

Bürke ÇIRÇIRLI

DOKTORA TEZİ

2025-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE
SPARSTOLONİN B'NİN TOLL LİKE RESEPTÖR
YOLAĞINA ETKİSİ

Bürke ÇIRÇIRLI

DOKTORA TEZİ

2025-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE
SPARSTOLONİN B’NİN TOLL LİKE RESEPTÖR
YOLAĞINA ETKİSİ**

Bürke ÇIRÇIRLI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mutay ASLAN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından TDK-2024-6590, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından 31481 ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 124S394 proje numaraları ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2025-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoteknoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 22/12/2025

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Tıbbi Biyokimya ABD/ Tıbbi Biyoteknoloji ABD
Gen ve H¼cre Tedavisi ABD

¼ye : Prof. Dr. Gamze TANRI¼VER
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Histoloji ve Embriyoloji ABD/Tıbbi Biyoteknoloji ABD

¼ye : Prof. Dr. Ece şimşek
Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fak¼ltesi
Diyetetik ABD/Tıbbi Biyoteknoloji ABD

¼ye : Prof. Dr. G¼zin AYKAL
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi
Tıbbi Biyokimya ABD

¼ye : Doç. Dr. Hamit Yaşar ELLİDAğ
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi
Tıbbi Biyokimya ABD

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Bürke ÇIRÇIRLI

Prof. Dr. Mutay ASLAN

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, bilimsel merakımı besleyen ve akademik gelişimime katkı sunan değerli danışmanım Prof. Dr. Mutay ASLAN'a en derin teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecim boyunca, tezimi ve diğer tüm akademik çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Tıbbi Biyoteknoloji Ana Bilim Dalına bana sağladığı destek, kaynaklar ve akademik ortam için teşekkür ederim. Bu deneyim, hem kişisel hem de akademik açıdan bana büyük katkılar sağladı. Bu fırsatı sunan tüm hocalarıma minnettarım. Ayrıca bu süreçte güler yüzleri, içtenlik ve sabırlarıyla bana yardımcı olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İdari kadrosuna çok teşekkür ederim.

Araştırmamın hayata geçmesine olanak sağlayan **Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP- TDK-2024-6590)**, **Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK-124S394)** ve **Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB-31481)**'na destekleri için teşekkür ederim. Doktora eğitimim sürecinde **2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programından yararlandığım TÜBİTAK'a** ayrıca teşekkürlerimi sunarım. Bilime verilen her destek, yeni keşiflerin kapısını aralar ve bu kapıyı bana açtıkları için minnettarım.

Ve en büyük teşekkür hayatımın her anında yanımda olan, bana olan inançlarını hiç kaybetmeyen ve her daim desteklerini esirgemeyen değerli anneciğime ve beni bir yerlerden izlediğine ve duyduğuna inandığım rahmetli babacığıma... Sadece tez sürecinde değil, hayatımın her döneminde bana gösterdikleri sabır, sevgi ve özveri, bu başarının arkasındaki en güçlü motivasyon kaynağım olmuştur. Onların varlıkları bana güç verdi, zorlandığımda bile pes etmeden devam etmemi sağladılar. Onların bana sunduğu güven, her zaman önüme yeni yollar açmamı sağladı. Sabırları, fedakârlıkları ve koşulsuz sevgileri olmadan bu yolculuk çok daha zorlu olurdu. Hayatımın her alanında her zaman yanımda oldular. Onların gösterdiği destek ve sağladıkları huzur, bana bu süreci daha verimli geçirme fırsatı sundu. Hayatımın her anında bana güç veren aileme sağladıkları tüm değerli katkılar için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Hayata karşı duruşumu şekillendiren en kıymetli öğretmenlerim oldunuz.

Son olarak, her şeye rağmen pes etmeyen, yorulduğunda bile devam eden, hata yapmaktan korkmadan öğrenmeye devam eden kendime teşekkür etmek istiyorum. Biliyorum ki bu yolculuk burada bitmiyor, aksine yeni başlangıçların kapısını aralıyor... Bu tez sadece akademik bir başarı değil, aynı zamanda kendime duyduğum güvenin ve inancın bir yansıması. En büyük ödölüm ise bu sürecin sonunda kendime duyduğum saygı ve sevgi oldu. Zor zamanlarda bile pes etmeyip, devam etme gücünü kendi içimde bulduğum için şükrediyorum. Ve en önemlisi, kendi değerimi bilerek, en iyisini yapmak için her an elimden gelenin fazlasını verdim. Kendime teşekkür ediyorum, çünkü bu yolculuk sadece bir akademik başarı değil, aynı zamanda kendimi keşfetme, sınırlarımı aşma ve daha güçlü bir birey olma süreciydi. Zorlukların üstesinden gelerek, hem bilimsel hem de kişisel olarak büyük bir dönüşüm geçirdim. Bu yolculuk bana yalnızca bilgi değil, aynı zamanda hayata karşı duruşumu şekillendirecek değerli dersler sundu. Kendime olan inancım ve kararlılığım sayesinde, yalnızca bir araştırmacı olarak değil, daha olgun bir insan olarak da yoluma devam ediyorum.

Teşekkürler...

ÖZET

Amaç: Kolorektal kanser, dünya genelinde en sık görülen malignitelerden biri olup kansere bağlı mortaliteler arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Kolorektal kanserde Toll like reseptör 2 ve 4 (TLR2/4) ekspresyonunun artışı inflamatuvar yanıtı güçlendirerek tümör gelişimini desteklemektedir. Bu çalışmada, TLR2/4 antagonisti olan Sparstolonin B (SsnB)'nin insan kolorektal kanser hücrelerinde (HCT-116) hücre canlılığı, inflamatuvar sinyal yolları, apoptotik süreçler ve sfingolipid metabolizması üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Yöntem: HCT-116 ve sağlıklı fibroblast (BJ) hücrelerine SsnB (3.125-50 μ M) ve/veya forbol 12-miristat 13-asetat (PMA; 1-10 nM) uygulaması yapıldı. Bu uygulamaların hücre sağkalımına etkileri, doz-zaman bağımlı olarak 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi ile değerlendirildi. Hücre modellerinde SsnB'nin proliferasyona etkileri çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) enzime bağlı immünosorbent test (ELISA) ve immünofloresan analiz ile değerlendirildi. Apoptoz üzerine etkileri ise parçalanmış terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP çentik uç etiketleme (TUNEL), akış sitometrisi ve kesilmiş kaspaz-3 immünofloresan analiz ile değerlendirildi. TLR sinyalizasyonu, sitokin ekspresyonu ve sfingolipid seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (q-RT PCR), ELISA, immünofloresan boyama ve kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) kullanılarak ölçüldü.

Bulgular: SsnB, HCT-116 hücre canlılığını doz ve zamana bağlı olarak azaltmış, BJ hücreleri üzerinde minimal etki göstermiştir. PMA uygulaması hücre proliferasyonunu artırırken, SsnB bu etkiyi baskılamıştır. SsnB uygulanan gruplarda kesilmiş kaspaz-3 aktivasyonu ve TUNEL pozitif hücre oranı artmıştır. PMA ile uyarılan TLR2/4, MyD88, p-ERK ve pNF- κ B seviyeleri SsnB ile belirgin biçimde baskılanmıştır. SsnB uygulanan gruplarda inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) seviyeleri azalmış, seramid (C18, C20, C22 ve C24) seviyeleri artmış ve tümör progresyonuyla ilişkili S1P ve C1P seviyeleri düşmüştür.

Sonuç: SsnB, kolon kanseri hücrelerinde proliferasyonu seçici olarak inhibe eder, apoptozu indükler, TLR aracılı inflamatuvar yanıtı ve sfingolipid metabolizmasını modüle eder. BJ hücrelerinde ise belirgin bir toksisite oluşturmaması, SsnB'yi kolorektal kanser tedavisinde hedefe yönelik bir terapötik ajan olarak öne çıkarmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Sparstolonin B; kolorektal kanser; apoptoz; toll like reseptör; inflamasyon; sfingolipid

ABSTRACT

Objective: Colorectal cancer is among the most common malignancies worldwide and ranks third in cancer-related mortality. Increased expression of Toll-like receptors 2 and 4 (TLR2/4) in colorectal cancer enhances the inflammatory response and promotes tumor development. This study investigated the effects of Sparstolonin B (SsnB), a TLR2/4 antagonist, on cell viability, inflammatory signaling pathways, apoptotic processes, and sphingolipid metabolism in human colorectal cancer cells (HCT-116).

Methods: HCT-116 and healthy fibroblast (BJ) cells were treated with SsnB (3.125-50 μ M) and/or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 1-10 nM). The effects of these treatments on cell survival were evaluated in a dose- and time-dependent manner using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The impact of SsnB on proliferation was assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence analysis. Apoptotic effects were determined using terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL), flow cytometry, and cleaved caspase-3 immunofluorescence analysis. TLR signaling, cytokine expression, and sphingolipid levels were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (q-RT PCR), ELISA, immunofluorescence staining, and mass spectrometry (LC-MS/MS).

Results: SsnB reduced HCT-116 cell viability in a dose- and time-dependent manner, with minimal effects on BJ cells. While PMA treatment enhanced proliferation, SsnB suppressed this effect. Cleaved caspase-3 activity and the proportion of TUNEL-positive cells increased in the SsnB-treated groups. PMA-induced increases in TLR2/4, MyD88, p-ERK, and p-NF- κ B levels were markedly suppressed by SsnB. Moreover, SsnB reduced pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6), increased ceramide species (C18, C20, C22, and C24), and decreased S1P and C1P levels associated with tumor progression.

Conclusion: SsnB selectively inhibits proliferation, induces apoptosis, and modulates TLR-mediated inflammatory responses and sphingolipid metabolism in colorectal cancer cells. Its lack of significant toxicity in healthy fibroblasts highlights SsnB as a promising targeted therapeutic agent for colorectal cancer treatment.

Keywords: Sparstolonin B; colorectal cancer; apoptosis; toll-like receptor; inflammation; sphingolipid

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser Tanımı ve Hücresel Temeli	3
2.2. Kolorektal Kanser	5
2.3. Sparstolonin B	8
2.4. Forbol 12-Miristat 13-Asetat	10
2.5. Toll Like Reseptör Sinyal Yolağı	10
2.6. Apoptoz ve Kanser	12
2.7. Sfingolipid-Seramid Metabolizması ve Kanser	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	15
3.1. Materyaller	15
3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	16
3.2.1. Hücre Besiyerlerinin Hazırlanması	16
3.2.2. Hücrelerin Kültüre Alınması, Pasajlanması ve Dondurulması	16
3.2.3. Hücrelere Sparstolonin B ve Forbol-12-Miristat 13-Asetat Uygulanması	17
3.2.4. Hücre Canlılığı Analizi ve Deney Gruplarının Oluşturulması	18
3.2.5. İmmünofloresan Boyama	19
3.2.6. Toll Like Reseptör 2/4 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	21
3.2.7. ELISA Ölçümleri	23
3.2.8. Apoptotik Hücre Tayini	24
3.2.8.1. TUNEL Analizi	25

3.2.8.2. Akış Sitometri Analizi	25
3.2.9. Sfingolipidomik Analiz	26
3.2.10. Protein Ölçümleri	29
3.2.11. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR	30
4.1. Sparstolonin B ve Forbol 12-Miristat 13-Asetat'ın Hücre Canlılığına Etkisi	30
4.2. Sparstolonin B ve Forbol 12-Miristat 13-Asetat'ın Toll Like Reseptör 2/4 Sinyal Yolu Üzerindeki Etkisi	34
4.3. Sparstolonin B ve Forbol 12-Miristat 13-Asetat'ın Apoptoz Üzerindeki Etkisi	38
4.4. Sparstolonin B ve Forbol 12-Miristat 13-Asetat'ın Sfingolipid Seviyeleri Üzerindeki Etkisi	40
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	49

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3. 1. qRT-PCR için kullanılan primer ve problemler	22
Tablo 3. 2. Sfingomiyelin ve seramid prekürsör ve ürün iyonlarının değerleri	28
Tablo 4. 1. HCT-116 ve BJ hücrelerindeki sfingolipid düzeyleri	41



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanser hücresinin özellikleri	3
Şekil 2.2. Kanser hücrelerinde tümör mikroçevresi elemanları ve tümör metastazı	4
Şekil 2.3. Kansere yol açan faktörler	5
Şekil 2. 4. Kolonun yapısı	6
Şekil 2. 5. Sparstolonin B'nin kimyasal yapısı	8
Şekil 2. 6. Toll benzeri reseptörler ve sinyal iletimi	11
Şekil 2. 7. Seramid metabolizması	14
Şekil 4. 1. HCT-116 hücrelerinde hücre canlılığı ve proliferasyon	32
Şekil 4. 2. HCT-116 hücrelerinde TLR2/TLR4 sinyal yolunun değerlendirilmesi	36
Şekil 4. 3. HCT-116 hücrelerinde apoptoz	39
Şekil 5. 1. SsnB'nin olası etki mekanizması	46

SİMGELER ve KISALTMALAR

AJCC	Amerikan birleşik kanser komitesi
APC	Adenomatöz polipozis koli geni
ASC	Seçilen hücre alanı
ATCC	Amerikan tip kültür koleksiyonu
Bax	B-hücreli lenfoma 2 proteini ile ilişkili X proteini
BCG	Bacillus Calmette–Guérin
Bcl-2	B-hücreli lenfoma 2 proteini
BJ	Sağlıklı fibroblast hücresi
BMF	Arka plan ortalama floresansı
C16 CER	N-palmitoil-D-eritro-sfingozin
C16 SM	N-palmitoil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin
C18 CER	N-stearoil-D-eritro-sfingozin
C18 SM	N-stearoil-D-eritro sfingosilfosforilkolin
C1P	Seramid 1-fosfat
C20 CER	Araşidoil-D-eritro-sfingozin,
C22 CER	N-behenoil-D-eritro-sfingozin
C24 CER	Lignoseroil-D-eritro-sfingozin
C24 SM	N-lignoseroil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin
CCK-8	Hücre sayım kiti

CER	Seramid
CTCF	Düzeltilmiş toplam hücre floresansı
CTCF	Düzeltilmiş toplam hücre floresansı
DAMP	Doku hasarı sonucu ortaya çıkan tehlike ile ilişkili moleküler paternleri
DG	Diaçilgliserol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzim bağlantılı immünosorbent analiz
ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
FITC	Floresan izotiyosiyanat konjugat
HCT-116	İnsan kolon kanseri hücresi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ICH	İntraserebral kanama
ID	Entegral yoğunluk
IL-1β	İnterlökin-1 Beta
IL-6	İnterlökin-6
IκBα	Kappa B inhibitörü alfa
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi

MAPK	Mitogenle aktive olan protein kinaz
MMP-2	Matriks metalloproteinaz 2
MOMP	Mitokondri dış zar geçirgenliğini
MTT	3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difenil tetrazolyum bromür
MyD88	Miyeloid farklılaşma birincil yanıt 88
NCI	Ulusal kanser enstitüsü
NF-κB	Nükleer faktör kappa B p65
NGS	Normal keçi serumu
PAMP	Patojenle ilişkili moleküler kalıpları
PANC-1	İnsan pankreatik kanser hücresi
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCNA	Çoğalan hücre nükleer antijeni
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-Kinaz
PKC	Protein kinaz C
PMA	Forbol 12-miristat 12-asetat
PRR	Patern tanıyan reseptörler
qRT-PCR	Gerçek zamanlı PCR
S1P	Sfingozin 1-fosfat
SM	Sfingomiyelin

SsnB	Sparstolonin B
SW1990	İnsan pankreatik kanser hücresi
TdT	Terminal deoksinükleotid transferaz
TIR	Toll/IL-1 Reseptör
TLR	Toll like reseptör
TLR2	Toll like reseptör 2
TLR4	Toll like reseptör 4
TNF	Tümör nekroz faktör
TNM	Tümör-lenf nodu-metastaz
TPA	12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat
TUNEL	Parçalanmış terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP çentik uç etiketleme
UICC	Uluslararası kanser birliği

1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en yaygın ölüm nedenidir ve giderek artan insidansı nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir (Sung ve ark., 2021; Bray ve ark., 2020). Kanser etiyolojisi genetik mutasyonlar, epigenetik değişiklikler, yaşam tarzı faktörleri ve kronik inflamasyonun etkileşimi ile şekillenmektedir. Bu kompleks yapının araştırılması, yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Kolorektal kanser, gelişmiş ülkelerde en önemli onkolojik sorunlardan biri olup dünya genelinde görülme sıklığı açısından üçüncü sırada yer almaktadır (Sung ve ark., 2021). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, 2020 yılında dünya çapında yaklaşık 1.9 milyon kişi kolorektal kanser tanısı almış ve 1 milyon kişi bu nedenle hayatını kaybetmiştir (Sung ve ark., 2021). Gelişiminde adenoma-karsinoma sekansı, genetik mutasyonlar ve epigenetik düzenlemeler rol oynamaktadır (Tahghighi ve ark., 2025). Normal şartlar altında bağışıklık sistemi, hasarlı uyaranlara karşı inflamasyonu başlatarak dokudaki hasarı ortadan kaldırır. Doğal bağışıklık sistemimizin en önemli sensör proteinlerinden olan Toll like reseptörler (TLR'ler) patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP) tanır ve inflamatuvar yanıtları düzenler (Akira ve ark., 2001). Ancak inflamatuvar yanıtın sürekli aktive olması ve TLR'lerin kronik inflamasyonu, kolorektal kanser başta olmak üzere tümör mikroçevresinin oluşumuna ve ilerlemesine zemin hazırlar (Fukata ve ark., 2007; Cammarota ve ark., 2010). Bu bağlamda TLR sinyal yollarının inhibisyonu kolon kanseri tedavisinde umut verici bir yol olarak kabul edilmektedir. TLR2/4 aşırı ekspresyonu, epitel hücrelerde miyeloid farklılaşma birincil yanıt 88 (MyD88) aracılı nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) aktivasyonu ve mitogenle aktive olan protein kinaz/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (MAPK/ERK) yolunun tetiklenmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu da proinflamatuvar sitokinlerin salınımını, hücre proliferasyonunu ve apoptoz direncini arttırmaktadır (Rakoff-Nahoum ve Medzhitoy, 2008; Fukata ve Abreu, 2008). Günümüzde kolorektal kanser tedavisinde cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapi gibi temel yöntemler kullanılmasına rağmen genellikle tedavi direnci, şiddetli yan etkiler, yaşam kalitesinin düşmesi ve bazı vakalarda sadece belirli alt gruplarda etkili olmaları gibi ciddi sınırlamalar nedeniyle klinik faydaları

kısıtlanmaktadır (Cerrito ve Grassilli, 2021; Salva De Torres ve ark., 2024). Kolorektal kanserin polifenoller ve kemoterapi ile kombinasyon terapisi, son yıllarda kanser tedavisinde kullanılan stratejilerden biridir. Bu yaklaşım hem tedavi etkinliğini arttırmak hem de hastaya sosyal fayda sağlaması açısından oldukça önemlidir.

SsnB, *Spargonium stoloniferum* bitkisinin köklerinden izole edilen doğal kaynaklı bir polifenol olarak sınıflandırılmaktadır (Kumar ve ark., 2014; Yepuri ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda SsnB'nin TLR2/4 antagonisti olarak aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Liang ve ark., 2011). Bu çalışmada, daha önce TLR 2/4 antagonisti olarak incelenmemiş bir polifenol olan SsnB'nin kolon kanseri hücrelerindeki etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar, TLR 2/4'ün HCT-116 insan kolon kanseri hücre hattında ekspresyon gösterdiğini ve bu sinyal yollarının aktivasyonunun ERK fosforilasyonu ile NF- κ B üzerinden hücre proliferasyonunu artırıp apoptozu baskıladığını rapor etmiştir (Doan ve ark., 2009; Guo ve ark., 2013; Chung ve ark., 2016; Liu ve ark., 2018). Gastrik kanser hücreleri ve adipositlerde SsnB'nin TLR 2/4'ü baskılayarak NF- κ B ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Guo ve ark., 2021; Liang ve ark., 2011; Wang ve ark., 2015). Bu bulgular ışığında, SsnB'nin kolorektal kanser hücrelerinde TLR 2/4 aracılığıyla antiproliferatif etki gösterebileceği hipotezi geliştirilmiştir. Literatürde bu mekanizmanın kolorektal kanser hücrelerinde araştırıldığına dair bir çalışma bulunmamaktadır.

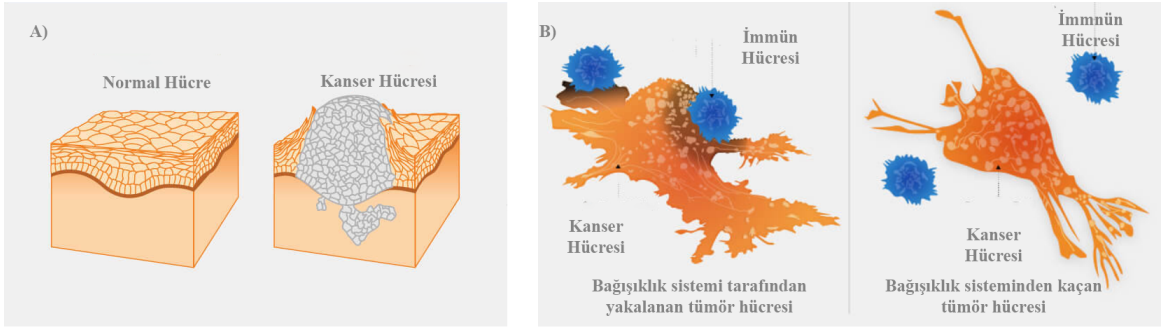
Sfingolipid metabolizmasının kanser gelişimi ve ilerlemesindeki rolü son yıllarda artan bir ilgi görmektedir (Piazzesi ve ark., 2021). Ekibimizin yaptığı yakın tarihli bir çalışmada, östrojen reseptörü pozitif meme ve yumurtalık kanser hücrelerine uygulanan 25 μ M SsnB'nin sfingozin-1-fosfat (S1P) seviyelerini belirgin şekilde düşürdüğü ve hücre içi seramid birikimini artırdığı saptanmıştır (Dilber ve ark., 2024). Fizyolojik olarak aktif sfingolipidlerin, özellikle seramidin, kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyerek tümör büyümesini inhibe ettiği bilinmektedir (Li ve ark., 2015). Ayrıca bazı araştırmalar, TLR sinyalizasyonu ile sfingolipid metabolizması, özellikle seramid sentezi arasında bir etkileşim olabileceğini öne sürmektedir (Ogretmen, 2018). Bu nedenle çalışmamızda SsnB'nin insan kolon kanser hücrelerinde seramid, S1P ve C1P seviyeleri üzerindeki etkisi de değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Tanımı ve Hücresel Temeli

Küresel ölçekte kanser, morbidite ve mortalite açısından önde gelen sağlık sorunlarından biridir. Hücrelerin normal büyüme, farklılaşma ve ölüm süreçlerinin bozulması sonucunda kontrolsüz çoğalma bağışıklık sisteminden kaçma çevre dokulara invazyon ve uzak organlara metastaz yapma kapasitesi ile karakterize edilen biyolojik açıdan heterojen bir hastalık grubudur (**Şekil 2.2**) (Boveri, 2008; Hanahan ve ark., 2011). Sağlıklı hücrelerde homeostazı koruyan düzenleyici mekanizmalar kanserleşme sürecinde devre dışı kalır ve hücreler sınırsız çoğalma potansiyeli kazanır (Hanahan ve ark., 2011). GLOBOCAN verilerine göre her yıl milyonlarca yeni olgu tanı almakta ve ölümler meydana gelmektedir. Bu durum, kanseri günümüzde en önemli halk sağlığı problemlerinden biri haline getirmektedir (Bray ve ark., 2020).

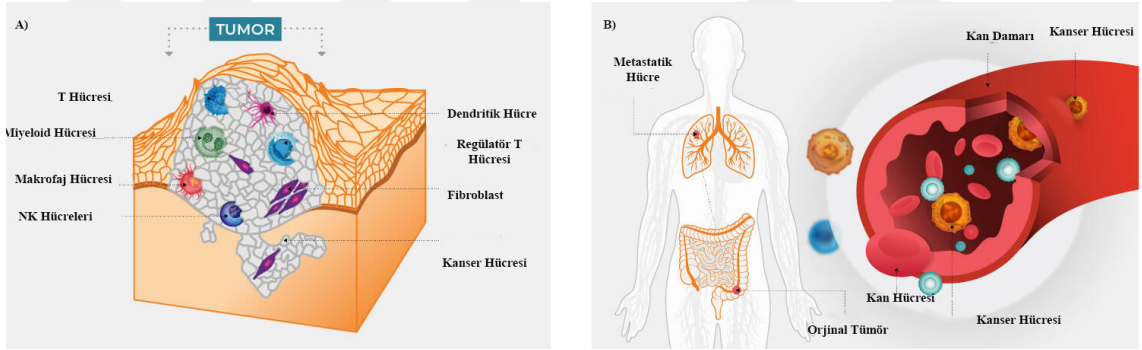
Kanserler, geleneksel olarak köken aldıkları hücre ve dokuya göre sınıflandırılır. Ancak son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar, histolojik sınıflamayı tamamlayan ve tedaviye yön veren yeni alt tiplerin tanımlanmasını sağlamıştır (Garraway ve Lander 2013).



Şekil 2.1. Kanser hücresinin özellikleri **A)** Kanser hücreleri kontrolsüz olarak bölünüp çoğalabilmektedir **B)** Bağışıklık sistemi, normalde vücudun zararlı veya anormal hücrelerini tespit edip yok edebilir. Kanser hücreleri ise zaman zaman bu gözetimden kaçabilir ya da bağışıklık saldırılarını etkisiz hale getirebilir. Bu nedenle bazı kanser türleri, bağışıklık sistemi tarafından fark edilmeden büyüyebilir (Ulusal kanser enstitüsü (NCI), 2021)'den Türkçeleştirilmiştir).

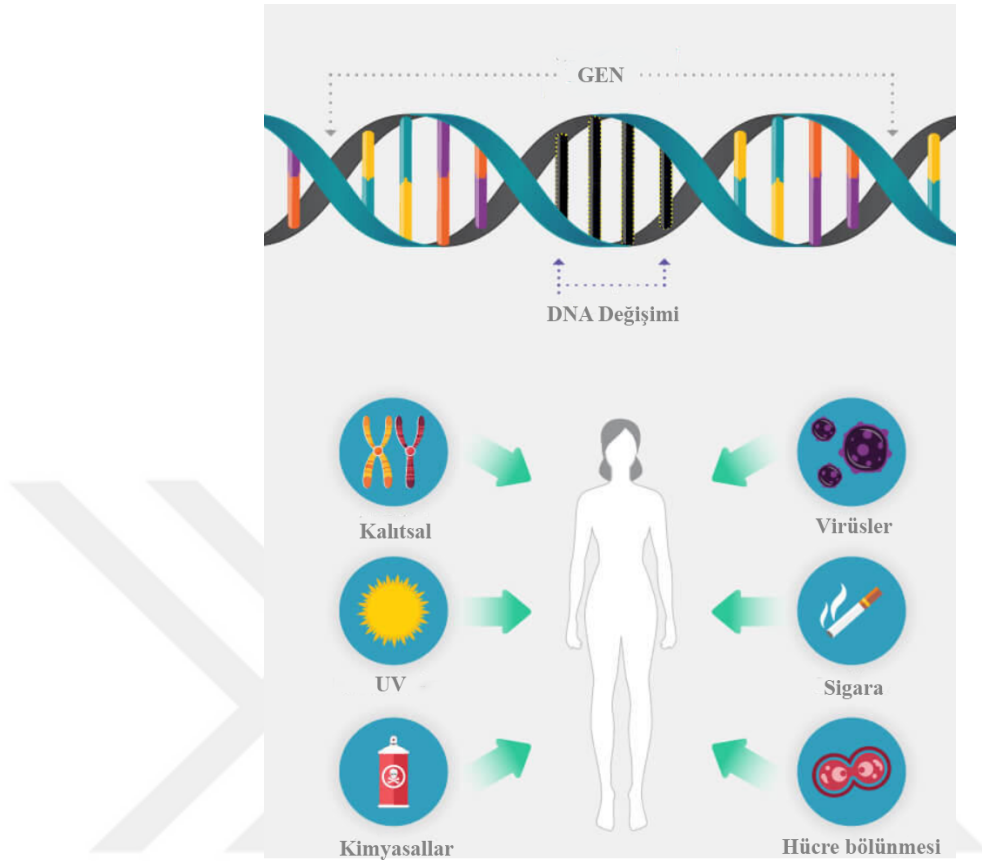
Kanser oluşumu çok etkenli bir süreçtir. Genetik yatkınlık, onkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, DNA onarım mekanizmalarının bozulması, epigenetik değişiklikler ve genomik instabilite bu sürecin temelini oluşturur (Stratton ve ark., 2009; Liu ve ark., 2022). Moleküler düzeyde kanser, belirli biyolojik yeteneklerin kazanılmasıyla açıklanmaktadır. Kanser hücrelerinin süregiden proliferatif sinyalleme, büyümeyi baskılayan sinyallerden kaçış, hücre ölümüne direnç, replikatif ölümsüzlük, anjiyogenez indüksiyonu ve metastaz yeteneği gibi işlevsel özellikler kazandığı bildirilmektedir. Son yıllarda immün sistemden kaçış, metabolik yeniden programlanma ve tümör mikroçevresindeki etkileşimler de bu çerçeveye eklenmiştir (Hanahan, 2022).

Tümör yalnızca malign hücrelerden ibaret değildir. Stromal hücreler, immün sistem elemanları, vasküler yapı ve ekstraselüler matriks de tümörün davranışını belirler (**Şekil 2.2A**). Metastaz, primer tümörden ayrılma, dolaşıma katılma, uzak dokuda tutunma ve kolonizasyon gibi çok aşamalı bir süreçtir ve tümör mikroçevresi bu süreçte belirleyicidir.



Şekil 2.2. Kanser hücrelerinde **A)** Tümör mikroçevresi elemanları ve **B)** Tümör metastazı (Ulusal kanser enstitüsü (NCI), 2021)'den Türkçeleştirilmiştir).

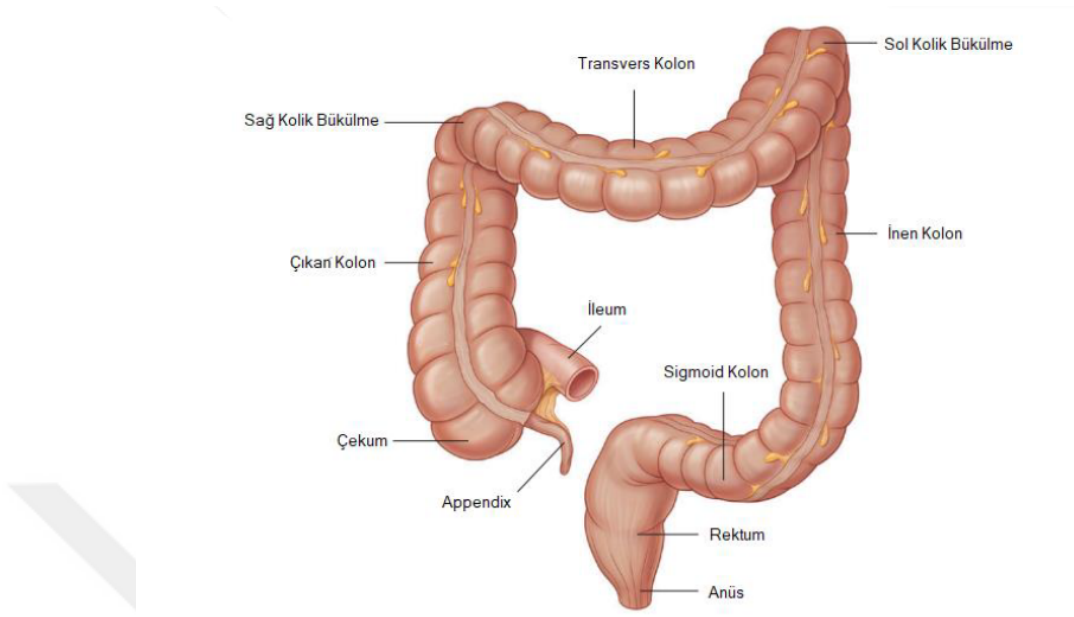
Sonuç olarak, kanser tek bir hastalık değil; çok sayıda biyolojik, genetik, epigenetik ve çevresel faktörün etkileşimi sonucu ortaya çıkan karmaşık bir hastalık ailesidir (**Şekil 2.3**). Bu nedenle araştırma ve tedavi yaklaşımları multidisipliner bir bakış açısı gerektirmektedir (DeVita ve ark., 2023).



Şekil 2.3. Kansere yol açan faktörler (Ulusal kanser enstitüsü (NCI), 2021)’den Türkçeleştirilmiştir).

2.2. Kolorektal Kanser

Kalın bağırsak, yetişkinlerde kolon, rektum ve anal kanaldan oluşur (**Şekil 2.4**). Kolonun kanlanması öncelikle mezenterik arterler aracılığıyla sağlanır ve venöz dönüşüm, arterlerle paralel seyreden venler aracılığıyla gerçekleşir. (Sakorafas ve ark., 2006). Kolonun başlıca işlevleri dışkıyı depolamak ve boşaltmak olmakla birlikte, gastrointestinal hormonlar ve alkalın mukus salgılayarak sindirime katkı sağlar. Rektum, sigmoid kolonla devam eder ve temel olarak dışkılamadan sorumludur. Ayrıca sınırlı miktarda su, tuz, glukoz ve bazı farmakolojik ajanların emilimini gerçekleştirir (Sakorafas ve ark., 2006).



Şekil 2. 4. Kolonun yapısı (Drake ve ark., 2019 yayınından Türkçeleştirilmiştir)

Kolorektal kanser, dünya genelinde en sık görülen kanser türlerinden biri olarak kabul edilmekte ve kanser kaynaklı ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır (Sung ve ark., 2021). Hastalığın görülme sıklığı ve sağkalım oranları ülkelere göre farklılık göstermektedir. Gelişmiş ülkeler, kolorektal kanser vakalarının çoğunluğuna sahip olmasına rağmen, ölümlerin yarısından fazlası gelişmekte olan ülkelere görülmektedir (Khan ve Lengyel, 2023; Dharwadkar ve ark., 2022; Bener ve ark., 2024). Obezite, sigara ve alkol tüketimi, sağlıksız beslenme ve hareketsizlik gibi değiştirilebilir yaşam tarzı faktörlerini kontrol altına almak, hastalığın birincil önlenmesinde kritik öneme sahiptir. Ayrıca, düzenli fiziksel aktivite ve belirli farmakolojik önlemler korunmayı destekleyen etkili stratejiler arasında yer alır (Dharwadkar ve ark., 2022; Bener ve ark., 2024).

Moleküler düzeyde bakıldığında, kolorektal kanser gelişiminde normal mukozadan adenoma, ardından karsinomaya ilerleyen bir süreç söz konusudur (Tahghighi ve ark., 2025). Bu ilerleme, çeşitli genetik mutasyonlar sonucu meydana gelir. Protoonkogenlerde meydana gelen mutasyonlarla onkogenik aktivasyon, tümör baskılayıcı genlerde işlev kaybı ve DNA onarım sisteminde görev alan genlerin

bozulması sonucu ortaya çıkan bu kümülatif genetik hasarlar, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına, büyüme sinyallerinden bağımsız hale gelmesine ve tümör oluşumuna zemin hazırlar (Ahnen, 2011). Neoplastik sürecin başlangıcı, ilk genetik mutasyonların oluşturduğu hasarın korunması ve sürdürülmesine dayanır. “Adenoma karsinoma dönüşüm sekansı” olarak tanımlanan bu süreçte hücrelerin bazal membranı aşarak invaziv özellik kazanması ve metastatik potansiyele ulaşması kritik bir aşamayı temsil eder (Vogelstein ve Kinzler, 2004; Nardone ve ark., 2023; Tahghighi ve ark., 2025). Kolorektal karsinom gelişiminde birçok genin rol oynadığı ortaya konulmuştur. Bu bağlamda adenomatöz polipozis koli geni (APC) ve p53 tümör baskılayıcı genler; K-ras ve c-myc protoonkogenler; MLH1, MSH2 ve MSH6 ise DNA yanlış eşleşme onarım genleri arasında yer almaktadır. Bu genlerde meydana gelen değişikliklerin, farklı aşamalarda belirleyici rol üstlendiği ve her mutasyonun tümör gelişimine özgün bir katkı sağladığı kabul edilmektedir. Böylelikle ardışık genetik olaylar, kolorektal tümörlerin oluşumuna yol açmaktadır (Tariq ve Ghias, 2016; Shin ve ark., 2007).

Bazı genetik mutasyonların yanı sıra, kolorektal kanser gelişiminde rol oynayan kalıtsal sendromlar da bulunmaktadır. Sporadik yani ailesel yatkınlığı olmayan, daha çok çevresel etkenler veya yaşla ilişkili faktörlerden kaynaklanan olgulara kıyasla, bu kalıtsal sendromlar genellikle daha erken yaşlarda ortaya çıkmaktadır (Byrne ve Tsikitis, 2018). Bu genetik ve kalıtsal yatkınlıkların yanı sıra, kolorektal kanserin erken tanı ve doğru evrelendirilmesinde kullanılan klinik muayene ve görüntüleme yöntemleri de büyük önem taşımaktadır.

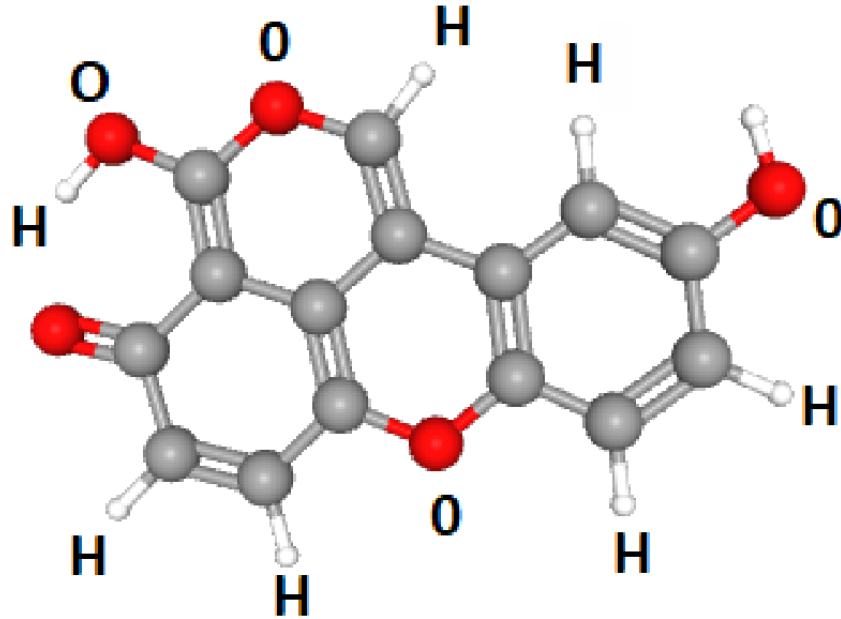
Kolorektal kanserli hastalarda prognozun değerlendirilmesi ve adjuvan tedavi gereksiniminin belirlenmesi için objektif ölçütlere ihtiyaç vardır. Bu amaçla günümüze kadar farklı sınıflandırma sistemleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında en sık kullanılanlar Duke’s sınıflandırması, Astler-Coller sınıflandırması ve TNM (tümör-lenf nodu-metastaz) sınıflandırmasıdır. Günümüzde kolorektal kanserlerde en sık kullanılan evreleme yöntemi, 1987 yılında Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) tarafından geliştirilmiş ve Uluslararası Kanser Birliği (UICC) tarafından da kabul edilmiş olan TNM sınıflandırma sistemidir (Hari ve ark., 2013). Sınıflandırma sistemleri yalnızca

hastalığın biyolojik davranışını ortaya koymakla kalmaz, aynı zamanda klinisyene tedavi algoritmasının hangi basamakta şekilleneceği konusunda yol gösterici olmaktadır.

2.3. Sparstolonin B

Polifenoller, doğal ve sentetik olarak bulunabilen organik bileşiklerdir. Serbest radikalleri nötralize etme yetenekleri sayesinde antioksidan ve antikanser özellikler gösterirler (Lu ve ark., 2016; Sharma ve ark., 2005).

Sparganium stoloniferum bitkisinin köklerinden izole edilen ve doğal bir bileşik olan SsnB, yapısal olarak $C_{15}H_8O_4$ formülüne sahip bir polifenoldür (Şekil 2.5). Nükleer manyetik rezonans ve X-ışını kristalografisi analizleri, bu bileşiğin izokumarin ve ksanton olmak üzere iki temel bileşenden oluştuğunu göstermektedir.



Şekil 2. 5. Sparstolonin B'nin kimyasal yapısı (Pubchem; Erişim tarihi: 28 Ocak 2025)

SsnB'nin mekanizması bağışıklık sisteminin aşırı aktivasyonunu yöneten kritik patern tanıma reseptörleri olan TLR yollarının seçici inhibisyonuna dayanmaktadır (Liang ve

ark., 2011). Geleneksel Çin tıbbında menstrüasyon düzenleyici, antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve antitümör etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Kumar ve ark., 2014; Yepuri ve ark., 2019).

SsnB'nin antikanser potansiyeli, çeşitli nöroblastoma hücre hatlarında hücre döngüsünü durdurarak proliferasyonu engellemesi ve apoptozu tetiklemesi ile ortaya konulmuştur (Kumar ve ark., 2014). Prostat kanseri hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda, SsnB'nin G2/M faz durmasını indükleyerek hücre çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu azalttığı, *in vivo* olarak ise ksenograft modellerinde tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir. Bu etkiler sırasında SsnB, reaktif oksijen türlerinin birikimini azaltmakta ve oksidatif stresi düşürerek fosfatidilinozitol 3-Kinaz / Protein Kinaz B (PI3K/AKT) sinyal yolunu inhibe etmektedir (Liu ve ark., 2021).

Pankreas adenokarsinomu hücreleri üzerinde yapılan araştırmalarda SsnB'nin PANC-1 ve SW1990 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir. CCK-8 analizleri, koloni oluşumu ve Transwell deneyleri, SsnB'nin bu hücrelerin proliferasyonunu ve göç yeteneğini baskıladığını ortaya koymaktadır. Moleküler düzeyde, B-hücreli lenfoma 2 proteini ile ilişkili X proteini (Bax) ve NF-κB p65 fosforilasyon seviyelerinde artış, B-hücreli lenfoma 2 proteini (Bcl-2), Matriks metalloproteinaz-2 (MMP2) ve Kappa B inhibitörü alfa (IκBα) ekspresyonlarında ise azalma gözlenmiş, toplam NF-κB p65 seviyeleri ise değişmemiştir. Bu bulgular, SsnB'nin NF-κB sinyal yolunu hedefleyerek pankreas kanseri hücrelerinin büyümesini engelleyebileceğini ve apoptozu tetikleyebileceğini göstermektedir (Liu ve ark., 2021; Lyu ve ark., 2022).

Preklinik veriler, SsnB'nin, seçici TLR2/4 inhibisyonu üzerinden hareket ederek, geniş bir spektrumda çok yönlü bir terapötik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Ancak mevcut literatürde, SsnB'nin kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini yeterince inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu durum, bileşiğin farklı kanser türlerinde potansiyel terapötik etkilerini araştırma gerekliliğini ortaya koymaktadır.

2.4. Forbol 12-Miristat 13-Asetat

Croton tiglium bitkisinin özünden elde edilen forbol 12-miristat 13-asetat (PMA), ya da kimyasal adıyla 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA), hücre biyolojisi ve kanser araştırmalarında çok kullanılan, doğal bir forbol esteri bileşiğidir (Hecker, 1968).

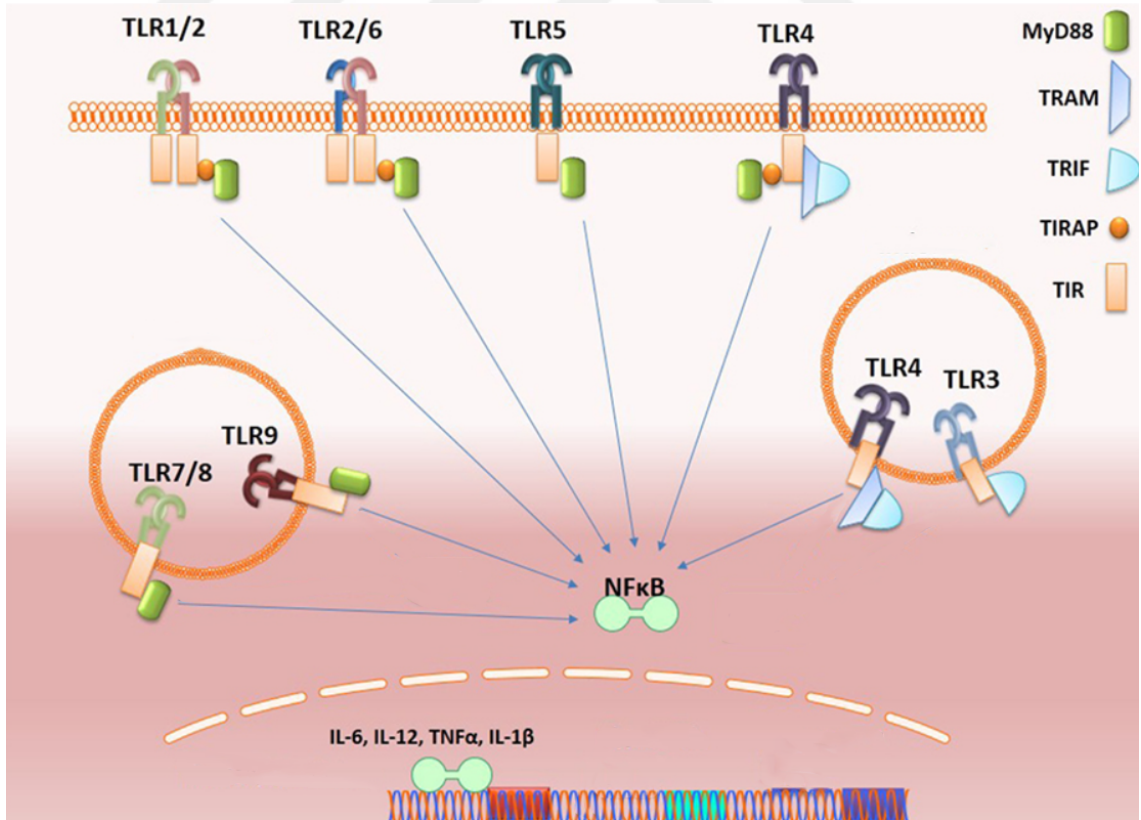
PMA'nın biyolojik etkisinin temelinde, hücre içi sinyal ileticisi olan protein kinaz C (PKC) enzimlerini etkinleştirmesi yatar. PMA, PKC'nin doğal lipid ikincil habercisi olan diaçilgliserol (DG) molekülünü taklit eden güçlü bir moleküldür (Castagna ve ark., 1982). PMA'nın enzime DG'den iki kat daha yüksek bir afiniteyle bağlanma yeteneği sayesinde olağanüstü bir güç sergilemektedir. Bu yüksek bağlanma, PKC enzimini hücre zarında DG'nin geçici sinyalinin aksine sürekli aktif bir durumda tutmakta ve sinyal yolunun devamlı olarak açık kalmasına yol açmaktadır (Sharkey ve ark., 1984). PMA'nın sebep olduğu uzun süreli aktivasyon, enzimin yıkımını tetikleyen bir paradoks yaratmaktadır. Sürekli aktif ve zara sabitlenmiş durumda olan PKC, fosfatazlara karşı savunmasız hale gelir. Bu fosfatazlar, enzimin aktivasyon döngüsünü bozar ve onu inaktive eder (Gao ve ark., 2008). İnaktif hale gelen PKC, proteozomlar aracılığıyla parçalanarak hücreden kalıcı olarak uzaklaştırılır. Böylece, PMA'nın sürekli PKC aktivasyonu, hücrede hem sinyal yollarının uzun süreli uyarılmasına hem de enzimin kendini düzenleme süreçlerinin tetiklenmesine yol açar.

Sonuç olarak, PMA, hücredeki sinyal yollarını incelemek, hücre farklılaşmasını tetiklemek, inflamasyon ve kanser mekanizmalarını modellemek için kullanılan, vazgeçilmez bir kimyasaldır.

2.5. Toll Like Reseptör Sinyal Yolağı

Bağışıklık sistemi, organizmayı yabancı etkenlere karşı koruyan iki temel mekanizma üzerinden işlemektedir. Doğal bağışıklık sistemi, patojenlere karşı hızlı ve spesifik olmayan yanıt vererek ilk savunma hattını oluşturur. Edinsel bağışıklık ise antijene özgü, uzun süreli ve hafıza kapasitesine sahip bir yanıt sağlar (Marshall ve ark., 2018). Doğal bağışıklık sistemi, patojenlerin hücre membranı, toksinleri ve nükleik asit parçaları gibi moleküllerini tanıyarak koruma sağlar. Bu patojene özgü yapılar PAMP olarak

adlandırılır (Marshall ve ark., 2018). PAMP'ları tanıyan reseptörler ise patern tanıyan reseptörler (PRR) grubuna dahildir ve TLR bu grubun önemli üyelerindendir (Wolska ve ark., 2009). TLR'ler, evrimsel olarak korunmuş bir patern tanıyıcı PRR ailesidir. Glikoprotein yapısında, transmembran yerleşimli reseptörlerdir ve çok sayıda hücre tipinde eksprese edilirler. Bu reseptörler, bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler gibi pek çok patojenin PAMP'ları tanımanın yanı sıra, hücre ölümü ve doku hasarı sonucu ortaya çıkan tehlike ile ilişkili moleküler paternleri (DAMP) de algırlarlar (Rakoff-Nahoum ve Medzhitov, 2008). TLR'lerin hücredeki lokalizasyonu, tanıyacıkları patojenlere göre değişir. TLR aktivasyonu sonrası TIR (Toll/IL-1 Reseptör) domainleri dimerleşir ve adaptör proteinler aracılığıyla sinyal iletimi başlar (Zakeri ve Russo 2018). Sinyal iletimi, adaptör protein kullanımına göre iki ana yolda gerçekleşir: MyD88 bağımlı yolak ve TRIF bağımlı (MyD88 bağımsız) yolak (Rakoff-Nahoum ve Medzhitov, 2008) (Şekil 2.6).



Şekil 2. 6. Toll benzeri reseptörler ve sinyal iletimi. Aktivasyon MyD88'e bağımlı veya TRIF'e bağımlı yollar üzerinden ilerleyebilir (Zakeri ve Russo 2018 yayınından düzenlenmiştir)

Başlangıçta yalnızca immün hücrelerde eksprese edildikleri düşünülse de, yapılan çalışmalar TLR'lerin epitel ve hatta tümör hücrelerinde de bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle TLR'lerin kanser biyolojisindeki rolü iki yönlüdür. Antijen sunumunu ve sitotoksik T hücre aktivasyonunu artırarak immün sistemi tümöre karşı yönlendirebilirler (Rakoff-Nahoum ve Medzhitov, 2008). TLR aktivasyonunun kontrolsüz olması, NF- κ B ve interlekin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar yolları aktive ederek tümör büyümesi, anjiyogenez ve metastaza yol açabilir.

2.6. Apoptoz ve Kanser

Apoptoz, embriyonik gelişim sırasında doku morfogeneziyi yönlendirmek, bağışıklık sisteminde gereksiz veya tehlike arz eden hücreleri temizlemek ve yaşlanmış hücreleri ortadan kaldırmak gibi sayısız fonksiyona hizmet eder (Elmore, 2007). Apoptoz, biyolojik sistemler için sadece bir ölüm mekanizması değil, organizmanın gelişimi ve homeostazının sürdürülmesi açısından kritik öneme sahip bir süreçtir (Kaczanowski, 2016). Bu kontrollü süreç hasarlı, yaşlanmış, kanser potansiyeli taşıyan veya artık gereksiz hale gelmiş hücrelerin sistematik olarak ortadan kaldırılmasını sağlayarak doku sağlığını ve bütünlüğünü korur (Elmore, 2007). Apoptozun işlevindeki herhangi bir aksama veya bozulma, kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açarak kanser veya hücre kaybına neden olarak patolojik durumların gelişimine zemin hazırlayabilir.

Apoptoz, fizyolojik veya patojenlere bağlı farklı uyaranlara yanıt olarak başlıca iki ana yol aracılığıyla başlatılır. Her iki yol da kaspazlar adı verilen güçlü proteazları aktive ederek hücre ölümünü tetikler (Elmore, 2007). İntrinsik yol, hücre içi stres faktörlerine bir yanıt olarak devreye girer. DNA hasarı, oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresi gibi olumsuz koşullar bu yolu tetikler. Bu süreç, doğrudan mitokondri aracılı yol olarak da adlandırılır (Kaczanowski, 2016). Ekstrinsik yol ise hücre yüzeyindeki sinyaller aracılığıyla başlatılır. Bu süreç, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesine ait transmembran reseptörlerin aktivasyonu ile gerçekleşir (Elmore, 2007).

Kanser hücrelerinin çoğu apoptoz mekanizmasını inhibe etmeyi başarır. Bu durum, kontrolsüz çoğalma ve tümör oluşumunun temelidir. Bu nedenle, kaspaz-3 dahil olmak üzere kaspazların doğru ve etkili bir şekilde aktive edilmesi, kanser tedavilerinin

başarıya ulaşması açısından kritik öneme sahiptir. Apoptozun moleküler detaylarının anlaşılması, hem temel hücre biyolojisine ışık tutmakta hem de hastalıkların terapötik yönetiminde yeni hedefler belirlemek için hayati bir zemin sağlamaktadır.

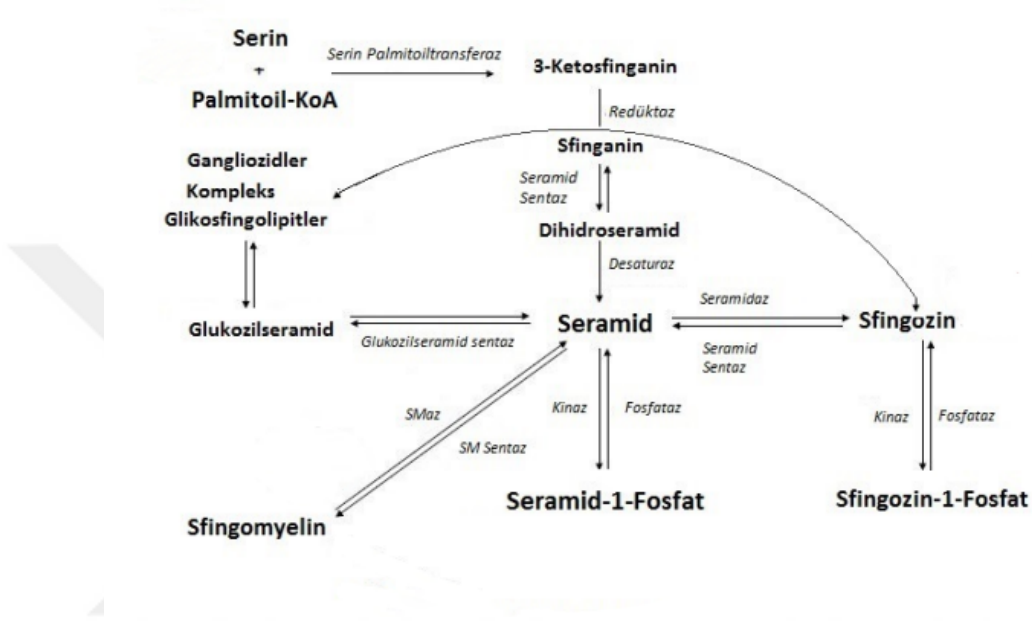
2.7. Sfingolipid-Seramid Metabolizması ve Kanser

Sfingolipidler, hücre membranlarının temel yapı taşları olup aynı zamanda hücre içi sinyal iletimini hassas bir şekilde düzenleyen biyoaktif lipidlerdir. Bu moleküllerin metabolizması, hücre kaderini belirlemede merkezi bir öneme sahiptir.

Sfingolipid yolunun en kritik metabolitlerinden biri olan seramid, hücre sağkalımı, proliferasyon, apoptoz ve stres yanıtları üzerinde güçlü bir kontrol mekanizması kurar (Hannun ve Obeid, 2018). Seramid, genellikle proapoptotik bir sinyal molekülü olarak işlev görür. Hücre içi sinyal yollarını aktive ederek, özellikle mitokondri dış zar geçirgenliğini (MOMP) artırır ve böylece kaspaz kaskadının başlamasına yol açar. Bu mekanizma, kanser hücrelerinin terapötik yaklaşımlara karşı geliştirdiği direnci anlamada kritik bir moleküler işlev görür (Ogretmen, 2018). Seramidin metabolik dönüşümü, onu zıt etkilere sahip diğer iki önemli biyoaktif lipide çevirir (**Şekil 2.7**). Seramidin fosforilasyonu ile oluşan C1P, çoğunlukla antiapoptotik ve proliferatif sinyalleri destekler. Ayrıca, inflamasyon ve hücre göçü süreçlerini düzenlemede merkezi bir rol oynar (Gómez-Muñoz ve ark., 2010). S1P, seramidin dehidrojenasyonu ve ardından fosforilasyonu sonucu ortaya çıkan bir metabolittir. Güçlü bir hayatta kalma ve büyüme sinyalleycisi olarak bilinir. Hücre proliferasyonunu, anjiyogenezi ve immün hücre göçünü tetikler. Kanser hücrelerinde artan S1P seviyeleri, hücre içi antiapoptotik yollarla hayatta kalmayı sağlamanın yanı sıra, tümör mikroçevresindeki endotel ve immün hücreleri modüle ederek metastazı ve tümör progresyonunu aktif olarak destekler (Pyne ve Pyne, 2010). Bu iki yönlü etkisi nedeniyle S1P, kanser biyolojisinde ikili bir regülatör olarak kabul edilir ve terapötik hedefleme için cazip bir moleküldür.

C1P ve S1P'nin inflamasyon, anjiyogenezi ve immün yanıt üzerindeki modülatör etkileri, sadece hücre içi değil, aynı zamanda tümör-mikroçevre etkileşimlerinde de merkezi bir rol oynar. S1P, bağışıklık hücrelerinin migrasyonunu etkileyerek bağışıklık sisteminin

tümör lehine veya aleyhine şekillenmesine aracılık ederken; C1P, inflamatuvar sinyalleri aktive ederek stroma içinde proliferasyonu ve hayatta kalmayı teşvik eder.



Şekil 2. 7. Seramid metabolizması (Bal Topcu ve ark., 2018 yayınından düzenlenmiştir)

Sonuç olarak, seramid, C1P ve S1P arasındaki bu karmaşık metabolik denge, kanser hücrelerinin proliferasyon, metastaz ve kemoterapiye direnç gibi kritik süreçlerini yöneten bir anahtardır. Bu sfingolipid yollarının detaylı ve hedefe yönelik incelenmesi, hem tümör progresyonunun moleküler mekanizmalarını derinlemesine anlamaya hem de bu metabolik yolları hedefleyen yenilikçi, sfingolipid odaklı terapötik stratejilerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneylerin tümü Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyaller

Çalışmamızda kullanılan tüm kimyasallar yüksek saflık derecesine sahip olup farklı firmalardan temin edilmiştir. Hücre kültürü için kullanılan Dulbecco's Modified Eagle's Medium Yüksek Glukoz (DMEM, Sigma-Aldrich, #D5648, St. Louis, MO, USA); sodyum bikarbonat (Sigma-Aldrich, #S5761, St. Louis, MO, USA); fetal bovin serum (FBS, Gibco, #10270-106, Life Technologies, Grand Island, UK), penisilin-streptomisin (Gibco, #15140-122, Life Technologies, Grand Island, UK), amfoterisin B (Gibco, #15290-026, Life Technologies, Paisly, UK), sodyum pirüvat (Gibco, #11360-070, Life Technologies, Paisly, UK) ile desteklenmiştir. Sparstolonin B (SsnB, $\geq$ %98, Merck Millipore, #SML1767) ve forbol 12-miristat 13-asetat (PMA, $\geq$ %98, LC Laboratories, #P-1680), dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, %99.9, #D5879, St. Louis, MO, USA) içerisinde çözülmüştür. MTT (Gold Biotechnology, #T-030, St. Louis, MO, USA) fosfat tamponlu salin (PBS, Sigma-Aldrich, #P4417, St. Louis, MO, USA) kullanılarak hazırlanmıştır. İmmünofloresan boyama protokolünde paraformaldehit (Sigma-Aldrich, #158127, St. Louis, MO, USA), Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, #T8787, St. Louis, MO, USA), normal keçi serumu (NGS, Vector Laboratories, #S-1000, Burlingame, CA, USA), çeşitli primer antikörler (Bioss Antibodies, Affinity Biosciences, BT Lab, Cell Signaling Tech.), sekonder antikör Alexa Fluor 488 (Abcam, #150077, Cambridge, UK) ve DAPI (Sigma-Aldrich, #F6057, St. Louis, MO, USA) kullanılmıştır. ELISA kitler BT Lab (Shanghai, China), TUNEL kit ise Elabscience (Houston, TX, USA) firmasından temin edilmiştir. Akış sitometri analizinde Annexin-V ve propidyum iyodür (Elabscience, E-CK-A211, Houston, TX, USA) reaktifi kullanılmıştır. Sfingolipidomik analizler için kullanılan kloroform, metanol, amonyum format Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilmiştir. Standartlar Avanti Polar Lipid (Birmingham, USA), internal standart ise Cambridge Isotope

Laboratories (Tewksbury, MA, USA)’ten alınmıştır. LC-MS/MS ölçümleri, Shimadzu LCMS-8040 sistemi ve XTerra C18 kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.1. Hücre Besiyerlerinin Hazırlanması

Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC; Manassas, VA, USA) kuruluşundan temin edilen insan kolon kanseri (HCT-116) ve sağlıklı fibroblast (BJ) hücre hatlarını çoğaltmak için yüksek glukoz içeren DMEM (Sigma-Aldrich, #D5648, St. Louis, MO, USA) kullanılmıştır. Besiyeri içeriği 3.7 g/L sodyum bikarbonat (Sigma-Aldrich, #S5761, St. Louis, MO, USA), %10 (v/v), ısı ile inaktive edilmiş FBS (GIBCO, #10270-106, Life Technologies, Grand Island, UK), 100 U/mL penisilin; 100 µg/mL streptomisin (GIBCO, #15140-122, Life Technologies, Grand Island, UK), %1 sodyum pirüvat (Gibco, #11360-070, Life Technologies, Paisly, UK) ve 5 µg/100 mL amfoterisin B (Gibco, #15290-026, Life Technologies, Paisly, UK) ile zenginleştirilmiştir. Hazırlanan besiyeri, 0.22 µm’lik filtre ile sterilize edilerek 4°C’de saklanmıştır.

3.2.2. Hücrelerin Kültüre Alınması, Pasajlanması ve Dondurulması

Çalışmamızda kullanılan HCT-116 ve BJ hücre hatları, kriyoprezervasyon yöntemiyle dondurulmuş olarak temin edilmiştir. Kriyotüplerde bulunan hücreler (1 mL), 37°C su banyosunda hızlı çözme yöntemiyle eritilmiştir. Çözdürülen hücreler 9 mL besiyeri içeren santrifüj tüpüne aktarılmış ve 1.500xg’de santrifüj edilerek dondurma çözeltisi içerisinde bulunan DMSO’dan uzaklaştırılmıştır. Tüp içerisindeki üst faz (süpernatant) uzaklaştırılmış ve alt faz (pellet) besiyeri (Sigma-Aldrich, #D5648, St. Louis, MO, USA) içerisinde süspanse edilmiştir. Süspanse edilen hücreler, 25 cm² kültür flasklarına alınmış, 37°C inkübatörde kültüre edilmiştir.

Kültür ortamındaki besin maddelerinin tükenmesi ve hücre yoğunluğunun artması, hücrelerin strese girmesine ve çoğalma kapasitelerinde bir düşüşe neden olmaktadır. Bu durum hücre morfolojisinin bozulmasına ve deneysel sonuçların güvenilirliğinin düşmesine sebep olmaktadır. Bu nedenle hücreler, enzimatik bir yöntem olan Tripsin-

EDTA (Gibco, %0.05 Trypsin/%0.02 EDTA, Life Technologies, Grand Island, UK) ile flask yüzeyinden ayrıştırılarak yeni flasklara aktarılmaktadır. Böylece hücreler sağlıklı bir şekilde büyüyüp çoğalmaya devam etmekte, kültürün sürekliliği sağlanmakta ve deneysel standartlar korunmaktadır. Yeterli yoğunluğa (%80-90) ulaşan hücreler tripsinizasyon (pasajlama) işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem steril biyogüvenlik kabini (sınıf 2) içerisinde, aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Öncelikle flask içerisinde bulunan besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler 5 mL PBS (Sigma-Aldrich, #P4417, St. Louis, MO, USA) ile yıkanarak ortamda kalan serum proteinleri elimine edilmiştir. Ardından hücrelere yüzeyden ayrılması için 5 mL Trypsin-EDTA (Gibco, %0.05 Trypsin/%0.02 EDTA, Life Technologies, Grand Island, UK) uygulanmış ve 37°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. Trypsin etkisiyle yüzeyden ayrılan hücrelere, 5 mL besiyeri ilave edilerek nötralize edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu, 1.500xg’de santrifüjlenerek çöktürülmüş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti 5 mL taze besiyeri içerisinde süspansiyon edilerek yeni flasklara aktarılmış, 37°C inkübatörde kültüre alınmıştır.

Hücreler çoğaltıldıktan sonra, aynı hücre hatlarının uzun süreli kullanımı ve genetik özelliklerinin korunmasını sağlamak amacıyla dondurma işlemi uygulanmıştır.

Pasajlama sonrasında hücreler, %5 (v/v) DMSO (Sigma-Aldrich, %99.9, #D5879, St. Louis, MO, USA) içeren besiyeri ile süspansiyon edilip kriyotüplere alınmış ve kontrollü soğutma yöntemiyle dondurulmuştur. Dondurulan hücreler, -80 °C saklama koşullarında ve -196 °C sıvı nitrojen tanklarında muhafaza edilmiştir. Bu yöntem ile hücrelerin canlılığı ve biyolojik özellikleri korunarak ileride gerçekleştirilecek çalışmalarda güvenilir şekilde kullanılmıştır.

3.2.3. Hücrelere Sparstolonin B ve Forbol-12-Miristat 13-Asetat Uygulanması

Bu çalışmada SsnB, TLR2/4 aracılı sinyal yollarını baskılayıcı etkisi sebebiyle tercih edilmiştir. Hücrelerde TLR2/4 yollarının aktivasyonu için ise güçlü bir PKC aktivatörü olan PMA kullanılmıştır.

Beş mg SsnB (MW: 268.22 g/mol; Merck Millipore, #SML1767, Cork, Ireland) 10 mM stok konsantrasyonu elde etmek için 1.854 mL DMSO (%99.9, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, #D5879) içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan ana stok, DMSO ile seyreltilerek 1 mM'lık ara stok oluşturulmuştur. Daha sonra 1 mM'lık ara stok besiyeri ile seyreltilip literatüre uygun olarak 3.125, 6.25, 12.5, 25 ve 50 µM konsantrasyonlarında hazırlanmıştır (Bateman ve ark., 2013; Kumar ve ark., 2014).

Sonraki aşamada, 5 mg PMA (MW: 616.83 g/mol; LC Laboratories, Canada, #P-1680), 8.1 mM'lık stok konsantrasyon hazırlanmak üzere 1 mL DMSO'da çözülmüştür. Bu stok, 1 mM'lık ara stok oluşturulması için DMSO ile seyreltilmiştir. Ara stok besiyeri ile seyreltilerek 1, 5 ve 10 nM konsantrasyonlarında hazırlanmıştır.

Hazırlanmış olduğumuz SsnB ve PMA, HCT-116 ve BJ hücrelerine belirlenen konsantrasyonlarda uygulanmıştır.

3.2.4. Hücre Canlılığı Analizi ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Uygulama etkin doz ve süresinin belirlenmesi için 12, 16 ve 18 saatlik inkübasyon süreleri sonunda 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT; Gold Biotechnology, #T-030, St. Louis, MO, USA) hücre canlılık analizi gerçekleştirilmiştir.

MTT analizi, hücrelerin canlılığını ölçmek için yaygın kullanılan bir yöntemdir. Test, metabolik açıdan aktif olan canlı hücrelerin MTT'yi mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla indirgemesi ve NADPH aracılığıyla suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanmaktadır. Suda çözünemeyen formazan kristalleri DMSO ile çözünür hale getirilir ve ölçülen absorbans değerleri formazan konsantrasyonunun dolayısıyla MTT'nin hücre içi azalmasının bir göstergesi kabul edilir (Van Meerloo ve ark., 2011).

MTT, 5 mg/mL konsantrasyonunda PBS (Sigma-Aldrich, #P4417, St. Louis, MO, USA) içerisinde çözülmüş ve 0.22 µM'lık filtreden geçirilerek steril edilmiştir. MTT analizi öncesinde HCT-116 ve BJ hücreleri 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve plaka tabanına yapışması için bir gece boyunca, 37°C inkübatörde inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklara ekilen hücrelerin üzerine DMSO (1µL/mL), PMA (1-10 nM) ve/veya SsnB

(3.125-50 μ M) konsantrasyonlarını içeren 200 μ L besiyeri ilave edilmiştir. Hücreler 12-18 saat inkübe edildikten sonra kuyucuk içerisindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve MTT içeren 100 μ L taze besiyeri (90 μ L besiyeri+10 μ L MTT) ilave edilmiştir. Hücreler 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklu plakaların tabanında oluşan mor renkli formazan kristalleri, 100 μ L DMSO ile çözünür hale getirilmiş, 570 ve 690 nm dalga boyunda bir spektrometrik plaka okuyucu (MicoQuant, Bio-Tek Instruments Inc., Charlotte, VT, USA) ile ölçülmüştür. Kontrol grubu canlılığı %100 olarak referans alınmış ve deney grupları buna göre normalize edilmiştir.

$$[\text{Hücre canlılık (\%)} = (\text{Örnek absorbansı} / \text{Kontrol grubu absorbansı}) \times 100]$$

Hücre canlılık analiz sonuçlarına göre HCT-116 ve BJ hücrelerinde beş farklı deneysel grup oluşturulmuştur.

1. Kontrol (hücreler 12 saat boyunca sadece besiyeri ile inkübe edilmiştir)
2. DMSO (hücreler 12 saat boyunca 1 μ L/mL DMSO içeren kültür ortamı ile inkübe edilmiştir)
3. PMA (hücreler 12 saat boyunca 10 nM PMA içeren kültür ortamı ile inkübe edilmiştir)
4. SsnB (hücreler 12 saat boyunca 25 μ M SsnB içeren kültür ortamı ile inkübe edilmiştir)
5. SsnB + PMA (hücreler 12 saat boyunca 25 μ M SsnB ve 10 nM PMA içeren kültür ortamı ile inkübe edilmiştir)

3.2.5. İmmünofloresan Boyama

İmmünofloresan boyama, herhangi bir doku veya hücreye ait bileşenlerin görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Florofor işaretli antikorların hedef proteinlere özgün olarak bağlanması ile hücre içerisindeki proteinlerin varlığı ve lokalizasyonu güvenilir bir biçimde tanımlanabilmektedir (Zaqout ve ark., 2020). Antijen-antikor etkileşimine dayalı bu yöntemle, deneysel uygulamalar sonrasında

protein düzeyinde meydana gelen değişimler floresan mikroskop altında kolayca incelenebilmektedir.

Çalışmamızda belirli proteinlerin hücre içi lokalizasyonu ve düzeylerinin belirlenmesi amacıyla immünofloresan boyama yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla yaklaşık 10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 8 kuyucuklu chamber slide kültür lamına (Merck Millipore, Cork, Ireland, #PEZGS0816) ekilen HCT-116 hücrelerinin gece boyunca yüzeye tutunmaları sağlanmıştır. Deney gruplarının 12 saat inkübasyonunun ardından hücreler soğuk PBS ile iki kere yıkanmış ve %4 paraformaldehit (Sigma-Aldrich, #158127, St. Louis, MO, USA) çözeltisi ile 10 dakika süreyle fikse edilmiştir. Ardından hücreler %0.2 Triton- X-100 (Sigma-Aldrich, #T8787, St. Louis, MO, USA) içerisinde 10 dakika permeabilize edilmiş, PBS ile beş kez yıkanmıştır. Bloklama işlemi için hücreler, %5 NGS (Vector Laboratories, #S-1000, Burlingame, CA, USA) kullanılarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Bloklama işleminin ardından, primer antikorlar kuyucuk başına 200 µL olacak şekilde ilave edilmiş ve chamber slide 4°C’de gece boyunca bekletilmiştir. Primer antikorlar, %5 NGS ve %0.2 Tween 20 içeren PBS ile hazırlanmıştır. Kullanılan primer antikorlar şunlardır:

Çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) tavşan poliklonal antikor (1:100 dilüsyon, #bs-0754R, Bioss Antibodies Inc., Wobun, MA, USA)

Fosfo-ERK1/2; (Thr202/Tyr204) tavşan poliklonal antikor (1:200 dilüsyon, #AF1015, Affinity Biosciences, Changzhou, Jiangsu, China)

Fosfo-NF-κB tavşan poliklonal antikor (1:200 dilüsyon, #AF2006, Affinity Biosciences, Changzhou, Jiangsu, China)

MyD88 tavşan poliklonal antikor (1:100 dilüsyon, #BT-AP05682, BT Lab, Shanghai, China)

Kesilmiş kaspaz-3 tavşan poliklonal antikor (1:100 dilüsyon, #9664S, Cell Signaling Tech., Danvers, MA, USA)

Primer antikor inkübasyonunun ardından, kültür ortamı uzaklaştırılmış, hücreler PBS ile üç kez yıkanmış ve karanlık ortamda kuyucuklara 200 µL florofor işaretli sekonder antikor (Alexa Fluor, 1:1000, Abcam, #ab150077, Cambridge, UK) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 45 dakikalık inkübasyon ardından hücreler, PBS ile üç kez yıkanmış ve chamber slide'ın üst yapısı lam kısmından ayrıştırılmıştır. Fazla sıvıdan arındırmak için kenarları peçete ile silinen lam üzerine çekirdek boyaması için DAPI (Fluoroshield with DAPI, Sigma-Aldrich, #F6057, St. Louis, MO, USA) damlatılmıştır. Lamlar, hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamelle kapatılmıştır. Görüntüleme floresan mikroskop (Olympus BX61 tam otomatik, Tokyo, Japan) ile DP Controller 3.2.1.276 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Alexa Fluor, 488 nm eksitasyon (uyarma) ve 505-525 nm emisyon dalga boylarında görüntülenmiştir. Floresan yoğunluğu, NIH ImageJ 1.53 yazılımı ile ölçülmüş ve CTCF (düzeltilmiş toplam hücre floresansı) = ID (entegral yoğunluk) – [ASC (seçilen hücre alanı) x BMF (arka plan ortalama floresansı)] formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6. Toll Like Reseptör 2/4 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), başlangıçta belirli DNA dizilerini çoğaltmak amacıyla geliştirilmiş olup, günümüzde biyolojik ve tıbbi araştırmalarda en güvenilir ve yaygın kullanılan yöntemlerden biri haline gelmiştir. Standart PCR yöntemleri, doğru kantitatif ölçümler için yeterince güvenilir olmadığından, teknik geliştirilmiş ve günümüzde gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR), gen ekspresyon seviyelerini hassas ve kantitatif biçimde değerlendirmeye olanak tanıyan güçlü bir analitik yöntem olarak ortaya çıkmıştır (Artika ve ark., 2022). Bu teknik, hedef mRNA'nın önce cDNA'ya dönüştürülmesini ve ardından PCR reaksiyonu sırasında oluşan ampikon miktarının gerçek zamanlı olarak izlenmesini içerir. PCR sırasında kullanılan floresan boyalar veya prob sistemleri, DNA sentezine bağlı olarak ışıma yapar ve bu sinyal ölçülerek gen ekspresyon düzeyleri kantitatif olarak belirlenir (Artika ve ark., 2022). qRT-PCR'in temel avantajı, yüksek hassasiyet ve spesifiklik ile az miktardaki mRNA örneklerinden bile güvenilir veri elde edilebilmesidir. Bu yöntem, gen ekspresyon değişimlerini değerlendirmek, farklı hücre veya dokular arasında karşılaştırmalar yapmak için yaygın

olarak kullanılmaktadır. Analiz sonuçları referans genler ile normalize edilerek, hedef genin ekspresyon düzeyleri karşılaştırmalı olarak belirlenmektedir.

Çalışmamızda tüm mRNA dizileri için OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) veritabanı referans olarak kullanılmıştır. Primer ve probalar, OligoYap 9.0 yazılımı (SNP Biotechnology R&D Ltd., Ankara, Türkiye) aracılığıyla tasarlanmış olup, kullanılan tüm primer ve probalar **Tablo 3.1**'de sunulmuştur. Primer ve probalar Probesyntesis (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir.

Tablo 3. 1. qRT-PCR için kullanılan primer ve probalar

GEN	OLIGO İSMİ	DİZİ *	5' BOYA	3' BOYA	GENBAN K NO
TLR2	HTLR2YP1	CAAAGACACACACAGAAATG	-	-	OMIM***: 603028
	TLR2KKP2	GCTTATCACTGGCTTGCTGTCAG	-	-	
	TLR2PR	TGTGGAGTGGGAAATCAGGGGACTC	FAM	BHQ-1	
TLR4	TLR4EXP1	CTGGTGGCTGTGGAGACAAATC	-	-	OMIM: 603030
	TLR4EXP2	GTCCAAGTGCTCTAGATTGGTCAG	-	-	
	TLR4EXPR	CTCTAGAGAACTTCCCCATTGGACATCTC	FAM	BHQ-1	
BETA AKTIN (ACTB)	AKTYP1	CCTGGCACCCAGCACAATGAAG	-	-	OMIM: 102630
	AKTY1P2	GGGTGTAACGCAACTAAGTCATAGTC	-	-	
	AKT-FAM-PR	AGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAG	FAM	BHQ-1	

*Primer probalar özel olarak hazırlanmış **OLIGOYAP 9.0** programı ile tasarlanmıştır

***Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®)

qRT-PCR analizleri, One-run RT PCR kiti (SNP Biotechnology R&D Ltd., Ankara, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarının 12 saatlik inkübasyonu sonrasında PBS içerisinde süspanse edilen 500 µL hücre, 4.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant uzaklaştırılmış, pellet üzerine 250 µL 1X K buffer, 10 µL Proteinaz K ve 50 µL solüsyon A ilave edilmiştir. Karışım 2-3 saniye kadar vortekslenmiş ve 70 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karışımın üzerine 100 µL solüsyon B ve 650 µL etanol (%99) ilave edilip

12.500 rpm'de 12 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant atılmış ve pellet üzerine 300 µL etanol (%75) ilave edilmiştir. Karışım 12.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, oluşan pellet üzerine 500 µL nükleaz içermeyen su ilave edilerek ekstrakte edilen RNA'lar kullanıma hazır hale getirilmiştir. Elde edilen RNA, 70 µL TE tamponu [10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA (pH 7,5)] içinde çözülmüştür. Çözelti, 1:50 oranında seyreltilmiş ve 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümlerle saflığı değerlendirilmiştir. 260/280 nm oranı 2'nin altında olan örnekler analize uygun kabul edilmiştir. RNA miktarı, 260 nm'deki absorbans değerine göre hesaplanmış olup (260 nm'de 1 absorbans birimi = 40 µg/mL RNA) her test için 100 ng/µL RNA, one-run karışımı, primer-1 (100 pmol), primer-2 (100 pmol) ve prob (100 pmol) bir araya getirilmiştir. Optimizasyon aşamasında, örneklerin minimum ve maksimum floresans farkı olan ΔR_n değerini en yüksek seviyeye çıkaracak en düşük primer konsantrasyonu belirlenmiştir. Farklı prob konsantrasyonları, ideal primer seviyelerinde test edilerek en uygun prob miktarı tespit edilmiş ve en düşük çevrim eşik (Ct) değerine sahip prob, optimal prob olarak kabul edilmiştir. qRT-PCR analizleri, Mx3000p Multiplex Quantitative PCR sistemi (Stratagene, San Diego, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve döngü koşulları şu şekilde uygulanmıştır: adım 1, 42 °C'de 10 dakika (1 döngü); adım 2, 90 °C'de 5 saniye; adım 3, 60 °C'de 45 saniye (40 döngü). Amplifikasyonun log-lineer fazı MxPro QPCR v6.22 yazılımıyla izlenmiş ve her örnek için Ct değerleri elde edilmiştir. Tüm ölçümler üçlü tekrar olarak yapılmış ve genlerin mRNA seviyeleri beta-aktin'e normalize edilerek $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ kat değişim olarak ifade edilmiştir.

3.2.7. ELISA Ölçümleri

Enzim bağlantılı immünosorbent analiz (ELISA), hücre, doku ve çeşitli biyolojik örneklerdeki belirli proteinlerin nicel olarak belirlenmesi amacıyla kullanılan bir yöntemdir. ELISA yönteminin farklı tipleri bulunmakta olup hedef proteinin özgüllüğünü ve hassasiyetini arttırmak amacıyla sandviç ELISA sıklıkla tercih edilmektedir. Sandviç ELISA, hedef proteinin iki farklı antikor aracılığıyla bağlanıp ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Birinci antikor mikro plaka yüzeyinde bulunur ve proteini plakada tutar. İkinci antikor ise proteine bağlanarak ölçülebilir bir sinyal üretir.

Böylece yüksek hassasiyet ile az miktardaki proteinler dahi tespit edilebilmektedir (Aydın ve ark., 2015).

Hücrelerdeki PCNA seviyelerini ölçmek için rekabetçi olmayan sandviç ELISA kiti (Elabscience, #ELK5141, Denver, CO, USA) kullanılmıştır. HCT-116 ve BJ deney gruplarının 12 saatlik inkübasyonunun ardından PBS ile süspanse edilen hücreler (10^7 hücre/mL), ultrasonikasyon cihazı (Bandelin Sonopuls HD 2070, Bandelin Elec., Berlin, Germany) ile parçalanmış ve süpernatantlar 4°C’de 10 dakika 1.500xg’de santrifüj edilerek toplanmıştır. PCNA seviyeleri, kit prospektüsüne uygun bir şekilde örneklerin 450 nm’de spektrometrik bir plak okuyucuda ölçülmesiyle belirlenmiştir. PCNA konsantrasyonu standart eğri kullanılarak hesaplanmış ve ng/ 10^6 hücre olarak belirtilmiştir.

TLR2 (BT Lab, E0358Hu, Shanghai, China), TLR4 (BT Lab, E0346Hu, Shanghai, China), MyD88 (BT Lab, E1870Hu, Shanghai, China), TNF- α (BT Lab, E0082Hu, Shanghai, China), IL-1 β (BT Lab, E0143Hu, Shanghai, China) ve IL-6 (BT Lab, E0090Hu, Shanghai, China) protein seviyeleri hücre lizat örneklerinde rekabetçi olmayan sandviç ELISA kitleri kullanılarak belirlenmiştir. Deney gruplarının 12 saatlik inkübasyonu ardından hücreler PBS içerisinde süspanse edilmiş ve ultrasonikasyona tabi tutulmuştur. Lizatlar 2-8°C’de 1.500xg’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar toplanmıştır. Ölçümler kit prosedürlerine uygun şekilde 450 nm’de spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin konsantrasyonları, doğrusal olmayan standart eğriler kullanılarak analiz edilmiş, interpolasyon işlemleri GraphPad Prism aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, hücre proteini mg proteine oranlanarak normalize edilmiştir.

3.2.8. Apoptotik Hücre Tayini

Apoptozun güvenilir bir şekilde tespit edilebilmesi için hem DNA hasarı hem de hücre membran yapısındaki değişiklikler açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada apoptotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla iki temel yaklaşım tercih edilmiştir. Bunlardan ilki DNA kırıklarını doğrudan işaretleyerek görselleştirmeyi mümkün kılan TUNEL yöntemi; ikincisi ise hücre membran bütünlüğü ve fosfotidil

serin lokalizasyonu üzerinden erken ve geç apoptotik hücrelerin analizini mümkün kılan akış sitometrisi temelli Annexin-V/Propidium iyodür (PI) yöntemidir.

3.2.8.1. TUNEL Analizi

TUNEL analizi, apoptozun geç evrelerindeki yoğun DNA hasarına sahip apoptotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Kyrylkova ve ark., 2012). Bu yöntem, apoptotik hücrelerde meydana gelen DNA kırıklarının 3'OH uçlarına floresan işaretli nükleotidlerin eklenmesi ve DNA hasarının moleküler düzeyde güvenilir bir şekilde belirlenmesi esasına dayanır.

Çalışmamızda apoptotik hücreler, tek adımlı TUNEL (Elabscience, #E-CK-A320, Houston, TX, USA) kiti kullanılarak tespit edilmiştir. Örneklerin ve reaktiflerin hazırlıkları kit prospektüsünde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Chamber slide kültür lamalarına kuyu başına 10^5 hücre ekilmiş, deney gruplarının inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda hücreler paraformaldehit içeren fiksatif çözeltisi içerisinde 20 dakika bekletilmiş, takiben beşer dakikalık sürelerle üç kez PBS ile yıkanmıştır. Deney prosedürün doğruluğunu tespit etmek için kullanılan pozitif kontrol grubuna DNaz I (200 U/mL) ilave edilmiş, negatif kontrol grubuna ise terminal deoksiniükleotid transferaz (TdT) enzimi uygulanmadan sadece eşit hacimde tampon ilavesi yapılmış ve 37 °C'de 25 dakika inkübe edilmiştir. Diğer tüm gruplara ise 100 µL TdT enzimi ilave edilerek aynı şartlar altında inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda her kuyucuğa 50 µL işaretleme çalışma solüsyonu ilave edilip 37 °C'de 60 dakika daha inkübe edilmiştir. Sonrasında lamalar üç kez her biri beş dakika olacak şekilde PBS ile yıkanmıştır. Chamber kısmı ayrıştırılan lamlara DAPI damlatılmış ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamelle kapatılmıştır. Örneklerin görüntülemesi floresan mikroskopta yapılmış, NIH ImageJ 1.53 yazılımı aracılığıyla floresan yoğunluğu analiz edilmiştir.

3.2.8.2. Akış Sitometri Analizi

Hücre membranının iç tabakasında bulunan fosfotidil serin, apoptotik hücrelerde dış yüzeye lokalize olur. Annexin-V, dış yüzeye lokalize olan fosfotidil serin moleküllerine

yüksek afiniteyle bağlanırken, PI ise membran bütünlüğü bozulan hücrelere bağlanarak işaretleme gerçekleştirir. Bu eş zamanlı gerçekleştirilen ikili boyama sonucunda hücreler canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik olarak akış sitometrisi ile ayrıştırılabilmektedir (Alshehade ve ark., 2024).

SsnB ve PMA'nın, HCT-116 ve BJ hücrelerindeki apoptotik etkileri floresan izotiyosiyanat konjugat (FITC) konjugeli Annexin-V ve PI apoptoz kiti (Elabscience: #E-CK-A211, Houston, TX, USA) ile değerlendirilmiştir. Daha önce tanımlandığı şekilde oluşturulan deney gruplarının inkübasyon süresi sonunda, her tüpe PBS içerisinde süspanse edilmiş 10^6 hücre ilave edilmiştir. Hücreler $1.500\times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve iki kere PBS ile yıkanmıştır. Süpernatantı uzaklaştırılan hücrelere 500 μ L Annexin-V bağlanma tamponu ilave edilmiş ve süspanse hale getirilmiştir. Üzerine 5 μ L FITC işaretli Annexin-V ve 5 μ L PI reaktifleri eklenen hücreler oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda floresan ile işaretlenmiş hücreler uygun voltaj ve kompanzasyon ayarlarıyla FACS Canto II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) akış sitometrisi cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar BD FACSDiva 6.1.3 yazılımı (BD Biosciences) kullanılarak analiz edilmiştir. Değerler toplam hücre yüzdesi olarak verilmiştir.

3.2.9. Sfingolipidomik Analiz

Sfingolipidomik analiz, hücre ve doku örneklerinde bulunan sfingolipidlerin detaylı şekilde incelenmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu analizlerde likit kromatografi ve kütle spektrometrisi kullanılmaktadır. Sfingolipidomik analizler sayesinde, sfingomiyelin, seramid ve kompleks sfingolipidlerin miktarı ve bileşimi hassas bir şekilde ortaya konulmaktadır. Elde edilen veriler, hücrelerin stres tepkileri, apoptoz süreçleri ve inflamasyon gibi durumlarda lipidlerin ne şekilde değiştiğini anlamamıza yardımcı olmaktadır.

Örnekler, ekibimizin daha önceki çalışmasında belirttiği şekilde (Afşar ve ark., 2020) sfingolipidomik analizler için hazırlanmıştır. Hücre lizatları (100 mg/mL protein), 2 μ L internal standart (5000 ng/mL, Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA) ve 375 μ L kloroform:metanol (1:2, v/v, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ile

muamele edilmiştir. Karışım 30 saniye sonikasyon ve 5 dakika vorteks işlemine tabi tutulmuş ve 100 µL distile su ile karıştırılarak 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında karışım, 2.000xg'de 5 dakika santrifüjlenmiş, elde edilen süpernatanta 125 µL distile su ve 125 µL kloroform ilavesi yapılarak vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyonun ardından oluşan 500 µL organik üst faz yeni bir cam tüpe aktarılmıştır. Sabit bir azot akımı (VLM, Bielefeld, Germany) altında kuruyan kalıntı 100 µL metanol:formik asit (99.9:0.1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) içinde çözülmüş ve sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) analizleri için insert viallere aktarılmıştır.

Seramid ve sfingomiyelin miktarları, ultra hızlı sıvı kromatografi sistemi (LC-20 AD UFLC XR) sistemi ile bağlı olan LC-MS/MS (Shimadzu LCMS-8040, Kyoto, Japan) cihazı kullanılarak belirlenmiştir (Özer ve ark., 2018). Analizlerde kullanılan standart sfingolipidler, N-palmitoil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin (C16 SM), N-stearoil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin (C18 SM), N-lignoseroil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin (C24 SM), N-palmitoil-D-eritro-sfingozin (C16 CER), N-stearoil-D-eritro-sfingozin (C18 CER), N-araşidoil-D-eritro-sfingozin (C20 CER), N-behenoil-D-eritro-sfingozin (C22 CER) ve N-lignoseroil-D-eritro-sfingozin (C24 CER) Avanti Polar Lipids (Birmingham, USA), internal standart olarak kullanılan C16 CER d18:1/16:0 (Palmitoil-U-¹³C₁₆) ise Cambridge Isotope Laboratories'ten (Tewksbury, MA, USA) temin edilmiştir. Standartlar methanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) içerisinde çözülmüş ve 40°C'de sonikasyon ile analizler için hazırlanmıştır. Kromatografik ayırma, XTerra C18 yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kolonu (2,1 mm × 50 mm, Waters, Milford, MA, USA) ile 60 °C'de, 10 µL enjeksiyon hacmi ve 0,450 mL/dk akış hızıyla gerçekleştirilmiştir.

Gradient ayırımında kullanılan mobil fazlar şunlardır:

Mobil faz A: Su/asetonitril/izopropanol; (8:1:1) + 10 mM amonyum format

Mobil faz B: Asetonitril/izopropanol (9:1) + amonyum format

Tespit için pozitif elektrospray iyonizasyon (ESI) ve çoklu reaksiyon izleme (MRM) yöntemi uygulanmıştır. Kalibrasyon aralıkları 39–625 ng/mL arasında lineer olarak belirlenmiş ve toplam analiz süresi 30 dakika olarak optimize edilmiştir.

Sfingomiyelin ve seramid türlerinin doğru şekilde tanımlanabilmesi için, her lipidin moleküler ağırlığı ile birlikte LC-MS/MS analizinde kullanılan prekürsör ve ürün iyonlarının bilinmesi önemlidir. Bu değerler, lipidlerin yapısal doğrulamasını ve kantitatif ölçümlerini sağlar.

Aşağıda, çalışmada kullanılan sfingomiyelin ve seramid türlerine ait değerler belirtilmiştir (**Tablo 3.2**).

Tablo 3. 2. Sfingomiyelin ve seramid prekürsör ve ürün iyonlarının değerleri

Standartlar	Moleküler ağırlık	Prekürsör m/z:	Ürün m/z
IS C16 Seramid (d18:1/16:0) C16C18H67NO3	553.78	564	264
16:0 SM (d18:1/16:0)	703.028	704	184
18:0 SM (d18:1/18:0)	731.081	732	184
24:0 SM (d18:1/24:0)	815.241	816	184
C16 Seramid (d18:1/16:0)	537.901	538	264
C18 Seramid (d18:1/18:0)	565.954	566	264
C20 Seramid (d18:1/20:0)	594.007	594	264
C22 Seramid (d18:1/22:0)	622.060	622	264
C24 Seramid (d18:1/24:0)	650.113	650	264

* Moleküler ağırlık, molekülün kütle spektrometresiyle ölçülen kütlesini tahmin etmemizi sağlar. Prekürsör iyon, LC-MS/MS analizinde, molekül önce iyonlaştırılır ve pozitif yüklü bir iyon (prekürsör iyon) seçilir. Prekürsör iyon, parçalanarak ürün iyonları üretir. Ürün iyon, prekürsör iyon parçalandığında oluşan karakteristik iyonlardan biri

ürün iyonudur. Bu iyon, molekülün belirli bir yapısal parçasını temsil eder ve türünü doğrulamak için kullanılır.

3.2.10. Protein Ölçümleri

Belirlenen doz ve sürelerde PMA ve/veya SsnB uygulanmış olan HCT-116 ve BJ hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonları Coomassie reaktifi (Thermo Scientific; Rockford, IL, USA, #23238) kullanılarak 595 nm’de ölçülmüştür. Ölçümlerimizde bovin serum albümin (BSA) standart olarak kullanılmış ve lizatlardaki protein konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.2.11. İstatistiksel Analiz

SigmaPlot 15 (Systat Software, Inc., St Palo Alto, CA, USA) ve GraphPad Prism 9.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) yazılımları istatistiksel analizler için kullanılmıştır. Normalite testleri ile verilerin dağılımı belirlenmiştir. Normal dağılıma uymayan veriler için non-parametrik testler kullanılmıştır. Deney grupları arasındaki karşılaştırmalar Kruskal-Wallis veya tek yönlü ANOVA testleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki spesifik farklılıkların belirlenmesi için post-hoc testleri uygulanmıştır. Şekil açıklamalarında ayrıntılı bilgiler yer almaktadır.

4. BULGULAR

4.1. Sparstolonin B ve Forbol 12-Miristat 13-Asetat'ın Hücre Canlılığına Etkisi

HCT-16 ve sağlıklı kontrol grubumuz olan BJ hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan SsnB (3.125-50 μ M) ve PMA'nın (1-10 nM), 12, 16 ve 18 saatlik etkisi **Şekil 4.1**'de gösterilmiştir. HCT-116 hücrelerine 25 μ M ve 50 μ M SsnB uygulanması, kontrol, DMSO ve diğer doz gruplarına kıyasla tüm zaman dilimlerinde hücre canlılığını anlamlı derecede azaltmıştır ($p<0.01$) (**Şekil 4.1A**). SsnB'nin 6.25 μ M, 12.5 μ M ve 25 μ M'lık dozlarda 18 saatlik uygulanması, diğer saatlere kıyasla hücrelerde canlılığı anlamlı bir düzeyde azaltmıştır ($p<0.01$). Sağlıklı BJ hücrelerinde, 50 μ M SsnB uygulaması tüm zaman dilimlerinde kontrol, DMSO ve diğer doz gruplarına kıyasla hücre canlılığını anlamlı derecede azaltmıştır ($p<0.05$) (**Şekil 4.1D**). SsnB'nin 12 saatlik bir periyotta uygulanmasının ardından, HCT-116 hücrelerinin canlılığı 58.49 ± 9.34 (ortalama $\pm$ SD) olarak hesaplanmış ve yaklaşık olarak %50 oranında bir hücre kaybına işaret etmiştir. BJ hücrelerinde, 12 saatlik 25 μ M uygulaması hücre canlılığını anlamlı derecede etkilememiştir. Bu nedenle, 25 μ M SsnB'nin 12 saatlik inkübasyonu diğer tüm uygulamalar için seçilen doz olmuştur.

HCT-116 hücrelerinde proliferasyonu arttırmak için PMA kullanılmıştır. Hücre canlılığı üzerindeki etkinliği 12-18 saatlik inkübasyon aralığında incelenmiştir.

Şekil 4.1B'de gösterildiği üzere, 1-10 nM aralığında PMA'nın 12 saatlik uygulaması, HCT-116 hücrelerinde proliferasyonu etkin biçimde uyarmış ve aynı doz gruplarında diğer tüm saatlere kıyasla hücre canlılığını artırmıştır ($p<0.01$). PMA'nın 12 saatlik inkübasyonu sonrasında HCT-116 hücrelerinde canlılık 195.04 ± 44.94 (ortalama $\pm$ SD) olarak hesaplanmış ve yaklaşık %100 hücre artışını işaret etmiştir. PMA'nın BJ hücrelerinde hücre canlılığını artırıcı bir etkisi görülmemiştir (**Şekil 4.1E**). Ancak 16-18 saatlik 10 nM PMA uygulaması sonucunda BJ hücrelerinde hücre canlılığı diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). Elde edilen veriler ışığında, diğer tüm deneylerde kullanılmak üzere 10 nM PMA dozu seçilmiştir.

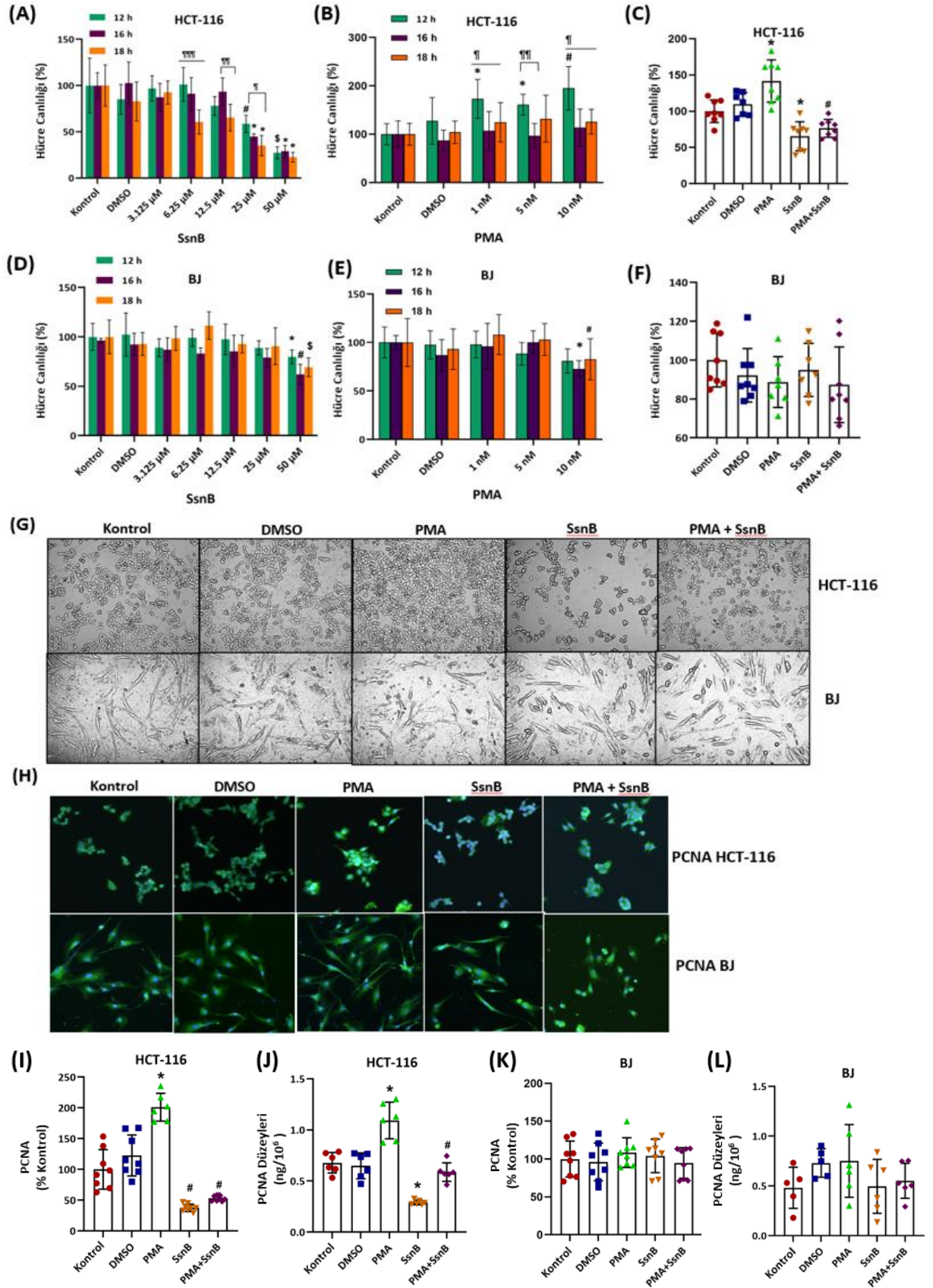
Şekil 4.1C ve **Şekil 4.1F**'de, HCT-116 ve BJ hücreleri sırasıyla 1µL/mL DMSO, 25 µM SsnB ve/veya 10 nM PMA ile 12 saat boyunca inkübe edilmiştir. HCT-116 hücrelerinin PMA ile inkübasyonu sonucunda, hücre canlılığının diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede arttığı ($p<0.05$), SsnB inkübasyonu sonucunda ise azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). PMA + SsnB grubunda hücre canlılığının azaldığı ($p<0.05$) ve SsnB'nin PMA aktivitesini baskıladığı görülmüştür. Sağlıklı fibroblast hücrelerinde aynı doz grupları hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır (**Şekil 4.1F**).

HCT-116 ve BJ hücrelerine ait ışık mikroskop görüntüleri **Şekil 4.1G**'de verilmiştir. Kontrol ve DMSO uygulama gruplarında morfolojik bir değişim gözlenmezken, 12 saat 10 nM PMA uygulanan hücrelerde belirgin bir hücre proliferasyonu görülmüştür. SsnB'nin 12 saat 25 µM olarak uygulandığı HCT-116 hücrelerinde değişen morfoloji ile kümelenme ve büzülme meydana gelmiş, toksik etki oluşmuştur. BJ hücrelerinde anlamlı morfolojik değişimler kaydedilmemiştir.

Şekil 4.1H'de HCT-116 ve BJ hücrelerine ait immünofloresan boyamalar gösterilirken, **Şekil 4.1I** ve **Şekil 4.1K** sırasıyla PCNA floresan boyanma miktarlarını ifade etmektedir. BJ hücrelerinde tüm uygulama gruplarında, PCNA floresan boyama ve kantifikasyonu benzer sonuçlar göstermektedir.

HCT-116 hücrelerinde, PMA'nın 12 saatlik 10nM uygulaması PCNA floresan boyamasını 213.34 ± 38.04 (ortalama $\pm$ SD) değerine çıkarmış ve kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %100 artış göstermiştir. SsnB'nin 12 saat 25 µM inkübasyonu ardından HCT-116 hücrelerinin PCNA floresan boyama değeri 37.51 ± 5.89 (ortalama $\pm$ SD) olarak belirlenmiştir. Bu sonuç kontrole kıyasla %40 oranında bir azalmayı işaret etmektedir. SsnB grubundaki PCNA floresan miktarı PMA + SsnB grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik göstermemiştir.

HCT-116 hücrelerindeki PCNA kantifikasyon verileri, hücre canlılığı sonuçları ile uyum göstermektedir. PCNA protein miktarı, HCT-116 ve BJ hücrelerinde ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmüş ve sonuçlar sırasıyla **Şekil 4.1J** ve **Şekil 4.1L** 'de rapor edilmiştir.



Şekil 4. 1. HCT-116 hücrelerinde hücre canlılığı ve proliferasyon. Görüntüler 40X objektif

kullanılarak elde edilmiştir. **(A)** Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n=8$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz iki yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. #, $p < 0.01$ aynı zaman diliminde kontrol, DMSO, 3.125 ve 6.25 μM grupları ile karşılaştırıldığında. *, $p < 0.001$ aynı zaman diliminde kontrol, DMSO, 3.125, 6.25 ve 12.5 μM grupları ile karşılaştırıldığında. \$, $p < 0.001$ aynı zaman diliminde diğer tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. ¶¶¶, $p < 0.01$ 18 saat ile 12 saat ve 16 saat karşılaştırıldığında. ¶¶, $p < 0.01$ 18 saat ile 16 saat karşılaştırıldığında.¶, $p < 0.01$ 18 saat ile 12 saat karşılaştırıldığında. **(B)** Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n=8$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz iki yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.05$ aynı zaman diliminde kontrol grubuna karşı. #, $p < 0.01$ aynı zaman diliminde kontrol ve DMSO gruplarına karşı. ¶, $p < 0.01$ 12 saat ile 16 ve 18 saat karşılaştırıldığında. ¶¶, $p < 0.01$ 12 saat ile 16 saat karşılaştırıldığında. **(C)** HCT-116 hücreleri 12 saat boyunca DMSO (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$), SsnB (25 μM) ve/veya PMA (10 nM) ile muamele edilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 8$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.05$ diğer tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.05$ DMSO ve PMA grupları ile karşılaştırıldığında. **(D)** Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 8$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel iki yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.05$ aynı zaman diliminde kontrol, DMSO ve 6.25 μM grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.05$ aynı zaman diliminde kontrol, DMSO, 3.125, 6.25 ve 12.5 μM grupları ile karşılaştırıldığında. \$, $p < 0.05$ aynı zaman diliminde diğer tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **(E)** Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 8$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel iki yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.05$ aynı zaman diliminde kontrol, 1 ve 5 nM grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.05$ aynı zaman diliminde PMA 1 nM grubu ile karşılaştırıldığında. **(F)** BJ hücreleri 12 saat boyunca DMSO (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$), SsnB (25 μM) ve/veya PMA (10 nM) ile muamele edilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 8$ farklı ölçümü göstermektedir. **(G)** HCT-116 ve BJ hücreleri 12 saat boyunca DMSO (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$), SsnB (25 μM) ve/veya PMA (10 nM) ile muamele edilmiştir. **(H)** Çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA), 12 saat boyunca DMSO (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$), SsnB (25 μM) ve/veya PMA (10 nM) ile muamele edilmiş HCT-116 ve BJ hücrelerinde immüno floresan ile boyanmıştır. **(I)** HCT-116 hücrelerindeki PCNA floresan boyanması ImageJ yazılımı kullanılarak kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 8$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.001$ diğer tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.01$ kontrol, DMSO ve PMA grupları ile karşılaştırıldığında. **(J)** HCT-116 hücrelerindeki PCNA protein düzeyleri. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 6$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.01$ diğer tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.01$ SsnB grubu ile karşılaştırıldığında. **(K)** BJ hücrelerindeki PCNA floresan boyanması ImageJ yazılımı ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 8$ farklı ölçümü göstermektedir. **(L)** BJ hücrelerindeki PCNA protein düzeyleri. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 6$ farklı ölçümü göstermektedir.

4.2. Sparstolonin B ve Forbol 12-Miristat 13-Asetat'ın Toll Like Reseptör 2/4 Sinyal Yolu Üzerindeki Etkisi

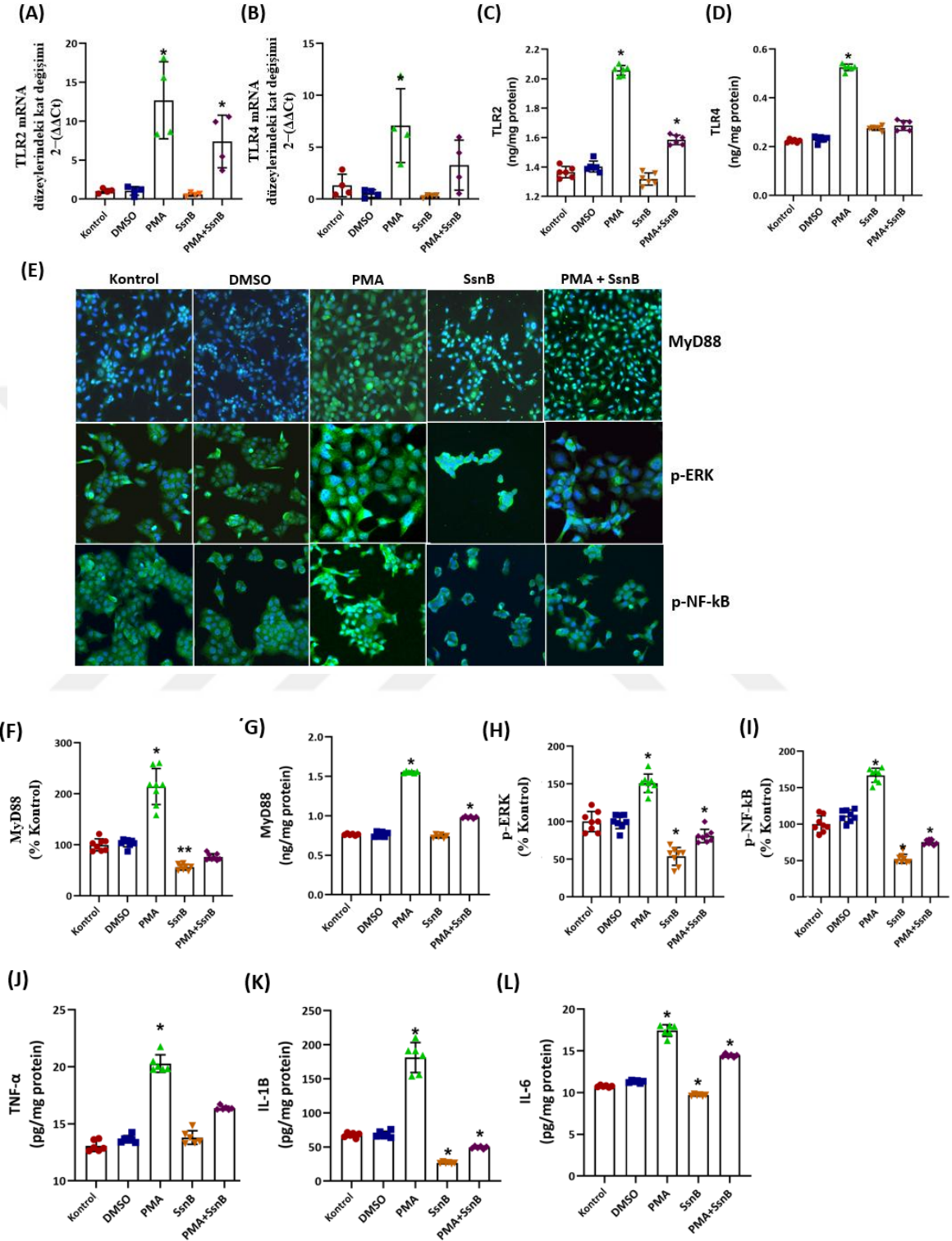
Şekil 4.2A ve **Şekil 4.2B** sırasıyla TLR2 ve TLR4 mRNA miktarlarını rapor etmektedir. **Şekil 4.2C** ve **Şekil 4.2D** ise TLR2 ve TLR4 protein miktarlarını göstermektedir. TLR2 mRNA seviyeleri, PMA (10 nM) ve PMA (10 nM) + SsnB (25 µM) ile 12 saat muamele edilen hücrelerde 25 µM SsnB ile muamele edilen gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.05$) (**Şekil 4.2A**). mRNA miktarlarına paralel olarak, TLR2 protein seviyeleri de PMA ve PMA + SsnB ile muamele edilen gruplarda diğer gruplara kıyasla anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.001$) (**Şekil 4.2C**). TLR4 mRNA seviyeleri, PMA uygulanan grupta SsnB grubuna kıyasla anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.01$) (**Şekil 4.2B**). TLR4 protein miktarı, mRNA seviyelerine uygun olarak PMA uygulanan hücrelerde tüm gruplara kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$) (**Şekil 4.2D**).

Şekil 4.2E, MyD88, p-ERK ve p-NF-κB immünofloresan boyama sonuçlarını göstermektedir. Kontrol ve DMSO gruplarında hücrelerin sitoplazmalarında düşük yoğunlukta, homojen dağılımlı bir floresan sinyali gözlenmiştir. Bu gruplarda hücre morfolojisi düzenli, çekirdek-sitoplazma oranı dengeli ve membran konturları belirgin olup yüksek bir aktivasyon bulgusuna rastlanmamıştır. PMA ile muamele edilen hücrelerde, floresan sinyal yoğunluğu belirgin şekilde artmış ve özellikle p-ERK ile p-NF-κB boyamasında sitoplazmadan çekirdek bölgesine doğru yoğun translokasyon paterni izlenmiştir. Hücrelerin daha yayvan morfoloji kazandığı, sitoplazmik uzantılarının belirginleştiği ve çekirdek çevresinde granüler yoğunlukta floresan birikimi olduğu tespit edilmiştir. Bu görünüm, hücre aktivasyonunu ve inflamatuvar yanıtın tetiklendiğini göstermektedir. SsnB ile muamele edilen grupta ise floresan sinyal şiddeti belirgin şekilde azalmış, boyanma daha düşük yoğunlukta seyretmiştir. Morfolojik olarak bu hücrelerin daha kompakt, sitoplazmik uzantıları azalmış, çekirdek çevresinde ise sınırlı düzeyde floresan birikimi gözlenmiştir. Bu durum, SsnB'nin PMA ile indüklenen aktivasyonu baskıladığını ve sinyal yollarının inhibisyonuna yol açtığını göstermektedir.

Şekil 4.2F ve **Şekil 4.2G** ise sırasıyla MyD88 floresan boyama kantitatif ölçümlerini ve ELISA protein sonuçlarını ifade etmektedir. MyD88 protein seviyeleri ve floresan boyama sonuçları, PMA ile muamele edilen hücrelerde diğer gruplara kıyasla anlamlı bir şekilde artış göstermiştir ($p<0.001$). SsnB ile inkübe edilen hücrelerde, MyD88 floresan boyaması kontrol ve DMSO gruplarına kıyasla anlamlı şekilde azalırken ($p<0.001$), protein miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmemiştir. Aynı şekilde PMA + SsnB grubunda, MyD88 floresan boyama miktarı kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark göstermezken, ELISA protein sonuçları tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.001$).

Şekil 4.2H ve **Şekil 4.2I**, sırasıyla p-ERK ve p-NF- κ B floresan boyama kantitatif sonuçlarını ifade etmektedir. PMA ile muamele edilen hücrelerde p-ERK ve p-NF- κ B floresan boyanma yoğunluğu, diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir ($p<0.01$). SsnB uygulanan hücre gruplarında p-ERK ve p-NF- κ B floresan boyanma yoğunluğu tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$).

Şekil 4.2J, **Şekil 4.2K** ve **Şekil 4.2L** sırasıyla TNF- α , IL-1 β ve IL-6 protein düzeylerini rapor etmektedir. PMA uygulanan hücre gruplarında, TNF- α proinflamatuvar sitokin düzeyleri kontrol, DMSO ve SsnB gruplarına kıyasla istatistiksel düzeyde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.05$) (**Şekil 4.2J**). IL-1 β ve IL-6 düzeyleri ise PMA uygulanan hücrelerde, diğer tüm gruplar ile karşılaştırıldığında belirgin bir biçimde artış gösterirken ($p<0.05$) SsnB grubunda azalma meydana gelmiştir ($p<0.001$).



Şekil 4. 2. HCT-116 hücrelerinde TLR2/TLR4 sinyal yolağının değerlendirilmesi. Tüm deneylerde hücreler 12 saat boyunca DMSO (1 μ L/mL), SsnB (25 μ M) ve/veya PMA (10 nM) ile muamele edilmiştir. Görüntüler 40 $\times$ objektif kullanılarak elde edilmiştir. **(A)** TLR2'nin PCR analizi. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve n = 4 farklı ölçümü göstermektedir.

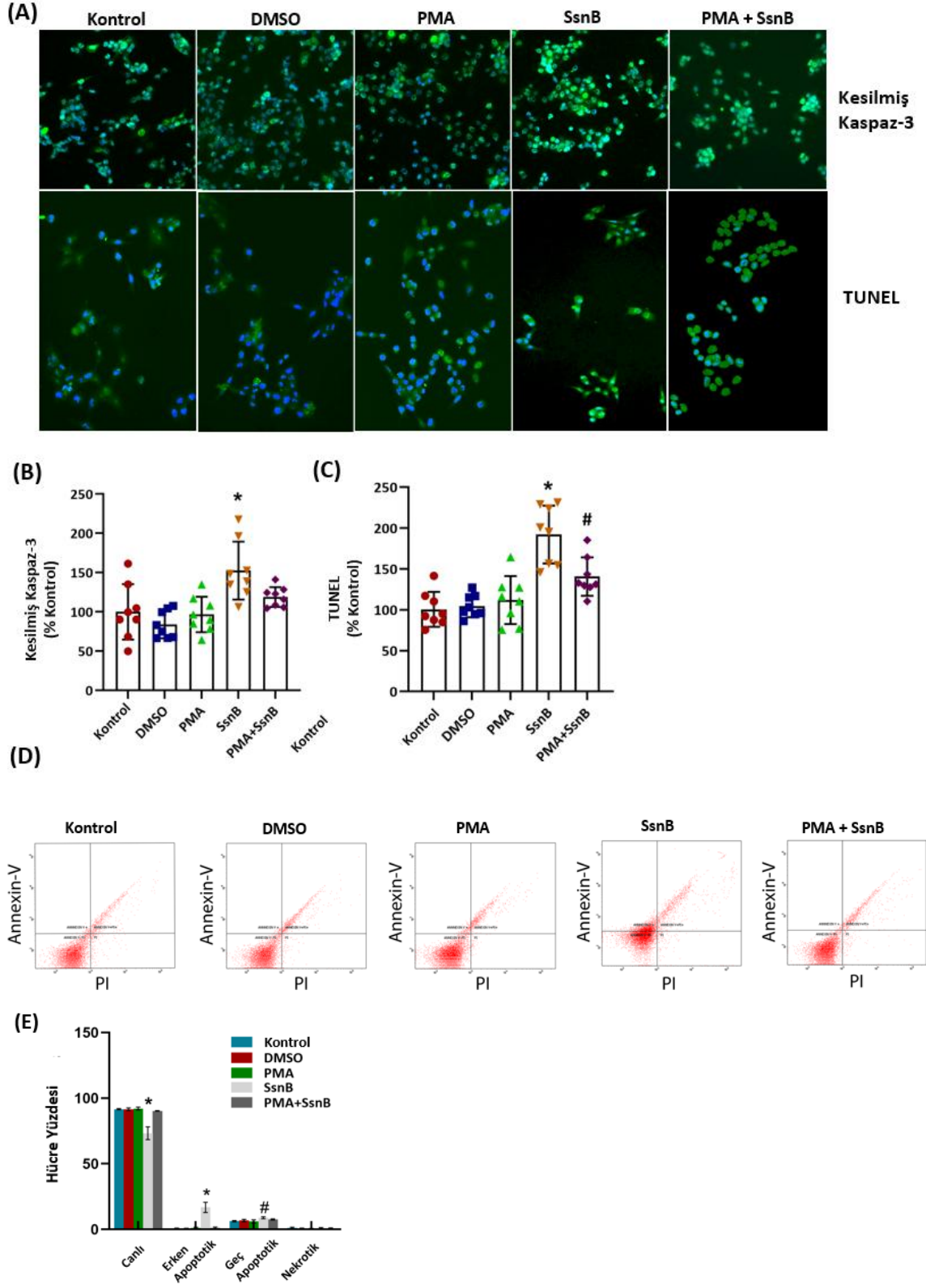
İstatistiksel analiz Kruskal–Wallis testi ile yapılmış ve gruplar arası fark Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.05$ SsnB grubu ile karşılaştırıldığında. **(B)** TLR4'ün PCR analizi. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 4$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz Kruskal–Wallis testi ile yapılmış, gruplar arası fark Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.01$ SsnB grubu ile karşılaştırıldığında. **(C)** TLR2 protein düzeyleri. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 6$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.001$ tüm diğer gruplarla karşılaştırıldığında. **(D)** TLR4 protein düzeyleri. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 6$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.001$ tüm diğer gruplarla karşılaştırıldığında. **(E)** HCT-116 hücrelerinde MyD88, p-ERK ve p-NF- κ B immüno floresan boyaması **(F)** MyD88 floresan boyaması ImageJ yazılımı ile kantitatif olarak analiz edilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 8$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.001$ tüm diğer gruplarla karşılaştırıldığında. **, $p < 0.001$ kontrol ve DMSO gruplarıyla karşılaştırıldığında. **(G)** MyD88 protein düzeyleri. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 6$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.001$ tüm diğer gruplarla karşılaştırıldığında. **(H)** p-ERK floresan boyaması ImageJ yazılımı ile kantitatif olarak analiz edilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 8$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.01$ tüm diğer gruplarla karşılaştırıldığında. **(I)** p-NF- κ B floresan boyaması ImageJ yazılımı ile kantitatif olarak analiz edilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.001$ tüm diğer gruplarla karşılaştırıldığında. **(J)** TNF- α protein düzeyleri. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 6$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz Kruskal–Wallis testi ile yapılmış, gruplar arası fark Dunn çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p < 0.05$ kontrol, DMSO ve SsnB grupları ile karşılaştırıldığında. **(K)** IL-1 β protein düzeyleri. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 6$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.05$ tüm diğer gruplarla karşılaştırıldığında. **(L)** IL-6 protein düzeyleri. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 6$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.001$ tüm diğer gruplarla karşılaştırıldığında.

4.3. Sparstolonin B ve Forbol 12-Miristat 13-Asetat'ın Apoptoz Üzerindeki Etkisi

Şekil 4.3A kesilmiş kaspaz-3 ve TUNEL floresan boyamalarını göstermektedir. **Şekil 4.3B** ve **Şekil 4.3C** ise sırasıyla kesilmiş kaspaz-3 ve TUNEL boyama miktarlarını ifade etmektedir. Kesilmiş kaspaz-3 floresan boyanma yoğunluğunun miktarı, SsnB ile muamele edilen hücre grubunda kontrol, DMSO ve PMA grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.01$). TUNEL floresan boyanma miktarı, SsnB uygulanan hücrelerde diğer tüm uygulama gruplarına kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.01$). TUNEL floresan boyaması, PMA uygulanan hücrelerde azaltmışken, PMA + SsnB grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artış göstermiştir ($p<0.05$)

Şekil 4.3D, Annexin V ve PI ile işaretli hücrelerin akış sitometri grafiğini göstermektedir. **Şekil 4.3E**'de HCT-116 hücrelerinde Annexin V ve PI işaretlemesinin kantitatif analizi belirtilmiştir. SsnB uygulama grubunda canlı hücre sayısı, diğer tüm uygulama gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir ($p<0.05$). Erken apoptotik hücre sayısı, SsnB grubunda diğer tüm uygulama gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı derecede bir artış göstermiştir ($p<0.05$). Geç apoptotik hücre sayısı, SsnB grubunda kontrol ve PMA uygulama gruplarına kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.05$).

Bu bulgular, SsnB'nin HCT-116 hücrelerinde apoptozu etkin bir şekilde indükleyerek hücre canlılığını azalttığını ve hem erken hem de geç apoptotik süreçleri artırdığını göstermektedir.



Şekil 4. 3. HCT-116 hücrelerinde apoptoz. Tüm deneylerde hücreler DMSO (1 μ L/mL), SsnB (25 μ M) ve/veya PMA (10 nM) ile 12 saat süreyle muamele edilmiştir. Görüntüler 40 $\times$ objektif

kullanılarak elde edilmiştir. **(A)** Kesilmiş kaspaz-3 ve TUNEL boyaması immüno floresan boyama temsili görüntüleri. **(B)** Kesilmiş kaspaz-3 floresan boyaması ImageJ yazılımı kullanılarak kantitatif olarak analiz edilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 8$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.01$, kontrol, DMSO ve PMA grupları ile karşılaştırıldığında. **(C)** TUNEL boyaması ImageJ yazılımı kullanılarak kantitatif olarak analiz edilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir ve $n = 8$ farklı ölçümü göstermektedir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.01$, diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında. #, $p < 0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. **(D)** Akış sitometrisi kullanılarak Annexin V-FITC ve PI ile işaretli HCT-116 hücrelerinde apoptozun temsili analizi. Her panelde, alt sol kare canlı hücreleri, üst sol kare erken apoptotik hücreleri, üst sağ kare geç apoptotik hücreleri ve alt sağ kare nekrotik hücreleri göstermektedir. Her koşul için toplam 10^4 hücre seçilmiş ve analiz edilmiştir. **(E)** Annexin-V ve PI işaretli HCT-116 hücrelerinde deneysel gruplarda kantitatif analiz akış sitometrisi kullanılarak yapılmıştır. Veriler üç ayrı deneyin temsili olup değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır. Gruplar arasındaki fark Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p < 0.05$, kontrol, DMSO, PMA ve PMA + SsnB grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.05$, kontrol ve PMA grupları ile karşılaştırıldığında.

4.4. Sparstolonin B ve Forbol 12-Miristat 13-Asetat'ın Sfingolipid Seviyeleri Üzerindeki Etkisi

Tablo 4.1, HCT-116 ve BJ hücre gruplarında ölçülen sfingolipid seviyelerini belirtmektedir. SsnB ile muamele edilen hücre gruplarında, C18, C30, C22 ve C24 seramid seviyelerinde diğer tüm uygulama gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.01$). PMA ile muamele edilen hücre gruplarında, S1P ve C1P seviyelerinde, diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı bir artış meydana gelmiştir ($p < 0.01$). S1P seviyeleri, PMA grubuna kıyasla PMA + SsnB gruplarında istatistiksel olarak azalmış olsa da ölçülen miktar kontrol, DMSO ve SsnB gruplarında halen anlamlı olarak yüksek olarak belirlenmiştir ($p < 0.01$). Benzer şekilde, C1P seviyeleri de PMA + SsnB gruplarında PMA grubuna kıyasla istatistiksel olarak azalmış ($p < 0.01$), ancak DMSO ve SsnB gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek ölçülmüştür ($p < 0.05$).

Tablo 4. 1. HCT-116 ve BJ hücrelerindeki sfingolipid düzeyleri. Tüm değerler ortalama $\pm$ SD'dir. SM, sfingomiyelin; S1P, sfingozin-1 fosfat; C1P, seramid-1-fosfat; Sparstolonin B (SsnB); Dimetil Sülfoksit (DMSO); Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile gerçekleştirilmiş ve gruplar arasındaki fark Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir *, $p < 0.01$ Kontrol, DMSO, PMA ve PMA + SsnB grupları ile karşılaştırıldığında. **, $p < 0.01$ Kontrol, DMSO, SsnB ve PMA + SsnB grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.01$ Kontrol, DMSO ve SsnB grupları ile karşılaştırıldığında.

	KONTROL ($n=6$)	DMSO ($n=6$)	PMA ($n=6$)	SsnB ($n=6$)	PMA + SsnB ($n=6$)
Sfingolipidler (ng/mg protein)					
16:0 SM (d18:1/16:0)					
HCT-116	357,84 $\pm$ 188,76	389,33 $\pm$ 101,59	288,43 $\pm$ 98,55	399,96 $\pm$ 195,80	179,05 $\pm$ 25,01
BJ	362,92 $\pm$ 35,55	412,82 $\pm$ 103,74	355,55 $\pm$ 51,55	371,99 $\pm$ 24,61	311,66 $\pm$ 100,76
18:0 SM (d18:1/18:0)					
HCT-116	58,02 $\pm$ 3,42	45,16 $\pm$ 3,41	47,42 $\pm$ 4,17	54,98 $\pm$ 20,28	61,32 $\pm$ 5,19
BJ	48,99 $\pm$ 11,30	46,07 $\pm$ 6,50	43,15 $\pm$ 12,69	51,20 $\pm$ 2,91	46,95 $\pm$ 9,72
24:0 SM (d18:1/24:0)					
HCT-116	79,01 $\pm$ 13,99	84,27 $\pm$ 9,33	85,53 $\pm$ 19,17	95,35 $\pm$ 8,17	99,82 $\pm$ 31,30
BJ	102,28 $\pm$ 23,69	91,45 $\pm$ 5,50	92,43 $\pm$ 7,01	91,41 $\pm$ 8,35	93,32 $\pm$ 4,55
C16 Seramid (d18:1/16:0)					
HCT-116	49,28 $\pm$ 5,93	51,56 $\pm$ 8,26	53,52 $\pm$ 8,09	59,11 $\pm$ 11,52	51,73 $\pm$ 8,69
BJ	23,90 $\pm$ 5,66	23,37 $\pm$ 4,97	21,13 $\pm$ 3,74	23,61 $\pm$ 4,81	18,43 $\pm$ 1,12
C18 Seramid (d18:1/18:0)					
HCT-116	5,35 $\pm$ 0,81	5,09 $\pm$ 0,86	5,34 $\pm$ 0,81	7,16 $\pm$ 0,73*	5,42 $\pm$ 1,03
BJ	2,28 $\pm$ 0,26	2,56 $\pm$ 0,55	2,48 $\pm$ 0,94	2,62 $\pm$ 0,60	1,68 $\pm$ 0,13
C20 Seramid (d18:1/20:0)					
HCT-116	6,22 $\pm$ 0,81	6,36 $\pm$ 0,76	6,79 $\pm$ 1,03	9,58 $\pm$ 0,79*	6,60 $\pm$ 1,25
BJ	2,70 $\pm$ 0,27	2,95 $\pm$ 0,75	2,86 $\pm$ 1,06	3,05 $\pm$ 0,64	2,40 $\pm$ 0,84
C22 Seramid (d18:1/22:0)					
HCT-116	8,31 $\pm$ 1,16	8,34 $\pm$ 0,67	8,64 $\pm$ 1,26	14,31 $\pm$ 4,02*	8,80 $\pm$ 1,39
BJ	4,62 $\pm$ 0,63	4,32 $\pm$ 0,85	4,10 $\pm$ 1,39	4,47 $\pm$ 0,91	4,29 $\pm$ 0,95
C24 Seramid (d18:1/24:0)					
HCT-116	12,34 $\pm$ 1,59	13,53 $\pm$ 1,84	14,11 $\pm$ 1,81	30,30 $\pm$ 5,12*	16,82 $\pm$ 2,69
BJ	9,19 $\pm$ 0,59	8,65 $\pm$ 0,80	9,20 $\pm$ 3,21	9,76 $\pm$ 1,15	8,11 $\pm$ 0,57
S1P					
HCT-116	0,55 $\pm$ 0,12	0,34 $\pm$ 0,05	2,61 $\pm$ 0,40**	0,28 $\pm$ 0,14	1,18 $\pm$ 0,36#
BJ	0,23 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,15	0,20 $\pm$ 0,05
C1P					
HCT-116	0,38 $\pm$ 0,12	0,31 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,06**	0,12 $\pm$ 0,03*	0,45 $\pm$ 0,09#
BJ	0,17 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,02

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın sonuçları, HCT-116 hücrelerinin 10 nM PMA ile 12 saat boyunca muamele edilmesinin hücre proliferasyonunu anlamlı derecede arttırdığını göstermektedir. Aynı doz ve sürede PMA uygulaması yapılan BJ hücrelerinde ise hücre proliferasyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. PKC aktivatörü olan PMA, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi biyolojik süreçleri düzenlemektedir (Mosior ve ark., 1995; Tahara ve ark., 2009; Hwang ve ark., 2010). PMA, kolorektal kanser progresyonunun temel itici gücü olan kronik inflamasyonun tümör promotör etkilerini de en iyi şekilde taklit etmektedir. Hücre proliferasyonu, inflamasyonu ve özellikle kolorektal kanser modellerinde TLR sinyal yollarını uyarıcı özelliği iyi tanımlanmış olan PMA, çalışmamızda tümör promotörü ve inflamatuvar aktivatör olarak kullanılmıştır. PMA'nın çeşitli hücre tiplerinde TLR2 ve TLR4 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. Örneğin, HL-60 hücrelerinin PMA aracılı makrofaj benzeri hücrelere farklılaşmasının TLR2 ve TLR4 ekspresyonunda bir artışa yol açtığı gösterilmiştir. Bu yukarı regülasyonun PKC aktivasyonuna bağlı olduğu rapor edilmiştir. PMA, kolorektal kanser modelleri başta olmak üzere yaygın olarak proinflamatuvar ve protümörojenik sinyal kaskatlarını incelemek için kullanılmaktadır.

Çalışmamızda, HCT-116 hücrelerinin 25 µM SsnB ile 12 saat boyunca inkübasyonu, PMA varlığında ve yokluğunda hücre proliferasyonunu anlamlı derecede azaltmıştır. Aynı doz ve zaman diliminde PMA ve/veya SsnB uygulanan BJ hücrelerinde ise, proliferasyon açısından anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Yapılan çalışmalar, kanser ve endotel hücrelerine SsnB uygulamasının hücre proliferasyonunu azalttığını göstermektedir (Liu ve ark., 2021; Liu ve ark., 2015; Bateman ve ark., 2013; Lyu ve ark., 2022; Takahashi ve ark., 2024). SsnB'nin G1, G2/M2 hücre döngüsü kontrol noktalarında durdurduğu, hücre göçü, invazyon ve anjiyogenez gibi kanserle ilişkili süreçleri inhibe ettiği rapor edilmiştir (Bateman ve ark., 2013). 10-100 µM konsantrasyonlarındaki SsnB uygulamalarının, nöroblastom (Kumar ve ark., 2014), prostat kanseri (Liu ve ark., 2021; Liu ve ark., 2015; Bateman ve ark., 2013; Lyu ve ark., 2022; Takahashi ve ark., 2024), pankreas kanseri (Lyu ve ark., 2022) ve meme kanseri (Dilber ve ark., 2024) dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde güçlü antiproliferatif

etkiler gösterdiği bulunmuştur. Literatür incelemeleri sonucunda bu çalışmanın, HCT-116 ve BJ hücrelerinde SsnB'nin PMA bağımlı hücre proliferasyonunu inceleyen ilk çalışma olduğu belirlenmiştir.

HCT-116 hücrelerinin 25 µM SsnB ile 12 saat muamelesi sonrasında, C18, C20, C22 ve C24 seramidlerin hücre içi seviyelerinin tüm deneysel gruplara kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma, SsnB'nin HCT-116 hücrelerindeki endojen sfingolipid seviyeleri üzerindeki etkisini değerlendiren ilk çalışmadır.

C1P ve S1P, kanser patofizyolojisinde yer alan ve hayati öneme sahip sfingolipid metabolitlerindendir (Li ve ark., 2022; Ogretmen, 2018; Pralhada ve ark., 2013). Elde ettiğimiz sonuçlar, HCT-116 hücrelerine 25 µM SsnB uygulamasının S1P ve C1P seviyeleri dramatik bir şekilde azalttığını göstermektedir. Çalışmamız, SsnB uygulanan kolon kanseri hücrelerinde S1P seviyelerinin düştüğünü rapor eden ilk çalışmadır.

SsnB üzerine gerçekleştirilen çalışmaların çoğu, temel olarak NF-κB ve STAT1 sinyal inhibisyonu (Kim ve ark., 2022) ve TLR yolaklarının modifikasyonu (Liang ve ark., 2011) ile gerçekleşen antiproliferatif, antiinflamatuvar ve antianjiyogenik özelliklerine odaklanmaktadır. Liang ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, SsnB'nin TLR4, TLR1/TLR2 ve TLR2/TLR6 ligandları aracılığıyla fare makrofajlarında inflamatuvar sitokin ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığı rapor edilmiştir (Liang ve ark., 2011). Ancak SsnB'nin lipid metabolizması ve seramid seviyeleri üzerindeki etkileri konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır. Kanser hücrelerinde seramid üretimi ve TLR sinyalizasyonu karmaşık bir dizi etkileşime sahiptir. Bazı çalışmalara göre, TLR sinyalizasyonu, sfingolipid metabolizması ve özellikle de seramid sentezi ile kanser tedavisi ile ilgili bir bağlantı olabileceği belirtilmektedir (Schilling ve ark., 2013). Ancak TLR antagonistlerinin doğrudan seramid sentezini arttırdığına dair çok fazla çalışma bulunmamaktadır.

SsnB, güçlü antiinflamatuvar ve antiproliferatif özelliklere sahip olan seçici TLR antagonisti olarak bilinmektedir (Liang ve ark., 2011). TLR'ler kanser hücrelerinde inflamatuvar yanıtı düzenlemektedir. TLR ekspresyonunun artışı ile kanser hücrelerinin progresyonu ve onkogenezi gibi süreçler ilişkilidir (Sato ve ark., 2009; Onier ve ark.,

1999; Garay ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2009). Kanser biyolojisinde cazip terapötik hedefler olarak görülen TLR'ler (özellikle TLR2, TLR3 ve TLR4) çoğu kolorektal kanser hücresinde aşırı eksprese edilmektedir (Fukata ve ark., 2007; Furrie ve ark., 2005). Ancak anormal TLR sinyalizasyonu kolon kanseri bağlamında, tümör-promotor ve tümör-supresör etkileşimleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu durum terapötik olarak TLR yollarının hedeflenmesinin karmaşıklığını ortaya koymaktadır (Pradere ve ark., 2014). Mesane kanserinin tedavisinde, en etkili TLR ligandı olarak bilinen TLR2/TLR4 agonisti Bacillus Calmette–Guérin (BCG) kullanılmaktadır (Yoo ve ark., 2012). Bu durum, TLR yollarının modülasyonunun onkoloji alanında önemli bir tedavi potansiyeli taşıdığını göstermektedir. Ancak tümör gelişim sürecinde TLR4'ün aktive olması, düzensiz bir şekilde proinflamatuvar kemokinlerin ve immünsüpresif sitokinlerin salgılanmasına yol açar. Böyle bir mikroçevre, immün sistemden kaçışı, anjiyogenezi ve metastatik yayılımı destekler (Li ve ark., 2017).

Bu sonuçlar, TLR4 antagonistlerinin yeni bir tedavi yaklaşımı olarak öne çıkabileceğini göstermektedir. Çalışmamız, TLR sinyalizasyonunun, özellikle seramid sentezinin düzenlenmesi yoluyla önemli terapötik fırsatlar sunduğunu ortaya koymaktadır. Seramid, biyolojik olarak aktif bir lipid olup kanser hücrelerinde hücre ölümünü tetikleme ve ilaç direncini aşma sürecinde kritik bir işlev üstlenir (Wajapeyee ve ark., 2024). TLR sinyalizasyonu bağlamında, SsnB'nin seramid sentezini etkileyerek kolon kanseri hücrelerinde seramid aracılı apoptozu artırabileceği ileri sürülmektedir. Bu mekanizma, seramid birikimiyle birlikte proapoptotik bir mikroçevre oluşturan TLR inhibisyonunu içermektedir. Böylece SsnB, kanser hücrelerinde seçici olarak apoptozun indüklenmesine katkı sağlar. Bu çift yönlü düzenleme, SsnB'nin TLR yollarının ve hayatta kalma mekanizmalarının bozulduğu kolon kanserinde hedefe yönelik güçlü bir terapötik aday olabileceğini göstermektedir.

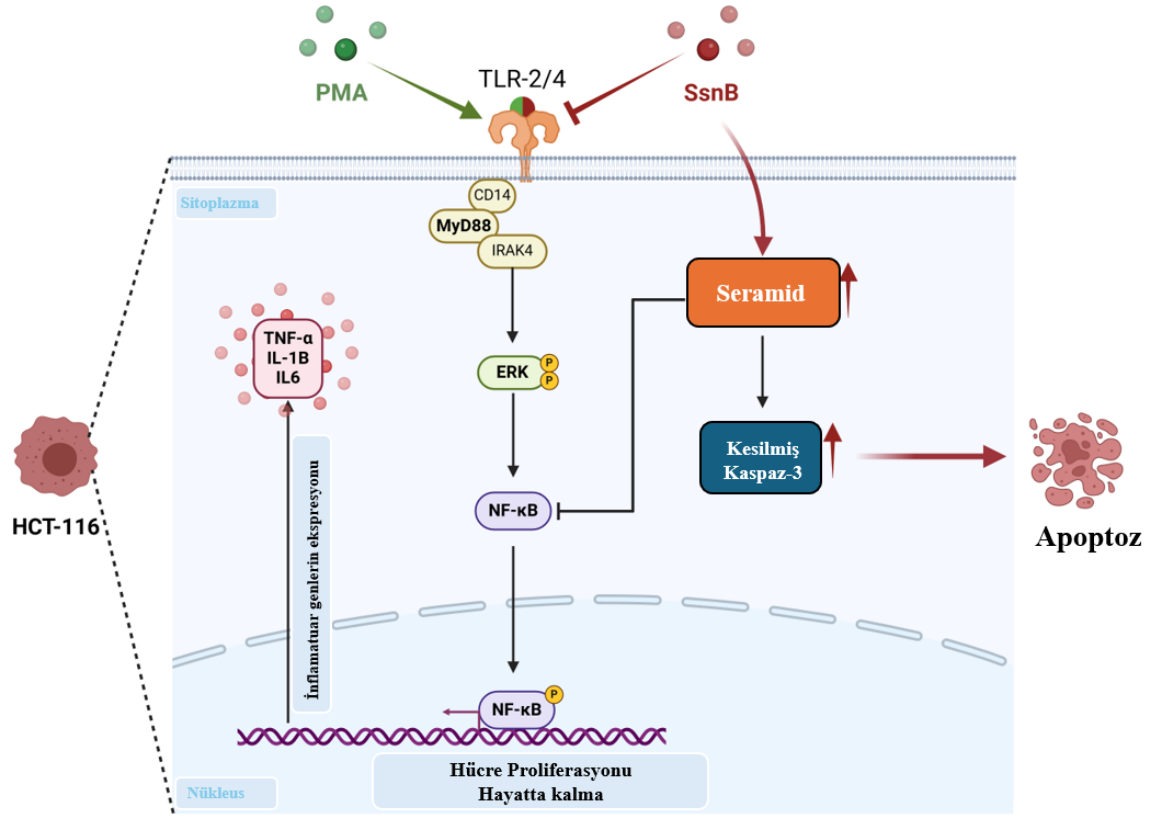
SsnB ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinde MyD88, p-ERK, p- NF- κ B, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde baskılandığı belirlenmiştir. Bu veriler, kanser hücrelerinde inflamatuvar sinyal yollarının SsnB ile inhibe edildiğinin gösterildiği çalışmalarla uyumludur (Dilber ve ark., 2024). MyD88/ NF- κ B sinyal kaskadı, kolorektal kanser hücrelerinde tümör progresyonu ve inflamatuvar

yanıtların düzenlenmesinde hayati bir öneme sahiptir (Wang ve ark., 2018). Adaptör protein olan MyD88'in etkinleşmesi, p-ERK ve NF- κ B'yi de kapsayan bir sinyal kaskadını harekete geçirerek TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indüklemektedir (Tanimura ve ark., 2021). Bu sitokinler, yalnızca tümör gelişimini destekleyen bir tümör-promotor mikroçevrenin oluşumuna katkıda bulunmakla kalmayıp aynı zamanda kanser hücrelerinin proliferasyonunu, yaşam sürekliliğini ve metastatik kapasitesini de artırmaktadır (Tanimura ve ark., 2021). SsnB'nin, MyD88 ile birlikte p-ERK ve p-NF- κ B gibi aşağı akım medyatörlerin aktivitesini baskılaması, güçlü bir antiinflamatuvar etki potansiyeline işaret etmektedir. Bu durum, tümör progresyonunu destekleyen inflamatuvar mikroçevrenin bozulmasına aracılık edebilir. Özellikle NF- κ B, pek çok kanser türünde sıklıkla sürekli olarak aktive olmakta ve hücrel yaşamın sürdürülmesi, invazyon süreçleri ile kemoterapiye direnç mekanizmalarında rol alan genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (Xia ve ark., 2014). NF- κ B aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla SsnB, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını ve immün kaçış mekanizmalarını sürdüren TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi sitokinlerin ekspresyonunu azaltabilmektedir.

Elde edilen bulgular, SsnB'nin sitokin aracılı sinyal yollarını hedeflemedeki terapötik potansiyelini de ortaya koymaktadır. TNF- α ve IL-1 β , apoptoza karşı direnci artıran ve tümör invazyonunu destekleyen temel proinflamatuvar sitokinlerdir. IL-6 ise STAT3'ü aktive ederek tümör büyümesini teşvik eder. STAT3, kolorektal kanser hücrelerinde proliferasyon ve metastazla ilişkilendirilen kritik bir transkripsiyon faktörüdür (Chung ve ark., 2017). SsnB'nin bu sitokinlerin ekspresyonunu baskılaması, bu sitokinlerin tümör destekleyici etkilerini azaltabilir ve kanser hücrelerinin apoptoza duyarlılığını artırabilir.

Özetle bu çalışma, SsnB'nin kolorektal kanserde hem tümör-promotör sitokinlerin ekspresyonunu azaltarak inflamatuvar mikroçevrenin yeniden düzenlenmesine hem de kanser hücrelerinde apoptozu artırarak hücrel hayatta kalma mekanizmalarını bozmasına olanak sağladığını göstermektedir. TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi sitokinlerin baskılanması, tümörün invazyon ve metastaz kapasitesini sınırlandırarak progresyonu engelleyici bir etki yaratırken, NF- κ B ve STAT3 gibi hayatta kalma sinyallerinin

modülasyonu, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve tedaviye karşı direnç mekanizmalarını azaltmaktadır. Bu çok boyutlu etki, SsnB'nin yalnızca tek bir yolak üzerinde değil, tümör mikroçevresi ve hücre hayatta kalma mekanizmaları üzerinde bütüncül bir modülasyon sağladığını ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, SsnB, kolorektal kanser için hem tümör progresyonunu engelleme hem de mevcut tedavilere duyarlılığı artırma açısından hedefe yönelik umut verici bir terapötik aday olarak değerlendirilebilir. Çalışmada elde edilen veriler ışığında SsnB'nin olası etki mekanizmaları, **Şekil 5.1**'de görselleştirilmiştir.



Şekil 5. 2. SsnB'nin olası etki mekanizması

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada doğal bir polifenol bileşiği olan SsnB'nin kolorektal kanser hücreleri üzerindeki olası etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular, SsnB'nin HCT-116 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığını, apoptoz mekanizmalarını uyardığını ve proliferasyonu sınırladığını göstermektedir. Mekanistik açıdan değerlendirildiğinde, SsnB uygulamasının TLR2/4 aracılı MyD88/p-ERK/p-NF- κ B sinyal yolunu baskıladığı, bu süreçte TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokin düzeylerinde azalma sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca sfingolipid metabolizması üzerinde de etkili olduğu, seramid düzeylerini artırırken S1P ve C1P seviyelerini azalttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, SsnB'nin hem hücre ölümünü destekleyen hem de inflamatuvar yanıtı zayıflatan bir etki profiline sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Bununla birlikte, çalışmanın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Kullanılan HCT-116 kanser hücre hattı ve BJ fibroblastları, tümör heterojenliğini ve normal hücre davranışlarını tam olarak yansıtmamaktadır. Yalnızca *in vitro* koşullara dayalı sonuçlar, bağışıklık sistemi ve stromal etkileşimlerin yer aldığı *in vivo* tümör mikroçevresini taklit edememektedir. Ayrıca, inflamasyon indüksiyonu için kullanılan PMA'nın doğal tümör gelişimini sınırlı ölçüde temsil ettiği ve uygulanan doz aralığı ile kısa süreli tedavilerin uzun vadeli etkiler hakkında sınırlı bilgi sunduğu dikkate alınmalıdır.

Gelecekteki çalışmalar açısından, SsnB'nin farklı kolorektal kanser hücre hatlarında etkilerinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir. *In vivo* deneyler, bileşiğin terapötik etkinliğini, güvenlik profilini ve tümör mikroçevresi üzerindeki olası düzenleyici etkilerini ortaya koyabilir. Ayrıca, SsnB'nin kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde uygulanmasının, tedavi etkinliğini artırma veya ilaç direncini azaltma potansiyeli araştırılmalıdır. Sfingolipid metabolizması üzerindeki etkilerinin daha detaylı incelenmesi de gelecekte yeni terapötik hedeflerin belirlenmesine katkı sağlayabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma SsnB'nin kolorektal kanser hücrelerinde hücre canlılığı, inflamasyon ve lipid metabolizması üzerine olan etkilerine dair yeni veriler sunmaktadır. Elde edilen veriler, SsnB'nin kanser araştırmalarında dikkate alınması gereken bir aday

olabileceğini göstermekte ve gelecekte yapılacak daha kapsamlı çalışmalar için bir temel oluşturmaktadır. Klinik uygulamalara yönelik kesin çıkarımlar yapılabilmesi için daha ileri düzey deneysel çalışmalar ve translasyonel araştırmalara ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

Afşar E., Kırmılioğlu E., Çeker T., Yılmaz Ç., Demir N., & Aslan M. (2020). Effect of ER stress on sphingolipid levels and apoptotic pathways in retinal pigment epithelial cells. *Redox biology*, 30, 101430. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101430>

Ahnen D. J. (2011). The American College of Gastroenterology Emily Couric Lecture--the adenoma-carcinoma sequence revisited: has the era of genetic tailoring finally arrived?. *The American journal of gastroenterology*, 106(2), 190–198. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.423>

Akira S., Takeda K., & Kaisho T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* Aug;2(8):675-80. doi: 10.1038/90609. PMID: 11477402.

Alshehade S. A., Almoustafa H. A., Alshawsh M. A., & Chik Z. (2024). Flow cytometry-based quantitative analysis of cellular protein expression in apoptosis subpopulations: A protocol. *Heliyon*, 10(13), e33665. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33665>

Artika I. M., Dewi Y. P., Nainggolan I. M., Siregar J. E., & Antonjaya U. (2022). Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*, 13(12), 2387. <https://doi.org/10.3390/genes13122387>

Aydin S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>

Bal Topcu, D., Öztas, Y., & Lay, İ. (2018). Seramidler ve hastalıklarla ilişkisi. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 16(3), 177–187.

Bateman H.R, Liang Q, Fan D, Rodriguez V, Lessner S.M. (2013). Sparstolonin B inhibits pro-angiogenic functions and blocks cell cycle progression in endothelial cells. *PLoS One*. Aug 5;8(8):e70500. doi: 10.1371/journal.pone.0070500. PMID: 23940584; PMCID: PMC3734268.

Bener A, Öztürk A.E, Dasdelen M.F, Barisik C.C, Dasdelen Z.B, Agan A.F., De La Rosette J., & Day A.S. (2024). Colorectal cancer and associated genetic, lifestyle, cigarette, nargileh-hookah use and alcohol consumption risk factors: a comprehensive case-control study. *Oncol Rev*. Oct 11;18:1449709. doi: 10.3389/or.2024.1449709. PMID: 39464346; PMCID: PMC11505119.

Boveri T. (2008). Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *Journal of cell science*, 121 Suppl 1, 1–84. <https://doi.org/10.1242/jcs.025742>

Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., & Jemal A. (2020). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide. *CA Cancer J Clin.* ;71(3):209–249.

Byrne, R. M., & Tsikitis, V. L. (2018). Colorectal polyposis and inherited colorectal cancer syndromes. *Annals of gastroenterology*, 31(1), 24–34. <https://doi.org/10.20524/aog.2017.0218>

Cammarota R., Bertolini V., Pennesi G., Bucci E. O., Gottardi O., Garlanda C., Laghi L., Barberis M. C., Sessa F., Noonan D. M., & Albini A. (2010). The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *J Transl Med.* Nov 8;8:112. doi: 10.1186/1479-5876-8-112. PMID: 21059221; PMCID: PMC2997091.

Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., & Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of biological chemistry*, 257(13), 7847–7851.

Cerrito, M. G., & Grassilli, E. (2021). Identifying Novel Actionable Targets in Colon Cancer. *Biomedicines*, 9(5), 579. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050579>

Chung S.S., Wu Y., Okobi Q., Adekoya D., Atefi M., Clarke O., Dutta P., & Vadgama J.V. (2017). Proinflammatory Cytokines IL-6 and TNF- α Increased Telomerase Activity through NF- κ B/STAT1/STAT3 Activation, and Withaferin A Inhibited the Signaling in Colorectal Cancer Cells. *Mediators Inflamm* ;2017:5958429. doi: 10.1155/2017/5958429. Epub 2017 Jun 6. PMID: 28676732; PMCID: PMC5476880.

Chung Y.H., & Kim D. (2016). Enhanced TLR4 Expression on Colon Cancer Cells After Chemotherapy Promotes Cell Survival and Epithelial-Mesenchymal Transition Through Phosphorylation of GSK3 β . *Anticancer Res.* Jul;36(7):3383-94. PMID: 27354597.

DeVita V.T Jr., Hellman S., & Rosenberg A. (2023). Advances in personalized oncology and immunotherapy. *CA Cancer J Clin.* 2023;73:45–69.

Dharwadkar P, Zaki T.A, & Murphy C.C. (2022). Colorectal Cancer in Younger Adults. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2022 Jun;36(3):449-470. doi: 10.1016/j.hoc.2022.02.005. Epub May 13. PMID: 35577711; PMCID: PMC9177054.

Dilber Y., Çeker H.T., Öztüzün A., Çırçırılı B., Kırımlıoğlu E., Barut Z., & Aslan M. (2024). Sparstolonin B Reduces Estrogen-Dependent Proliferation in Cancer Cells: Possible Role of Ceramide and PI3K/AKT/mTOR Inhibition. *Pharmaceuticals (Basel)*. Nov 21;17(12):1564. doi: 10.3390/ph17121564. PMID: 39770406; PMCID: PMC11677571.

Doan H.Q., Bowen K.A., Jackson L.A., & Evers B.M. (2009). Toll-like receptor 4 activation increases Akt phosphorylation in colon cancer cells. *Anticancer Res.* Jul;29(7):2473-8. PMID: 19596916; PMCID: PMC2901163.

Drake, R., Vogl, A. W., & Mitchell, A. (2019). *Gray's anatomy for students* (4th Edition ed.): Elsevier, p: 307-316.

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Fukata M., Abreu M.T. (2008). Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies. *Oncogene*. Jan 7;27(2):234-43. doi: 10.1038/sj.onc.1210908. PMID: 18176605; PMCID: PMC2821878.

Fukata M., Chen A., Vamadevan A.S., Cohen J., Breglio K., Krishnareddy S., Hsu D., Xu R., Harpaz N., Dannenberg J., Subbaramaiah K., Cooper H.S., Itzkowitz S.H., & Abreu M.T. (2007). Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*. Dec;133(6):1869-81. doi: 10.1053/j.gastro.2007.09.008. Epub 2007 Sep 14. PMID: 18054559; PMCID: PMC2180834.

Furrie E., Macfarlane S., Thomson G., Macfarlane G.T. (2005). Microbiology & Gut Biology Group; Tayside Tissue & Tumour Bank. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*. Aug;115(4):565-74. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02200.x. PMID: 16011525; PMCID: PMC1782176.

Gao, T., Brognard, J., & Newton, A. C. (2008). The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*, 283(10), 6300–6311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707319200>

Garay R.P., Viens P., Bauer J., Normier G., Bardou M., Jeannin J.F., Chiavaroli C. (2007). Cancer relapse under chemotherapy: why TLR2/4 receptor agonists can help. *Eur J Pharmacol*. 2007 Jun 1;563(1-3):1-17. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.02.018. Epub 2007 Feb 17. PMID: 17383632.

Garraway, L. A., & Lander, E. S. (2013). Lessons from the cancer genome. *Cell*, 153(1), 17–37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.002>

Gómez-Muñoz, A., Gangoiti, P., Granado, M. H., Arana, L., & Ouro, A. (2010). Ceramide-1-phosphate in cell survival and inflammatory signaling. *Advances in experimental medicine and biology*, 688, 118–130. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_8

Guo H., Chen Y., Hu X., Qian G., Ge S., & Zhang J. (2013). The regulation of Toll-like receptor 2 by miR-143 suppresses the invasion and migration of a subset of human colorectal carcinoma cells. *Mol Cancer*. Jul 17;12:77. doi: 10.1186/1476-4598-12-77. PMID: 23866094; PMCID: PMC3750391.

Guo Y., Zhou K., Zhuang X., Li J., & Shen X. (2021). CDCA7-regulated inflammatory mechanism through TLR4/NF- κ B signaling pathway in stomach adenocarcinoma. *Biofactors*. Sep;47(5):865-878. doi: 10.1002/biof.1773. Epub 2021 Aug 2. PMID: 34339079.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hannun Y.A., Obeid L.M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Mar;19(3):175-191. doi: 10.1038/nrm.2017.107. Epub 2017 Nov 22. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Oct;19(10):673. doi: 10.1038/s41580-018-0046-6. PMID: 29165427; PMCID: PMC5902181.

Hari D.M., Leung A.M., Lee J.H., Sim M.S., Vuong B., Chiu C.G., Bilchik A.J. (2013). AJCC Cancer Staging Manual 7th edition criteria for colon cancer: do the complex modifications improve prognostic assessment? *J Am Coll Surg*. 2013 Aug;217(2):181-90. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2013.04.018. Epub 2013 Jun 12. PMID: 23768788; PMCID: PMC4657944.

Hecker E. (1968). Cocarcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae. *Cancer research*, 28(11), 2338–2349.

Hwang Y.P., Yun H.J., Choi J.H., Kang K.W., Jeong H.G. (2010). Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by bergamottin via the inhibition of protein kinase C δ /p38 mitogen-activated protein kinase and JNK/nuclear factor-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol Nutr Food Res*. 2010 Jul;54(7):977-90. doi: 10.1002/mnfr.200900283. PMID: 19943262.

Kaczanowski S. (2016). Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Physical biology*, 13(3), 031001. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/13/3/031001>

Khan, S. Z., & Lengyel, C. G. (2023). Challenges in the management of colorectal cancer in low- and middle-income countries. *Cancer treatment and research communications*, 35, 100705. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2023.100705>

Kim N., Kim C., Ryu S.H., Kim G.O., Bae J.S. (2022). Anti-Inflammatory Effect of Sparstolonin B through Inhibiting Expression of NF- κ B and STAT-1. *Int J Mol Sci*. Sep 6;23(18):10213. doi: 10.3390/ijms231810213. PMID: 36142124; PMCID: PMC9499357.

Kumar A., Fan D., Dipette D.J., Singh U.S. (2014). Sparstolonin B, a novel plant derived compound, arrests cell cycle and induces apoptosis in N-myc amplified and N-myc nonamplified neuroblastoma cells. *PLoS One*. May 1;9(5):e96343. doi: 10.1371/journal.pone.0096343.

Kyrylkova K., Kyryachenko S., Leid M., Kioussi C. (2012). Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol*. 887: 41–47.

Li F., Zhang N. (2015). Ceramide: Therapeutic Potential in Combination Therapy for Cancer Treatment. *Curr Drug Metab*. 17(1):37-51. doi:10.2174/1389200216666151103120338. PMID: 26526831.

Li J., Yang F., Wei F., Ren X. (2017). The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment. *Oncotarget*. Jul 8;8(39):66656-66667. doi: 10.18632/oncotarget.19105. PMID: 29029545; PMCID: PMC5630445.

Li R.Z., Wang X.R., Wang J., Xie C., Wang X.X., Pan H.D., Meng W.Y., Liang T.L., Li J.X., Yan P.Y., Wu Q.B., Liu L., Yao X.J., Leung E.L. (2022). The key role of sphingolipid metabolism in cancer: New therapeutic targets, diagnostic and prognostic values, and anti-tumor immunotherapy resistance. *Front Oncol*. Jul 27;12:941643. doi: 10.3389/fonc.2022.941643. PMID: 35965565; PMCID: PMC9364366.

Liang Q., Wu Q., Jiang J., Duan J., Wang C., Smith M.D., Lu H., Wang Q, Nagarkatti P., Fan D. (2011). Characterization of sparstolonin B, a Chinese herb-derived compound, as a selective Toll-like receptor antagonist with potent anti-inflammatory properties. *J Biol Chem*. Jul 29;286(30):26470-9. doi: 10.1074/jbc.M111.227934. Epub 2011 Jun 10. PMID: 21665946; PMCID: PMC3143611.

Liu Q., Li J., Liang Q., Wang D., Luo Y., Yu F., Janicki J.S., Fan D. (2015). Sparstolonin B suppresses rat vascular smooth muscle cell proliferation, migration,

inflammatory response and lipid accumulation. *Vascul Pharmacol.* 2015 Apr-Jun;67-69:59-66. doi: 10.1016/j.vph.2015.03.015. Epub. Apr 11. PMID: 25869499; PMCID: PMC4433853.

Liu S., Hu J., Shi C., Sun L., Yan W., Song Y. (2021). Sparstolonin B exerts beneficial effects on prostate cancer by acting on the reactive oxygen species-mediated PI3K/AKT pathway. *J Cell Mol Med.* 2021 Jun;25(12):5511-5524. doi: 10.1111/jcmm.16560. Epub 2021 May 5. PMID: 33951324; PMCID: PMC8184693.

Liu Y.D., Ji C.B., Li S.B., Yan F., Gu Q.S., Balic J.J., Yu L., Li J.K. (2018). Toll-like receptor 2 stimulation promotes colorectal cancer growth via PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathways. *Int Immunopharmacol.* Jun;59:375-383. doi: 10.1016/j.intimp.2018.04.033. Epub 2018 Apr 24. PMID: 29689497.

Liu, J., Peng, Y., & Wei, W. (2022). Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy. *Içinde Trends in Cell Biology (C. 32, Sayı 1).* <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.001>

Lu W., Kelly A.L., Miao S. (2016). Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends in Food Science & Technology*, 47: 1-9.

Lyu Y., Duan B., Liu Z., Yang F., Chen C., Jiang X., Liu X. (2022). Sparstolonin B inhibits pancreatic adenocarcinoma through the NF- κ B signaling pathway. *Exp Cell Res.* Aug 1;417(1):113214. doi: 10.1016/j.yexcr.2022.113214. Epub 2022 May 18. PMID: 35594953.

Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology, 14(Suppl 2), 49. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>

Mosior M., Newton A.C. (1995). Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters. Reversibility and nature of membrane association. *J Biol Chem.* Oct 27;270(43):25526-33. doi: 10.1074/jbc.270.43.25526. PMID: 7592722.

Nardone, O. M., Zammarchi, I., Santacroce, G., Ghosh, S., & Iacucci, M. (2023). Inflammation-Driven Colorectal Cancer Associated with Colitis: From Pathogenesis to Changing Therapy. *Cancers*, 15(8), 2389. <https://doi.org/10.3390/cancers15082389>

Ogretmen B. (2018). Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat Rev Cancer.* Jan;18(1):33-50. doi: 10.1038/nrc.2017.96. Epub 2017 Nov 17. PMID: 29147025; PMCID: PMC5818153.

Onier N., Hilpert S., Arnould L., Saint-Giorgio V., Davies J.G, Jeannin J.F, Jeannin J.F. (1999). Cure of colon cancer metastasis in rats with the new lipid A OM 174. Apoptosis of tumor cells and immunization of rats. *Clin Exp Metastasis*. Jun;17(4):299-306. doi: 10.1023/a:1006663017149. PMID: 10545016.

Özer, H., Aslan, İ., Oruç, M. T., Çöpelci, Y., Afşar, E., Kaya, S., & Aslan, M. (2018). Early postoperative changes of sphingomyelins and ceramides after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Lipids in health and disease*, 17(1), 269. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0917-z>

Piazzesi A., Afsar S.Y., Van Echten-Deckert G. (2021). Sphingolipid metabolism in the development and progression of cancer: one cancer's help is another's hindrance. *Mol Oncol*. Dec;15(12):3256-3279. doi: 10.1002/1878-0261.13063. Epub 2021 Jul 29. PMID: 34289244; PMCID: PMC8637577.

Pradere J.P., Dapito D.H., Schwabe R.F. (2014). The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene*. 2014 Jul 3;33(27):3485-95. doi: 10.1038/onc.2013.302.

Pralhada Rao R., Vaidyanathan N., Rengasamy M, Mammen Oommen A., Somaiya N., Jagannath M.R. (2013). Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases. *J Lipids*. 2013;2013:178910. doi: 10.1155/2013/178910. Epub 2013 Aug 4. PMID: 23984075; PMCID: PMC3747619.

PubChem. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed on 28 January 2025).

Pyne, N. J., & Pyne, S. (2010). Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 10(7), 489–503. <https://doi.org/10.1038/nrc2875>

Rakoff-Nahoum, S., & Medzhitov, R. (2008). Role of toll-like receptors in tissue repair and tumorigenesis. *Biochemistry. Biokhimiia*, 73(5), 555–561. <https://doi.org/10.1134/s0006297908050088>

Sakorafas, G. H., Zouros, E., & Peros, G. (2006). Applied vascular anatomy of the colon and rectum: clinical implications for the surgical oncologist. *Surgical oncology*, 15(4), 243–255. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2007.03.002>

Salva de Torres, C., Baraibar, I., Saoudi González, N., Ros, J., Salva, F., Rodríguez-Castells, M., Alcaraz, A., García, A., Tabernero, J., & Élez, E. (2024). Current and Emerging Treatment Paradigms in Colorectal Cancer: Integrating Hallmarks of Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), 6967. <https://doi.org/10.3390/ijms25136967>

Sato Y., Goto Y., Narita N., Hoon D.S. (2009). Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* Sep;2 Suppl 1(Suppl 1):205-14. doi: 10.1007/s12307-009-0022-y.

Schilling J.D., Machkovech H.M., He L., Sidhu R., Fujiwara H., Weber K., Ory D.S., Schaffer J.E. (2013). Palmitate and lipopolysaccharide trigger synergistic ceramide production in primary macrophages. *J Biol Chem.* Feb 1;288(5):2923-32. doi: 10.1074/jbc.M112.419978.

Sharkey, N. A., Leach, K. L., & Blumberg, P. M. (1984). Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(2), 607–610. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.2.607>

Sharma, R. A., Gescher, A. J., & Steward, W. P. (2005). Curcumin: the story so far. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 41(13), 1955–1968. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>

Shin, S. K., Nagasaka, T., Jung, B. H., Matsubara, N., Kim, W. H., Carethers, J. M., Boland, C. R., & Goel, A. (2007). Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer. *Gastroenterology*, 133(6), 1849–1857. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.074>

Stratton M.R., Campbell P.J., Futreal P.A. (2009). The cancer genome. *Nature*. 458:719–724.

Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* May; 71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.

Tahara E., Kadara H., Lacroix L., Lotan D., Lotan R. (2009). Activation of protein kinase C by phorbol 12-myristate 13-acetate suppresses the growth of lung cancer cells through KLF6 induction. *Cancer Biol Ther.* May;8(9):801-7. doi: 10.4161/cbt.8.9.8186. Epub 2009 May 17. PMID: 19333010.

Tahghighi A., Seyedhashemi E., Mohammadi J., Moradi A., Esmaeili A., Pornour M., Jafarifar K., Ganji S.M. (2025). Epigenetic marvels: exploring the landscape of colorectal cancer treatment through cutting-edge epigenetic-based drug strategies. *Clin Epigenetics.* Feb 22;17(1):34. doi: 10.1186/s13148-025-01844-w. PMID: 39987205; PMCID: PMC11847397.

Takahashi I., Takagi K., Yamaguchi-Tanaka M., Sato A., Sato M., Miki Y., Ito A., Suzuki T. (2024). Toll-like receptor (TLR) 4 is a potent prognostic factor in prostate cancer associated with proliferation and invasion. *Pathol Res Pract*. Aug;260:155379. doi: 10.1016/j.prp.2024.155379.

Tanimura A., Nakazato A., Tanaka N. (2021). MYD88 signals induce tumour-initiating cell generation through the NF- κ B-HIF-1 α activation cascade. *Sci Rep*. 2021 Feb 17;11(1):3991. doi: 10.1038/s41598-021-83603-4. PMID: 33597599; PMCID: PMC7890054.

Tariq K, Ghias K. (2016). Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*. Mar;13(1):120-35. doi: 10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103. PMID: 27144067; PMCID: PMC4850121.

Van Meerloo J., Kaspers G.J., Cloos J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011;731:237-45. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_20. PMID: 21516412.

Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, 10(8), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nm1087>

Wajapeyee N., Beamon T.C., Gupta R. (2024). Roles and therapeutic targeting of ceramide metabolism in cancer. *Mol Metab*. May;83:101936. doi: 10.1016/j.molmet.2024.101936. Epub 2024 Apr 9. PMID: 38599378; PMCID: PMC11031839.

Wang L., Yu K., Zhang X., Yu S. (2018). Dual functional roles of the MyD88 signaling in colorectal cancer development. *Biomed Pharmacother*. Nov;107:177-184. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.139. Epub 2018 Aug 4. PMID: 30086464.

Wang M., Xiu L., Diao J., Wei L., Sun J. (2015). Sparstolonin B inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol*. 2015 Dec 15;769:79-85. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.10.050. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26522926.

Wolska A., Lech-Marańda E., Robak T. (2009). Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. *Cell Mol Biol Lett*. 2009;14(2):248-72. doi: 10.2478/s11658-008-0048-z.

Xia Y., Shen S., Verma I.M. (2014). NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res*. Sep;2(9):823-30. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0112. PMID: 25187272; PMCID: PMC4155602.

Yepuri N., Dhawan R., Cooney M., Pruekprasert N., Meng Q., Cooney R.N. (2019). Sparstolonin B: A Unique Anti-Inflammatory Agent. *Shock*. Dec;52(6):568-576. doi: 10.1097/SHK.0000000000001326. PMID: 30807526.

Yoo K.H., Lim T.J, Chang S.G. (2012). Monthly intravesical bacillus Calmette-Guérin maintenance therapy for non-muscle-invasive bladder cancer: 10-year experience in a single institute. *Exp Ther Med*. Feb;3(2):221-225. doi: 10.3892/etm.2011.400. Epub 2011 Dec 1. PMID: 22969872; PMCID: PMC3438621.

Zakeri, A., & Russo, M. (2018). Dual Role of Toll-like Receptors in Human and Experimental Asthma Models. *Frontiers in immunology*, 9, 1027. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01027>

Zaqout, S., Becker, L. L., & Kaindl, A. M. (2020). Immunofluorescence Staining of Paraffin Sections Step by Step. *Frontiers in neuroanatomy*, 14, 582218. <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.582218>

Zhang Y.B., He F.L., Fang M., Hua T.F., Hu B.D., Zhang Z.H., Cao Q., Liu R.Y. (2009). Increased expression of Toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. *Mol Biol Rep*. Jul;36(6):1475-81. doi: 10.1007/s11033-008-9338-9. Epub 2008 Sep 2. PMID: 18763053.

ÖZGEÇMİŞ

GENEL BİLGİLER

ARAŞTIRMA ALANLARI

Moleküler Hücre Biyolojisi, Kanser Moleküler Biyolojisi, Tıbbi ve Moleküler Biyokimya, Tıbbi Biyoteknoloji, Tıp Araştırma ve Deneysel Yaşam Bilimleri, Sfingolipidomik Analiz, Sağlık Bilimleri, Temel Tıp Bilimleri

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2022- 2025	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoteknoloji Anabilim Dalı (Disiplinlerarası), Antalya
Yüksek Lisans 2018-2021	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2014-2018	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya *Bölüm ve Fakülte Birinciliği, Yüksek Onur Belgesi

YAPTIĞI TEZLER

DOKTORA

Kolon Kanseri Hücrelerinde Sparstolonin B'nin Toll Like Reseptör Yolağına Etkisi

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ, TIP FAKÜLTESİ (SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ),
TIBBİ BİYOTEKNOLOJİ ABD.

YÜKSEK LİSANS

Phellinus igniarius (L.) Quel ve *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin
Türlerinden Elde Edilen Ekstraktların Epidermoid Karsinoma Hücrelerinin Membranı
Üzerine Prooksidan ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ, FEN FAKÜLTESİ (FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ),
BİYOLOJİ (MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK) ABD.

SERTİFİKA, KURS VE EĞİTİMLER

1. Yükseköğretim Kurulu (YÖK) Veri Analizi Okulu, Temel İstatistik Modülü Eğitimi (2025).
2. Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (2023).
3. Türkiye Biyolojik Bilimler Ağı (TBBA Akademi), Tıbbi ve Aromatik Bitkilere Giriş, Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanım Şekilleri, Ekonomik Yönden Değerlendirme Potansiyeli Olan Tıbbi Aromatik Bitkiler, Ülkemizde Yetişen Toksik Bitkilerin İlaç Sektörü Yönünden Değerlendirilmesi, Biyologların Ülkemiz Biyoçeşitliliğine Katkıları, Tıbbi ve Aromatik Bitkileri Kullanırken Dikkat Edilmesi Gereken Önemli Hususlar, Türkiye Aktarlarında Yaygın Satılan Tıbbi Bitkiler, Başarı, Katılım ve 14 saatlik Eğitim Sertifikası (2021).
4. Türkiye Biyolojik Bilimler Ağı (TBBA Akademi), CRISPR ve Gen Düzenleme Araçlarının Kullanım Alanları, Katılım Sertifikası (2021).
5. Uludağ Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Topluluğu, Ulugen Kanseri Sempozyumu, Katılım Sertifikası (2021).

6. Biyolojik Bilimler ve Biyoteknoloji Topluluğu, Mikrobiyota ve Sepsis, Bilim Buluşmaları/Seminer, Katılım Sertifikası, (2021).
7. Anatolian Genetics and Biology, Prof. Dr. Bünyamin AKGÜL ile Kodlanmayan RNAların Genom Kapsamlı Taranması ve Analizi, Katılım Sertifikası, (2021).
8. Akdeniz Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Pedagojik Formasyon Eğitimi Sertifikası, (2020).
9. EBSCO Information Services Customer Training & Success, Certificate of Completion, (2019).

YAYINLAR VE ESERLER

SCI İNDEKSİNE GİREN DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

1. Barut, Z., Karataş, Ö., Akdeniz, F. T., **Çirçirli, B.**, Demir, S., & İsbir, T. (2026). The Association Between miRNA-223-3p Levels and Pain Severity in Fibromyalgia Syndrome: A Molecular Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(1), 176. <https://doi.org/10.3390/ijms27010176>
2. Aslan., M., **Çirçirli, B.**, Öztüzün, A., Tuzcu H., Yılmaz, Ç., Çeker, T., & Elpek, G.Ö. (2025). Protective Effects of COG133 on Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury: Modulation of Inflammation, Apoptosis and Sphingolipid metabolism. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*; 29(12). <https://doi.org/10.1111/jcmm.70677>.
3. **Çirçirli, B.**, Yılmaz, Ç., Çeker, T., Barut, Z., Kırımlıoğlu, E., & Aslan., M. (2025). Sparstolonin B Suppresses Proliferation and Modulates Toll-like Receptor Signaling and Inflammatory Pathways in Human Colorectal Cancer Cells. *Pharmaceuticals*;18(3):300. <https://doi.org/10.3390/ph18030300>.
4. Dilber, Y., Çeker, H.T., Öztüzün, A., **Çirçirli, B.**, Kırımlıoğlu, E., Barut, Z.& Aslan, M. (2024). Sparstolonin B Reduces Estrogen Dependent Proliferation in Cancer Cells: Possible Role of Ceramide and PI3K/AKT/mTOR Inhibition, *Pharmaceuticals*,17(12), 1564; <https://doi.org/10.3390/ph17121564>.
5. Barut, Z., Aslan, M., **Çirçirli, B.**, Çeker, T., & Yılmaz, Ç. (2024). Antiproliferative Effect of 7- Ketositosterol in Breast and Liver Cancer Cells: Possible

Impact of Ceramide, ERK and NF-kB Signaling Pathways, *Pharmaceuticals*, 17(7):860.
<https://doi.org/10.3390/ph17070860>.

DİĞER DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

1. Barut, Z., Aydın Aslan, M., Çeker, T., Yılmaz, Ç., Öztüzün, A., **Çırçırılı, B.**, Dinç, B., & İlker Aycan (2024). High-Density Lipoprotein Subfraction Changes in End-Stage Liver Failure, *Akdeniz Medical Journal*, 10(3), 542-549.
<https://doi.org/10.53394/akd.1366089>
2. Eraslan E.C., **Çırçırılı, B.**, Özkan, A., Akgül, H. (2021). Anticancer mechanisms of action of macrofungus extracts, *Eurasian Journal of Medical and Biological Sciences*, 1(2):58-69. pages.

KİTAP BÖLÜMÜ

1. **Çırçırılı, B.** & Emre, M.C. (2025). Biyomalzemelerle Sinyal Yolu Modülasyonu: Hücresel Mekanizmalardan Terapötik Uygulamalara. In: Karakurt, P. & Fırat, M. (eds.), Sağlık Alanında Güncel Yaklaşımlar. *Özgür Yayınları*,
<https://doi.org/10.58830/ozgur.pub1126.c4580>

HAKEMLİ KONGRE BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

1. Dilber, Y., Çeker, H.T., Öztüzün, A., **Çırçırılı, B.** & Aslan, M. (2025). Reduced Estrogen-Dependent Breast Cancer Proliferation by Sparstolonin B: Potential Contribution of Ceramide and PI3k/Akt/mTOR Inhibition. *26th IFCC-EFLM EUROMEDLAB Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 18–22 May 2025, Brussels, Belgium. <https://doi.org/10.1515/cclm-2025-8072>. **(Poster Presentation)**.
2. Aslan, M., Öztüzün, A., Yılmaz, Ç., Çeker, T., Tuzcu Balaban, H., **Çırçırılı, B.**, & Elpek, G. (2025). Apolipoprotein E Mimetic Peptide Ameliorates Carbon Tetrachloride-induced Liver Damage by Suppressing İnflammation and Apoptosis. *31st FAOBMB Conference & 2025 KSBMB International Conference*, 20-23 May 2025, Busan, Republic of Korea. **(Poster Presentation)**.

3. **Çirçirli, B., Öztüzün, A., & Aslan, M. (2024).** Anti-Inflammatory Effect Apolipoprotein E Mimetic Peptide in A Cell Model of Acute Hepatotoxicity. *XXXI Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation 35th National Biochemistry Congress*, 28 October- 1 November 2024, Antalya, *Turk J Biochem*, 49 (S1), 82-83. pages. **(Oral Presentation).**
4. **Öztüzün, A., Çirçirli, B., & Aslan, M. (2024).** Investigation of The Protective Effects of Apolipoprotein E Mimetic Peptide in A Cell Model of Acute Hepatotoxicity. *XXXI Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation 35th National Biochemistry Congress*, 28 October -1 November 2024, Antalya, Türkiye, *Turk J Biochem*, 49 (S1), 81-82. pages. **(Oral Presentation).**
5. **Yılmaz, Ç., Barut, Z., Aslan, M., Çirçirli, B., & Çeker, T. (2024).** Role of Ceramide, Erk and NF-kB Signaling in The Antiproliferative Effects of 7-Ketositosterol in Breast and Liver Cancer Cells. *XXXI Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation 35th National Biochemistry Congress*, 28 October- 1 November 2024, Antalya, *Turk J Biochem*, 49 (S1), 116. Page. **(Oral Presentation).**
6. **Dilber, Y., Çeker, H.T., Öztüzün, A., Çirçirli, B., & Aslan, M. (2024).** Inhibition of Estrogen-Dependent Proliferation in Breast and Ovarian Cancer Cells By Sparstolonin B. *XXXI Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation 35th National Biochemistry Congress*, 28 October- 1 November 2024, Antalya, *Turk J Biochem*, 49 (S1), 128. page. **(Oral Presentation).**
7. **Çirçirli, B., Yılmaz, Ç., Kırımlıoğlu, E. & Aslan, M. (2023).** Investigation of The Effects of Sparstolonin B on Apoptotic Path Activation in Colorectal Cancer Cells, *TBS International Biochemistry Congress 2023- 34rd National Biochemistry Congress*, 29 October-1 November, Fethiye, Türkiye, *Turk J Biochem*, 48 (S1), 91-92. pages. **(Oral Presentation).**
8. **Yılmaz, Ç., Çeker, T., Öztüzün, A., Çirçirli, B., Dinç, B., Aycan, İ.Ö., Aslan, M. (2023).** Evaluation of Alterations in The HDL Subfraction and HDL-Related Enzymes in Patients with Liver Failure and in Healthy Donors, *TBS International Biochemistry Congress 2023- 34rd National Biochemistry Congress*, 29 October-1 November, Fethiye, Türkiye, *Turk J Biochem*, 48 (S1), 165-166. pages. **(Poster Presentation).**

9. Çeker, T., Yılmaz, Ç., Öztüzün, A., **Çırçırılı, B.**, Dinç, B., Aycan, İ.Ö., Aslan, M. (2023). Evaluation of HDL Subfraction Changes and HDL-Associated Enzymes in Liver Failure Patients and Healthy Donors, *FEBS Open Bio*, 13 (Suppl. S2) (2023) 61–258 DOI: 10.1002/2211-5463.13646, 214. page **(Poster Presentation)**.
10. **Çırçırılı, B.**, Yılmaz, Ç. & Aslan, M. (2022). Effects of Sparstolonin B as an Antiproliferative Agent in Colorectal Cancer Cells, TBS International Biochemistry Congress 2022-33rd National Biochemistry Congress, 26-30 October, Çeşme, Türkiye, *Türk J Biochem*, 50 (S3) **(Oral Presentation)**.
11. **Çırçırılı, B.** & Emre, M.C. (2021). Green Synthesis, Anticancer and Anti-Corrosion Activities of Nanoparticles, *6th International Academic Studies Conference (UBCAK)*, 26-28 July, Online, 571-580. pages **(Oral Presentation)**.
12. **Çırçırılı, B.**, Emre, M.C. & Özkan, A. (2021). Comparison of the Effects of Titanium Dioxide and Zirconium Dioxide on A431 Cell Viability and Membrane, *6th International Academic Studies Conference (UBCAK)*, 26-28 July, Online, 581-585. pages **(Oral Presentation)**.
13. **Çırçırılı, B.**, Özkan, A., Akgül, H. & Doğan, H.H. (2020). *Terfezia boudieri* Chatin Metanol ve Su Ekstraktlarının A431 Hücre Dizileri Üzerine Etkilerinin Araştırılması, 2. Uluslararası Avrasya Bilim, Mühendislik ve Teknoloji Konferansı, 7-9 Ekim, Gaziantep, Türkiye, 43. sayfa **(Sözlü Bildiri)**.
14. **Çırçırılı, B.**, Özkan, A. & Yücel, G. (2020). Timol ve karvakrol'un A549 Hücreleri Üzerine Sitotoksik ve Antioksidan Etkisinin Araştırılması, 2. Uluslararası Avrasya Bilim, Mühendislik ve Teknoloji Konferansı, 7-9 Ekim, Gaziantep, Türkiye, 42. sayfa **(Sözlü Bildiri)**.
15. **Çırçırılı, B.**, Eraslan, E.C. & Özkan, A. (2020). *Suillus luteus*'un Terapötik Özellikleri, II. Uluslararası 23 Nisan Bilimsel Çalışmalar Kongresi, 23-26 Nisan, Ankara-Türkiye, 127-132. sayfa **(Sözlü Bildiri)**.
16. Eraslan, E.C. & **Çırçırılı, B.** (2020). Pharmacological Potentials of *Russula* Species, II. International April 23 Scientific Studies Congress, 23-26 April, Ankara-Turkey, 143-147. pages **(Oral Presentation)**.

17. Eraslan, E.C. & **Çırçırılı, B.** (2020). Biological Activities of *Tricholoma* Species, *II. International April 23 Scientific Studies Congress*, 23-26 April, Ankara-Turkey, 148-152. Pages (**Oral Presentation**)
18. **Çırçırılı, B.**, Eraslan, E.C., Özkan, A. & Akgül, H. (2020). *Pyrofomes demidoffii* (Lév.) Kotl. & Pouzar Mantarının A431 ve Bj Fibroblast Hücreleri Üzerine Etkisinin Araştırılması, *II. Uluslararası 23 Nisan Bilimsel Çalışmalar Kongresi*, 23-26 Nisan, Ankara-Türkiye, 167-168. sayfa (**Sözlü Bildiri**).
19. **Çırçırılı, B.**, Özkan, A., Özcan, G. & Demirci, G. (2020). Investigation of Cytotoxic Effects of Gold, Silver and Gold-Silver Nanoparticles Synthesized in *Pelargonium sidoides* Root Extract on H1299 Cell Line, *3. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (eurasianbiochem)*, 19-20 March, Ankara- Türkiye, 87. pages (**Poster Presentation**).
20. **Çırçırılı, B.**, Özkan, A., Bayram, E., Kızıl, Ç., Girişken, H. & Özcan, G. (2018). Comparison of Anticancer Effects of Nitrogen Doped Graphene, Reduced Graphene Oxide and Drug Doped Graphene on Cancer Cell Lines, *1. Euroasia Biochemical Approaches and Technologies Congress (EBAT)*, 27-30 October 2018, Antalya, Türkiye, Abstract Book, 50. pages (**Oral Presentation**).
21. **Çırçırılı, B.**, Girişken, H., Erdoğan, A. & Özkan, A. (2018). Timol ve Karvakrolun A431 (Epidermal Karsinom) hücrelerinin Hücre Zarı Üzerine Prooksidan ve Antioksidan Etkisinin Araştırılması, *1. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Yaşam Kongresi*, 02-05 May 2018, Burdur, Türkiye, Bildiri Kitabı, 172. sayfa (**Sözlü Bildiri**).

DESTEKLENEN PROJELER

1. Investigation of the Therapeutic Potential of Palmitoyl CoA in Breast Cancer via a Genetic and Biotechnological Approach (**Araştırmacı, Tez Projesi, Yüksek Lisans, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi, Proje Numarası: TYL-2025-6830**).
2. Pediatrik Juvenil Miyoklonik Epilepsi Hastalarında Uyku ve Melatonin (**Araştırmacı, Normal Araştırma Projesi, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi, Proje Numarası: TSA-2024-6717**).

3. Sparstolonin B Uygulanan İnsan Kolon Kanseri ve İnsan Fibroblast Hücrelerinde Toll Like Reseptör 2 ve 4 Ekspresyonlarının İncelenmesi (**Yürütücü, 1002-A Hızlı Destek TÜBİTAK, Proje No: 124S394**).
4. Kolon Kanseri Hücrelerinde Sparstolonin B'nin Toll Like Reseptör Yolağına Etkisi (**Tez Öğrencisi, Tez Projesi, Doktora, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi, Proje Numarası: TDK-2024-6590**).
5. Estrojen Pozitif Kanser Hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR Bağımlı Proliferasyonda Sparstoloninin Etkisinin Araştırılması (**Araştırmacı, Tez Projesi, Doktora, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi, Proje Numarası: TDK-2024-6535**).
6. Robotik Yardımlı Laparoskopik Cerrahi Yapılan Hastalarda İntraoperatif Gelişebilecek Nöronal Hasarın S100beta GFAP ve NSE biyobelirteçleri ile Değerlendirilmesi (**Araştırmacı, Tez Projesi, Tıpta Uzmanlık, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi, Proje Numarası: TTU-2024-6416**).
7. Sparstolonin B'nin Antiproliferatif Ajan Olarak Kolon Kanseri Hücrelerinde Araştırılması (**Araştırmacı, TÜSEB, Proje Numarası: 31481**).
8. Apolipoprotein E mimetik peptidin akut hepatotoksistide koruyucu etki mekanizmasının incelenmesi (**Bursiyer, 1001 TÜBİTAK, Proje Numarası: 123S697**).
9. 7-Ketositosterol'ün Karaciğer ve Meme Kanseriindeki Antiproliferatif Etki Mekanizmasının Araştırılması (**Araştırmacı, Normal Araştırma Projesi, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi, Proje Numarası: TSA-2023-6282**).
10. *Phellinus igniarius* (L.) Quél ve *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin türlerinden elde edilen ekstraktların epidermoid karsinoma hücrelerinin membranı üzerine prooksidan ve antioksidan etkilerinin araştırılması (**Araştırmacı, Yüksek Lisans Tez Projesi, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi, Proje Numarası: FYL-2020-5152**).
11. Timol ve Karvakrolun Epidermoid Karsinoma (A431) ve Fibroblast (BJ) Hücrelerinde Antioksidan/Prooksidan Etkilerinin Araştırılması (**Proje Yürütücüsü, 2209-A TÜBİTAK, Proje Numarası: 1919B011701388**).

TÜBİTAK BURS VE DESTEKLERİ

1. TÜBİTAK Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı **(2024/4. Dönem)**
2. TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, 1002-Hızlı Destek/Hızlı Destek-A, ARDEB **(Proje Yürütücüsü-Proje No: 124S394)**
3. TÜBİTAK SBAG- Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, 1001-Araştırma, ARDEB **(Bursiyer-Proje No: 123S697)**
4. TÜBİTAK Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı **(2024/2. Dönem-2025/1.Dönem-2025/2.Dönem)**
5. TÜBİTAK Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılım Desteği Programı **(2023/4. Dönem; 2024/4. Dönem)**
6. TÜBİTAK Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı **(2017/2. Dönem)**

BİLİMSEL ÜYELİKLER

- Türk Biyokimya Derneği, Üye, 2022-Devam Ediyor

BİLGİSAYAR

- Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint)
- GraphPad
- SPSS
- Endnote
- Image J
- R Studio
- PhotoShop