit	4.88±0.89 ^a	1.32±0.54 ^b	2.10±0.62 ^{bc}	2.39±1.07 ^{bc}	1.81±0.73 ^{bc}	3.04±0.70 ^c	0.001
Monosit	1.48±0.80 ^a	0.53±0.30 ^b	0.33±0.42 ^b	0.65±0.13 ^b	0.41±0.07 ^b	0.68±0.15 ^b	0.027
Eozinofil	0.06±0.03 ^a	0.04±0.02 ^a	0.02±0.00 ^b	0.04±0.01 ^{ab}	0.04±0.02 ^{ab}	0.06±0.01 ^a	0.166
Bazofil	0.05±0.05	0.10±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.07±0.11	0.446
Eritrosit	7.98±0.28 ^a	7.61±0.64 ^a	8.88±0.24 ^b	7.97±0.55 ^a	8.82±0.96 ^b	8.08±0.34 ^a	0.009
Hemoglobin	142.00±5.83 ^{ab}	135.97±10.59 ^a	151.33±2.51 ^b	135.33±2.51 ^a	149.67±3.05 ^b	139.00±2.64 ^a	0.017
Hematokrit	39.88±1.59 ^{ab}	37.53±3.27 ^a	43.43±0.45 ^c	36.93±2.44 ^a	42.33±1.04 ^{bc}	38.03±0.68 ^a	0.003
MCV	49.95±0.61 ^a	49.30±0.17 ^a	48.93±1.55 ^{ab}	46.37±1.48 ^c	47.97±0.66 ^{abc}	47.17±1.43 ^{bc}	0.008
MCH	17.75±0.19 ^a	17.80±0.10 ^a	17.00±0.62 ^b	17.00±0.45 ^b	16.97±0.15 ^b	17.23±0.51 ^{ab}	0.037
MCHC	356.00±7.39 ^{ab}	361.00±2.64 ^{ab}	348.00±2.00 ^a	367.00±15.62 ^b	354.00±2.00 ^{ab}	365.67±1.15 ^b	0.048
RDWCV	15.25±0.28 ^{ab}	17.43±2.31 ^a	14.47±0.76 ^b	17.17±1.87 ^a	14.47±0.97 ^b	14.67±1.00 ^b	0.043
RDWSD	35.30±1.03 ^{ab}	38.63±4.58 ^a	33.20±1.03 ^{ab}	35.63±5.25 ^{ab}	31.97±1.09 ^b	32.57±1.85 ^b	0.122

*Veriler ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir. Aynı satırda farklı harflerle işaretlenen gruplar arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir. One-way ANOVA, posthoc Duncan test. MCV: Ortalama eritrosit hacmi, MCH: Ortalama eritrosit hemoglobini, MCHC: Kırmızı kan hücresi hacmindeki ortalama hemoglobin konsantrasyonu. RDW: Eritrosit boyutu. RDW-SD: Eritrosit boyut dağılımının standart sapması.

4.4. Makroskopik Bulgular

Çalışmanın tamamlanmasından sonra tüm fareler ötenazi edildi ve kolon örnekleri uzaklaştırılarak dikkatlice incelendi. Grup 1 (kontrol grubunda) yer alan tüm farelerde kolon mukozasının normal histolojik görünümü korunmuş olarak gözlemlendi. Bu grupta, epitel hücre diziliminde bozulma, kript yapısında deformasyon veya inflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı.

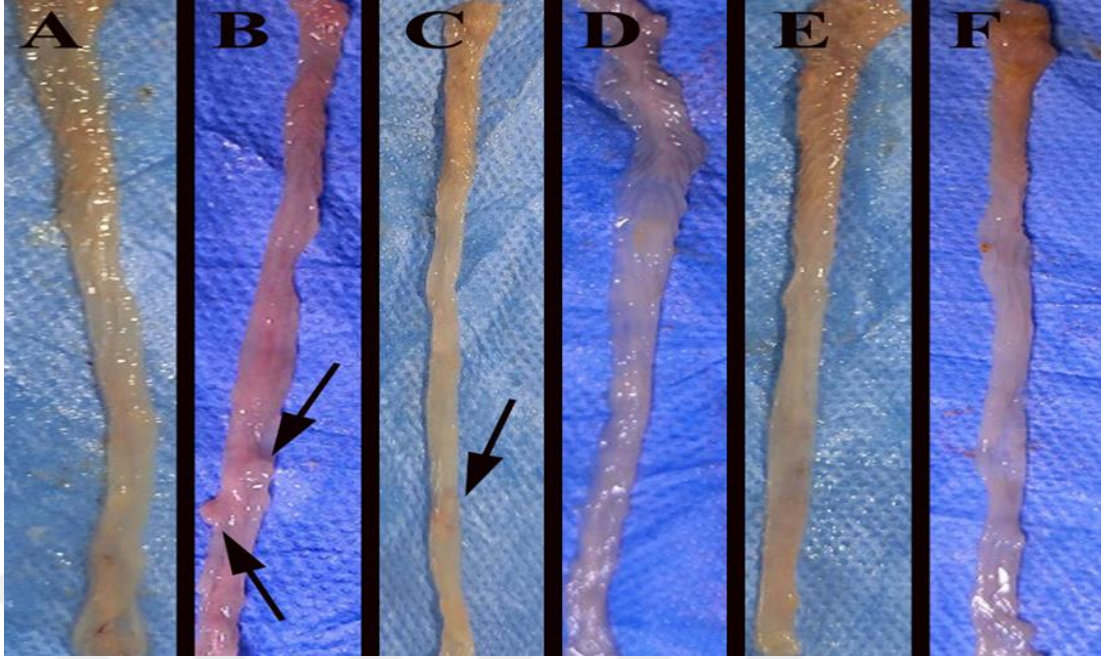
Grup 2’de (AOM-DSS grubu) ise kolon mukozasında belirgin yapısal bozukluklar saptandı. Bu gruptaki farelerin büyük çoğunluğunda çok sayıda proliferatif lezyonlar, displastik kript yapıları ve mukozal kalınlaşmalar gözlemlendi. Ayrıca bazı örneklerde kript proliferasyonu, epitelial atipi ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu dikkat çekiciydi. Bu gruptaki farelerin villuslarında hücresel atipi, pleomorfizm ve anaplazik hücre topluluklarından oluşan alanlar gözlemlendi ve bulgular, kolorektal karsinogenez sürecinin şekillendiğini gösterdi.

Grup 3'te (kanser indüklenmiş ve 0,5 mg/kg BM uygulanan grup), kontrolsüz hücre proliferasyonunun kısmen engellendiği izlendi. Bu grupta proliferatif lezyonların hem sayısında hem de boyutlarında azalma olduğu kaydedildi. Histolojik olarak lezyonların daha sınırlı alanlarda lokalize olduğu ve displazi derecelerinin daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu durum, BM'nin düşük dozda dahi karsinogenez süreci üzerinde baskılayıcı bir etkisinin olabileceğini düşündürdü.

Grup 4'te (daha yüksek dozda BM (2 mg/kg) uygulanan kanserli grup) ise tedaviye yanıt çok daha belirgin düzeydeydi. Bu gruptaki kolon örneklerinde proliferatif lezyonların sayısında dramatik bir azalma görülürken, mevcut lezyonların da boyutlarının oldukça küçük olduğu ve çoğunlukla hafif displastik karakterde olduğu tespit edildi. Ayrıca mukozal yapının bütünlüğünün büyük ölçüde korunduğu ve inflamatuvar yanıtın minimum düzeyde olduğu izlendi. Bu bulgular, BM'nin doza bağımlı olarak tümör oluşumunu baskılayabileceğini düşündürdü.

Sadece BM verilen (kanser indüklenmemiş) Grup 5 (0,5 mg/kg) ve Grup 6'daki (2 mg/kg doz) farelerin kolon dokuları incelendiğinde ise, hiçbir hayvanda proliferatif lezyon, displazi ya da başka herhangi bir patolojik değişiklik saptanmadı. Histolojik olarak bu gruplardaki kolonların epitel ve kript yapılarının tamamen normal olduğu ve enflamatuvar hücre varlığının gözlenmediği belirlendi. Bu durum, BM'nin sağlıklı dokularda toksik veya iritan bir etki oluşturmadığını ve güvenli bir profil sergilediğini gösterdi.

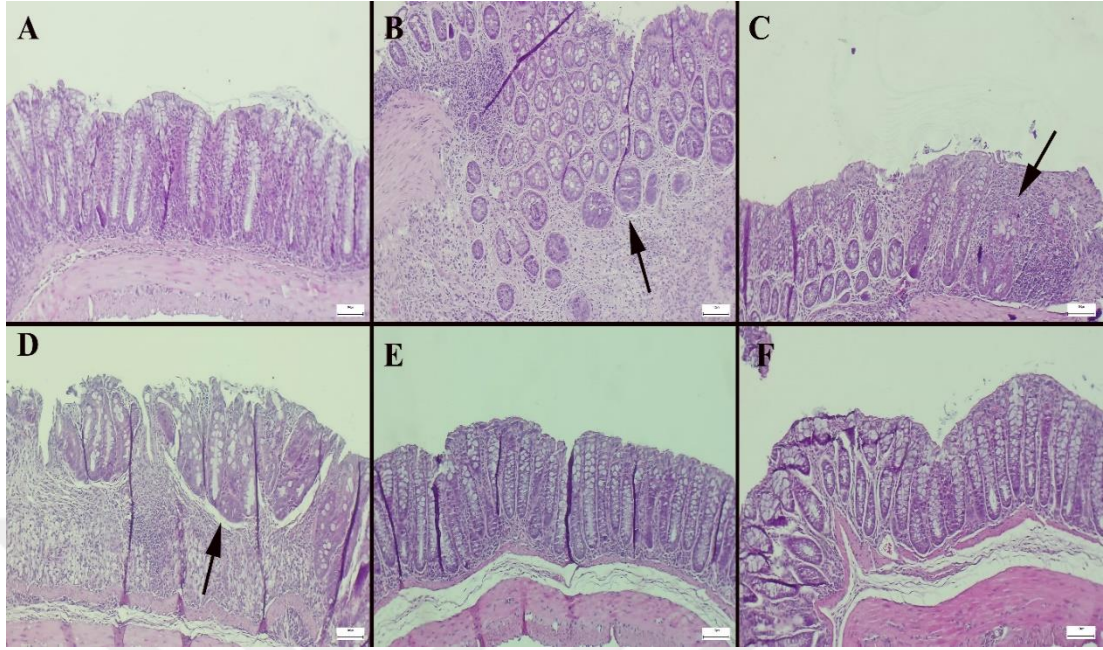
Tüm bu bulgular, BM ekstresinin kolorektal kanserin gelişimini baskılayıcı etkiler gösterebileceğini ve bu etkinin doza bağımlı olarak arttığını ortaya koydu (Şekil 4.3).



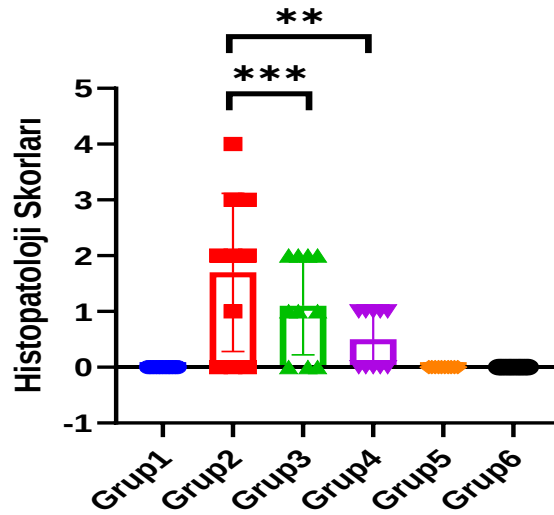
Şekil 4.3. Gruplara göre kolonların makroskobik görünüşleri. (A) Grup 1’de normal kolon mukozası, (B) Grup 2’de bir farenin kolonunda proliferatif lezyonlar (oklar), (C) Grup 3’te azalmış proliferatif lezyonlar (ok), (D) Grup 4’te normale yakın kolon mukozası, (E) Grup 5’te normal kolon mukozası, (F) Grup 6’da kolon mukozasının normal görünümü.

4.5. Histopatolojik Bulgular

Gruplara göre kolon mukozasının histopatolojik incelemesinde Grup 1’de normal kolon histolojik görüntüsü gözlenirken Grup 2’de kolon mukozasında belirgin adenomatöz- adenokarsinomatöz proliferasyonlar dikkati çekti. Grup 3’te ve Grup 4’te proliferasyonların azalma gözlemlendi, azalma Grup 4’te daha belirgindi. Grup 5 ve Grup 6’da herhangi bir patolojik bulgu saptanmadı (Şekil 4.4.-4.5). Histopatolojik skorların istatistik analizi Tablo 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.4. Gruplar arasında kolonların mikroskopik görünüşleri. (A) Grup 1’de normal görünümde kolon histolojisi. (B) Grup 2’de kolonda yaygın adenokarsinomatöz proliferasyonlar (ok). (C) Grup 3’de küçük adenomatöz proliferasyonlar (ok). (D) Grup 4’te küçük adenomatöz odaklar (ok). (E) Grup 5’te normal kolon mikroskopik görünümü. (F) Grup 5’te normal kolon histolojisi, HE, barlar =100µm.

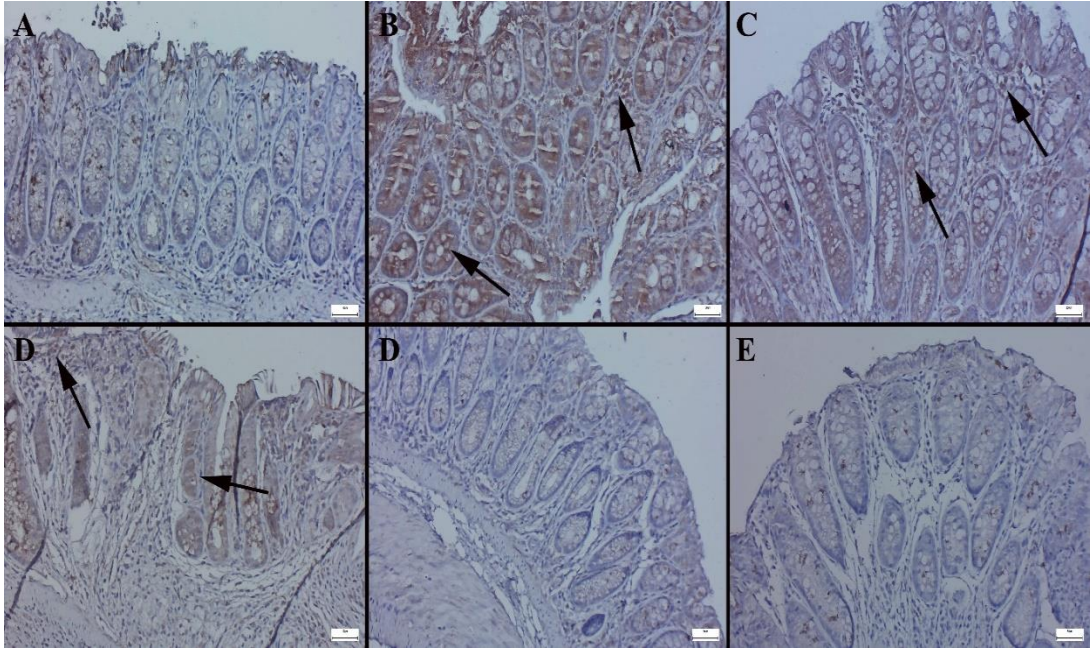


Şekil 4.5. Gruplara göre histopatolojik skorların grafiği, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

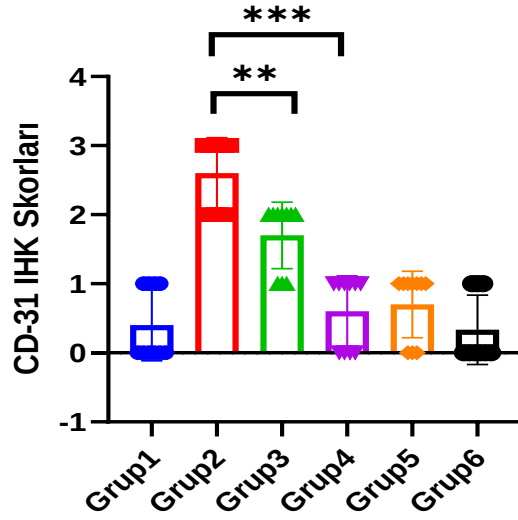
4.6. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.6.1. CD-31 İmmunohistokimyasal Bulguları

Gruplara göre CD-31 immunohistokimyasal bulguları incelendiğinde Grup1’de çok hafif olan ve kapillar damarlarda sınırlı olan ekspresyonların Grup 2’de belirgin şekilde arttığı ve neoplastik hücrelerde yoğunlaştığı gözlemlendi. Grup3 ve Grup 4’de ekspresyonlarda biraz azalma dikkati çekti. Grup 5 ve Grup 6’da ekspresyonlar Grup 1’de olduğu gibi hafif ve kapillarlarda sınırlı bir şekildeydi (Şekil 4.6.-4.7).



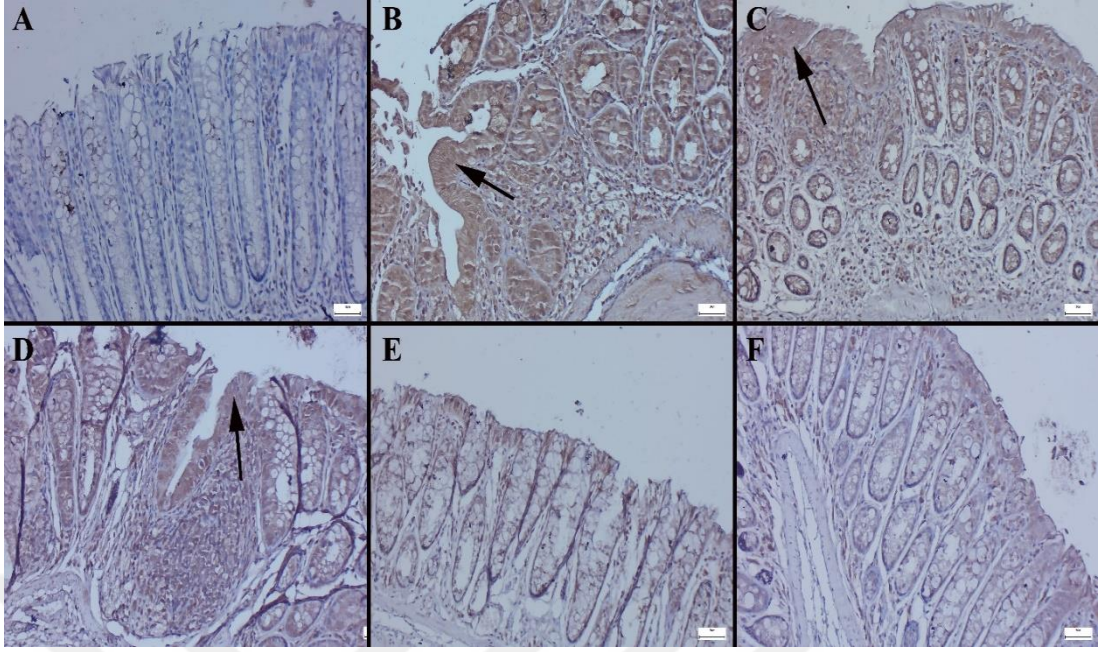
Şekil 1.6. Gruplara göre CD-31 immunoekspresyonlarının görünümü. (A) Grup 1’de çok hafif ekspresyon. (B) Grup 2’de belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Grup 3’de orta düzeyde ekspresyonlar (oklar). (D) Grup 4’de daha hafif ekspresyonlar (oklar). (E) Grup 5’de çok hafif ekspresyonlar. (F) Grup 6’da çok hafif ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, barlar =50µm.



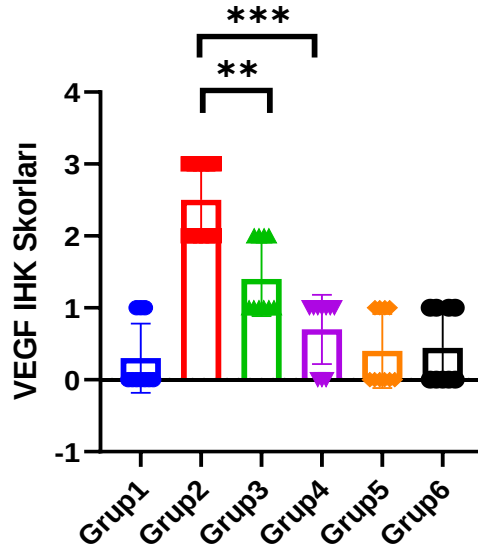
Şekil 4.7. Gruplara göre CD-31 immunohistokimya skorlarının istatistik analizi, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

4.6.2. VEGF İmmunohistokimyasal Bulguları

VEGF immunoekspresyonlarının gruplar arasında görünümeleri değerlendirildiğinde incelendiğinde Grup1’de çok hafif olan ekspresyonların Grup 2’de epitel hücrelerinde önemli ölçüde arttığı ve neoplastik hücrelerde yoğunlaştığı gözlemlendi. Grup 3 ve Grup 4’de ekspresyonlarda hafifçe azaldığı dikkati çekti. Grup 5 ve Grup 6’da ekspresyonlar çok hafif veya negatif olarak gözlemlendi (Şekil 4.8.-4.9).



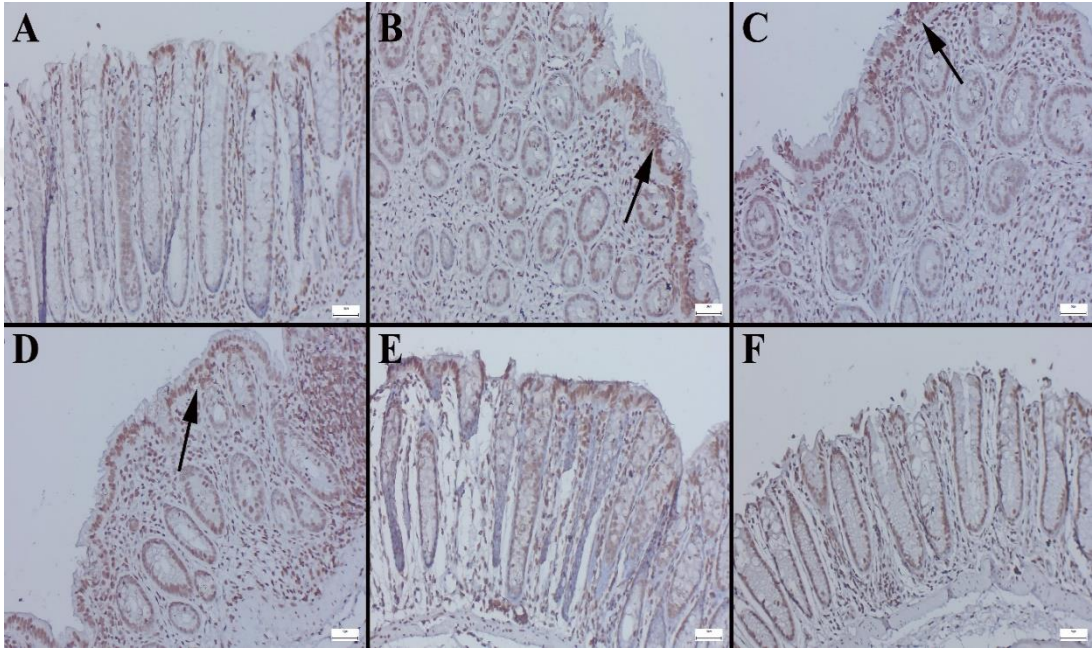
Şekil 4.8. VEGF ekspresyonlarının gruplar arasındaki görünümü. (A) Grup 1’de çok hafif ekspresyon. (B) Grup 2’de epitel hücrelerinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok). (C) Grup 3’de epitel hücrelerinde belirgin ekspresyonlar (ok). (D) Grup 4’de epitellerde orta düzeyde ekspresyonlar (ok). (E) Grup 5’de çok hafif ekspresyonlar. (F) Grup 6’da çok hafif ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, barlar =50µm.



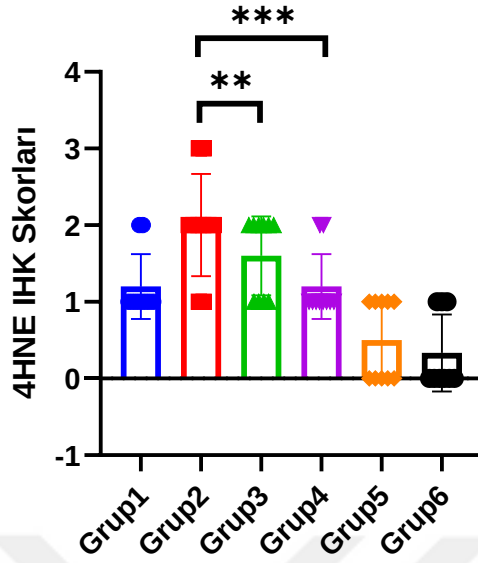
Şekil 4.9. Gruplara göre VEGF immunohistokimya skorlarının istatistik analizi, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

4.6.3. 4HNE İmmunohistokimyasal Bulguları

Gruplar arasında 4HNE ekspresyonları değerlendirildiğinde tüm gruplarda ekspresyonların olduğu saptandı. Ekspresyonların Grup 2,3 ve 4’de biraz daha belirgin olduğu ve yer yer hücre gruplarında artışlar şekillendiği saptandı. Ekspresyonlar intranükleer yerleşimliydi ve sadece epitel hücrelerinde değil aynı zamanda mezenkimal hücreler ile inflamatuvar hücrelerde de saptandı (Şekil 4.10-4.11).



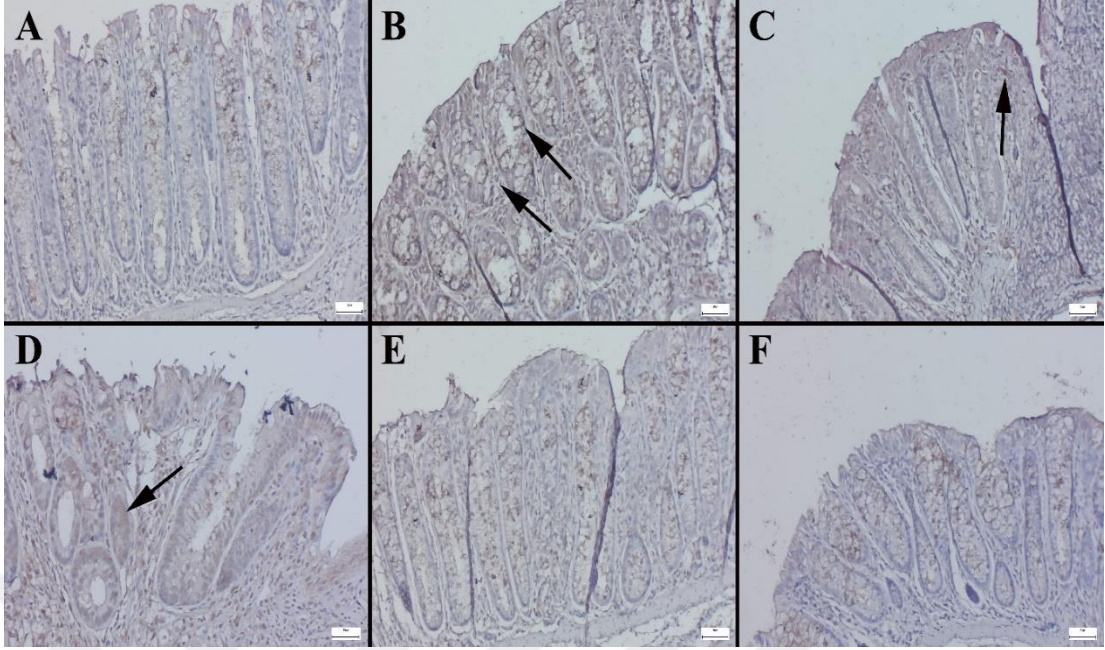
Şekil 4.10. 4HNE ekspresyonlarının gruplara göre görünüşleri. (A) Grup 1’de orta düzeyde ekspresyon. (B) Grup 2’de özellikle epitel hücrelerinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok). (C) Grup 3’de özellikle epitel hücrelerinde belirgin ekspresyonlar (ok). (D) Grup 4’de epitellerde belirgin ekspresyonlar (ok). (E) Grup 5’de orta düzeyde ekspresyonlar. (F) Grup 6’da orta düzeyde ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, barlar =50µm.



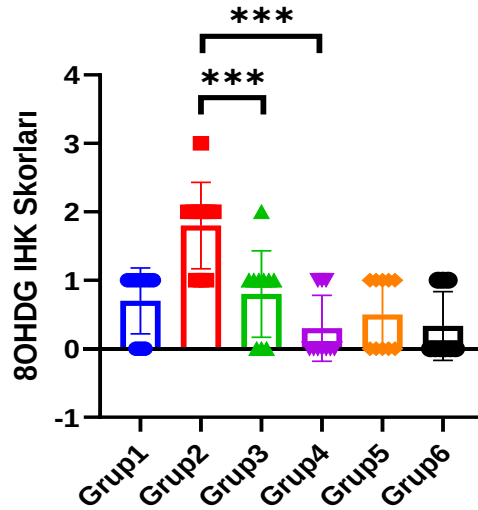
Şekil 4.11. Gruplara göre 4HNE immunohistokimya skorlarının istatistik analizi, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

4.6.4. 8OHdG İmmunohistokimyasal Bulguları

Gruplara göre 8OHdG ekspresyonları karşılaştırıldığında Grup1'e çok hafif olan ekspresyonların Grup 2'de önemli ölçüde arttığı saptandı. BM ile tedavi uygulanan Grup 3 ve Grup 4'te ekspresyonların azaldığı görüldü. Sadece BM verilen Grup 5 ve 6'da ekspresyonlarda kontrole göre önemli bir artış şekillenmediği dikkati çekti (Şekil 4.12, 4.13).



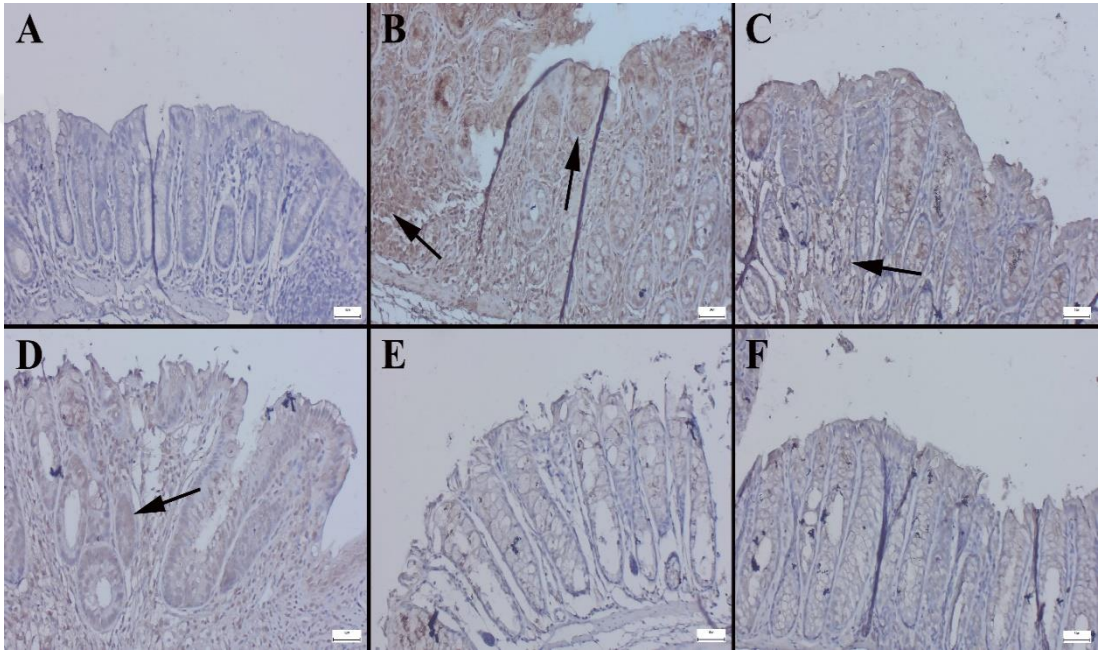
Şekil 4.12. Gruplara göre 8OHdG ekspresyonlarının görünüşleri. (A) Grup 1’de çok hafif ekspresyon. (B) Grup 2’de epiteliyal ve mezenkimal hücrelerinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Grup 3’de hücrelerde ekspresyonlarda azalma ve hafif ekspresyonlar (ok). (D) Grup 4’de ekspresyonlarda azalma ve bazı epitel hücrelerinde pozitif ekspresyonlar (ok). (E) Grup 5’de çok hafif ekspresyonlar. (F) Grup 6’da negatife yakın ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, barlar =50µm.



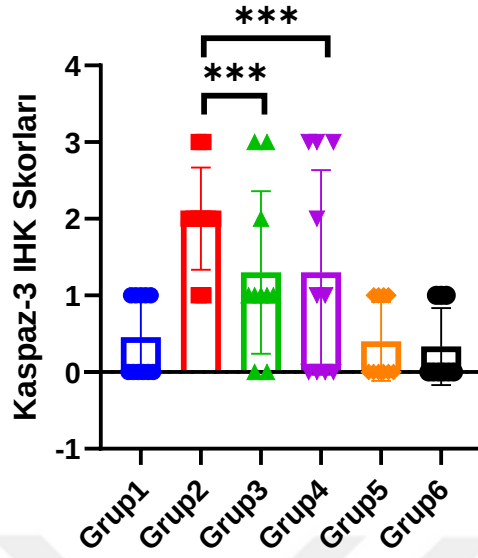
Şekil 4.13. Gruplara göre 8OHdG immunohistokimya skorlarının istatistik analizi, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

4.6.5. KASPAZ-3 İmmunohistokimyasal Bulguları

Gruplara arasında kaspaz-3 ekspresyonları değerlendirildiğinde Grup 1'e çok hafif olan ekspresyonların Grup 2'de belirgin ölçüde arttığı saptandı. BM ile tedavi uygulanan Grup 3 ve Grup 4'te ekspresyonların belirgin şekilde devam ettiği saptandı. Sadece BM verilen Grup 5 ve 6'da ekspresyonlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli bir fark şekillenmediği dikkati çekti (Şekil 4.14-4.15). Grupların immunohistokimya skorlarının istatistik analizi Tablo 4.2'da verilmiştir.



Şekil 4.14. Grupların kaspaz-3 ekspresyonlarının görünüşleri. (A) Grup 1'de çok hafif ekspresyon. (B) Grup 2'de epiteliyal ve mezenkimal hücrelerinde artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Grup 3'de hücrelerde belirgin ekspresyonlar (ok). (D) Grup 4'de belirgin ekspresyonlar (ok). (E) Grup 5'de çok hafif ekspresyonlar. (F) Grup 6'da negatife yakın ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, barlar =50µm.



Şekil 4.15. Gruplara göre kaspaz-3 immunohistokimya skorlarının istatistik analizi, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Tablo 4.2. Grupların histopatolojik ve immunohistokimyasal skorlarının istatistik analiz verileri.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	P değeri
Histo-skor	0.00±0.00 ^a	1.70±0.44 ^b	1.10±0.27 ^b	0.50±0.16 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	<0.001
CD-31	0.36±0.15 ^a	2.60±0.16 ^b	1.70±0.15 ^c	0.58±0.15 ^a	0.70±0.15 ^a	0.39±0.13 ^a	<0.001
VEGF	0.27±0.14 ^a	2.50±0.16 ^b	1.40±0.16 ^c	0.70±0.15 ^a	0.40±0.16 ^a	0.44±0.17 ^a	<0.001
4HNE	1.18±0.12 ^a	1.98±0.20 ^b	1.60±0.16 ^{ab}	1.20±0.13 ^a	0.50±0.16 ^c	0.33±0.16 ^c	<0.001
8OHdG	0.70±0.13 ^a	1.80±0.20 ^b	0.80±0.20 ^a	0.30±0.15 ^a	0.50±0.16 ^a	0.33±0.16 ^a	<0.001
Kaspaz-3	0.45±0.15 ^a	1.95±0.24 ^b	1.30±1.05 ^a	1.23±1.13 ^a	0.42±0.15 ^a	0.40±0.15 ^a	<0.001

*Veriler ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir. Aynı satırda farklı harflerle işaretlenen gruplar arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir. One-way ANOVA, posthoc Duncan test.

Tablo 4.3. Histopatolojik ve immunohistokimyasal skorların korelasyon analiz sonuçları

	Histopatoloji	CD31	VEGF	4HNE	8OHdG	Kaspaz-3
Histopatoloji	1	0,567** 0,000	0,533** 0,000	0,460** 0,000	0,306* 0,018	0,414** 0,001
CD31	0,567** 0,000	1	0,735** 0,000	0,590** 0,000	0,533** 0,000	0,500** 0,000
VEGF	0,533** 0,000	0,735** 0,000	1	0,489** 0,000	0,616** 0,000	0,495** 0,000
4HNE	0,460** 0,000	0,590** 0,000	0,489** 0,000	1	0,462** 0,000	0,339** 0,008
8OHdG	0,306* 0,018	0,533** 0,000	0,616** 0,000	0,462** 0,000	1	0,438** 0,000
Kaspaz-3	0,414** 0,001	0,500** 0,000	0,495** 0,000	0,339** 0,008	0,438** 0,000	1

Pearson korelasyon analizi, *: $p<0.05$ ve **: $p<0.01$

Histopatolojik skorlar ile IHK skorları arasında pozitif ve anlamlı bir korelasyon saptandı. Buna göre CD31 ($r=0.567$, $p<0.01$), artan vaskülarizasyon veya anjiyogenez ile histolojik hasarla ilişkili bulundu ve bu korelasyon, tümör dokusunda anjiyogenezin hasara eşlik ettiğini gösterdi. VEGF ($r=0.533$, $p<0.01$), VEGF, anjiyogenezin temel mediatörü olup bu korelasyon, tümör mikroçevresinde yeni damar artışının histopatolojik hasarla korole olduğunu destekledi. Lipid peroksidasyonu göstergesi olan 4-HNE'nin artışı ($r=0.460$, $p<0.01$), oksidatif stres ve hücrel hasarın histopatolojik bulgularla ilişkili olduğunu gösterdi. 8-OHdG ($r=0.306$, $p<0.05$), DNA oksidatif hasarı göstergesi olup histopatolojik hasar arasındaki daha zayıf ama anlamlı korelasyon, saptandı ve bu oksidatif DNA hasarının KKK patogeneze rol oynadığını düşündürdü. Kaspaz-3 ($r=0.414$, $p<0.01$), apoptoz göstergesi olup bununla histopatolojik bulgular arasında ile anlamlı ilişki saptandı. Bu sonuç ise, tümör dokusundaki apoptotik aktivite artışının histolojik lezyonlarla paralel olduğunu gösterdi.

Biyobelirteçler arası korelasyonlar değerlendirildiğinde, tüm parametreler birbiriyle anlamlı düzeyde körele bulundu, bu da TMC' de ortak etkileşimli patolojik süreçler şekillendiğini düşündürdü. Anjiyogenez göstergeleri olan CD31 ve VEGF ($r=0.735$, $p<0.01$) arasında çok güçlü korelasyon saptandı. Bu veri ise VEGF'nin

CD31+ damar oluşumunu tetiklediğini doğruladı. CD31 ile 4-HNE ($r=0.590$), ve VEGF4 ile 4HNE ($r=0.489$) arasındaki korelasyon oksidatif stresin anjiyogenezi artırabileceğine veya bunun tersinin de doğru olduğuna yorumlandı.

Oksidatif stres ve apoptoz belirteçleri (4-HNE ve 8-OHdG) ($r=0.462$) arasındaki korelasyon lipid peroksidasyonu ile DNA hasarı arasında güçlü ilişki olduğunu ortaya koydu. Buna göre 8-OHdG–Kaspaz-3 ($r=0.438$) korelasyonunun DNA hasarının apoptozu tetiklediği şeklinde yorumlandı. Ayrıca 4-HNE–Kaspaz-3 ($r=0.339$) arasındaki korelasyonun oksidatif stres kaynaklı hücre ölümüne işaret ettiğini düşündürdü. VEGF–Kaspaz-3 ($r=0.495$) arası korelasyon, VEGF'nin, pro-ya da anti-apoptotik etkiler gösterebileceği ve bu korelasyonun dengenin KRK'de bozulduğuna işaret ettiği şeklinde yorumlandı.

Genel olarak değerlendirildiğinde bu korelasyonların, KRK dokusunda anjiyogenez, oksidatif stres ve apoptozun birlikte aktive olduğunu ve bu süreçlerin histopatolojik hasarla sıkı ilişkili olduğunu göstermektedir. Özellikle CD31, VEGF, 4-HNE ve Kaspaz-3 gibi göstergeler, tümör progresyonu ve doku hasarının başlıca belirleyicileri olabilecek potansiyelleri saptanmıştır. Bu nedenle, bu parametreler hem tanı hem de tedavi hedefi olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

5. TARTIŞMA

Literatürde, BM'nin AOM/DSS ile oluşturulmuş inflamatuvar KRK modelleri üzerinde in vivo etki analizine yönelik doğrudan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yönüyle çalışma, BM'nin TMÇ üzerindeki modülatör etkilerini değerlendiren ilk deneysel model denemesidir ve bu özgün modelin geçerliliği, insana translasyonel doz hesaplamalarıyla daha da güçlendirilmiştir. Doz belirleme sürecinde insan eşdeğer doz formülü uygulanarak translasyonel geçerliliğe dayalı bir yaklaşım benimsenmiştir. Bu çalışma sayesinde hem yeni bir model üzerinde BM'nin etkilerini inceleyerek literatüre özgün katkı sağlamış hem de insan uygulamasına yakın doz planlaması ile translasyonel önemi artırılmıştır.

BM'den saflaştırılan bacopaside I ve II'nin kolon ve meme kanseri hücre hatlarında apoptozu indüklediğini gösterilmiştir (Palethorpe ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında elde edilen kaspaz-3 aktivasyonu ve immunohistokimyasal pozitiflik sayesinde bu bulgularla uyumlu olarak BM'nin apoptotik yolları in vivo düzeyde de aktive edebildiği anlaşılmaktadır. Bu bulgular BM'nin yalnızca hücre kültürü sistemlerinde değil, hayvan modellerinde de apoptotik sinyal yollarını etkileyebildiğini göstererek terapötik potansiyelini güçlendirmektedir.

Apoptozdaki artışa paralel olarak, oksidatif stres belirteçlerinde de anlamlı iyileşmeler gözlenmiştir. 8-OHdG ve 4-HNE gibi oksidatif stres belirteçleri üzerine yapılan boyamalarda elde edilen pozitiflik, BM'nin antioksidan etkilerinin TMÇ'de de korunabildiğini bildirmektedir. Bu bulgu, Kumar vd. tarafından bildirilen BM'nin oksidatif stresle ilişkili enzimatik sistemleri normalleştirme etkisiyle paralellik göstermektedir (Kumar ve ark., 1998). BM'nin oksidatif stres kaynaklı doku hasarını azaltmadaki in vivo potansiyelini desteklenmiş ve kolorektal kanser gibi inflamatuvar patolojilerde koruyucu bir ajan olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir.

Çalışmamızda Grup 2'de belirgin şekilde VEGF ekspresyonlarında artış görülmüştür. Grup 3 ve Grup 4'te ise ekspresyonlarda düşme gözlenmiştir. VEGF boyamalarında gözlenen azalma tümör vaskülarizasyonunun BM tarafından baskılanabileceğini göstermiştir. Palethorpe ve diğerlerinin (Palethorpe ve ark., 2019)

alışmasında bildirilen endotelial hücre g ve hücre grubu oluşumunun inhibisyonu bulgularıyla bizim sonuçlarımız örtüşmektedir ve bu bulgu, BM'nin anjiyogenezi hedef alarak tümör büyümesini sınırlayabilecek potansiyel bir anti-anjiyojenik ajan olarak değerlendirilebileceğine işaret etmektedir.

VEGF inhibisyonunun yanında modelin epigenetik duyarlılığı BM'nin karmaşık etki ağını açıklığa kavuşturmaktadır. Literatürde, KRK'de CIMP+ fenotipi ve CpG adacıklarının hipermetilasyonu erken tanı ve prognoz açısından önemlidir (Lemberger, 2010). Bu tezde kullanılan hayvan modeli, epigenetik modifikasyonlara duyarlılığı ile bilinen bir sistem olması nedeniyle, BM'nin metilasyon regülasyonuna dair potansiyel etkilerinin incelenmesi açısından da önemli bir başlangıç noktası oluşturmaktadır. Bu yaklaşım, BM'nin sadece antioksidan ve apoptotik değil, aynı zamanda epigenetik mekanizmalar üzerinden de TM'ni etkileyebilecek bir ajan olabileceği hipotezini destekleyerek çalışmanın özgünlüğünü artırmaktadır.

Bu epigenetik temel, BM'nin çok hedefli özelliklerinin klinik potansiyelini yansıtır. Çalışmada da elde edilen bulgular, BM'nin anti-kanser mekanizmalarını hedefleyen çoklu etkilerini göstermektedir. Bu sonuçlar, Huangteerakul ve arkadaşları (Huangteerakul ve ark., 2021) tarafından rapor edilen bacopasaponin C'nin RAD1 eksikliği olan hücrelerde gösterdiği seçici etki ile birlikte düşünüldüğünde, bitkinin klinik araştırmalara yönelik potansiyel bir aday olduğunu göstermektedir. Sonuçlar BM'nin anti-kanser mekanizmaları üzerinde spesifik ve hedefe yönelik etkiler oluşturabileceğini, dolayısıyla klinik araştırmalar için güçlü bir aday olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışma, BM'nin AOM/DSS modelinde KRK zerindeki etkilerini ilk kez in vivo düzeyde değerlendirerek literatüre özgün bir katkı yapılmasını sağlamıştır. İnsan eşdeğer doz yaklaşımıyla tasarlanan deneyler, apoptotik (kaspaz-3 aktivasyonu) ve antioksidan (8-OHdG/4-HNE azalması) etkileri ortaya koyarken, VEGF inhibisyonu ile anti-anjiyojenik potansiyeli doğrulamıştır. Modelin epigenetik duyarlılığı, BM'nin DNA metilasyonu gibi mekanizmalarla etkileşim olasılığına dikkat çekmiştir. Literatür (Huangteerakul ve ark., 2021) ile uyumlu çoklu hedef etkileri, BM'nin klinik araştırmalarda çok yönlü bir aday olabileceğini destekler

niteliktedir. Bu bulgular, doğal bileşiklerin kanser tedavisinde hem temel hem de translasyonel araştırmalarla derinleştirilmesi gerektiğini belirtir.

Bu tezde elde edilen bulgular, BM'nin anti-kanser özellikleri üzerine yapılan önceki çalışmalarla büyük oranda örtüşmektedir. Özellikle Vishnoi ve Agarwal, tarafından DMBA ile indüklenen deri tümör modelinde BM'nin kemopreventif etki göstermesiyle (Agarwal, 2013) bu çalışmada da gözlenen tümör hacmindeki azalma paralellik oluşturmıştır. Kumar ve ark., Dalton lenfoma ascites modeli ile yaptıkları in vivo çalışmada, BM ekstraktının tümör oluşumunu geciktirdiği ve hematolojik parametreleri iyileştirdiği ifade edilmiştir (Kumar ve Mondal, 2016); bu da BM'nin sistemik düzeyde koruyucu bir etki potansiyeli taşıdığını düşündürmüştür. Bununla birlikte Huangteerakul ve ark., *Saccharomyces cerevisiae* modeli üzerinden yürüttüğü çalışmalarda bacopasaponin C'nin DNA hasarı ve apoptoza yol açan kimyasal-genetik etkileşimleri tanımlanmıştır (Huangteerakul ve ark., 2021). Bu durum, tezde gözlemlenen kaspaz-3 aktivasyonu ile ilişkili apoptoz verilerini desteklemiştir. Ayrıca Palethorpe ve ark., tarafından kolorektal kanser hücre hatlarında bacopaside I ve II'nin apoptozu artırıcı ve invazyonu azaltıcı etkileri gözlemlenmiş (Palethorpe ve ark., 2019), bu da bizim çalışmamızda saptanan immunohistokimyasal analizlerde elde edilen bulgularla benzerlik göstermiştir. Bu paralellik, BM'nin anti-kanser, apoptoz artırıcı ve invazyonu baskılayıcı etkilerinin hem deneysel hem translasyonel açıdan güvenilir ve klinik araştırmalar için umut vaat eden bir profil sunduğunu anlatmaktadır.

Literatür uyumu, BM'nin anti-kanser etkilerinin evrensel bir profil taşıdığını gösterir ve aynı zamanda tezin özgün yaklaşımı bu etkilerin TMC'deki karmaşık dinamiklerle ilişkisini ilk kez ortaya koyar. Bu tez çalışması AOM/DSS modelinde anjiyogenez, apoptoz ve oksidatif stresi eşzamanlı inceleyerek, BM'nin mikroçevresel etkilerini bütüncül bir perspektifle değerlendiren ilk çalışma olmuştur. Diğer yandan, mevcut tez çalışması farklı olarak AOM/DSS ile indüklenen bir KKK modeli üzerinde BM'nin etkilerini in vivo koşullarda çok yönlü biçimde incelemiştir ve özellikle TMC'ye ait anjiyogenez, oksidatif stres ve apoptoz parametrelerinin eşzamanlı olarak değerlendirilmesini sağlamıştır. Bu yönüyle, yalnızca in silico (bilgisayar tabanlı moleküler modellemeler) veya in vitro (laboratuvar düzeyinde hücre temelli)

Çalışmalarda kalmış değişik yolaklar incelenmiştir. Tez kapsamında elde edilen veriler, BM'nin terapötik etkilerinin yalnızca hücresele düzeyde değil, tümör stroma yapısı ve damarlaşma gibi karmaşık biyolojik süreçler üzerinde de anlamlı etkiler yaratabileceğini ortaya koymuştur. Bu yönüyle tez, literatürde eksik olan deneysel model bütünlüğünü sağlamış ve BM'nin kolorektal kanserde umut vaat eden bir doğal ajan olduğunu bir kez daha ortaya koymuştur.

Moleküler bağlanma analizleriyle desteklenen bu bulgular, BM'nin sadece hücresele değil, hedef odaklı terapötik potansiyelini de göstermiştir. BM'nin karaciğer tümörlerinde bağlanma afinitesi MMPBSA/MMGBSA ile doğrulanmıştır (Sadaqat ve ark., 2023). MMPBSA/MMGBSA ile doğrulananan yüksek bağlanma afinitesi, BM'nin yalnızca hücresele etkilerle değil, doğrudan moleküler hedefler üzerinden de tümör baskılayıcı etki gösterebileceğini ortaya koymakta ve bu bitkinin kolorektal kanser gibi malignitelere potansiyel doğal terapötik ajan olarak değerlendirilmesi hipotezini güçlendirmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, önceki çalışmalarla tutarlılık göstererek BM'nin anti-kanser etkilerinin evrensel bir profil taşıdığını doğrulamıştır. Bu veriler BM'nin klinik araştırmalarda çoklu hedefleyici bir doğal ajan olarak değerlendirilebileceğini ve KRK'de tedaviye önemli ölçüde destek olabileceğini düşündürmüştür.

Bu tezin özgün katkısının AOM/DSS ile oluşturulan KRK modeli kapsamında, BM'nin tümör mikroçevresi (TM) üzerindeki etkilerini immunohistokimyasal (CD31 ile mikrovasküler yoğunluk, kaspaz-3 ile apoptoz), oksidatif stres parametreleri (8-OHdG ve 4-HNE) üzerinden sistematik ve bütüncül bir şekilde in vivo değerlendiren nadir çalışmalardan biri olması söz konusudur. Literatürdeki bacopasaponin C'nin in silico analizleri gibi birçok çalışma moleküler docking ve bilgisayar modellemeleri ile sınırlıyken, bu tez gerçek bir in vivo hayvan modelinde yani AOM/DSS ile indüklenmiş, histopatolojik ve immunolojik olarak karakterize edilmiş şekilde uygulama yapmış ve tümör stroma yapısı, mikrovasküler yoğunluk yani anjiyogenez, apoptoz ve oksidatif stres göstergelerini entegre bir yaklaşımla incelemiştir. Bu kapsamlı değerlendirme sayesinde sadece tümör boyutu değil, TM ile ilişkili kritik

immunolojik ve moleküler süreçleri de analiz edilerek BM'nin kanser tedavisindeki çok yönlü potansiyeline dair yeni bir perspektif sunmuş ve literatürdeki bir boşluğun doldurulmasına katkıda bulunmuştur.

Çalışma, BM'nin kolorektal kanser tedavisinde potansiyel çok hedefli doğal bir ajan olarak ele alınabileceğini belirtmektedir. Literatür uyumu, BM'nin evrensel anti-kanser profilini desteklerken, tezin AOM/DSS modelinde TMÇ'yi çok yönlü incelemesi, klinikte kombinasyon terapilerinin önemini altını çizmiştir. Bu bağlamda, Zekri ve Abubacker tarafından metastatik KRK'li hastalarda, daha önce başarısız olmuş iki kemoterapi protokolünün (XELOX-B ve FOLFIRI) Bevacizumab ile kombine edilmesiyle beklenmedik bir tümör yanıtı (kısmi yanıt) elde edildiği raporu, tedavi seçeneklerinin tükendiği durumlarda bile kombinasyon stratejilerinin umut verici olabileceğini göstermektedir (Zekri ve Abubacker, 2010).

TMÇ dinamiklerini anlamak için Mitselou'nun çalışması, insan KRK dokularında Thrombospondin-1 (TSP-1) ekspresyonunun ekstraselüler matriks bileşenleri olan tenascin, fibronectin, tip IV kollajen ve laminin ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkiler gösterdiğini, ancak p53 ekspresyonu veya genel sağkalım ile anlamlı ilişki göstermediğini bulmuştur. Bu bulgu, TSP-1'in tümör progresyonunda anjiyogenezden bağımsız olarak, özellikle TMÇ'nin yeniden şekillendirilmesi (ECM remodeling) yoluyla rol oynayabileceğini düşündürmektedir ve AOM/DSS modelinin inflamasyon-tümör etkileşimini yansıtmaya kapasitesi açısından bağlantı kurar (Mitselou, 2013).

Tezde kullanılan AOM/DSS modelinin inflamasyonla ilişkili kolorektal kanseri incelemek için güçlü ve uygun bir araç olarak kabul edildiği bilinmektedir (Thaker ve ark., 2012; Mittal ve ark., 2015) Bu model, insan KRK'si ile uyumlu histolojik değişikliklere sahiptir ve inflamasyon, DNA hasarı ile tümör gelişimi arasındaki bağlantıları araştırmak için etkilidir. Ancak Parang ve arkadaşları (Parang ve ark., 2016) tarafından da vurgulandığı gibi, sporadik (inflamasyonsuz) KRK'yi yansıtamaması ve metastatik kanser gelişimini/mikrometastaz oluşumunu yeterince taklit edememesi gibi modelin önemli sınırlamaları bulunmaktadır. Bu sınırlılıklar,

gelecek çalışmalarda genetiği değiştirilmiş modeller veya mikrobiyota-entegre sistemler gibi daha kapsamlı yaklaşımların araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

BM, kanser biyolojisi açısından çok çeşitli etki mekanizmalarına sahip bir bitkisel ajan olarak öne çıkmaktadır. BM başta NF- κ B olmak üzere, kanserle ilişkili sinyal yollarının baskılanmasıyla inflamasyon, hücresel proliferasyon ve metastaz süreçlerini sınırlandırma potansiyeli taşımaktadır (Gabbita ve ark., 2000; Kaur ve ark., 2017). BM bu etkiler sayesinde hem bağışıklık sisteminin yeniden programlanmasına hem de TMC baskılanmasına katkıda bulunur (Williams ve ark., 2014). Antioksidan kapasitesi sayesinde oksidatif stresin baskılanması, kaspaz-3 gibi apoptoz belirteçlerinin aktive edilmesiyle birleşerek programlı hücre ölümünü desteklemektedir (Kalyani ve ark., 2013; Palethorpe ve ark., 2019). Bu çalışma özellikle 8-OHdG ve 4-HNE gibi hasar belirteçlerinin düzeylerindeki azalma ile BM'nin DNA koruyucu etkisini desteklemiştir.

BM'nin etanolik ekstraktının (EEBM), in vivo ve in vitro çalışmalarda doza bağımlı tümör baskılayıcı ve hematolojik dengeleyici etkiler sergilediği bildirilmiştir (Kumar ve ark., 1998). Bitkinin bacoside II ve bacoside A gibi aktif bileşenlerinin hücre döngüsünü G0/G1 ve G2/M fazlarında durdurarak apoptoz ve anti-anjiyogenez mekanizmalarını birlikte devreye soktuğu literatürde yer almaktadır (Palethorpe ve ark., 2019; Mishra ve ark., 2019). BM bileşenlerinin aynı zamanda AQP1 su kanal proteinlerini inhibe ederek hücre hareketliliğini ve metastazı sınırlandırabildiği bildirilmiştir (Smith ve ark., 2018). Bu bulgular, BM'nin hücre içi sinyalleme yollarının yanında aynı zamanda hücre dışı çevresel etkileşimleri de hedef aldığını göstermektedir. Bu çalışmanın bulguları da önceki bulgularla paralellik göstermektedir.

BM'nin moleküler düzeyde etkili olduğu yollar arasında p53, PI3K/Akt, MAPK ve Notch1 gibi temel sinyal eksenleri yer almaktadır. Bu yolların önemi hem apoptozun uyarılması hem de hücre çoğalmasının durdurulmasından gelmektedir (Fatima ve ark., 2022; Sadaqat ve ark., 2023). Epigenetik düzeyde ise BM'nin DNA metilasyon desenlerini modüle ederek CIMP+ fenotipli tümörlerde tümör baskılayıcı genlerin yeniden ekspresyonunu destekleyebileceği düşünülmüştür (Lemberger, 2010;

Liu ve ark., 2024). Bu etki sayesinde dışkı DNA'sı metilasyon analizleri gibi non-invaziv tanı yöntemleriyle de ilişkilendirilerek, BM'nin tanı destekleyici potansiyeli ortaya konulmuştur.

Immun modülasyon açısından BM'nin CSF-1/CSF-1R eksenine etkisi, makrofaj polarizasyonunu tümör baskılayıcı fenotipe yönlendirebilirken; miRNA'lar üzerindeki regülasyonu M2 fenotipinin baskılanması da gelecek çalışmalar açısından umut vaat etmektedir (Huynh ve ark., 2013; Wadhonkar ve ark., 2023). Bunlara ek olarak yaşam tarzı faktörlerinin etkisini azaltabileceği yönündeki bulgular sayesinde BM'nin kemopreventif ajan olarak kullanımını desteklenmiştir (Tarraga Lopez ve ark., 2010).

AOM/DSS ile oluşturulan inflamasyon temelli kolorektal kanser modelinde, BM'nin hem düşük hem yüksek dozlarında VEGF ekspresyonunu azaltması, anjiyogenezi baskıladığını göstermektedir (Hurwitz, 2012). Kaspaz-3 ile doğrulanan apoptotik artış ise tümör gerilemesini destekler niteliktedir, bu veriler sayesinde BM'nin yalnızca hücre bazlı değil, mikroçevresel dinamikleri de hedef aldığını gösterilmiştir (Burlaka ve ark., 2019; Tepebaşı ve ark., 2023).

BM'nin anti-kanser etkisinin araştırılması ile ilgili olarak yeşil sentez yoluyla metal nanopartikül üretiminde kullanımı, çevresel uyumu da destekleyen yeni stratejiler sunmaktadır. Özellikle bacoside A ve fenolik bileşiklerin nanoparçacıkların stabilizasyonuna katkı sağlayarak ilaç taşıma sistemlerinde değerlendirilebileceği ile bağlantı kurulmuştur (Genç ve ark., 2021). Bunun yanı sıra otofaji mekanizmalarının aktive edilmesiyle hücrel stres yanıtlarının dengelenmesi, BM'nin sadece hücre ölümünü değil, hücrel dayanıklılığı da düzenleyebileceğini ortaya koymaktadır (Das ve ark., 2016).

TMÇ'de inflamasyonun kronikleşmesi, displazi ve tümör progresyonunu kolaylaştırmaktadır. Bu anlamda BM'nin MPO aktivitesini düşürerek doku bütünlüğünü koruması, inflamasyon ilişkili patolojilere karşı koruyucu potansiyelini sergilemektedir (Devi ve ark., 2023). Bu etkinin, bağırsak mikrobiyotası üzerindeki

olası düzenleyici etkilerle birleşimi BM'yi yalnızca kanser tedavisine değil, önleyici yaklaşımlara da entegre edilebilir bir ajan haline getirmektedir (Kinslechner, 2011).

Bir diğer önemli konu TMC'deki bağışıklık baskılayıcı ortamın yeniden programlanmasıdır. Bu alanda BM'nin STAT3, IL-6 ve MDSC gibi yolları düzenlemesi, özellikle immunoterapötik yaklaşımlarla sinerji oluşturabileceğini düşündürmektedir (Church ve Casey, 2004; Jeyasri ve ark., 2020). Antiangiogenik etkilerinin selektif ve fizyolojik düzeyde olması, klasik ajanlara kıyasla daha düşük yan etki profiline sahip bir müdahaleyi mümkün kılmaktadır (Balci ve ark., 2019).

BM'nin umut vaat eden çok yönlü etkilerine rağmen insan çalışmalarında sınırlı veriyle temsil edilmesi, standardize doz formülasyonlarının olmaması ve uzun vadeli toksisite profillerinin belirsizliği gibi faktörler, klinik uygulamalar öncesinde çözülmesi gereken temel sorunlar olarak görünmektedir (Lemberger, 2010; Nur, 2022). Klinik translasyonun sağlanabilmesi için, faz çalışmaları, moleküler düzeyde hedef doğrulamaları ve disiplinler arası çalışmalar yapılması gerekmektedir.

BM'nin antikanser etkileri, hücrel düzeyde apoptotik yanıtları artırmakla sınırlı değildir ve BM tümör mikroçevresini çok aşamalı olarak yeniden programlama potansiyeline sahiptir. Özellikle bağırsak mikrobiyotası üzerindeki düzenleyici etkisinin inflamasyon kaynaklı patolojilerde dengeleyici rol oynayabileceği görülmektedir (Kinslechner, 2011). TMC'nin M2 makrofajlar, STAT3 aktivasyonu gibi immunosupresif bileşenlerini baskılaması, BM'yi potansiyel bir immunomodülatör ajan olarak öne çıkarırken; metabolik stresin azaltılması ve glikoz/lipid metabolizmasına etkileri ise hipoksik TMC ortamında bağışıklık fonksiyonlarını yeniden canlandırabilecek mekanizmaları ileri sürmektedir (Church ve Casey, 2004; Kao ve ark., 2022). Yine BM'nin yeşil sentezle üretilen nanopartiküllerde kullanılabilmesi de hem ilaç taşıyıcı sistemler hem de çevresel sürdürülebilirlik açısından çifte avantaj sağlar (Genç ve ark., 2021). BM bu konuda tekil etki mekanizmalarının yanında çoklu hedeflere yönelik ve sistemik düzeyde işleyen biyolojik yanıtlarla, modern onkolojide adjuvan veya kemopreventif stratejilere entegre edilme potansiyelini taşımaktadır. Bu çalışmada su ile verilmesine rağmen

önemli iyileştirici sonuçlar alınması akıllı ilaç veya nanopartikül kombinasyonları gibi hedefe yönelik preparasyonlarda önemli etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

Birçok çalışma, BM'nin NF- κ B, STAT3, PI3K/Akt ve VEGF gibi sinyal yollarını inhibe ederek inflamasyon ve tümör gelişimini baskıladığını ifade etmiştir (Kaur ve ark., 2017; Sadaqat ve ark., 2023). Ayrıca TNF- α , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin baskılanması ve T hücre aktivitesinin artırılması sayesinde immun mikroçevrede yeniden düzenleme potansiyeli ortaya koyulmuştur. Yaşlanmaya bağlı immunosenesens sürecini hedefleyerek bağışıklık sistemini yeniden aktive edebilmesi ise BM'nin kolon kanserinde yalnızca doğrudan hücre etkisinin yanında sistemik destekleyici rol üstlenebileceğini göstermektedir (Ergün, 2008).

BM'nin oksidatif stres ve mitokondriyal hasarı azaltarak otofaji ve mitofaji süreçlerini desteklemesi, özellikle Beclin-1 ve LC3-II proteinlerinin ekspresyon artışıyla gösterilmiştir (Das ve ark., 2016; Saha ve ark., 2020). Bununla birlikte, yüksek doz uygulamalarının genotoksik risk taşıyabileceği ve hücre canlılığını azaltabileceği gösterilmiş ve güvenli doz aralığının belirlenmesini klinik geçiş için kritik hale getirmiştir (Dogan ve Emsen, 2018). Bu çalışmada ise toksisite ile ilgili herhangi bir bulgu ile karşılaşılmamıştır.

BM'nin stres hormonlarını ve inflamatuvar belirteçleri baskılaması, kolorektal kanser gelişiminde rol oynayan kronik stres faktörlerine karşı koruyucu bir etki sağlayabilir (Chowdhuri ve ark., 2002; Lopresti ve ark., 2021). Ayrıca mikrobiyota üzerindeki düzenleyici etkileri ve antibakteriyel özellikleri sayesinde kolon epitelinin bütünlüğünü destekleyebileceği bildirilmiştir (Mehta ve ark., 2022; Pandey ve ark., 2022). Bu çalışmada mikrobiyolojik incelemeler yapılmamıştır ancak koruyucu etki hem histopatolojik analizlerde hem de immunohistokimyasal bulgulara göre belirgin olarak saptanmıştır.

Tüm bu verilerin sonucunda BM'nin apoptoz indüksiyonu, oksidatif stres baskılanması, anjiyogenez inhibisyonu ve bağışıklık sisteminin yeniden programlanması gibi çoklu hedef mekanizmalar üzerinden KRK tedavisinde etkili olabileceği anlaşılmaktadır. Fakat mevcut çalışmaların çoğunluğu in vitro veya hayvan

modeli düzeyinde olduğu için, insan klinik verilerinin eksikliği, doz optimizasyonu ve uzun dönem toksisite profili klinik translasyon önündeki temel engelleri şekillendirmektedir. Bu nedenle, BM'nin terapötik potansiyelinin tam olarak anlaşılabilmesi için standardize ekstrakt formülasyonları, immun profillemeye analizleri ve disiplinlerarası faz çalışmalarıyla desteklenmesi uygun olacaktır.

Sonuç olarak, BM; apoptoz, anjiyogenez, epigenetik regülasyon, immunmodülasyon ve mikrobiyota etkileşimi gibi birçok mekanizmayı eş zamanlı etkileyebilen doğal bir ajan olarak, kolorektal kanser tedavisinde tamamlayıcı ve önleyici stratejiler açısından incelenmelidir. Ancak bu potansiyelin, bilimsel temelli dozaj, güvenlik ve moleküler etkinlik verileriyle desteklenmesi gerekmektedir ve BM'nin fitoterapötik etkileri yalnızca deneysel değil, klinik düzeyde de değerlendirilerek, modern onkoloji uygulamalarına entegre edilebilir hale getirilmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, BM bitkisinin AOM/DSS ile indüklenen inflamasyon kaynaklı kolorektal kanser modelinde TMC üzerindeki etkileri, çok boyutlu bir yaklaşımla incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Çalışma, BM'nin anti-anjiyojenik, proapoptotik ve antioksidan etkilerini in vivo düzeyde ilk kez değerlendirmiştir. TMC'nin temel belirleyicileri olan anjiyogenez, apoptoz ve oksidatif stres parametreleri üzerinden anlamlı biyolojik etkiler yansıtmaktadır. Deneysel süreçte, Balb/c fareler tercih edilerek, bağışıklık sistemiyle ilişkili mikroçevre tepkilerinin gözlenmesi amaçlanmıştır. BM uygulaması içme suyu yoluyla, fizyolojik koşullara yakın ve invaziv olmayan bir maruziyet modeliyle gerçekleştirilmiş ve uygulama süresi önceki literatürden farklı olarak 2 haftadan 6 haftaya çıkarılarak geç evre tümöral dinamiklerin ve immunosupresif mikroçevrenin daha olgun yanıtları değerlendirilmiştir.

Çalışmada, TMC'nin dört temel boyutu olan vaskülarizasyon (VEGF, CD31), hücre ölümü regülasyonu (kaspaz-3), oksidatif hasar (8-OHdG, 4-HNE) ve stromal yanıtlar hem histopatolojik hem de immunohistokimyasal düzeyde incelenmiştir. BM uygulaması sonucunda VEGF ve CD31 ekspresyonunun azaldığı, kaspaz-3 düzeylerinin arttığı ve oksidatif stres belirteçlerinin baskılandığı gözlemlenmiştir. Bu değişiklikler, morfolojik olarak tümör çapında küçülme, stromal yoğunlukta azalma ve nekroz gibi yapısal bulgularla da örtüşmektedir. Bu yönüyle tez hem bir bitkisel ajanın etkilerini göstermiş hem de aynı zamanda seçilen belirteçlerin biyolojik yönleriyle yüksek işlevsel kapsayıcılığa sahip olması sayesinde, etik olarak minimal sayıda hayvanla maksimum veri üretimi sağlamıştır.

Metodolojik olarak, BM'nin geç evre TMC'ye yönelik etkilerinin değerlendirilmesi, çalışmayı mevcut literatürden ayıran başlıca özgünlüklerden biri olmuştur. Buna ilaveten dozaj uygulamasında bireysel farklılıklar gibi sınırlılıklar dikkatle belirtilmiş, moleküler yolak analizlerinin bazı yönlerden sınırlı kaldığı da bilimsel şeffaflık içinde sunulmuştur.

Elde edilen bulgular, BM'nin yalnızca destekleyici değil, TMC'yi yeniden şekillendiren potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir. TMC'nin bağışıklık yanıtı, inflamasyon, apoptotik denge ve vaskülarizasyon gibi temel bileşenlerine müdahale ederek tümör progresyonunu baskılayabileceği öne sürülmektedir. Bu bağlamda BM'nin hem önleyici hem de ilerlemiş evre tümörlerde de etkili olabileceği vurgulanmaktadır. Klinik öncesi bulgular, fitoterapötik ajanların konvansiyonel tedavilere tamamlayıcı nitelikte eklenebileceğini anlatmakta ve özellikle kemoterapiye yanıtı artırabilecek ve immunoterapiye zemin hazırlayabilecek stratejiler için zemin oluşturmaktadır.

Sonuç olarak bu tez, BM'nin AOM/DSS ile oluşturulan kolorektal kanser modelinde TMC üzerindeki etkilerini bütüncül şekilde değerlendirerek, literatürdeki önemli bir boşluğun doldurulmasında yardımcı olmuştur. Seçilen modelin belirteçler ve uygulama protokolüyle birlikte hem farmakolojik hem onkolojik anlamda translasyonel değeri yüksek bir katkı sunmuş olması hedeflenmiş; bitkisel ajanların modern onkolojik yaklaşımlar içinde değerlendirilebileceğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, ileride farklı kanser türleri, kombinasyon tedavileri ve daha geniş ölçekli prelinik/klinik çalışmalar için BM'yi umut verici bir fitoterapötik ajan olarak öne sürmektedir.

Bu tezde, BM'nin AOM/DSS ile indüklenen KRK modelinde TMC'ye etkisi anjiyogenez, apoptoz ve oksidatif stres gibi temel parametreler üzerinden incelenmiştir. Ancak çalışmanın belirli metodolojik ve teknik sınırlılıkları da bulunmaktadır. En başta, BM'nin içme suyu yoluyla uygulanması, bireysel su tüketim farkları nedeniyle doz standardizasyonunu zorlaştırmış ve farmakokinetik değerlendirmeleri sınırlamıştır. Ayrıca çalışmada yalnızca bazı moleküler belirteçlerin incelenmiş olması, BM'nin çoklu biyolojik yollar üzerindeki etkilerinin bütüncül olarak anlaşılmasını engellemiştir. Örneğin PI3K/AKT, NF- κ B ya da Wnt/ β -katenin gibi sinyal yolları çalışmaya dahil edilememiştir. BM içeriğindeki bacoside A ve B gibi karışım yapıdaki bileşikler net moleküler hedeflerin belirlenmesini güçleştirmektedir. Ayrıca hayvan deneylerinden elde edilen verilerin insan biyolojisine doğrudan aktarılabilirliği, biyoyararlanım farklılıkları ve sınırlı klinik veri nedeniyle belirsizliğini korur. Özellikle oral yoldan uygulanan BM'nin gastrointestinal

emilim, bireysel metabolizma farkları ve sistemik etkileri üzerindeki değişkenliklerin terapötik etkilerin standardizasyonunu kısıtlaması söz konusudur.

Bunların yanı sıra, çalışmada mikrobiyota gibi TMC'yi doğrudan etkileyen önemli parametreler tamamen değerlendirilmemiştir. Halbuki BM'nin olası probiyotik etkileri, mikrobiyotanın inflamasyon ve genetik instabilite üzerindeki rolüyle birlikte düşünüldüğü zaman bu alan gelecekteki araştırmalar için önemli bir fırsat sunmaktadır. Bir başka olası sınırlılık çalışma süresinin tümör progresyonunun ileri evrelerini kapsamamış olması olabilir. Bu durum, BM'nin uzun dönem koruyucu veya terapötik etkilerini belirleme açısından eksiklik olarak değerlendirilebilir.

Güncel literatür, BM'nin moleküler etkilerinin daha derinlemesine anlaşılabilmesi için, EMS, NaN₃ gibi kimyasal mutajenlerle varyantlaştırılmış hatların incelenmesinin önemli bir yaklaşım olduğunu ifade etmiştir. Bu varyantların sekonder metabolit profillerinde yaratabileceği değişimlerin BM'nin farmakolojik etkilerinin yeniden tanımlanmasına katkı sağlayabilecektir. Bununla birlikte bu çalışmada varyant analizler ve genetik modifikasyonlara yönelik ileri uygulamalara yer verilememiştir. Bu tercih, tez süresinin sınırlılığı, deney hayvanlarıyla yürütülen etik onay kapsamı ve laboratuvar altyapısının mevcut olanakları çerçevesinde, öncelikli araştırma hedeflerine odaklanmak için yapılmıştır. Benzer şekilde, BM'nin nanoteknoloji tabanlı ilaç taşıma sistemlerinde kullanımı üzerine yapılan çalışmalar, özellikle yeşil sentezle elde edilen gümüş ve altın nanopartiküllerin apoptoz indüksiyonu, fototermal etki ve hedefe yönelik dağılım gibi özellikleri bakımından ilgi çekicidir ancak bu tezde nanoteknolojik uygulamalara dair deneysel bir modül planlanmamıştır. Bunun nedeni, çalışmanın öncelikli olarak TMC için biyolojik etkileri anlama amacına odaklanması ve sınırlı kaynakların etkin kullanımı doğrultusunda bir modüler ilerleme stratejisi benimsenmiş olmasıdır.

Bu doğrultuda, moleküler düzeyde protein ve gen ekspresyonlarını belirlemeye yönelik Western blot, qRT-PCR gibi analizlere, MLH1 metilasyonu, CIMP+ gibi epigenetik regülasyonun incelenmesine ve immun hücre fenotiplemesine bu tez kapsamında yer verilmemiştir. Bu eksiklikler metodolojik bir eksiklikten değil, sürenin, altyapının ve etik onayların oluşturduğu çerçeve dahilinde planlı bir

kısıtlamadan kaynaklanmaktadır. Öte yandan hayvanlardan alınan doku örneklerinin ileri analizlere olanak verecek şekilde saklanmış olması, gelecekte olası bu yönlü çalışmaların için önemli bir bilimsel hazırlık sağlamıştır.

Sonuç olarak, bu tez BM'nin kolorektal tümör mikroçevresi üzerindeki çok yönlü etkilerini ortaya koyan değerli öncül bulgular sunmaktadır, yine de bulguların translasyonel tıpta klinik anlam kazanabilmesi için doz standardizasyonu, mikrobiyota etkileşimleri, epigenetik ve moleküler yollara dair daha ileri tekniklerle desteklenmiş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut çalışma, bu bağlamda hem öncü nitelikte bir prelinik model oluşturmuş, hem de gelecekte disiplinlerarası iş birlikleriyle geliştirilebilecek bütüncül projelere de sağlam bir başlangıç noktası teşkil etme potansiyeline sahiptir.

KAYNAKLAR

- Agarwal SV& RC (2013).** Chemopreventive Action of Bacopa monnieri (Brahmi) Hydromethanolic Extract on DMBA- Induced Skin Carcinogenesis in Swiss Albino Mice. *J Pharmacogn Phytochem* 2:197–202.
- Anderson NM, Simon MC (2020).** The tumor microenvironment. *Current Biology* 30:R921–R925.
- Aytaç HÖ (2020).** Gastrointestinal Sistem Kanserlerinin Cerrahisi. Akademisyen Kitabevi.
- Balci MA, Özyiğit MÖ, İpek V, Kafa İM, Kurt E (2019).** Investigation of the Pathogenesis and Treatment Efficiency of Bevacizumab-Induced Hypertension in the Rat Model. *Medical Laboratory Technology Journal* 5:16–23.
- Banerjee S, Anand U, Ghosh S, Ray D, Ray P, Nandy S, Deshmukh GD, Tripathi V, Dey A (2021).** Bacosides from Bacopa monnieri extract: An overview of the effects on neurological disorders. *Phytotherapy Research* 35:5668–5679.
- Bernanke J, Köhler* H-R (2009).** The Impact of Environmental Chemicals on Wildlife Vertebrates. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Whitacre DM (editor). New York, NY: Springer; pp.1–47
- Bhullar JS, Subhas G, Silberberg B, Tilak J, Andrus L, Decker M, Mittal VK (2011).** A Novel Nonoperative Orthotopic Colorectal Cancer Murine Model Using Electrocoagulation. *Journal of the American College of Surgeons* 213:54–60.
- Boopathy L, Kumar SS, Ponnusamy K, Arumugam S, Gopal T, Durai S, Ravikumar S, Arumugam M (2024).** Animal Models: A Tool for Colon Cancer Research.
- Brierley JD, Giuliani M, O’Sullivan B, Rous B, Eycken EV (2025).** TNM Classification of Malignant Tumours. John Wiley & Sons.
- Burlaka AP, Burlaka AA, Virko SV, Ganusevich II (2019).** Molecular mechanisms of oxidation damage and liver cell dysfunction in patients with metastatic colorectal cancer. *Experimental Oncology* 41:328–334.
- Cameron IL (2011).** Promotional Role of Lymphoid Nodules in Colorectal Cancer: Implications for Endoscopic Screening and Prevention. *TOCOLCJ* 4:6–12
- Cerquetella M, Spaterna A, Laus F, Tesei B, Rossi G, Antonelli E, Villanacci V, Bassotti G (2010).** Inflammatory bowel disease in the dog: differences and similarities with humans. *World J Gastroenterol* 16:1050–1056.

- Chatterjee M, Verma P, Palit G (2010).** Comparative evaluation of *Bacopa monniera* and *Panax quinquefolium* in experimental anxiety and depressive models in mice. *Indian J Exp Biol* **48**:306–313.
- Chowdhuri DK, Parmar D, Kakkar P, Shukla R, Seth PK, Srimal RC (2002).** Antistress effects of bacosides of *Bacopa monnieri*: modulation of Hsp70 expression, superoxide dismutase and cytochrome P450 activity in rat brain. *Phytotherapy Research* **16**:639–645.
- Church J, Casey G (2004).** Molecular Genetics of Colorectal Neoplasia. In: *Molecular Genetics of Colorectal Neoplasia: A Primer for the Clinician*. Church J, Casey G (editors). Boston, MA: Springer US; pp.69–89
- Clapper ML, Cooper HS, Chang W-CL (2007).** Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacologica Sinica* **28**:1450–1459.
- Colangelo T, Polcaro G, Muccillo L, D’Agostino G, Rosato V, Ziccardi P, Lupo A, Mazzocchi G, Sabatino L, Colantuoni V (2017).** Friend or foe?: The tumour microenvironment dilemma in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1867**:1–18.
- Cuvertoret-Sanz M, Weissenbacher-Lang C, Lunardi M, Brunthaler R, Coma M, Weissenböck H, Segalés J (2019).** Coinfection with *Entamoeba polecki* and *Brachyspira hyodysenteriae* in a pig with severe diarrhea. *J Vet Diagn Invest* **31**:298–302.
- Das DN, Naik PP, Nayak A, Panda PK, Mukhopadhyay S, Sinha N, Bhutia SK (2016).** *Bacopa monnieri*-Induced Protective Autophagy Inhibits Benzo[a]pyrene-Mediated Apoptosis. *Phytotherapy Research* **30**:1794–1801.
- Devi K, Bali A, Bhatia P, Singh N, Jaggi AS (2023).** Exploring the ameliorative potential of *Bacopa monnieri* in acetic acid induced ulcerative colitis in mice. *Natural Product Research* **0**:1–6.
- Dogan M, Emsen B (2018).** Anti-cytotoxic-genotoxic influences of in vitro propagated *Bacopa monnieri* L. Pennell in cultured human lymphocytes. *Eurasian J Bio Chem Sci* **1**:48–53.
- Dzhalilova D, Zolotova N, Fokichev N, Makarova O (2023).** Murine models of colorectal cancer: the azoxymethane (AOM)/dextran sulfate sodium (DSS) model of colitis-associated cancer. *PeerJ* **11**:e16159.
- Emsen B, Dogan M (2018).** Evaluation of antioxidant activity of in vitro propagated medicinal *Ceratophyllum demersum* L. extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* **17**.
- Erdman SE, Rao VP, Poutahidis T, Rogers AB, Taylor CL, Jackson EA, Ge Z, Lee CW, Schauer DB, Wogan GN, Tannenbaum SR, Fox JG (2009).** Nitric oxide and TNF- α trigger colonic inflammation and carcinogenesis in

Helicobacter hepaticus-infected, Rag2-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:1027–1032.

Ergün MA (2008). Replikatif Yaşlanma, Hücresel Senesens ve Apoptozis: Sonuçları ve Hastalıklardaki Önemi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* **28**:21–26.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**:81–128.

Fadlallah H, El Masri J, Fakhereddine H, Youssef J, Chemaly C, Doughan S, Abou-Kheir W (2024). Colorectal cancer: Recent advances in management and treatment. *World J Clin Oncol* **15**:1136–1156.

Fatima U, Roy S, Ahmad S, Al-Keridis LA, Alshammari N, Adnan M, Islam A, Hassan MdI (2022). Investigating neuroprotective roles of Bacopa monnieri extracts: Mechanistic insights and therapeutic implications. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **153**:113469.

Folkman J (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology* **29**:15–18.

Fusco W, Bricca L, Kaitsas F, Tartaglia MF, Venturini I, Rugge M, Gasbarrini A, Cammarota G, Ianiro G (2024). Gut microbiota in colorectal cancer: From pathogenesis to clinic. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **72**:101941.

Gabbita SP, Robinson KA, Stewart CA, Floyd RA, Hensley K (2000). Redox Regulatory Mechanisms of Cellular Signal Transduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **376**:1–13.

Garrido F, Aptsiauri N, Doorduijn EM, Garcia Lora AM, van Hall T (2016). The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* **39**:44–51.

Genç S, Pehlivanoglu S, Aydin Acar C, Yeşilot Ş (2021). Vitis vinifera Çekirdek Ekstraktı Kullanılarak Altın Nanopartiküllerin Yeşil Sentezi ve Kolon Kanseri (HT-29) Hücrelerinde Anti-kanser Özelliklerinin Değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* **28**.

Ghosh S, Khanam R, Acharya Chowdhury A (2021). The Evolving Roles of Bacopa monnieri as Potential Anti-Cancer Agent: A Review. *Nutrition and Cancer* **73**:2166–2176.

Ghosh T, Maity TK, Singh J (2011). Evaluation of antitumor activity of stigmaterol, a constituent isolated from Bacopa monnieri Linn aerial parts against Ehrlich Ascites Carcinoma in mice. *Orient Pharm Exp Med* **11**:41–49.

Guo Y, Wang M, Zou Y, Jin L, Zhao Z, Liu Q, Wang S, Li J (2022). Mechanisms of chemotherapeutic resistance and the application of targeted nanoparticles

for enhanced chemotherapy in colorectal cancer. *Journal of Nanobiotechnology* **20**:371.

He X, Luan F, Yang Y, Wang Z, Zhao Z, Fang J, Wang M, Zuo M, Li Y (2020). *Passiflora edulis*: An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. *Front Pharmacol* **11**:617.

Heber D (1999). *Nutritional Oncology*. San Diego, Calif. u.a.: Academic Press.

Huangteerakul C, Aung HM, Thosapornvichai T, Duangkaew M, Jensen AN, Sukrong S, Ingkaninan K, Jensen LT (2021). Chemical-Genetic Interactions of *Bacopa monnieri* Constituents in Cells Deficient for the DNA Repair Endonuclease RAD1 Appear Linked to Vacuolar Disruption. *Molecules* **26**:1207.

Hurwitz HI (2012). Anti-angiogenesis therapy in colorectal cancer. *Colorectal Cancer* **1**:463–465.

Huynh D, Akçora D, Malaterre J, Chan CK, Dai X-M, Bertoncello I, Stanley ER, Ramsay RG (2013). CSF-1 Receptor-Dependent Colon Development, Homeostasis and Inflammatory Stress Response. *PLOS ONE* **8**:e56951.

Jeyasri R, Muthuramalingam P, Suba V, Ramesh M, Chen J-T (2020). *Bacopa monnieri* and Their Bioactive Compounds Inferred Multi-Target Treatment Strategy for Neurological Diseases: A Cheminformatics and System Pharmacology Approach. *Biomolecules* **10**:536.

Kalyani MI, Lingaraju SM, Salimath BP (2013). A pro-apoptotic 15-kDa protein from *Bacopa monnieri* activates caspase-3 and downregulates Bcl-2 gene expression in mouse mammary carcinoma cells. *J Nat Med* **67**:123–136.

Kao K-C, Vilbois S, Tsai C-H, Ho P-C (2022). Metabolic communication in the tumour-immune microenvironment. *Nat Cell Biol* **24**:1574–1583.

Kasai H (1997). Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* **387**:147–163.

Kaur P, Robin, Makanjuola VO, Arora R, Singh B, Arora S (2017). Immunopotentiating significance of conventionally used plant adaptogens as modulators in biochemical and molecular signalling pathways in cell mediated processes. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **95**:1815–1829.

Kinslechner K (2011). The influence of intestinal flora on genetic instability and cancer predisposition in p53-deficient mice. University of Veterinary Medicine Vienna.

Koczurkiewicz P, Łojewski M, Piska K, Michalik M, Wójcik-Pszczola K, Szewczyk A, Hałaszuk P, Pękala E, Muszyńska B (2017). Chemopreventive and Anticancer Activities of *Bacopa Monnieri* Extracted from Artificial

- Kumar EP, Elshurafa AA, Elango K, Subburaju T, Suresh B (1998).** Cytotoxic And Anti –Tumour Properties Of Ethanolic Extract Of Bacopa Monnieri (L) Penn. *Anc Sci Life* **17**:228–234.
- Kumar S, Mondal AC (2016).** Neuroprotective, Neurotrophic and Anti-oxidative Role of Bacopa monnieri on CUS Induced Model of Depression in Rat. *Neurochem Res* **41**:3083–3094.
- Lemberger U (2010).** Analysis of DNA methylation in colorectal cancer patients. Medical University of Vienna.
- Liu Y, Ming H, Xu L, Li L, Liu Q, Zhao J, Zhong C, Li H (2024).** DNA methylation analysis of the SDC2, SEPT9 and VIM genes in fecal DNA for colorectal cancer diagnosis. *BMC Cancer* **24**:1205.
- Lopresti AL, Smith SJ, Ali S, Metse AP, Kalns J, Drummond PD (2021).** Effects of a Bacopa monnieri extract (Bacognize®) on stress, fatigue, quality of life and sleep in adults with self-reported poor sleep: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *J Funct. Foods* **85**:104671.
- Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D (1997).** MAP3K-related kinase involved in NF-KB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* **385**:540–544.
- Martineau D, Lair S, Guise SD, Liscomb TP, Beland P (1999).** Cancer in beluga whales from the St Lawrence Estuary, Quebec, Canada: A potential biomarker of environmental contaminatio. *J Cetacean Res Manage* 249–265.
- Mehta J, Utkarsh K, Fuloria S, Singh T, Sekar M, Salaria D, Rolta R, Begum MY, Gan SH, Rani NNIM, Chidambaram K, Subramaniyan V, Sathasivam KV, Lum PT, Uthirapathy S, Fadare OA, Awofisayo O, Fuloria NK (2022).** Antibacterial Potential of Bacopa monnieri (L.) Wettst. and Its Bioactive Molecules against Uropathogens—An In Silico Study to Identify Potential Lead Molecule(s) for the Development of New Drugs to Treat Urinary Tract Infections. *Molecules* **27**:4971.
- Meyiah A, Khan FI, Alfaki DA, Murshed K, Raza A, Elkord E (2025).** The colorectal cancer microenvironment: Preclinical progress in identifying targets for cancer therapy. *Translat. Oncology* **53**:102307.
- Mirza K (2020).** İn Vitro Koşullarda Bacopa Monnieri L.’Nin Farklı Kimyasal Mutajenlerin Etkisi. M.S.
- Mirza K, Aasim M, Katırcı R, Karataş M, Ali SA (2023).** Machine Learning and Artificial Neural Networks-Based Approach to Model and Optimize Ethyl Methanesulfonate and Sodium Azide Induced In Vitro Regeneration and Morphogenic Traits of Water Hyssops (Bacopa monnieri L.). *J Plant Growth Regul* **42**:3471–3485.

- Mishra SR, Yadav PK, Nandhakumar P, Saini M, Kumar A, Kataria M (2019).** In Vitro Analysis of Bacosine as Novel Therapeutic Agent for Murine Breast Cancer. *Proc Natl Acad Sci, India, Sect B Biol Sci* **89**:511–515.
- Mitselou A (2013).** Association Between Thrombospondin-1, Angiogenesis Related Markers, and Extracellular Matrix Components with Colorectal Cancer Outcome. *TOCOLCJ* **6**:1–9.
- Mittal VK, Bhullar JS, Jayant K (2015).** Animal models of human colorectal cancer: Current status, uses and limitations. *World J Gastroenterol* **21**:11854–11861.
- Nasrallah A, El-Sibai M (2014).** Colorectal cancer causes and treatments: A minireview. *Open Colorectal Cancer J* **7**:1–4.
- Nur AE (2022).** Therapeutic Targeting of Molecular Pathways in Colorectal Cancer. *Exp. Oncol* **44**:2–6.
- Ozfirat EC, Topal A, Akkoc A, Satar NYG, Ipek V, Pamukçular O, Uçkan EM (2022).** Tarantula cubensis extract (Theranekron®) inhibits inflammation in carrageenan-induced acute paw edema in rats. *Arq Bras Med Vet Zootec* **74**:56–64.
- Palethorpe HM, Smith E, Tomita Y, Nakhjavani M, Yool AJ, Price TJ, Young JP, Townsend AR, Hardingham JE (2019).** Bacopasides I and II Act in Synergy to Inhibit the Growth, Migration and Invasion of Breast Cancer Cell Lines. *Molecules* **24**:3539.
- Pandey A, Madan S, Sandhiya K, Sharma R, Raturi A, Bhatt A, Gaurav N (2022).** Comparison of Antioxidant, Phytochemical Profiling of Bacopa monnieri (Brahmi). *The Scientific Temper* **13**:285–292.
- Parang B, Barrett CW, Williams CS (2016).** AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Methods Mol Biol* **1422**:297–307.
- Porter AG, Jänicke RU (1999).** Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**:99–104.
- Ramawat KG, Merillon JM (editors) (2008).** Bioactive Molecules and Medicinal Plants. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Remke M, Groll T, Metzler T, Urbauer E, Kövilein J, Schnalzger T, Ruland J, Haller D, Steiger K (2024).** Histomorphological scoring of murine colitis models: A practical guide for the evaluation of colitis and colitis-associated cancer. *Exp. Mol. Pathol.*, **140**:104938.
- Robertis MD, Massi E, Poeta ML, Carotti S, Morini S, Cecchetelli L, Signori E, Fazio VM (2011).** The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog* **10**:9.

- Sadaqat M, Qasim M, Tahir ul Qamar M, Masoud MS, Ashfaq UA, Noor F, Fatima K, Allemailem KS, Alrumaihi F, Almatroudi A (2023).** Advanced network pharmacology study reveals multi-pathway and multi-gene regulatory molecular mechanism of *Bacopa monnieri* in liver cancer based on data mining, molecular modeling, and microarray data analysis. *Comp Biol. Med.* **161**:107059.
- Saha S, Mahapatra KK, Mishra SR, Mallick S, Negi VD, Sarangi I, Patil S, Patra SK, Bhutia SK (2020).** *Bacopa monnieri* inhibits apoptosis and senescence through mitophagy in human astrocytes. *Food Chem. Toxicol.*, **141**:111367.
- Sharma P, Allison JP (2020).** Dissecting the mechanisms of immune checkpoint therapy. *Nat Rev Immunol* **20**:75–76.
- Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, Smith RA, Jemal A (2023).** Colorectal cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **73**:233–254.
- Singh V, Kumar K, Purohit D, Verma R, Pandey P, Bhatia S, Malik V, Mittal V, Rahman MdH, Albadrani GM, Arafah MW, El-Demerdash FM, Akhtar MF, Saleem A, Kamel M, Najda A, Abdel-Daim MM, Kaushik D (2021).** Exploration of therapeutic applicability and different signaling mechanism of various phytopharmacological agents for treatment of breast cancer. *Biomed Pharmacot.*, **139**:111584.
- Sluyser M (2002).** Apoptosis in Normal Development and Cancer. CRC Press.
- Smith E, Palethorpe HM, Tomita Y, Pei JV, Townsend AR, Price TJ, Young JP, Yool AJ, Hardingham JE (2018).** The Purified Extract from the Medicinal Plant *Bacopa monnieri*, Bacopaside II, Inhibits Growth of Colon Cancer Cells In Vitro by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Cells* **7**:81.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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 J Clinicians* **71**:209–249.
- Syn NL, Teng MWL, Mok TSK, Soo RA (2017).** De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *The Lancet Oncology* **18**:e731–e741.
- Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H (2003).** A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.*, **94**:965–973.
- Tarraga Lopez PJ, Solera Albero J, A. Carbayo Herencia J, Rodriguez Montes JA, A. Lopez Cara M, Celada Rodriguez A (2010).** Impact of Life Habits on Colorectal Cancer. *TOCOLCJ* **3**:12–22

- Tepebaşı MY, Büyükbayram Hİ, Özmen Ö, Taşan Ş, Selçuk E (2023).** Dexpanthenol ameliorates doxorubicin-induced lung injury by regulating endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, **396**:1837–1845.
- Thaker AI, Shaker A, Rao MS, Ciorba MA (2012).** Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). *J Vis Exp.*, 4100.
- Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM (2016).** Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.*, **16**:275–287.
- Wadhonkar K, Singh N, Heralde III FM, Parihar SP, Hirani N, Baig MS (2023).** Exosome-derived miRNAs regulate macrophage-colorectal cancer cell cross-talk during aggressive tumor development. *Colorectal Cancer.*, **12**:CRC40.
- Williams R, Münch G, Gyengesi E, Bennett L (2014).** Bacopa monnieri (L.) exerts anti-inflammatory effects on cells of the innate immune system in vitro. *Food Funct.*, **5**:517–520.
- Wu F, Yang J, Liu J, Wang Y, Mu J, Zeng Q, Deng S, Zhou H (2021).** Signaling pathways in cancer-associated fibroblasts and targeted therapy for cancer. *Sig Transduct Target Ther.*, **6**:1–35.
- Zekri JM, Abubacker MZ (2010).** Bevacizumab May Overcome Clinical Tumor Drug Resistance to Irinotecan Based Chemotherapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer: Case Report. *TOCOLCJ* **3**:23–26.