

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE İRİNOTEKANIN
ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOTİK AKTİVİTESİ ÜZERİNE
GENİSTEİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA BOZKIR DİNLER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ MEHMET KADİR ERDOĞAN**

BİNGÖL-2024

**İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE İRİNOTEKANIN
ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOTİK AKTİVİTESİ ÜZERİNE GENİSTEİNİN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kadir ERDOĞAN danışmanlığında, Fatma BOZKIR DİNLER tarafından hazırlanan bu çalışma/...../..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Abdullah ASLAN	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kadir ERDOĞAN	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve/ nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi tarafından BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: BAP-FEF.2024.002

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden, çalışmama farklı perspektiflerden bakmamı sağlayan ve her aşamada desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kadir ERDOĞAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisinin yol göstericiliği, çalışmamın gelişiminde önemli bir rol oynamıştır.

Laboratuvar çalışmalarında bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaşan, motive edici rehberliğiyle her zaman yanımda olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDÖĞDU'ya teşekkürlerimi sunarım. Kendisinin desteği, çalışmamın başarıyla tamamlanmasında büyük katkı sağlamıştır. Ayrıca laboratuvar çalışmalarında verdikleri destek ve katkılarından dolayı Öğr. Gör. Aydın SEVER ve Yusuf TOY'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda proje desteklerinden ötürü Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince hayatımın her alanında olduğu gibi bana destek olan, ışıklarıyla yolumu aydınlatan anneme ve babama ve bu zorlu süreçte her zaman yanımda olan kıymetli eşime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Fatma BOZKIR DİNLER

Bingöl 2024

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.2. Yöntem.....	13
3.2.1. Hücre Kültürü.....	13
3.2.2. Hücre Canlılığı Analizi	14
3.2.3. Koloni Sağ-kalımı Analizi	14
3.2.4. Hücre Göçü Analizi	14
3.2.5. ROS analizi	15
3.2.6. Anti-anjiyogenik Etkinin İncelenmesi (Hu-VEGF Analizi).....	15
3.2.7. Western blot	16
3.2.8. İstatistikî analizler	18
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	19
4.1. Hücre Canlılığı Bulguları	19
4.2. Genistein ve İrinotekan Arasındaki Sinerjizm	21
4.3. Koloni Sağ-kalımı Bulguları	23

4.4. Hücre Migrasyonu Bulguları	24
4.5. ROS Düzeylerinin Belirlenmesi	26
4.6. Anti-anjiyogenez Bulguları	28
4.7. Protein İfade Düzeyleri	30
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	35
KAYNAKLAR	37

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Bcl-2	: B hücreli lenfoma-2
Bax	: Bcl-2 ilişkili x proteini
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FBS	: Fetal bovin serum
PARP	: Poli (ADP-riboz) polimeraz
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
p21	: Sikline bağlı kinaz inhibitörü 1
p53	: Tümör protein 53
μ M	: Mikromolar
mM	: Milimolar
μ L	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
μ g	: Mikrogram
mg	: Miligram
kDa	: Kilo dalton
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
IC ₅₀	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
Tris	: Trihidroksimetil aminometan
DMSO	: Dimetil sülfoksit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
PVDF	: Poliviniliden diflorid
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforezi
ECL	: Hassas kemilüminesans görüntüleme
Gen	: Genistein
İr	: İrinotekan

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Kolonun anatomisi	5
Şekil 2.2.	Apoptozun moleküler mekanizması	7
Şekil 2.3.	Genisteinin kimyasal yapısı	9
Şekil 4.1.	Genistein ve irinotekan ile 72 saat tedavi edilen HT-29 ve Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin artan konsantrasyonlara bağlı canlılık grafiği	20
Şekil 4.2.	Genistein ve irinotekan kombine tedavisi 72 saat süreyle uygulanan Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin canlılık grafiği	22
Şekil 4.3.	Genistein ve irinotekan ile mono- ve kombo- tedavi edilen Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin koloni sağ-kalımı bulguları	24
Şekil 4.4.	Hücre migrasyonu bulguları	26
Şekil 4.5.	Genistein ve irinotekan ile mono- ve kombo- tedavi edilen Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin ROS miktarının kantitatif analizi	28
Şekil 4.6.	Anti-anjiyogenik etkinin kolorimetrik analizi	29
Şekil 4.7.	Genistein ve irinotekan mono- ve kombo- tedavilerinin Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde apoptotik proteinlerin ifade düzeylerine olan etkisi	31

İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE İRİNOTEKANIN ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOTİK AKTİVİTESİ ÜZERİNE GENİSTEİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Kanser, günümüzde en tehlikeli ve hızlı yayılan hastalıklardan birisidir ve dünya üzerindeki en önemli ölüm sebepleri arasında yer almaktadır. Kanserın klinik tedavisinde kullanılan kemoterapotik ve radyoterapotik ajanlar ciddi yan etkilere sahiptir. Bu ajanların bitkisel bileşiklerle kombine olarak kullanımları yan etkilerin azaltılmasını veya ortadan kaldırılmasını ve düşük dozlarda daha etkin olmalarını sağlayabilmektedir.

Bu çalışmada, anti-kanser etkinliğe sahip bitkisel bir etken madde olan genisteinin, kanserin klinik tedavisinde kullanılan ve ciddi yan etkilere sahip bir ilaç olan irinotekan ile kombinasyonunun sinerjistik etkinliğinin insan kolon kanseri hücreleri üzerinde araştırılması ve bu kombinasyonun sinerjistik etkisinin apoptotik yollarda görevli olan proteinlerin ekspresyonları üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Kolon kanseri hücre hatları (HT-29 ve Caco-2) artan dozlarda genistein ve irinotekan ile tedavi edildi ve IC₅₀ dozları belirlendi. Hücre canlılığı ve koloni oluşumu deneyi ile genistein ve irinotekan kombinasyonunun antiproliferatif etkinliği araştırıldı. Genistein ve irinotekanın etkin dozlarının kombinasyonu ile tedavi edilen hücrelerde ortaya çıkan ROS seviyeleri DCFD-A analizi ile ve migrasyon yara iyileşmesi deneyi ile değerlendirildi. Bu kombinasyonun apoptotik sinyal yollarındaki proteinlerin ekspresyonları üzerine olan etkileri Western blot yöntemi ile analiz edildi.

Bulgular ışığında, genisteinin irinotekan ile kombinasyonunun terapötik etkilerinin önemli düzeyde antikanser etki gösterdiği ve sinerjistik etkileşime sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bu araştırmada elde edilen bulgular, apoptozu yüksek seçicilik ve etkinlikte indükleyen, minimal toksik etkili olan tedavilerin geliştirilmesine genisteinin katkı sunabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: İrinotekan, Kolon kanseri, Genistein, Apoptoz.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF GENISTEIN ON THE ANTIPROLIFERATIVE AND APOPTOTIC ACTIVITIES OF IRINOTECAN IN HUMAN COLON CANCER CELLS

ABSTRACT

Cancer is one of the most dangerous and rapidly spreading diseases today and is among the leading causes of death in the world. Chemotherapeutic and radiotherapeutic agents used in the clinical treatment of cancer have serious side effects. The use of these agents in combination with herbal compounds can reduce or eliminate side effects and make them more effective at low doses.

This study aimed to investigate the synergistic activity of the combination of genistein, a herbal active substance with anti-cancer activity, with irinotecan, a drug used in the clinical treatment of cancer and has serious side effects, on human colon cancer cells and to investigate the effects of this combination on the expression of proteins involved in apoptotic pathways. Colon cancer cell lines (HT-29 and Caco-2) were treated with increasing doses of genistein and irinotecan and IC_{50} doses were determined. The antiproliferative activity of the genistein and irinotecan combination was investigated by cell viability and colony formation assay. The ROS levels in cells treated with the combination of effective doses of genistein and irinotecan were evaluated by DCFDA analysis and migration wound healing assay. The effects of this combination on the expression of proteins in apoptotic signaling pathways were analyzed by Western blot method.

In the light of the findings, it was revealed that the therapeutic effects of the combination of genistein and irinotecan showed significant anticancer effects and had synergistic interaction. The findings obtained in this study suggest that genistein may contribute to the development of treatments that induce apoptosis with high selectivity and efficiency and have minimal toxic effects.

Keywords: Irinotecan, Colon cancer, Genistein, Apoptosis.

1. GİRİŞ

Kanser, geçmişten günümüze insan hayatını tehdit eden, çevresel ve kalıtsal faktörlerin etkisiyle oluşan mortalite oranı yüksek bir hastalıktır. Kanser genellikle DNA'daki bir hasar veya bozukluk ile gelişmekte ve normal hücrelerin hasarı sonucu kontrolsüz çoğalma ile seyretmektedir. Organizmanın oluşumunun ilk safhalarında hem anne hem babadan gelen hasarlı DNA'lar nedeniyle de genetik olarak aktarılabilmektedir (Sudhakar, 2009). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'na (IARC) göre, 2020 yılında 19,3 milyon bireyin kanser tanısına sahip olduğu ve bu bireylerin yaklaşık 10 milyonunun hayatını kaybettiği bildirilmiştir. Aynı yılda dünya çapında kanser tanısı alan bireylerden erkeklerde en çok prostat kanseri, kadınlarda ise meme kanseri olduğu belirtilmiştir. 2040 yılına kadar küresel anlamda kanser hastası birey sayısının 28 milyon civarında olması beklenmektedir. En sık ölüme sebep olan kanser türleri ise akciğer, kolon ve karaciğer kanserleridir (Sung vd., 2021).

Kolon kanseri genetik bozukluklar ve epigenetik değişimler nedeniyle oluşmaktadır. Kolon kanserine sebep olan temel etkenlerden biri beslenme tarzıdır. Protein ve yağ oranı yüksek besinlerle beslenmek, meyve ve sebze bakımından ise fakir diyet uygulamak kolon kanserinin oluşma riskini artırmaktadır (Wiencke vd., 1999). Tüm kanserlerin insidansı içindeki % 10 oranı ile kolon kanseri yaşam kalitesini azaltmaya ve insan hayatını tehdit etmeye devam etmektedir. Küresel açıdan mortalite oranında ikinci sırada yer almaktadır (Sung vd., 2021). Kemoterapi ilaçlarının kullanıldığı tedavi protokolleri kanser tedavisinin temel basamağını oluşturmaktadır. Tedavi sırasında gelişen ilaca direnç sebebiyle tümöral gelişim ve bunun sonucu olarak hastalığın progresyonu, bu ilaçların kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücre hasarı ve ölümüne veya sağlıklı hücre bölünmesinin durmasına sebep olması, bulantı-kusma, saç dökülmesi, halsizlik ve yorgunluk, anemi, mukozit gibi yan etkilere neden olması tedavide farklı uygulamaların geliştirilmesinin gerekli kılmaktadır. Bu gibi etkenlerden dolayı kemoterapi ilaçlarının bitkisel kökenli farklı ajanlarla kombinasyonu, komplikasyonların hasta yaşamına olan olumsuz etkisini azaltmak amacıyla uygulanmakta ve ilaca direnç gelişmesi konusunda çözümler sunmaktadır (Zhang ve Guo, 2016).

Bu çalışmanın amacı, klinikte yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi ajanı olan İrinotekanın insan kolon kanseri hücrelerinde bitkisel doğal bir bileşik olan genistein ile kombine tedavisinin hücre çoğalması ve apoptoz üzerine olan etkilerini araştırmaktır. Bu kapsamda, insan kolon kanseri hücreleri kültüre edilip gerekli tedaviler uygulandı. Daha sonra yapılan çeşitli analizler ile uygulanan bu maddelerin anti-proliferatif ve apoptotik etkileri belirlendi. Apoptotik yollarda görevli olan bazı proteinlerin ekspresyon seviyeleri de incelendi. Bu çalışma, kanser hücrelerinin programlanmış ölümünü yüksek seviyede etkin ve seçici bir şekilde indükleyen, ancak normal hücrelere minimal zarar veren ilaç ve tedavilerin geliştirilmesine katkıda bulunmayı amaçlamaktadır. İrinotekanın diğer birçok kemoterapötik ajan gibi sağlıklı hücreler üzerinde ciddi yan etkileri mevcuttur. Bu çalışmada, irinotekanın apoptotik etkilerini arttırmada ve istenmeyen yan etkilerini azaltmada genisteinin rolü incelenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kanser, hücrelerin anormal bir şekilde büyüüp yayılmasıyla karakterize edilen klonal bir hastalıktır ve somatik genetik bozuklukların en yaygın ve karmaşık olanıdır (Futreal vd., 2001). Tüm kanserler, DNA dizisinde meydana gelen çeşitli anormalliklerle başlar. Kanser %10-15'i kalıtsaldır, yani ebeveynlerden gelen genetik faktörlerle ilişkilidir; geri kalan %85-90'lık kısmı ise yaşam boyunca hücrelerin DNA'sındaki değişiklikler ve replikasyon hataları gibi faktörlere bağlıdır. Bu mutasyonlardan biri bazen hücre büyümesini etkileyerek bir kanser klonunun oluşmasına yol açabilir. Kanser, bir dizi faktörün etkisi altında gelişen bir hastalıktır ve bu faktörler arasında bakterilerden virüslere, radyasyondan genetik mirasa, çevresel etkenlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasal maddelere kadar pek çok faktör yer almaktadır (Williams, 2001).

Kanser, hücrelerin bölünme ve büyüme süreçlerini kontrol eden genlerin hasar görmesiyle başlayan karmaşık bir hastalıktır. Kanseri tanımlayan önemli bir özellik, anormal hücre bölünmesinin vücudun çeşitli bölgelerinde ortaya çıkması ve diğer organlara yayılabilmesidir (Pal ve Nayak, 2010). Bu sürecin devam etmesi, hücrelerin aşırı çoğalması ve apoptotik hücre ölümü mekanizmasıyla dengelenememesi gibi sorunlara yol açar. Kontrol kaybı sonucunda aşırı çoğalan hücreler, organizmanın farklı organlarında kalıcı hasarlara neden olabilir (Donar, 2021). Kanser hücreleri, düşük oksijen seviyeleri, besin yetersizliği ve zorlu çevresel koşullara karşı direnç göstererek, zaman içinde bu koşulları kendi avantajlarına dönüştürebilen adaptif hücrelerdir. Kanser hücreleri, zamanla morfolojik ve işlevsel değişikliklere uğrayabilir. Normal hücrelerin belirli bir substrata bağlı olarak büyüme ve hayatta kalma yeteneği varken, kanser hücreleri substrata bağımlı olmadan da yaşayabilir ve çoğalabilir (Baykara, 2016).

Kanser hücrelerinin bazı özellikleri şunlardır:

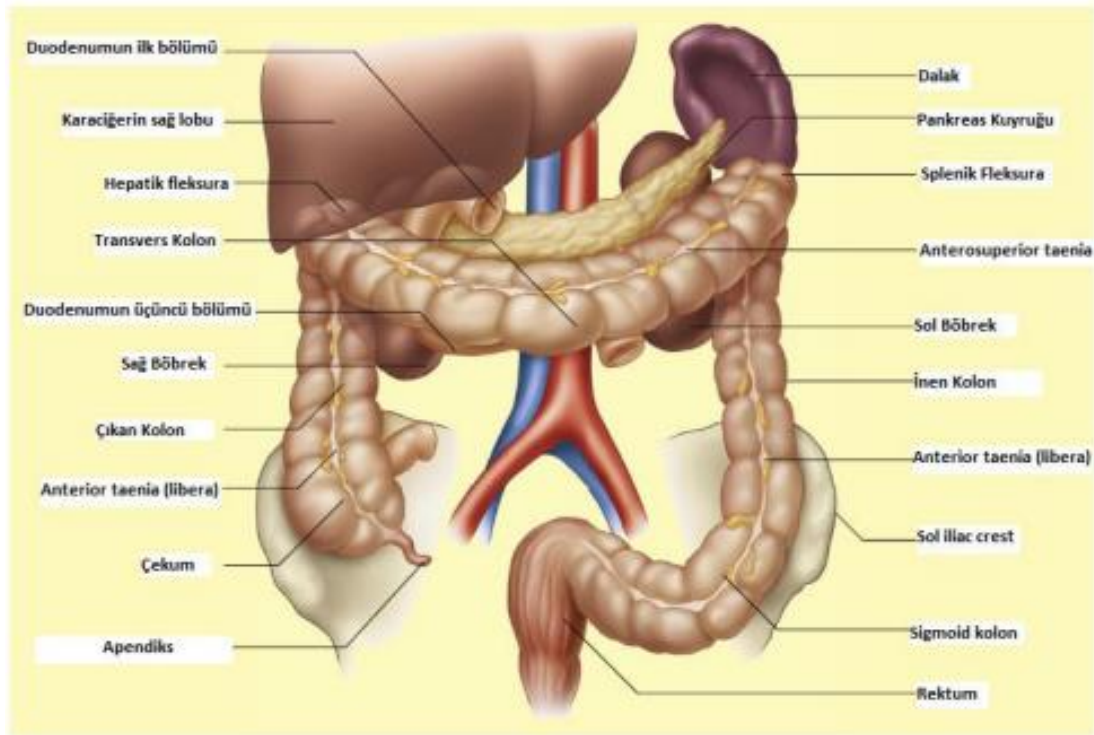
- Hücre yüzeyinde bulunan reseptörler, daha sık sinyal alır.
- Kontrolsüz bir şekilde çoğalmayı sağlayan kendi sinyal sistemlerine sahiptirler.
- Yan hücrelerle temas sonrasında bölünmeyi durdurmadan büyümeye ve çoğalmaya devam ederler.

- Sağlıklı hücreler her tür besini kullanabilirken, kanser hücreleri sadece glikolizden gelen glukozu tercih ederler. Şeker, normal hücrelere kıyasla yaklaşık olarak 100 kat daha fazla miktarda kandan alınıp, laktat üreterek enerji sağlarlar (Warburg etkisi).
- Gereksinim duydukları besin ve oksijeni almak için çevredeki stromayı etkileyerek yeni damar sistemleri oluşturabilirler (Anjiyogenez).
- Telomerlerini sabitleyerek veya telomeraz aktivitesini koruyarak sonsuz bir şekilde replike olabilirler.
- Diğer dokulara ve organlara göç edebilirler (İnvazyon veya Metastaz).
- Apoptozdan kaçabilirler (Baykara, 2016).

Kanser, hücre büyümesini ve mitozu kontrol eden genlerin mutasyona uğraması veya anormal aktivasyonu sonucunda ortaya çıkar (Guyton ve Hall, 2013). Hücre siklusu, hücrenin içeriğini iki katına çıkararak bölünmesini ve bu sürecin sonunda iki yeni hücrenin oluşmasını sağlayan oldukça karmaşık ve düzenli bir süreçtir. Bu süreçte, hücresel çoğalmanın düzenlenmesinde siklinler, siklin bağımlı kinazlar, onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve mitotik kontrol noktaları gibi birçok düzenleyici proteine ihtiyaç duyulmaktadır (Wenzel ve Singh, 2018). Hücre siklusunun düzenlenmesi, hücrenin büyümesi ve çoğalması için hayati öneme sahip bir süreçtir. Bu sürecin düzensizleşmesi veya mutasyona uğraması, kanser gibi ciddi hastalıklara yol açabilir. Kanser, genellikle hücre siklusunun normal dışı aktivitesi ile tanımlanır. Bu durum, sinyal yolundaki mutasyonlar veya hücre siklusunu kodlayan genlerdeki genetik bozukluklar gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir. Hücre döngüsü kontrol sistemi, siklin bağımlı kinazlar (Cdk) olarak bilinen protein kinazlarının temelinde yatar. Hücre döngüsü ilerlerken, bu kinazların aktivitesi artar veya azalır. Bu enzimler, hücre döngüsünün önemli olaylarını- DNA replikasyonu, mitoz ve sitokinez - başlatan veya düzenleyen intraselüler proteinlerin fosforilasyonunda döngüsel değişikliklere neden olurlar. Cdk aktivasyonunu düzenleyen en önemli proteinler, siklinlerdir. Siklinler, hücre döngüsü aşamaları ile koordineli olarak sentezlenir ve parçalanır. Siklin düzeylerindeki döngüsel değişiklikler, siklin-Cdk komplekslerinin aktivasyonunu tetikleyerek ve hücre döngüsü olaylarını başlatarak bir etki oluşturur (Otto ve Sicinski, 2017).

Organizmada kalın bağırsak, çekum, kolon, rektum ve anal kanaldan oluşan dört ana bölüm bulunmaktadır. Kolon ise çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid

kolon olmak üzere dört ayrı segmentten meydana gelir (Şekil 2.1). Kolonun rektuma bağlanması sigmoid kolon ile, ince bağırsağın ileum kısmına bağlanması ise çekum vasıtasıyla olur. Kolon veya kolorektal kanserler en sık kolon, rektum ve apandis kısımlarında meydana gelmektedir (Jemal vd., 2008). Kolonun temel görevi feçesteki su ve elektrolitlerin emilimini sağlayarak atıkların dışarı atılmasına kadar feçesi depolamaktır. Kolonun üst kısmı emilimde görev alırken alt kısmı depolamadan sorumludur. Kolonda bulunan longitudinal ve sirküler kasların beraber kasılmaları sonucu hastrasyon denilen karıştırıcı hareketler oluşur. Bu kasılmalar çıkan kolon ve çekumun içerisinde ilerleyerek devam eder. Kolon içeriğinin transvers kısımdan sigmoid kısma iletilmesindeyse ilerletici kütle hareketleri rol almaktadır. Karıştırıcı ve ilerletici hareketlerle feçesteki su ve elektrolitler emilir ve bir günde yaklaşık olarak 80-200 ml feçe dışarı atılır (Guyton ve Hall, 2013).



Şekil 2.1. Kolonun anatomisi (Ellis ve Mahadevan, 2014'den uyarlanmıştır)

Kolorektal kanser (KRK), dünya genelinde sıkça görülen kanser türlerinden biridir ve kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır (Sung vd., 2021). KRK, kolon ve rektum dokusundan gelişen bir kanser türüdür ve genellikle epitelyal tabakadan kaynaklanır (Jemal vd., 2008). KRK'nın karsinogenezinde genetik ve çevresel faktörlerin

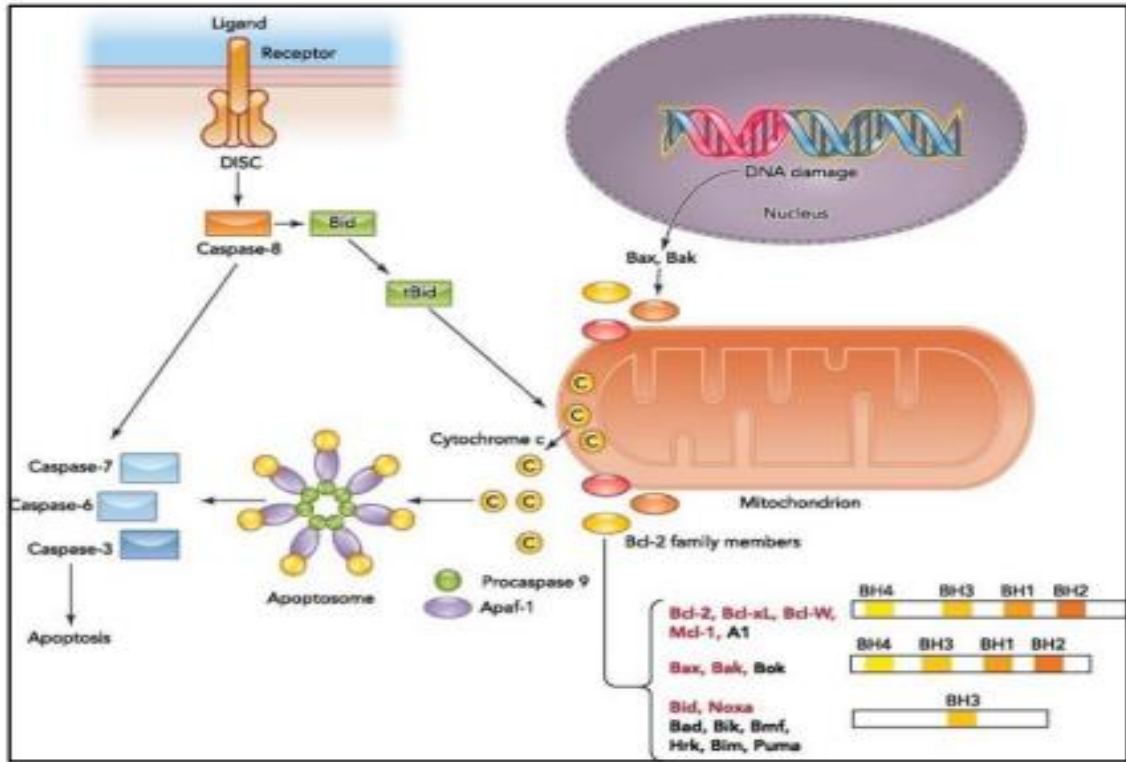
etkileşimi önemli bir rol oynamaktadır. Son yirmi yılda KRK'nın moleküler mekanizması daha iyi anlaşılmış olmasına rağmen, prognozda belirgin bir iyileşme görülmemiştir. KRK tanısı konan hastalar için 1980'lerin başlarında %56.5 olan 5 yıllık sağkalım oranı, son yıllarda erken tanı ve tedaviye bağlı olarak %64.9'a yükselmiştir (Miller vd., 2008). Kolon kanserinin kalıtsal ve kalıtsal olmayan formları bulunmaktadır. Kalıtsal olanlar arasında, ailevi kolon polipozisi (FAP) ve polipozisle birlikte olmayan kalıtsal kolon kanseri (HNPCC) bulunmaktadır. FAP'lı hastalarda, 5. kromozomdaki APC geninde mutasyonlar gözlenir ve genellikle binlerce polip oluşumu saptanır. FAP ve HNPCC gibi kalıtsal kolon kanseri türleri otozomal dominant geçiş gösterir. Ancak, çoğu durumda kolorektal kanser kalıtsal olmayıp, çevresel faktörlere bağlı olarak somatik mutasyonlar sonucu ortaya çıkar (Aran vd., 2016).

Düşük sosyoekonomik düzey, 50 yaş üstü olma, obezite, hareketsiz yaşam tarzı, sigara kullanımı, aşırı alkol tüketimi, lıfız ve yağlı beslenme alışkanlıkları, kırmızı et ve işlenmiş et tüketimi, diyabet, insülin direnci, akromegali, uzun süreli immünsupresyon için böbrek nakli geçmişi, uzun süreli androjen yoksunluğu tedavisi, ailede kolorektal kanser öyküsü, kolorektal adenom geçmişi, kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı, ailesel adenomatöz polipozis sendromu, kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser (HNPCC), Lynch sendromu, Muir-Torre sendromu, Peutz-Jeghers sendromu gibi hamartomatöz polipozis sendromları, Cowden sendromu, Juvenil polipozis sendromu ve Cronkhite-Canada sendromu gibi kalıtsal olmayan polipozis sendromları KRK için önemli risk faktörleridir (Banales vd., 2020).

Yüksek organizmalarda, hücrelerin kendi otonom sistemlerince artık ihtiyaç duyulmayan ve normal aktivitelerini kaybetmiş hücrelerin zarar vermeden çevreden uzaklaştırılması süreci apoptozis olarak adlandırılır. Apoptoz, hücre döngüsü, bağışıklık sistemi gelişimi ve işleyişi, hormonla ilişkili atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal olarak indüklenen hücre ölümü gibi çeşitli süreçlerde hayati bir rol oynar (Elmore, 2007).

Apoptoz, içsel veya reseptör aracılı yollardan birisi ile aktive edilebilir. İçsel yolak, mitokondri membranındaki porların genişlemesiyle karakterizedir, bu da mitokondri içeriğinin sitoplazmaya dağılarak apoptozom kompleksinin oluşmasına yol açar. Diğer bir yandan, reseptör aracılı yolak, hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine sinyal

iletimiyle belirlenir. Sistein-aspartik proteaz (kaspaz) aktivasyonu, hücresel yapıların parçalanması ve hücrenin ölüme hazırlanması ile sonuçlanır, bu da çevre dokularda minimum stres ortamının korunmasını sağlar. İçsel yolaktaki sinyalin regülasyonu, Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından sağlanır (Şekil 2.2). Bu aile, hem apoptozu tetikleyen hem de önleyen proteinleri içerir. Bu iki farklı işlev arasındaki denge, hücrenin yaşamı ve ölümü arasındaki kararın alınmasında kritik bir rol oynar (O'Brien ve Kirby, 2008; Wong, 2011).



Şekil 2.2. Apoptozun moleküler mekanizması (Sendoel ve Hengartner, 2014)

Apoptozdan kaçınma yeteneği, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına ve kanser dahil çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına yol açabilir. Son otuz yıldan fazla bir süredir, kanser hücrelerinin apoptoz yoluyla etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasını teşvik eden tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, klinik onkolojinin temel bir amacı ve hedefi olarak kabul edilmektedir (Nirmala ve Lopus, 2020).

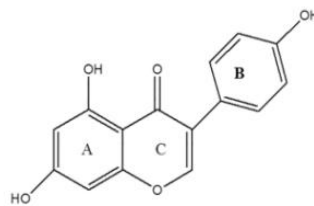
Topoizomerazlar, DNA replikasyonu, transkripsiyon, rekombinasyon, kromozom kondensasyonu ve ayrılması gibi süreçlerde ortaya çıkan topolojik sorunların çözülmesine yardımcı olan enzimlerdir. Bugün birçok FDA onaylı kemoterapötik ajan,

topoizomerazlarla etkileşime girerek kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Fortune ve Osheroff, 2000). İrinotekan, topoizomeraz-I enzimini hedefleyen bir kamptotesindir. DNA replikasyonu ve transkripsiyonu sırasında çift zincirli kırıklara yol açar, böylece hücre bölünmesi ve çoğalması durdurulur. Sonuç olarak, irinotekan, kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını baskılar (Fujita vd., 2015). İrinotekan, ilk olarak 1994 yılında Japonya'da onaylanmış olup, özellikle ileri evre kolon kanseri ve diğer katı tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İlacın etkinliği, monoterapi olarak kullanılabildiği gibi, daha yaygın olarak 5-fluorourasil ve folinik asit ile kombine tedavi rejimlerinde de belirgin şekilde artmaktadır. FOLFIRI ve FOLFIRINOX gibi kombinasyon tedavileri, metastatik kolorektal kanser tedavisinde standart hale gelmiştir ve irinotekanın bu rejimlerdeki rolü, hastaların sağkalım oranlarını artırmada kritik öneme sahiptir (Bailly, 2019). İrinotekan, metabolizmasında önemli bir varyasyon gösterir ve bireyler arasında farmakokinetik profili değişiklik gösterebilir. İlaç, SN-38 adlı aktif metabolitine dönüşen bir prodrugdur. SN-38, irinotekan'dan 100-1000 kat daha sitotoksik olup, geniş bir tümör spektrumuna karşı etkilidir. Ancak, SN-38'in aktif ve inaktif formları arasındaki denge, pH ve bağlanma proteinlerinin varlığına bağlıdır ve bu durum, ilacın biyolojik etkinliğini etkileyebilir (Mathijssen vd., 2001).

İrinotekanın kullanımı, bazı önemli yan etkilerle ilişkilidir. Bu yan etkiler arasında nötropeni, diyare ve diğer hematolojik toksisiteler yer almaktadır. Bu nedenle, irinotekan tedavisinin yönetimi dikkatli bir hasta takibi gerektirir ve bu tedavi sırasında destekleyici bakım önlemleri önemlidir. Bu yan etkileri azaltmak amacıyla yeni ilaç formülasyonları geliştirilmiştir. Örneğin, liposomal irinotekan ve immünokonjugat SN38 gibi yeni irinotekan türevleri, ilacın etkinliğini artırırken yan etkilerini azaltmayı hedeflemektedir (Fuchs vd., 2006; Bailly, 2019). Bununla birlikte, irinotekana karşı tümör hücrelerinin geliştirdiği direnç mekanizmaları, tedavi etkinliğini sınırlayan faktörler arasındadır. İrinotekan ve benzeri ilaçların kombinasyonları ve yeni formülasyonları üzerinde araştırmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar, irinotekanın kanser tedavisindeki etkinliğini artırmayı ve yan etkilerini azaltmayı amaçlamaktadır. Sonuç olarak, irinotekan, kolon kanserinin tedavisinde kritik bir rol oynamaya devam etmektedir, ancak tedavi sürecinde karşılaşılan direnç ve yan etkiler, bu ajanın klinik kullanımını sınırlayan faktörler arasında yer almaktadır (Fujita vd., 2015; Kciuk vd., 2020).

Fitoöstrojenler, endojen östrojene benzer etkilere sahip bitkisel kaynaklı kimyasallardır ve son yıllarda yapılan araştırmalarla önemleri giderek artmış, günümüzde büyük ilgi görmektedir. Özellikle soya gibi pek çok bitkide önemli miktarda fitoöstrojen bulunmaktadır. Bu fitoöstrojenlerin başlıcaları, soya fasulyesinde bulunan izoflavonlardır. İzoflavonların en bilinen kaynaklarından bazıları, Leguminosae ailesine ait kuru baklagiller arasında bezelye, fasulye, nohut, mercimek ve soya fasulyesidir. Genellikle günümüzde soya fasulyesinden elde edilen ürünler, özellikle genistein kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu ürünler arasında soya unu, soya protein izolatları, tofu, soya sütü, soya yoğurdu ve soya şehriye öne çıkmaktadır (Büyüktuncer ve Başaran, 2005).

Genistein, glisitein ve daidzein gibi soya izoflavonları, en bilinen ve önemli olanlardır. Bu izoflavonlar arasında sadece genistein hem kolaylıkla sentezlenebilir hem de güçlü bir aktiviteye sahiptir (Şekil 2.3). Genisteinin östrojenik ve antiöstrojenik etkileri bulunmaktadır. Fitoöstrojenler, östrojen reseptörleriyle etkileşerek östrojen agonisti veya antagonist olarak işlev görürler. Antioksidan özellikleri yüksek olan genistein, antioksidan enzimlerin aktivitesini artırabilir, kanser gelişiminde etkili olan serbest radikalleri yakalayabilir ve oksidatif DNA hasarını önleyebilir. Bu nedenle, genistein birçok kanser türüne karşı antikanserojen etki gösterebilir ve kemik ile kalp-damar sağlığını koruyabilir. Araştırmalar, soya fasulyesi ve ürünlerinin tüketiminin vücuttaki genistein miktarını artırdığını ve böylece kolon, meme ve prostat dahil olmak üzere birçok kanser türünün gelişme riskini azaltabileceğini göstermektedir (Orhan, 2011). Genistein izoflavonoid olarak, hücre döngüsü ilerlemesini, apoptozu ve metastazı düzenleme kapasitesine sahiptir. Araştırmalar, genisteinin insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) dahil olmak üzere epidermoid karsinoma ve lösemi hücrelerinde reseptör tirozin kinazlarının (RTK'lar) fosforilasyon seviyelerini azaltarak spesifik bir RTK inhibitörü olarak hareket ettiğini ortaya koymuştur (Akiyama vd., 1987).



Şekil 2.3. Genisteinin kimyasal yapısı (Tuli vd., 2019)

Genisteinin kanser gelişimini azaltma veya ortadan kaldırma üzerindeki etkileri, bir dizi *in vitro* ve *in vivo* çalışma ile doğrulanmıştır. Genistein, serbest radikalleri doğrudan veya antioksidan enzimlerin yardımıyla dolaylı olarak etkileyerek oksidatif DNA hasarını engelleyebilir (Büyüktuncer ve Başaran, 2005). Genisteinin antikanserojenik etkileri, anjiogenezin ve hücre döngüsünün ilerleyişinin inhibisyonunu içerir. Bu potansiyel etkiler, genisteinin tümör oluşumunda önemli bir rol oynayan yapıların aktivitesini baskılayarak ortaya çıkar. Özellikle, DNA topoizomera II, tirozin protein kinaz ve epitelyal büyüme faktörü gibi yapıların etkinliklerinin genistein tarafından bastırıldığını gösteren araştırmalara odaklanılmıştır. Genisteinin antiproliferatif özelliği, hücrelerin bölünerek çoğalmasını engellerken, antianjiogenetik etkileri anjiogenezin bastırılmasına yardımcı olarak tümör hücrelerinin metastaz yapma yeteneğini azaltır (Dixon ve Ferreira, 2002; Miller vd., 2008; Taylor vd., 2009; Pavese vd., 2010).

Genisteinin bir kemoterapotik ajan olarak moleküler etki mekanizması farklı kanser türlerinde incelenmiştir. Genistein hücre döngüsü, apoptoz, anjiyogenez ve metastazın çeşitli aşamalarını modüle eder. Genisteinin başlıca moleküler hedefleri arasında kaspazlar, B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2), Bcl-2'ye bağlı X protein (Bax), nükleer faktör- κ B (NF- κ B), NF- κ B inhibitörü, fosfoinosit 3-kinaz/Akt (PI3K/Akt), hücre dışı sinyal iletim düzenleyici kinaz 1/2 (ERK 1/2), mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) ve Wingless ve integrasyon 1/ β -katenin (Wnt/ β -katenin) sinyal yolları bulunmaktadır. Transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra, genistein tarafından indüklenen endoplazmik retikulum (ER) stresi ve bu stresin neden olduğu hedeflerin de kanserde apoptozu tetiklediği bildirilmektedir. İlginç bir şekilde, peroksizom proliferatör-aktif edici reseptörler (PPAR'lar) tümör büyümesini modüle etmek için potansiyel terapötik hedefler olarak da ortaya çıkmıştır ve genisteinin PPAR γ sinyal kaskadını hedef alarak tümör hücrelerinde apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Tuli vd., 2019).

Hücre döngüsü, bir hücrenin bölünmesine ve iki kızıl hücre üretimine yol açan olayların dizisidir. Genistein, hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin ifadesini modüle ederek hücre büyümesini ve hücre döngüsü ilerlemesini düzenler (Tuli vd., 2019). Örneğin, genisteinin insan mide kanseri (HGC-27) hücrelerinin büyümesini G2-M evresinde durdurarak engellediği rapor edilmiştir (Matsukawa vd., 1993). Benzer şekilde, galektin-3-transfekte edilmiş insan meme epitelyal (BT549) hücre hattında, genisteinin

p21Waf1/Cip1 ifadesini yukarı regüle ederek G2/M fazında hücre döngüsünü durdurduğunu bildirilmiştir (Lin vd., 2000). Genistein ile tedavi edilen nöroblastoma (B35) hücrelerinde, Cdk inhibitörü p21Waf/Cip1'in daha yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir (Ismail vd., 2006). Çalışmalar ayrıca genisteinin insan meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerinde Ras/MAPK/aktivatör protein-1 aracılığıyla G2/M fazında hücre döngüsünün durdurulmasını tetikleyebildiğini ve dolayısıyla Cdk1, siklin B1 ve Cdc25C'nin indirgenmesini sağladığını göstermiştir (Li vd., 2008). Ek olarak, genisteinin insan kolon kanseri HCT-116 ve SW-480 hücrelerinde ATM/p53 bağımlı yolak aracılığıyla G2/M hücre döngüsü baskılanması ve apoptozu indükleyebildiği gösterilmiştir (Zhang vd., 2013a).

Kanser metastazı dünya genelinde en yaygın ölüm nedenlerinden biridir. Kanser metastazının, MMP'lerin yüksek ekspresyonuna bağlı olduğu bulunmuştur (Tuli vd., 2019). Çıplak fareler kullanılarak yapılan bir çalışmada, genisteinin tükrük adenoid kistik karsinom hücrelerinin (ACC) metastazını, VEGF ve MMP-9 ekspresyonunu inhibe ederek engellediği gösterilmiştir (Liu ve Yu, 2004). Genisteinin MAT-LyLu ve AT-2 sıçan prostat kanseri hücrelerinin migrasyonu üzerinde inhibe edici etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Miekus ve Madeja, 2007). HCT116 kolon kanseri hücrelerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, genisteinin COX-2, MMP-9, Ang-1, vazodilatör uyarılmış fosfoprotein (VASP) ve VEGF'in inhibisyonu yoluyla antimetastatik etkiler sergilediği ortaya koyulmuştur (Kang vd., 2018). Genistein ile tedavi edilen A549 akciğer kanseri hücrelerinde ERK1/2, PI3K/Akt ve MMP-2'nin indirgenmesi rapor edilmiştir (Noori-Dalooi, 2012). Ayrıca, genistein tedavisini takiben epitelyal-mesenkimal geçiş transkripsiyon faktörü olan Snail'in ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Cui vd., 2017). Genisteinin mekanizması, belirli bir yolak hedefleyen özel kemoterapötik ilaçlardan farklıdır ve geniş bir yelpazede moleküler yolları içerir. Genistein'in tüm bu etkileri, antimetastatik etkisini artırabilir ve tümör hücrelerinin diğer dokulara yayılmasını ve invazyonunu engelleyebilir.

In vivo bir çalışmada, azoksimetan ile kolon kanseri modeli oluşturulmuş erkek Sprague Dawley sıçanlarında, 13 haftaya kadar vücut ağırlığı başına 140 mg genistein/kg dozunda tedavi edilenlerde, toplam anormal kriptlerin azalması sağlanmıştır, bu da bu izoflavonun kanseri önleyici rolünü doğrulamaktadır (Zhang vd., 2013b). Genistein tedavisi

uygulanan ve tümör taşıyan çıplak farelerde, tümörlü TGF-1 ve TTTY18 konsantrasyonunda azalma, ayrıca daha düşük bir vücut kütlesi gözlenmiştir. Dahası, hücre içindeki SGK1-, AktSer473- ve p38 MAPKTyr323-pozitif hücre sayısı doza bağlı olarak azalmıştır (Chen vd., 2020). Genistein, farelerdeki kolon kanseri xenograft tümörünün büyümesini dramatik olarak yavaşlatmıştır (Qin vd., 2015). Yüksek yağ içeren farelerde, azoksimetan/dekstran sülfat sodyum (AOM/DSS) ile indüklenmiş kolon kanserini önleme yeteneği için genistein açısından zengin bir diyet test edildi. Kontrol grubuna kıyasla, genistein takviyesi kolon kanserini önlemeye yardımcı olabilir. Genistein ile tedavi edilen grupta, COX2, TNF ve FRAT-1 mRNA ifadesi azaltılmıştır. Ayrıca, genistein açısından zengin bir diyetin, PI3K, AKT ve FOXO3 ifadelerini düzenleyerek kolon kanseri canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Genistein, yüksek yağ içeren bir diyetle beslenen farelerde, PI3K/FOXO3/AKT sinyal mekanizmasını düzenleyerek kolon neoplazmlarının oluşumunu engellemiştir (Song vd., 2018).

İnflamasyonun kanser gelişimi ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Kanser hücreleri, sitokinler ve kemokinler gibi çeşitli enflamatuvar mediyatörleri ifade ederler. Önceki çalışmalar, genisteinin aktive makrofajlarda sinyal transdüser ve aktivatörü 1 ile NF- κ B aracılı sinyal kaskadını inhibe edici etkisini bildirmiştir (Hamalainen vd., 2007). Diğer araştırmacılar ise genisteinin COX-2, fosforile c-Jun N-terminal kinaz (JNK), protein kinaz R-benzeri ER kinaz ve pp38 inhibisyonu yoluyla inflamatuvar yanıtları bastırdığını rapor etmişlerdir; bunlar in vitro ve in vivo çalışmalarında sırasıyla MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve dişi sıçanların meme bezlerinde incelenmiştir (Hwang vd., 2009). RAW 264.7 makrofajlar ve MH7A insan sinoviyoit hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalar, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IL-6 ve NF- κ B gibi enflamatuvar mediyatörlerin düşüşünü bildirmiştir (Ji vd., 2012). Genisteinin farelerde peritoneal endometriozis modelinde TNF- α ve IL-6 ekspresyonunu düşürdüğü, böylece inflamasyon gelişimini inhibe etme yeteneğini gösterdiği ortaya koyulmuştur (Sutrisno vd., 2018). Sonuç olarak, genisteinin olası klinik uygulamasının bir anti-inflamatuvar ajan olarak düşünülmesinin nedeni, kanser hücrelerinin kendi bağımsız mikroçevresini oluşturmalarına yardımcı olan birçok inflamatuvar kaskadı engelleme yeteneğine sahip olmasıdır. Büyüme faktörleri, kemokinler ve sitokinler gibi inflamatuvar mediatörlerin inhibisyonu veya azaltılması, kanser hücrelerinin fonksiyonunu baskılayabilir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar, sarf malzemeler ve kitler, uluslararası standartlara uygun olarak ticari olarak temin edildi. Hücrelerin çoğaltılması için Fetal Bovine Serum (FBS), Penisilin/Streptomisin, Tripsin-EDTA, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ve DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) gibi temel hücre kültürü reaktifleri Gibco firmasından tedarik edildi. Deneylerde kullanılan diğer kimyasallar arasında DMSO (Dimetil sülfoksit), Tris HCl, Bromfenol mavisi, Tween-20, β -merkaptoetanol, EDTA (Etilen diamin tetraasetik asit), NP-40 (Nonidet P-40), β -glycerophosphate, EGTA (Etilen glikol tetraasetik asit), NaOH (Sodyum hidroksit), H_2O_2 ve glisin bulunmaktadır. Bu kimyasallar, proteinlerin ekstraksiyonu, hücrelerin fikse edilmesi, boyama ve diğer moleküler biyoloji işlemleri gibi çeşitli laboratuvar prosedürlerinde kritik roller oynamaktadır. Tüm bu maddeler, Merck firmasından sağlandı. Tüm örnekler ve reaktifler, deney boyunca uygun şekilde hazırlandı ve stabilitelerinin korunması için belirlenen uygun koşullarda saklandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmalar kapsamında Caco-2 ve HT-29 insan kolon kanseri hücre hatları kullanıldı. Bu hücreler, gastrointestinal sistem kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılan model hücre hatlarıdır ve farklı tedavi yaklaşımlarının etkisini incelemek için sıklıkla kullanılır. Hücre kültürü analizleri, Bingöl Üniversitesi Kanser Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Hücreler, %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS), 64 μ g/mL penisilin ve 100 μ g/mL streptomisin içeren DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) besiyerinde, %5 CO_2 , %95 nem ve 37°C koşullarında karbondioksit inkübatöründe çoğaltıldı. Tüm hücre kültürü deneyleri, GCCP (Good Cell Culture Practice) aseptik standartlarına uygun olarak gerçekleştirildi.

3.2.2. Hücre Canlılığı Analizi

Hücre canlılığı metil tiazolil tetrazolyum (MTT) proliferasyon analizi ile üretici protokollerine göre belirlendi (Elabscience, USA). 96 kuyucuklu mikropklara 8×10^3 hücre olacak şekilde Caco-2 veya HT-29 hücreleri ekildi. Hücrelere artan konsantrasyonlarda genistein, irinotekan veya genistein+irinotekan ile 72 saatlik tedavi uygulandı. Tedaviler sonlandırıldıktan sonra kuyucuklara taze medyum ve 50'şer μL MTT çözeltisi eklendi. Plakalar 4 saat boyunca 37°C ve %5 CO_2 koşullarındaki inkübatöre yerleştirildi. Daha sonra kuyucuklardaki karışım aspire edildi ve kuyucuklara 150 μL DMSO ilave edildi. Hücre canlılığını değerlendirmek için 570 nm'de absorbanslar ELISA mikropklara okuyucu kullanılarak ölçüldü.

3.2.3. Koloni Sağ-kalımı Analizi

Koloni sağ-kalım analizi, hücrelerin uzun vadeli proliferasyon yeteneklerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirildi. 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna, 5×10^2 adet Caco-2 kolon kanseri hücresi eklendi ve hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri gözlemlendi (Franken vd., 2006). Hücreler, irinotekan, genistein ve bu iki bileşiğin farklı dozları ile 72 saat tedavi edildi. Bu sürenin sonunda hücreler taze medyum eklenerek 12 gün daha inkübasyona bırakıldı. Fiksasyon işlemi, hücrelerin sabitlenmesi için metanol ve asetik asidin 3:1 oranında karıştırıldığı çözelti eklenerek 5 dakika süreyle gerçekleştirildi. Fiksasyonun ardından, metanol içinde hazırlanan kristal violet boyası kullanılarak hücreler 15 dakika boyunca boyandı. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra, flasklar dikkatlice su ile durulandı ve oluşan koloniler sayıldı.

3.2.4. Hücre Göçü Analizi

Kanser hücrelerinin tedavi altında migrasyon yeteneklerini değerlendirmek amacıyla yara-kapanma analizi gerçekleştirildi (Jonkman vd., 2014). Bu analiz, hücrelerin hareket kabiliyetini ve tedaviye yanıtını ölçmek için kullanılan etkili bir yöntemdir. Deney için, 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 2×10^5 adet Caco-2 hücresi eklendi ve hücrelerin tam yoğunlukta tek katmanlı bir tabaka oluşturmaları sağlandı. Hücrelerin istenen yoğunluğa ulaşmasının ardından, steril bir pipet ucu kullanılarak hücre tabakasının

yüzeyinde lineer bir çizik açıldı. Bu çizik, hücre göçünü değerlendirmek için bir yaralanma modeli olarak uygulandı. Çizik oluşturulduktan sonra, yaralanma bölgesindeki serbest hücreler, bu bölgeden ayrılmaları sağlamak amacıyla dikkatlice PBS ile yıkandı. Tedavilerin ardından 0., 12. ve 24. saatlerde çizik alanın mikroskop altında fotoğraflandı. % yara açıklığı hücrelerin migrasyon yeteneklerinin bir göstergesi olarak değerlendirildi ve tedaviye maruz kalan hücrelerin hareket kabiliyeti, her grubun kendi 0. saat görüntüsüyle normalize edilerek analiz edildi.

3.2.5. ROS analizi

Hücrelerdeki Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) seviyelerini tespit etmek için DCFD-A (Sigma-Aldrich) probu ile hücresel ROS tespit analizi yöntemi kullanıldı. 96 kuyucuklu mikropalakaya 2×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen Caco-2 hücreleri bir gece inkübasyona bırakıldı. Ardından 72 saatlik tedavilerden sonra her bir kuyuya 10 μ M'lik son konsantrasyona seyreltilmiş 120 μ L DCFD-A probu eklendi ve 37 °C ve %5 CO₂'de 40 dakika inkübe edildi. Ardından çözelti uzaklaştırıldı ve daha sonra absorbans, bir mikropalaka okuyucu kullanılarak 505 nm dalga boyunda ölçüldü. Pozitif kontrol olarak H₂O₂ tedavi edilen grup kullanıldı. Hücresel ROS düzeyleri herhangi bir tedavi uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslanarak kat cinsinden değişim olarak ifade edildi.

3.2.6. Anti-anjiyogenik Etkinin İncelenmesi (Hu-VEGF Analizi)

Bu çalışmada, VEGF miktarlarının kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla İnsan VEGF (Hu-VEGF) ELISA yöntemi üretici protokollerine (YL Biotech Corp.) göre gerçekleştirildi. Özetle, 96 kuyucuklu mikropalakanın her bir kuyucuğuna 5×10^4 Caco-2 hücresi ekildi ve hücreler standart koşullar altında bir gece boyunca inkübe edildi. Ardından, hücreler 72 saat boyunca genistein (IC₅₀), irinotekan (IC₅₀) veya bu iki ajanın kombinasyonu olan genistein (IC₂₅) + irinotekan (IC₂₅) konsantrasyonları ile monoterapi veya kombinasyon tedavilerine tabi tutuldu. Tedavi süresi tamamlandıktan sonra, ortamda bulunan besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler, soğuk PBS ile yıkandı. Hücreler tripsinize edilerek toplandı ve 50 μ L taze besiyeri eklenmiş tüplere alındı. Daha sonra, 50 μ L inkübasyon tamponu, tedavi uygulanan hücreleri içeren 50 μ L besiyeri ve 50 μ L standart seyreltici tampon, 96 kuyucuklu mikropalakanın 8 kuyucuklu şerit plakalarına

eklendi. Hücreler, oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edildi. Bu süre sonunda, kuyucuklar 4 kez yıkama tamponu ile yıkandı ve 100 µL Hu-VEGF biyotin konjugat çözeltisi kuyucuklara eklendi. Çözeltinin eklenmesinden sonra, hücreler 1 saat süreyle oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Çözeltinin uzaklaştırılmasının ardından, kuyucuklar tekrar 4 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Bunu takiben, kuyucuklara 100 µL streptavidin-HRP çözeltisi eklendi ve 30 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, çözeltinin kuyucuklardan aspire edilmesi ile birlikte, kuyucuklar 4 kez 1X yıkama tamponu ile tekrar yıkandı. Yıkama işleminin ardından, kuyucuklara 100 µL stabilize kromojen çözeltisi eklendi ve 30 dakika boyunca karanlık bir ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, kuyucuklara 100 µL durdurma çözeltisi (stop solution) eklendi ve çözelti homojen bir şekilde karıştırıldı. Bu işlem sonucunda, çözeltiler mavi tonlarından sarı tonlarına dönüştü. 2 saatlik inkübasyonun ardından, 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri ELISA okuyucusu ile ölçüldü. Elde edilen veriler, oluşturulan standart eğri grafiği ile kıyaslandı ve her tedavi grubu için VEGF miktarları kontrol grubu ile karşılaştırılarak analiz edildi.

3.2.7. Western blot

Bu çalışmada, Caco-2 hücre hattında kaspaz-3, kaspaz-9, p53 ve p38 MAPK protein ekspresyon düzeylerini tespit etmek amacıyla Western blot analizi gerçekleştirildi (Erdogan vd., 2024). Genistein, irinotekan ve bu iki ajanın kombinasyonu ile tedavi edilen Caco-2 hücreleri, 72 saatlik tedavi sonrasında toplandı. Hücreler başlangıç olarak soğuk PBS tamponuyla (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.4 mM KH₂PO₄; pH 7.4) iki kez yıkandı. Bu yıkama işlemi, hücrelerin yüzeyindeki artık maddeleri temizlemek ve protein izolasyonunu kolaylaştırmak amacıyla gerçekleştirildi. Proteinlerin saflaştırılması için, lizis tamponu kullanıldı. Bu tampon, proteinlerin hücrelerden etkin bir şekilde çıkarılması ve korunması için gerekli olan 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, %0.5 NP-40 (v/v), 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT ve proteaz inhibitör kokteyli (EDTA içermeyen) içerir. Hücreler, tripsin ile toplanarak PBS tamponu içinde süspanse edildikten sonra, oda sıcaklığında 1100 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem, hücrelerin yoğunlaştırılmasını sağladı ve elde edilen süpernatant kısmı dikkatlice aspiratör yardımıyla uzaklaştırıldı. Hücrelerden elde edilen pelet, lizis tamponu ile yeniden süspanse edildi ve homojenizasyon işlemi sırasında 1

mL'lik enjektörler kullanılarak etkin bir şekilde proteinler çıkarıldı. Homojenizasyon, proteinlerin hücreden tamamen çıkarılmasını ve analiz için hazır hale getirilmesini sağlar. Örnekler, buz üzerinde 60-120 dakika süreyle bekletildi ve ardından 4°C'de 15000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, yeni bir mikro-santrifüj tüpüne aktarıldı ve protein konsantrasyonları, Bradford yöntemi (Bradford, 1976) kullanılarak belirlendi. Protein örnekleri, SDS-PAGE jel ile uygun konsantrasyonlarda ayrıştırıldı. Bu adım, farklı moleküler ağırlıklardaki proteinlerin ayrılmasını sağlar. Ayrılan proteinler, PVDF membranına transfer edildi. Membran transferi, proteinlerin jelden membrana taşınmasını ve daha sonra antikorlar tarafından tespit edilmesini mümkün kılar. Transfer sonrası membranlar, TBS-T içerisinde %5'lik BSA ile hazırlanan bloklama tamponunda inkübe edildi. Bloklama işlemi, antikorların nonspesifik bağlanmasını önleyerek analiz sonuçlarının doğruluğunu artırır. Bloklamanın ardından, membranlar gece boyunca 4°C'de ilgili primer antikorlarla (dilüsyon: %5'lik BSA içinde) inkübe edildi. Primer antikorlar, hedef proteinlere spesifik olarak bağlanarak proteinlerin tespit edilmesini sağlar. İnkübasyon sonrası, membranlar TBS-T tamponuyla (0,3 M NaCl, 0,1 M Tris-base, %0,5 Tween; pH 7,4) üç kez, onar dakika boyunca yıkandı. Bu yıkama adımları, membrandan spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırır. Sonraki adımda, membranlar oda sıcaklığında 2 saat boyunca HRP ile işaretli sekonder antikorlar ile inkübe edildi. Bu sekonder antikorlar, primer antikorlarla bağlanarak sinyalin güçlendirilmesine yardımcı olur. İnkübasyonun ardından, membranlar TBS-T tamponuyla tekrar üç kez, onar dakika boyunca yıkandı. Görüntüleme işlemi için, kemilüminesans yöntemine dayanan ECL (Enhanced Chemiluminescence) kiti kullanıldı. Bu kit, HRP ile işaretli sekonder antikorların etkileşimi sonucu oluşan ışığı üretir. Elde edilen kemilüminesans sinyal, X-ray görüntüleme sistemi kullanılarak filme aktarıldı ve proteinlerin varlığı ve yoğunluğu kaydedildi. Son olarak, bant yoğunluklarının dansitometrik analizi ImageJ yazılımı (National Institutes of Health, USA) kullanılarak yapıldı. Bu analiz, protein bantlarının yoğunluğunu sayısal olarak değerlendirir ve farklı deney grupları arasındaki protein ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasını sağlar. Bu yöntem, hücrelerin apoptotik yanıtlarını ve tedaviye verdikleri tepkiyi anlamak için kritik veriler sunar.

3.2.8. İstatistiki analizler

Tüm bulgular en az üç deneyin ortalama $\pm$ standart sapması (SD) olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar, tek yönlü ANOVA testi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analiz için GraphPad Prism 8.0 ve Windows Office-Excel programları kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık değeri olarak $p < 0,05$ kabul edildi.

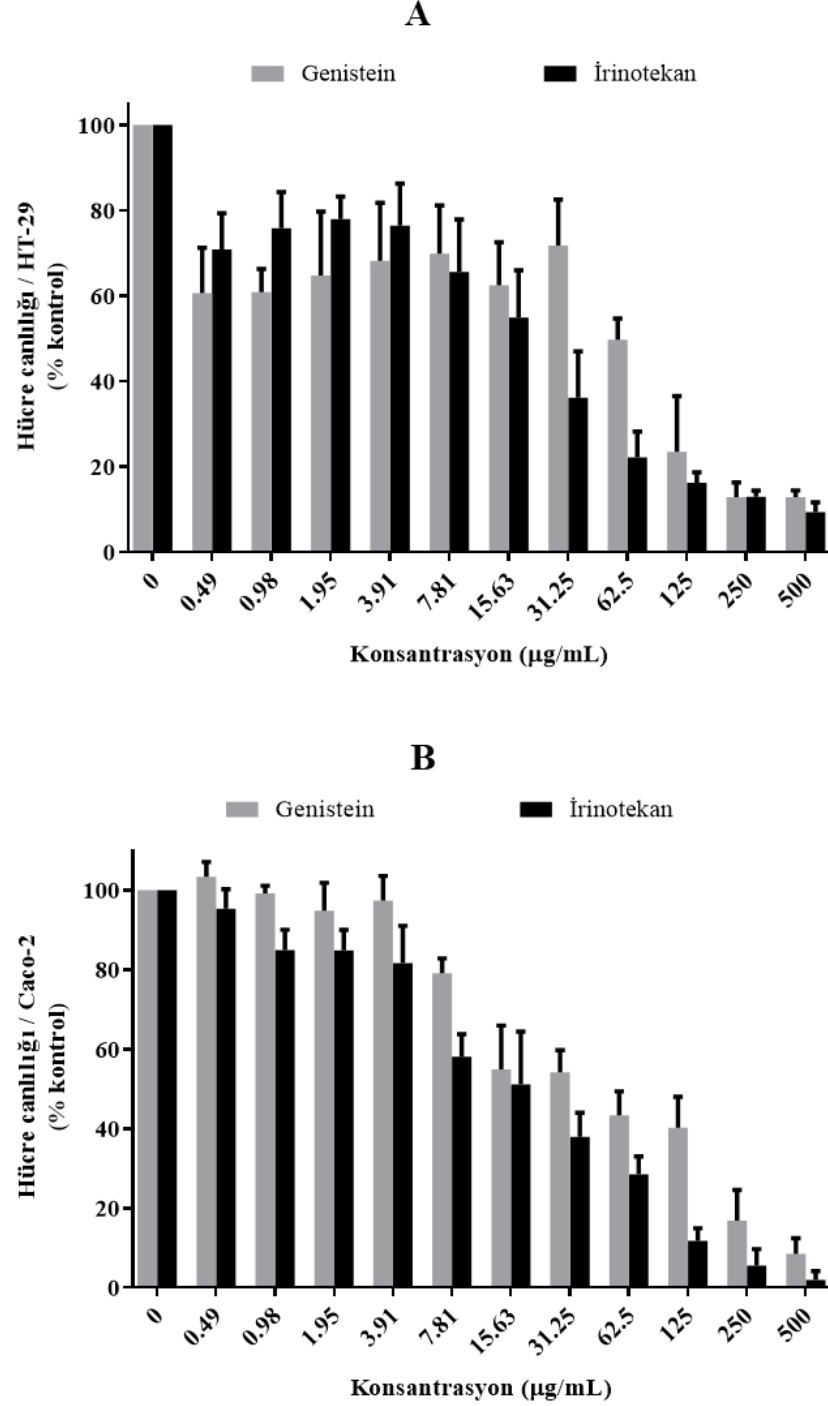
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Hücre Canlılığı Bulguları

Hücre canlılığı ve sitotoksikite testleri, çeşitli maddelerin canlı hücrelerdeki sitotoksik etkisini ölçmek için biyomedikal araştırmalarda kullanılan temel araçlardır. Bu testler esas olarak ilaç taramasında, belirli kimyasal ajanların sitotoksik etkisini test etmek için kullanılır. Dahası, bu teknikler yıllar içinde giderek artan bir popülerlik kazanmış ve artık onkoloji araştırmaları alanında, özellikle ilaç geliştirme bağlamında hem toksisitenin hem de tümör hücresi büyümesinin baskılanmasının değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre canlılığı analizi, genlerin, proteinlerin ve yolakların hücrelerin zararlı maddelere maruz kaldıktan sonra hayatta kalıp kalmayacağını nasıl etkilediğini kontrol eden karmaşık süreçleri anlamak için önemli bir araçtır. Tetrazolyum tuzları, renksiz veya zayıf renkli sulu çözeltilerden formazanlar olarak bilinen parlak renkli türevlere dönüşme yeteneklerinden yararlanılarak hücre canlılığını ve sitotoksikiteyi değerlendirmek için sıklıkla kullanılan bir tekniktir. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür), suda çözünürlük gösteren ve canlı hücreler tarafından içselleştirilebilen sarı renkli bir bileşiktir ve suda çözünmeyen mavi bir formazan oluşumuyla sonuçlanır. Bu formazan bileşiğinin dimetil sülfoksitte (DMSO) çözünmesi, enzim aktivitesiyle doğrudan ilişkili ve canlı hücre sayısı ile doğrudan orantılı olan 540 nm'de kantifikasyonuna olanak tanır. Mor rengin daha yoğun olması daha yüksek seviyede hücre canlılığına karşılık gelirken, yoğunlukta azalma hücre sayısında azalma ve sitotoksik etkinin varlığına işaret eder (Khalef vd., 2024).

Bu çalışmada genisteinin mono- ve irinotekan ile kombo- tedavisinin Caco-2 ve HT-29 insan kolon kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri MTT hücre canlılığı analizi ile incelendi. Hücreler 72 saat süreyle artan konsantrasyonlarda genistein ve irinotekan ile tedavi edildi. Daha sonra tedaviler sonlandırılarak üretici protokolüne göre reaktifler eklendi ve kuyucuklarda oluşan renk değişimi ELISA mikroparka okuyucu bir cihazla (SpectraMax 384 Plus, Molecular Devices, ABD) 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Sitotoksikite yüzde değerleri, tedavi grubunun absorbans değerinden arka plan

kontrolünün çıkarılması ve ardından bu değerin kontrol grubuna bölünmesiyle hesaplandı.



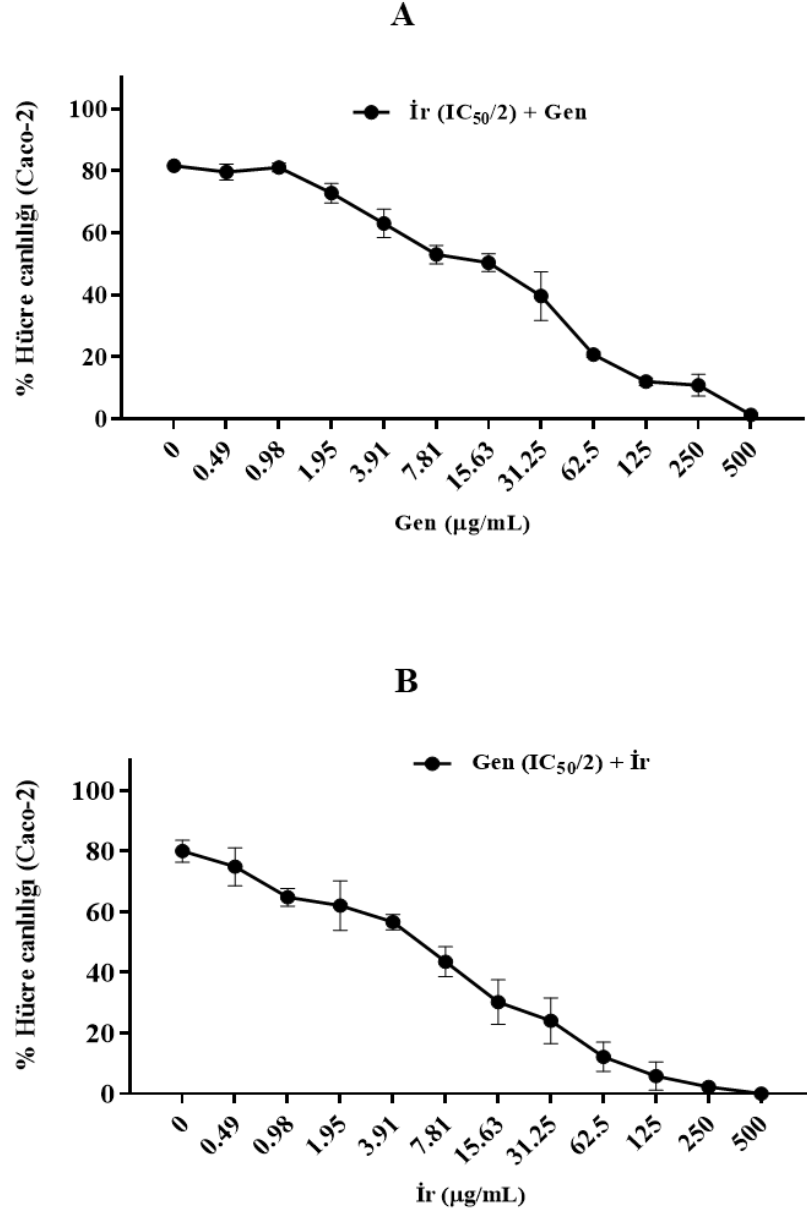
Şekil 4.1. Genistein ve irinotekan ile 72 saat tedavi edilen HT-29 (A) ve Caco-2 (B) kolon kanseri hücrelerinin artan konsantrasyonlara bağlı canlılık grafiği. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçlar ortalama±standard sapma (SD) olarak verildi

Şekil 4.1-A’de görüldüğü gibi HT-29 hücrelerinde genistein tedavisinin özellikle 62,5 µg/mL ve üstü konsantrasyonlarda etkili bir sitotoksik etki gösterdiği, benzer etkinin irinotekan ile tedavi edilen grupta 15,63 µg/mL ve üstü konsantrasyonlarda arttığı ortaya koyuldu. Caco-2 hücrelerinde ise sitotoksik etkinin hem genistein hem de irinotekan tedavisinde konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 4.1-B). Elde edilen sitotoksikite değerleri kullanılarak genistein ve irinotekan için IC₅₀ değerleri hesaplandı. Genistein ve irinotekan için IC₅₀ değerleri sırasıyla; HT-29 hücrelerinde 61,1±9,3 µg/mL ve 16,5±2,6 µg/mL olarak, Caco-2 hücrelerinde ise yine sırasıyla 37,4±4,7 µg/mL ve 14,8±2,1 µg/mL olarak belirlendi. Test edilen her iki ajanın da Caco-2 hücrelerinde daha düşük IC₅₀ konsantrasyonuna sahip olduğu belirlendiği için bundan sonraki analizler Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde gerçekleştirildi.

4.2. Genistein ve İrinotekan Arasındaki Sinerjizm

Birçok yan etkisine rağmen kemoterapi, kanser tedavisinde en sık tercih edilen tedavi yaklaşımları arasındaki yerini korumaktadır. İrinotekan gibi kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan birçok kemoterapötik ajanın direnç gelişimi ve yan etkiler gibi istenmeyen sonuçlarının, bitkisel bileşiklerle kombine olarak kullanıldığında bu ajanların etkinliğinin artırılması ile daha düşük dozlarda ilaç kullanımına bağlı olarak istenmeyen yan etkilerin minimal düzeye indirilebileceği ifade edilmektedir (Lewandowska vd., 2014). Genistein ve irinotekan kombinasyon tedavisinin Caco-2 kolon kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ve aralarındaki etkileşim MTT hücre canlılığı analizi ile değerlendirildi. Sitotoksikite analizi ile belirlenen IC₅₀ değerleri kullanılarak *in vitro* sitotoksikite deneyleri yapıldı. Bu kapsamda Caco-2 hücreleri irinotekanın IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı olan 7,4 µg/mL irinotekan + artan genistein konsantrasyonu (0; 0,49; 0,98; 1,95; 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250 ve 500 µg/mL) ile ve ayrı bir deney seti olarak genisteinin IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı olan 18,7 µg/mL genistein + artan irinotekan konsantrasyonları (0; 0,49; 0,98; 1,95; 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250 ve 500 µg/mL) ile 72 saat tedavi edildi (Şekil 4.2-A-B). Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde genistein ile irinotekan kombine tedavisinin sinerjistik bir ilişkiye sahip olup olmadığının belirlenmesi için kombinasyon indeksi (KI) aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$KI = (A_{Gen})_{50} / (B_{Gen})_{50} + (A_{Ir})_{50} / (B_{Ir})_{50} \quad (4.1)$$



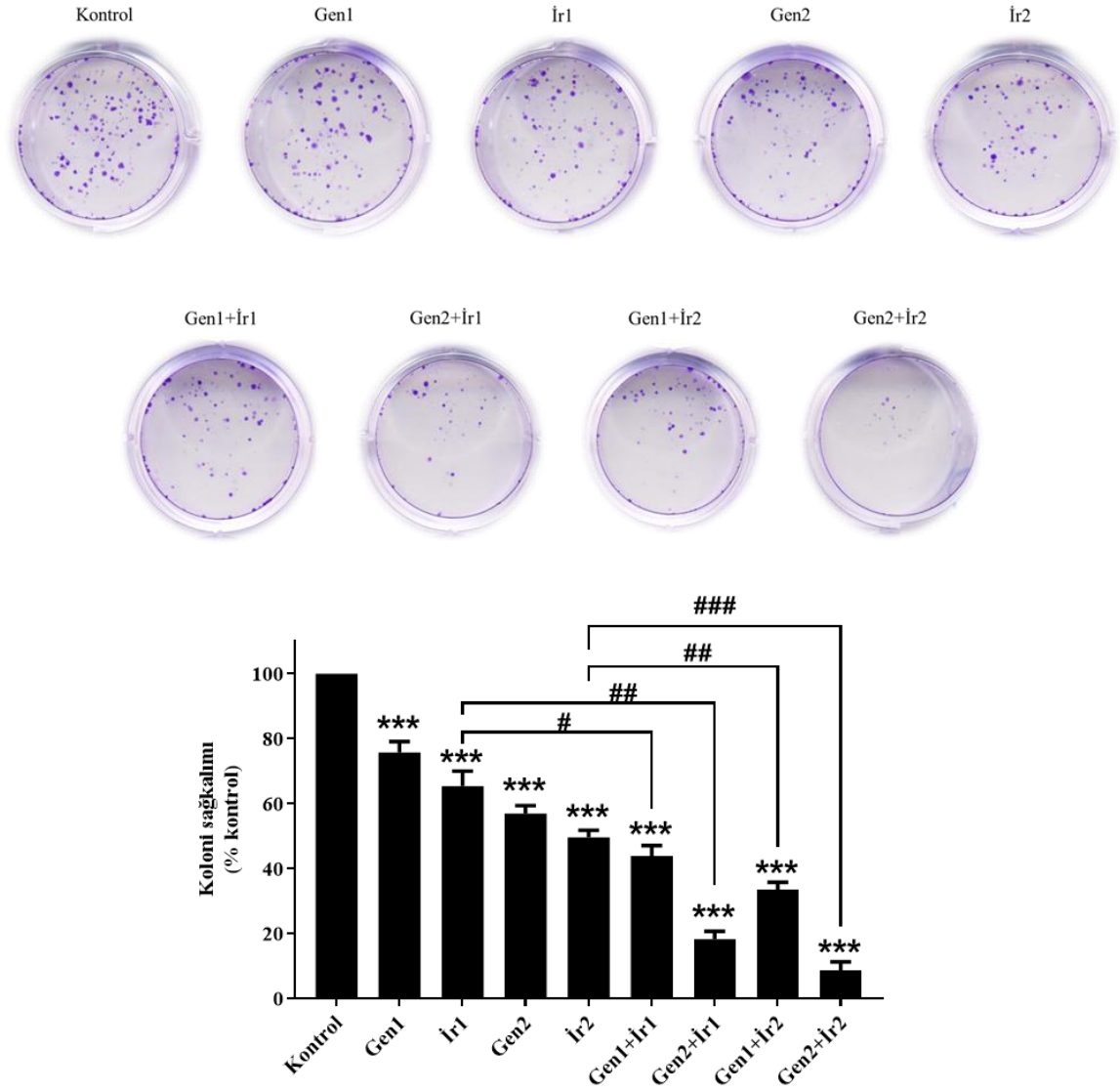
Şekil 4.2. Genistein ve irinotekan kombine tedavisi 72 saat süreyle uygulanan Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin canlılık grafiği. A. Hücreler irinotekanın IC_{50} konsantrasyonunun yarısı sabit olacak şekilde artan konsantrasyonlarda genistein ile kombine olarak tedavi edildi. B. Hücreler genisteinin IC_{50} konsantrasyonunun yarısı sabit olacak şekilde artan konsantrasyonlarda irinotekan ile kombine olarak tedavi edildi. Sonuçlar üç tekrarlı analizlerin ortalama±standard sapma (SD) değeri olarak verildi. Gen:genistein, Ir:irinotekan

Bu formülde (A_{Gen})₅₀; irinotekanın IC_{50} konsantrasyonunun yarısı uygulandığında %50 inhibisyon etkisine sahip genistein konsantrasyonunu, (B_{Gen})₅₀; genisteinin IC_{50} konsantrasyonunu, (A_{Ir})₅₀; genisteinin IC_{50} konsantrasyonunun yarısı uygulandığında %50 inhibisyon etkisine sahip irinotekan konsantrasyonunu, (B_{Ir})₅₀; irinotekanın IC_{50} konsantrasyonunu ifade etmektedir. Hesaplanan kombinasyon indeksi değerinin; 1'den

büyük olması ($KI > 1$) antogonizmi, 1'e eşit olması ($KI = 1$) additif etkiyi ve 1'den küçük olması ($KI < 1$) sinerjizmi gösterir (Chou ve Talalay, 1984; Li vd., 2017). Genistein ve irinotekan için bu kombinasyon tedavilerde IC_{50} değerleri sırasıyla $14,96 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$ ve $6,27 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ olarak bulundu ve KI değeri 0,78 olarak hesaplandı (Şekil 4.2-A-B). Bu sonuç Caco-2 hücrelerinde genistein ve irinotekan kombinasyonunun sinerjistik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

4.3. Koloni Sağ-kalımı Bulguları

Tek bir hücrenin koloniye dönüşme kapasitesini analiz eden *in vitro* koloni sağkalımı deneyi, test edilmek istenen ajanların mono- ve kombo- tedavilerinin etkinliğini belirleyen ve tedaviye bağlı olarak hücrelerden bir kısmının koloni oluşturmaya dayanan kullanışlı bir tekniktir (Franken vd., 2006). 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekimi yapılan 0.5×10^3 Caco-2 hücreleri ertesi gün $5 \mu\text{g/mL}$ genistein (Gen1), $2 \mu\text{g/mL}$ irinotekan (İr1), $10 \mu\text{g/mL}$ genistein (Gen2), $4 \mu\text{g/mL}$ irinotekan (İr2), $5 \mu\text{g/mL}$ genistein + $2 \mu\text{g/mL}$ irinotekan (Gen1 + İr1), $10 \mu\text{g/mL}$ genistein + $2 \mu\text{g/mL}$ irinotekan (Gen2 + İr1), $5 \mu\text{g/mL}$ genistein + $4 \mu\text{g/mL}$ irinotekan (Gen1 + İr2) ve $10 \mu\text{g/mL}$ genistein + $4 \mu\text{g/mL}$ irinotekan (Gen2 + İr2) tedavilerine 72 saat boyunca maruz bırakıldı. Tedavi süresinin sonunda hücreler 12 gün boyunca taze ilaçsız mediumda bekletildi. Boyama işleminden sonra mono- ve kombo- tedavilerin koloni sağkalımı üzerindeki etkileri değerlendirildi. Genistein ve irinotekanın hem tek kullanıldıklarında hem de kombine olarak kullanıldıklarında Caco-2 hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini artan dozla birlikte tedavi edilmeyen kontrol grubuna göre önemli ölçüde baskıladığı görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 4.3). Aynı zamanda kombine tedavilerin sadece irinotekan tedavisine göre koloni sağkalımının anlamlı oranda inhibe ettiği gözlemlendi ($p < 0,05$ - $p < 0,001$).

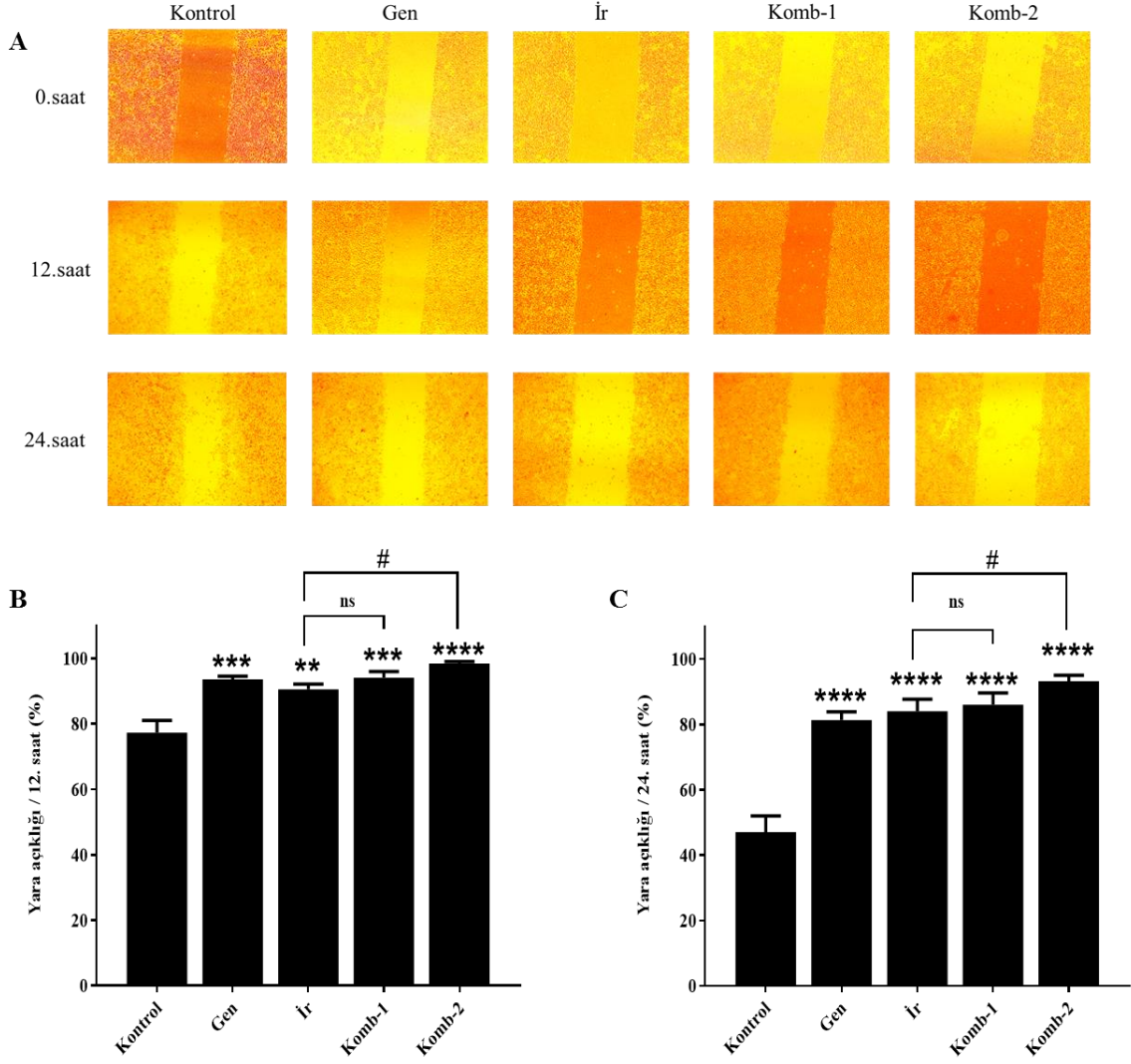


Şekil 4.3. Genistein ve irinotekan ile mono- ve kombo- tedavi edilen Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin koloni sağ kalımı bulguları. Hücreler genistein, irinotekan ve genistein+irinotekan kombinasyonu ile 72 saat süreyle tedavi edildi. Tedavinin ardından hücreler 12 gün boyunca taze ilaçsız mediumda bekletildi. Oluşan kolonilerin analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar üç tekrarlı analizlerin ortalama±standard sapma (SD) değeri olarak verildi. Gen1: 5 µg/mL genistein, Gen2: 10 µg/mL genistein, Ir1: 2 µg/mL irinotekan, Ir2: 4 µg/mL irinotekan. *** $p < 0,001$; kontrolle kıyaslandığında. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; Ir1 ve Ir2 ile tedavi edilen grupla kıyaslandığında

4.4. Hücre Migrasyonu Bulguları

Genisteinin WIF1'in demetilasyonu aracılığıyla HT-29 kolon kanseri hücrelerinin göçünü ve invazyonunu engellediği, ve bu etkisinin MMP2, MMP9, E-kadherin, TIMP1, - katenin, siklin D1, c-Myc gibi hücre göçü ile ilgili genlerin regülasyonu ile

ilişkilendirilebileceği bildirilmiştir (Zhu vd., 2018). Başka bir çalışmada genisteinin HT-29 kolon kanseri hücrelerinde E kadherinin yukarı regülasyonu ve N kadherinin aşağı regülasyonu ile birlikte, hücre göçünü engellediği, ayrıca notch1, p-NFB ve NFB ifadesini de inhibe ederken, Bax ve kaspaz-3 ifadesini indüklediği gösterilmiştir (Zhou vd., 2017). *In vitro* hücre göçünü analiz etmek için kullanılan yara iyileşmesi (wound-healing) deneyi, ekimi yapılan hücrelerin hücre kültür plakasının yüzeyini tam olarak kapladığında yüzeyde bir açıklık oluşturmaya ve hücrelerin göçü sonucunda bu açıklığın kapanma oranını belirlemeye dayanan bir yöntemdir. Genistein (genisteinin IC₅₀ konsantrasyonu), irinotekan (irinotekanın IC₅₀ konsantrasyonu), Komb-1 (genisteinin IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı + irinotekanın IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı) ve Komb-2 (genisteinin IC₅₀ konsantrasyonu + irinotekanın IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı) tedavileri ile muamele edilen hücrelerin göç kapasitesi tedaviden sonraki 0., 12. ve 24. saatlerde mikroskop altında fotoğraflandı (Şekil 4.4-A). 12. saat sonunda yara açıklığının genistein (p<0,001), irinotekan (p<0,01), Komb-1 (p<0,001) ve Komb-2 (p<0,0001) tedavi gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde fazla olduğu, sadece irinotekan ile tedavi edilen gruba göre yara açıklığının Komb-1 grubunda farklı olmadığı (p>0,05, ns) ancak Komb-2 grubunda ise anlamlı şekilde daha geniş olduğu (p<0,05) görüldü (Şekil 4.4-B). 24. saatin sonunda ise yara açıklığının tedavi edilmeyen hücrelere göre genistein, irinotekan, Komb-1 ve Komb-2 tedavilerinde daha geniş olduğu (p<0,0001), bu genişliğin Komb-2 tedavisi uygulanan grupta irinotekan ile tedavi edilen gruba göre anlamlı ölçüde fazla olduğu gözlemlendi (p<0,05) (Şekil 4.4-C). Bu bulgular, kombinasyon tedavilerinin Caco-2 hücrelerinin göçünü engellediğini gösteren daha yavaş bir çizik yarası iyileşme sürecine neden olduğunu göstermektedir.



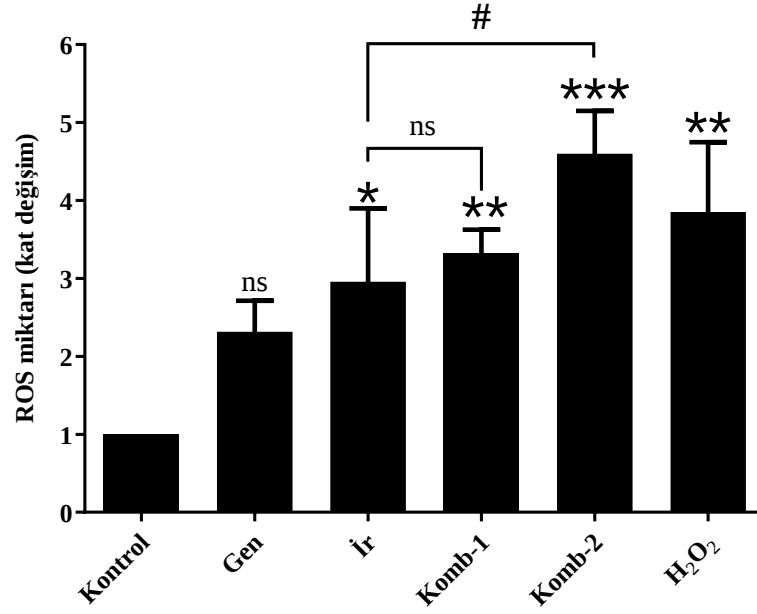
Şekil 4.4. Hücre migrasyonu bulguları. Genistein ve irinotekan ile mono- ve kombo- tedavi edilen Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin migrasyonu yara iyileşmesi (wound healing) analizi ile incelendi. Hücrelerin açıklığı kapatma oranı genistein, irinotekan ve genistein+irinotekan kombine tedavisinin ardından tedavilerin 0., 12. ve 24. saatlerinde mikroskop altında gözlemlendi. Açıklığın genişliği Image-J programı kullanılarak analiz edildi. Her grup kendi 0. saat görüntüsü ile normalize edildi. Bulgular herhangi bir tedavi uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslandı ve % yara açıklığı ortalama±standard sapma (SD) değeri olarak verildi. Komb-1: genisteinin IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı + irinotekanın IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı, Komb-2: genisteinin IC₅₀ konsantrasyonu + irinotekanın IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001; kontrolle kıyaslandığında. #p<0,05; ns:anlamalı değil; irinotekan ile tedavi edilen grupla kıyaslandığında

4.5. ROS Düzeylerinin Belirlenmesi

Oksidatif stres sırasında sürekli olarak serbest radikaller üretilir ve bunların hücresel ve enzimatik bütünlüğe son derece zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Genistein, vücudun ana antioksidan bileşenleri olarak bilinen geri dönüşüm enzimlerine önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, genistein prostat kanseri hücrelerinde (DU145) AMPK ve PTEN

yolları aracılığıyla antioksidan enzimlerin aktivasyonunu indüklemiştir. Genistein ayrıca manganez süperoksit dismutaz ve katalazın ekspresyonunu uyararak, reaktif oksijen türlerinin önemli ölçüde azalmasına neden olmuştur (Park vd., 2010). *İn vivo* olarak, genistein maruziyeti, glutatyon ve NAD(P)H dehidrogenaz ekspresyonunu artırarak non-enzimatik antioksidan etkisini yönetmiştir (Wiegand vd., 2009; Vanhees vd., 2013). Başka bir çalışmada, genisteinin kanserle ilişkili bir enzim olan ornitin dekarboksilaz üzerinde inhibisyon etkisine sahip olduğu ortaya koyulmuş ve fare modelinde ultraviyole ışıkla uyarılan deri karsinogenezini önemli ölçüde baskılamıştır (Mazumder ve Hongsprabhas, 2016). Yukarıda açıklandığı gibi, inflamatuvar mediatörler ile oksidatif stres arasında karmaşık bir etkileşim bulunmaktadır. Toplu olarak veya ayrı ayrı, her biri diğerinin üretimini artırır ve ikisi de kanser hastalarının durumunu kötüleştirir. Yukarıda tartışıldığı gibi, genisteinin inflamatuvar mediatörleri hafifletme potansiyeli olduğu gibi birçok antioksidan enzimin aktivitesini artırma yeteneği de vardır. Bu özellikleri, kanserle mücadelede kanser hastalarının yaşam kalitesini artırmak ve bu tür inflamasyondan kaynaklanan acıları hafifletmek için faydalı olabilir. Bununla birlikte, genisteinin kanser hastalarında terapötik potansiyelini araştırmak için daha fazla klinik çalışma yapılması gerekmektedir.

ROS'un çeşitli hücre ölümü mekanizmalarıyla bağlantılı olduğu bilindiğinden, apoptozun tetiklenmesinde genistein ve irinotekanın mono- ve kombo- tedavilerinin rolü de incelendi. Bu kapsamda 72 saat genistein, irinotekan, Komb-1 ve Komb-2 tedavileri uygulanan Caco-2 hücrelerinde ROS'un anlık üretimini ölçmek için DCFDA testi yapıldı. H₂O₂ ile tedavi edilen hücreler pozitif kontrol grubu olarak değerlendirildi. Kontrolle karşılaştırıldığında genistein ile tedavi edilen hücrelerde önemli bir artış olmazken, özellikle Komb-1 ve Komb-2 tedavilerinin sırasıyla 3,3 (p<0,01) ve 4,6 (p<0,001) kat ROS miktarında artışa neden olduğu görüldü (Şekil 4.5). Sadece irinotekan ile tedavi edilen grupla karşılaştırıldığında ise Komb-2 grubunda anlamlı oranda ROS miktarında artış olduğu belirlendi (p<0,05). Bu sonuçlar kombine tedavilerin *in vitro* kolon kanseri hücreleri üzerinde pro-oksidan etki gösterdiğini düşündürmektedir.

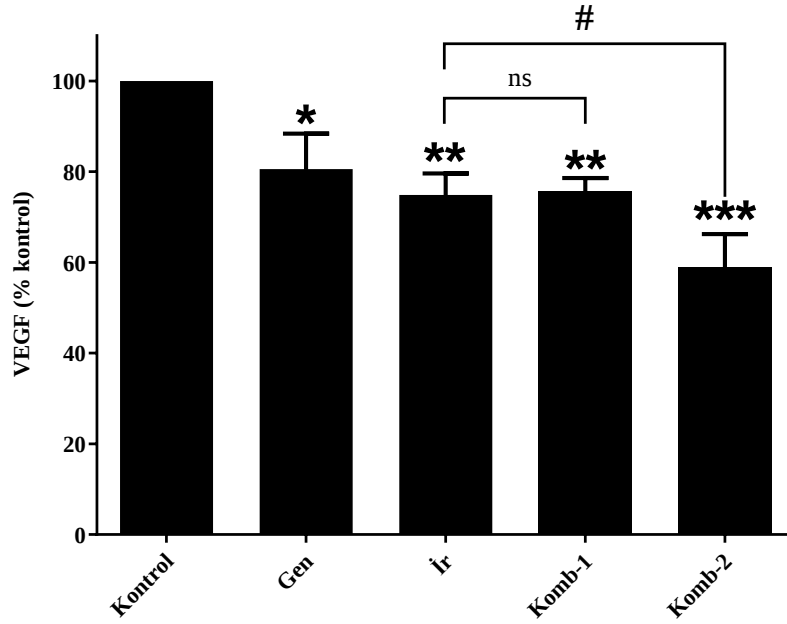


Şekil 4.5. Genistein ve irinotekan ile mono- ve kombo- tedavi edilen Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin ROS miktarının kantitatif analizi. Gen: genisteinin IC₅₀ konsantrasyonu, İr: irinotekanın IC₅₀ konsantrasyonu, Komb-1: genisteinin IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı + irinotekanın IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı, Komb-2: genisteinin IC₅₀ konsantrasyonu + irinotekanın IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı. H₂O₂ ile tedavi edilen hücreler pozitif kontrol grubu olarak değerlendirildi. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: anlamlı değil; kontrolle kıyaslandığında. #p<0,05; ns: anlamlı değil; irinotekan ile tedavi edilen grupla kıyaslandığında

4.6. Anti-anjiyogenez Bulguları

Yeni kan damarı oluşumundan sorumlu olan temel bir fizyolojik süreç olan anjiyogenez, embriyonik gelişim, yumurtlama, yara iyileşmesi ve karsinogenez süreçlerinde hayati öneme sahiptir. Anjiyogenezi düzenlemenin iki temel yöntemi vardır: Doğrudan ve dolaylı yollar. Doğrudan yol, vasküler endotel hücrelerinin çoğalma, göç etme ve VEGF gibi anjiyojenik faktörlere yanıt verme yeteneğini düzenlemeyi içerir. Dolaylı yol, anjiyogenezi indükleyen anjiyojenik faktörlerin ifadesini ve aktivitesini etkileme kapasitesine dayanır (Al-Zabin vd., 2024). Anjiyogenez, kanser hücrelerinin oksijen ve besin gibi hayati faktörlerle büyümesini desteklediği için, damarlanmanın inhibisyonu kanser tedavisi için kilit bir strateji olabilir. Önceki çalışmalar, genisteinin güçlü anti-anjiyogenik özellikler sergilediğini göstermiştir. Genistein ile tedavi edilen E6 ve beş insan mesane kanseri hücre hattı, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü, ürokinaz plazmijen aktivatörü, matris metaloproteinaz-2 (MMP-2) ve MMP-9 ekspresyonunu düşürerek anti-anjiyogenik etki göstermiştir. Ayrıca,

plazmijen aktivator inhibitörü-1, endostatin, anjiostatin ve trombospondin-1 gibi doğal damarlanma inhibitörlerinin aktive olduğu bulunmuştur (Su vd., 2005). Başka bir çalışmada, genistein aracılığıyla VEGF'in baskılanmasının, c-Jun N-terminal kinaz ve p38, PTK/MAPK ve MMP'lerin üretiminin düşürülmesi yoluyla gerçekleştiği bildirilmiştir (Yu vd., 2012). Genistein tedavisiyle oral skuamöz hücre karsinom hücrelerinde VEGF, temel fibroblast büyüme faktörü ve MMP-2'nin düşük düzeyde olduğu gösterilmiştir (Myoung vd., 2003). Ayrıca, HSC-3 hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* invazyon testi ve jelatin zimografisi, VEGF ekspresyonunda azalma olduğunu göstermiştir. Daha yakın zamanlarda, tiroid kanseri hücreleri kullanılarak, bir grup araştırmacı VEGF-A ekspresyonunun yanı sıra insan telomeraz ters transkriptazı, PTEN, NF- κ B ve p21'in düşük düzeyde olduğunu ortaya koymuştur (Ozturk vd., 2018). Bu sonuçlar, VEGF hedeflemenin, downstream moleküler yollarının aktivasyonunun ardışık ve zararlı etkilerini önlemek için etkili bir anahtar faktörü temsil edebileceğini göstermektedir.

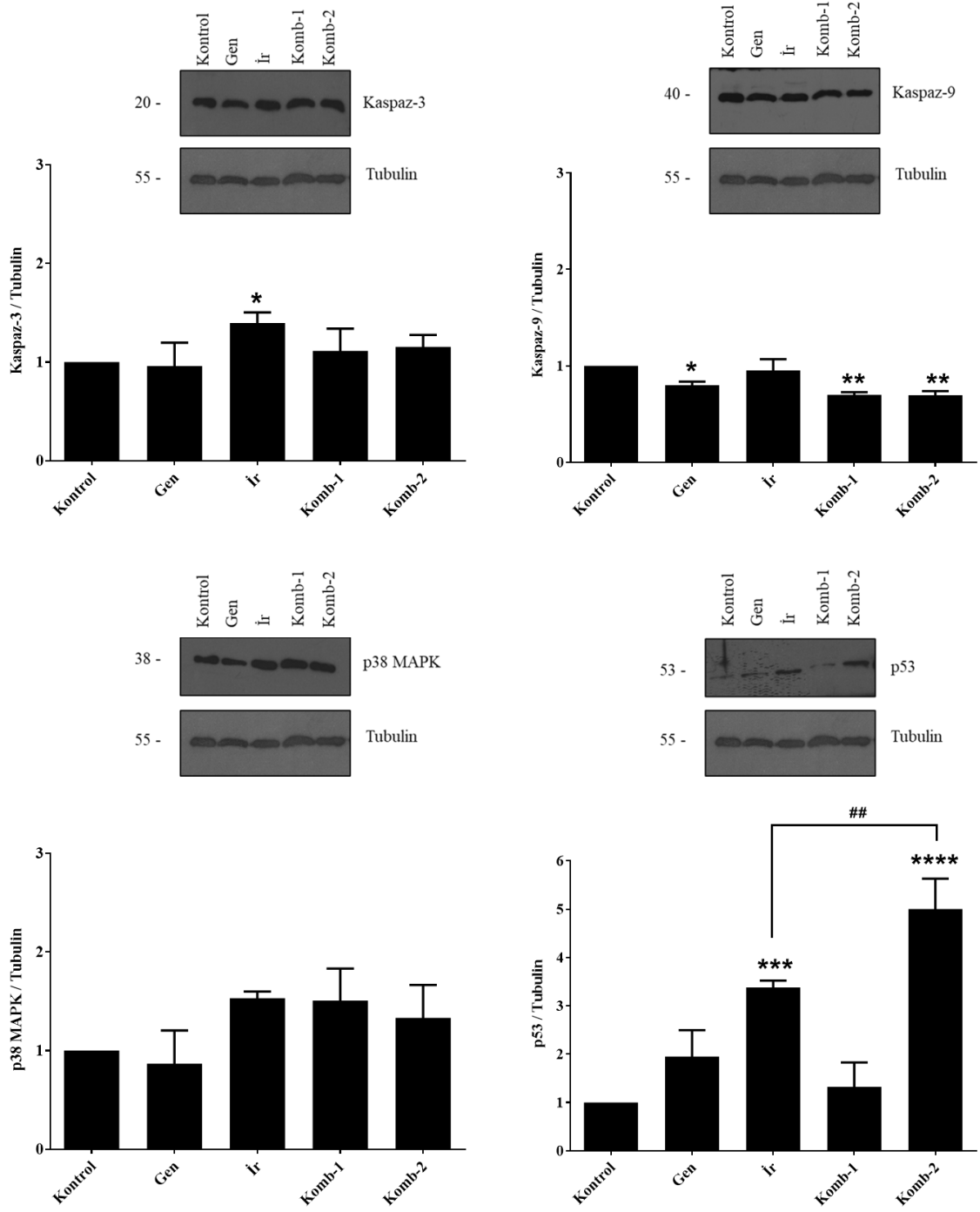


Şekil 4.6. Anti-anjiyogenik etkinin kolorimetrik analizi. Genistein ve irinotekan ile mono- ve kombo-tedavi edilen Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin VEGF miktarlarındaki değişim. Gen: genisteinin IC₅₀ konsantrasyonu, Ir: irinotekanın IC₅₀ konsantrasyonu, Komb-1: genisteinin IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı + irinotekanın IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı, Komb-2: genisteinin IC₅₀ konsantrasyonu + irinotekanın IC₅₀ konsantrasyonunun yarısı. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; kontrolle kıyaslandığında. #p<0,05; ns: anlamlı değil; irinotekan ile tedavi edilen grupla kıyaslandığında

VEGF'yi spesifik inhibitörler ile bloke ederek, kanser hücrelerinin yeni oluşumlarla kan damarları oluşturmalarına yardımcı olan moleküler yollar baskılanabilir. Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde genistein ($p<0,05$), irinotekan ($p<0,01$), Komb-1 ($p<0,01$) ve Komb-2 ($p<0,001$) tedavilerinin kontrol grubuna kıyasla VEGF miktarında anlamlı azalmaya neden olduğu görüldü (Şekil 4.6). Ayrıca irinotekan ile tedavi edilen hücrelere göre Komb-2 tedavisinin VEGF miktarını önemli ölçüde azalttığı da belirlendi ($p<0,05$).

4.7. Protein İfade Düzeyleri

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü olarak bilinir ve genellikle hücre morfolojisinde belirgin değişikliklerle karakterizedir; bunlar arasında kabarcıklaşma, hücre bağlanma kaybı, sitoplazmanın büzülmesi, DNA parçalanması ve diğer biyokimyasal değişiklikler bulunur. Bu değişiklikler arasında, ekstrasik ve/veya intrinsik mitokondriyal yollar aracılığıyla kaspazların aktivasyonu da yer alır (Elmore, 2007). Genisteinin, HeLa hücrelerinde apoptozu kaspaz-9 ve/veya kaspaz-3 aktivitelerini artırarak indüklediği belirtilmiştir (Dhandayuthapani vd., 2013). Ayrıca, genisteinin LoVo ve HT-29 kolon kanseri hücre hatlarında apoptotik hücre ölümünü NF- κ B yolakını inhibe ederek ve antiapoptotik protein Bcl-2 ile proapoptotik protein Bax seviyelerini düzenleyerek tetiklediği gösterilmiştir (Luo vd., 2014). Genistein ayrıca HT-29 kolon kanseri hücrelerinde kaspaz-3 ve p38 MAPK sinyal yollarını düzenleyerek apoptozu teşvik etmiştir (Shafiee vd., 2016). Western blot analizleriyle, genistein ve irinotekan mono- ve kombo- tedavilerinin Caco-2 hücrelerindeki kaspaz-3, kaspaz-9, p38 MAPK ve p53 protein ekspresyon düzeyleri kontrol hücreleriyle karşılaştırıldı. Uygulanan bireysel ve kombine tedavilerin apoptotik proteinler üzerindeki etkisi Western blot analizi ile test edildi. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde genistein (Gen-IC₅₀), irinotekan (İr-IC₅₀), Komb-1 (genistein IC₅₀/2+irinotekan IC₅₀/2) ve Komb-2 (genistein IC₅₀+irinotekan IC₅₀/2) tedavileri ile sırasıyla; kaspaz-3 seviyesinin kontrole göre yaklaşık 0,96; 1,40 ($p<0,05$); 1,11 ve 1,15 kat değişim görülürken, kaspaz-9 seviyesinin kontrole göre anlamlı bir artış görülmedi. p38 MAPK seviyesinin kontrol göre yine bu tedavilerle sırasıyla 0,87; 1,53; 1,50 ve 1,33 katlık değişim gözlemlenirken, p53 seviyesinin kontrole göre yine sırasıyla yaklaşık 1,95; 3,38 ($p<0,001$); 1,32 ve 5,00 ($p<0,0001$) kat arttığı, p53 seviyesindeki artışın da irinotekan tedavisi uygulanan gruba göre Komb-2 tedavisiyle anlamlı şekilde arttığı ($p<0,01$) ortaya konuldu.



Şekil 4.7. Genistein ve irinotekan mono- ve kombo- tedavilerinin Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde apoptotik proteinlerin ifade düzeylerine olan etkisi. Western blot analizleriyle genistein (IC₅₀), irinotekan (IC₅₀), Komb-1 (genistein IC₅₀/2 + irinotekan IC₅₀/2) ve Komb-2 (genistein IC₅₀ + irinotekan IC₅₀/2) ile tedavi edilen Caco-2 hücrelerindeki kaspaz-3, kaspaz-9, p38 MAPK ve p53 ekspresyon düzeyleri tedavi uygulanmayan kontrol grubu hücreleriyle karşılaştırıldı. 72 saatlik tedavinin ardından tripsinize edilip toplanan hücrelerin total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bradford analizi ile konsantrasyonu belirlenen eşit miktarda protein örnekleri SDS-PAGE jelde koşturulup PVDF membrana transfer edildikten sonra ilgili primer ve sekonder antikorlarla inkübe edildi ve son olarak enzimatik HRP aktivitesi x-ray filmine aktarılarak protein ekspresyon profilleri karşılaştırıldı. Taranan bantların analizi Image J programı kullanılarak gerçekleştirildi. Bulguların istatistikî değerlendirilmesi yapıldı ve sonuçlar ortalama±standard sapma (SD) olarak verildi. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001; kontrolle kıyaslandığında. ##p<0,01; irinotekan ile tedavi edilen grupla kıyaslandığında.

Genistein aracılığıyla ER stresinin indüksiyonu yoluyla apoptozun insan serviks kanseri hücrelerinde indüksiyonunun, glikoz regüle protein 78 (GRP78) ve CCAAT/enhancer-bağlanma protein homologu protein ifadesini arttırarak gerçekleştiği ortaya koyulmuştur (Yang vd., 2016). Hepa1-6 hepatoselüler karsinom hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, genisteinin konsantrasyona bağımlı apoptotik etkisi doğrulanmıştır (Sanaei vd., 2018). Sitokrom c'nin salınımı ve apoptotik proteaz aktivatör faktör-1'in mitokondriden salınımı, apoptozun indüksiyonunda önemli faktörlerdir. Olası mekanizmalardan biri, genisteinin sitozolik Bax ve Bid'i kesen, dolayısıyla apoptoz indüklemeye faktörünü kısaltan ve sitokrom c'nin salınımına neden olan Ca^{2+} -bağımlı enzim olan kalspainin aktivitesini arttırmasıdır (Das vd., 2010). Diğer olası mekanizma ise genisteinin ER stresi ile ilişkili proteinlerin, örneğin inositol-requiring enzim 1 α , kalspain 1, 78 kDa GRP78, büyüme duruşu ve DNA hasarı-indükleyici gen 153, kaspaz-7 ve kaspaz-4'ün ifadesini arttırmasıdır. Tam form GRP78'unun yukarı regülasyonu ER stresi ile ilişkilidir (Hsiao vd., 2019). Son olarak, protein kinaz R benzeri ER kinazının aktivitesini arttıran bu ifadenin indüksiyonu, sırasıyla, apoptozu indüklemek için CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein transkripsiyon faktörünü aktive eder (Xia vd., 2019). Ayrıca, genisteinin p53'ün fosforilasyonunu ve aktivasyonunu arttırdığı, aynı zamanda Bcl-2/Bax ve Bcl-xL/Bax oranını azalttığı ve fosforile Akt (aynı zamanda protein kinaz B olarak da bilinir) seviyesini düşürdüğü ve bu da hücrelerin apoptoza girmesine neden olduğu öne sürülmüştür (Ouyang vd., 2009). Genisteinin apoptozu tetikleme yeteneği için başka bir olası mekanizma, ataksi-telanjiectazi mutasyonlu (ATM) protein ailesinin fosforilasyonunu ve ATM ile ilişkili (ATR) ve Chk1-Chk2 kontrol nokta kinazlarının aktivasyonunu indükleyebilme yeteneğinden kaynaklanmaktadır (Ouyang vd., 2009). Bu durumda, Chk1 ve Chk2'nin fosforilasyonu, fosfataz Cdc25C ve Cdc25A'nın inaktivasyonuna ve ardından Cdc2'nin inaktivasyonuna yol açar, bu da hücrenin G2/M fazında durmasına ve apoptozun gerçekleşmesine neden olur (Ouyang vd., 2009).

Aynı zamanda genisteinin, nitrik oksit (NO) üretimini arttırarak oksidatif stres tarafından indüklenen apoptozu tetiklediği ve nöronal nitrik oksit sentazlarının aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Miao vd., 2018). Genistein, aerobik glikoliz inhibitörü olarak hipoksi indükleyici faktör-1 α 'nın (HIF-1 α) indirgenmesi aracılığıyla glukoz taşıyıcı 1'in veya/ve heksokinaz 2'nin inaktivasyonu yoluyla apoptozu tetikler (Li vd., 2017).

Genisteinin PPAR γ yolları aracılığıyla apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Horia ve Watkins, 2007). Bu yolak PPAR γ , Bcl-2, fosfataz ve tensin homologu (PTEN), p21Waf11/Cip1, survivin ve siklin B1'i içermektedir. Genisteinin, dokosaheksaenoik asit, eikosapentanoik asit ve araşidonik asit olmak üzere üç çoklu doymamış yağ asidi ile kombinasyon halinde verilmesinin, MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde PPAR γ ifadesini artırdığı ve inflamatuvar moleküller siklooksijenaz-2 (COX-2) ve prostaglandin E2 (PGE2) ifadesini azalttığı, böylece meme kanseri hücrelerindeki invazifliği tersine çevirdiği bildirilmiştir (Horia ve Watkins, 2007). Bununla birlikte, genistein, resveratrol ile kombinasyon halinde kullanıldığında, yağ hücrelerine özgü proteinlerin, CCAAT/enhancer bağlayıcı protein- α ve PPAR γ 'nin ifadesini azalttığı ve böylece 3T3-L1 hücrelerinde adipogenezin inhibe edildiği, 3T3-L1 adipositlerinde apoptozun indüklendiği ve lipolizin teşvik edildiği ortaya koyulmuştur (Rayalam vd., 2007). *İn vitro* ve *in vivo* bulgular, genisteinin farklı kanser tiplerinde apoptozu indüklemadaki umut verici rolünü göstermektedir. Bununla birlikte, genisteinin terapötik bir ajan olarak etkinliğini maksimize etmek için kesin hücresel hedefi belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Kolon kanseri, ileri bir aşamada ölümcül bir tümördür ve yüksek derecede invazivlik ve metastaz potansiyeline sahiptir (Brody, 2015). Birçok *in vitro* araştırma, genisteinin kolon kanserine karşı antikanser özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Genistein, kolon kanseri hücre büyümesini PI3K/Akt yollarını inhibe ederek etkin bir şekilde engellediği belirtilmiştir (Meng, vd., 1999; Yu vd., 2000). Genisteinin ayrıca kolon kanser hücrelerinde ER'ların ekspresyonunu ve tümör baskılayıcı genleri etkilediği rapor edilmiştir (Somjen vd., 2002; Matsumoto vd., 2005). İnsan SW480 kolon kanser hücre hattında, genisteinin, histon asetilasyonunu teşvik ederek Wnt sinyal yolağı antagonisti olan Dickkopf-benzeri protein 1 (DKK1) geninin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Shimoda vd., 2008). Bir çalışmada *Fructus sophorae*'den izole edilen genisteinin, radyasyon kaynaklı bağırsak hasarının tedavisinde biyoaktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. C57/BL farelerine genistein tedavileriyle 7.5 Gy tam vücut radyasyonu uygulanmıştır. Radyasyondan sonra, doku incelemesi genistein ile tedavi edilen gruplarda bağırsağın önemli ölçüde yapısal ve işlevsel iyileşmesini ortaya koymuştur. IEC6 hücrelerinin FSGen tarafından Rassfla ve Ercc-1 genlerinin protein ifadesi, mRNA

ifadesi ve küçük müdahale RNA analizi ile DNA radyasyon hasarını başarılı bir şekilde zayıflatmasıyla radyasyon hasarından korunduğunu göstermiştir (Zhang vd., 2021). Genistein ile tedavi edilen tümör nakledilmiş çıplak farelerde, tümör gelişimi azalmıştır ve bu durum, KDR proteinleri, MCL1, APP ve mRNA'ların doza bağlı olarak aşağı regülasyonları ile takip edilmiştir (Zhang vd., 2020).

Kitosan ile kapsüllenmiş genisteinin (CHIE_n/Gen), insan HT-29 kolon kanseri hücrelerinin büyüme ve bölünmesini önemli ölçüde baskıladığı, ayrıca apoptotik hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (Rahmani vd., 2020). Genisteinin HCT116 kolon kanseri hücre hattında hücre büyümesini baskımlarken, Akt, SGK1 ve miR-95 mRNA seviyelerini azaltıp Akt fosforilasyonunu engelleyerek hücreleri apoptoza yönlendirdiği rapor edilmiştir (Qin vd., 2015).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmalardan elde edilen bulgular, genistein ile birlikte tedavinin, daha yüksek dozların eşdeğer etkisi için gereken irinotekan konsantrasyonlarının etkili bir şekilde azaldığını göstermektedir. Genisteinin düşük toksisitesi, onu kanser kemoterapisi ve kanserin önlenmesi için umut verici bir aday yapmaktadır. Bulgularımız, genisteinin irinotekan ile kombine halde kullanımının mekanistik rolünün tam olarak aydınlatılmasının ve fonksiyonel işlevinin *in vivo* çalışmalarla kanıtlanmasının umut verici bir klinik kemoterapi yaklaşımı olarak göz önünde bulundurulabileceğini göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kanser tedavisinde temel yöntemler olan kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve cerrahi yaklaşımlar, çeşitli tümörleri tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmakta ve bazılarında sonuç elde edilebilmektedir. Ancak, kemoterapi ilaçlarının toksik yan etkileri ve bu ilaçlara karşı direnç gelişimi, radyoterapinin neden olduğu radyoaktif hasar ve immünoterapinin zayıf etkinliği gibi sorunlar hala mevcuttur ve bu yaklaşımlar kanser tedavisinin terapötik etkilerini sınırlayarak hastanın yaşam kalitesini düşürebilmektedir. Bu nedenle, bu sorunları hafifletmek için yeni arayışlara olan ilgi her geçen gün artmaktadır.

Kötü huylu tümörün oluşumu ve gelişimi çok adımlı, çok faktörlü bir birikim sürecidir ve vaka sayısı ile ölüm oranı her geçen yıl artmaktadır. Bu nedenle, kanser tedavisi şu ana kadar hala büyük bir zorluk olmaya devam etmektedir. Şu anda, kemoterapi ile desteklenen cerrahi, ana tedavi yöntemidir. Ancak kemoterapinin yetersiz etkinlik, ilaç direnci, metastaz ve istenmeyen yan etkiler vb. gibi birçok dezavantajı vardır. Geleneksel tekli kemoterapötik tedaviyle karşılaştırıldığında, fitokimyasallara ve kemoterapötik ilaçlara dayalı kombinasyon tedavisi, sinerjik antitümör etkisi yoluyla en iyi terapötik etkiyi sağlayabilir. Son birkaç on yılda, kombine kanser tedavisi hızla ilerleme kaydetmiştir. Küçük molekülü kemoterapötik ilaçların ve doğal bileşiklerin maksimum kombinasyon avantajlarını gerçekleştirmek için birçok çalışma yapılmaktadır. Ek olarak, fitokimyasallar ve kemoterapötik ajanların kombinasyonuna dayalı sinerjik olarak sunulan tedaviler genellikle tümör dokularını hedefleme, biyoyararlanımı arttırma, yan etkileri azaltma ve ilaç etkinliğini arttırma gibi birden fazla işleve sahiptir.

Tümör moleküler mekanizmasının anlaşılmasının derinleşmesi ve çok işlevli ilaçlarının geliştirilmesiyle, fitokimyasal ilaçlar ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonu, anti-tümör tedavisi için yeni bir fırsat sunmaktadır. Bu çalışma sonucunda elde ettiğimiz bulgular, genisteinin mono- ve irinotekan ile kombo- tedavisinin Caco-2 insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve koloni sağ-kalımını inhibe ettiğini, ayrıca hücre göçü ve

anjiyogenez üzerinde etkili bir ajan olma potansiyeli taşıdığını gösteren *in vitro* kanıtlar sunmaktadır. Aynı zamanda özellikle genistein + irinotekan kombine tedavisinin hücre döngüsü, DNA hasar yanıtı/tamiri ve apoptozis ile ilgili proteinlerin ifadelerinin regüle edilmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Genisteinin irinotekan ile kombine kullanımının etki mekanizmasının açıklığa kavuşturulması, söz konusu ajanlarla gerçekleştirilecek olan kolon kanseri tedavilerinden daha fazla hastanın yararlanmasını amaçlayan tedavi stratejilerinin ve ürünlerinin geliştirilmesi noktasında klinik öncesi literatüre katkı sağlayacak, kanser tedavisinde fitokimyasal polifenolik bileşiklerin kullanımı ile ilgili gelecekte yapılacak daha kapsamlı araştırmalar için de öncül veriler sunacaktır. Genistein ve irinotekan arasındaki sinerjizmin ileri dönem *in vivo* çalışmalarla doğrulanması, genisteinin klinik ve klinik öncesi kullanımda önemli bir fitokimyasal olarak göz önünde bulundurulmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., and Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5592–5595.

Al-Zabin, A., Abu Thiab, T., Zihlif, M., Al-Hunaiti, A., Al-Ameer, H. J., Al-Awaida, W., and Imraish, A. (2024). Anti angiogenic and cytotoxic evaluation of green synthesized Fe₂ ZnO₄ nanoparticles against MCF 7 cell line. *Biomedical Reports*, 20(3), 1-9.

Aran, V., Victorino, A. P., Thuler, L. C., and Ferreira, C. G. (2016). Colorectal cancer: epidemiology, disease mechanisms and interventions to reduce onset and mortality. *Clinical Colorectal Cancer*, 15(3), 195–203.

Bailly, C. (2019). Irinotecan: 25 Years of Cancer Treatment. *Pharmacol. Res.* 148, 104398.

Banales, J. M., Marin, J. J. G., Lamarca, A., Rodrigues, P. M., Khan, S. A., Roberts, L. R., Cardinale, V., Carpino, G., Andersen, J. B., and Braconi, C. (2020). Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 17(9), 557–588.

Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154–165.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254

Brody, H. (2015). Colorectal cancer. *Nature*, (521), S1.

Büyüktuncer, Z., and Başaran, A. A. (2005). Fitoöstrojenler ve sağlıklı yaşamdaki önemleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 2, 79–94.

Chen, X., Wu, Y., Gu, J., Liang, P., Shen, M., Xi, J. and Qin, J. (2020). Anti-invasive effect and pharmacological mechanism of genistein against colorectal cancer. *Biofactors*. 46(4), 620-628.

Cui, S., Wang, J., Wu, Q., Qian, J., Yang, C., and Bo, P. (2017). Genistein inhibits the growth and regulates the migration and invasion abilities of melanoma cells via the FAK/paxillin and MAPK pathways. *Oncotarget* 8, 21674–21691.

Das, A., Banik, N. L., and Ray, S. K. (2010). Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but not in human normal astrocytes. *Cancer* 116, 164–176.

Dhandayuthapani, S., Marimuthu, P., Hormann, V., Kumi-Diaka, J., and Rathinavelu, A. (2013). Induction of apoptosis in HeLa cells via caspase activation by resveratrol and genistein. *J. Med. Food* 16, 139–146.

Dixon, R. A., and Ferreira, D. (2002). Genistein. *Phytochemistry*, 60(3), 205–211.

Donar, G. B. (2021). Türkiye’de Kanser İnsidansı ve Farkındalık Etkinlikleri ile Google Çevrimiçi Arama Hacmi Arasındaki İlişki: Retrospektif Bir Araştırma. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 12(2), 353–360.

Ellis, H., and Mahadevan, V. (2014). Anatomy of the caecum, appendix and colon. *Surgery (Oxford)*, 32(4), 155–158.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.

Erdogan, M. K., Sever, A., Gundogdu, R., Toy, Y., Gecibesler, I. H., Yapar, Y., Behcet, L., and Zengin, G. (2024). *Verbascum gimgimense* an Endemic Turkish Plant: Evaluation of In Vitro Anticancer, Antioxidant, Enzyme Inhibitory Activities, and Phytochemical Profile. *Cell Biochemistry and Function*, 42(8), e70023.

Fortune, J. M., and Osheroff, N. (2000). Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice.

Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., and van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319.

Fuchs, C., Mitchell, E. P., and Hoff, P. M. (2006). Irinotecan in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Treat Rev.* 32(7), 491-503.

Fujita, K., Kubota, Y., Ishida, H., and Sasaki, Y. (2015). Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 21(43), 12234-48

Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., Wooster, R., and Stratton, M. R. (2001). Cancer and genomics. *Nature*, 409(6822), 850-852.

Guyton, A. C., Hall, J. E. (2013). *Tıbbi Fizyoloji*. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 937-942.

Hamalainen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., and Moilanen, E. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflammation*, 45673.

Horia, E., and Watkins, B. A. (2007). Complementary actions of docosahexaenoic acid and genistein on COX-2, PGE2 and invasiveness in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 28, 809–815.

Hsiao, Y. C., Peng, S. F., Lai, K. C., Liao, C. L., Huang, Y. P., and Lin, C. C. (2019). Genistein induces apoptosis in vitro and has antitumor activity against human leukemia HL-60 cancer cell xenograft growth in vivo. *Environ. Toxicol.* 34, 443–456.

Hwang, J. T., Lee, Y. K., Shin, J. I., and Park, O. J. (2009). Anti-inflammatory and anticarcinogenic effect of genistein alone or in combination with capsaicin in TPA-treated rat mammary glands or mammary cancer cell line. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1171, 415–420.

Ismail, I. A., Kang, K. S., Kim, J. W., and Sohn, Y. K. (2006). Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in rat neuroblastoma B35 cells; involvement of p21waf1/cip1, Bax and Bcl-2. *Korea J. Pathol.* 40, 39–347.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., and Thun, M. J. (2008). Cancer statistics, 2008. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 58(2), 71–96.

Ji, G., Zhang, Y., Yang, Q., Cheng, S., Hao, J., and Zhao, X. (2012). Genistein suppresses LPS-induced inflammatory response through inhibiting NF-kappaB following AMP kinase activation in RAW 264.7 macrophages. *PloS One* 7, e53101.

Jonkman, J. E. N., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., and Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell adhesion and migration*, 8(5), 440–451

Kang, S., Kim, B. R., Kang, M. H., Kim, D. Y., Lee, D. H., and Oh, S. C. (2018). Anti-metastatic effect of metformin via repression of interleukin 6-induced epithelial-mesenchymal transition in human colon cancer cells. *PloS One* 13, e0205449.

Kciuk, M., Marciniak, B., and Kontek, R. (2020). Irinotecan-Still an Important Player in Cancer Chemotherapy: A Comprehensive Overview. *Int J Mol Sci.* 21(14), 4919.

Khalef, L., Lydia, R., Filicia, K., and Moussa, B. (2024). Cell viability and cytotoxicity assays: Biochemical elements and cellular compartments. *Cell Biochemistry and Function*, 42(3), e4007.

Lewandowska, U., Gorlach, S., Owczarek, K., Hrabec, E., and Szewczyk, K. (2014). Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 68(4468), 528–540.

Li, S., Li, J., Dai, W., Zhang, Q., Feng, J., and Wu, L. (2017). Genistein suppresses aerobic glycolysis and induces hepatocellular carcinoma cell death. *Br. J. Cancer* 117, 1518–1528.

Li, Z., Li, J., Mo, B., Hu, C., Liu, H., and Qi, H. (2008). Genistein induces G2/M cell cycle arrest via stable activation of ERK1/2 pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Biol. Toxicol.* 24, 401–409.

Lin, H. M., Moon, B. K., Yu, F., Kim, and H. R. C. (2000). Galectin-3 mediates genistein-induced G2/M arrest and inhibits apoptosis. *Carcinogenesis* 21, 1941–1945.

Liu, H., and Yu, G. Y. (2004). Antimetastatic effects of genistein on salivary adenoid cystic carcinoma in vivo. *Zhonghua Kou Qiang yi Xue za Zhi= Zhonghua Kouqiang Yixue zazhi= Chinese Journal of Stomatology*, 39(5), 373-375.

Luo, Y., Wang, S. X., Zhou, Z. Q., Wang, Z., Zhang, Y. G., and Zhang, Y. (2014). Apoptotic effect of genistein on human colon cancer cells via inhibiting the nuclear factor-kappa B (NF-κB) pathway. *Tumor Biol.* 35, 11483–11488.

Mathijssen, R. H., van Alphen, R. J., Verweij, J., Loos, W. J., Nooter, K., Stoter, G. and Sparreboom, A. (2001). Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res.* 7(8):2182-94.

Matsukawa, Y., Marui, N., Sakai, T., Satomi, Y., Yoshida, M., and Matsumoto, K. (1993). Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res.* 53, 1328–1331.

Matsumoto, T., Kobayashi, T., Kikuchi, T., Honda, T. and Kamata, K. (2005). Effects of dual-action genistein derivatives on relaxation in rat aorta. *Journal of Smooth Muscle Research*, (41), 23–33.

Mazumder, M. A. R., and Hongsprabhas, P. (2016). Genistein as antioxidant and antibrowning agents in in vivo and in vitro: a review. *Biomed. Pharmacother.* 82, 379–392.

Meng, Q. H., Wähälä, K., Adlercreutz, H., and Tikkanen, M. J. (1999). Antiproliferative efficacy of lipophilic soy isoflavone phytoestrogens delivered by low density lipoprotein particles into cultured U937 cells. *Life Sci.* 65(16), 1695–705.

Miao, Z. Y., Xia, X., Che, L., and Song, Y. T. (2018). Genistein attenuates brain damage induced by transient cerebral ischemia through up-regulation of Nrf2 expression in ovariectomized rats. *Neurol. Res.* 40, 689–695.

Miekus, K., and Madeja, Z. (2007). Genistein inhibits the contact-stimulated migration of prostate cancer cells. *Cell Mol. Biol. Lett.* 12, 348–361.

Miller, B. A., Chu, K. C., Hankey, B. F., and Ries, L. A. G. (2008). Cancer incidence and mortality patterns among specific Asian and Pacific Islander populations in the US: Erratum, *Cancer Causes and Control*, 19, 227–256.

Myoung, H., Hong, S. P., Yun, P. Y., Lee, J. H., and Kim, M. J. (2003). Anti-cancer effect of genistein in oral squamous cell carcinoma with respect to angiogenesis and in vitro invasion. *Cancer Sci.* 94, 215–220.

Nirmala, J. G., and Lopus, M. (2020). Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biology and Toxicology*, 36, 145–164.

Noori-Dalooi, M. (2012). Study of antimetastatic effect of genistein through inhibition of expression of matrix metalloproteinase in A-549 cell line. *J. Sci. Islam. Repub. Iran* 23, 115–122.

O'Brien, M. A., and Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(6), 572–585.

Orhan, C. (2011). Bildircinlarda genistein ve çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) performans ve antioksidan düzeyi üzerine etkisi/The effect of genistein and polyunsaturated fatty acids (PUFA) on performance and antioxidant status in quail.

Otto, T., and Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93–115.

Ouyang, G., Yao, L., Ruan, K., Song, G., Mao, Y., and Bao, S. (2009). Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of human ovarian cancer cells via activation of DNA damage checkpoint pathways. *Cell Biol. Int.* 33, 1237–1244.

Ozturk, S., Alp, E., Yar Saglam, A., Konac, E., and Menevse, E. (2018). The effects of thymoquinone and genistein treatment on telomerase activity, apoptosis, angiogenesis, and survival in thyroid cancer cell lines. *J. Cancer Res. Ther.* 14, 328–334.

Pal, D., and Nayak, A. K. (2010). Nanotechnology for targeted delivery in cancer therapeutics. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 1(1), 1–7.

Park, C. E., Yun, H., Lee, E. B., Min, B. I., Bae, H., and Choe, W. (2010). The antioxidant effects of genistein are associated with AMP-activated protein kinase activation and PTEN induction in prostate cancer cells. *J. Med. Food* 13, 815–820.

Pavese, J. M., Farmer, R. L., and Bergan, R. C. (2010). Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29, 465–482.

Qin J, Chen JX, Zhu Z, and Teng JA. (2015). Genistein inhibits human colorectal cancer growth and suppresses miR-95, Akt and SGK1. *Cell Physiol Biochem.* 35(5), 2069-2077.

Rahmani, F., Karimi, E., and Oskoueian, E. (2020). Synthesis and characterisation of chitosan-encapsulated genistein: its anti-proliferative and anti-angiogenic activities. *J Microencapsul.* 37(4), 305-313.

Rayalam, S., Della-Fera, M. A., Yang, J. Y., Park, H. J., Ambati, S., and Baile, C. A. (2007). Resveratrol potentiates genistein's antiadipogenic and proapoptotic effects in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.* 137, 2668–2673.

Sanaei, M., Kavooosi, F., Valiani, A., and Ghobadifar, M. A. (2018). Effect of genistein on apoptosis and proliferation of hepatocellular carcinoma Hepa1-6 cell line. *Int. J. Prev. Med.* 9, 12.

Sendoel, A., and Hengartner, M. O. (2014). Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology*, 29(3), 168–176.

Shafiee, G., Saidijam, M., Tavalani, H., Ghasemkhani, N., and Khodadadi, I. (2016). Genistein induces apoptosis and inhibits proliferation of HT29 colon cancer cells. *Int. J. Mol. Cell Med.* 5, 178–191.

Shimoda, K., Kobayashi, T., Akagi, M., Hamada, H. and Hamada, H. (2008). Synthesis of oligosaccharides of genistein and quercetin as potential anti-inflammatory agents. *Chemistry Letters.* (37), 876-877.

Somjen D, Amir-Zaltsman Y, Gayer B, Kulik T, Knoll E, Stern N, Lu LJ, Toldo L, and Kohen F. (2002). 6-Carboxymethyl genistein: a novel selective oestrogen receptor

modulator (SERM) with unique, differential effects on the vasculature, bone and uterus. *J Endocrinol.* 73(3), 415-27.

Song S., Cheng D., and Wei S. (2018). Preventive effect of genistein on AOM/DSS-induced colonic neoplasm by modulating the PI3K/AKT/FOXO3 signaling pathway in mice fed a high-fat diet. *Journal of Functional Foods.* (46), 237–242.

Su, S. J., Yeh, T. M., Chuang, W. J., Ho, C. L., Chang, K. L., and Cheng, H. L. (2005). The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 69, 307–318.

Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 1(2), 1.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.

Sutrisno, S., Aprina, H., Simanungkalit, H. M., Andriyani, A., Barlianto, W., and Sujuti, H. (2018). Genistein modulates the estrogen receptor and suppresses angiogenesis and inflammation in the murine model of peritoneal endometriosis. *J. Tradit. Complement Med.* 8, 278–281.

Taylor, C. K., Levy, R. M., Elliott, J. C., and Burnett, B. P. (2009). The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies. *Nutrition Reviews*, 67(7), 398–415.

Tuli, H. S., Tuorkey, M. J., Thakral, F., Sak, K., Kumar, M., Sharma, A. K., Sharma, U., Jain, A., Aggarwal, V., and Bishayee, A. (2019) Molecular Mechanisms of Action of Genistein in Cancer: Recent Advances. *Front. Pharmacol.* 10:1336.

Vanhees, K., Van Schooten, F. J., Van Waalwijk Van Doorn-Khosrovani, S. B., Van Helden, S., Munnia, A., and Peluso, M. (2013). Intrauterine exposure to flavonoids modifies antioxidant status at adulthood and decreases oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 57, 154–161.

Wenzel, E. S., and Singh, A. T. K. (2018). Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. *In Vivo*, 32(1), 1–5.

Wiegand, H., Wagner, A. E., Boesch-Saadatmandi, C., Kruse, H. P., Kulling, S., and Rimbach, G. (2009). Effect of dietary genistein on Phase II and antioxidant enzymes in rat liver. *Cancer Genomics Proteomics* 6, 85–92.

Wiencke, J. K., Zheng, S., Lafuente, A., Lafuente, M. J., Grudzen, C., Wrensch, M. R., Miike, R., Ballesta, A., and Trias, M. (1999). Aberrant methylation of p16 INK4a in anatomic and gender-specific subtypes of sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 8(6), 501–506.

Williams, G. M. (2001). Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*, 166(1–2), 3–10.

Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30(1), 1–14.

Xia, S., Wang, J., Kalionis, B., Zhang, W., and Zhao, Y. (2019). Genistein protects against acute pancreatitis via activation of an apoptotic pathway mediated through endoplasmic reticulum stress in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 509, 421–428.

Yang, Y. M., Yang, Y., Dai, W. W., Li, X. M., Ma, J. Q., and Tang, L. P. (2016). Genistein-induced apoptosis is mediated by endoplasmic reticulum stress in cervical cancer cells. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20, 3292–3296.

Yu, O., Jung, W., Shi, J., Croes, R. A., Fader, G. M., McGonigle, B., and Odell, J. T. (2000). Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiol.* 124(2), 781–94.

Yu, X., Zhu, J., Mi, M., Chen, W., Pan, Q., and Wei, M. (2012). Anti-angiogenic genistein inhibits VEGF-induced endothelial cell activation by decreasing PTK activity and MAPK activation. *Med. Oncol.* 29, 349–357.

Zhang, J., Pang, Z., Zhang, Y., Liu, J., Wang, Z., Xu, C., He, L., Li, W., Zhang, K., Zhang, W., Wang, S., Zhang, C., Hao, Q., Zhang, Y., Li, M., and Li, Z. (2021). Genistein From *Fructus sophorae* Protects Mice From Radiation-Induced Intestinal Injury. *Front Pharmacol.* 21(2), 655652.

Zhang, L., Zhang, J., Gong, Y., and Lv, L. (2020). Systematic and experimental investigations of the anti-colorectal cancer mediated by genistein. *Biofactors.* 46(6), 974–982.

Zhang, Y., Li, Q., Zhou, D., and Chen, H. (2013b). Genistein, a soya isoflavone, prevents azoxymethane-induced up-regulation of WNT/ β -catenin signalling and reduces colon pre-neoplasia in rats. *Br J Nutr.* 109(1), 33–42.

Zhang, H. H., and Guo, X. L. (2016). Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78, 13–26.

Zhang, Z., Wang, C. Z., Du, G. J., Qi, L. W., Calway, T., and He, T. C. (2013a). Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via ATM/p53- dependent pathway in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* 43, 289–296.

Zhou, P., Wang, C., Hu, Z., Chen, W., Qi, W., and Li, A. (2017). Genistein induces apoptosis of colon cancer cells by reversal of epithelial-to-mesenchymal via a Notch1/NF- κ B/slug/E-cadherin pathway. *BMC Cancer*. 17(1), 813.

Zhu, J., Ren, J., and Tang L. (2018). Genistein inhibits invasion and migration of colon cancer cells by recovering WIF1 expression. *Mol Med Rep.* 17(5), 7265-7273.