



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FİSETİN İLE KOMBİNE EDİLMİŞ KEMOTERAPİ İLAÇLARININ
KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNE ETKİSİ ÜZERİNE
ÇALIŞMALAR**

ZEHRA KANLI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. HÜLYA CABADAK
BİYOFİZİK DOKTORA PROGRAMI

EŞ-DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ CAN ERZİK

İSTANBUL- 2024



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FİSETİN İLE KOMBİNE EDİLMİŞ KEMOTERAPİ İLAÇLARININ
KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNE ETKİSİ ÜZERİNE
ÇALIŞMALAR**

ZEHRA KANLI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. HÜLYA CABADAK
BİYOFİZİK DOKTORA PROGRAMI

EŞ-DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ CAN ERZİK

İSTANBUL- 2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Zehra KANLI

	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	DOKTORA TEZ ONAY FORMU	Doküman No: SBE-DR-9f
			İlk Yayın Tarihi: 18.01.2022
			Revizyon Tarihi:09.05.2022
			Revizyon No:01
Kurum	: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü		
Program türü	: Doktora		
Anabilim Dalı	: Biyofizik		
Tez Sahibi	: Zehra KANLI		
Sınav Tarihi ve Saati: 17.05.2024 - 10.30			
Tez Başlığı : Fisetin ile Kombine Edilmiş Kemoterapi İlaçlarının Kolorektal Kansere Etkisi Üzerine Çalışmalar			
Bu çalışma, içerik ve kalite bakımından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.			
JÜRİ ÜYELERİ	Unvan, Adı-Soyadı (Kurum adı)	İmza	
Danışman	Prof. Dr. Hülya CABADAK		
Üye	Prof. Dr. Handan AKÇAKAYA		
Üye	Prof. Dr. Işıl ALBENİZ		
Üye	Prof. Dr. Oya ORUN		
Üye	Doç. Dr. Banu AYDIN OMAV		
Üye	Doç. Dr. Başak VAROL		
ONAY			
Bu tez, yukarıda isimleri bulunan jüri üyeleri tarafından " Marmara Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nuntarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.			
Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü			



Canım Babama;

TEŞEKKÜR

Marmara Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı' nda yapmış olduğum yüksek lisans ve doktora öğrenimim boyunca,

Bilgi birikimini ve deneyimlerini benimle paylaşıp desteğini benden esirgemeyen kendisiyle çalışma fırsatı yakalayabilmekten dolayı onur ve mutluluk duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım **Prof. Dr. Hülya CABADAK'** a,

Birlikte çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum eş danışmanım çok kıymetli hocam **Dr. Öğr. Üyesi Can ERZİK'** e

Akademik hayata başladığım andan itibaren her anımda bana destek olan, her alanda gelişmemi sağlayan samimiyetini her zaman hissettiğim, her yönüyle kendime örnek aldığım ve ablam gibi sevdiğim çok kıymetli hocam **Doç. Dr. Banu AYDIN'** a

Doktora eğitimim boyunca, mesleki beceri ve bilgimi geliştirmemde tecrübe ve bilgilerini hiçbir zaman esirgemeyerek paylaşan ondan her zaman destek gördüğüm abim gibi sevdiğim çok kıymetli hocam **Doç. Dr. Cevdet NACAR'** a,

Tez izleme komitemin değerli üyesi sayın hocam **Prof. Dr. Handan AKÇAKAYA'** ya,

Tezime ön çalışmalarıyla katkıda bulunan değerli hocam **Prof. Dr. Kazım Yalçın ARĞA'** ya

Tez çalışmama yaptığı yardımlardan dolayı güzel, naif ve kıymetli arkadaşım **Dr. Öğr. Üyesi İrem PEKER EYÜBOĞLU** ve **Şeyma ÇOLAKOĞLU'** na

Tezi sürecim boyunca değerli vakitlerini ayırarak moral ve motivasyonum düştüğünde her zaman destek veren, her anını özlemle anımsayacağım sevgili **Ayşe Melek TANRIVERDİ BADEMCİ'** ye,

Son zamanlarda sıkı bağ kurabildiğim, birlikteliğimizin ötesinde dostluk kazandığım çok değerli arkadaşım **Arş. Gör. Sevdener YAZI'** ya,

Doktora eğitimim süresince beraber çalıştığım tüm asistan arkadaşlarım ve Marmara Üniversitesi Biyofizik Anabilimdalı kıymetli hocalarıma,

Attığım her adımda arkamda olan, maddi-manevi desteklerini benden esirgemeyen ve tüm eğitim-öğretim hayatım boyunca benimle beraber ağlayan-beraber gülen, sevgisini ve desteğini daima yanımda hissettiğim çok kıymetli ailem; **annem, babam, kardeşlerim ve yeğenim Egehan KANLI'** ya

Bu tez Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı TDK-2021-10284 numaralı proje, 1004 Tübitak Doktora Bursu ve YÖK 100/2000 öncelikli alanlar doktora bursu ile desteklenmiştir. Bu desteğinden dolayı **BAPKO**, **TÜBİTAK** ve **YÖK** birimine,

Tüm içtenliğimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez ve proje Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.



İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ	i
TABLO LİSTESİ.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Kolorektal Kanser	6
4.1.1. Kolorektal kanser epidemiyoloji	6
4.1.2. Kolorektal kanserin aşamaları	7
4.1.3. Kolorektal kanser tipleri.....	7
4.1.4. Kolorektal kanser moleküler patogenezi (Adenom-karsinoma dönüşümü).....	9
4.2. Kolorektal Kanserde Güncel Tedavi Stratejileri.....	12
4.3. HT29 Hücre Soyu	15
4.4. Kolorektal Kanserin Tedavisinde Kullanılan İlaçlar.....	16
4.4.1. 5-FU	18
4.4.2. Kapesitabin	20
4.5. Kolorektal Kansere İlaç Etkileşimleri.....	22
4.6. Kanserde Kemoterapi ve İlaç Direnci	23
4.7. Fisetin.....	26
4.8. Fisetinin Moleküler Yapısı ve İlaç Etkileşimleri	28
4.9. MikroRNA.....	32
4.10. Kanserde MikroRNA' ların Rolü	34
4.11. MikroRNA ve İlaç Direnci Mekanizması.....	38
4.12. Kolorektal Kansere Hücrelerinde Apoptoz	41
5. GEREÇ VE YÖNTEM	47
5.1. Gereçler	47
5.1.1. Kimyasal maddeler ve reaktifler.....	47
5.1.2. Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar	48
5.1.3. Western emdiriminde kullanılan antikorlar	49
5.1.4. Sarf malzemeler	49
5.1.5. Kitler	50
5.1.6. Cihazlar	50
5.1.7. Tampon ve çözeltilerin bileşimi.....	51
5.2. Yöntem.....	55

5.2.1. Biyoinformatik analizler ile aday miRNA'ların belirlenmesi	55
5.2.2. Çalışmada kullanılan hücrelerin hazırlanması ve çoğaltılması	56
5.2.3. Koloni oluşumu	60
5.2.4. Yara iyileşimi	61
5.2.5. RNA ve miRNA izolasyonu.....	62
5.2.6. cDNA sentezi	63
5.2.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR).....	64
5.2.8. Hücre lizatlarının hazırlanması	66
5.2.9. Protein miktar tayini	66
5.2.10. Elektroforez (SDS-PAGE)	66
5.2.11. İstatistiksel Analiz	67
6. BULGULAR	68
6.1. Yabancı-tip HT29 hücre canlılığının belirlenmesi	68
6.1.1. Yabancı-tip HT29 hücrelerinin tripan mavisini ile hücre sayımı	68
6.2. Yabancı-tip HT29 hücre soyu mikroskopik görüntüleri	69
6.3. HT29 kolorektal kanser hücre soylarında BrdU hücre çoğalma deneyleri	70
6.3.1. Yabancı-tip HT29 hücre çoğalmasında farklı dozlarda fisetinin 24.saat muamelesinin etkileri	70
6.3.2. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında çoğalma deneyleri	72
6.4. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında hücre göçü deneyleri.....	74
6.5. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında koloni oluşumu deneyleri	77
6.7. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında apoptoz protein ekspresyon düzeyleri	82
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	91
8. KAYNAKLAR.....	101
9.ÖZGEÇMİŞ	134
10. BİLİMSEL FAALİYETLER	135

KISALTMALAR LİSTESİ

5-FU	:	5-fluorourasil
APC	:	Adenomatöz polipozis koli
AIF	:	Apoptoz-indükleyici Faktör
BRAF	:	B-raf proto-onkogen
BrdU	:	Bromodeoksiuridin
CpG	:	C;sitozin-p;fosfat-G;Guanin
CIN	:	Kromozomal instabilite
CIMP	:	CpG adası metilatör fenotipi
DDT	:	Ditiyotreitöl
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
ESMO	:	Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü
FSS	:	Fetal sığır serumu
HEPES	:	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
KRK	:	Kolorektal kanser
MSI	:	Mikrosatellite instabilite
MMR	:	Mismatch onarım sistemi
NBT/BCIP	:	Nitroblutetrazolyum/Bromokloroindol fosfat
PMSF	:	Fenil metil sülfonil klorür
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	:	N, N, N', N',-tetrametiletildiamin
TRİS	:	Tris Hidroksimetil Aminometan

TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1.	KRK hücre soylarının kökenlerine ilişkin veriler	9
Tablo 2.	Kolorektal kanser için mevcut ve yeni ortaya çıkan tedaviler	17-18
Tablo 3.	Genel kimyasallar	48-49
Tablo 4.	Hücre kültür solüsyonları	49-50
Tablo 5.	Western emdiriminde kullanılan antikorlar	50
Tablo 6.	Sarf malzemeler	50-51
Tablo 7.	Kitler	51
Tablo 8.	Kullanılan cihaz ve aletler listesi	51-52
Tablo 9.	Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soyu ilaç tedavi grupları	60
Tablo 10.	MiRNA primer tablosu	65
Tablo 11.	MiRNA ifade seviyelerinin tespiti için GZ-PZR koşulları	66
Tablo 12.	P-gp mRNA primer tablosu	66
Tablo 13.	P-gp mRNA ekspresyon düzeyi tespiti için GZ-PZR koşulları	67
Tablo 14.	BrdU hücre çoğalması deneylerinde kullanılan fisetin konsantrasyonları	71

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kolorektal kanser aşamaları

Şekil 2. Kolorektal kanser gelişiminde anahtar moleküler yollar

Şekil 3. Normal kolon dokusunun karsinoma ilerlemesini gösteren diyagram

Şekil 4. 5-FU ve kapesitabin aktivitesinin modülasyonu

Şekil 5. Kapesitabinin 3D (üç boyutlu) kimyasal yapısı

Şekil 6. Kapesitabin metabolizması

Şekil 7. Anti-kanser ilaç direncinin çeşitli nedenleri

Şekil 8. İlaç direncinin biyolojik belirleyicileri

Şekil 9. Fisetin çiçeklerde, meyvelerde, sebzelerde ve çeşitli çaylarda bulunmaktadır

Şekil 10. Fisetinin 2D ve 3D moleküler yapısı

Şekil 11. Fisetinin farklı kanser türlerine ve altta yatan moleküler mekanizmalara karşı potansiyel terapötik hedefleri

Şekil 12. Kolorektal kanser hücrelerinde fisetinin apoptoz yollarına etkileri

Şekil 13. MiRNA, miRNA biyosentezi ve mekanizması

Şekil 14. KRK ilaç direncinde miRNA'ların moleküler mekanizmaları

Şekil 15. Apoptotik sinyal yolları; içsel (intrinsik) ve dışsal (ekstrinsik)

Şekil 16. Yabanıl-tip HT29 hücrelerinde direnç geliştirilme aşamaları

Şekil 17. BrdU hücre çoğalması deneyi şematik gösterimi

Şekil 18. Koloni oluşumu deneyi şematik gösterimi

Şekil 19. Yara iyileşimi deneyi şematik gösterimi

Şekil 20. RNA izolasyonu temsili deney aşamaları

Şekil 21. Yabanıl-tip HT29 hücre sayımı. Tripan mavisi ile boyanmış HT29 hücrelerinin faz kontrast ışık mikroskopunda hemositometrideki görüntüsü.

Şekil 22. Hemositometri ile yabancı-tip HT29 (%) hücre canlılığı.

Şekil 23. Yabancı-tip HT29 hücrelerinin 24. ve 48. saat faz kontrast ışık mikroskobu görüntüleri

Şekil 24. Yabancı-tip HT29 hücre çoğalmasında artan dozlarda fisetinin 24.saat etkisi

Şekil 25. Yabancı-tip HT29 hücre çoğalmasında fisetinin IC₅₀ değeri

Şekil 26. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında fisetin ve/veya kapesitabinin 24 saat tedavisi sonrası BrdU hücre çoğalması

Şekil 27. Yabancı-tip HT29 hücre soyunda fisetin ve/veya kapesitabinin 24 saat tedavisi sonrası BrdU hücre çoğalması

Şekil 28. KD/HT29 hücre soyunda fisetin ve/veya kapesitabinin 24 saat tedavisi sonrası BrdU hücre çoğalması

Şekil 29. Yabancı-tip HT29 hücre soyunda % yara iyileşimi

Şekil 30. KD/HT29 hücre soyunda % yara iyileşimi

Şekil 31. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında yara iyileşmesi deneyi karşılaştırılması

Şekil 32. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında yara iyileşmesinin temsili görüntüleri

Şekil 33. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında yara iyileşimi ısı-haritası grafiği

Şekil 34. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında % koloni oluşumu verimliliği

Şekil 35. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında koloni oluşumu deneyinin ısı-haritası grafiği

Şekil 36. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında koloni oluşumu temsili görüntüleri

Şekil 37. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında P-gp ekspresyon düzeyi grafiği

Şekil 38. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında hsa-mir-381 ekspresyon düzeyi grafiği

Şekil 39. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında hsa-mir-21 ekspresyon düzeyi grafiği

Şekil 40. Yabancıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında hsa-mir-181a ekspresyon düzeyi grafiği

Şekil 41. Bax/BcL-2 protein ekspresyon düzeyi grafiği

Şekil 42. Cyt c protein ekspresyon düzeyi grafiği

Şekil 43. AIF protein ekspresyon düzeyi grafiği

Şekil 44. Kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyi grafiği

Şekil 45. Kaspaz-8 protein ekspresyon düzeyi grafiği

Şekil 46. Kaspaz-9 protein ekspresyon düzeyi grafiği

Şekil 47. Cyt c, Bax, BcL-2, AIF, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve Aktin protein ekspresyonu western blot temsili görüntüleri

1. ÖZET

Tezin başlığı : Fisetin ile Kombine Edilmiş Kemoterapi İlaçlarının Kolorektal Kanser Hücrelerine Etkisi Üzerine Çalışmalar

Öğrencinin Adı Soyadı : Zehra Kanlı

Danışmanın Adı Soyadı : Prof. Dr. Hülya Cabadak

Programın Adı : Biyofizik Doktora Programı

Amaç: Kolorektal kanser hücrelerinde artan dozlarda kapesitabinle geliştirilen dirençli HT29 hücre soylarında yan etkileri yüksek olan kemoterapötik ajanının flavon fisetin ile kombine kullanılmasının hem kemoterapötik ilaçların toksik etkilerinin azaltması hem de apoptoz protein ekspresyonları ile spesifik miRNA ekspresyonlarının kolorektal kanser tedavisi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Biyoinformatik analizler yapılarak kolorektal kanserlerle ilişkili miRNA'lar belirlendikten sonra HT29 hücrelerinde kapesitabin ile artan dozlarda ilaç direnci geliştirilmiştir. Kapesitabin direnci geliştirilmiş hücreler fisetin ve/veya kapesitabin ile inkübe edildikten sonra hücre çoğalması, hücre göçünün belirlenmesi, seçilen miRNA'ların ekspresyon değişimlerinin GZ-PZR çalışmaları ve apoptoz protein ekspresyon düzeyindeki değişimleri belirlemek üzere western emdirimi çalışmaları yapılmıştır.

Bulgular: Kapesitabine dirençli HT29 hücre alt kümesi geliştirilmiştir. HT29 hücre soylarında geliştirilen kapesitabin direnci tüm deney sonuçları ile gösterilmiştir. Yabancı HT29 ve kapesitabine dirençli HT29 hücrelerinde fisetin tek başına ve/veya kapesitabinle kombinasyonlarının hücre çoğalması, yara iyileşmesi, koloni oluşumu, miRNA ekspresyonları ve apoptoz protein ekspresyonlarında değişimlere neden olmuştur.

Sonuç: Fisetinin, hem yabancı-tip hem de kapesitabin direnci geliştirilmiş hücrelerde tek başına ve kapesitabin ile kombinasyonunun hücre çoğalması, üzerinde inhibe edici etkileri gösterilmiştir. Ayrıca yabancı ve dirençli hücrelerde kapesitabin, fisetin ve kombiasyonları, miR 21 ekspresyonunda azalma ilaç duyarlılığının artmasına katkı sağlayabilir. miRNA' lardaki değişimler tümör baskılanmasına ve direncin gerilemesine de katkıda bulunabilir.

Anahtar kelimeler: İlaç direnci, fisetin, kapesitabin, kolorektal kanser, miRNA

2. SUMMARY

Title of Thesis: Studies on the Effect of Chemotherapy Drugs Combined with Fisetin on Colorectal Cancer Cells

Student Name, Surname: Zehra Kanlı

Supervisor Name : Prof. Hülya Cabadak

Program Name : Biophysics PhD Program

Objective: It was aimed to use the chemotherapeutic agent, which has high side effects, in combination with the flavone fisetin, in resistant HT29 cell lines developed with increasing doses of capecitabine in colorectal cancer cells, to both reduce the toxic effects of chemotherapeutic drugs and to determine the effect of apoptosis protein expressions and specific miRNA expressions on colorectal cancer treatment.

Material and Methods: After miRNAs associated with colorectal cancers were determined by bioinformatic analysis, drug resistance was developed in HT29 cells with increasing doses of capecitabine. After capecitabine-resistant cells were incubated with fisetin and/or capecitabine, western blot studies were performed to determine cell proliferation, cell migration, RT-PCR studies of expression changes of selected miRNAs, and changes in the expression level of apoptosis proteins.

Results: A subset of capecitabine-resistant HT29 cells has been developed. Capecitabine resistance developed in HT29 cell lines was demonstrated by all experimental results. In wild-type HT29 and capecitabine-resistant HT29 cells, fisetin alone and/or in combination with capecitabine caused changes in cell proliferation, wound healing, colony formation, miRNA expressions and apoptosis protein expressions.

Conclusion: Fisetin, alone and in combination with capecitabine, has been shown to have inhibitory effects on cell proliferation in both wild-type and capecitabine-resistant cells. Additionally, in wild-type and resistant cells, capecitabine, fisetin and their combinations may contribute to decreased miR-21 expression and increased drug sensitivity. Changes in miRNAs may also contribute to tumor suppression and regression of resistance.

Keywords: Drug resistance, fisetin, capecitabine, colorectal cancer, miRNA

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanserin (KRK) gelişimi ve ilerlemesi farklı moleküler mekanizmalara bağlıdır (Siegel ve ark., 2017; Bray ve ark., 2018; Koveitypour ve ark., 2019; Reidy ve ark., 2021; Siegel ve ark., 2023). Kolorektal adenokarsinomlar, onkogenleri, tümör baskılayıcı genleri ve DNA onarım mekanizmalarıyla ilgili genleri hedef alan genetik ve epigenetik mutasyonların bir sonucu olarak gelişir (Pancione ve ark., 2012; Brenner ve ark., 2014; Ewing ve ark., 2014; Sharifi-Azad ve ark., 2022; Wang ve ark., 2022). Günümüzde KRK' nın tanı ve tedavisi spesifik biyobelirteçleri yoktur. KRK patogenezi düzenleyen mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir (H. Chen ve ark., 2019; Xiao ve ark., 2020; de Assis ve ark., 2022). Beş yıllık sağkalım prognozu büyük ölçüde hastalığın evresine bağlıdır. Evre I KRK hastalarında yüzde 90' ın üzerinde sağkalım gösterirken, evre IV hastalarında %10 sağkalım göstermektedir. KRK tedavisi için cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi önde gelen yaklaşımlardır (Vogelstein ve Kinzler, 1998; Goss ve Groden, 2000; Fearon, 2011; Kaur ve ark., 2020). KRK tedavisinin temelini 1950' lerden beri 5-fluorourasil (5-FU) bazlı kemoterapi, oluşturur (Salonga ve ark., 2000; Schmoll ve Arnold, 2006; Showalter ve ark., 2008; Van der Jeught ve ark., 2018; Vodenkova ve ark., 2020). 5-FU/ kapesitabin, oksaliptin ve irinotekan klinikte kullanılan ilk basamak kemoterapi ilaçlarıdır. Bununla birlikte 5-FU/ kapesitabin bazlı tedaviye yanıt oranları hala çok sınırlıdır (Yaffee ve ark., 2015; Van der Jeught ve ark., 2018; Liu ve ark., 2022). Kapesitabin, 5-FU' nun oral yoldan uygulanan bir ön ilacıdır ve ilerlemiş veya metastatik kolon kanseri için ilk kemoterapi rejimlerinden biri olarak önerilmektedir. Kapesitabin, 5-FU' yu tümör hücrelerine seçici olarak transfer eden modifiye edilmiş bir floropirimidindir ve 5-FU' dan daha düşük toksisitesi olan floropirimidin karbamat olarak geliştirilmiştir (Di Costanzo ve ark., 2000; McKendrick ve Coutsouvelis, 2005; Chintala ve ark., 2011; Allegra ve ark., 2016; Alqahtani ve ark., 2022).

Kanser de dahil olmak üzere bazı hastalıklarda ilaç direnci mekanizması ile karşılaşılmaktadır. Kanser tedavisinde ilaç direnci, kemoterapi ve radyoterapi uygulanan hastalarda kendinden ya da sonradan gelişen bir durumdur. Başlangıçta kanserin pek çok tipi kemoterapiye duyarlı olmasına rağmen zamanla direnç gelişimi gözlemlenmektedir. İlaç direnci gelişiminde; ilaç inaktivasyonu, mitokondriyal değişimler, onkogenler, tümör baskılayıcı genler, ilaç hedeflerindeki değişiklikler, otofaji, hücre ölümünün inhibisyonu, post translasyonel modifikasyonlar ve DNA hasar onarımı gibi etkili mekanizmaların rolü vardır (Housman ve ark., 2014; Zheng, 2017; Wang ve ark., 2019; Farhan, 2023).

Gastrointestinal kanserlerde kanserin gelişiminde ve ilerlemesinde birtakım genlerin rol oynadığı doğrulanmış olsa da, buna aracılık eden moleküler mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır. Farklı araştırmacılar tarafından, mikroRNA'ların (miRNA'lar) mRNA'ları hedeflediği ve daha sonra kanserlerin önlenmesinde ve tedavisinde çok sayıda rol oynadığı bildirilmektedir (Kim ve ark., 2018; Hill ve Tran, 2021; Menon ve ark., 2022). miRNA'lar çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçleri yönetmedeki gen ekspresyonu ve transkripsiyon sonrası kilit düzenleyicileridir. Çeşitli hastalıklar için miRNA'lar gelecek vaat eden yeni biyobelirteçlerin kaynağı olarak önerilmektedir. miRNA'ların kanserle ilgili önemli süreçlerde ve yollarda rol alma görevleri giderek artmaktadır, fakat kolorektal kanserin patogenezi kapsamlı bir şekilde araştırılmış olsa da hastalığı yöneten mekanizmalar henüz tam olarak belirlenememiştir. Günümüzde küçük moleküler ilaçlar ve miRNA'lar arasındaki kanser önleyici potansiyeli olan ajanlar ve antikanser ilaçları bulma ilişkisine dikkat çekilmektedir (O'Brien ve Kirby, 2008; H. Wang ve ark., 2018; Fu ve ark., 2021; Menon ve ark., 2022). miRNA'ların çeşitli kanser türlerinde sisplatin veya 5-FU gibi kemoterapötik ilaçlara duyarlılık veya direnç ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (Kovalchuk ve ark., 2008; Yang ve ark., 2008; Boren ve ark., 2009; Tormo ve ark., 2019; Pavlikova ve ark., 2022).

Flavonoidler bitkilerde bulunan ve insan sağlığı açısından son derece faydalı olan anti-enflamatuar, antimikrobiyal, antiviral, antikanser ve immünomodülatör gibi özelliklere sahip bileşenlerdir (Ullah ve ark., 2020; Dias ve ark., 2021; Liga ve ark., 2023). Bazı flavonoidler kanser hücre çoğalmasını inhibe etmektedir. Fisetin, çeşitli kanser türlerine karşı anti-proliferatif, anti-kanser, anti-inflamatuar ve antioksidan aktiviteye sahiptir. Fisetinin apoptoz ve çoğalma üzerindeki terapötik etkilere katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (H. W. Zhang ve ark., 2018; Kashyap ve ark., 2019; Slika ve ark., 2022; Hosseinzadeh ve ark., 2023). Fisetinin geleneksel kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde potansiyel terapötik kullanımına ilişkin az sayıda veri bulunmaktadır. Bu nedenle kansere karşı yeni ilaç çalışmaları ve farklı ilaç kombinasyonlarının kullanımı önem kazanmaktadır.

Bu tez çalışmasında kapesitabin dirençli HT29 kolorektal kanser hücrelerinde (KD/HT29) tedaviye yanıt oranlarını iyileştirmek için ilaç direnci mekanizmalarına karşı kemoterapi işlevinin etkinliğini arttıran ajanlardan biri olan flavonoid fisetin kullanılmıştır. Tez çalışmasındaki hipotezimiz; fisetin, kemoterapide yaygın olarak kullanılan kapesitabinle kombinasyon tedavisine KD/HT29 hücre soylarının çoğalmasında etkin midir? Kapesitabine dayalı kemo-direnç mekanizmaları hala belirsizdir, bu nedenle, düzenleyici yolların ve olası spesifik hedeflerin incelenmesi, tedavi yanıtlarını optimize etmeye yardımcı olabilir

olduğundan, miRNA' ların kanser regülasyonunda ve tedavi yanıtlarındaki rolünün de araştırılması gerekir. Bu çalışmadaki amaç; yabancı-tip HT29 kolorektal kanser hücre soylarında *in siliko* çalışmalarda kolorektal kanser ile ilişkili yolaklarda ekspresyonu artan veya azalan miRNA' ları belirlemek, fisetin ve kapesitabin ile tedavi edilen hem yabancı-tip hem de KD/HT29 hücre soylarında;

- 1)Hücre çoğalması,
- 2) Seçilen miRNA'ların ekspresyon düzeyinin belirlenmesi ve
- 3)Apoptoz yolaklarındaki spesifik proteinlerin değişimini araştırmaktır.

İlk defa bu çalışmada, *in siliko* araştırmalar sonucunda kolorektal kanser gen profilinde ilaca dirençli olarak seçilen; hsa-mir-21, hsa-mir-381 ve hsa-mir-181a-2 aday miRNA'larının kapesitabin ve fisetinin etkisi incelenmiştir. Çalışma süresince hem yabancı-tip HT29 hem de KD/HT29 hücrelerinden elde edeceğimiz bilgiler sonucunda yan etkileri yüksek olan kemoterapötik ajanların, flavonoid bileşiklerle birlikte kullanılmasının ilaçların ekspresyon değişimlerinin kemoterapötik direnç gelişim üzerindeki etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Araştırma verilerimizin kolorektal kanser mekanizmasında kapesitabinin tek başına /ve fisetinle birlikte kapesitabine direnç geliştirilen hücrelerde hücre ölümü üzerine etkisinin belirlenmesini ayrıca yeni ilaç kombinasyon çalışmalarına katkı sağlaması öngörülmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

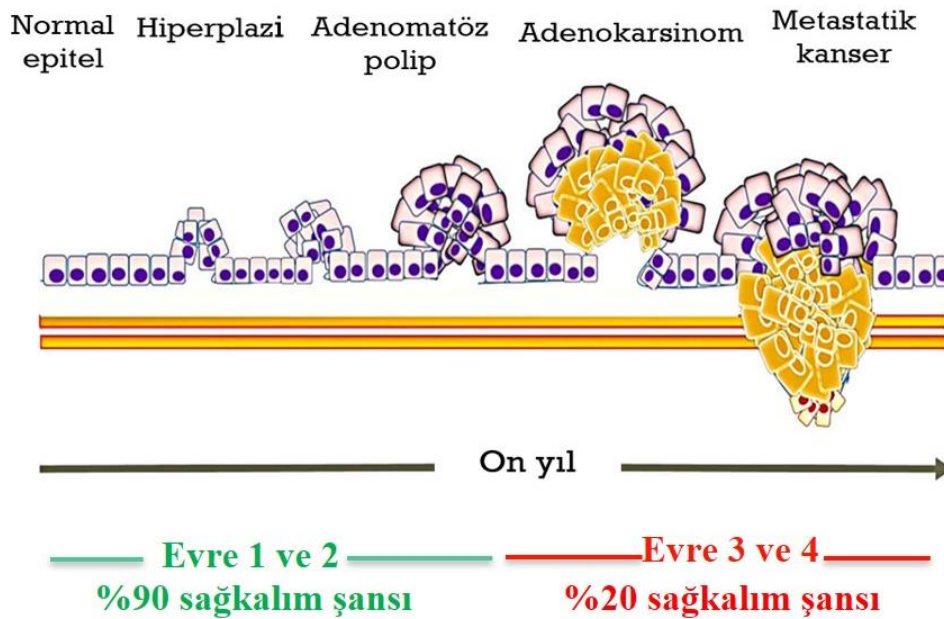
4.1. Kolorektal Kanser

4.1.1. Kolorektal kanser epidemiyoloji

Kolorektal kanser, dünya çapında ve Amerika Birleşik Devletleri'nde hem erkek hem de kadınlarda en sık teşhis edilen üçüncü kanserdir ve kansere bağlı ölümlerin üçüncü en yaygın nedenidir (Siegel ve ark., 2017; Bray ve ark., 2018; Koveitypour ve ark., 2019; Reidy ve ark., 2021; Siegel ve ark., 2023). Ancak genel olarak kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada ve 50 yaş altı erkeklerde ise birinci sırada yer almaktadır (Siegel ve ark., 2023). 2035 yılına kadar KRK hasta sayısının 2,4 milyona ulaşacağı ve KRK'nın dünya çapında 1,3 milyon ölüme neden olacağı tahmin edilmektedir (Douaiher ve ark., 2017; Mattiuzzi ve ark., 2019; Wang ve ark., 2022). Tüm vakaların ve ölümlerin nedeni; yarısından fazlasında sigara içme, sağlıksız beslenme, yüksek alkol tüketimi, fiziksel hareketsizlik ve yüksek vücut ağırlığı gibi değiştirilebilir risk faktörlerine bağlanabilir (İslami ve ark., 2018; Siegel ve ark., 2023). Amerika Birleşik Devletlerindeki mevcut KRK istatistiklerinde, yaşa ve görülme sıklığına göre 2023'teki tahmini yeni vaka ve ölüm sayıları, hayatta kalma ve ölüm oranları, 2019'a kadar olan görülme sıklığı ve 2020 yılına kadar ölüm verilerine dayalı olarak yaş, ırk ve etnik kökene göre eğilimler dahil olmak üzere, kapsamlı bir genel bakış sunulmaktadır (Siegel ve ark., 2017; Siegel ve ark., 2023). KRK görülme sıklığındaki düşüş, 2000'li yıllarda yıllık %3-%4'ten 2011-2019 döneminde yıllık %1'e yavaşladığı bunun nedeninin kısmen 55 yaş altı bireylerde 1990'ların ortasından bu yana yıllık %1-%2'lik artış olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak, 55 yaşın altındaki vakaların oranı 1995'te %11'den 2019'da %20'ye çıktığı bildirilmektedir. Her ne kadar genel KRK mortalitesi azalmaya devam etse de bu ilerleme, gelecekte daha az olumlu eğilimlerin habercisi olan, hızla değişen hastalık profili nedeniyle sekteye uğruyor. KRK yükü, 20. yüzyılın son yarısında doğan genç bireylere kayıyor. Artık beş yeni vakadan biri 50'li yaşların başındaki veya daha genç bireylerde görülüyor. İkincisi, hastalığın ileri evrelerine genel bir geçiş var ve 1990'ların ortalarına kıyaslandığında artık daha fazla kişiye, ileri evrede teşhis konuluyor. Irk ve coğrafyaya göre çarpıcı eşitsizliklerin devam ettiği belirtilmektedir. KRK eşitsizliklerinin azaltılması, daha sağlıklı yaşam tarzlarının teşvik edilmesi, başta kırsal ve Alaska gibi diğer düşük kaynaklara sahip bölgelerde yaşayanlar olmak üzere tüm bireylerin yüksek kaliteli sağlık hizmetlerine eşit erişiminin sağlanması yoluyla başarılabileceği belirtilmektedir (Siegel ve ark., 2023).

4.1.2. Kolorektal kanserin aşamaları

Histopatolojik özelliklerine göre KRK dört ayrı aşamaya ayrılır ve bunlar aynı zamanda Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği' nin (ESMO) uygun tedavilerin uygulanmasına yönelik kılavuzlarının da temelini oluşturur. KRK' nın 0. evresinde kolon mukozasının iç astarında polipler oluşur. Daha sonra evre I' de polipler tümörlere dönüşerek mukozaya göç etmeye başlar. Lokal tümörlerin cerrahi rezeksiyonu, evre 0 ve evre I' de ek tedaviye gerek kalmadan iyi terapötik etki sağlayabilir. Evre II' de kanser kolonun ötesine yayılabilir, ancak bu aşamada lenf düğümleri yoluyla metastaz olmaz. Evre III' te kanser hücreleri kolon duvarına ve çevredeki lenf düğümlerine yayılır, ancak yakındaki organlara yayılmaz. Bu evrede hastaların hem radyoterapi hem de kemoterapi ile tedavi edilmesi gerekir (Wang ve ark., 2022). Evre IV' te kanserin vücudun diğer organlarına yayılım hızı artar. Genellikle karaciğere veya akciğere yayılım gösterir (Hashiguchi et al., 2020; Wang et al., 2022). Kolorektal kanserin farklı aşamaları Şekil 1' de gösterilmiştir.



Şekil 1. Kolorektal kanser aşamaları (Biovendor, 2023' den yararlanılarak hazırlanmıştır)

4.1.3. Kolorektal kanser tipleri

KRK, farklı DNA hasarları olan üç farklı ancak kısmen örtüşen moleküler fenotipe sahip heterojen bir hastalıktır. Bu yollar kromozomal instabilite (CIN), mikrosatellite instabilite (MSI) ve CpG (C;sitozin-P;fosfat-G;Guanin) adası metilatör fenotipi (CIMP)' dir. CIN yolağı, tüm sporadik KRK' ların ~%85' ini oluşturan en yaygın fenotiptir (Lengauer ve ark., 1997; Nowak ve ark., 2002; Ahmed ve ark., 2013). CIN tümörlerindeki kötü huylu hücreler tipik olarak anöploididir ve büyük ölçekli kromozomal yeniden düzenlemeleri ortaya çıkarır. MSI

fenotipi, tüm KKR' ların yaklaşık %15' ini temsil eder ve DNA onarım sistemindeki çeşitli eksikliklerden kaynaklanır ve mutasyon oranında büyük artışa neden olur (Shibata ve ark., 1994; Lothe, 1997; Ahmed ve ark., 2013). CIMP fenotipi gösteren kanserler, anormal DNA metilasyonuna sahiptir, birçok genin uyumsuz promötör hipermetilasyonuna yol açar (Issa, 2004; Ahmed ve ark., 2013). Bu fenotipin kesin bir tanımı ve sınıflandırması için birleşik bir belirteç paneli oluşturulmayı beklemektedir. Burada temsili genotiple doğrulanmış kolon kanseri hücre dizilerinden oluşan bir panel, genetik ve epigenetik moleküler fenotiplerine göre ayrıca sınıflandırılır (Ahmed ve ark., 2013).

Kolorektal kanserin ortaya çıkışı ve gelişimi, kanserin aşamalar halinde varlığının en belirgin kanıtlarından biri olmaya devam etmektedir. Adenomdan karsinomaya dönüşüm dizisi, en iyi hayatta kalma, büyüme ve kanser hücresi kolonilerinin istilasına sahip varyantların seçilmesiyle tümör fenotipinin desteklenmesine yol açan mutasyonların gelişimine dayanır (Vogelstein ve Kinzler, 1998). Onkogenler, hücrelerin normal halden kanser hücrelerine dönüşümüyle sıkı sıkıya ilişkili olan genlerdir. Tümör baskılayıcı genler ise normal bir hücrenin işlevini koruyan genlerdir. Kolorektal kanserde rolü kanıtlanmış olan onkogenler Ras, EGFR (Erb-B1), Erb-B2, TGFalfa, TGF-beta 1'dir. Tümör baskılayıcı genler ise Adenomatöz polipozis koli (APC), p53, p27, MSI, LOH 18q, delesyon 5q aleli, DNA hipermetilasyonudur (Munteanu ve Mastalier, 2014). KKR hücre soylarının kökenlerine ilişkin veriler Tablo 1' de açıklanmıştır.

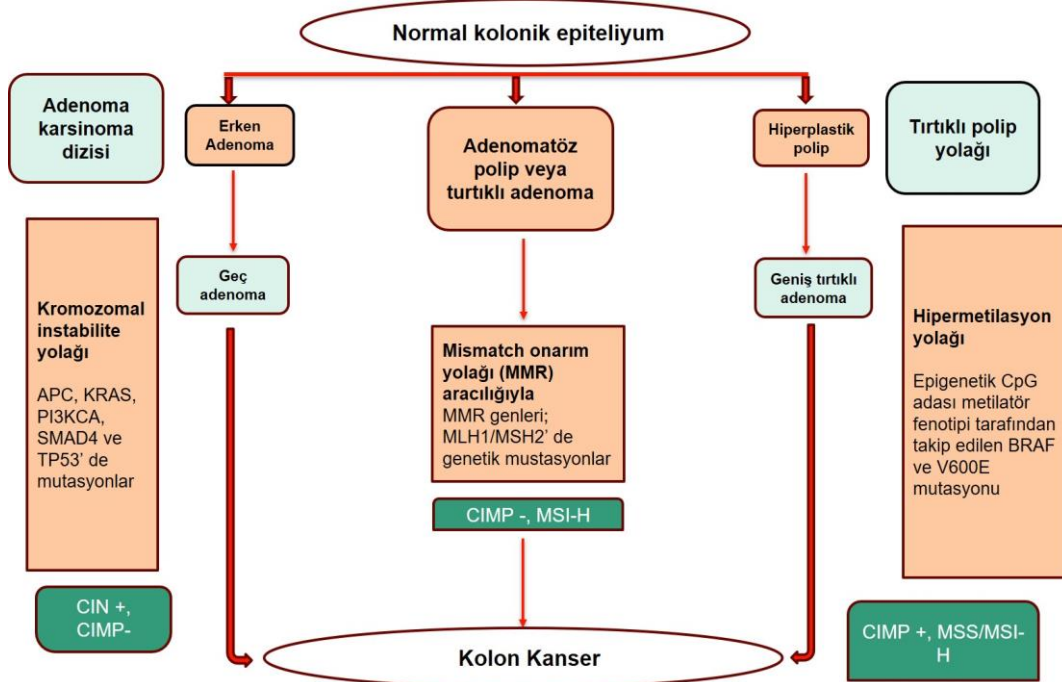
Tablo 1. KRK hücre soylarının kökenlerine ilişkin veriler

Hücre soyu	Hasta (Yaş/cinsiyet)	Organ	Hastalık	Evre	Köken	Referans
Caco-2		Kolon	Kolorektal karsinoma			(Caro ve ark., 1995)
CO-115	77 yaş, kadın	Kolon	Kolorektal karsinoma	Duke's C	Primer tümör	(Carrel ve ark., 1976)
COLO 320	55 Yaş, kadın	Kolon sigmoid	Kolorektal karsinoma		Primer tümör	(Quinn ve ark., 1979)
DLD-1	Erkek	Kolon	Kolorektal karsinoma		HCT-15/DLD-1 (yanlış sınıflandırılmış)	(Dexter ve ark., 1981; Chen ve ark., 1995)
HCT-115	Erkek	Kolon	Kolorektal karsinoma		HCT-15/DLD-1 (yanlış sınıflandırılmış)	(Tibbetts ve ark., 1977; Dexter ve ark., 1981; Chen ve ark., 1995)
HCT-116	48 yaş, erkek	Kolon	Kolorektal karsinoma	Duke's D	Primer tümör	(BrattainBrattain ve ark., 1981; BrattainFine ve ark., 1981; Eshleman ve ark., 1995)
HT29	44 yaş, kadın	Kolon	Kolorektal karsinoma	Duke's C	Primer tümör	(Fogh, 1975)
LoVo	56 yaş, erkek	Kolon	Kolorektal karsinoma	Duke's C	Sol köprücük üstü bölgesi	(Drewinko ve ark., 1976)
SW480	50 yaş, erkek	Kolon	Kolorektal karsinoma	Duke's B	Primer tümör	(Leibovitz ve ark., 1976)
SW620	51 yaş, erkek	Kolon	Kolorektal karsinoma	Duke's C	Lenf nodu metastazı	(Leibovitz ve ark., 1976)

4.1.4. Kolorektal kanser moleküler patogenezi (Adenom-karsinoma dönüşümü)

Kolorektal karsinogenezdeki moleküler yollar, normal kolonik mukozanın iyi huylu bir polipe ve ardından kötü huylu bir tümöre dönüşmesine neden olan çeşitli karmaşık genetik ve epigenetik modülasyonları içerir. Günümüze kadar kanıtların çoğu KRK' nın kanser öncesi

lezyonlardan veya adenomatöz poliplerden kaynaklandığını öne sürmeye devam ediyor. KRK'nın patogenezinin, anormal kript odağı adı verilen en erken displastik lezyondan başlayarak adenomatöz polipe ve invazif kanser gelişimine kadar çok aşamalıdır. Fearon ve Vogelstein, moleküler düzeyde, karsinogenez gelişiminin, zaman içinde tümör büyümesine neden olan ve sonuçta invazif bir maligniteye yol açan değişikliklerin ilerlemesine bağlı olduğunu öne sürdüler. Bu ilerlemeyi adenom-karsinom dizisi olarak adlandırdılar (Fearon ve Vogelstein, 1990; Kasi ve ark., 2020). APC geninin kesilmesi genellikle tetikleyicidir ve bunu KRAS ve TP53 mutasyonları takip eder. Bunlar, kolorektal kanserin evrimi için alternatif bir yolağı temsil eder ve hiperplastik polipler, sesil “serrated” (tırtıklı) adenomlar veya karışık hiperplastik polipler/serrated adenom gibi fenotipik olarak heterojen büyümelerdir (De Palma ve ark., 2019; Kasi ve ark., 2020). Sesil “serrated” (tırtıklı) adenomlar kolonun premalign lezyonları olup çekum ve asendan (çıkan) kolonda daha sık görülmektedirler. B-raf proto-onkogen (BRAF) mutasyonları, genellikle epigenetik CpG adası metilatör fenotipi ile birleşen en yaygın başlangıç hasarıdır. İlginç bir şekilde, bağırsak mikrobiyomunda disbiyoz, özellikle fusobacterium nükleatumun aşırı büyümesi, serrated polip adenokarsinomanın ilerlemesinde rol oynar (Ito ve ark., 2015; Park ve ark., 2016; Kasi ve ark., 2020). Prognoz değişkendir ve yüksek derecede CIMP, MSI ve BRAF mutasyonlarının kombinasyonu en kötü prognozu taşır. Kolorektal kanser gelişiminin ana hatları CIN yolağı, MSI yolağı ve CIMP hipermetilasyonu olmak üzere üç ana moleküler yolakla gerçekleşir (Şekil 2) (Kasi ve ark., 2020).

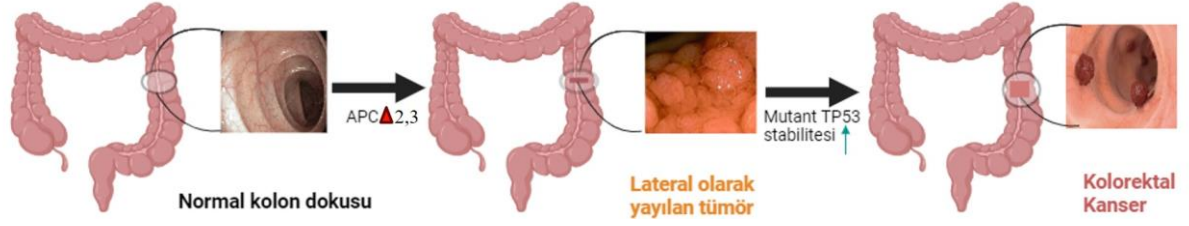


Şekil 2. Kolorektal kanser gelişiminde anahtar moleküler yolaklar (Kasi ve ark., 2020' den yararlanılarak hazırlanmıştır).

Kolon epitel hücrelerinden KRK' nın gelişimi ve ilerlemesi için iki klasik model önerilir. İlk model, APC genindeki mutasyonlar tarafından başlatılan, adenomun kansere dönüşüm sürecini açıklar. Bu kromozom instabilite modeli ile karsinomaya ilerleme APC geninde mutasyon çeşitli kromozom kusurları içerir (Ogino ve Goel, 2008). Kromozom instabilite (CIN) modelinin önemli bir özelliği tümör baskılayıcı genlerin delesyonuna neden olmasıdır. CIN' de anahtar genler APC, TP53, KRAS, PI3KCA vs' dir (Walther ve ark., 2009).

MSI, kolorektal kanserlerin yaklaşık olarak %15' ini karakterize eden mismatch onarım (MMR) sisteminin moleküler parmak izidir. MMR eksikliği olan hücrelerin DNA hatalarını kat kat biriktirmeleri olasıdır. Eksik mismatch (uyumsuzluk) protein sistemi, bu mikrosatellitlerin genleşmesine veya daralmasına yol açar, dolayısıyla bu durum mikrosatellit kararsızlığı olarak adlandırılır (Jasperson ve ark., 2010). MSI, MMR genlerindeki doğuştan gelen mutasyonlardan veya daha yaygın olarak, sporadik tümörlerde MLH1 geninin promotör bölgelerindeki CpG adalarının metilasyonu arkasında gelişen epigenetik susturulmadan kaynaklanır. Bu tümörler sıkça BRAF onkogenindeki hotspot mutasyonlarını gösterir (Sinicrope ve Sargent, 2012). Mikrosatellit instabilitesi yüksek (MSI-H) kolorektal tümörlerde çoklu gen dizilimi ile tanımlanan, işlevsiz MMR genlerinden kaynaklandığı belirtilmektedir. MSI-H KRK' lı hastaların çoğunun immüno terapiden faydalandığı belirtilmektedir (Overman ve ark., 2017).

Diğer model, KRAS/B-Raf proto-onkogen, serin/treonin kinaz (BRAF) ve fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa mutasyonlarına ikincil olarak katenin beta1' in mutasyonu ile serrated poliplerden kansere dönüşümü açıklar. Bu mutasyonlar transforme edici büyüme faktör-beta reseptörü (TGF- β) tip 2' nin aşırı ekspresyonu sonucunda oluşur (Ireland ve ark., 2017; Lu ve ark., 2023). Ana sinyal molekülleri, Wnt, mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK), fosfoinositid 3-kinaz (PI₃K)/Akt ve hiperaktif TP53' tür (Kuipers ve ark., 2015; Lu ve ark., 2023). KRK' nın gelişimine ve oluşumuna yol açan diğer sinyal yolları hedgehog, erb-b2 reseptör tirozin kinaz, ras homolog aile üyesi A, Notch, kemik morfogenetik proteini, hippo, AMP ile aktifleştirilen protein kinaz, nükleer faktör KB (NF-kB) ve Jun N terminal kinazdır (Mahar ve ark., 2017; Lu ve ark., 2023). Mutasyonlarla normal kolon dokusunun kolorektal kansere dönüşümü Şekil 3' te gösterilmektedir.



Şekil 3. Normal kolon dokusunun karsinoma ilerlemesini gösteren diyagram (Lu ve ark., 2023' den yararlanılarak hazırlandı) (APC: Adenomatöz polipozis koli; TP: Tümör proteini)

APC' nin somatik nokta APC mutasyonları mutasyon kümesi bölgesinde (MCR)' de meydana gelir (Lu ve ark., 2023). MCR' de mutasyonlardan sonra en önemli sitolojik olaylar antigen-presenting (APCΔ2,3) tekrarlarının yapısal kırılması ve aksin, katenin eksikliği, mikrotübüller ve diğer bağlanma bölgeleri mutasyonlarıdır (Kohler ve ark., 2008). Genomik DNA'nın bütünlüğünün gerçek zamanlı izlenmesi için normal TP53 kullanılır (Bykov ve ark., 2018). TP53 mutasyonları öncelikle karsinogenezin orta ve geç aşamalarında meydana gelir (Zhang ve ark., 2022). Kansere ilerleme (driver) aşamasında golgi fragmentasyonu ile yönetilen APC-kırılma mutasyonları hücrel yapısal proteinlerin yeniden reorganize olması sonucu anormal polarite ve yanıl büyüme neden olur. Kanser aşamasında, golgi fragmentasyonu, ısı şoku proteinleri murine double minute-2 (MDM2), TP63 ve TP73' ün aracılık ettiği TP53 baz uyumsuzluğunun onarım mekanizmasını etkiler, bu da mutant TP53' ün stabilitesinin artmasına ve lateral olarak yayılan tümörlerin karsinoma ilerlemesinin desteklenmesine neden olur (Lu ve ark., 2023).

4.2. Kolorektal Kanserde Güncel Tedavi Stratejileri

KRK ile savaşmak için çok sayıda tedavi stratejisi kullanılmaktadır. Ancak yaşamı tehdit eden bu hastalığı tamamen ortadan kaldıracak bir yaklaşım henüz mevcut değildir. Günümüzde cerrahi, kemoterapi, radyasyon terapisi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi dahil olmak üzere çok sayıda KRK tedavi stratejisi kullanılmaktadır (Goss ve Groden, 2000; Raedler, 2016; Van der Jeught ve ark., 2018; Kaur ve ark., 2020). Lokal tedaviler, sistemik tedaviler ve kombine tedavi yaklaşımları olarak ayrılır ve tümörün evresine göre uygulamalar değişir. Lokal tedaviler vücudun geri kalanını etkilemeden sadece tümörü tedavi eden tedavilerdir. Bu tedaviler erken evre kanserlerde daha etkilidir ancak diğer bazı durumlarda da kullanılabilir. Kolorektal kanserde kullanılan lokal tedavi türleri arasında cerrahi, ablasyon ve embolizasyon ve radyasyon yer alır. Genellikle cerrahi rezeksiyon olarak adlandırılan cerrahi, KRK' nın en yaygın tedavisidir (Young ve ark., 2014; Brar ve ark., 2021; Krasteva ve Georgieva, 2022). Bu, erken evredeki malign katı tümörleri çıkarmak için etkili bir araçtır ve tümör iyi tanımlanmış

olsa da ileri aşamalarda çok etkili değildir (Young ve ark., 2014; Krasteva ve Georgieva, 2022). Kolorektal kanserde, sağlıklı bir kolon veya rektumun bir kısmı ve yanındaki lenf düğümleri çıkarılabilir (Young ve ark., 2014; Brar ve ark., 2021; Krasteva ve Georgieva, 2022). Bu cerrahinin yan etkileri, operasyon bölgesinde ağrı ve hassasiyeti içerir, ayrıca kabızlık veya ishal de görülebilir (Young ve ark., 2014; Krasteva ve Georgieva, 2022). Ayrıca, cerrahi, tümör bütünlüğünün mekanik bozulması sonucunda belirli kanser hastalarında metastaz nedeniyle ölüm riskini artırabilir. Radyasyon terapisi, hücrelerin büyümesini ve bölünmesini kontrol eden genetik materyallerine zarar vererek kanser hücrelerini yok etmek üzere yüksek enerjili X ışınlarını kullanır. Rektal kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılır çünkü bu tümör başlangıç yerine yakın kalma eğilimindedir. Radyasyon tedavisinin en yaygın erken yan etkileri yorgunluk, hafif cilt reaksiyonları, mide rahatsızlığı vb.' dir (Joye ve Haustermans, 2014; Brar ve ark., 2021; Krasteva ve Georgieva, 2022). Diğer yan etkiler rektumda kanamadan kaynaklanan kanlı dışkı veya bağırsak tıkanıklığı, cinsel sorunlar ve hem erkeklerde hem de kadınlarda kısırlık olabilir (Joye ve Haustermans, 2014; Krasteva ve Georgieva, 2022). Hastaların, hasar gören sağlıklı hücrelerinin miktarını etkileyen iyonlaştırıcı radyasyona karşı farklı hassasiyetleri vardır. Radyasyon hasarına karşı daha duyarlı hastalarda, radyasyon tedavisi, daha ileri neoplazmın gelişimini başlatmaya yeterli olacak DNA hasarına da neden olabilir (Krasteva ve Georgieva, 2022).

Ablasyon sıklıkla küçük (4 cm' den küçük) tümörleri yok etmek için ameliyat yerine kullanılır. Ablasyon tekniklerinin birçok farklı türü vardır. Radyofrekans ablasyonu (RFA), kanser hücrelerini öldürmek için yüksek enerjili radyo dalgalarını kullanır. Mikrodalga ablasyonu, kanseri hızlı bir şekilde öldüren yüksek sıcaklıklar oluşturmak için elektromanyetik mikrodalgalar kullanır; etanol ablasyonu, kanser hücrelerine zarar vermek için doğrudan tümöre konsantre alkol enjeksiyonunu içerir; kriyocerrahi ise tümörü ince bir metal proba dondurarak yok eder. Ablasyon tedavisinden sonraki olası yan etkiler arasında karın ağrısı, karaciğerde enfeksiyon, ateş, göğüs boşluğunda veya karında kanama ve anormal karaciğer testleri yer alır. Embolizasyon, karaciğere metastaz yapan KKK tümörlerini tedavi etmek üzere kullanılır. Embolizasyon işleminde, tümöre giden kan akışını engellemek veya azaltmak için karaciğerdeki bir artere doğrudan bir madde enjekte edilir. Olası yan etkiler ablasyon tedavisinden sonrakilere benzerdir (Krasteva ve Georgieva, 2022).

Kolorektal kanser tedavisinin temelinde cerrahi rezeksiyon veya radyasyona uygun olmayan metastatik kolorektal kanserli hastalar için sistemik tedavi seçenekleri arasında sitotoksik kemoterapi ve hedefe yönelik tedavi yöntemleri hastalığın evresine bağlı olarak yanıtları ve uzun vadeli sonuçları optimize etmek için sırayla veya kombinasyon halinde kullanılabilir

(Goss ve Groden, 2000; Raedler, 2016; Van der Jeught ve ark., 2018; Kaur ve ark., 2020). Kemoterapi kan akışı yoluyla vücudun her yerindeki kanser hücrelerine ulaşabilen sistemik tedaviler olarak adlandırılır. Kemoterapide, normalde kanser hücrelerinin büyüme ve bölünme yeteneğini durdurarak kanser hücrelerini yok etmek üzere ilaçlar kullanılır (Chu, 2012; Cisterna ve ark., 2016; Viswanath ve ark., 2016; Johdi ve Sukor, 2020; Xie ve ark., 2020; Brar ve ark., 2021; Krasteva ve Georgieva, 2022). Kolorektal kanserin türüne bağlı olarak farklı türde ilaçlar kullanılabilir, ağız yoluyla uygulanabilir veya doğrudan kan dolaşımına enjekte edilebilir. Günümüzde KRK' yı tedavi etmek için çeşitli ilaçlar onaylanmıştır. Mevcut kemoterapi, hem 5-FU bazlı tek ajanlı tedaviyi hem de oksaliptatin (OX), irinotekan (IRI) ve kapesitabin (CAP veya XELODA veya XEL) dahil olmak üzere bir veya daha fazla ilaç içeren çoklu ajan rejimlerini içerir (Yaffee ve ark., 2015; Hammond ve ark., 2016; Van der Jeught ve ark., 2018). KRK tedavisinde timin analogu ve DNA replikasyon inhibitörü olan floropirimidin 5-FU, yaygın olarak kullanılmaktadır (Bertino, 1997; Salonga ve ark., 2000; McQuade ve ark., 2017; Van der Jeught ve ark., 2018). Kemoterapötik ilaçların seçici olmayan sitotoksik mekanizmaları nedeniyle kemoterapi sırasında ve sonrasında birçok güçlü yan etki bildirilmektedir (Hammond ve ark., 2016; Brar ve ark., 2021). Bu yan etkiler mide bulantısı, kusma, ishal, nöropati ve ağız yaralarını içerir. Bu nedenle son zamanlarda KRK için başka bir sistematik tedavi olan hedefe yönelik tedaviye dikkat çekilmektedir. Bu tip tedavide, tümör hücrelerinin yüzeyindeki veya çevresindeki spesifik moleküllere karşı etki eden monoklonal antikorlar uygulanır (Cisterna ve ark., 2016). Bevacizumab ve Setuksimab gibi monoklonal antikorların ortaya çıkmasıyla KRK' nın tıbbi tedavisinde büyük adımlar atılmıştır (Van der Jeught ve ark., 2018). KRK tedavisinde bu iki ilaç onaylanmıştır ve bunlar arasında vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) adı verilen bir kanser hücresi proteinini hedef alan Bevacizumab ve metastatik kanser tedavisinde kullanılan bir epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) inhibitörü ilaç olan setuksimab yer alır (Cisterna ve ark., 2016). Her iki ilaç da monoklonal antikorlara dayanmakta olup KRK' ya karşı modern tedavi yaklaşımlarının bir parçasıdır. 2000'li yılların başlarından beri irinotekan (bir topoizomeras I inhibitörü), oksaliptatin (bir DNA çapraz bağlayıcı) ile birlikte onkolojik uygulamaya girmiştir. Öte yandan sitotoksik ilaçlar beyaz kan hücreleri, kırmızı kan hücreleri ve trombositler gibi çoğalan sağlıklı hücreleri öldürür. Bu nedenle, kan hücrelerinin üretimini güçlendiren ve standart KRK kemoterapisi sırasında tedavi verimliliğini artıran bir kalsiyum folinat olan lökovorinin eş zamanlı uygulanması denetlenmektedir (Hammond ve ark., 2016). İmmünoterapi kanser tedavisinde yeni alternatiflerden biridir. Standart tedaviye kıyasla bu tedavi, kanser hücrelerine karşı mücadelede hastanın kendi bağışıklık sistemini manipüle eder ve kullanır. Doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkileri, kanser hücrelerini tanımak ve

potansiyel olarak tümörü yok etmek için uyarılır (Vesely ve ark., 2011; Gajewski ve ark., 2013; Marcus ve ark., 2014; Johdi ve Sukor, 2020). Özellikle hematolojik malignitelerde ve solid tümörlerde başarılı olduğu rapor edilmiştir (Im ve Pavletic, 2017; Nixon ve ark., 2018; Johdi ve Sukor, 2020). Kanser immünoterapisi (IT), kolorektal kanser tedavisine yönelik yeni bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım, ilaçları (immün kontrol noktası inhibitörleri) kullanarak bir kişinin bağışıklık sistemini kanser hücrelerini daha iyi tanıyıp yok etme yeteneğini arttırmayı amaçlar (Bousbaa, 2021). İmmünoterapi, ileri evre kolorektal kanserli hastaların tedavisinde kullanılabilir. Bu, kanser hastalarına yeni umutlar getirmiştir, çünkü standart tedavi stratejileri ile karşılaştırıldığında hastanın yaşam süresinde ve yaşam kalitesinde net bir iyileşme vaat etmektedir. Ancak, immünomodülatör özelliklerinden dolayı, immün kontrol noktası inhibitörlerini diğer ilaçlarla en etkili biçimde birleştirmek için optimal bir zaman penceresinin belirlenmesi, toksisiteyi kontrol altında tutarken maksimum etkinliği elde etmek için gereklidir (Johdi ve Sukor, 2020). Kanser immünoterapisine iyi yanıt veren hastaların prognozu daha iyi ve yaşam kalitesi daha iyidir. Kombine tedavi yaklaşımlarında, kanserin evresine ve diğer faktörlere bağlı olarak farklı tedavi türlerinin kombinasyonu aynı anda veya ardı ardına uygulanır. Birçok kişi ilk tedavi olarak hem kemoterapi hem de radyasyon terapisi (kemoradyasyon olarak adlandırılır) alır ve genellikle bunu ameliyat izler. Ameliyattan sonra genellikle toplamda yaklaşık 6 ay boyunca ek kemoterapi verilir. Diğer bir seçenek olarak önce tek başına kemoterapi, ardından kemo artı radyasyon tedavisi ve sonra ameliyat yapmak olabilir (Messersmith, 2019; Yaqoob ve ark., 2020; Krasteva ve Georgieva, 2022). Bununla birlikte, tüm tedavi tekniklerin sınırlamaları vardır ve tatmin edici sonuçları garanti etmez. Örneğin geleneksel kemoterapinin etkinliği, antikanser ilaçların spesifik olmayan dağılımı ve hızlı temizlenmesi, düşük verimlilik, hücresel ve tümör seviyelerinde ilaç direnci ve yaygın antikanser ajanlarının daha yüksek dozlarda reçete edildiğinde ciddi toksisiteye sahip olması nedeniyle azalmıştır. Bu nedenle, bunların özgüllüğünü ve etkililiğini daha da geliştirmek için yeni yöntemlere gereksinim vardır.

4.3. HT29 Hücre Soyu

İnsan kolon adenokarsinom hücre soyu HT29, 1964' te Fogh ve Trempe tarafından 44 yaşındaki beyaz ırktan kadının birincil tümöründen izole edilmiştir (Fogh, 1975; Martinez-Maqueda ve ark., 2015). Günümüze kadar insan kolon kanserlerinden birçok hücre soyu üretilmiştir. HT29 hücre soyu insan kanserlerinin biyolojisinin farklı yönlerini incelemek için kullanılmaktadır. Bu hücreler yüksek oranda glikoz tüketimi gösterir ve bu nedenle ortamda yüksek glukoz konsantrasyonu gerektirir. Bu hücreler standart büyüme koşulları altında, 25 mM glikoz ve %10 serum varlığında, farklılaşmamış bir fenotip sergiler; polarize olmamış farklılaşmamış hücreler

çok katmanlı olarak büyürler ve işlevsel olarak bağırsak epitel hücrelerinin herhangi bir tipik özelliğini ifade etmezler. Kültür ortamında glukozun galaktoz ile değiştirilmesinin, tersine çevrilebilir bir enterositik farklılaşmayı indüklediğinin keşfinden bu yana (Zweibaum ve ark., 1985), HT29 hücreleri bağırsak hücresi farklılaşmasının moleküler mekanizmalarını incelemek üzere benzersiz bir model haline gelmiştir. Bu hücreler uygun kültür koşulları altında veya bütirat (bütirik asit) gibi farklı indükleyicilerle muameleden sonra çoğaltıldığında (Augeron ve Labois, 1984; Fitzgerald ve ark., 1997) enterosit farklılaşmasının farklı yollarını ifade etmek için modüle edilebilirler. Bu nedenle HT29, hücre farklılaşmasında yer alan yapısal ve moleküler olayların incelenmesinde kullanılabilen bir pluripotent bağırsak hücre soyu olarak kabul edilmektedir (Martinez-Maqueda ve ark., 2015).

4.4. Kolorektal Kanserin Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

İyileştirici amaçlı tedavi mümkün olmadığında, hastalara genellikle hedefe yönelik tedaviyle birlikte sitotoksik kemoterapi kombinasyonu verilir. Son birkaç on yılda evre III ve IV metastatik KKK (mKRR) tedavisindeki eğilimler, yeni kemoterapötiklerin ve yeni kombinasyon tedavilerinin indüksiyonuna dayalı olarak çeşitli alanlara ayrılabilir olduğu belirtilmiştir (McQuade ve ark., 2017). Günümüzde kullanılan ve geliştirilen ilaçlar tablo 2’ de sunulmuştur (Tablo 2).

Tablo 2. Kolorektal kanser için mevcut ve yeni ortaya çıkan tedaviler (McQuade ve ark., 2017' den yararlanılarak hazırlanmıştır).

Ajan	Mekanizma	Referans
Güncel tedaviler		
5-FU	Floropirimidin (Timidilat sentaz enziminin inhibisyonunun yanı sıra floro nükleotidinin RNA ve DNA' ya hatalı birleşimi)	(Petrelli ve ark., 1987; Petrelli ve ark., 1989)
Lökovorin	Folinik asit türevi	(Poon ve ark., 1989)
Kapesitabin	Floropirimidin (5-florourasil için oral ön ilaç)	(Twelves ve ark., 2005)
FOLFOX	Kombinasyon rejimi FOL = folinik asit (Lökovorin) + F = 5-florourasil (5-FU) + OX = oksaliptatin (Elotaksin)	(Andre ve ark., 2004; André ve ark., 2009)
FOLFIRI	Kombinasyon rejimi FOL = folinik asit (Lökovorin) + F = 5-florourasil (5-FU) + IRI = irinotekan (CPT-11)	(Saltz ve ark., 2000; Saltz ve ark., 2007)
FOLFOXIRI	Kombinasyon rejimi FOL = folinik asit (Lökovorin) + F = 5-florourasil (5-FU) + OX = oksaliptatin (Elotaksin) + IRI = irinotekan (CPT-11)	(Falcone ve ark., 2002; Souglakos ve ark., 2006)
XELOX	Kombinasyon rejimi XEL = kapesitabin (Xeloda) + OX = oksaliptatin (Elotaksin)	(Borner ve ark., 2002; Díaz-Rubio ve ark., 2002; Cassidy ve ark., 2008)
XELIRI	Kombinasyon rejimi XEL = kapesitabin (Xeloda) + IRI = irinotekan (CPT-11)	
Bevacizumab	VEGF inhibitörü	
Setuksimab	EGFR inhibitörü	
Panitumumab	EGFR inhibitörü	
Aflibercept	VEGF inhibitörü	
Regorafenib	Oral çoklu-kinaz inhibitörü	

Tablo 2. Kolorektal kanser için mevcut ve yeni ortaya çıkan tedaviler (devam) (McQuade ve ark., 2017’ den yararlanılarak hazırlanmıştır).

Gelişen Tedaviler		
Selekoksib	COX-2 inhibitörü	
Rutenyum	Geçiş metali kompleksi	
Olaparib	Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörü	
Lonsurf	Kombinasyon rejimi Bevacizumab + Trifluridine and Tipiracil VEGF inhibitörü	Cancer Therapy Advisor, 2023

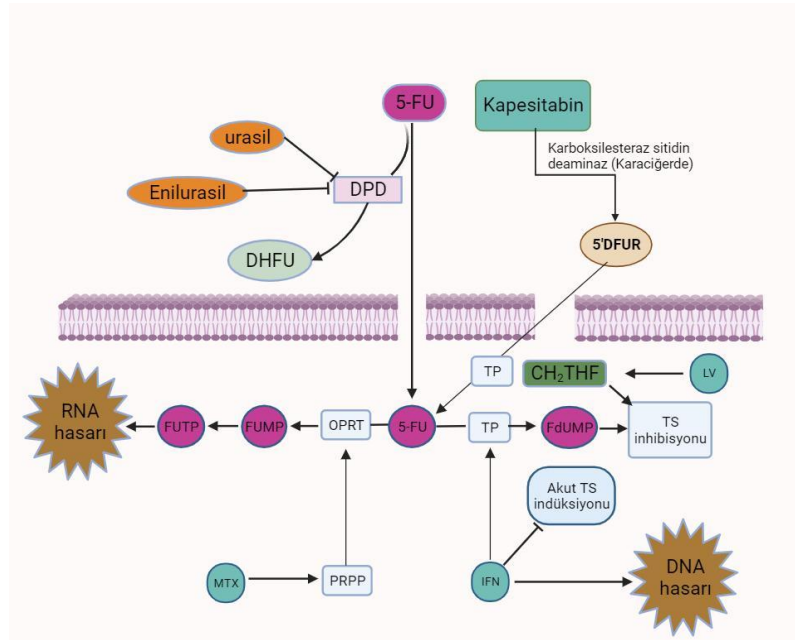
Metastatik kolorektal kanser için sıklıkla kemoterapi rejimleri arasında tek ajanlı kapesitabin ve irinotekan yanı sıra, FOLFOXIRI (lökovorin, 5-FU, oksaliplatin ve irinotekan); FOLFOX (lökovorin, 5-FU ve oksaliplatin); FOLFIRI (lökovorin, 5-FU ve irinotekan); CapeOx (kapesitabin ve oksaliplatin); ve FL (5-FU ve lökovorin) kullanılır (Raedler, 2016). Uluslararası klinik bir araştırma grubu tarafından yapılan son araştırmalara göre, bevacizumab (Avastin) ve trifluridin ile tipiracil (Lonsurf) kombinasyon rejimi kolorektal kanserli bazı kişilerin tedavisi için Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. SUNLIGHT adı verilen araştırma sonucuna göre, daha önceki en az iki tedavi rejiminden sonra durumu kötüleşen ilerlemiş kolorektal kanseri olan yaklaşık 500 kişi dahil edildiği ve trifluridin-tipirasil'i tek başına veya bevacizumab ile birlikte almak üzere rastgele tedavi aldıkları belirtilmektedir. Kombinasyon tedavisi alan grubun ortalama 14 ay takip edildikten sonra ortalama 10,8 ay sağkalım görüldüğü belirtilmiştir (Natioanal Cancer Institute, 2023).

4.4.1. 5-FU

5-FU, antikanser etkinliği olan ilk kemoterapötik ilaçlardan biridir (Heidelberg ve ark., 1957). Kolon kanserinde etkinliğinin ilk yayınlanmasının ardından, 5-FU tedavinin temelini oluşturmuştur ve hâlâ ileri veya mKRK için birçok tedavinin standart parçası olarak kullanılmaktadır (Hammond ve ark., 2016). 5-FU, birden fazla mekanizma kullanarak, DNA'ya timidin (dTMP veya deoksitimidin monofosfat) yerine dahil edilen florlu nükleotidleri oluşturarak DNA replikasyonunu engeller ve hücre ölümüne neden olur. Bu, aktif metabolitlere intrasellüler dönüşüm gerektiren bir öncül ilaçtır. Başlıca aktif metabolit, timidilat sentaz (TS) enzimini inhibe eden FdUMP (florodeoksirutidin monofosfat)' dir, bu enzim, DNA nükleotidi dTMP' nin oluşturulmasında anahtar bir enzimdir. TS' nin inhibe edilmesi, dUMP' nin dTMP' ye dönüştürülmesini önler, bu da hücresel replikasyon döngüsünün S fazında DNA sentezini bozar. Ayrıca, diğer 5-FU metabolitleri olan 5-florouridin trifosfat (5-FUTP) ve 5-florodeoksi trifosfat (5-FdUTP), alternatif enzimatik yollarla oluşturulur ve DNA'ya dahil edilen ve normal

protein üretimine müdahale eden yanlış nükleotidleri oluşturur, bu da hücre ölümüne yol açar (Nicum ve ark., 2000). Kemoterapi ortamında 5-FU' nun metastatik ve ileri KRK tedavisinde yaygın kullanımından bu yana, 5-FU' nun ön ilacı kapesitabin, tegafur, irinotekan ve oksaliptatin dahil olmak üzere diğer sitotoksik ilaçlar araştırılmıştır ve doğrulanmıştır. Bu ilaçların uygulama kılavuzlarına dahil edilmesine ve klinik uygulamada yaygın şekilde kullanılmasına olanak sağlamıştır (Yaffee ve ark., 2015; Hammond ve ark., 2016; Van der Jeught ve ark., 2018).

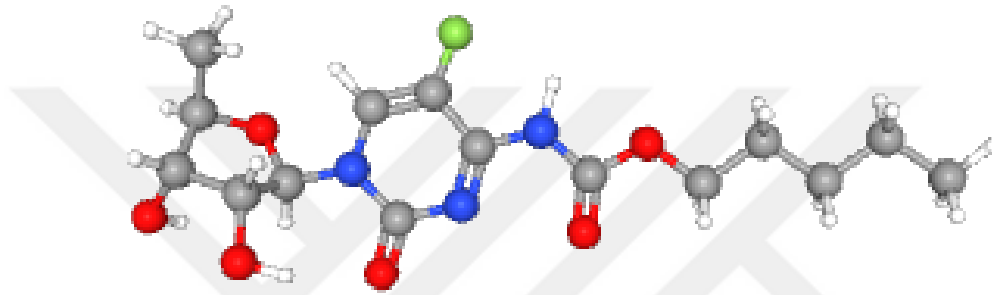
5-FU ve kapesitabin antikanser aktivitesini artırmak amacıyla bazı araştırma stratejiler şu şekilde özetlenebilir: Leukovorin, 5,10-metilen tetrahidrofolat (CH₂THF) intrasellüler havuzunu artırarak florodeoksiuridin monofosfat (FdUMP) tarafından timidilat sentaz (TS) inhibisyonunu artırır. Enilurasil ve urasil, 5-FU' nun dihidroprimidin dehidrogenaz (DPD) aracılı bozunmasını engeller. Metotreksat (MTX), fosforibosil pirofosfat (PRPP) seviyelerini artırarak 5-FU aktivasyonunu artırdığı düşünülmektedir. Interferonlar (IFN'ler), timidin fosforilaz (TP) aktivitesini artırarak, 5-FU tedavisinin neden olduğu akut TS indüksiyonunu ortadan kaldırdığı ve 5-FU aracılı DNA hasarını artırdığı belirtilmektedir. Kapesitabin, karboksilesteraz ve sitidin deaminazın karaciğerde ardışık etkileşim sonucu oluşturduğu 5-FU' nun ön ilacıdır. 5'DFUR, TP tarafından 5-FU' ya dönüştürülür. Bu modülasyon şematize edilmiştir (Şekil 4) (Longley ve ark., 2003).



Şekil 4. 5-FU ve kapesitabin aktivitesinin modülasyonu Longley ve ark., 2023' den yararlanılarak hazırlanmıştır).

4.4.2. Kapesitabin

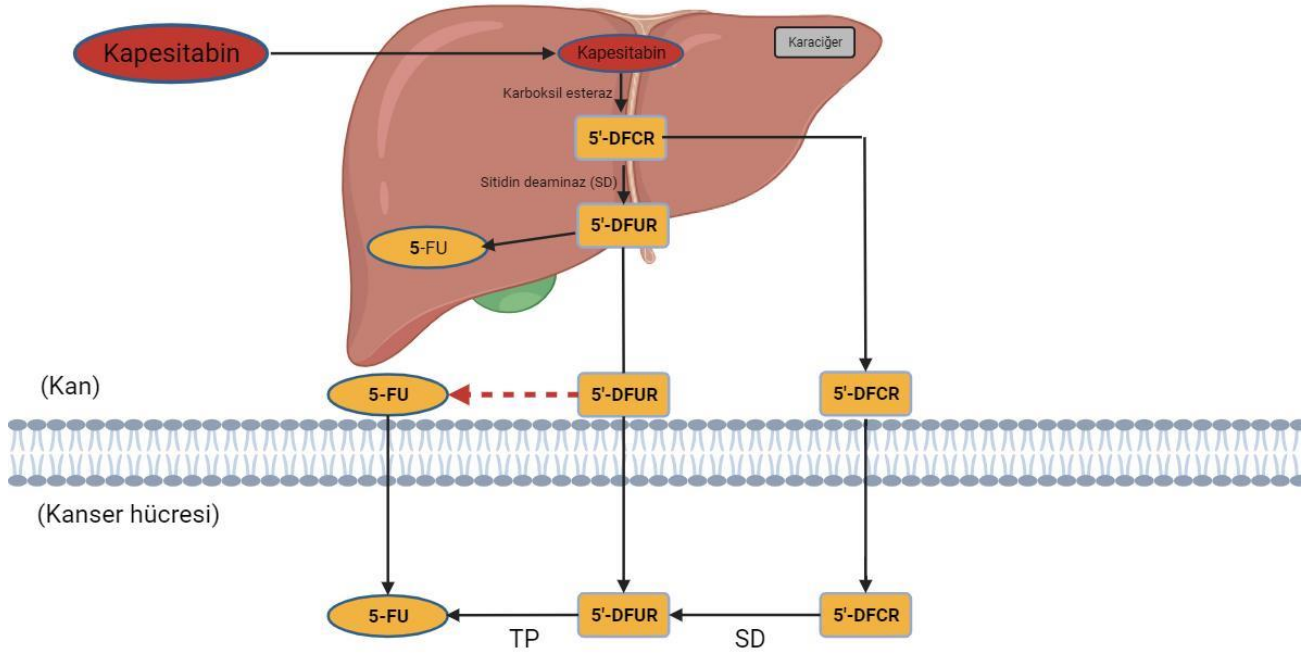
Kapesitabin (Xeloda), sürekli 5-FU infüzyonunu taklit etmek üzere geliştirilmiş, ancak esas olarak tümör bölgesinde meydana gelen aktivasyona sahip, ağızdan alınan bir antikanser ajandır. Günümüzde kapesitabin Dukes'C kolon kanseri olan hastalarda adjuvan tedavi için onaylanmıştır. Metastatik kolorektal kanserde tek başına floropirimidin tedavisi tercih edildiğinde birinci basamak monoterapi olarak kullanılmaktadır (Miwa ve ark., 1998; Reigner ve ark., 2001; Alqahtani ve ark., 2022). 5-FU' ya metabolize olan sitotoksik ajan kapesitabin, timidilat sentaz (TS) inhibitörüdür ve DNA sentezine müdahale eder



Şekil 5. Kapesitabinin 3D (üç boyutlu) kimyasal yapısı (National Enstitutes of Health, 2023)

Kapesitabin, oral olarak uygulanan bir 5-FU ön ilacı ve tümör seçici sitotoksik bir ajan olarak floropirimidin karbamatı olarak geliştirilmiştir. Oral uygulama sonrasında kapesitabin, değişmeden ve intact olarak gastrointestinal mukozal bariyer boyunca hızla geçer ve düşük değişkenlikle büyük ölçüde (en az %70) emilir. Kapesitabin, sitotoksik bir ilaç değildir, ancak ana metabolitleri 5'-deoksi-5-florositidin (5'-DFCR) ve 5'-deoksi-5-florouridin (5'-DFUR veya doksifluridin), insan kanser hücrelerinde seçici olarak 5-FU' ya dönüştürüldükten sonra etkili hale gelir. Kapesitabin üç aşamada 5-FU'ya metabolize edilir:

- (1) Kapesitabin, karaciğerde bulunan karboksilesteraz enzimi ile 5'-DFCR' ye dönüştürülür,
- (2) 5'-DFCR, karaciğer ve tümör dokusunda bulunan sitidin deaminaz enzimi ile 5'-DFUR' a dönüştürülür,
- (3) 5'-DFUR, katı tümörlerde upregüle olan timidin fosforilaz (dThdPaz) enzimi ile 5-FU' ya dönüştürülür (Di Costanzo ve ark., 2000; Van Cutsem ve ark., 2000).



Şekil 6. Kapesitabin metabolizması (TP; timidin fosforilaz; SD, sitidin deaminaz; 5'-DFCR, 5'-deoksi-5-florositidin; 5'-DFUR, 5'-deoksi-5 -florouridin; 5-FU, 5-florourasil) (Yoshida ve ark., 2020' den yararlanılarak hazırlanmıştır).

Mide kanseri tedavisinde kapesitabin tek başına veya diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde kullanılır. Kanser hastalarına yüksek dozlarda kapesitabin uygulanması, lenfopeni, kemik iliği baskılanması, kardiyak toksisite, ishal, bulantı, kusma, stomatit ve doza bağlı dermatolojik değişiklikler gibi yan etkilere neden olur (Dudhipala ve Puchchakayala, 2018; Gover ve ark., 2022). Bu yan etkileri en aza indirmek, etkinliği arttırmak, hastanın yaşam kalitesini iyileştirmek için hedefli ve sürekli salınım sağlayan bir dağıtım sisteminin tasarlanması gereklidir.

Kemoterapide yaygın kullanılan diğer ilaç irinotekan (CPT-11), doğal alkaloid kamptotesinin yarı sentetik bir analogudur ve DNA topoizomeraz I inhibitörüdür. Topoizomerazlar, transkripsiyon, replikasyon ve onarım rekombinasyonu gibi temel hücresel süreçlerin sonucu olarak DNA' nın seçili bölgelerinde bulunan twistleri ve süpersarmalları azaltır. İrinotekan, bu enzimin etkisini inhibe ederek DNA replikasyonu ve transkripsiyonu engeller. Topoizomeraz I inhibitörleri, inhibitör, enzim ve DNA tek sarmallı iplik arasında oluşan ara kesme komplekslerini stabilize ederler ve ardından DNA' nın yeniden bağlanmasını önleyerek hücre ölümüne neden olur. İrinotekan, etkisini göstermesi için aktif metaboliti SN-38 (irinotekan aktif metaboliti)'e dönüştürülür ve SN-38, topoizomeraz-1' e tersinir olarak bağlanır ve kompleksi stabilize eder. Bu ilaç FDA (Food and Drug Administration) tarafından 1996 yılında hızlandırılmış bir şekilde onaylanmıştır ve 1998 yılında kolorektal kanser tedavisinde tam onay

almıştır (Hammond ve ark., 2016). 1990' ların başlarında başlayan çok sayıda çalışmada ileri KRK için adjuvan tedaviye ve mKRK' nın tedavisine irinotekanın eklenmesi desteklenmiştir (Saltz ve ark., 2000; Hammond ve ark., 2016). Tek ajan olarak irinotekan, mKRK' lı 5-FU dirençli hastalarda yapılan klinik denemelerde sadece ılımlı yanıt oranı (%11-27) bildirilmiştir (Cunningham et al. 1998), ancak floroprimidinler (FP), 5-FU ve kapesitabin ile kombinasyonu ve/veya oksaliplatin ile birlikte verildiğinde daha büyük etki yaptığı bildirilmiştir (Shimada ve ark., 1996; Hammond ve ark., 2016).

Oksaliplatin, apoptotik hücre ölümüne yol açan DNA çapraz bağ oluşumunu indükleyen üçüncü nesil bir platin bileşiğidir. Diğer platinlerden farklı olan kare düzlemsel bir platindir. DNA iplikleri arası ve iplik içi DNA çapraz bağlar oluşumuna neden olarak replikasyonu ve transkripsiyonu durdurur (Hector ve ark., 2001). Oksaliplatin, Avrupa' da 1996 yılında kullanılması onaylandığı ve ABD' de de ise 2002 yılında FDA tarafından hızlı onay verilmiştir. 2004 yılında ileri KRK veya mKRK için 5-FU ile kombine kullanımı için tam onay verilmiştir. Bu ilaçlar KRK tedavisinde rutin olarak kullanılsa da ilaç direnci gibi bazı problemler, hasta sonuçlarını iyileştirmek için yeni sitotoksik ilaçlar bulma konusunda yeni zorluklar ortaya çıkarmaktadır (Denlinger ve Barsevick, 2009; Hammond ve ark., 2016; Mohammadian ve ark., 2017; Van der Jeught ve ark., 2018).

4.5. Kolorektal Kanser İlaç Etkileşimleri

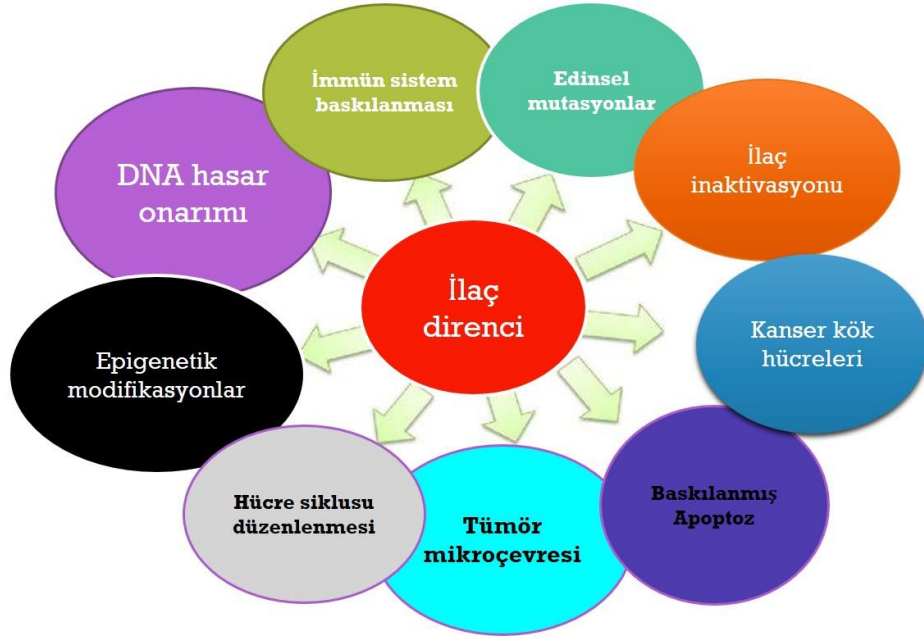
İlaç-ilaç etkileşimleri, iki veya daha fazla ilaç arasındaki metabolik müdahalenin sonucu olarak tanımlanır, bu da ilaçların etkililiğini ve/veya toksisitesini etkileyebilir ve bu durum özellikle tıbbi onkolojide ciddi endişe kaynağıdır (Sharma ve ark., 2019; Roberto ve ark., 2021). Hastalar antikanser ilaçların yanı sıra, genellikle diyabet ve hipertansiyon gibi farklı durumları tedavi etmek için diğer ilaçları da kullanırlar, bu da farmakokinetik (emilim, dağılım, metabolizma, eliminasyon) ve farmakodinamik özelliklerde ciddi değişikliklere neden olarak durumu daha da karmaşık hale getirir (Caterina ve ark., 2013; Berretta ve ark., 2016; Kotlinska-Lemieszek ve ark., 2019; Roberto ve ark., 2021). Bu durum özellikle yaşlı hastalarda önemlidir. Çünkü kanser ve yaşlanma, yaşlı popülasyonda çok ilaç kullanımının nedenlerindendir (Cabrera ve Finkelstein, 2016; Stepney ve ark., 2016; Alkan ve ark., 2017; Roberto ve ark., 2021).

Bir hastanın farmakogenomik profilinin bilgisi, P450 (CYPs) enzim süper ailesinin tüm sitokromlarını ve bu özellikleri etkileyen diğer genleri içermesi eşit derecede önemlidir; örneğin, P-glikoprotein, ATP bağlayıcı kaset taşıyıcıları, detoksifikasyon ve DNA tamir enzimleri gibi genlerdir (Tannenbaum ve Sheehan, 2014; Lee ve ark., 2019; Roberto ve ark.,

2021). Bu genlerdeki bireysel germ hücresi dizisi varyasyonları, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP' ler) olarak bilinir ve bu varyasyonlar, hastalar tarafından bildirilen hem etkinlik hem de toksisite profillerini etkilemektedir (Evans ve McLeod, 2003; Roberto ve ark., 2021). Klinik uygulamadaki SNP' lerin önemini yansıtan önemli bir örnek, fluoropirimidin metabolizma kompleks sinyal yolunda yer alan dihidropirimidin dehidrogenazı (DPD; DPYD geni tarafından kodlanır) etkileyen nokta mutasyonlarıdır (Roberto ve ark., 2021).

4.6. Kanserde Kemoterapi ve İlaç Direnci

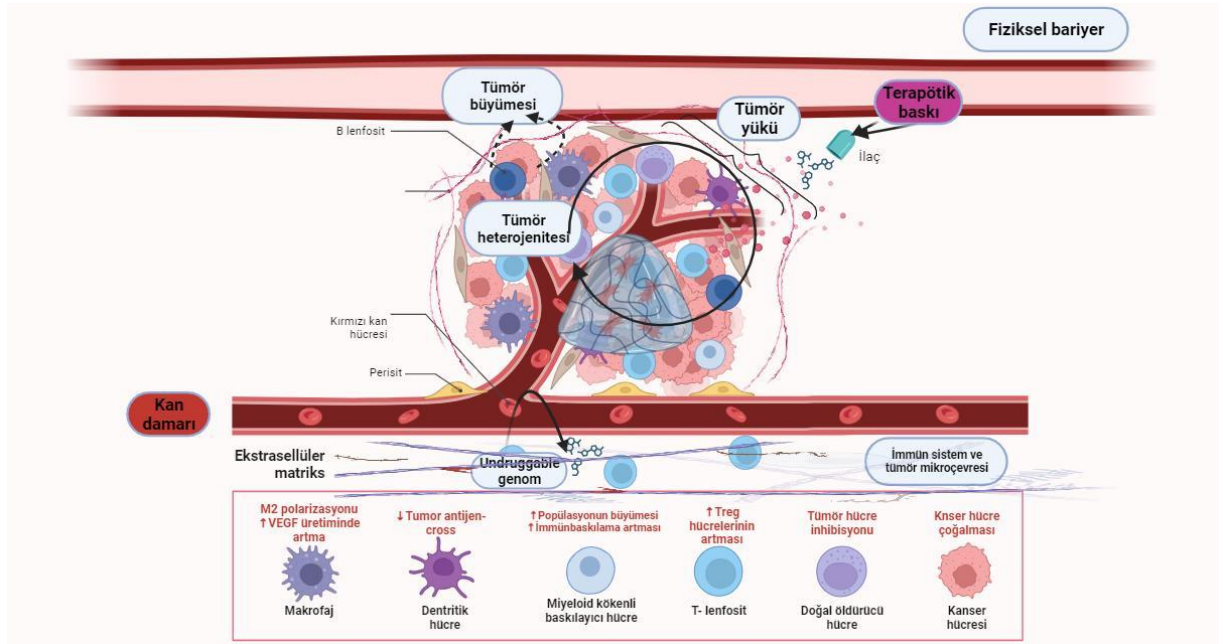
Kanserin genetik nedenlerine ek olarak, fenotipik etkenler de etiyopatogeneizde önemli bir rol oynar. Yaşamımız boyunca, yaşlanma ile insan fizyolojisi değişir ve aynı zamanda bazen kanser vakalarını artırabilecek birçok zararlı çevresel faktörlere de maruz kalınmaktadır. Hızlı modern yaşam tarzı, dengesiz diyet ek olarak koruyucu düzeyi düşük ve zararlı bileşenleri yüksek olan beslenme alışkanlıkları, kirlenmiş çevre, stres maruziyeti, düşük fiziksel aktivite, obezitenin gelişimi ve günlük yaşamımızda karşılaştığımız birçok diğer faktör, tümör oluşumu ve büyümesinde rol oynar (Pavlikova ve ark., 2022). Kanser tedavisi, tümörün tipine, konumuna, malignite derecesine, hastanın durumuna ve yaşına bağlıdır. Günümüzde en yaygın kullanılan tedaviler, tümör dokusunun cerrahi olarak çıkarılması, radyoterapi ve immünoterapi ile birleştirilmiş kemoterapidir (Arruebo ve ark., 2011; Pavlikova ve ark., 2022). Kemoterapi, solid tümörler için yardımcı tedavi olarak kullanılır ve cerrahi öncesi ve/veya sonrasında uygulanabilir (O'Donnell ve ark., 2017; Mueller ve ark., 2018; Green ve Konig, 2020; Pavlikova ve ark., 2022). Ancak bazı hastalar, kemoterapiye baştan tepki vermezler (Farshchi Zarabi ve ark., 2018). İlk başta kemoterapiye yanıt veren diğer hastalar, sitostatiklerin tekrarlanan uygulamaları tedavi direncine ve nükse yol açabilirler (Zhang ve ark., 2019). İlaç direnci olarak bilinen fenomen, çoğu hastalığın iyileştirme oranındaki azalmadan sorumlu olup aynı zamanda birçok antikanser ilacın terapötik etkinliğinde kayba neden olmaktadır (Husain ve ark., 2022; Karthika ve ark., 2022). Tedavi direnci sadece tek bir kemoterapötik ilaca değil, yapısal ve işlevsel olarak farklı bir ilaç grubuna karşı da gelişebilir. Tek bir tedaviye uzun süre maruz kalmak ve ilacın tekrar tekrar kullanılması ilaç direncine neden olmakta, bu da ilaçların terapötik etkinliğini azaltmaktadır. Doz değiştirilse bile bu olayda önemli bir değişiklik olmamaktadır. İlaç vücudumuza girdikten sonra farklı bölümlere ayrılarak dolaşıma karışır ve birçok farklı yere dağılarak vücuttan atılır. Tüm bu faktörler yan etkileri, ilacın etkisini ve etki süresini etkiler (Karthika ve ark., 2022). Anti-kanser ilaçlarına direnç gelişiminin nedenleri şekil 7' de özetlenmiştir.



Şekil 7. Anti-kanser ilaç direncinin çeşitli nedenleri (Kaur ve ark., 2020’ den yararlanılarak hazırlanmıştır)

Çeşitli mekanizmalar çoklu ilaç direncine katkıda bulunur. Pek çok iç ve dış faktör, doğrudan veya dolaylı etkiler yoluyla insan kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncinin gelişmesiyle ilişkilendirilmiştir. İlaç akışı, hücresel ilaç seviyelerindeki değişiklikler, ilaç inaktivasyonu, değişen epigenetik durumlar, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), tümör mikro ortamı, DNA hasarı onarımı ve kanser kök hücre yayılımı ilaç direncine katkıda bulunduğu düşünülen mekanizmalardır (Housman ve ark., 2014).

Kanser tedavisi üç bileşenli bir sistem olarak işlev görür: (i) bir tedavi; (ii) bir kanser hücre popülasyonunu hedef alan; (iii) belirli bir konak ortamında. Tedavinin farmakolojik özellikleri, kanser hücrelerinin içsel ve edinsel, fiziksel ve moleküler parametreleri ile dışsal çevresel faktörlerin bir kombinasyonu, klinik tepkilerin spektrumuna neden olur. Kanserde ilaç direncine dair birçok açıklama, içsel ve edinsel direnç arasındaki ikili farklara odaklanmıştır; ancak pratikte, birçok tümör, bu faktörlerin örtüşen kombinasyonları nedeniyle dirençli hale gelir veya zaten dirençlidir. Direncin temel biyolojik prensiplerini tanımlarken, mevcut ve gelecekteki tedavilere karşı direnci anlamak için bir çerçeve oluşturulabileceği önerilmektedir (Vasan ve ark., 2019) (Şekil 8).



Şekil 8. İlaç direncinin biyolojik belirleyicileri (Vasan ve ark., 2019’ dan yararlanılarak hazırlanmıştır).

Antikanser ilaç direnci, anti-insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ilaç direnci, anti-tüberküloz ilaç direnci, antibiyotik direnci, anti-sıtma ilaç direnci ve anti-mikrobiyal ilaç direnci yaygındır. İlaç direncinin çoğunluğuna çoklu ilaç direnç (MDR) proteinleri gibi adenosin trifosfat bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı protein ailesi aracılık eder. ABC ailesinin 100'den fazla üyesi, organizmalardaki hayati önemi olan taşıyıcılardır (Silva ve ark., 2015; Mollazadeh ve ark., 2018; Lai ve ark., 2020; Mirzaei ve ark., 2022). Toksik maddelerin dışarı pompalanması, besin alımı, iyon ve peptit taşıma ve hücre sinyali gibi işlemler ABC taşıyıcılar tarafından gerçekleştirilir (Mirzaei ve ark., 2022). İlaç taşımacılığında ise ABC taşıyıcıları, ksenebiyotik metabolizmasının XXX’ in faz III’ ünde yer alır ve ilaçları dışkı, idrar ve safra gibi sıvılara pompalayarak görev yapar (Döring ve Petzinger, 2014; Mirzaei ve ark., 2022). Ancak, çeşitli hastalıklara ABC taşıyıcı mutasyonları neden olabilir; bunlar arasında kistik fibroz, Dubin–Johnson sendromu, Tangier hastalığı ve kanser bulunmaktadır (Gottesman ve ark., 1996; Hano ve ark., 2018; Seelig, 2020; Mirzaei ve ark., 2022). P-gp, ilk kez 40 yıl önce keşfedildi ve kemoterapi direncini tersine çevirmede potansiyel hedef olarak kabul edilmektedir (Waghray ve Zhang, 2018; Mirzaei ve ark., 2022). P-glikoprotein (P-gp), MDR ailesinin güçlü üyesidir ve çoğu tedavide terapötik etkinliğin azaltılmasında önemli rol oynar (Estevinho ve ark., 2022; Karthika ve ark., 2022). P-gp’ nin rolü ksenebiyotiklerin ve zararlı kimyasalların girişini önleyerek hücreleri korumaktır. Bununla birlikte, kanser hücrelerinde aşırı eksprese edildiği ve ilaca erişimi engellediği için, bu gibi durumlarda terapötik etkinlik için etkisinin azaltılması gerekmektedir (Cavalu ve ark., 2020; Karthika ve ark., 2022). P-gp’ nin ekspresyon düzeyi,

melanom ve merkezi sinir sistemi kanserlerinde %50 ekspresyonunun değiştiği, renal ve kolon karsinomlarında ise yüksek ekspresyon düzeylerine sahiptir (Alvarez ve ark., 1995; Szakacs ve ark., 2004; Mirzaei ve ark., 2022). P-gp' nin ekspresyonu ve aktivitesinde artış, kemoterapiye zayıf yanıt verirken, kemoterapinin başarısızlığı ve kanser ilerlemesinden sorumludur (Leonard ve ark., 2003; Mirzaei ve ark., 2022).

P-gp' nin klinik tümörlerdeki rolü geniş ölçüde karakterize edilmiştir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %50' si, ilaca direnç sağlamaya yeterli seviyelerde P-gp eksprese eder (Fu ve Arias, 2012; Hu ve ark., 2016). Kolon kanseri, tedavinin başlangıcından itibaren kemoterapötik ajanların çoğuna karşı duyarsızdır. Aslında, kolon kanseri tanısı sırasında, çeşitli kolon kanseri hücre soylarının doğal ürünlerden türetilen kanser ilaçlarına karşı içsel direnci ile ilişkili olan yüksek P-gp ekspresyonu gözlenmiştir (Fojo ve ark., 1987; Spoelstra ve ark., 1991; Meschini ve ark., 2000; Hu ve ark., 2016). P-gp ekspresyonu aynı zamanda kanser hücrelerinde kemoterapötik ajanlar tarafından da indüklenebilir (Burger ve ark., 2005; Hu ve ark., 2016). Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1alfa (HIF-1a)' nın, HCT116, HT29, LoVo ve SW480 dahil olmak üzere insan kolon karsinomu dokularında ve kolon hücre soylarında P-gp ekspresyonu ile ilişkili olduğu da rapor edilmiştir (Ding ve ark., 2010; Hu ve ark., 2016). Dolayısıyla kanser hücrelerinde P-gp' nin düzenlenmesinde birden fazla sinyal ileti yolağının rol oynadığı görölmektedir. DNA replikasyon süreçlerini bozan, hızla çoğalan kanser hücrelerini öldüren sitotoksik ilaçlar, özellikle P-gp' nin aşırı aktivitesine karşı savunmasız kalmaktadır. Öte yandan biyokimyasal süreçleri hedef alarak kanser hücre çoğalması ve yayılmasını engelleyen daha yeni ilaçlar da P-gp ile etkileşime girerek direnç mekanizmasını aktif hale getirmektedir. P-gp' nin kanser direncine katkısı açısından, çalışmalar genellikle kanser hücrelerinde P-gp ekspresyonunu baskılamaya odaklanmıştır.

4.7. Fisetin

Flavonoidler şarap, bira ve çay gibi çeşitli içecek ve yiyeceklerde bulunabilirken meyveler, sebzeler, çiçekler ve tohumlar en yüksek miktarda doğal flavonoid içeren kaynaklardır (Rodríguez-García ve ark., 2019; Dias ve ark., 2021). Ancak bu bileşiklerin miktarı bitki çeşidi/genotipi, yetiştirme ortamı koşulları, toprak özellikleri, hasat ve depolama gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Örneğin, kuersetin, kemferol, fisetin (3,7,3',4'-tetrahidroksiflavon 1), isorhamnetin ve mirisetin gibi flavonollar, yeşil yapraklar, meyveler ve tahıllarda bol miktarda bulunur (Terahara, 2015; Dias ve ark., 2021). Marullar, yaban mersini, elma, şeftali ve kırmızı biber gibi gıdalarda özellikle kuersetin ve kemferol açısından zengindirler (Panche ve ark., 2016; Dias ve ark., 2021). Ispanak yaprakları rutin, spinasetin glikozitleri ve patuletin glikozitleri bakımından yüksek miktarlara sahiptir. Brokoli, lahana, hindiba, patates, soğan,

üzüm ve domates ise daha çok kemferol 3-O-glikozitleri içerir (Panche ve ark., 2016; Dias ve ark., 2021). Mirsetin, ceviz, yaban mersini, çay ve aynı zamanda kırmızı şarapta da bulunmaktadır (Basli ve ark., 2012; Panche ve ark., 2016; Dias ve ark., 2021). Fisetin bulunan bazı çiçekler, meyveler, sebzeler ve çaylar Şekil 9’ da özetlenmiştir.

Çiçekler	 Sarı papatya 28 µg/g	 Ihlamur 39 µg/g					
Meyveler	 Elma 26.9 µg/g	 Kivi 2 µg/g	 Trabzon hurması 10.6 µg/g	 Şeftali 0.6 µg/g	 Siyah üzüm 0.255 µg/g	 Çilek 160 µg/g	 Beyaz üzüm 0.176 µg/g
Sebzeler	 Salatalık 0.1 µg/g	 Nilüfer kökü 5.8 µg/g	 Soğan 4.8 µg/g	 Domates 0.1 µg/g			
Çay	 Siyah çay 109 µg/g	 Seylan çayı 174 µg/g	 Yeşil çay 539 µg/g	 Kırmızı çayı 320 µg/g			

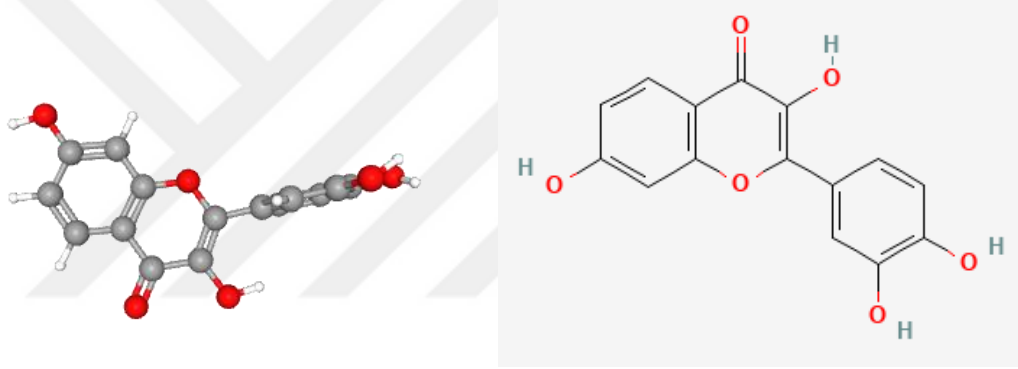
Şekil 9. Fisetin çiçeklerde, meyvelerde, sebzelerde ve çeşitli çaylarda bulunmaktadır (Sundarraaj ve ark., 2018’ den yararlanılarak hazırlanmıştır)

Biyolojik sistemlerde flavonoid bileşikler düşük toksisitelerinden dolayı önemli rol oynamaktadır. Çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarda geniş yelpazede sağlığı destekleyen perspektifler sergilemişlerdir (Chaudhuri ve ark., 2007; Benavente-Garcia ve Castillo, 2008; Abubakar ve ark., 2012; Imran ve ark., 2021). Fisetin, çok iyi antioksidan, anti-parkinson ve anti-kanser aktivitelere sahip önemli fitoflavonoiddir. Farklı araştırmacılar, flavonoidlerin çeşitli insan kanser türlerine karşı kemopreventif rolünü araştırmış ve açıklamıştır (Kumar ve ark., 2021). Genel olarak fisetin bitkilerde bulunan biyoaktif flavonoidlerden biri olarak kabul edilmektedir ve çeşitli serbest radikallerin aracılık ettiği kanserlere ve insan kanserlerine karşı potansiyel ilaç olarak kullanılmaktadır (Sengupta ve ark., 2005; Imran ve ark., 2021). Fisetin sebzelerde (soğan ve salatalık), meyvelerde (hurma, elma, çilek), şarapta ve sert kabuklu yemişlerde sıklıkla bulunur ve konsantrasyonları 2 ila 160 mg/g arasında değişir ve ortalama günlük alım tahmini 0,4 mg’ dır. Besin takviyelerinde fisetin daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılarak hazırlanmaktadır. Fisetin anti-oksidan ve anti-inflamatuar aktivite dahil olmak üzere farklı farmakolojik aktiviteler sergilemektedir. Fisetinin temizleme ve nötralize etme etkilerinden dolayı insan kanser hücre soylarında apoptozu tetikler, hücre döngüsünü kontrol

eder ve siklin bağımlı kinazları (CDK' lar) baskılar. Fisetinin ayrıca lipid kinazı ve protein kinaz yollarını modüle ettiği belirtilmektedir (Park ve ark., 2008; Liao ve ark., 2009; Inkielewicz-Stepniak ve ark., 2012; Imran ve ark., 2021).

4.8. Fisetinin Moleküler Yapısı ve İlaç Etkileşimleri

Fisetin, difenilpropan yapısından oluşur ve üç karbonla oksijenlenmiş heterosiklik halka yoluyla bağlanan ve idame edici olarak bir okso ve dört hidroksil grubuyla kenetlenen iki aromatik halkadan oluşur (Jash, 2014; Zhong ve ark., 2022). Bu yapı biyolojik aktiviteleriyle, özellikle de hidroksil gruplarının sayısı ve bölgesiyle oldukça bağlantılıdır (Kashyap ve ark., 2018; Zhong ve ark., 2022). Araştırmalar, fisetinin B ve C halkasının, flavonollerdeki tipik A halkasına kıyasla daha iyi serbest radikal yakalama yeteneği gösterdiğini ortaya çıkardı. Ayrıca fisetin içindeki hidroksil gruplarının idamesi, biyoaktivitelerini de etkilediği bulunmuştur (Crasci ve ark., 2018; Zhong ve ark., 2022)



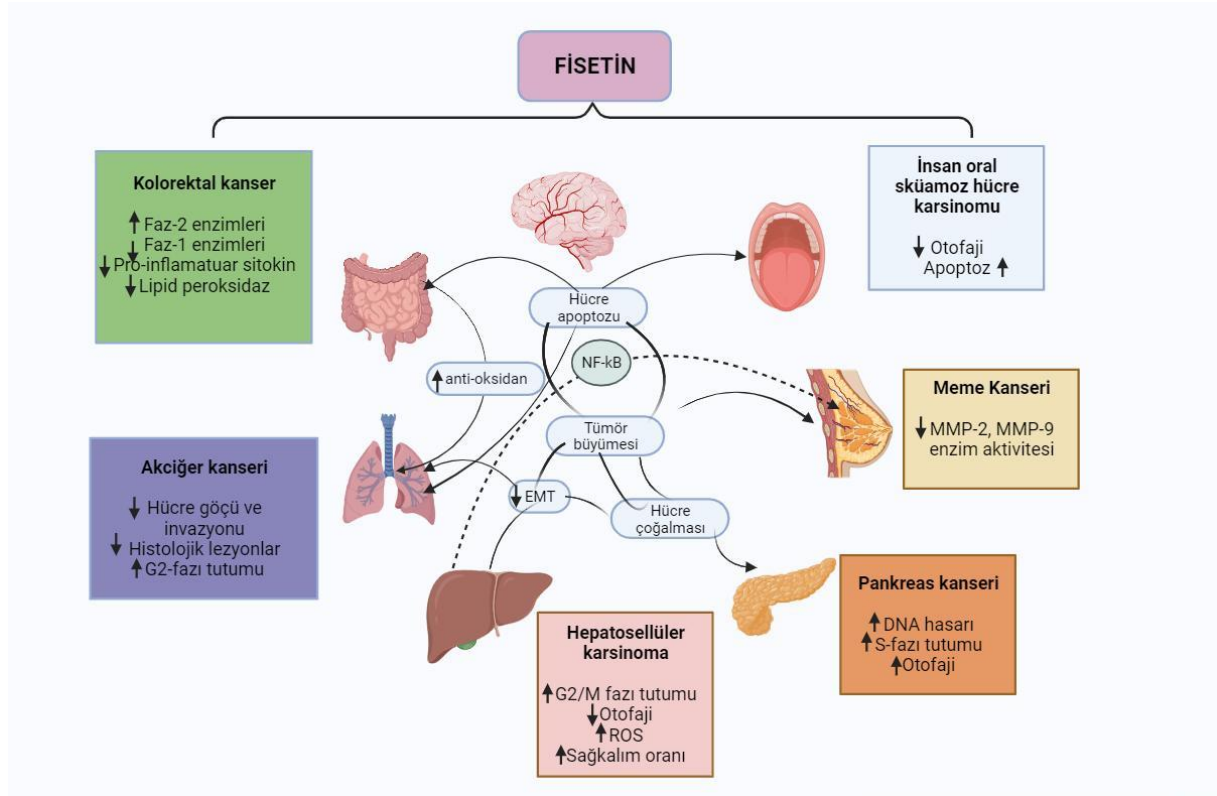
Şekil 10. Fisetinin 2D ve 3D moleküler yapısı (National Enstitutes of Health, 2023)

Fisetin, heterosiklik piran (C-halkası) aracılığıyla bağlanmış iki aromatik halka (A- ve B-halkası) içeren benzersiz bir flavon yapısına sahiptir. C-halkasındaki oksijen grubu, 2 ve 3 karbon atomları arasındaki çift bağ (C2=C3 çift bağı) ve dört hidroksil grubu (C-3, C-7, C-3', C-4'), flavonoid türünü belirler. Altı tane hidrojen bağı alıcısı, dört tane hidrojen bağı vericisi ve bir adet dönebilen bağ ile bir kovalent bağ ünitesi vardır (Pal ve ark., 2014). Yapısal-aktivite ilişkileri (SAR), fisetinin biyolojik aktivitelerini ileten önemli yapısal motiflerin, C2-C3 çift bağının 4-oksopiran grubu ile birlikte ve 3, 7, 3', 4' konumlarındaki hidroksil gruplarını içerdiğini göstermiştir. C-halkasındaki C2=C3 çift bağının 4-oksopiran grubu, halka B elektronlarını etkili bir şekilde dağılımını genişletebilir, bu da daha güçlü antioksidan özelliklere yol açabilir. Ayrıca, 3-OH ve 3', 4'-OH grupları için bağ kopma enerjisi düşüktür; bu da serbest radikallere H bağışlama yetenekleri daha yüksek olduğundan dolayı 7-OH' ın A-halkasındaki etkisinden daha güçlü bir antioksidan etkisi olduğu anlamına gelir (Cao ve ark., 1997; Touil ve ark., 2011; Wang ve Huang, 2018). Fisetinde tip 2 diyabetle ilişkilendirilen Akt-fosforilasyonun

inhibisyonu, C-3, C-3', C-4' ve C2=C3 çift bağdaki OH gruplarından büyük ölçüde etkilenmiştir (Dirimanov ve Hogger, 2019). İnsan voltaj duyarlı K⁺ kanalı (insan eter à-go-go-ilişkili gen) hERG, birkaç kanser hücresinde aşırı ekprese olur. Fisetin hERG K⁺ kanal modülatörü olarak işlev göstermektedir. C2=C3 çift bağı, hERG inhibisyonu için kritiktir, C-3' teki hidroksil grubu ise bu etkide yer almamaktadır (Sun ve ark., 2017). B halkasındaki katekol grubunun lipid peroksidasyonunun bir inhibitörü olarak rol oynadığı görünmektedir ve bu katekol grubu, C halkasındaki 3-OH ile birlikte ve C2=C3 çift bağ, hücre transformasyonunu inhibe edebilir (Heijnen ve ark., 2002; Ichimatsu ve ark., 2007). Fisetin, 5.5 µM IC₅₀ değeri olan etkili bir vasküler endotel büyüme faktörü inhibitörü olarak işlev gördüğü, bunun çoğunlukla A-halkasındaki 7 ve B-halkasındaki 4' pozisyonlardaki OH grupları aracılığıyla gerçekleştiği bildirilmiştir (Ansó ve ark., 2010).

Bir ilacın in vivo farmakolojik etkileri, absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon profilleri de dahil olmak üzere farmakokinetik özelliklerine sıkı bir şekilde bağlıdır (Huang ve ark., 2018; Zhong ve ark., 2022). Bu parametreler, düzenleyici gereksinimlerin, optimal dozajın, dozaj sıklığının ve ilaç uyumunun formülasyonu için önemlidir (Mehta ve ark., 2015; Mehta ve ark., 2017). Birçok in vivo çalışma, flavonoid metabolitlerinin insan vücudu içinde ana mevcut formlarının, metabolik dolaşımda aglikonlarının değil sülfat ve glukuronik asitleri olduğunu doğrulamıştır (Chao ve ark., 2002). Bir farmakokinetik çalışma, fisetin intravenöz (i.v.) uygulama sonrasında (10 mg/kg) Sprague-Dawley sıçanlarında kuyruk damarından hızlı bir şekilde emildiğini ve glukuronitlere ve sülfatlara dönüştüğünü göstermiştir. Ortalama serum düzey-zaman profilleri, fisetin ana formunun hızlı bir şekilde azaldığını ve eş zamanlı olarak glukuronitlerin ve sülfat/glukuronitlerin arttığını göstermiştir (Shia ve ark., 2009). Çalışmalar, 2,3-çift bağ ve hidroksi gruplarda 3 ve 5-substitüsyon gösteren flavonolların aynı şekilde fisetin için de geçerli olan, P-gp ile yüksek bağlanma afinitesi gösterdiğini belirtmektedir (Boumendjel ve ark., 2001). Sonuçlar, fisetin P-gp' ye yüksek afinitesinden dolayı safra atılımının bununla düzenlendiği gösterilmiştir (Huang ve ark., 2018). Kanser tedavisinde hücrelerin çoğalmasını durdurarak vücut içinde büyüme ve yayılmasını engelleyen ana mekanizmalardan biri kemoterapidir. Kemoterapi birçok hastada saç dökülmesi, yorgunluk, kusma ve kardiyotoksisite gibi tedavi ile ilişkili yan etkiler yaratmaktadır (Imran ve ark., 2021). Bu nedenle, daha güvenli kanser tedavisi için bu yan etkilerin önlenmesi daha mantıklı ve uygundur. Fisetin gibi flavonoidlerin karaciğer, kolon, meme, akciğer, over kanseri gibi birçok insan kanser türlerinde kemopreventif rolünü değerlendiren birçok çalışma bulunmaktadır (Li ve ark., 2011; Yang ve ark., 2012; Kang ve ark., 2015; Kumar ve ark., 2019). Antioksidan kapasitesi ve serbest radikal yakalama etkileri nedeniyle, fisetin farklı insan kanser hücreleri ve

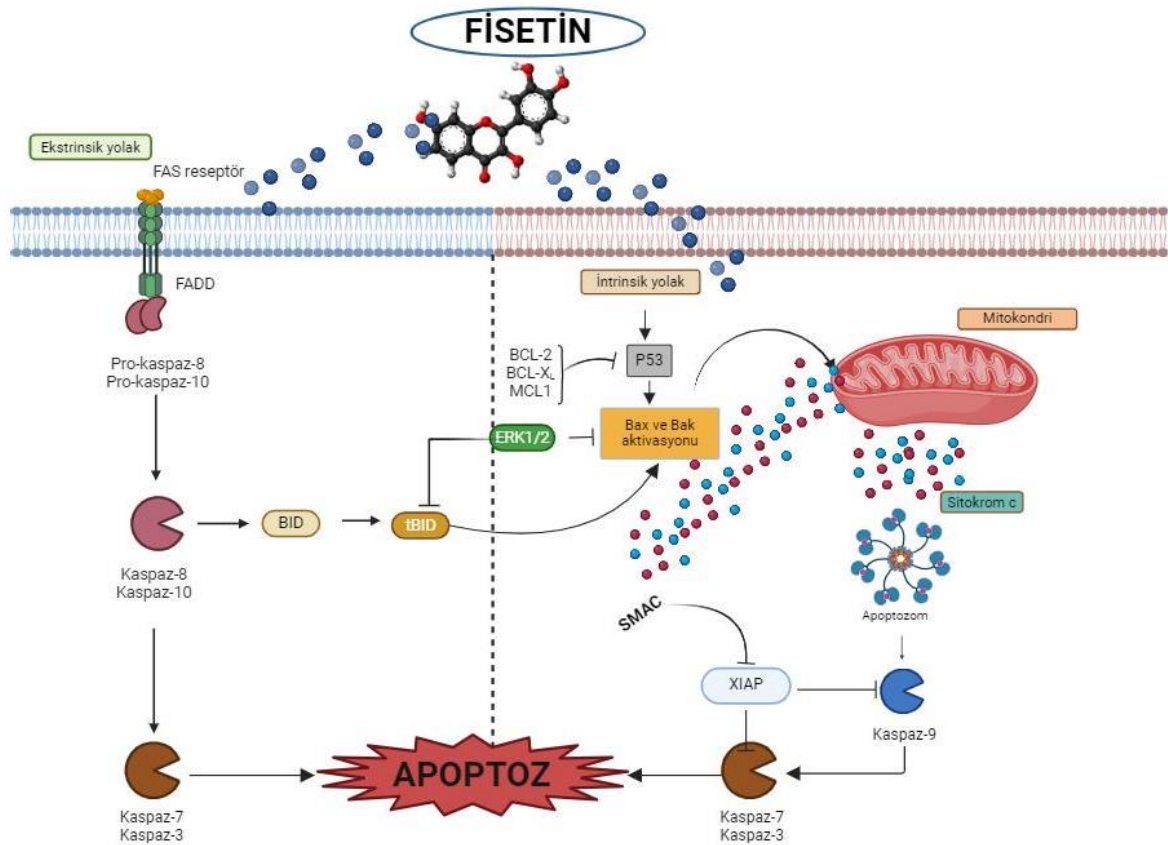
xenograft tümörlerine karşı çeşitli mekanizmalar aracılığıyla antikanser etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Şekil 11). Fisetin kanser hücre proliferasyonunu inhibe etme, hücre döngüsü ilerlemesini önleme ve apoptoz indüksiyonu dahil birden fazla mekanizma aracılığıyla antikanser etki göstermektedir. Son in vitro ve in vivo çalışmalar, fisetin' in çeşitli kanser türlerindeki moleküler hedeflerini doğrulamıştır (Şekil 11) (Park ve ark., 2008; Inkielewicz-Stepniak ve ark., 2012).



Şekil 11. Fisetinin farklı kanser türlerine ve altta yatan moleküler mekanizmalara karşı potansiyel terapötik hedefleri (Zhong ve ark., 2022' den yararlanılarak hazırlanmıştır)

Fisetinin kombinasyon terapisi hücre canlılığını inhibe etme, hücre göçünü engelleme ve apoptozu tetikleme konularında daha etkin olabilir (Qaed ve ark., 2023). Ektrinsik yolak boyunca fisetin, kaspaz-8' i aktive etmek için önce pro-kaspaz-8' i uyarır ve kaspaz-8' i aktive eder, ardından BID' i tBID' e aktive eder. Ayrıca, kaspaz-8, kaspaz-3' ü aktive ederek apoptozu tetiklemektedir. Fisetin tarafından p53' ün aktivasyonu ile Bax/BAK miktarının artması ve BcL-2, BcL-XL, MCL-1 tarafından negatif olarak düzenlenen BcL-2' nin inhibe edilmesi apoptozu gerçekleştirir. ERK1,2, tBID' i negatif olarak düzenler, Bax/Bak' ı aktive eder. Bu da doğrudan fisetin tarafından başlatılan, cyt c' nin salınımına ve ROS' un aşırı üretimine yol açar, 5'-adenozin monofosfat aktive edilmiş protein kinaz (AMPK)' nın uyarılması ve apoptotik proteaz aktive edici faktör (APAF)' in etkisi altında apoptozom oluşumu, ardından kolektif

olarak kaspaz-9' u ve kaspaz-3' ü aktive ederek apoptoza yol açar. Ayrıca, hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9, negatif olarak SMAC/DIABLO tarafından düzenlenen PARP tarafından inhibe edilir. AMPK' nın aktivasyonu, cyt c' nin üretimine yol açarak Bid, apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve Bax/BcL-2 oranının artışı aktive eder, bu da kaspaz-3 ve kaspaz-9' un aktivasyonuna yol açarak apoptozun artmasına neden olur (Qaed ve ark., 2023). Fisetinin kolorektal kanser hücrelerinde apoptoz yollarına etkileri Şekil 12' de özetlenmiştir:



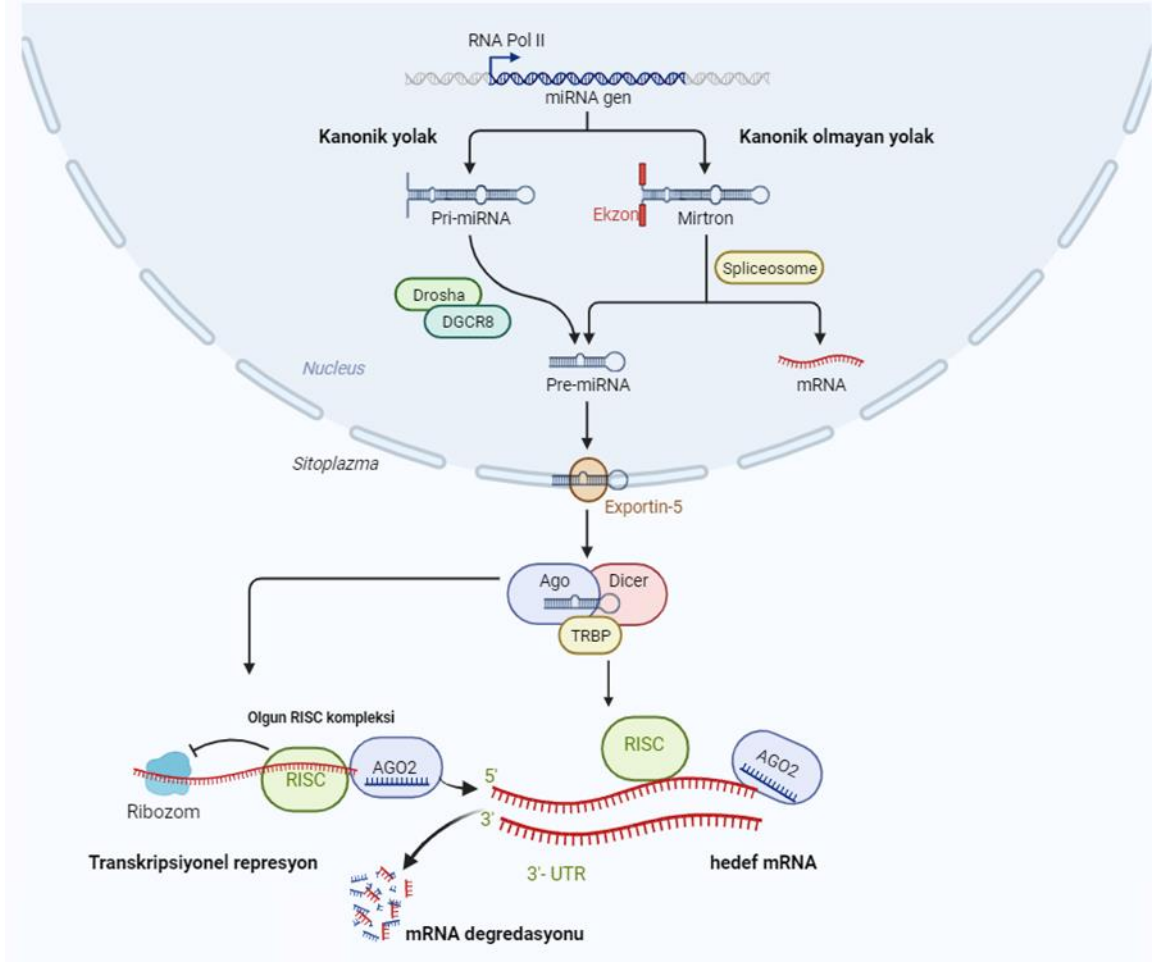
Şekil 12. Kolorektal kanser hücrelerinde fisetin apoptoz yollarına etkileri (Qaed ve ark., 2023' den yararlanılarak hazırlanmıştır) (Kısaltmalar: Bax, B hücre lenfoma 2 ile ilişkili x protein; MCL1, miyeloid hücre lösemi-1, BcL-2 Aile Üyesi; Cyt c, sitokrom c; ROS, Reaktif oksijen türleri; AIF, apoptozu indükleyici faktör; (Smac/DIABLO), İkinci mitokondrilardan türetilmiş kaspaz aktivatörü/doğrudan düşük pI ile apoptoz bağlayıcı protein; AMPK, adenosin monofosfat-aktive protein kinaz) ("↓" uyarmak için "⊥" inhibe etmek için kullanılır; düz çizgi doğrudan eylemi temsil eder; noktalı çizgi birkaç süreç üzerinden eylemi temsil eder).

Melatonin, COX-2/iNOS, NF-κB/P300 ve cyt c bağımlı apoptozu inhibe eder. Melanoma hücrelerinde fisetin etkisi bir sinyal yolağını amplifiye etmiştir (Yi ve ark., 2014; Qaed ve ark., 2023). BRAF mutasyonlu insan melanoma hücrelerine, fisetin ve BRAF inhibitörü sorafenib birlikte uygulandığında çoğalmanın önemli ölçüde yavaşladığı belirtilmiştir. Kaspaz-3 ve PARP parçalanması, Bax, Bak ekspresyonunda artış yanı sıra BcL-2 ve MCL-1' in inhibisyonu apoptozdaki artışa katkıda bulunmaktadır (Lin et al., 2016; Qaed et al., 2023). Farklı bir çalışmada, Hsp90 inhibitörleri geldanamisin ve gibberellin, mitokondriyal bağımlı

kaspaz-3 kaskadını tetikleyerek ve p53 proteininin fosforilasyonunu hızlandırarak fisetin tarafından indüklenen insan kolon kanseri hücrelerinin sitotoksitesini arttırmıştır (Wu ve ark., 2014; Qaed ve ark., 2023). Kronik miyeloid lösemi hücrelerinde fisetin ve hesperidinin hücre sinyal iletimini kontrol ederek, apoptoz ve hücre döngüsünün durmasına neden olduğu bildirilmiştir (Adan ve Baran, 2016; Qaed ve ark., 2023). Fisetinin pankreas kanseri hücre soyu AsPC-1' de, DR3 aracılı NF- κ B aktivasyonunu engellediği, apoptozu indüklediği ve invazyonu önlediği gösterilmiştir (Murtaza ve ark., 2009). İnsan mesane kanser hücrelerinde preaseton tarafından indüklenen apoptoz p53 yukarı regüle ederken, NF- κ B aktivitesi azalır ve pro-apoptatik ile antiapoptotik proteinler arasındaki oranı değiştirir. Fisetin, Bax ve Bak ekspresyonunu artırırken, Bcl-2 ve Bcl-XL seviyelerini düşürerek mitokondriyal ölüm yolunu aktive eder. Benzer sonuçlar otolog mesane kanseri ile tedavi edilen farelerde de görülmüştür (Li ve ark., 2011; Li ve ark., 2014; Qaed ve ark., 2023). Fisetinin, COX-2' nin aşırı eksprese olduğu insan kolon kanseri hücre soyu HT29' da epidermal büyüme faktörü reseptörü/NF- κ B aracılı apoptozu uyardığı belirtilmektedir (Suh ve ark., 2009)

4.9. MikroRNA

Yaklaşık 30 yıl önce *Caenorhabditis elegans* da mikroRNA' lar tespit edilmiştir. Bu türdeki miRNA' ların bilinmesinden önce *Drosophila* moleküler genetik çalışmalarından genel düzenleyici ve hedefleme prensiplerinin anlaşıldığı bildirilmiştir (Lai ve Posakony, 1997; Leviten ve ark., 1997; Lai ve ark., 1998; Shang ve ark., 2023). 2001 yılında ökaryotlarda miRNA' lar küçük RNA sınıfı olarak tanımlanmasıyla bilimsel disiplinlerde bu yeni düzenleyici paradigmaya yönelik yoğun araştırmalar tetiklenmiştir (Lagos-Quintana ve ark., 2001; Lau ve ark., 2001; Lee ve Ambros, 2001; Shang ve ark., 2023). Sonraki on yıl, korunmuş miRNA lokuslarının ana katalogları, miRNA biyogenezi ve fonksiyonunda merkezi olan moleküler faktörleri ve bunların düzenleyici mekanizmaları ortaya çıkarıldı (Shang ve ark., 2023). miRNA' ların biyogenezi, primer miRNA (pri-miRNA)' ların çekirdekte ve sitoplazmada adım adım işlenerek oluşmaktadır. miRNA' lar, ~22 nükleotit uzunluğunda ve bir veya daha fazla hairpin yapısı içeren daha uzun primer miRNA (pri-miRNA) transkriptinden türemiş olan RNA' lardır (Şekil 13). Çoğu miRNA hairpin yapısı kodlanmayan transkriptlerden veya intronlardan türetilirken az sayıda miRNA protein kodlayan genlerin ekzonlarıyla örtüşmektedir (Bartel, 2018).



Şekil 13. miRNA, miRNA biyosentezi ve mekanizması. Çekirdek içinde, miRNA geni RNA polimeraz II tarafından pri-miRNA'ya transkript edilir. Drosha ve DGCR8'in yardımıyla, pri-miRNA pre-miRNA'ya dönüşür. Daha sonra, Ran/GTP/Exportin-5 kompleksi pre-miRNA'yı sitoplazmaya taşır. Sitoplazmada, Dicer, bir miRNA dupleksi elde etmek için terminal halkasını ayırır. Dicer, TRBP ve PACT'in yardımıyla, pre-miRNA tek iplikçiklere ayrılır ve AGO2 ve RISC ile birleşerek olgun RISC kompleksini oluşturur. Son olarak, RISC kompleksi hedef mRNA'ya bağlanarak mRNA'nın parçalanmasına veya translasyonunun baskılanmasına neden olur (Yang ve ark., 2022' den yararlanarak hazırlanmıştır) (Ücretsiz BioRender programı ile tasarlanmıştır).

En çok korunan miRNA' lar (yani, omurgalılar arasında paylaşılanlar), iki RNaz III enzimi içeren bir kanonik yol kullanılarak oluşturulur (Şekil 13). İlk olarak, bir pri-miRNA transkriptinin hairpin yapısı, RNaz III Drosha molekülünün iki kopyasıyla bağlı olan nükleer mikroişlemci kompleksi tarafından 'kırpılır', böylece ~55-70 nükleotit uzunluğunda bir öncü miRNA (pre-miRNA) hairpin yapısı ortaya çıkar. Pre-miRNA, sitoplazmaya taşınır ve RNaz III Dicer tarafından terminal döngüye yakın bir yerde kesilerek miRNA dupleksi elde edilir, bu da Argonaute (Ago) protein ailesinden bir üye ile etkileşime girer. miRNA* türünün atılmasını takiben (aynı zamanda yolcu iplik olarak da bilinen), dupleksin sekans ve yapısal özellikleri tarafından düzenlenen bir süreçle, olgun tek iplikli miRNA bağlanır. miRNA-Ago etkileşimi, miRNA hedeflemesinin özgüllüğünün belirlenmesinde çok önemli bir adımdır. Ago

kompleksinin yönlendirmesiyle komplementer RNA hedeflerinin baskılamasına neden olur (Yang ve Lai, 2011). Drosha bağımsız ve/veya Dicer bağımsız olabilen ek kanonik olmayan miRNA yolları mevcuttur (Czech ve Hannon, 2011). Bu tür atipik yolların bilinmesi, hem Drosha hem de Dicer RNase III enzimlerini etkili bir şekilde atlayarak fonksiyonel miRNA'lar üretebilen sentetik substratların tasarlanmasına olanak tanır (Maurin ve ark., 2012; Shang ve ark., 2015; Shang ve ark., 2023). miRNA biyogenez süreci her adımda çok dikkatli düzenlenir. Düzensizlik meydana gelirse kanser, nörodejeneratif bozukluklar ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olabilir (Bofill-De Ros ve Vang Orom, 2024).

4.10. Kanserde MikroRNA' ların Rolü

Başlangıçta kodlamayan miRNA' ların insan sağlığı üzerinde ciddi bir etkiye sahip olabileceği ve hatta kanserin ortaya çıkmasına ve ilerlemesine yol açabileceği düşünülmüyordu. miRNA' ların sürekli araştırılması bu görüşü yavaş yavaş değiştirdi. miRNA' lar yalnızca hücre gelişimi, metabolizma, çoğalma ve apoptoz gibi çeşitli biyolojik süreçlerdeki normal fizyolojik aktiviteleri düzenlemek için kritik değildir, aynı zamanda kanserin ilerlemesinde de önemli bir rol oynar (Y. Chen ve ark., 2019; Tong ve ark., 2019; Yang ve ark., 2022). 2002 yılında Calin ve diğerleri (Calin ve ark., 2002), kronik lenfositik lösemide (CLL) 13q14' te bulunan (miR-15 ve miR-16) miRNA genlerinin genellikle delesyon ve ekspresyon analizi ile silindiğini (deleted) veya düşük düzeyde ekprese olduğunu gösterdi. Bu çalışma, miRNA' ların tümör oluşumu ve tümör ilerlemesinde önemli rol oynayabileceğini öne sürmektedir. Bu nedenle, o tarihten günümüze, KKK' nın oluşumu ve gelişimi de dahil kanser ilerlemesiyle miRNA' ların anormal ekspresyonunun ilişkili olduğunu gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır (Li ve ark., 2018; Tang ve ark., 2019; Stang ve ark., 2021; Yang ve ark., 2022).

Bağırsak mikrobiyomu, KKK bağışıklık düzenlemesinde ve tümörü teşvik eden mikro ortamda önemli bir katılımcı olarak kabul edilir, çünkü farklı bağırsak kaynaklarından gelen bakteriler, tümör büyümesini tetikleyebilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bağırsak mikropları ile tümör hücresi metabolizmasındaki konakçı arasındaki çapraz bağlantının büyük ölçüde miRNA seviyelerinin düzenlenmesiyle sağlandığını belirtmektedir (Yuan ve ark., 2019; Xing ve ark., 2022; Yang ve ark., 2022). Bağırsak mikrobiyotası miRNA ekspresyonunu etkileyebilir ve miRNA' nın anormal ekspresyonu daha sonra sinyal yollarını aktive ettiği ve KKK' daki tümör patobiyolojisinin çeşitli yönlerini düzenlediği önerilmiştir (Li ve ark., 2014; Yang ve ark., 2022).

KRK' nın ilerlemesinde ve metastazında, onkogenlerin, tümör baskılayıcı genlerin çoklu genetik ve epigenetik değişiklikleri olan çok aşamalı süreç sonucudur. Ayrıca metastaz KRK hastalarında kötü prognozun önemli nedenidir. Son yıllarda, KRK patogenezi ve metastazında yer alan çok sayıda düzenleyicide miRNA' ların önemli rolleri tanımlanmıştır. Son zamanlarda, kolorektal kanser ilerlemesi ve metastazı düzenleyen miRNA' ların sinyal yollarını, EMT' yi ve anjiyogenezi gibi çeşitli mekanizmaları etkileyerek gerçekleştiği giderek daha fazla kabul görmektedir (Yang ve ark., 2022). Kanser hücre transformasyonunda önemli rol oynayan miRNA' lar, tümör gelişimi ve ilerlemesi veya hücre döngüsünün inhibisyonunda rol oynayan genleri hedefleyerek tümör baskılayıcı genler veya onkogenler (oncomiR' ler) olarak da işlev görebilir. Tümörlerde aşırı eksprese olan, tümör baskılayıcı mRNA' ları baskılayan ve tümör hücresi çoğalmasını ve metastazı uyaran günümüze kadar kanser büyümesinde farklı rollere sahip tanımlanmış birçok farklı oncomiRNA vardır (Svoronos ve ark., 2016; Chakraborty ve ark., 2023). Kanserde oncomiR' ler yukarı doğru düzenlenir ve hedef tümör baskılayıcı genleri baskılar. Buna karşın, malignitede tümör baskılayıcı miRNA' lar aşağı yönde regüle edilir ve bunun sonucunda hedef onkogenler aşırı ekspres edilir (Svoronos ve ark., 2016; Saliminejad ve ark., 2019).

miRNA' lar, yukarı regüle edilen ve aşağı regüle edilen miRNA' lar olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. Çalışmalar, miRNA' ların normal gelişimde ve çeşitli hastalık koşullarında, viral enfeksiyonlar, immunolojik bozukluklar ve çeşitli kanser türleri de dahil olmak üzere düşük ve yüksek düzeyde eksprese olduğu gösterilmiştir (Mehta ve Baltimore, 2016; Y. Chen ve ark., 2019; Bhowmick ve ark., 2020; DeVeale ve ark., 2021; Ricafrente ve ark., 2021; Khan ve ark., 2022). Kanser vakalarında, bir dizi miRNA, çeşitli hücre dışı sinyallere yanıt olarak onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu hassas olarak düzenlemektedir (Esquela-Kerscher ve Slack, 2006; Kai ve ark., 2018; Huang ve ark., 2020; Khan ve ark., 2022; Pagotto ve ark., 2022). Çeşitli kanserlerde birçok miRNA' nın aşırı ifadesi olduğu ancak birçok tümörde çoğu miRNA' nın düşük düzeyde olması miRNA' ların onkojenik özelliklere kıyasla tümör baskılama özelliklerini işaret etmiştir (Garzon ve ark., 2010; Toden ve ark., 2021; Khan ve ark., 2022). Fakat bazı çalışmalarda, miR-7 gibi spesifik miRNA' lardan bazılarının, onkogenleri veya tümör baskılayıcı genleri hedef alarak aynı anda oncomiR veya tümör baskılayıcı miRNA olabildiği rapor edilmiştir (Svoronos ve ark., 2016; Saliminejad ve ark., 2019).

KRK' nın patogenezi ve metastazında önemli rol oynayan araçlardan biri de mir-21' dir. miR-21 geni, kromozom 17 üzerinde yer alır ve bir anahtar (onkogen) oncomiR'dir. Prostat kanseri dahil birçok karsinomda aşırı eksprese edilir. Protein tirozin fosfotaz ve tensin homologu (PTEN)

dahil bir dizi tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu baskılayarak çoğalmayı, migrasyonu ve çoklu ilaç direncini teşvik eder (Feng ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2020; Zhao ve ark., 2021). miR-21' in daha düşük ifadesi, JAK/STAT3 basamakları gibi sinyal yollarını hedefleyerek apoptozu indükler ve diğer miR' lerle işbirliği yapabilir veya sinerjistik olarak performans gösterebilir olduğu önerilmiştir (X. Zhou ve ark., 2010; Zhao ve ark., 2021). miR-21, PTEN, Tropomiyosin 1 (TPM1) ve programlanmış hücre ölümü 4 (PDCD4) aşağı düzenlenmesi ile ilişkilidir. miR-21' in aşırı ekspresyonu meme, yumurtalık, kolon vb. gibi çeşitli kanserlerde rapor edilmektedir (Özgün ve ark., 2013; Echevarria-Vargas ve ark., 2014; Menon ve ark., 2022; Chakraborty ve ark., 2023). Meme, akciğer, yumurtalık, kolon, prostat, pankreas ve mide kanseri hastalarının serum, plazma ve tümör dokularında da yüksek miR-21 seviyeleri rapor edilmiştir. miR-21' in aşağı regülasyonunun kanser çoğalmasını azalttığı ve pankreas, yumurtalık ve meme kanserlerinde ilaç direncini tersine çevirdiği önerilmiştir (Si ve ark., 2007; Sicard ve ark., 2013; Chan ve ark., 2014; Chakraborty ve ark., 2023). KRK' nın ilerlemesi PTEN' in baskılanmasının, PI₃K yolağının güçlenmesi ile ilişkili olan miR-21 tarafından kontrol edildiği önerilmiştir (Drebber ve ark., 2011). Schetter ve arkadaşları, miR-21 aşırı ekspresyonunun kolon adenokarsinomu hastalarında kötü klinik sonuçlar ve düşük sağkalım oranıyla bağlantılı olduğunu göstermiştir (Schetter ve ark., 2008). miR-21, KRK hücrelerinde kök hücre özelliklerini tetikler. Ayrıca, miR-21, HT29 ve HCT116 hücre soylarında 5-FU ve oksaliptatin temelli klinik rejimlere duyarlılığı azaltarak hücre çoğalmasını tetiklediği önerilmiştir (Yu ve ark., 2015; Mehrgou ve ark., 2021). Başka bir çalışmada miR-21'in ekspresyonu kolon kanser hücrelerinin eksozomlarında normal insan kolon epitelyal hücrelerine kıyasla belirgin derecede yüksek düzeyde bulunmuştur (Sun et al., 2020). Jiang ve ark. tarafından yapılan çalışmada, morfolojik olarak, HCT-116 ve HT-29 hücre soylarına miR-21-3p veya miR-21-5p inhibitörlerinin yanı sıra miR-21-5p mimiklerinin transfeksiyonu, hücre ölümüne neden olmuştur (Jiang et al., 2021).

Çeşitli kanser türlerinde miR-181 yukarı regüle edilen oncomiR'dir (Tian ve ark., 2022; Chakraborty ve ark., 2023). İnsanlarda, miR-181a kromozom 1' de bulunmaktadır. miR-181a-5p, miR-181a' nın olgun, tek bir zinciridir (Yang ve ark., 2014; Su ve ark., 2019). miR-181a-5p, meme tümör ilerlemesini N-Myc downstream-ilişkili gen 2 (NDRG2) aracılığıyla destekleyerek PTEN/AKT sinyal yolağının aktivasyonunu teşvik eder ve RTK sinyal antagonisti 4 (SPRY4), PH domain, lösin bakımından zengin tekrarlanan protein fosfat 2 (PHLPP2) ve inositol polifosfat 4-fosfat tip II (INPP4B) inhibitörlerini engeller (Strotbek ve ark., 2017; Tian ve ark., 2018; Zhai ve ark., 2022; Chakraborty ve ark., 2023). İnsan mikroRNA-181a-1' in (hsa-miR-181a) anormal ekspresyonunun, çeşitli kanserlerin

patogenezinde onkogen veya tümör baskılayıcı olarak rol aldığı gösterilmiştir. miR-181 paraloglarının (yani miR-181a, b, c, d) hücre tiplerinin mitokondrileri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zheng ve ark., 2021). miR-181, doza duyarlı olarak kromozom X üzerindeki adrenal hipoplazi kritik bölgesini, gen 1'i (DAX-1) hedefleyerek prostat kanseri hücre proliferasyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Tong ve ark., 2014; Chakraborty ve ark., 2023). Oral skuamöz hücreli karsinomda miR-181 artışı, kötü prognoz ve sağkalım ile ilişkili olup melanomda ise ilaç direnci ile ilişkili olduğu önerilmiştir (Barbato ve ark., 2021; Chakraborty ve ark., 2023).

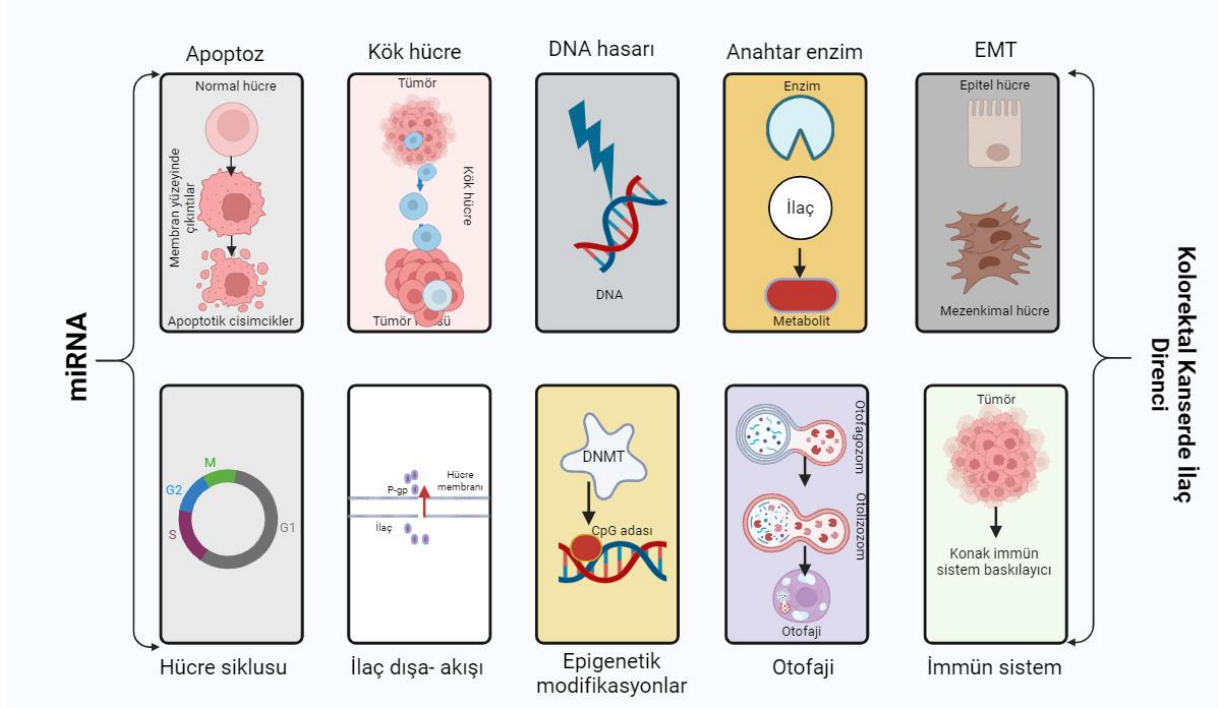
İnsan miR-381'in (hsa-miR-381) kodlayıcı geni, kromozom 14' ün uzun kolunda bulunur ve endotel hücrelerinin apoptoz ve proliferasyonunda yer alan miR-154 gen ailesinin üyesidirler (Guo ve ark., 2020). miR-381-3p seviyeleri ile apoptoza duyarlılık arasında doğrudan negatif bir ilişki olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Meng ve ark., 2021). miR-381 kanserdeki işlevini hücre çoğalmasını, apoptozu, hücre döngüsü ilerlemesini, hücre göçünü ve invazyonunu düzenleyerek gösterir. miR-381 lenfanjiyogenez ve tümör anjiyogenezini de düzenler (Sha ve ark., 2022). Diffüz büyük B hücreli lenfoma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde miR-381 gen ekspresyonu azalmaktadır (Rothschild ve ark., 2012; Leivonen ve ark., 2017; Tian ve ark., 2017; Xuan ve ark., 2019; Jin ve ark., 2020; Sha ve ark., 2022). miR-381, sindirim sistemi ile ilgili birçok kanserde; renal hücreli karsinom, mesane, prostat, yumurtalık, endometriyal ve rahim ağzı kanseri gibi ürogenital neoplazmların yanı sıra oral skuamöz hücreli karsinom dahil özofagus skuamöz hücreli karsinom, mide kanseri, kolorektal kanser, hepatoselüler karsinoma ve pankreas kanserinde aşağı yönde düzenlenmektedir (Formosa ve ark., 2014; He ve ark., 2016; Xia ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2016; Cao ve ark., 2017; X. Yang ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2017; Zhou ve ark., 2017; Liu ve ark., 2018; Tu ve ark., 2018; Chan ve ark., 2019; Li ve ark., 2019; Rui ve ark., 2019; Shang ve ark., 2019; Xie ve ark., 2019; Yin ve ark., 2019; Sha ve ark., 2022).

miR-181a ifadesinin KRK' da bağımsız anlamlı bir prognostik faktör olduğunu ve PTEN' in miR-181a' nın aday hedef geni olduğu gösterilmiştir. KRK' da miR-181a ifadesi ve prognostik değeri analiz edilmiş ve miR-181a' nın artışının daha kötü bir prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca miR-181a ifadesinin, klinikopatolojik faktörlerle ilişkili olmadığı önerilmiştir (Nishimura ve ark., 2012). miR-181a' nın tiroid kanseri (He ve ark., 2005; Pallante ve ark., 2006) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde arttığı, glioma hücrelerinde ise azaldığı gösterilmiştir (Shi ve ark., 2008; Nishimura ve ark., 2012). Kanaan ve ark., miR-181a' nın inflamatuvar bağırsak hastalığı ile ilişkili KRK' da neoplastik olmayanlardan (non-neoplastik) displaziye ilerleme sürecinde arttığını, displazinin kansere evrildiğinde ise miR-

181a ifadesinin azaldığını rapor etmiştir. Bu çalışmada, normal ve kanser dokusunda miR-181a ifadesinde fark bulunmamıştır (Kanaan ve ark., 2012). Xi ve ark. tarafından yapılan araştırmada, HCT-116 ve null-p53 HCT-116 hücrelerinde miRNA ekspresyonu dizi analizi yapılarak karşılaştırılmış ve miR-181a' nın kısmen p53 geni tarafından kontrol edildiği bulunmuştur. Bu bulgular, miR-181a' nın KRK' nın karsinogenez ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (Xi ve ark., 2006). miR-381 mide kanserindeki rolüne benzer olarak KRK' da Twist1'in negatif regülatörü olarak da görev yapabilir. miR-381 doğrudan epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) indükleyicisi Twist1' i hedef alarak KRK' da hücre göçünü ve invazyonu kısıtlamaktadır. Aynı zamanda Twist1' in aşağı regülasyonu KRK hücrelerinin çoğalmasını da engellemektedir (He ve ark., 2016). KRK' da ubikuitin konjuge edici enzim E2C (UBE2C) ekspresyonunun anormal yukarı regülasyonu olduğu ve UBE2C ifadesinin miR-381 tarafından modüle edildiği belirtilmektedir. miR-381, UBE2C ifadesini azaltır, böylece hücre çoğalmasını, hücre göçünü azaltır ve hücre apoptozunu teşvik ederek KRK' da baskılayıcı etki yapmaktadır (Y. Zhang ve ark., 2018).

4.11. MikroRNA ve İlaç Direnci Mekanizması

miRNA' ların anormal ifadesinin, KRK' nın ilerlemesi, metastazı ve ilaç direnci ile yakından ilişkili olduğu öne sürülmektedir (Yang ve ark., 2022). Birçok miRNA, KRK' da düzensizdir ve bazıları, ilaç metabolizmasını, ilaç dağıtımını, DNA hasarı tepkisini ve hücre apoptozunu düzenleyerek anti-kanser tedavilerine verilen yanıtlarla ilişkilidir (Zheng ve ark., 2010). KRK tedavisindeki temel sorunlardan biri erken teşhis edilememesidir. Çoğu zaman hastalık, kanser hücrelerinin yayılmasından sonra teşhis edilmesinden dolayı kemoterapi bir süre sonra hastalığın ilerlemesini engelleyemez ve dolayısıyla tümör hücrelerinin ilaca direncine sebep olur (Van der Jeught ve ark., 2018). İlaç direnci, tedavi başarısızlığıyla ilişkili, iyi tanımlanmış bir olgudur. Kanserde kemodirenç kemoterapi ilaçlarına karşı gelişmektedir (Housman ve ark., 2014). Günümüzde, P-gp gibi ilaç taşıyıcıları aracılığıyla hücre içi ilaç konsantrasyonlarının azalması, hücre döngüsünün bozulması, apoptoz, DNA hasarı onarım mekanizmaları, anormal DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi çeşitli mekanizmalar rapor edilmiştir (Kutanzi ve ark., 2011). KRK de ilaç direncinde miRNA' ların moleküler mekanizmaları Şekil 14' te gösterilmiştir.



Şekil 14. KRK ilaç direncinde miRNA'ların moleküler mekanizmaları. P-gp (P-glikoprotein), EMT (epitelyal-mezenkimal geçiş), otofagozom küresel yapısı, lizozom, bir otofagozom ve bir lizozomun füzyonu sonucu oluşan otolizozom, DNMT (DNA metiltransferaz) (Pouya ve ark., 2022' den uyarlanarak hazırlanmıştır).

5-FU ve/veya kapesitabin, KRK' daki temel tedavilerden biridir ve vücuttaki etki mekanizması DNA replikasyonunu inhibe etmektir. Bu fonksiyon, DNA'da florlu nükleotidlerin timidin ile yer değiştirmesine yol açar ve hücre ölümü meydana gelir (Van der Jeught ve ark., 2018). Bu nedenle, tümör hücrelerinde miRNA ifade profilleri değişir. miRNA' nın nasıl etki ettiğini açıklayan iki moleküler mekanizma bulunmaktadır. miRNA, KRK' daki kanser hücrelerini 5-FU' ya duyarlı hale getirmek için hedef genin 3'-UTR mRNA' sına bağlanır. mRNA ve miRNA eşleşmesi tamamlandığında, hedef kesilir ve protein ifade edilmez. Ancak hatalı baz çiftlerinde, hedef protein sessizleştirilir veya ifade seviyesi azalır. miRNA ayrıca, mRNA hedef üzerinde ters blokaj oluşturarak veya transkripsiyon etkinliğini düzensizleştirerek translasyonel re-programlamaya neden olabilir . KRK hücrelerinin 5-FU' ya maruz kalması, bazı miRNA' ların sağlıklı hücrelere kıyasla arttığını ve bazılarının azaldığını göstermiştir. KRK tümör hücrelerinde artan miRNA' lar onkojenik, azalanlar tümör baskılayıcı olup 5-FU' ya karşı ilaç direncinin indüklenmesine yol açar (J. Zhou ve ark., 2010; Blondy ve ark., 2020). Ayrıca çalışmalar, 5-FU' nun ilaç direncini indüklemekde miRNA' ların metabolik enzimleri, ABC taşıyıcı proteinleri, hücre döngüsünü, apoptozu ve epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) modüle ettiğini göstermiştir (Bartel, 2004; Yang ve ark., 2014; Jiang ve ark., 2015; Deng ve ark., 2016).

5-FU anabolizma veya katabolizma yollarındaki enzimlerin, birincil işlevlerini kaybederek 5-FU' ya dirençli hale geldiği gösterilmiştir (Blondy ve ark., 2020). Ayrıca miRNA' ların 5-FU

direncinde önemli rollere sahip olduğu önerilmiştir (Su ve ark., 2015). Çeşitli çalışmalar, miRNA' ların çeşitli mekanizmalar yoluyla kanserin ilerlemesinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir. miRNA' lar, farklı türdeki tümör baskılayıcıları ve onkogenleri hedef alarak kanserdeki moleküler yolakları düzenlemektedir (Zhang ve ark., 2007). Düzenleyici işlevleri kanser kök hücre biyolojisi, anjiyogenez, epitelyal-mezenkimal geçiş, metastaz ve ilaç direncinde de rapor edilmiştir (Kong ve ark., 2012). İlaç direnci açısından, hücre içi ilaç birikiminin azalması, DNA hasar onarımının artması, apoptozun azalması ve onkogenlerin ve tümör baskılayıcıların düzensizliği gibi çeşitli faktörler söz konusudur. miRNA' lar ilaç direnci sürecinde kritik öneme sahiptir (Xie ve ark., 2016).

İlaç taşıyıcılarının ve ilacı metabolize eden enzimlerin aşırı ekspresyonu, önemli hücrel savunma mekanizmalarıdır ve kemoterapötik ajanların ve bunların metabolitlerinin hücrel emilimini, dağılımını ve atılımını düzenlemede önemli rollere sahiptir (Gatti ve Zunino, 2005; Baguley, 2010). Son zamanlarda, miRNA' larla ilgili birçok çalışma, ilaç akışı ve metabolizmasında rol oynayan bir hedef gen alt kümesini göstermiştir (Kovalchuk ve ark., 2008; Pan ve ark., 2009; Xin ve ark., 2009). Kolorektal kanser hücrelerinde miR-522 doğrudan ABCB5' i hedefleyerek hücre sağkalımını ve doksorubisin direncini baskıladığı gösterilmiştir (Yang ve ark., 2015). Wang ve arkadaşları, KRK' da miR-26b tümör baskılayıcının aşırı ifadesinin, hücreleri 5-FU tedavisine duyarlı hale getirdiği ve P-gp ekspresyonundaki azalma ile ilişkilendiğini gösterdi (B. Wang ve ark., 2018). Öte yandan, MRP8 veya ATP-bağlayıcı kaset C11 (ABCC11)' in baskılanması yoluyla (miR-302, miR-369, miR-200c) miRNA' ların ekspresyonu KRK hücrelerinin 5-FU' ya duyarlılığını artırabilir (Guo ve ark., 2003; Miyazaki ve ark., 2015; Arlanov ve ark., 2016). Bu nedenlerden dolayı, sırasıyla tümör baskılayıcı miRNA' ların ekspresyonunun uyarılması ve ABC taşıyıcılarının ekspresyonunun azaltılmasında ve arttırılmasında rol oynayan onkogenik miRNA' ların ekspresyonunun inhibe edilmesi, KRK' da ABC taşıyıcılar tarafından indüklenen ilaç direncinin azaltılmasına önemli ölçüde yardımcı olabilir (Pouya ve ark., 2022).

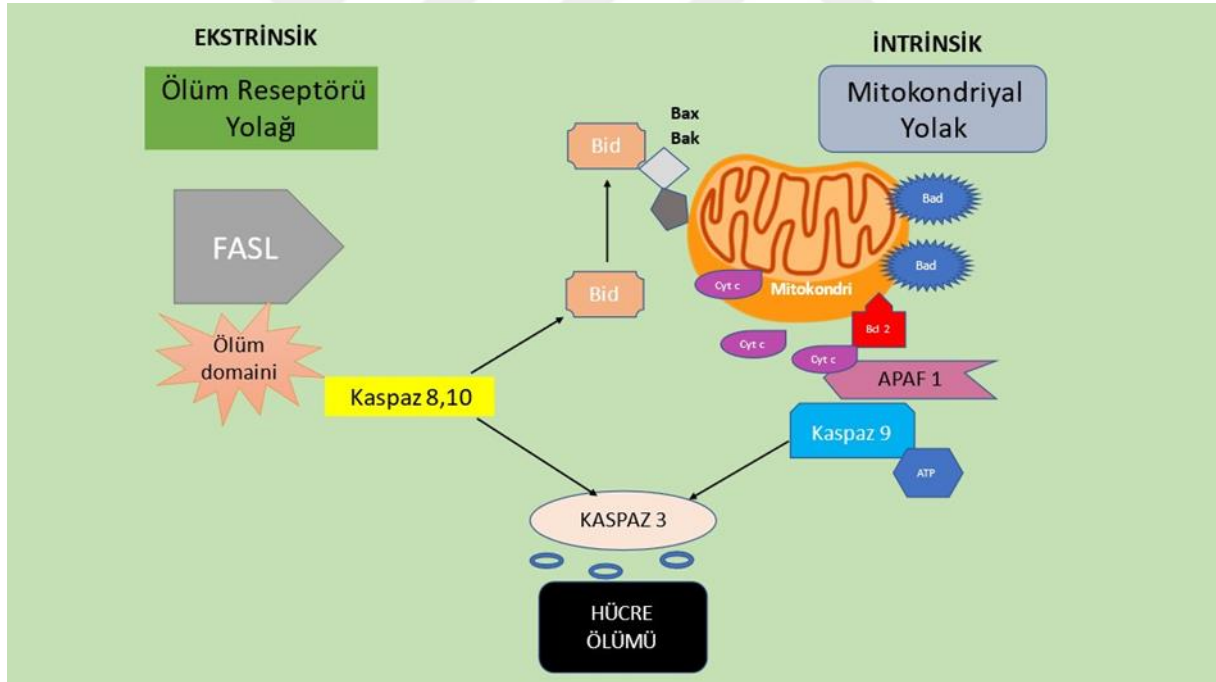
Birçok miRNA, apoptozla ilişkili genlerin, özellikle Bcl-2 ailesi genlerinin ekspresyonunu indükleyerek ilaç direncinde önemli bir rol oynar. KRK' da 5-FU' ya karşı ilaç direncinde, miR-206' nın düşük ekspresyonu, apoptozun inhibe edici bir faktörü olarak Bcl2' nin aşırı ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Meng ve Fu, 2018). miR-148a, miR-125a-5p ve miR-143' ün aşırı ifadesi Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı önerilmiştir (Zhang ve ark., 2011; Tong ve ark., 2015) . KRK hücrelerinde miR-143' ün kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ekspresyonunu indükleyerek apoptozu artırdığı gösterilmiştir (Borralho ve ark., 2009). Kolon kanseri hücrelerinde miR-520g' nin aşırı ifadesi, in vitro ve in vivo apoptozu inhibe ederek 5-

FU veya oksaliplatine karşı kemodirenci arttırmıştır (Zhang ve ark., 2015). 5-FU ve diğer kemoterapötik ilaçlara karşı toksisite ve ilaç direnci, KRK tedavisinde önemli sorunlardır. Çok sayıda çalışmada, ilaç taşınımı, hücre döngüsünün durması, DNA hasarı onarım mekanizmaları, apoptoz, otofaji, anahtar enzimler, epigenetik, EMT, kök hücre, immün sistem gibi çeşitli hücrel mekanizmaların bozulmasıyla KRK' da ilaç direncinin gelişiminde miRNA' ların önemi gösterilmiştir (Pouya ve ark., 2022).

4.12. Kolorektal Kanser Hücrelerinde Apoptoz

Apoptoz, hasarlı ve fazla hücrelerin uzaklaştırılmasını içeren önemli biyolojik süreçtir. Ayrıca yaşlanma, doku homeostazisi ve hücre büyümesi gibi diğer birçok biyolojik süreçlerde de rol oynar. Bütün dokular, hücre sayılarını ve doku boyutlarını düzenli bir şekilde kontrol edebilmeli ve homeostazi tehdit eden hücrelere karşı kendilerini koruyabilmelidir. 1970'lerin başlarında, Kerr ve arkadaşları, sağlıklı dokuların ölü hücrelerinde meydana gelen tek hücre ölümü fenomenini gözlemlediler; aynı zamanda teratogenez, neoplazi, tümör regresyonu, atrofi ve involüsyon ile ilişkilendirilen hücrelerde de bu fenomeni gözlemlediler. Apoptoz adı verilen bu hücrel süreci tanımlamak için, Yunanca kökenli terimler (apo=icin, ptosis=düşme) seçildi (Kerr ve ark., 1972; Hengartner, 2000; Perl ve ark., 2005). Programlanmış hücre ölümü, olgunlaşmadan önce veya sonra istenmeyen hücreleri veya potansiyel olarak reaktif hücre hatlarını ortadan kaldırır. Bu süreç, fetal ve embriyonik gelişim ile doku remodellemede hayati öneme sahiptir (Perl ve ark., 2005). Kerr ve arkadaşları, apoptotik hücrelerin nekrotik hücrelerden farklı birçok morfolojik özelliği paylaştığını gözlemlemiştir (Kerr ve ark., 1972). Apoptoz geçiren hücreler; hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, nükleozomal parçalanma ve plazma zarının tomurcuklanması gibi özelliklerden bir veya daha fazlasını sergilemektedir. Apoptozun biyokimyasal özellikleri, DNA fragmentasyonu, belirli yerlerde protein parçalanması, mitokondriyal membran geçirgenliğinde artış ve hücre zarı yüzeyinde fosfatidilserinin görünmesini içermektedir (Ziegler ve Groscurth, 2004; Perl ve ark., 2005). Pro-apoptotik proteinlerin salınmasına ve ardından apoptotik cisimlerin oluşumuna yol açan mitokondriyal geçirgenlikte artış olur. Ortaya çıkan membrana bağlı apoptotik cisimler, komşu hücreler veya makrofajlar tarafından yok edilir. Apoptoz tek hücreli bir olaydır ve inflamatuvar bir reaksiyona neden olmaz (O'Brien ve Kirby, 2008). Hücre yapısındaki çok sayıda benzersiz morfolojik değişikliklerin yanı sıra bir dizi enzime bağımlı biyolojik süreç, apoptozun özellikleridir. İki temel apoptotik sinyal yolağı vardır: dışsal ve içsel apoptotik yollar (Verbrugge ve ark., 2010; Su ve ark., 2015). İçsel (veya mitokondriyal) apoptotik yolak; DNA hasarı, sitotoksik ilaç tedavisi, büyüme faktörü yoksunluğu ve / veya oksidatif stres dahil olmak üzere çeşitli hücre içi uyaranlar tarafından tetiklenir. Bu yolak prokaspaz-9, Apaf-1 ve cyt c'

den apoptozom oluşur. Bcl-2 aile üyesi; Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bid ve Bim, mitokondriyal membran geçirgenliğini düzenleyerek cyt c salınımını kontrol eder. Cyt c gibi pro-apoptotik faktörler, gözenekler yoluyla mitokondriden dışarı sızar ve apoptozu indükler. Dışsal yolak (Ölüm reseptörü yolağı); Fas ve tümör nekroz faktör (TNF) reseptörü hücre zarında lokalizedir. Ölüm reseptörlerinin Fas ligand (FasL), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) lenfotoksin alfa vb. ligandlarla etkileşimi ile prokaspaz-8 kaspaz-8' e dönüşümüne kaspaz kaskadı aktive olur (Slee ve ark., 1999; Verbrugge ve ark., 2010; Tabas ve Ron, 2011; Su ve ark., 2015; CELEPLİ, 2020). Apoptozom kompleksindeki kaspaz bileşeni kaspaz-9, mitokondriden cyt c salınımını aktive eder. Kaspaz-9, bir cdk1 substratı olarak tanımlanan ilk kaspaz olarak tanımlanmıştır. İçsel yolaktaki kaspaz-9 gibi, kaspaz-8' in aktivitesi de translasyon sonrası modifikasyon, özellikle fosforilasyon ile değiştirilebilir. Kaspaz-8 doğrudan tirozin kinazlar tarafından düzenlenebilir. Kaspaz-3 efektör kaspazdır ve kaspaz kaskadının düzenlenmesine ve kaspaz substratlarının karakterizasyonuna yönelik çalışmalarla, kaspaz-3' ün kaspaz-7 ve kaspaz-6 ile hem farklı olan hem de örtüşen rolleri vardır (Slee ve ark., 1999; Lakhani ve ark., 2006; Luthi ve Martin, 2007; Inoue ve ark., 2009; Parrish ve ark., 2013) (Şekil 15).



Şekil 15. Apoptotik sinyal yolları; içsel (intrinsik) ve dışsal (ekstrinsik) (CELEPLİ ve ark., 2020' den yararlanılarak hazırlanmıştır).

Kaspazlar, Bax, Bcl-2, p53 ve cyt c gibi proteinler apoptotik sürecin kontrolünde rol oynar. Hücrenin apoptotik süreçte proapoptotik proteinler (Bax ve cyt c) ve AIF seviyeleri eş zamanlı olarak yükselir. Öte yandan apoptoz, anti-apoptotik protein Bcl-2 tarafından inhibe edilir. Bcl-

2, kaspaz öncülleri ile birlikte AIF ve cyt c' nin salgılanmasını durdurarak apoptozu inhibe eder (Ayna ve ark., 2020; Kizil ve ark., 2023; Varisli ve ark., 2023; Alian ve ark., 2024).

BcL-2 ailesinin, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu tarafından tetiklenen içsel apoptotik yolağın desteklenmesinde veya inhibe edilmesinde anahtar bir rol oynadığı keşfedilmiştir (Mohan ve ark., 2012; Vela ve Marzo, 2015). Bu nedenle bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri arasındaki denge, hücreyel kaderi belirlemektedir. Son on yılda yürütülen çeşitli çalışmalarda BcL-2 ailesinin ana üyeleri olan Bax ve BcL-2, tümörün ilerlemesi ve farklı insan malignitelerinin prognozunda potansiyel rolleri ilgi odağıdır. Bax, farklı hücreyel streslere yanıt olarak mitokondriyal dış zarın geçirgenleştirilmesiyle hücre ölümünü teşvik eder. Buna karşılık BcL-2, Bax'ın aktivitesini inhibe ederek apoptozu önler (Mohan ve ark., 2012). Kolorektal kanser hücrelerinde Bax ekspresyonunun yokluğunun, farklı kemoterapötik ajanlar tarafından tetiklenen apoptoza karşı direnci indükleyebildiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2000; Rashmi ve ark., 2005; Nehls ve ark., 2007). Bax ekspresyonunun kolorektal kanserin bağımsız bir prognostik ve prediktif belirteci olarak kullanılması durumunda çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda daha uzun sağkalım ile tümör hücrelerinde artan Bax ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmiştir (Sturm ve ark., 1999; Zeestraten ve ark., 2013). Bununla birlikte, diğer çalışmalarda Bax ve BcL-2 ekspresyonlarının aşağı regülasyonu ve yukarı regülasyonu sırasıyla daha iyi sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Tsamandas ve ark., 2007; Zeestraten ve ark., 2013). Ancak, tümör hücrelerinde Bax eksikliği veya düşük ifadesine sahip olan hastalar, yüksek ifadeye sahip olanlara kıyasla 5-FU bazlı yardımcı terapilerden fayda sağlamaktadır (Tsamandas ve ark., 2007).

Bax/BcL-2 oranı, hücrenin apoptoza duyarlılığını belirleyen bir reostat görevi görebilir (Raisova ve ark., 2001). Bu oranın düşük seviyeleri insan kanser hücrelerinin apoptoza karşı direncine yol açabilir. Dolayısıyla Bax/BcL-2 oranı tümörün ilerlemesini ve agresifliğini etkileyebilir (Khodapasand ve ark., 2015). Kolorektal kanserde BcL-XL gen ekspresyonunun prognostik ve prediktif rolü bazı araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir (De Angelis ve ark., 1998; Jin-Song ve ark., 2011). Sonuç olarak, Bax ve Bcl-2 ekspresyonu, kolorektal tümörlerde Bax/Bcl-2 ekspresyon oranı olarak birleştirildiğinde, tek başına Bax ve/veya Bcl-2 genlerinin ekspresyon seviyeleriyle karşılaştırıldığında, sonuç açısından en fazla öngörü sağladığı görülmektedir. Ayrıca, benzer terapötik duruma, tümör evresi ve farklılaşması gibi tümör özelliklerine sahip daha büyük homojen hasta kohortları üzerinde daha fazla analiz yapılması, hastalığın prognozu, hastanın sağkalımının tahmin edilmesi, tümörün nüksetmesi ve ayrıca kemoterapötik tedaviye yanıt dahil olmak üzere farklı yönlerden çok yararlı olabileceği öngörülmüştür (Khodapasand ve ark., 2015).

Apoptozun merkezi yürütücüleri olan kaspazlar geniş bir protein ailesinin parçasıdır (Alnemri ve ark., 1996; Hengartner, 2000). Bugüne kadar 14 kaspaz tanımlanmıştır. Spesifik kaspazlar, sitoplazmada prokaspaz adı verilen inaktif öncüler olarak nispeten fazla miktarlarda bulunmaktadır. Prokaspazlar; (1) başka bir aktive edilmiş kaspaza maruz kalma, (2) otokataliz veya (3) kaspaz-9, Apaf-1 ve cyt c gibi bir aktivatör protein ile birleşmesi gibi üç yöntem ile aktive edilebilir (Hengartner, 2000). Apoptozda rol oynayan kaspazlar, başlatıcı kaspazlara (2, 8, 9, 10) ve efektör (veya yürütücü) kaspazlara (3, 6, 7) bölünmüştür. Başlatıcı kaspazlar adaptör aracılı kendi kendine bölünme ile aktive edilir. Kaspazların ve aktivatör proteinin spesifik etkileşimi, birbirini aktive etmek ve aktif bir tetramer üretmek üzere 2 kaspaz öncüsünü bir araya getirmek için gerekli olan multimerik bir kompleksin oluşumunu teşvik eder (Martin ve ark., 1998; Yang ve ark., 1998). Bu kaspaz kaskadı aktivasyon stratejisi, başlatıcı kaspazlar tarafından efektör kaspazları parçalamak ve aktive etmek için kullanılır (Padanilam, 2003). Etkinleştirildiğinde efektör kaspazlar, bir aspartat kalıntısını takip eden sınırlı sayıda hedef proteini seçici olarak böler. Çoğu durumda bu, hedef proteinin inaktivasyonu ile sonuçlanır. Bununla birlikte, negatif bir düzenleyici alanı doğrudan keserek veya düzenleyici bir alt birimi etkisiz hale getirerek dolaylı olarak proteinleri de etkinleştirebilirler (Andrade ve ark., 1998; Hengartner, 2000). Efektör kaspazlar sitoskeletal (hücre iskelet yapısında) filament agregasyonuna, ribozomal parçacıkların kümeleşmesine ve elektron mikroskopunda görülen bir dizi konsantrik dolgu oluşturacak şekilde pürüzlü ER' nin yeniden düzenlenmesine neden olurlar. Kaspazlar aynı zamanda nükleer çekilme ve tomurcuklanma için gereken nükleer laminleri parçalamak, hücresel şekil kaybına ve zar tomurcuklanmasına neden olmakla sorumludur (Rao ve ark., 1996; Buendia ve ark., 1999; Hengartner, 2000). Kaspazlar, apoptozun ikinci özelliği olan nükleer DNA' yı parçalayan kaspazla-aktifleşen DNAaz' ları (CAD) aktive edecektir. CAD, bir alt birime bağlandığında çekirdekte aktif olmayan bir formda (ICAD) bulunur. Efektör kaspaz-3 aktive edildikten sonra çekirdeğe göç eder ve inhibitör alt birimi parçalayarak CAD' yi aktive eder (Nagata, 2000). CAD, DNA' nın 50-300 kb' lik parçalara bölünmesinden sorumludur ve daha sonra CAD endonükleazlarla 180-200 bp' lik parçalara bölünür. Apoptozun biyokimyasal belirteçlerinden biri DNA parçacıklarının merdiven biçiminde agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesidir (Power ve ark., 2002).

Sitokrom c, mitokondri kaynaklı apoptozda önemlidir ve solunum zincirinin temel bileşeni olarak enerji metabolizmasının önemli bir bileşenidir (Zou ve ark., 1999; Renault ve ark., 2013). Mitokondriyal cyt c' nin hücresel enerji metabolizması ve apoptozda ikili rol oynadığı gösterilmiştir. Cyt c, sitoplazmaya salındıktan sonra, ATP veya dATP bağlamında pro-kaspaz-9' u aktive etmek için adaptör molekülü Apaf-1 ile birleşir. Kaspaz-9 ve kaspaz-3,

aktifleştirilmiş kaspaz-9 tarafından aktive edilir, bu da apoptozun intrinsik mitokondri yolu olarak tanımlanmıştır (Robertson ve ark., 2000). Apoptotik süreçte önemli başlangıç basamağı, cyt c' nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasıdır. Mitokondriyal elektron taşıma zincirinin bileşeni olan cyt c, kompleks III (ubikinol: cyt c oksidoredüktaz) ve kompleks IV (sitokrom oksidaz) arasındaki elektron transferinde önemli bir rol oynamaktadır (Cai ve ark., 1998). Cyt c, hasarlı mitokondrinin geçirgenleştirilmesiyle indüklenen apoptozu takiben bir saat içinde hücre dışı boşluğa ve dolaşıma salınan mitokondriyal biyobelirteçtir (Renz ve ark., 2001). Sonuç olarak cyt c, mitokondri aracılı apoptozda önemli bir aracı ve biyobelirteç olarak kabul edilir. Literatür, serum cyt c düzeyinin lösemi ve akciğer kanseri de dahil olmak üzere kanser tedavisi boyunca prognozu öngördüğünü göstermiştir; bu da cyt c' nin tümör oluşumu ve gelişiminde rol oynayabileceğini göstermektedir (Barczyk ve ark., 2005; Osaka ve ark., 2009; Wen ve ark., 2014; Rana ve ark., 2022).

Kapesitabin, klasik antimetabolik kemoterapi ilacıdır ve kolorektal kanser gibi malign tümörler için birinci basamak kemoterapi ilacı haline gelmiştir (Di Desidero ve ark., 2018; Schmoll ve ark., 2021). Son çalışmalar, kapesitabinin hepatoselüler karsinom (HCC) gibi hepatik tümörler üzerinde de terapötik etkisinin iyi olduğunu doğrulamıştır (Gardini ve ark., 2017; Ravaioli ve ark., 2017; De Lorenzo ve ark., 2018; Trevisani ve ark., 2018). 2017' de Ravaioli ve ark. kapesitabin metronomik kemoterapisinin, sorafenibe benzer şekilde bir yıllık sağkalım oranına ulaştığını bulmuşlardır (Ravaioli ve ark., 2017). Bulguları, kapesitabinin hem immünsupresif hem de antikanser etkilere sahip potansiyel bir ilaç olabileceğini öne sürmüştür ve bu tedavinin HCC' li karaciğer transplantasyon hastalarında önemli klinik uygulama değerine sahip olabilir olduğu belirtilmiştir (Reigner ve ark., 2001). Ayrıca, kanser dokusunda TP' nin ekspresyonu çevresel normal dokulardan önemli ölçüde daha yüksektir ve bundan dolayı, daha yüksek 5-FU konsantrasyonu kanser dokusunda antikanser etki gösterir (Schüller ve ark., 2000). Bu nedenle, TP' nin dağılımı, kapesitabinin rol dağılımını belirlemektedir. TP aynı zamanda lenfositlerde de yüksek oranda ifade edildiğinden kapesitabinin kanser hücrelerini ve lenfositleri aynı anda hedefleme yeteneği de diğer bir özelliğidir. Bu iki farmakolojik özellik, kapesitabinin hem immünsupresif hem de antikanser etkilere sahip bir ilaç olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Yoshimura ve ark., 1990).

Kolorektal kanserdeki genomik instabilite kaynaklı sürekli genomik değişiklikler, apoptozu düzenlemede rol oynayan genlerde değişikliklere neden olabilir (Ansari ve ark., 1993). Apoptozun daha fazla inhibisyonunun kolorektal epitelyumun KRK' ya geçişi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Bedi ve ark., 1995). APC, bağırsak epitelinin apoptoz bozukluğu ve KRK

ilerlemesi ile ilişkilendirilen iyi karakterize edilmiş genlerden biridir (Koornstra ve ark., 2003). Kolon kanseri hücre büyümesinin kontrol edilmesinde APC, β -kateninin aracılık ettiği gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde hayati rol oynamaktadır (White ve ark., 2012). Yabancılık tip APC, ubiquitin aracılığıyla proteasomal bozunma yoluyla kadherin ile kompleks oluşturan β -kateninin bozunmasını indükler. Kırılmış APC proteinleri, degradasyon için, nükleer β -kateninin stabilizasyonunu teşvik eden degradasyon için β -kateninin hedeflenmesini önler (Pritchard ve Grady, 2011) ve Wnt yolağının (Adams, 2003) sürekli aktivasyonuna neden olarak apoptotik mekanizmanın bozulmasına ve KRK' nın ilerlemesine yol açar. β -katenin çekirdeğe göç eder ve T-hücre faktörü/lenfoid gelişim faktörü (TCF/LEF) transkripsiyon kofaktörüne bağlanır, bu da apoptoz, hücre göçü, kök hücre farklılaşması, hücre çoğalması ve hücre büyüme gibi sorumlu genlerin ifadesini etkiler (Sattler ve ark., 1997; Sancho ve ark., 2003; Sansom ve ark., 2004). β -katenin aktivasyonu aynı zamanda apoptoz başlatıcı pro-kaspaz 9, efektör kaspaz-3 ve kaspaz-7 ve cyt c ekspresyonunu da azaltabilir (Kim ve ark., 2003) (Kim ve ark., 2003). Pro- ve anti-apoptoz proteinleri arasındaki denge bozukluğu, kolonik hücrelerinin apoptoza girmesini önleyebilir (Chen ve ark., 2003). Radyoterapiye ve kemoterapötik ilaçlar gibi apoptotik uyaranlara karşı direnç kazanabilecekleri öngörülmüştür (Chen ve ark., 2003; Green ve Kaplan, 2003). Fisetin, DNA hasarının onarımında anahtar enzim olan PARP' ın parçalanmasını artırır ve genellikle parçalanmış PARP apoptozda yararlı bir belirteç olarak kabul edilmektedir. Bu flavonoid, HCT-116 ve HT29 hücrelerinde kaspaz-9, kaspaz-3 ve kaspaz-7' nin parçalanmasını artırırken, normal mitokondriye sahip hücrelerin sayısını azaltır ve depolarize mitokondri zarları olan hücrelerin sayısını arttırmaktadır. Ayrıca fisetin, sitoplazmadaki Smac/Diablo ve cyt c seviyelerini artırır ve mitokondrideki seviyeleri azaltmaktadır (Khan ve ark., 2019). Fisetin, kaspaz-8 (Lim ve Park, 2009) ve kaspaz-3' ün parçalanmasını ve cyt c' nin ekspresyonunu artırır. Fisetin tedavisi kemoterapi dirençli hücrelerde, dirençli olmayan tümör hücrelerinden daha yüksek düzeyde cyt c salınımına neden olur (Lim ve Park, 2009; Jeng ve ark., 2018). Diğer çalışmalar, fisetin ile tedavinin hücrelerde pro-survival proteini Bcl-2 ve Bcl-XL seviyelerini düşürdüğünü, aynı zamanda pro-apoptotik Bak proteinin seviyelerini artırdığını göstermiştir. Fisetinin Bax seviyelerini etkilemediği (Lim ve Park, 2009; Suh ve ark., 2009), ancak Bax seviyelerinin hücrelerin sitoplazmasında azaldığı ve mitokondri içinde arttığı gösterilmiştir (Lim ve Park, 2009). Yapılan çalışmalar, fisetin kolon kanseri tedavisinde umut verici bir ajan olarak ortaya çıkmasına neden olmuştur (Jeng ve ark., 2018).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Kimyasal maddeler ve reaktifler

Genel laboratuvar kimyasalları Tablo 3'te listelenmiştir.

Tablo 3. Genel kimyasallar

Akrilamid	Biorad
Amonyum persülfat	Sigma-Aldrich
Anti-Tavşan Immunoglobulin G	Sigma-Aldrich
Asetik asit	Merck
β -Merkaptoetanol (50mM)	Sigma-Aldrich
Bisakrilamid	Sigma-Aldrich
Bromfenol mavisi	Merck
Bromo kloro indol fosfat (BCIP)	Promega/Invitrogen
Coomassie parlak mavisi R250	Sigma-Aldrich
Etanol	Merck
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich
ECL	İnvitrogen
Glisin	Sigma-Aldrich
Gliserol	Sigma-Aldrich
HCl	Merck
Hepes	Sigma-Aldrich
Kalsiyum klorür	Sigma-Aldrich
Kristal viyole	Merck
Magnezyum klorür	Sigma-Aldrich
Metanol	Merck
N, N, N', N',-tetrametiletildiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Nitroblutetrazolyum (NBT)	Invitrogen
Nonidet P40 (NP40)	Amresco
Nonidet P40 (NP40)	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Potasyum klorür	Merck
Potasyum hidroksit	Horasan Kimya
Potasyum bifosfat	Merck
Protein Ladder Marker	İnvitrogen
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma-Aldrich

Tablo 3. Genel kimyasallar (devam)	
Sodyum asetat	Sigma-Aldrich
Sodyum bikarbonat	Sigma-Aldrich
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Sodyum karbonat	Merck
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum hidrojen fosfat	Merck
Sodyum klorür	Merck
Sodyum orthovanadate	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
Triton-X100	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Sigma-Aldrich
Fenil metil sulfonil florid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Aprotinin	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Pepsitatin A	Sigma-Aldrich
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor cocktail	Merck
Üre	Sigma-Aldrich
Bitkisel bileşik (flavon) 'Fisetin'	Glenthams Life Sciences
Kemoterapötik ajan 'Kapesitabin'	Selleckchem

5.1.2. Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar

Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar Tablo 4' te listelenmiştir.

Tablo 4. Hücre kültür solüsyonları

HEPES	Sigma-Aldrich
Penisilin/Streptomisin	Sigma-Aldrich
RPMI-1640	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)	Pan Biotech
Sodyum bikarbonat	Sigma
Tripan mavisi	Sigma
L-Glutamin	Sigma
Fetal sığır serumu (FSS)	Pan Biotech
Fosfat tamponlu salin	Gibco
Tripsin-EDTA (10X)	Capricorn

5.1.3. Western emdiriminde kullanılan antikorlar

Western emdiriminde kullanılan antikorlar Tablo 5’ de listelenmiştir.

Tablo 5. Western emdiriminde kullanılan antikorlar

Alkalen fosfotaz eşlenik tavşan anti keçi IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Alkalen fosfataz eşlenik keçi anti tavşan IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
HRP-eşlenik keçi anti tavşan IgG (H+L)	Abcam
AIF antikor	Cell signalling
Kaspaz-3 antikor	Invitrogen
Kaspaz-8 antikor	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Kaspaz-9 antikor	Cell signalling
Sitokrom c antikor	Invitrogen
BcL-2 antikor	Invitrogen
Bax antikor	Invitrogen
Aktin antikor	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

5.1.4. Sarf malzemeler

Sarf malzemeler Tablo 6’ da listelenmiştir.

Tablo 6. Sarf malzemeler

IBLOT transfer stack	Invitrogen
Nitroselüloz membran	Schleicher&Schuell
NOVEX Tris-Glisin %10-20 Jel 10W	Invitrogen
25 cm ² kültür kabı	TPP
75 cm ² kültür kabı	TPP
96 kuyulu hücre kültür plakası	TPP
48 kuyulu hücre kültür plakası	TPP
24 kuyulu hücre kültür plakası	TPP
12 kuyulu hücre kültürü plakası	TPP
6 kuyulu hücre kültürü plakası	TPP
Filtreli pipet uçları (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	TPP
Serolojik pipet uçları (5ml, 10ml, 25ml)	TPP
Mikroskop slide	Bio-Rad
Eppendorf tüpler (500µl, 1.5ml, 2ml)	CAPP
PZR tüp	greiner BIO-ONE
Parafilm	3M
Whatman filtre kağıdı	Whatman
Eldiven	Beybi

5.1.5. Kitler

Kitler Tablo 7’ de listelenmiştir.

Tablo 7. Kitler

RNA MiniPrep Plus w/ TRI Reagent	ZymoResearch
cDNA Synthesis Kit	abm
cDNA Synthesis Kit	NEPENTHE
SYBR No-ROX Kit	Bioline
BCA Protein Assay Kiti	Pierce
5-Bromo-2-deoksi-üridin hücre sayım kiti	Roche

5.1.6. Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihaz ve makinelerin isimleri ve firma bilgileri Tablo 8’ de listelenmiştir.

Tablo 8. Kullanılan cihaz ve aletler listesi

Etüv	Memmert
Güç Kaynağı	Dan-Kar
Manyetik Karıştırıcı	Hanna
pH Metre	WTW
Santrifüj	Hettich 30 RF
Santrifüj	Beckman Coulter
Spektrofotometre (Biotek Synergy H1 unit)	Synergy
Su Banyosu	Kotterman
Karıştırıcı (Vorteks)	Janke & Kunkel
Terazi	Oertling NA-114
Karbondioksit Etüvü	Sanyo
Derin Dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Derin Dondurucu (-20 °C)	Siemens
Derin Dondurucu (-70 °C)	ThermoFisher Scientific
Buzdolabı	Arçelik
Kırık Buz Makinesi	Scotsman AF-10
Çalkalama Cihazı	IKAVibraz-VXR
Otomatik Mikro Pipetler	Gilson
Otomatik Mikro Pipetler	Eppendorf
Otoklav	Nüve
Distile Su Cihazı	GFL
Fotograf Makinesi	Sony

Tablo 8. Kullanılan cihaz ve aletler listesi (devam)	
Biyogüvenlik kabini (Steril kabin)	Tez-san
Invert (ters ışık) Mikroskobu	Olympus
IBLOT transfer sistem	ThermoFisher Scientific
Protein jel Elektroforez ve Transfer Sistemi	Thermo Fisher Scientific
BioRad mini jel elektroforez düzeneği (dikey) ve elektroforetik aktarma düzeneği	Bio-Rad
Isı Döngü Cihazı	LightCycler (Roche Diagnostic)
Isı Döngü Cihazı (LightCycler 480)	LightCycler (RocheDiagnostic)
TC-20 hücre sayım cihazı	Bio-Rad

5.1.7. Tampon ve çözeltilerin bileşimi

5.1.7.1. Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler

Hücre kültür medyumu

NaHCO ₃	%2
Fetal Sığır Serumu	%10
Penisilin/Streptomisin	10000 IU/ml + 10000 µg/µl
L-Glutamin	200 mM
Hepes	20 mM
DMEM	500 ml

*DMEM hücre kültür medyumuna, ısı ile komplemanı inaktive edilmiş %10 FSS (fetal sığır serumu), 2 mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin, 100µg/mL streptomisin, 200 mM hepes ve sodyum bikarbonat eklenmiştir.

Tripan mavisi çözeltisi

Tripan Mavisi %0.5 (w/v), Sodyum klorür %0.9 (w/v)

Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)

	Son Konsantrasyon
Sodyum klorür	140 mM, pH: 7,4
Potasyum klorür	3 mM

Sodyum bikarbonat	8 mM
Potasyum bikarbonat	2 µg/ml

*1 litre distile su içerisinde çözülmüştür.

5.1.7.2. Hücre homojenizasyonunda kullanılan çözeltiler

Homojenleştirme tamponu (Taze hazırlanır)

	Son Konsantrasyon
Hepes	50 mM, pH: 8,0
NaCl	150 mM
EDTA	20 mM
NaF	100 µM
Na ₃ VO ₄	10 mM
Triton X-100	%1
DTT	1mM

Tabloda verilen toplamda 25 ml hazırlanan kimyasal tamponu içerisinde bir adet cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail tablet (Roche, Merck, Germany) eklendi ve tablet çözüldü. Her örneğe 500 µl tampon eklendi.

5.1.7.3. Elektroforez ve western emdirimi analizlerinde kullanılan çözeltiler

Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisi

Akrilamid	30 g
N, N-metilen bisakrilamid	0.8 g
Tepkime hacmi	100 mL

Örnek yükleme tamponu (4X)

125 mM Tris-HCl pH 6.8

%30 v/v Gliserol

6 M Üre

%10 w/v β merkapttoetanol

%2 w/v Sodyum dodesilsülfat (SDS)

%0.01 w/v bromfenol mavisi

2x Ayırma jeli tamponu

0.75 M Tris-HCl, pH 8,8

%0.2 w/v SDS

2x Yükleme jeli tamponu

0.25 M Tris-HCl, pH 6,8

%0.2 w/v SDS

2x Yürütme tamponu

6g Tris

30g Glisin

1g SDS

Toplam hacim: 1000 ml

5x Elektroforez tamponu

7.5g Tris

36g Glisin

Tepkime hacmi: 500 ml

Aktarma tamponu, pH 8,5

25 mM Tris, pH:8.3

192 mM Glisin

%20 Metanol

Tris tuz tamponu (TBS), pH 8,0

136.75 mM NaCl

2.68 mM KCl

21.26 mM Tris-HCl

Blok tamponu

%1 BSA

%0.05 Tween-20

TBS-T tamponu (% 0,1)

TBS

%0.1 Tween 20

Birincil antikor tamponu

Kaspaz-3 antikor	Bloklama çözeltisi ile 1:1000 seyreltilmiştir.
Kaspaz-8 antikor	Bloklama çözeltisi ile 1:1000 seyreltilmiştir.
Kaspaz-9 antikor;	Bloklama çözeltisi ile 1:1000 seyreltilmiştir.
Sitokrom c antikor	Bloklama çözeltisi ile 1:1000 seyreltilmiştir.
Bcl-2 antikor	Bloklama çözeltisi ile 1:1000 seyreltilmiştir.
Bax antikor	Bloklama çözeltisi ile 1:1000 seyreltilmiştir.
Aktin antikor	Bloklama çözeltisi ile 1:1000 seyreltilmiştir.
AIF antikor	Bloklama çözeltisi ile 1:1000 seyreltilmiştir.

İkincil antikor tamponu

Anti tavşan poliklonal IgG; %5 BSA ve %0.05 Tween20 içeren TBS ile 1:10000 seyreltilmiştir.

Anti keçi poliklonal IgG; %5 BSA ve %0.05 Tween20 içeren TBS ile 1:10000 seyreltilmiştir.

Anti tavşan IgG (H&L) HRP; %5BSA ve %0.05 Tween20 içeren TBS ile 1:10000 seyreltilmiştir.

Jel boyama çözeltisi

%0.2 (w/v) Coomassie mavisi

%50 (v/v) Metanol

%10 Asetik asit.

Jel boya çıkarma çözeltisi

%10 (v/v) Metanol

%10 (v/v) Asetik asit

Ponceau S Solüsyonu

Asetik Asit 2,5 mL

Ponceau S 0,05 g

dH₂O 50 mL' ye tamamlanır.

5.2. Yöntem

5.2.1. Biyoinformatik analizler ile aday miRNA'ların belirlenmesi

Projenin araştırma hipotezi ön çalışma bulgularına dayanmaktadır. Ön çalışma olarak, yabanıl ve dirençli kolorektal kanser hücre hatlarında (DLD-1 ve KM12C) 5-FU maruziyetinin mikroRNA düzeylerine etkisi araştırıldı ve anlamlı değişiklikler gösteren miRNA' lar belirlendi. Veri analizleri, projede araştırmacı/danışman olarak görev alan Prof. Dr. Kazım Yalçın ARĞA liderliğinde Marmara Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi.

5-FU maruziyetinin miRNA düzeylerine etkisini niceleyen transkriptom veri setlerinin elde etmek için kamuya açık veri tabanları olan NCBI-Gene Expression Omnibus (NCBI-GEO) ve ArrayExpress (EMBL-EBI) veri tabanları tarandı; her grupta en az ikişer örneğin ele alındığı, yabanıl ve dirençli kolorektal kanser hücre hatlarında gerçekleştirildi ve tek ajan olarak 5-Fluorourasilin kullanıldığı tek veri seti olan Agilent platformu tabanlı GSE30894 mikrodizin veri setinin seçilmesi uygun bulundu.

5-FU maruziyetinin 72. saat sonunda miRNA seviyeleri üzerindeki etkisi yabanıl ve dirençli hücre hatlarında karşılaştırılmalı olarak analiz edildi. Çalışma kapsamına alınan mikrodizin tabanlı miRNA veri seti (GSE30894) Bioconductor (www.bioconductor.org) yazılım platformu altında RMA normalizasyon (Irizarry ve ark., 2003) ve mikrodizin verileri için doğrusal modeller (LIMMA) (Smyth, 2005) paketleri kullanılarak R programlama dilinde istatistiksel olarak analiz edildi, Benjamini-Hochberg yöntemi ile p-değerlerine düzeltme (adj-p) uygulandı. Düzeltilmiş p-değeri 0.05'ten küçük olan miRNA' lar ekspresyonu farklılık gösteren miRNA' lar olarak belirlendi.

Analizler sonucunda; ilaç maruziyetinden 72 saat sonra alınan örneklerin karşılaştırılmalı analizi neticesinde 7 miRNA'nın dirençli hücrelerde yabanıl hücrelere göre yukarı yönde, 13 miRNA'nın ise aşağı yönde ekspresyon değişimi gösterdiği görüldü. Ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı olarak değişen 20 miRNA'nın florans yoğunlukları da incelendi, anlatım düzeyi yüksek (florasan yoğunluğu >1000) ve orta (florasan yoğunluğu >100) seviyede olan miRNA' lar için literatür taraması yapılarak kolorektal kanseri ile ilişkilendirilme durumu

araştırıldı. Araştırmalar sonucunda, hsa-mir-21, hsa-mir-381 ve hsa-mir-181a-2 miRNA'larının kolorektal kanser ile ilk defa bu çalışmada ilişkilendirildiği görüldü ve tez kapsamında bu miRNA'ların incelenmesi amaçlandı.

5.2.2. Çalışmada kullanılan hücrelerin hazırlanması ve çoğaltılması

Yabanıl-tip HT29 hücreleri (ThermoFisher, USA) suşu olup ticari olarak satın alındı. HT29 hücreleri %10 fetal sığır serumu, 100 U/mL penisilin, 100µg/mL streptomisin, 200 mM L-Glutamin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kültür ortamında, 37°C' de, %5 CO₂ içeren karbondioksit etüvünde inkübe edildi. Hücrelerin büyüme hızına bağlı olarak %70-80 kapasiteye ulaşmaları durumunda hücreler pasajlandı. Hücre büyüme ortamı atılıp hücreler 1X steril PBS ile yıkandı ve daha sonra %0,25 tripsin/ EDTA (Capricorn, Germany) ile 3-5 dakika boyunca trypsinizasyon yapıldı. Hücreler haftada üç kere kültür ortamı değiştirilerek 1x10⁶ hücre/ml olacak şekilde çoğaltıldı. Uygun hücre kültür şartlarında çoğaltılmış hücreler -80°C' ye kaldırıldı.

5.2.2.1. Hücrelerin dondurulması

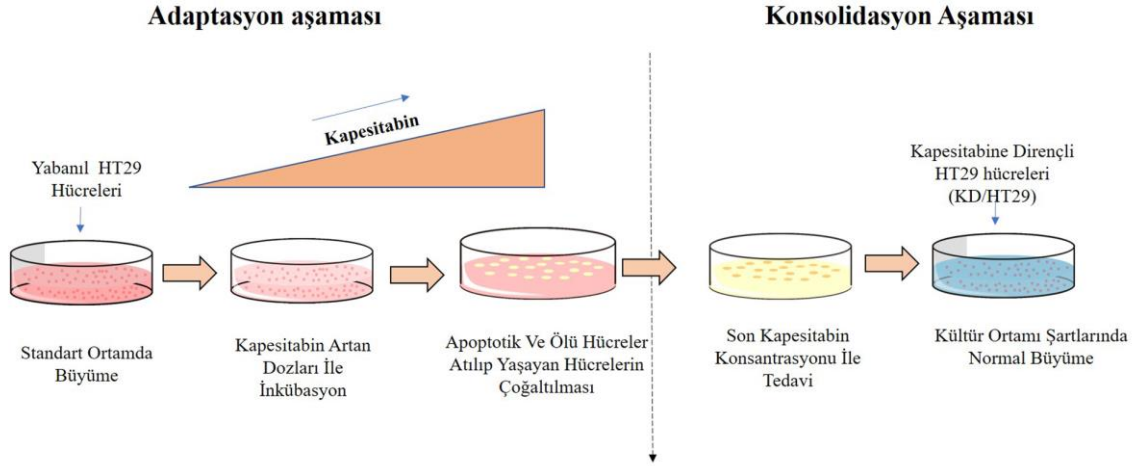
a-Pasajlama (subkültür): Hücrelerin pasajlanabilmesi için hücre kültür flakslarının yüzeyini kaplamış olmalıdır. Böyle flakslara konfluent flakslar denir. Pasajlama işlemi hücreler sıkışık konumda olduğu için yapılır. Ve daha geniş alana yayılır. Pasajlama işlemi besi ortamı içerisindeki hücrelerin besinleri tüketmesinden dolayı üreme hızlarının düşmesini ölümlerini önlemek amacı ile yapılır. Pasajlama işlemi yapışarak çoğalan hücrelerde ve süspanse kültürlerde farklı yapılır: Yapışarak çoğalan hücre kültürlerinde pasajlama yapılırken; kültür yüzeyi PBS ile yıkanır ve kültür kabına yapışan hücrelerin tutunduğu yüzeyi kaplayacak şekilde (1-2 ml) (%0,25) tripsin/EDTA içeren 1X PBS çözeltisi eklenir. 3-5 dakika 37°C' de bekleme süresinin ardından kültür kabının yüzeyinden kalkan hücrelere hücre besiyeri eklenir. Daha sonra hücre kabına hafifçe vurulur ve pipet yardımıyla hücreler falkon tüplere alınır. Santrifüj edilerek kullanılmış besi ortamı atılır. Daha sonra uygun besi ortamı eklenerek plakelere ya da hücre kültür kabına ekim yapılır.

b-Hücrelerin dondurulması: Hücre kültürünün uzun süre devam etmesi kontaminasyon ve üreme hızının düşüşü gibi olumsuzluklara yol açar. Bunun önüne geçebilmek için hücreler dondurulur. Dondurma işleminin başarısı, çözündürme işleminin sonunda hücre canlılık oranının yüksek olması ile orantılıdır.

Dondurma prosedürü: Su banyosu 37°C' ye ısıtılır. FSS su banyosunda 37 °C' ye ısıtılır. Hücre pasajlanması protokolünde belirtildiği şekilde hücre pelleti elde edilir. Hücre pelleti

üzerine toplam hacim 1 ml olacak şekilde 900 µl FSS ve 100 µl DMSO (dimetilsülfoksit) eklenir ve pipetle karıştırılır ve ependorf adı verilen tüplere konulur ve -80°C' ye kaldırılır.

5.2.2.2. Dirençli hücre soyu üretimi



Şekil 16. Yabanıl-tip HT29 hücrelerinde direnç geliştirilme aşamaları (Zhou ve ark., 2020' den yararlanılarak hazırlanmıştır).

Yöntem iki adımdan oluşur: Adaptasyon aşamasında yaklaşık olarak, yabanıl-tip HT29 hücreleri, ilaç konsantrasyonu 1, 5, 10, 20 ve 40µM'a (Mohammadian et al., 2019; Zeynali-Moghaddam et al., 2019; Sim et al., 2018) kademeli olarak artırılarak 48 saat boyunca Kapesitabin ile tedavi edildi. Ortam 2 günde bir değiştirildi ve ilaca maruz kalma dozu, her 15 günde bir artırıldı. Doza bağlı her adımdan sonra, apoptotik hücreleri atıldı ve hayatta kalan hücreleri kapesitabin içermeyen kültür ortamında büyütüldü; bu adım üç kez tekrarlandı. Yapışan hücreler, %0,25 Tripsin/EDTA 5 dakika kullanılarak pasajlandı. Hücreler daha sonra bir sonraki kapesitabin artışına maruz bırakıldı. Daha sonra, sağ kalan kapesitabine dirençli hücreler konsolidasyon aşamasında öldürücü doz (40 µM) içeren tam kültür ortamında tutulup normal olarak büyüene kadar kültürlendi. 6 aylık tedavi süreçlerinden sonra kapesitabin dirençli hücre soyları (KD/HT29) oluşturuldu. Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre gruplarında deneylere devam edildi. İlaç dozları literatür taranarak belirlendi (Suh vd., 2009; Sim vd., 2018; Mohammadian vd., 2019; Zeynali-Moghaddam vd., 2019).

5.2.2.3. Hücrelerin ilaçlarla muamelesi

Flavonoid ve kemoterapi İlaçları: Fisetin (Glentham Life Sciences Ltd, UK) ve kemoterapi ilacı kapesitabin (Selleckchem, UK) kullanıldı ve ilaçlar ticari olarak temin edildi.

İlaçların hazırlanması: Kapesitabin ve fisetin, stok solüsyonları sırasıyla; 10 mg/ml kapesitabin su içinde; 50 µg/mL Fisetin %100 etanol içinde çözülerek -20°C' de saklandı.

Fisetinin IC50 (hücrelerin yarısının çoğalmasını inhibe eden dozun sayısal değeri) değerlerini elde etmek için sitotoksik konsantrasyonları, doz-cevap eğrisine göre belirlendi. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücreleri kapesitabin ve fisetin eklenmeden 1 gün önce ekildi. Ertesi gün hücreler %1 serum varlığında kapesitabin ve/veya fisetin ile muamele edildikten sonra, hücre sayımı, koloni oluşumu, yara iyileşmesi, RNA izolasyonu ve Western emdirimi için uygun koşullarda toplandı. GZ-PZR ve Western emdirimi yöntemi için toplanan hücreler PBS ile yıkanıp -80°C'ta donduruldu.

5.2.2.4. Hücrelerin sayılması

5.2.2.4.1. Tripan mavisi ile hücre sayımı

Hücreler %10 oranında tripan mavisi ile boyanıp toma lamında ve TC20 hücre sayım cihazı (Biorad, California) ile sayıldı. Canlılık oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanıp %95 canlılık oranındaki hücreler hücre sayımı, koloni oluşumu, yara iyileşmesi, RNA izolasyonu ve western emdirimi yapılmak üzere donduruldu.

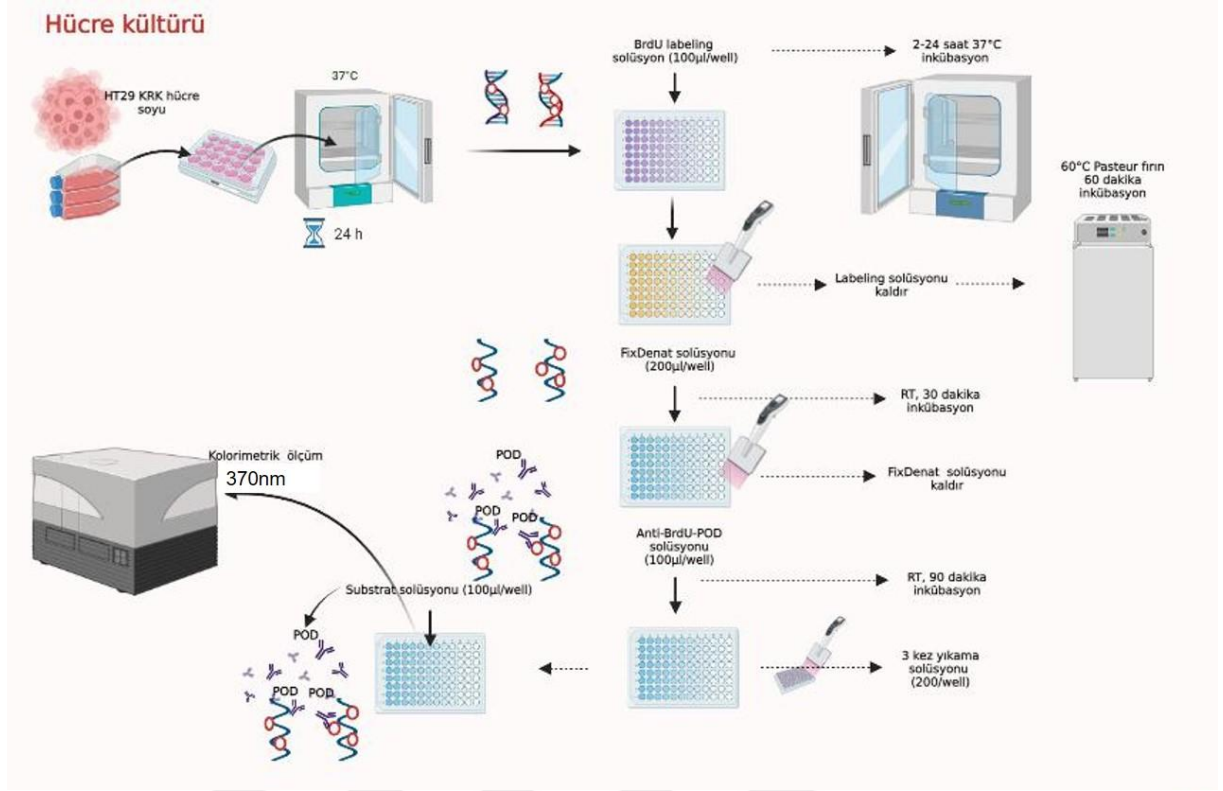
10 µl örnek + 90 µl TB → Ölü hücreler maviye boyanır.

$$\frac{\text{Canlı hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100 = \text{Canlılık Oranı}$$

5.2.2.4.2. BrdU ile hücre sayımı

Tablo 9. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soyu ilaç tedavi grupları

Hücre Modeli	Kontrol Grubu	Kapesitabin Grubu	Fisetin Grubu	Kapesitabin+ Fisetin Grubu
Yabancı-tip HT29 hücre soyu	+	+	+	+
KD/HT29 hücre soyu	+	+	+	+



Şekil 17. BrdU hücre çoğalması deneyi şematik gösterimi (Ücretsiz BioRender programı ile tasarlanmıştır).

5-Bromo-2-deoksi-üridin etiketli hücre sayım kiti (Roche, Mannheim, Germany) protokolüne uygun olarak hücreler sayıldı. Yabancıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücreleri, 96-kuyulu plakalara her deney altı kez tekrarlanacak şekilde 2×10^4 hc/ml olarak %10 FSS ve 100 units/mL Penisilin ve $100 \mu\text{g/mL}$ streptomisin içeren DMEM ortamına ekildi ve %5 CO_2 varlığında 37°C ' de hücreler kültürlendi. 24 saat sonra yapışan hücreler kontrol edilerek %10 FSS' li ortamdan serumsuz ortama alındı. Serumsuz ortamda 24 saat bırakılan hücrelere önce %1 FSS ve kapesitabin ve/veya fisetin eklendikten yedi saat sonra da labeling solüsyonu eklendi. İlaça maruz bırakılan hücrelerden 24 saat muamele işlemi bittikten BrdU etiketli hücre sayım kiti (Roche, Mannheim, Germany) üretici protokolüne uygun olarak; ortam plakalardan dikkatli bir şekilde pipetle çekilerek döküldü ve plakalar 60°C pasteur fırında 1 saat kurutuldu. Daha sonra hücreleri sabitlemek için her kuyuya $100 \mu\text{l}$ fixDenat eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Dikkatli bir şekilde hafifçe vurarak fixDenat solüsyonu kaldırıldı. Ardından önceden hazırlanmış olan Anti-BrdU-POD çalışma solüsyonu her kuyuya $100 \mu\text{l}$ eklendi, oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde plakalara hafifçe vurarak dikkatli bir şekilde solüsyon döküldü ve ardından kuyulara $200 \mu\text{l}$ yıkama solüsyonu eklenerek üçer kez yıkandı. Son yıkama işleminden sonra plakalara vurularak yıkama solüsyonu kaldırıldı. En son işlem olarak, oda sıcaklığında her kuyuya $100 \mu\text{l}$ substrat solüsyonu eklendi ve kuyular renk

gelişimi gösterene kadar yaklaşık 5 ila 30 dakika arası bekletildi. Daha sonra Snergy H1 Biotech cihazında (Santa Clara, USA) örneklerin 370 nm’de absorbans ölçümü yapıldı.

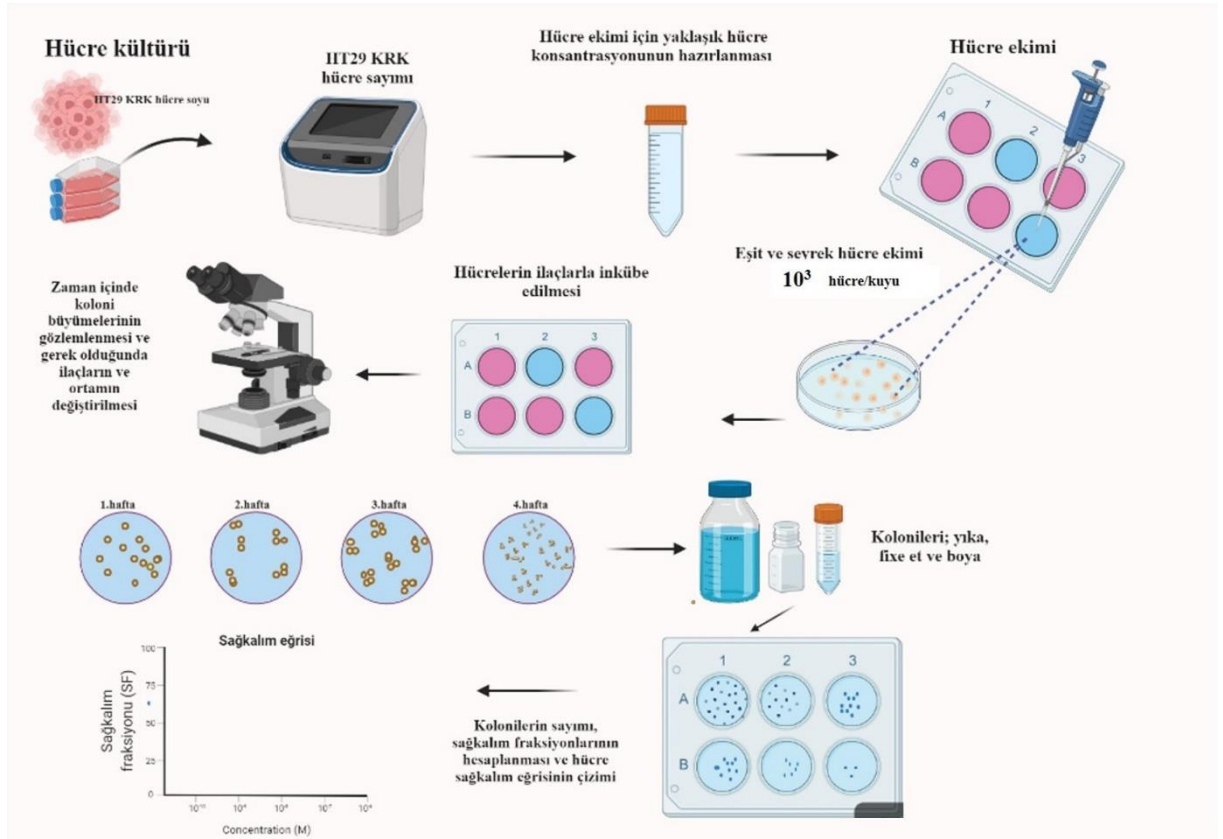
5.2.2.5. Hücrelerin toplanması

Kültür ortamında yetiştirilen hücre soyları 1×10^6 hücre/ml yoğunluğuna ulaşınca protein örnekleri için 30×10^6 hücre/ml, RNA izolasyonu için 3×10^6 hücre/ml toplam hücre olacak şekilde toplandı. Hücreler 700g’ de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz atılıp üzerine 5 ml PBS çözeltisi eklenip 700g’ de 10 dakika santrifüj edildi ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Hücreler RNA izolasyonu ve Western emdirimi yapmak için -80°C ’ ta derin dondurucuda saklandı.

5.2.3. Koloni oluşumu

Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarının koloni oluşumu değerlendirilmesi için hücreler, 6 kuyulu plakalara 10^3 hücre/kuyu oranında ekildi ve 37°C ve $\%5 \text{ CO}_2$ ’ de inkübe edildi. Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücreleri, 48 saat sonra spesifik dozlarda kapesitabin ve/veya fisetin ile tedavi edildi. İlaç tedavisinden 24 saat sonra kuyular yıkandı ve taze ortam ilave edildi. Hücre kültür süresi boyunca FSS’ li ortamla her üç günde bir yenilendi ve 11 gün boyunca koloni oluşumuna izin verildi. Koloniler oluşuktan sonra hücreler $\%70$ etanol ile 10 dakika sabitlendi ve koloniler $\%1$ kristal viyole ile boyandı (Fu ve ark., 2018). Deneyler üç kopya halinde gerçekleştirildi (Şekil 18). Koloni sayımı ImageJ yazılımı ücretsiz sürümü (National Institutes of Health, Bethesda, MD, ABD) kullanılarak değerlendirildi. Hücre kolonisi oluşum yüzdesi aşağıdaki formüle göre belirlendi;

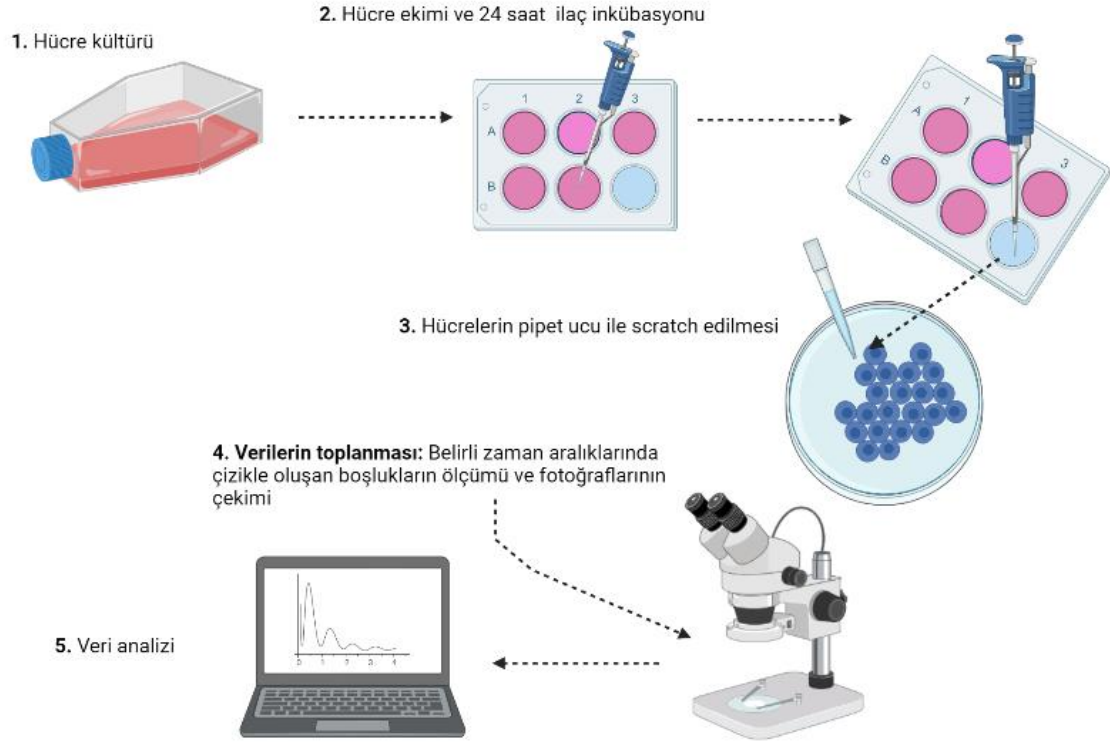
$$\text{Koloni oluşum verimliliği (\%)} = \frac{\text{Oluşan koloni sayısı}}{\text{Ekilen hücre sayısı } (10^3)} \times 100\%$$



Şekil 18. Koloni oluşumu deneyi şematik gösterimi (Ücretsiz BioRender programı ile tasarlanmıştır).

5.2.4. Yara iyileşimi

Yabancıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinin göç etme yeteneklerini gözlemlemek için yara iyileşmesi analizi tekniği kullanıldı. Bu analiz için 12 oyuklu bir plakaya kuyucuk başına 5×10^4 hücre ekildi. Hücreler, her bir kuyudaki hücre yoğunluğu %90' a ulaşana kadar kültüre edildi. Yabancıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücreleri, kapesitabin ve/veya fisetin içeren FSS' li ortamla ile 24 saat inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğun tüm çapı boyunca 200 μ L' lik bir pipet ucu ile kazınarak yaralar oluşturuldu (Grada ve ark., 2017). Kuyucuklardan hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için üç kez PBS ile yıkandı, DMEM ortamı atıldı ve taze DMEM eklendi. Çizilmeden hemen sonra; 0.saat, 24. ve 48. saat faz kontrast mikroskopta görüntüler alındı (Şekil 19). Yara genişlikleri ImageJ yazılımının ücretsiz sürümü (National Institutes of Health, Bethesda, MD, ABD) kullanılarak hesaplandı. Deneyler üç kere tekrarlandı.

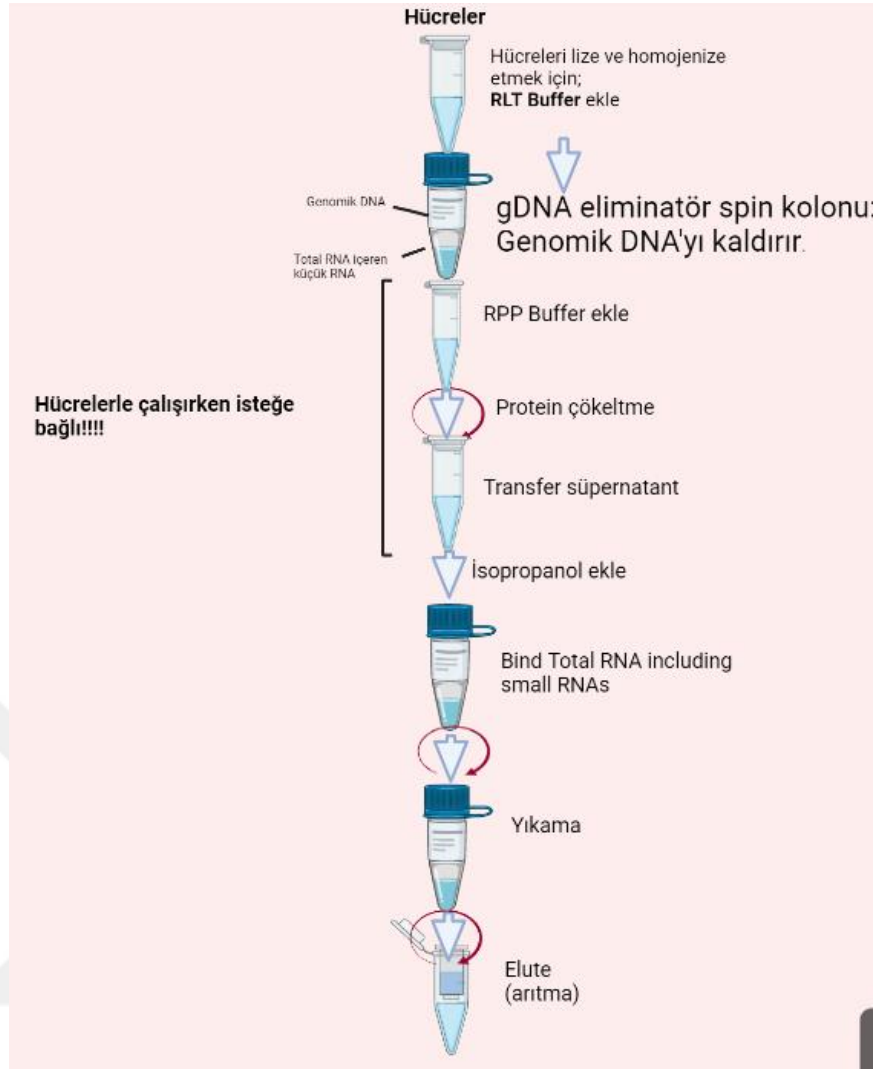


Şekil 19. Yara iyileşimi deneyi şematik gösterimi (Ücretsiz BioRender programı ile tasarlanmıştır).

5.2.5. RNA ve miRNA izolasyonu

Hücreler kapesitabin ve/veya fisetin ile 24 saat muamele edildikten sonra PBS tamponu ile yıkanmış ve dondurulmuş hücrelerden “Direct-zol™ RNA Miniprep Plus kiti (Zymo Research, ABD) kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyon temsili deney aşamaları Şekil 20’ de gösterilmiştir.

Aşamaları özet olarak aşağıdaki şemaya göre gerçekleştirildi;



Şekil 20. RNA izolasyonu temsili deney aşamaları (Zymo Research, USA)

*RNA elüsyonu 50µl RNaz/DNaz içermeyen su ile gerçekleştirildi.

5.2.5.1. Ekstrakte edilen RNA'ların miktar ve kalite değerlendirmesi

RNA konsantrasyonları ve saflığı, Nanodrop spektrofotometrede (NanoDrop Technologies, Biotek Synergy H1 unit (Synergy H1, BioTek, Winooski, VT) belirlendi. A260/280 ve A260/230' daki bağıl absorban oranı kullanılarak doğrulandı. Elde edilen RNA' lardan cDNA sentezi yapıldı.

5.2.6. cDNA sentezi

cDNA amplifikasyonu, RNA stok solüsyonundan 8µL alınarak miRNA All-In-One cDNA Sentez Kiti (ABM, Richmond, Canada) içerisindeki kimyasallar ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon içeriği 10µL 2X miRNA cDNA Sentezi SuperMix, 2 µL Enzim Karışımı ve 8 µL RNA şablonundan oluşur. Hazırlanan karışım 37°C'

de 30 dakika, 50°C' de 15 dakika, 85°C' de 5 dakika ve daha sonra 4°C' de inkübe edildi. Elde edilen cDNA' lar miRNA analizinde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

5.2.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR)

GZ-PZR, hsa-miR-181a, miR-21 ve hsa-miR-381 için özel olarak tasarlanmış primerler kullanılarak bir Roche Light Cycler 480 sistemi üzerinde SensiFast SYBR No-ROX kiti (Bioline, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Primerler miRprimer yazılımı kullanılarak tasarlandı, RNU6 referans olarak kullanıldı ve primer dizileri Tablo 10' da sunuldu. miRNA seviyelerinin tespiti için ileri ve geri primerler satın alındı.

Tablo 10. miRNA primer tablosu

Primer	Dizi
hsa-mir-21-ileri	5'- CAGCAACACCAGTCGATG-3'
hsa-mir-21-geri	5'- GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTACAG-3'
hsa-mir-181a-2-ileri	5'- GACCACTGACCGTTGAC -3'
hsa-mir-181a-2-geri	5'- TCCAGTTTTTTTTTTTTTTTGGTACA -3'
hsa-mir-381-ileri	5'-TAATCTGACTATACAAGGGCAAGC T-3'
hsa-mir-381-geri	5'-TATGGTTGTTCTGCTCTCTGTCTC-3'
U6-ileri	5'- CTCGCTTCGGCAGCACA -3'
U6-geri	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

cDNA amplifikasyonu, 95°C'de 5 dakikalık bir başlangıç aktivasyon adımı, ardından 95°C' de 10 saniyelik bir denatürasyon ve 60°C' de 60 saniyelik bağlanma/uzama döngüsü ile 45 kez tekrarlanarak gerçekleştirildi. Her numune iki kopya halinde incelendi ve tüm veriler $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak analiz edildi (Pfaffl, 2001). İstatistiksel analiz SPSS 19.0 (SPSS, Chicago,

IL, ABD) ve GraphPad Prism 8 (GraphPad, La Jolla, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. Tüm testler iki taraflı bir test kullanılarak yapıldı ve grupları karşılaştırmak için parametrik olmayan testler kullanıldı. $P < 0,05$ olan faktörler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 11. miRNA ifade seviyelerinin tespiti için GZ-PZR koşulları

Adım	Zaman	Sıcaklık (°C)
PZR başlangıç aktivasyon	5 dakika	95
Denatürasyon	10 saniye	95
Bağlanma/uzama	60 saniye	60
Döngü sayısı	45 döngü	

GZ-PZR ile P-gP mRNA ifade düzeyleri

Bu çalışmada kullanılan P-gP PZR primerleri Tablo 12’ de listelenmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

Tablo 12. P-gp mRNA primer tablosu

Primer	Dizi
P glikoprotein (P-gp)-ileri	5’-GCCTTCATCGAGTCACTGCC-3’
P glikoprotein (P-gp)-geri	5’-CCAGGGCTTCTTGGACAACC-3’
GAPDH-ileri	5’-GGTCACCAGGGCTGCTTTTA-3’
GAPDH-geri	5’-CCCGTTCTCAGCCATGTAGT-3’

P-gp mRNA ekspresyon düzeyinin tespitinde kullanılan GZ-PZR koşulları Tablo 13’ te listelenmiştir.

Tablo 13. P-gP mRNA ekspresyon düzeyi tespiti için GZ-PZR koşulları

Adım	Zaman	Sıcaklık (°C)
PZR başlangıç aktivasyon	5 dakika	95
Denatürasyon	10 saniye	95
Bağlanma/uzama	60 saniye	60
Döngü sayısı	45 döngü	

5.2.8. Hücre lizatlarının hazırlanması

Gerekli koşulda hazırlanıp -80°C’ de saklanan hücre peletlerine hazırlanan homojenleştirme (lisis) tamponu (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 µM NaF, 10 mM Na₃VO₄, %1 Triton X-100, 1mM DTT) veya bir adet cOMplete Edta-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Merck, Germany) tableti eklendi ve çözüldü ve her örneğe bu karışımdan 100µl eklendi. Dounce ile hücreler patlatıldı. Homojenleştirme tamponunu 1ml’ ye tamamlayarak hücre patlatma işi tekrarlandı. Protein örnekleri Lowry yöntemi ile protein miktar tayini yapılmak üzere -80°C’ de saklandı.

5.2.9. Protein miktar tayini

Tüm lizatların protein konsantrasyonu, Pierce™ BCA protein Assay kiti (Thermo Scientific, ABD) ile belirlendi (Lowry ve ark., 1951).

5.2.10. Elektroforez (SDS-PAGE)

Örnek tamponu (4X) ile karıştırılan protein örnekleri (150µg) 100°C’ ta 3-5 dakika denatüre edildi. Eşit miktarlarda (50 µg/kuyu) protein, %12 SDS-PAGE jelleri üzerinde 150 Volt’ da 1,5 saat yürütüldü ve fraksiyonlara ayrıldı.

5.2.10.1. Islak elektroforetik transfer düzeneği ile elektroforetik transfer

Jelin büyüklüğüne uygun olarak iki tane filtre ve bir tane nitroselüloz membran kesildi. Elektroforez sonrası üst jeli kesilen jel, nitroselüloz membran, filtre kağıtları ve süngerler 10 dakika aktarma tamponu içinde bekletildi. Jel kasetindeki pozitif elektrodun (anot) üzerine sırasıyla sünger, 3MM filtre kağıdı, nitroselüloz membran, jel, 3MM filtre kağıdı ve sünger konularak kaset kapatıldı. Kaset transfer düzeneğine yerleştirildikten sonra kasetin üst kısmını

kaplayacak şekilde aktarma tamponu ile dolduruldu. Düzenek güç kaynağına bağlanıp 80-100V'da 1 saat süresince aktarma yapıldı.

5.2.10.2. Western emdirimi analizi

Membranlar BSA içeren TBS-T blok tamponunda 1saat oda sıcaklığında veya 4°C' de gece boyu inkübe edilerek bloklandı. Membranlar sırasıyla kaspaz-3, Bcl-2, Bax, cyt c (Invitrogen, UK), kaspaz-9, AIF (Cell Signalling, Massachusetts, ABD), aktin (sc-1616) ve kaspaz-8 (SantaCruz, ABD) birincil antikorlar ile etkileştirildi. Membranlar, %0,05 Tween-20 (TBS-T) içeren TBS-T tamponu ile 3 kez 10'ar dakika yıkandıktan sonra, birinci antikoruna uygun horse-radish peroksidaz (HRP) konjuge keçi anti-tavşan ve/veya alkalın fosfataz (AP) konjuge keçi anti-tavşan sekonder antikorları ile 1 saat inkübe edildi. Daha sonra tekrar TBS-T tamponuyla 3 kez 10' ar dakika yıkandı ve birincil antikor ve ikincil antikor IgG etkileşimini içeren membran ECL sistemi ve/veya Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-phosphate (NBT-BCIP) (Roche, Merck, Germany), renk geliştirici tampon ile renklendirildi (Cabadak et al., 2011). Bant yoğunlukları, ImageJ yazılımının ücretsiz sürümü (National Institutes of Health, Bethesda, MD, ABD) kullanılarak optik yoğunluk ölçüldü. House-keeping gen kontrolü için aktin kullanıldı. Kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, Bcl-2, Bax, cyt c, AIF ve aktin moleküler ağırlıkları sırasıyla; 35kDa; 18kDa; 37kDa; 26kDa; 23 kDa;15 kDa; 67kDa ve 43kDa.

5.2.11. İstatistiksel Analiz

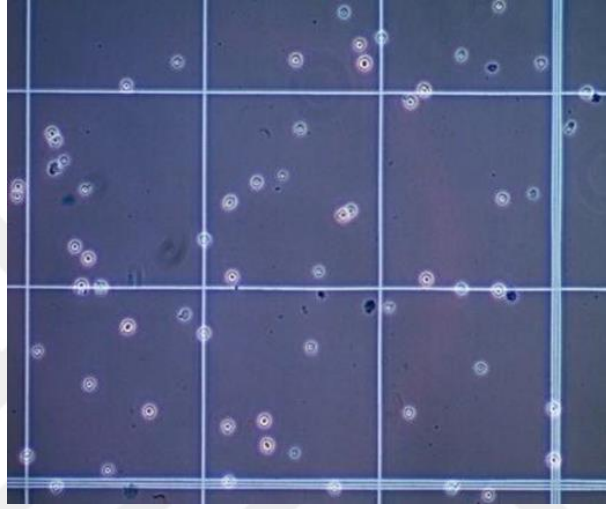
Veriler, en az üç veya altı bağımsız deneylerin Standart Hata Ortalaması (SEM) olarak ifade edilmiştir. Tüm istatistiksel analizler, iki yönlü varyans analizi kullanılarak belirlenmiş Prism sürüm 8.0.2 yazılımı (GraphPad Software Inc) kullanılarak Two-way ANNOVA ve Tukey' s çoklu karşılaştırma testi ile gerçekleştirilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Yabancı-tip HT29 hücre canlılığının belirlenmesi

6.1.1. Yabancı-tip HT29 hücrelerinin tripan mavisi ile hücre sayımı

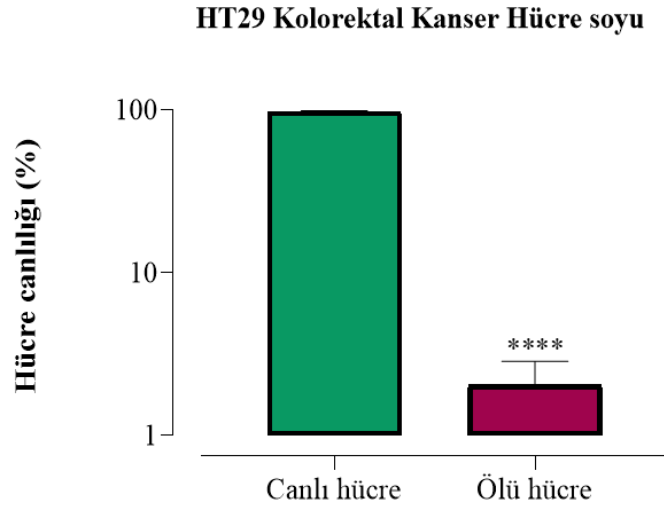
Kültüre edilen hücrelerin canlılıklarını ve sayıları TC20 hücre sayım cihazı (TC20, Biorad, USA) veya hemositometri kullanılarak Tripan mavisi boyası ile canlı hücre sayıları belirlenmiştir. Hemositometride sayılan ölü ve canlı hücrelerden; toplam hücre sayısının canlı hücrelere % olarak oranlanmasıyla hücre canlılığı belirlenmiştir. Yabancı-tip HT29 hücrelerinin toma lamında faz kontrast ışık mikroskopik görüntüsü Resim 1’ de gösterilmiştir.



Şekil 21. Yabancı-tip HT29 hücre sayımı. Tripan mavisi ile boyanmış HT29 hücrelerinin faz kontrast ışık mikroskopunda hemositometrideki görüntüsü.

Yabancı-tip HT29 hücrelerinin hemositometri ile hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak Şekil 22’ de gösterilmiştir.

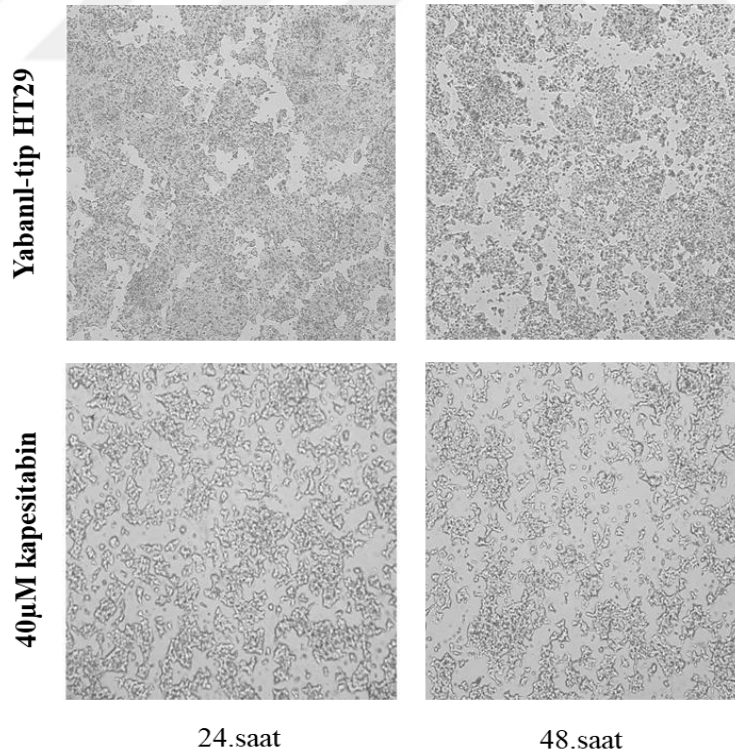
$$\begin{array}{lcl} 10 \mu\text{l örnek} + 90 \mu\text{l TB} & \longrightarrow & \text{Ölü hücreler maviye boyanır.} \\ \frac{\text{Canlı}}{\text{Toplam}} \times 100 & = & \text{Canlılık Oranı} \end{array}$$



Şekil 22. Hemositometri ile yabancı-tip HT29 (%) hücre canlılığı. Sonuçlar altı deneyin ortalaması alınarak $\pm$ SEM olarak sunuldu (**** $P < 0,0001$) $\pm$ SEM (**** $P < 0,0001$).

6.2. Yabancı-tip HT29 hücre soyu mikroskopik görüntüleri

Yabancı-tip HT29 hücre soyunun kültür ortamına ekildikten ve 40 μ M Kapesitabin eklendikten sonraki 24.saat ve 48. saat faz kontrast ışık mikroskopik görüntüleri aşağıdaki resimde gösterildi (Şekil 23).



Şekil 23. Yabancı-tip HT29 hücrelerinin 24. ve 48. saat faz kontrast ışık mikroskobu görüntüleri. (Yabancı-tip HT29 hücreleri %10 fetal sığır serumu içeren DMEM kültür ortamında çoğaltıldı. Yabancı-tip HT29 hücreleri kontrol grubu ve kapesitabin grubu)

6.3. HT29 kolorektal kanser hücre soylarında BrdU hücre çoğalma deneyleri

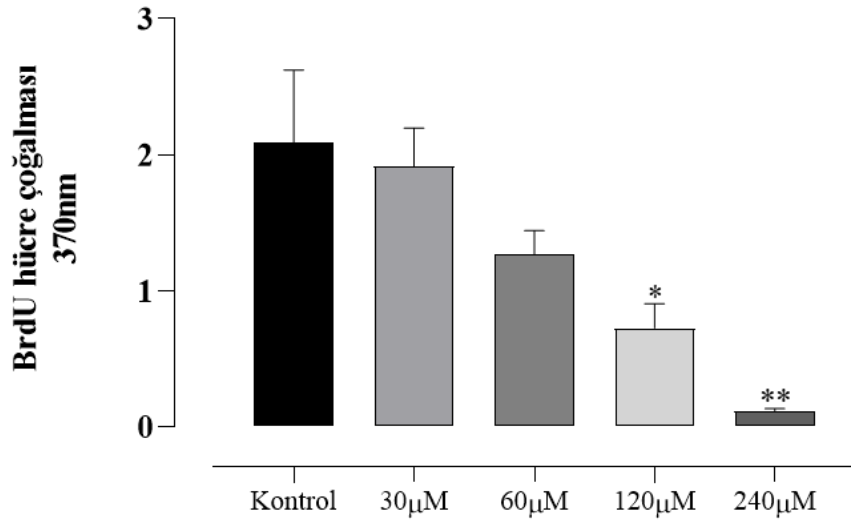
6.3.1. Yabanıl-tip HT29 hücre çoğalmasında farklı dozlarda fisetin 24.saat muamelesinin etkileri

Daha önceden hazırladığımız fisetin (200mM) alkol ile 14mM' a kadar seyreltildi. Hazırlanılan 14mM fisetin stoğundan, seri dilüsyon yapılarak; tabloda verilen fisetin konsantrasyonları hazırlandı. Yabanıl-tip HT29 hücreleri, %1 FSS ile 30µM, 60µM, 90µM ve 120µM fisetin varlığında IC₅₀ (%50 inhibisyon oranı) değerini belirlemek üzere 24 saat muamele edildi. Hücre sayımı BrdU yöntemi ile yapıldı. BrdU hücre çoğalması ve IC₅₀ eğrileri çizildi.

Tablo 14. BrdU hücre çoğalması deneylerinde kullanılan fisetin konsantrasyonları

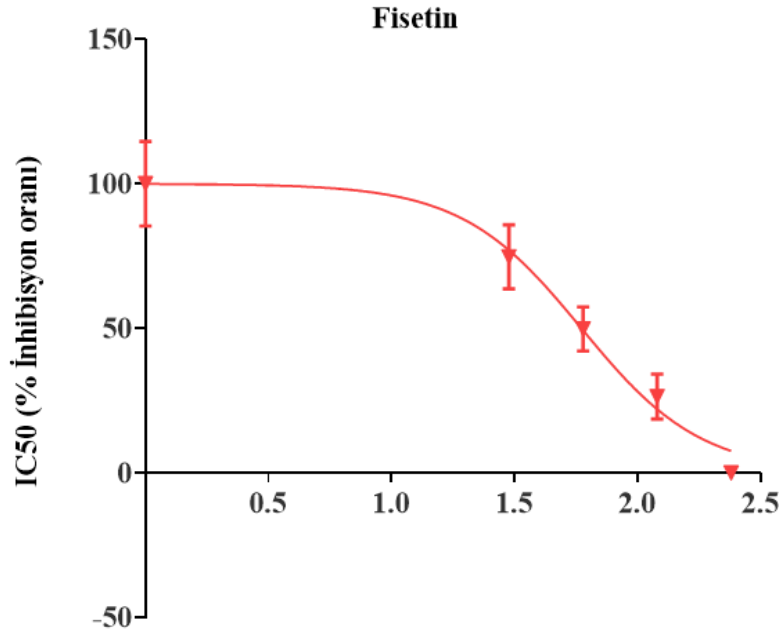
Gruplar	Yabanıl-tip HT29 hücre soyu
Kontrol	-
Fisetin (30µM)	+
Fisetin (60µM)	+
Fisetin (120µM)	+
Fisetin (240µM)	+

Fisetinin hücre çoğalmasına 24. saat etkisi Şekil 24' te gösterildi.



Şekil 24. Yabancıl-tip HT29 hücre çoğalmasında artan dozlarda fisetin 24.saat etkisi. Sonuçlar altı deneyin ortalaması alınarak $\pm$ SEM olarak sunuldu (* $p < 0,027782$; ** $p < 0,004397$) (Fisetin= 30µM, 60µM, 120µM ve 240µM).

Yabancıl-tip HT29 hücrelerinde fisetin IC_{50} dozu aşağıdaki grafikten elde edildi (Şekil 25). Hücre çoğalmasında fisetin doz yanıt eğrisinde IC_{50} değeri 59,13 olarak belirlendikten sonra; 60µM, 90µM ve 120µM dozlarının Yabancıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde hücre çoğalma deneylerinde kullanılmasına karar verildi.

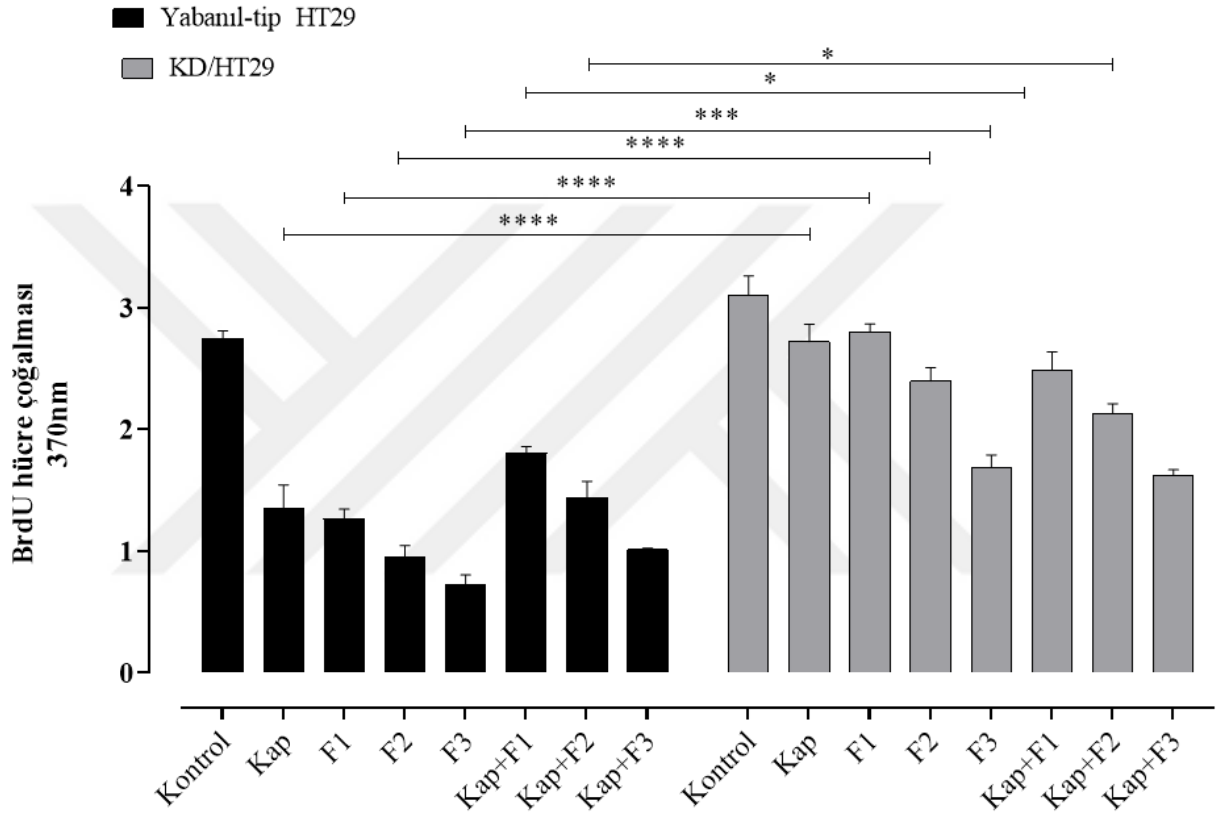


Şekil 25. Yabancıl-tip HT29 hücre çoğalmasında fisetin IC_{50} değeri. Sonuçlar altı deneyin ortalaması alınarak $\pm$ SEM olarak sunuldu (Fisetin=30µM, 60µM ve 120µM ve 240µM)

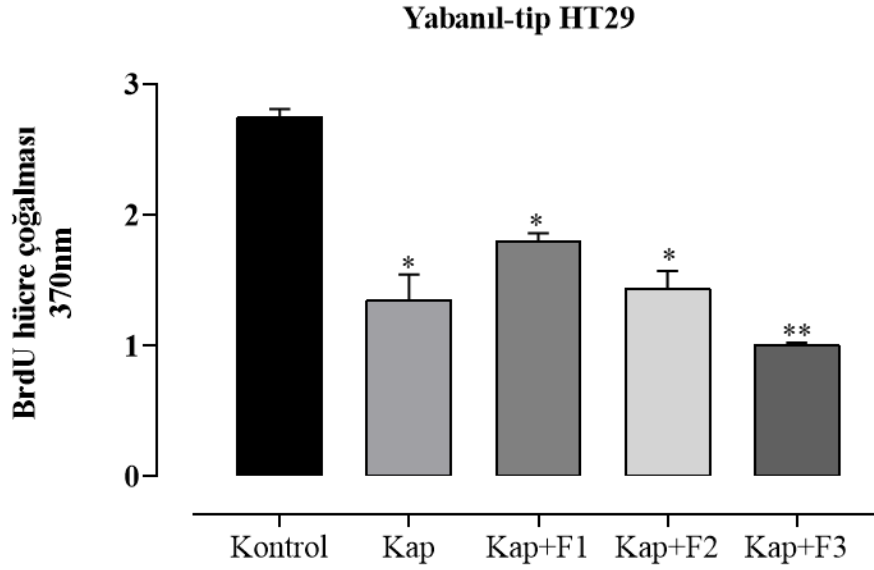
6.3.2. Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında çoğalma deneyleri

Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında 60 μ M, 90 μ M ve 120 μ M dozlarda fisetin, 40 μ M kapesitabin ve bunların kombinasyonları ile yukarıda anlattığımız (Şekil 17) protokole göre hücre çoğalma deneyleri yapıldı.

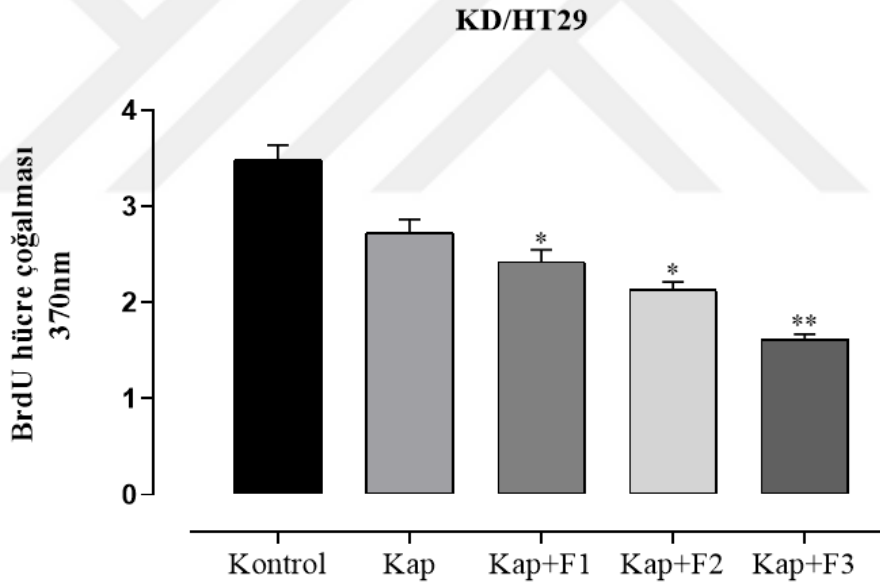
Hücre çoğalma deney sonuçları Şekil 26’ da gösterildi.



Şekil 26. Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında fisetin ve/veya kapesitabinin 24 saat tedavisi sonrası BrdU hücre çoğalması. Sonuçlar altı deneyin ortalaması alınarak $\pm$ SEM olarak sunuldu (****p<0.0001 ; *** p<0.0008; * p< 0,0459) (Kısaltmalar: Kap= 40 μ M kapesitabin; F1= 60 μ M fisetin; F2= 90 μ M fisetin; F3=120 μ M fisetin).



Şekil 27. Yabanıl-tip HT29 hücre soyunda fisetin ve/veya kapesitabinin 24 saat tedavisi sonrası BrdU hücre çoğalması. Sonuçlar altı deneyin ortalaması alınarak $\pm$ SEM olarak sunuldu (* $p < 0,037716$; ** $p < 0,002791$) (Kısaltmalar: Kap= $40\mu\text{M}$ kapesitabin; F1= $60\mu\text{M}$ fisetin; F2= $90\mu\text{M}$ fisetin; F3= $120\mu\text{M}$ fisetin).



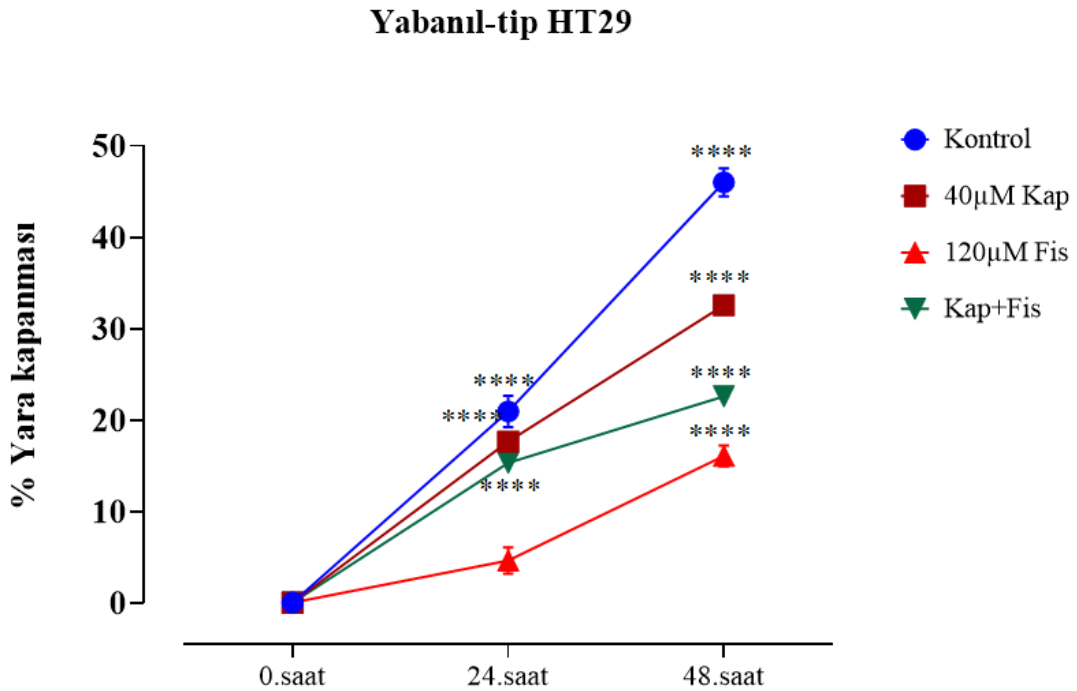
Şekil 28. KD/HT29 hücre soyunda fisetin ve/veya kapesitabinin 24 saat tedavisi sonrası BrdU hücre çoğalması. Sonuçlar altı deneyin ortalaması alınarak $\pm$ SEM olarak sunuldu (* $p < 0,0443$; * $p < 0,0212$; * $p < 0,0039$) (Kısaltmalar: Kap= $40\mu\text{M}$ kapesitabin; F1= $60\mu\text{M}$ fisetin; F2= $90\mu\text{M}$ fisetin; F3= $120\mu\text{M}$ fisetin).

Hücre çoğalması deney sonuçlarına göre; hücre soylarını ayrı ayrı ele aldığımızda; $40\mu\text{M}$ kapesitabinin ve $120\mu\text{M}$ fisetinin yabanıl-tip HT29 hücrelerinde KD/HT29 hücrelerine kıyasla daha fazla inhibisyon yanıtı verdiği görüldü. Dolayısıyla kapesitabin etkisinin daha az inhibisyon göstermesi KD/HT29 hücre soyunun bu ilaca direnç geliştirdiğini gösterdi. Ayrıca fisetin ve/veya kapesitabin maruziyeti iki hücre soyunda da inhibisyon yanıtı verdi. Bu

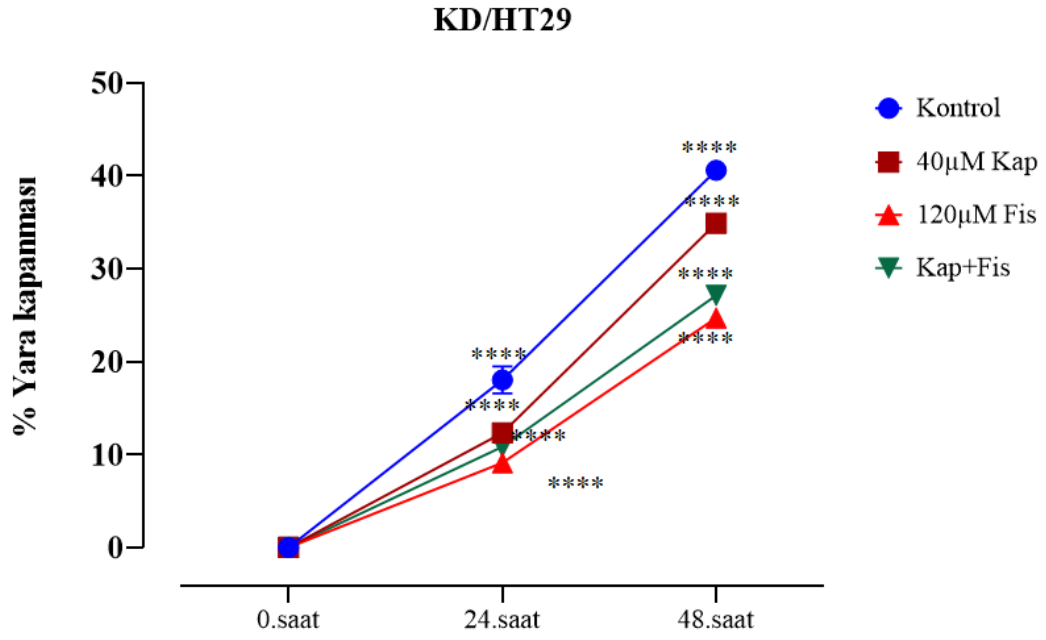
sonuçlar, KD/HT29 hücrelerinin kapasitabine direnç gelişimi göstermesinin yanında fisetin bu KD/HT29 hücrelerinin çoğalmasını daha fazla inhibe ettiği de belirlendi. Bu deneylerin sonuçlarına göre daha sonra yapılacak deneylerde fisetin 120µM dozu ile devam edilmesine karar verildi.

6.4. Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında hücre g deneyleri

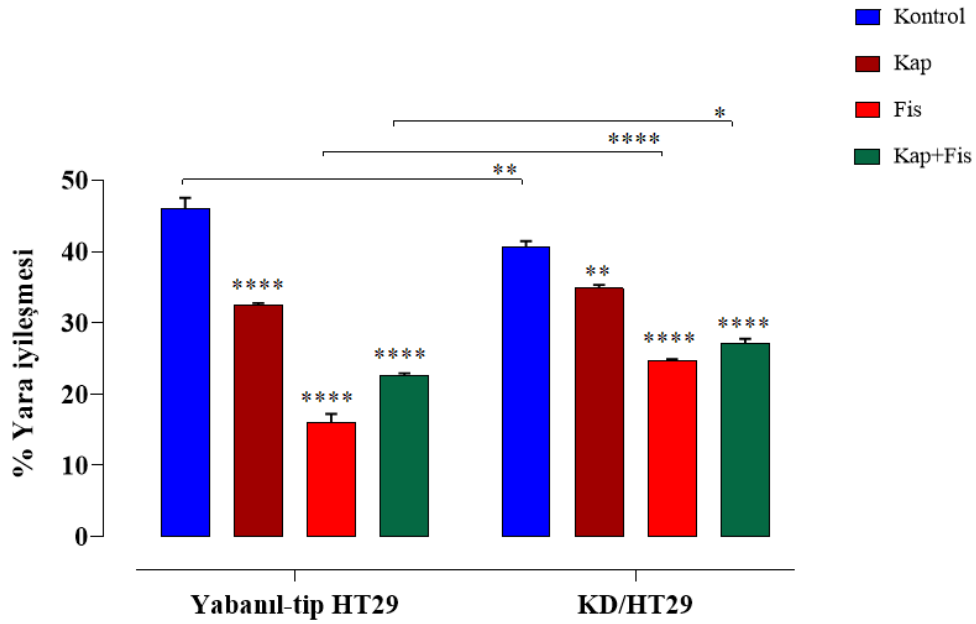
Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soyları, 12-kuyulu plakalara (5x10⁴ hücre/kuyu) ekilmiştir. Yaralar, her bir kuyucuğun tüm çapı boyunca 200 µL' lik bir pipet ucu ile kazınarak oluşturuldu. Daha sonra, hücreler PBS ile yıkandı, fisetin ve/veya kapasitabin içeren ortam ile 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra ortam atıldı ve taze besiyeri eklendi. izilmeden hemen sonra (0.saat), 24. ve 48. saatlerde faz kontrast ışık mikroskopunda görüntüler alındı (şekil 29). Yara genişlikleri ImageJ Yazılımı kullanılarak hesaplandı.



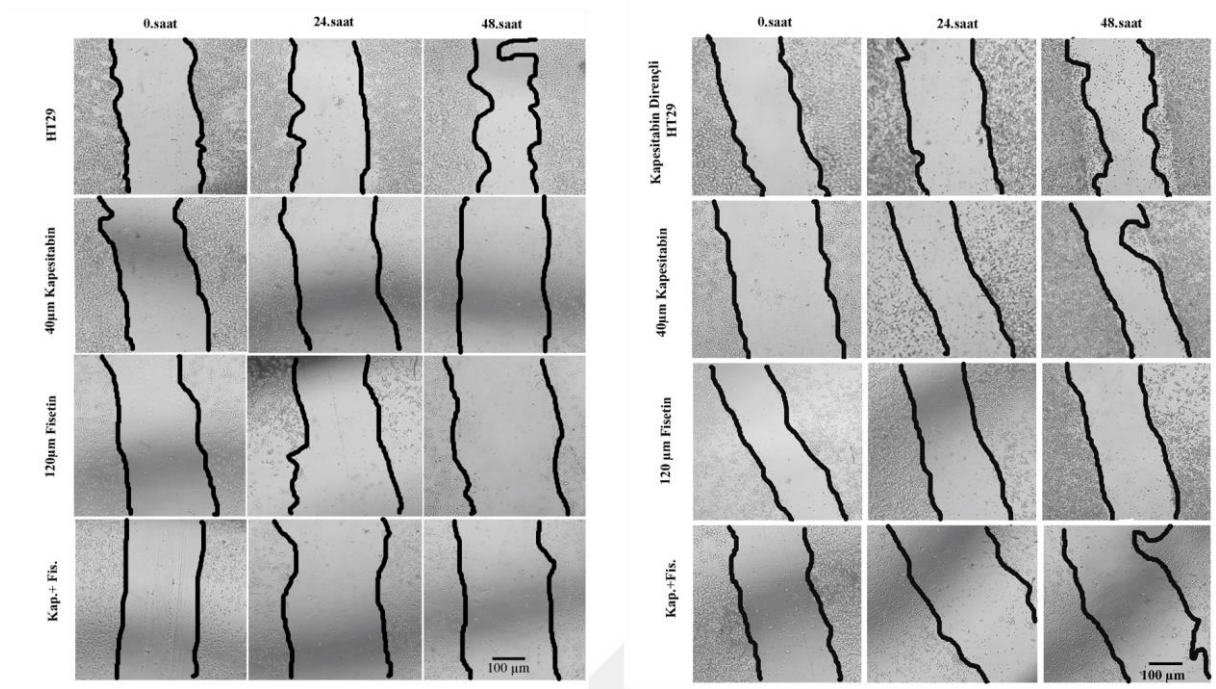
şekil 29. Yabanıl-tip HT29 hücre soyunda % yara iyileşimi. Hücrelerin kapasitabin, fisetin ve kombinasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonrası her grubun 0., 24. ve 48. saat yüzde kapanma grafikleri çizildi. Veriler en az dört bağımsız deneyin ortalaması ± SEM olarak sunuldu (**** P<0.0001) (Kısaltmalar: Kap= kapasitabin; Fis= fisetin, Kap+fis= Kapesitabin+fisetin).



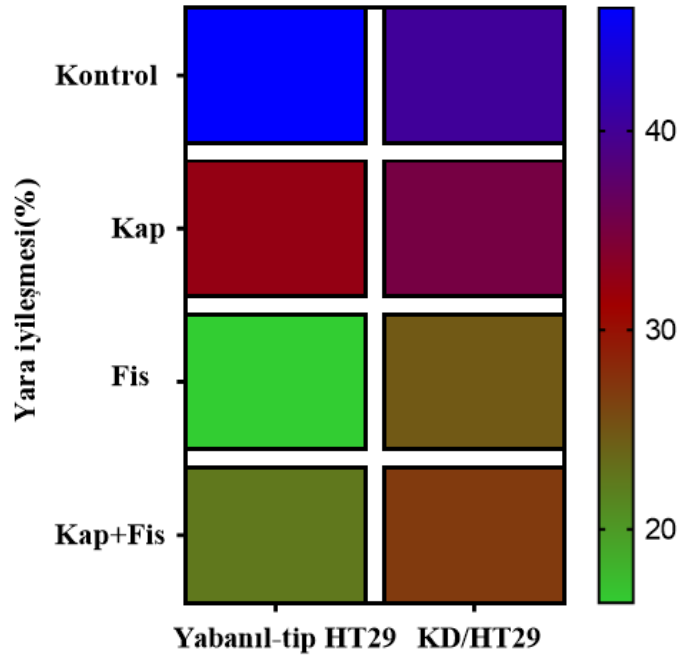
Şekil 30. KD/HT29 hücre soyunda % yara iyileşimi. Hücrelerin kapesitabin, fisetin ve kombinasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonrası her grubun 0., 24. ve 48. saat yüzde kapanma grafikleri çizildi. Veriler en az dört bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (**** $P < 0.0001$) (Kısaltmalar: Kap= kapesitabin; Fis= fisetin, Kap+fis= Kapesitabin+fisetin).



Şekil 31. Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında yara iyileşmesi deneyi karşılaştırılması. Hücrelerin kapesitabin, fisetin ve kombinasyonları ile 48 saat inkübasyonu sonrası her iki grubun karşılaştırmalı grafikleri Two-way ANOVA multiple karşılaştırmalı testi yapılarak çizildi. Veriler en az dört bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (**** $p < 0.0001$; ** $p < 0.0044$; * $p < 0.0180$) (Kısaltmalar: Kap= kapesitabin; Fis= fisetin, Kap+fis= Kapesitabin+fisetin)



Şekil 32. Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında yara iyileşmesi görüntüleri. Hücrelerin, kapesitabin, fisetin ve kombinasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonrası 0., 24. ve 48. saatteki her iki hücre grubundaki yara iyileşimi görüntüleri faz kontrast ışık mikroskopunda alındı (Kısaltmalar: Kap= kapesitabin; Fis= fisetin, Kap+fis= Kapesitabin+fisetin).



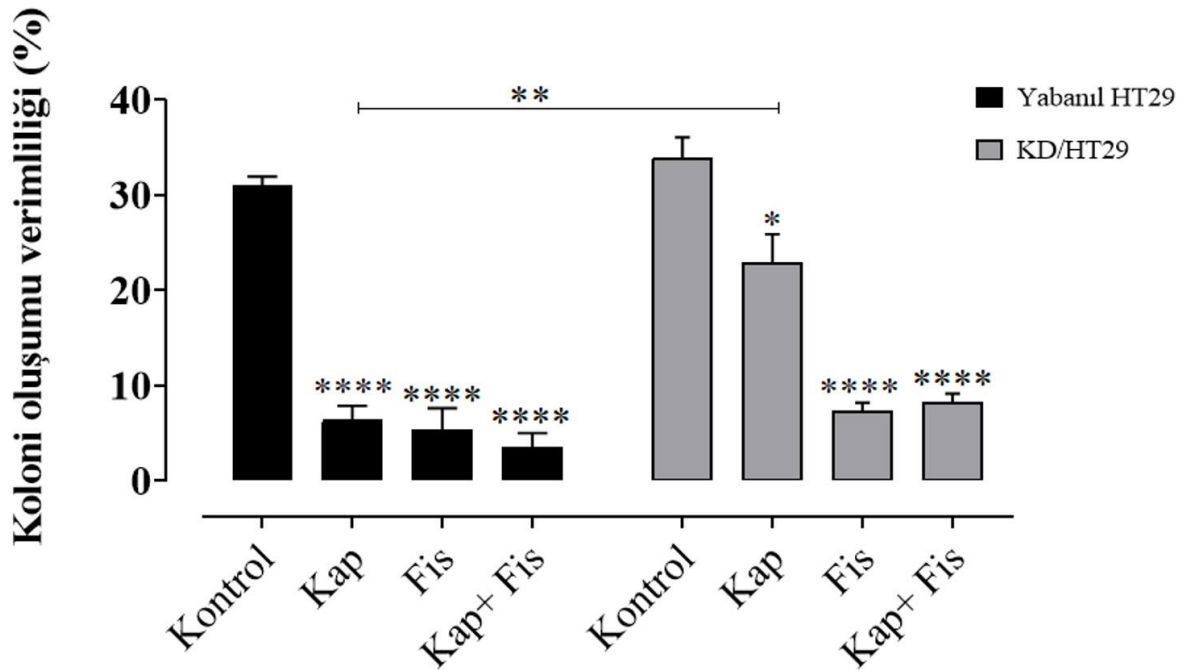
Şekil 33. Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında yara iyileşimi ısı-haritası. Hücrelerin kapesitabin, fisetin ve kombinasyonları ile 48 saat inkübasyonu sonrası her iki grubun karşılaştırmalı ısı haritası grafiği. Veriler en az dört bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (**** $p < 0.0001$; ** $p < 0.0044$; * $p < 0.0180$) (Kısaltmalar: Kap= kapesitabin; Fis= fisetin, Kap+fis= Kapesitabin+fisetin).

Hücre yara iyileşme deneylerinde her iki hücre soyunda hücre grupları kapanma (iyileşme) eğilimindedir ancak kontrol grubu diğer gruplara oranla 24 ve 48. saatte daha fazla kapanma gösterdi. Yabancı HT29 hücrelerinde 120 μ M fisetin grubunun tüm gruplara göre daha az kapanma gösterme sebebi hücre çoğalmasını daha güçlü inhibe etmesidir (Şekil 31).

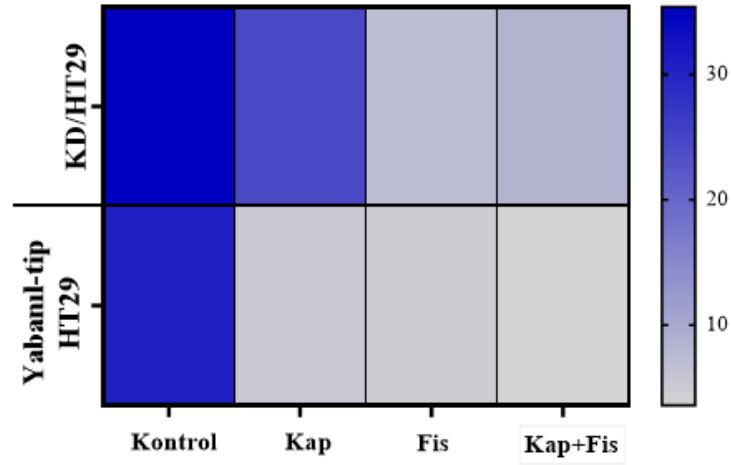
Aynı şekilde KD/HT29 hücre gruplarında da yaralar kapanma eğilimindedir ancak yabancı HT29 hücre soyuna göre kapesitabinin dirençli hücrelerde daha az etkin olmasından dolayı kapanma yüzdelerindeki değişim farklı bulunmuştur.

6.5. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında koloni oluşumu deneyleri

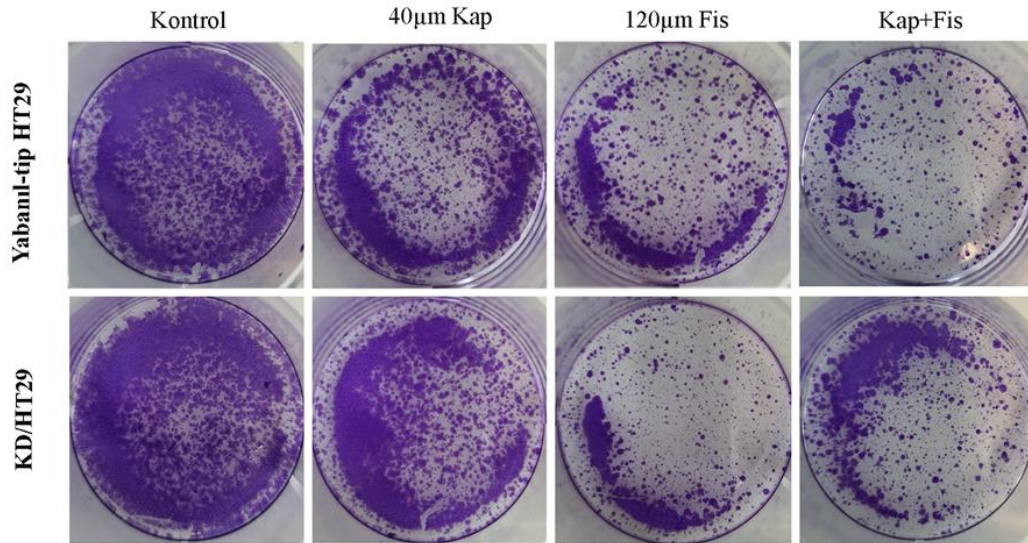
Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında koloni oluşumu deneyleri yapıldı. HT29 hücre soyları, koloni oluşum kapasitelerini değerlendirmek için, 1×10^3 hücre/kuyu 6-kuyulu plakalara ekildi ve 37°C' de ve %5 CO₂' de inkübe edildi. 24 saat sonra hücreler aynı koşullar altında, fisetin, kapesitabin ve fisetin ve /veya kapesitabin ile muamele edildi. 24 saat sonra ortam değiştirildi ve hücrelerin 11 gün boyunca koloni oluşumuna izin verildi. Daha sonra hayatta kalan koloniler etanol ile sabitlendi ve kristal viyole ile boyandı (Franken ve ark., 2006). Koloni oluşumu deney aşamaları Şekil 34' te gösterilmiştir.



Şekil 34. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında % koloni oluşumu verimliliği. Hücrelerin, kapesitabin, fisetin ve kombinasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonrası oluşan koloniler sayıldı. Veriler, kontrol hücrelerine göre yüzde olarak ifade edildi ve koloni oluşum verimliliğinin nicel analiz sonuçları grafikleri çizildi. Veriler en az dört bağımsız deneyimin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (**** $p < 0.0001$; ** $p < 0.0041$; * $p < 0.0147$) (Kısaltmalar: Kap= kapesitabin; Fis= fisetin, Kap+fis= Kapesitabin+fisetin).



Şekil 35. Yabancıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında koloni oluşumu deneyinin ısı-haritası grafiği. Hücrelerin, kapesitabin, fisetin ve kombinasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonrası 11 gün boyunca koloni oluşmasına izin verildi ve sonra oluşan koloniler sayıldı ve ısı-harita grafikleri çizildi. Veriler en az dört bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (Kısaltmalar: Kap= kapesitabin; Fis= fisetin, Kap+fis= Kapesitabin+fisetin).



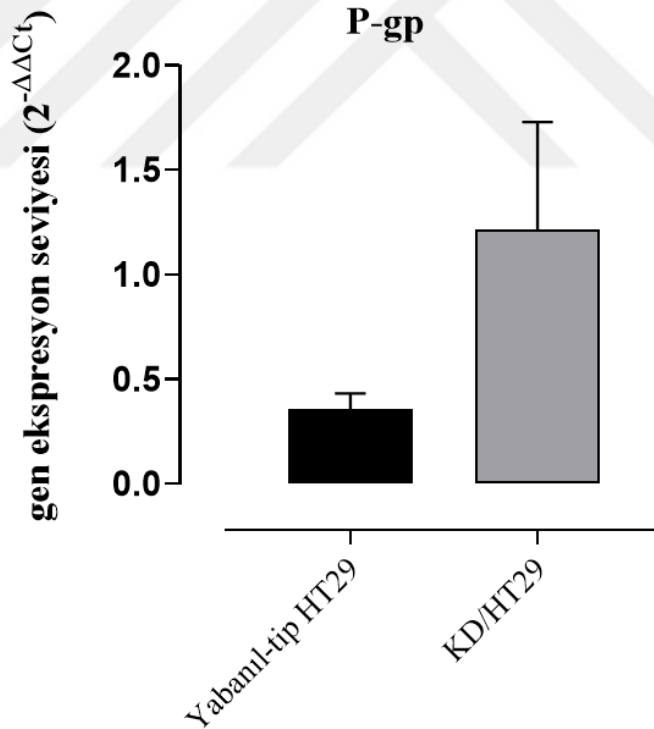
Şekil 36. Yabancıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soyu koloni oluşumu görüntüleri. Hücrelerin, kapesitabin, fisetin ve kombinasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonrası 11 gün boyunca koloni oluşmasına izin verildi ve sonra oluşan koloniler görüntülendi (Kısaltmalar: Kap= kapesitabin; Fis= fisetin, Kap+fis= Kapesitabin+fisetin).

Araştırmamızda, kombinasyon ilaç tedavilerinin kolorektal kanser hücre büyümesinde temel bir süreç olan koloni oluşturma yeteneğini inhibe edip etmediğini inceledik. Koloni oluşturma verimliliği formülü ile yapılan hesaplamalara göre deney sonuçları analiz edildi. Hem yabancıl-tip HT29 hem de KD/HT29 hücreleri, fisetin ve/veya kapesitabine maruz kaldığında inhibe olmuştur. Kapesitabin ve fisetin kombinasyonu, yabancıl-tip HT29 hücrelerinde kontrol grubuna

kıyasla koloni oluşturmaya en çok engelleyen etkileri gösterdi. Öte yandan, KD/HT29 hücrelerinde fisetin yalnız başına kontrol grubuna kıyasla daha fazla inhibe edici etki göstermiştir (**** $p<0.0001$) (Şekil 34). 40 μ M kapesitabin KD/HT29 hücre soyundaki koloni oluşumu yüzdesi, yabancı-tip HT29 hücrelerine kıyasla daha yüksektir (** $p<0.0041$). Yabancı-tip HT29 hücrelerinde, 40 μ M kapesitabin dozu kontrol grubuna kıyasla koloni oluşumunu %80 inhibe etmiştir. KD/HT29 hücrelerinde ise 40 μ M kapesitabin dozu kontrol grubuna kıyasla koloni oluşumunu %31,25 inhibe etmiştir (* $p<0.0147$). KD/HT29 hücrelerindeki kontrol grubuna kıyasla, kapesitabin ve fisetin kombinasyonu koloni oluşumunu önemli ölçüde %77,14 inhibe etmiştir (**** $p<0.0001$). Koloni oluşumu sonuçları, hücre çoğalması ve yara iyileşimi deneyleri ile elde edilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur.

6.6. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında miRNA ekspresyon düzeyleri

Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde P-gp ekspresyon düzeyindeki değişim Şekil 37’de gösterilmiştir.

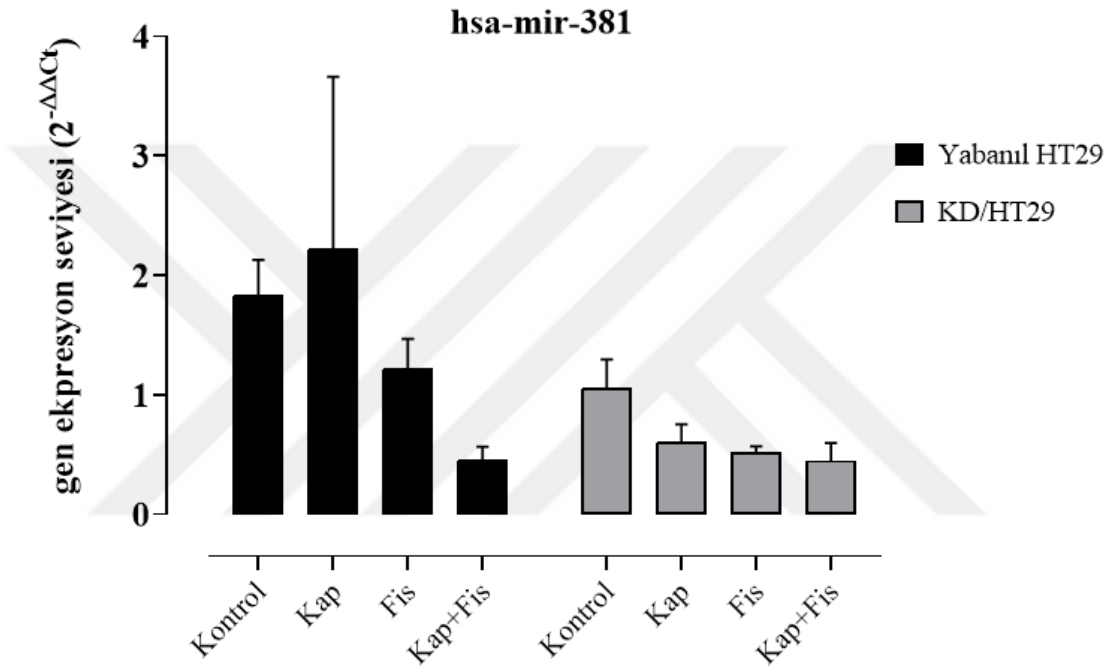


Şekil 37. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında P-gp ekspresyon düzeyi grafiği. Her iki hücre grubundan RNA ekstrakte edildikten sonra cDNA sentezi yapıldı. Uygun primerler kullanılarak GZ-PZR yapıldı. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu.

P-gp (MDR1) ABC-1 taşıyıcı ailesinin üyesidir. P-gp ekspresyonunun direnç gelişimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda, yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde direnç

gelişimi ile ilişkiyi göstermek için P-gp ekspresyonuna GZ-PZR ile bakılmıştır. Sonuçlarımızda, yabancı-tip HT29 hücrelerine göre KD/HT29 hücrelerinde P-gp ekspresyon düzeylerinde artış olduğu belirlendi. KD/HT29 hücrelerinde P-gp ekspresyon düzeylerinde artış olması kapesitabin direncinin geliştiğini göstermiştir (Şekil 37).

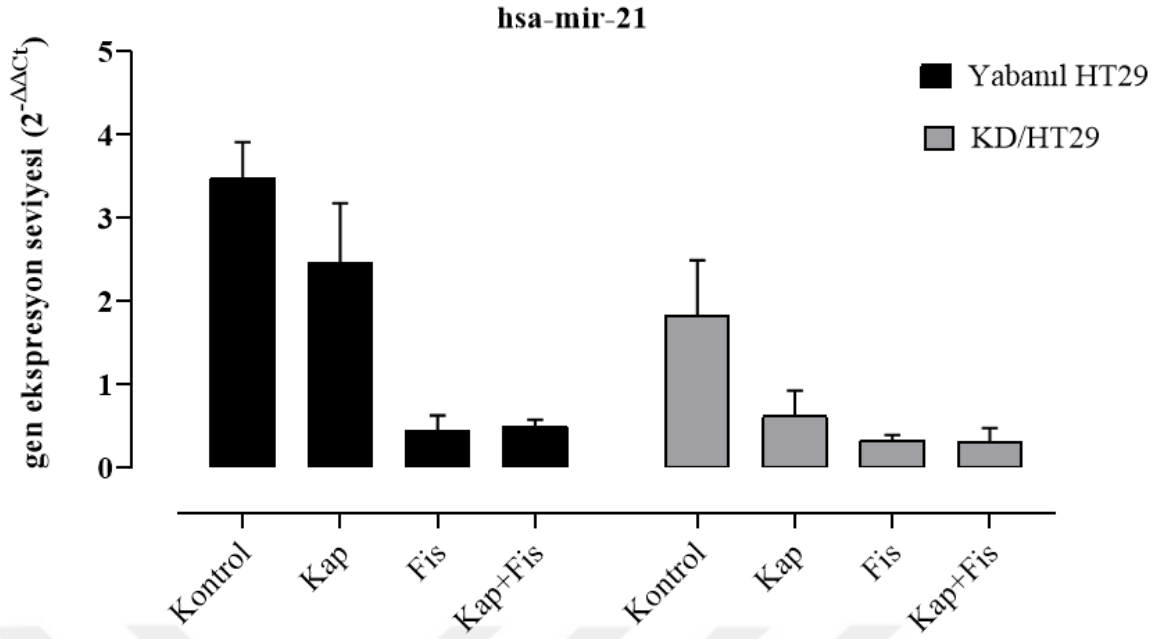
Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde hsa-mir-381 ekspresyon düzeyindeki değişim Şekil 38’ de gösterilmiştir.



Şekil 38. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında hsa-mir-381 ekspresyon düzeyi grafiği. Her iki hücre grubu, kapesitabin, fisetin ve kombinasyonları ile inkübe edilip miRNA ekstrakte edildikten sonra cDNA sentezi yapıldı. Uygun primerler kullanılarak GZ-PZR yapıldı. Housekeeping gen olarak RNU6 kullanıldı. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (Kısaltmalar: Kap=40 μ M kapesitabin; Fis=120 μ M fisetin).

Çalışmamızda, KD/HT29 hücrelerinde kapesitabin ve fisetin gruplarındaki hsa-mir-381 inhibisyonu ile kemo-direnç arasında ilişki önerilebilir.

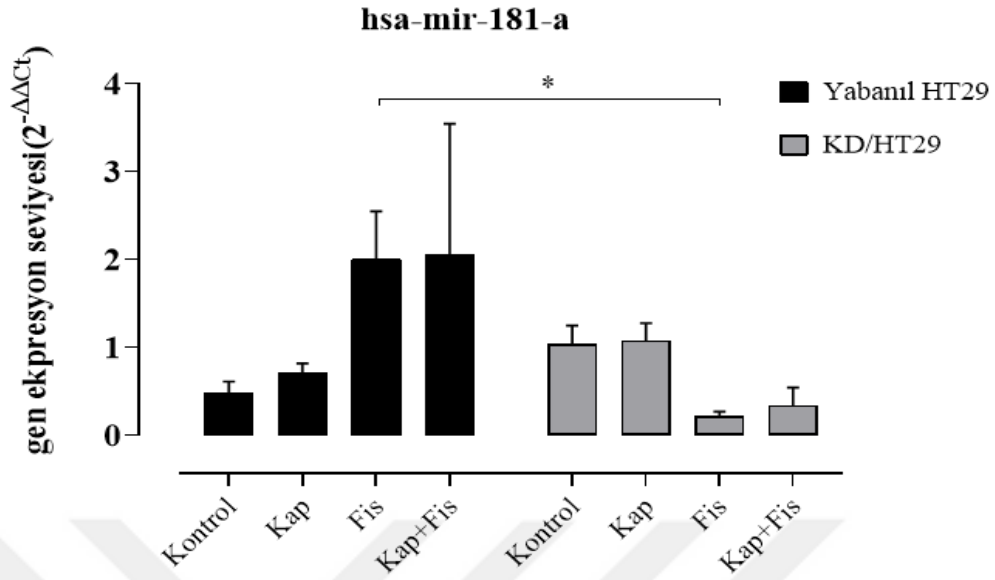
Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde hsa-mir-21 ekspresyon düzeyindeki değişim Şekil 39’ da gösterilmiştir.



Şekil 39. Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde hsa-mir-21 ekspresyon düzeyi grafiği. Her iki hücre grubu kapesitabin, fisetin ve kombinasyonları ile inkübe edilip miRNA ekstrakte edildikten sonra cDNA sentezi yapıldı. Uygun primerler kullanılarak GZ-PZR yapıldı. Housekeeping gen olarak RNU6 kullanıldı. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (Kısaltmalar: Kap=40 μ M kapesitabin; Fis=120 μ M fisetin).

Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde, kapesitabin, fisetin ve kombinasyonları ile hsa-miR-21 ekspresyon düzeylerinde inhibisyon olduğu görülmüştür. Hem yabanıl-tip HT29 hem de KD/HT29 hücrelerinde hsa-miR-21 ekspresyonunun inhibisyonu, en çok fisetin, fisetin+kapesitabin ile tedavi edilen gruplarda görülmüştür.

Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde hsa-mir-181-a ekspresyon düzeyindeki değişim Şekil 40' da gösterilmiştir.

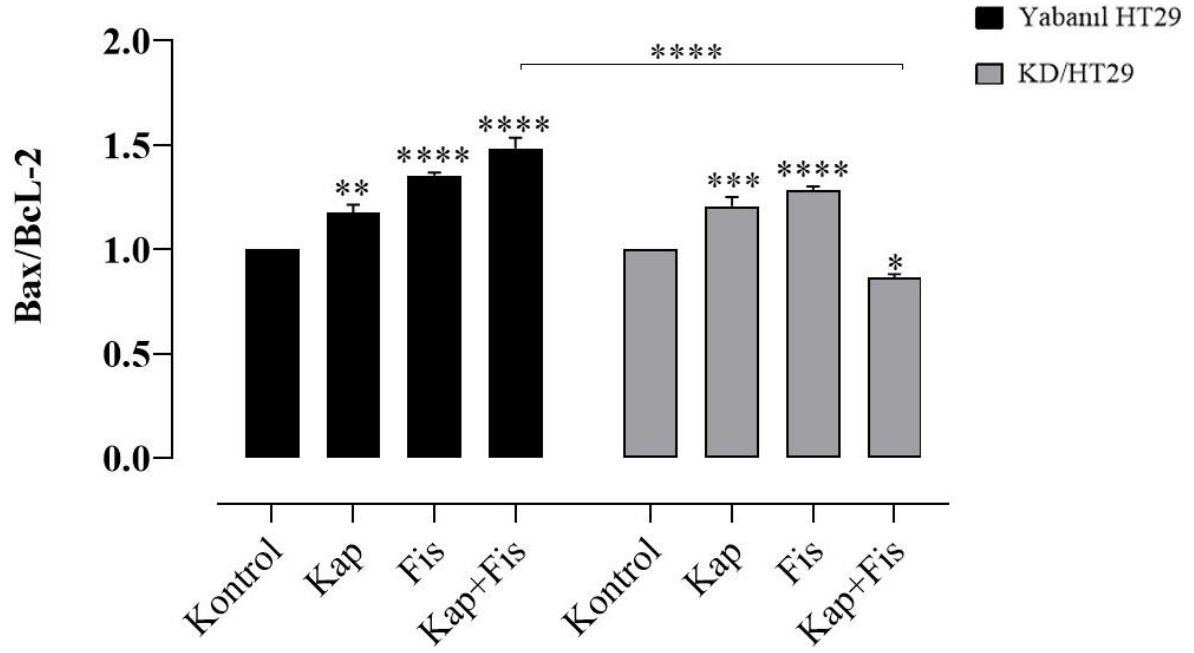


Şekil 40. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde hsa-mir-181-a ekspresyon düzeyi grafiği. Her iki hücre grubu kapesitabin, fisetin ve kombinasyonları ile inkübe edilip miRNA ekstrakte edildikten sonra cDNA sentezi yapıldı. Uygun primerler kullanılarak RT-PCR yapıldı. Housekeeping gen olarak RNU6 kullanıldı. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (* $p < 0,0105$) (Kısaltmalar: Kap=40 μ M kapesitabin; Fis=120 μ M fisetin).

Her iki hücre soyunu karşılaştırdığımızda, fisetin ve fisetin+kapesitabin gruplarında hsa-mir-181-a ekspresyon düzeyi yabancı-tip HT29 hücrelerinde artarken KD/HT29 hücrelerinde azaldı. Fisetin uygulanan yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücreleri karşılaştırıldığında, KD/HT29 hücrelerinde hsa-mir-181-a2 ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir (* $p < 0,0105$).

6.7. Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soylarında apoptoz protein ekspresyon düzeyleri

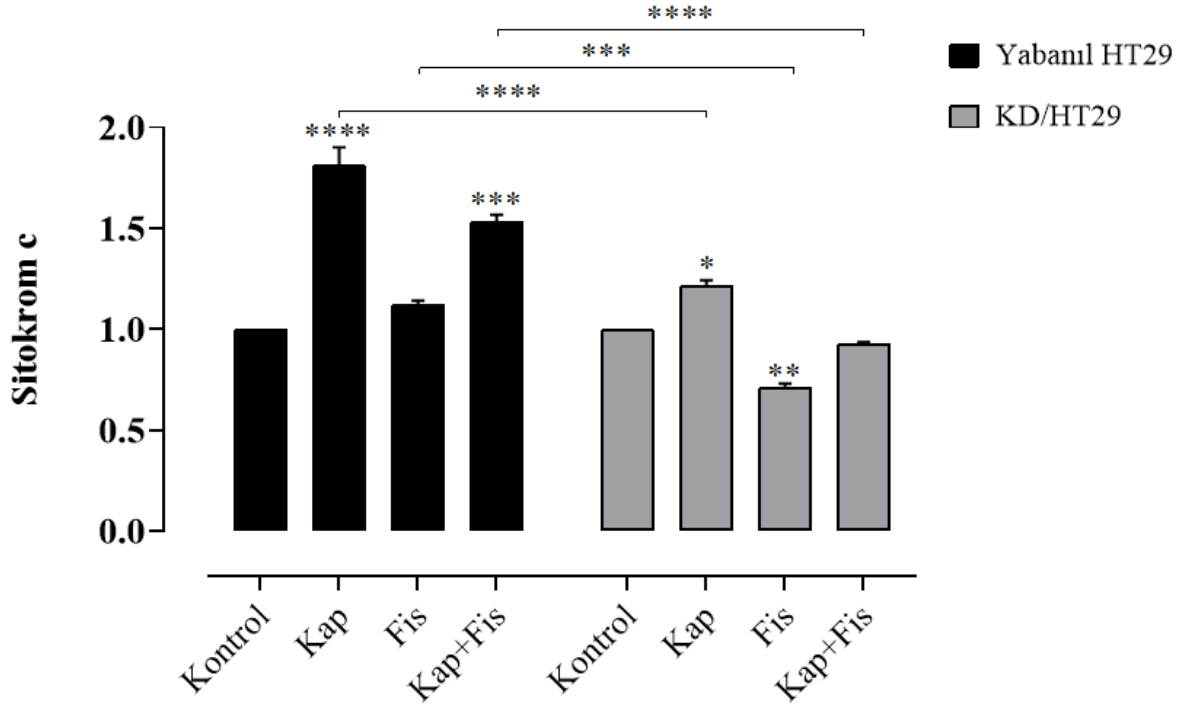
Western data grafikleri ve görüntüleri, Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde Bax/BcL-2 protein ekspresyon analizi Şekil 41’ de gösterilmiştir.



Şekil 41. Bax/BcL-2 protein ekspresyon düzeyi grafiği. 24 saat fisetin ve/veya kapesitabin varlığında çoğaltılan hücrelerden hücre lizatları hazırlanıp western blot analizleri yapıldı ve özgün antikorlarla etkileştirildi. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (* $p < 0.0164$; ** $p < 0.0018$; *** $p < 0.0004$; **** $p < 0.0001$) (Kısaltmalar: Kap=40 μ M Kapesitabin; Fis=120 μ M fisetin).

Fisetin, tek başına veya fisetin ile kombinasyon halinde kapesitabin, yabancı-tip HT29 hücrelerinde Bax/BcL-2 proteini ekspresyonunda artışa neden olmuştur (** $p < 0.0018$; **** $p < 0.0001$). KD/HT29 hücrelerinde ise, kapesitabin ve fisetin kontrol grubuna göre artışa neden olurken, kapesitabin ve fisetin birlikte uygulandığında inhibisyon yapmıştır (* $p < 0.0164$; *** $p < 0.0004$; **** $p < 0.0001$). Kapesitabin ve fisetin ile tedavi edilen yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücreleri karşılaştırıldığında, KD/HT29 hücrelerindeki Bax/BcL-2 protein seviyesi, yabancı-tip HT29 hücrelerine göre inhibe olmuştur (**** $p < 0.0001$) (Şekil 41).

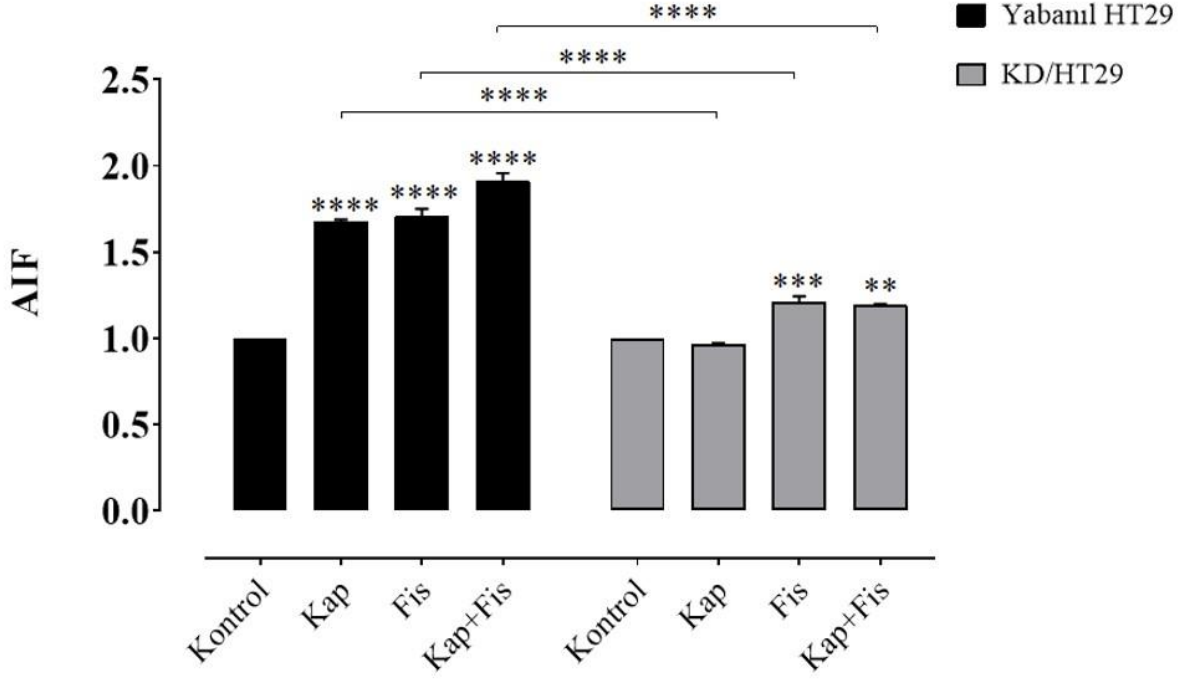
Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde sitokrom c protein ekspresyon analizi Şekil 42’ de gösterilmiştir.



Şekil 42. Cyt c protein ekspresyon düzeyi grafiği. 24 saat fisetin ve/veya kapesitabin varlığında çoğaltılan hücrelerden hücre lizatları hazırlanıp western blot analizleri yapıldı ve özgün antikorlarla etkileştirildi. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (* $p < 0,0323$; ** $p < 0,0082$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$) (Kısaltmalar: Kap=40 μ M kapesitabin; Fis=120 μ M fisetin).

Yabancı-tip HT29 hücrelerinde, kontrol grubuna göre kapesitabin cyt c seviyelerini arttırdı (**** $p < 0,0001$). Kapesitabin ve fisetin birlikte uygulandığında kontrol grubuna göre cyt c düzeylerinde artışa neden oldu (*** $p < 0,0003$). Kapesitabin, KD/HT29 hücrelerinde cyt c seviyelerini biraz yükseltti (* $p < 0,0323$), ancak fisetin inhibisyona neden oldu (** $p < 0,0001$). Bu iki hücre grubu karşılaştırıldığında, KD/HT29 hücrelerinin tüm ilaç gruplarında cyt c ekspresyon düzeylerinin anlamlı düzeyde inhibe olduğu görüldü (**** $p < 0,0001$, (** $p < 0,0005$) (Şekil 42).

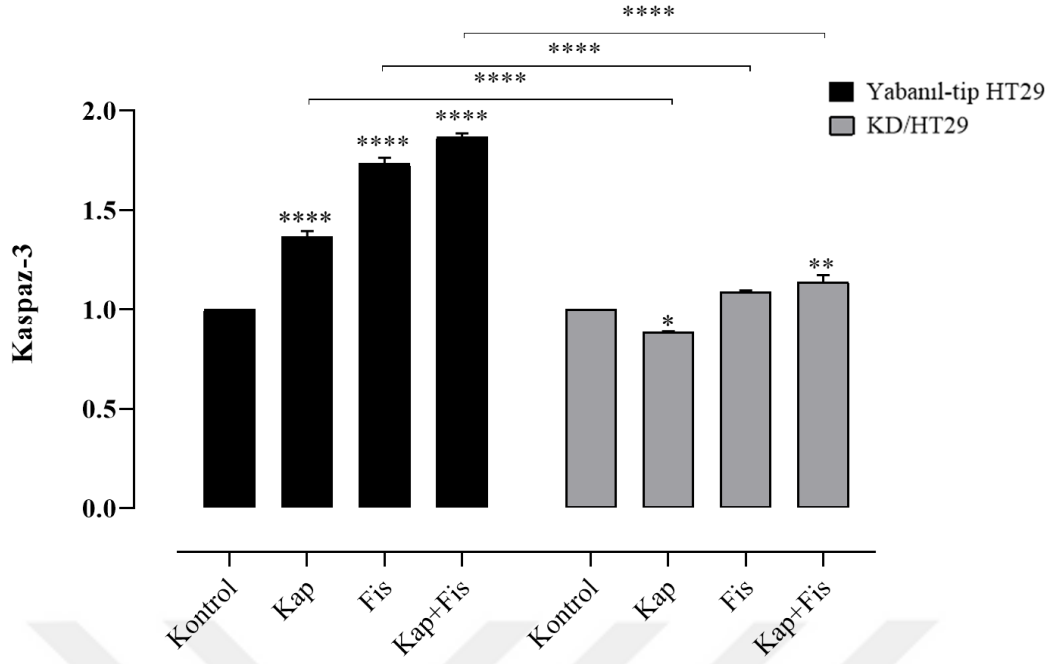
Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde Apoptoz indüklemeye faktörü (AIF) protein ekspresyon analizi Şekil 43' te gösterildi.



Şekil 43. AIF protein ekspresyon düzeyi grafiği. 24 saat fisetin ve/veya kapesitabin varlığında çoğaltılan hücrelerden hücre lizatları hazırlanıp western blot analizleri yapıldı ve özgün antikorlarla etkileştirildi. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (** $p < 0,0011$; *** $p < 0,0006$; **** $p < 0,0001$) (Kısaltmalar: Kap=40 μ M kapesitabin; Fis=120 μ M fisetin).

Kontrole göre tüm ilaç gruplarında hem yabancı-tip HT29 hücrelerinde AIF düzeyleri artmıştır, hem de KD/HT29 hücrelerinde kapesitabin tek başına veya fisetin ile kombinasyon halinde uygulandığında kontrol gruplarına kıyasla AIF seviyeleri anlamlı düzeyde artış göstermiştir (** $p < 0,0006$; ** $p < 0,0011$). Bu iki hücre grubu karşılaştırıldığında, KD/HT29 hücrelerinin, yabancı-tip HT29 hücrelerine göre tüm ilaç gruplarında AIF ekspresyonunu inhibe ettiği görüldü (**** $p < 0,0001$) (Şekil 43).

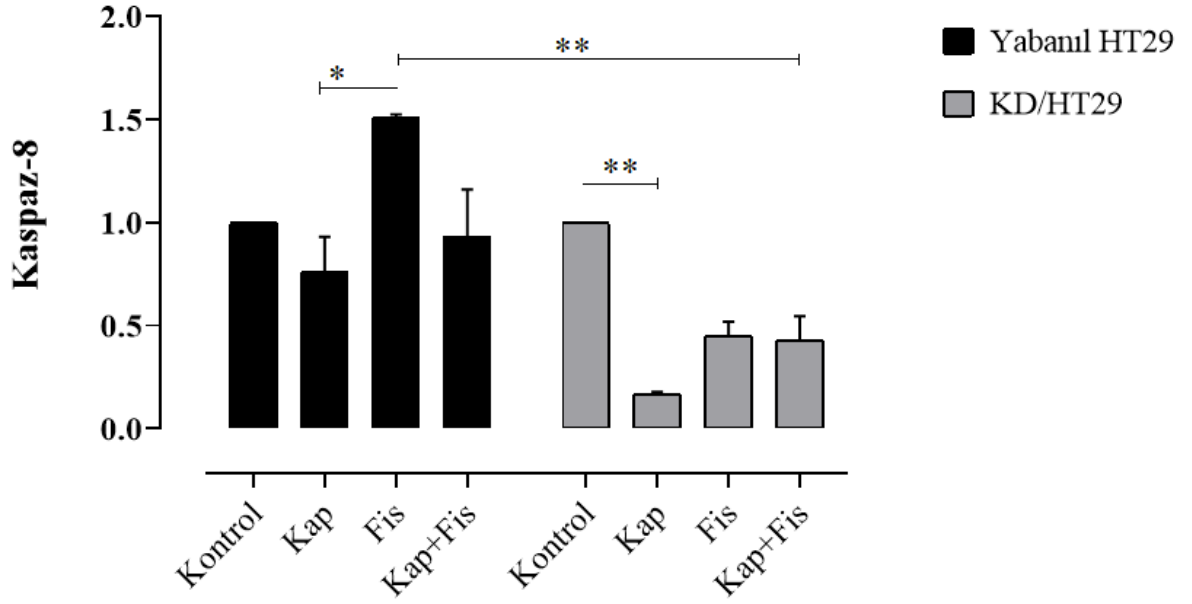
Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde kaspaz-3 protein ekspresyon analizi Şekil 44' te gösterildi.



Şekil 44. Kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyi grafiği. 24 saat fisetin ve/veya kapesitabin varlığında çoğaltılan hücrelerden hücre lizatları hazırlanıp western blot analizleri yapıldı ve özgün antikorlarla etkileştirildi. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (* $p < 0,0236$; ** $p < 0,0011$; *** $p < 0,0006$; **** $p < 0,0001$) (Kısaltmalar: Kap=40 μ M kapesitabin; Fis=120 μ M fisetin).

Kontrole göre tüm ilaç gruplarında yabancı-tip HT29 hücrelerinde kaspaz-3 düzeyleri önemli derecede artmış iken, KD/HT29 hücrelerinde tek başına kapesitabin grubunda anlamlı olarak azalmış (* $p < 0,0236$) ve kapesitabinle fisetin kombinasyon halinde uygulandığında kontrol gruplarına kıyasla çok az anlamlı düzeyde artış göstermiştir (** $p < 0,0011$). Bu iki hücre grubu karşılaştırıldığında, KD/HT29 hücrelerinin, yabancı-tip HT29 hücrelerine göre tüm ilaç gruplarında kaspaz-3 ekspresyonunu inhibe ettiği görüldü (**** $p < 0,0001$) (Şekil 44).

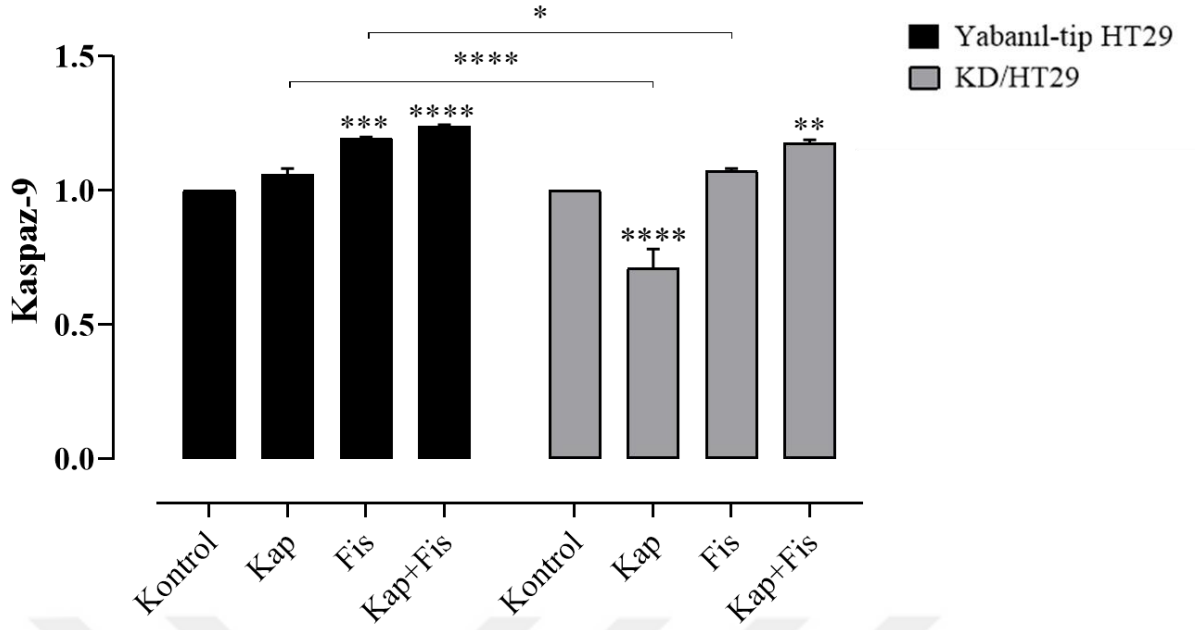
Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde kaspaz-8 protein ekspresyon analizi Şekil 45’ te gösterildi.



Şekil 45. Kaspaz-8 protein ekspresyon düzeyi grafiği. 24 saat fisetin ve/veya kapesitabin varlığında çoğaltılan hücrelerden hücre lizatları hazırlanıp western blot analizleri yapıldı ve özgün antikorlarla etkileştirildi. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (* $p < 0,0196$; ** $p < 0,0029$) (Kısaltmalar: Kap=40 μ M kapesitabin; Fis=120 μ M fisetin).

Yabancı-tip HT29 hücrelerinde kontrole göre tüm ilaç gruplarında kaspaz-8 düzeyleri anlamlı bulunmamış ancak bu hücrelerde kapesitabinle fisetin arasındaki fark anlamlı (* $p < 0,0196$) bulunmuştur. Yani kapesitabin kaspaz-8 ekspresyonunu anlamlı olmasa da azaltmıştır fakat fisetin kaspaz-8 düzeyini artırmıştır. Ancak KD/HT29 hücre soyunda kapesitabin grubu kendi kontrolüne göre anlamlı olarak inhibisyona neden olmuştur (** $p < 0,0029$). Fisetin ve kapesitabin ile fisetin kombinasyonu kontrol grubuna anlamlı göre azalma göstermemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 45).

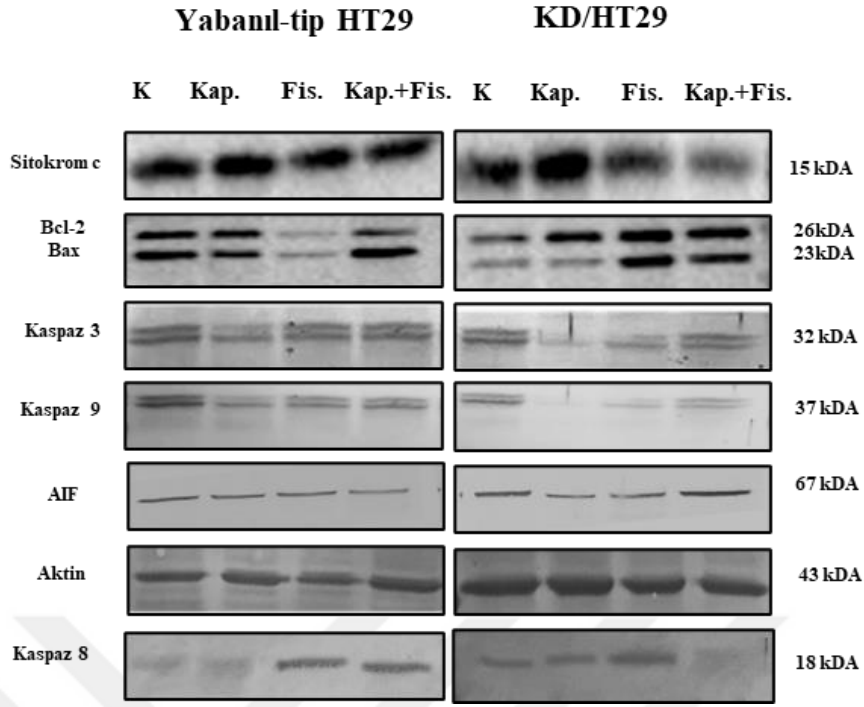
Yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde kaspaz-9 protein ekspresyon analizi Şekil 46' da gösterildi.



Şekil 46. Kaspaz-9 protein ekspresyon düzeyi grafiği. 24 saat fisetin ve/veya kapesitabin varlığında çoğaltılan hücrelerden hücre lizatları hazırlanıp western blot analizleri yapıldı ve özgün antikorlarla etkileştirildi. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SEM olarak sunuldu (* $p < 0,0479$; ** $p < 0,0011$; *** $p < 0,0003$; **** $p < 0,0001$) (Kısaltmalar: Kap=40 μ M kapesitabin; Fis=120 μ M fisetin).

Yabancı-tip HT29 hücrelerinde kontrole göre fisetin ve kapesitabin ile kombine fisetin gruplarında kaspaz-8 düzeyleri önemli derecede artış göstermiştir (*** $p < 0,0003$; **** $p < 0,0001$). KD/HT29 hücrelerinde ise kapesitabin grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede inhibisyon gösterirken (**** $p < 0,0001$), kapesitabin ile kombine fisetin grubu anlamlı olarak artış göstermiştir (** $p < 0,0011$). Bu iki hücre soyu karşılaştırıldığında, kapesitabin grubu ve fisetin grubu anlamlı derecede azalış göstermiştir (* $p < 0,0479$; **** $p < 0,0001$) (Şekil 46).

Protein ekspresyon düzeyleri western blot temsili görüntüleri Şekil 47’ de gösterilmiştir.



Şekil 47. Cyt c, Bax, Bcl-2, AIF, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve Aktin protein ekspresyonu western blot görüntüleri. 24 saat fisetin ve/veya kapesitabin varlığında çoğaltılan hücrelerden hücre lizatları hazırlanıp western blot analizleri yapıldı ve özgün antikorlarla etkileştirildi. (Kısaltmalar: Kap=40µM kapesitabin; Fis=120µM fisetin).

Western emdirimi analiz deneylerinden elde edilen sonuçlara göre;

Hücrelerdeki apoptoz protein ifadeleri, fisetin kaynaklı hücre ölümünde yer alan potansiyel moleküler mekanizmayı araştırmak için belirlendi. Kapesitabin ve/veya fisetin yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde apoptozu indükleyip indükleyemediğini görmek için western emdirimi analizi yapıldı. Sonuçlar, tüm apoptoz protein seviyelerinin, fisetin ve/veya kapesitabin kombinasyonlarında yabanıl-tip HT29 hücrelerinde önemli ölçüde arttığı, ancak KD/HT29 hücreleri üzerindeki etkisinin çok daha az olduğu gösterildi.

Yabanıl-tip HT29 hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonu tüm ilaçlarla artarken, KD/HT29 hücrelerinde kapesitabin kaspaz-3 düzeylerini kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalttı (**** $p < 0.0001$). Bunun nedeni, KD/HT29 hücrelerinin kapesitabine karşı bir direnç mekanizması geliştirmesidir. Ek olarak, KD/HT29 hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonu, kapesitabin ile kombine edilmiş fisetin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında arttığı belirlendi (** $p < 0.0056$). Yabanıl-tip HT29 ve KD/HT29 hücre soyları karşılaştırıldığında, KD/HT29 hücreleri, tüm ilaç tedavilerinde yabanıl-tip HT29 hücrelerine kıyasla kaspaz-3 ekspresyonunun inhibisyonunu indüklediği görülmektedir (**** $p < 0.0001$) (Şekil 47).

Yabancı-tip HT29 hücrelerinde kaspaz-9 seviyeleri tüm ilaç gruplarında artarken (**** $p<0.0003$), kapesitabin, KD/HT29 hücrelerinde kaspaz-9 seviyelerini azalttı (**** $p<0.0001$). Ayrıca KD/HT29 hücrelerinde kapesitabin, fisetin ile birlikte uygulandığında kaspaz-9 ekspresyonunda anlamlı düzeyde artışa neden oldu (** $p<0.0011$). Bu iki hücrede kapesitabin grupları karşılaştırıldığında, yabancı-tip HT29 hücrelerine göre KD/HT29 hücrelerinde kaspaz 9 ekspresyonu inhibe olduğu belirlendi (**** $p<0.0001$).

Yabancı-tip HT29 hücrelerinde AIF düzeyleri kontrol grubuna göre tüm ilaç gruplarında artarken, KD/HT29 hücrelerinde sadece fisetin ve kapesitabin ile fisetin kombinasyon gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı artmıştır (** $p<0,0011$; *** $p<0,0006$; **** $p<0,0001$). AIF ekspresyonunda iki hücre grubu karşılaştırıldığında, KD/HT29 hücrelerinin, yabancı-tip HT29 hücrelerine göre tek başına kapesitabin, tek başına fisetin ve kapesitabinle fisetin kombine gruplarında inhibe olduğu görülmektedir (**** $p<0.0001$).

Fisetin, tek başına veya fisetin ile kombine kapesitabin, yabancı-tip HT29 hücrelerinde Bax/BcL-2 proteini ekspresyonunda artışa neden oldu (** $p<0.0018$; **** $p<0.0001$). KD/HT29 hücrelerinde ise, kapesitabin, fisetin kontrol grubuna göre artışa neden olurken, kapesitabin ve fisetin kombine uygulandığında inhibisyona neden oldu (* $p<0.0164$; *** $p<0.0004$; **** $p<0.0001$). Kapesitabin ve fisetin ile tedavi edilen yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücreleri karşılaştırıldığında, KD/HT29 hücrelerindeki Bax/BcL-2 protein seviyesi, yabancı-tip HT29 hücrelerine göre inhibe olduğu görüldü (**** $p<0.0001$).

Yabancı-tip HT29 hücrelerinde, kapesitabin cyt c seviyelerini arttırmıştır (**** $p<0.0001$). Kapesitabin ve fisetin birlikte uygulandığında kontrol grubuna göre cyt c düzeylerinde artışa neden olmuştur (*** $p<0.0003$). Kapesitabin, KD/HT29 hücrelerinde cyt c seviyelerini yükseltti, ancak fisetin önemli ölçüde inhibisyona neden oldu (* $p<0,0323$; ** $p<0,0082$). Bu iki hücre grubu karşılaştırıldığında, KD/HT29 hücrelerinin tüm ilaç gruplarında cyt c düzeylerinin inhibe olduğu görüldü (*** $p<0.0005$; **** $p<0.0001$).

KD/HT29 hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-9, AIF ve cyt c düzeylerinin yabancı-tip HT29 hücrelerine göre azalması kapesitabin direncinin geliştiğini göstermektedir. Sonuç olarak, KD/HT29 hücrelerinin apoptoza girmekten kısmen korunduğu görüldü.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, HT29 kolorektal kanser hücrelerinin, artan dozda kapesitabin ile inkübe edilerek oluşturulan kapesitabine dirençli HT29 hücrelerinde fisetin tek başına ve/veya kapesitabinle kombinasyonlarının hücre çoğalması, yara iyileşmesi, koloni oluşumu, miRNA ekspresyonları ve apoptoz proteinleri üzerine etkileri incelendi. Metastatik kanserden ölen hastaların neredeyse tamamında çoklu ilaca dirençli tümörlere sahip oldukları belirtilmektedir. Araştırmacılar, çoklu ilaç direnci mekanizmalarını etkisiz hale getiren tedavilerin tasarlanabilmesi için yönelik ilaç direnç mekanizmalarının anlaşılmasının gereklilik olduğunu belirtmektedir. Kanser hala zorlu bir düşmandır. Tedaviye yanıtın iyileşme ile sonuçlanması için daha hedefe yönelik terapötiklere yapılan yeni yatırımlar vardır. Ancak çoklu ilaç direnci, kanserin kemoterapötik tedavilerle iyileştirilmesinin önündeki en büyük engel olarak devam etmektedir (Gottesman ve ark., 2023).

5-FU, kapesitabin, irinotekan ve platin tabanlı ilaçlar kolorektal kanser tedavisinde aracı olarak kullanılır, ancak ilaç direnci gibi bazı sorunlar hastaların sonuçlarını iyileştirmek için yeni sitotoksik ilaçları bulmada yeni zorluklar oluşturur (Denlinger ve Barsevick, 2009; Hammond ve ark., 2016; Mohammadian ve ark., 2017; Van der Jeught ve ark., 2018; Blondy ve ark., 2020; Al Saihati ve Rabaan, 2023). Birçok kanser türü başlangıçta kemoterapiye duyarlı olsa da zamanla direnç gelişebilir. Dirençli hücrelerin morfolojik ve biyolojik özelliklerindeki değişiklikler, edinilmiş ilaç direncini gösterebilir. Kolorektal kanser hücrelerinde kapesitabin direncinin gelişme mekanizması hala belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışmada kapesitabine sürekli maruz kalma yoluyla yabancı-tip HT29 hücrelerinde kapesitabine dirençli hücre alt kümesi KD/HT29 oluşturmak üzere doz arttırma stratejisi kullanıldı. Sonuçlarımız, artan kapesitabin dozlarına uzun süreli kronik maruz kalma yoluyla dirençli hücre alt kümesi oluşumunun gerçekleştiğini gösterdi.

Son zamanlarda, kolorektal kanser geniş bir kemosenitivite sergilediğinden kemoterapinin etkinliğini artırmak ve ilaç direnci gibi sorunları azaltmak için bazı yeni ajanlar önerilmiş ve kemopreventif aktivitelere sahip doğal bileşenlerin araştırılmasına odaklanılmıştır (Syed ve ark., 2008; Jeng ve ark., 2018; Afzal ve ark., 2023; Farhan, 2023). Meyveler, sebzeler, yeşil, beyaz ve siyah çay, elma, çilek, bira ve kırmızı şaraplardan elde edilen flavonoidlerin, güçlü kanser önleyici özellikleri olduğu daha önceki birçok çalışmada gösterilmiştir (Ramos, 2007; Androutsopoulos ve ark., 2010; Szliszka ve Krol, 2011; Jeng ve ark., 2018; Kashyap ve ark., 2019; Kubina ve ark., 2022; Afzal ve ark., 2023; Farhan, 2023; Kumar ve ark., 2023). Kanser hücrelerindeki kemoterapinin etkisini artırmak için flavonoidlerle anti-küçük ilaçların ortak

tedavi potansiyeli bir hedef olarak sunulmaktadır (Lin ve ark., 2016). Bu çalışmada, fisetin yabanıl-tip HT29 hücrelerinde apoptozu teşvik ettiği ve kısmen KD/HT29 hücrelerinde apoptoz sinyal yolağını inhibe ettiği gösterildi. Yabanıl-tip HT29 hücrelerinin 120µM ve 240µM fisetin tedavisinin hücre çoğalmasında doz-yanıt eğrisinde inhibitör etkisi gösterildi. Yabanıl-tip HT29 hücre çoğalması deneylerinde fisetin doz yanıt eğrisinde IC₅₀ değeri 59,13µM olarak belirlendi (Şekil 23). Hücre çoğalması deneylerinde literatürü inceleyerek karar verdiğimiz 40µM kapesitabin dozunun hem KD/HT29 hem de yabanıl-tip HT29 hücrelerinde anlamlı inhibisyona neden olduğu belirlendi. Her iki grup birbiriyle karşılaştırıldığında, kapesitabine maruz kalmanın, kapesitabine dirençli KD/HT29 hücrelerinde, yabanıl-tip HT29 hücrelerine kıyasla daha az inhibisyona neden olduğu görüldü. Wu ve arkadaşları, kapesitabin ve visfatin ile birlikte tedavi edilen insan DLD-1 kolorektal kanser hücrelerinin, tek başına kapesitabin ile tedavi edilen hücrelere kıyasla hücre canlılığını arttırdığı belirtildi ve resveratrolün, KRK hücrelerinin kapesitabine duyarlılığını azaltmada visfatin etkisini azalttığı gösterilmiştir (Wu ve ark., 2021). Yapılan başka bir araştırmada kapesitabinin insan kolon kanseri hücrelerinde canlılık ve apoptoz indüksiyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır ve daha düşük dozlarda kapesitabin tedavisinin, apoptozun mitokondriyal yolu aracılığıyla kolon kanseri büyümesinin inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark., 2017; Li ve ark., 2017; Sim ve ark., 2018). Zeynali-Moghaddarn ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HT29 hücre canlılığının, kapesitabin, irinotekan ve 17-AAG' ye 24 saat maruz kaldıktan sonra doza bağlı olarak azaldığı gösterildi. Kapesitabin veya irinotekan ilaç rejimine 17-AAG' nin dahil edilmesinin, hücre canlılığını tek tedavi veya üçlü tedavi gruplarına göre daha etkili bir şekilde azaltabileceği öne sürüldü. Ayrıca 17-AAG, irinotekan veya kapesitabinden oluşan ikili kombinasyon gruplarının sinerjistik etkiler gösterdiği, üçlü kombinasyon grubunun (17-AAG/Kap/irinotekan) ise açık bir antagonistik etki gösterdiği vurgulanmıştır (Zeynali-Moghaddarn ve ark., 2019). Literatürden elde edilen bu bulgular, gözlemlerimizle uyumludur ve kombinasyon tedavilerinin hücre davranışını etkilemedeki potansiyel etkileri vurgulanmıştır.

Çalışmamızdaki başka bir bulgu ise hücre çoğalmasında fisetin grubu, tüm gruplarla karşılaştırıldığında yabanıl-tip HT29 hücrelerinde en fazla inhibisyona neden olduğudur. KD/HT29 hücrelerinde ise kontrol grubuna göre fisetin hücre çoğalmasında daha fazla inhibitör etkiye neden olduğu belirlendi. KD/HT29 hücrelerinde yabanıl-tip HT29 hücrelerine göre az da olsa fisetin hala inhibe edici etki göstermesi direncin de kısmen aşıldığını göstermektedir. Sonuçlarımıza göre yabanıl-tip hücrelerle dirençli hücrelerin çoğalmaları karşılaştırıldığında ilaçların inhibe edici etkileri dirençli hücrelerde daha azdır. Jeng ve arkadaşları tarafından, LoVo kolorektal kanser hücrelerinde fisetin hücre canlılığını inhibe

ettiğini ve doza bağlı olarak apoptozu indüklediği gösterildi. 80µM fisetinin LoVo, OR ve CPT11-LoVo kanser hücrelerinde sırasıyla %9,8, %4 ve %40,3 apoptotik hücreleri indüklediği gösterildi. Ayrıca CPT11' e dirençli Lovo Kanser hücrelerinin fisetin tedavisine karşı daha duyarlı olduğunu ve oksaliptatin dirençli Lovo hücrelerine göre daha fazla inhibitör etkiye sahip olduğu belirtildi (Jeng ve ark., 2018). Sim ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, HT29 hücrelerinde 20µM kapesitabinin hücre çoğalmasını inhibe ettiği belirtildi (Sim ve ark., 2018). Shao ve arkadaşları HT29 hücrelerinin kapesitabin ile tedavi edildikten veya si-RANK ile transfekte edildikten sonra hücre canlılığının negatif kontrollerine kıyasla önemli ölçüde azaldığını belirttiler (Shao ve ark., 2022). Mohammadian ve arkadaşları, HT29 ve HCT-116 hücre soylarının 1, 2, 4 ve 8µM farklı kapesitabin konsantrasyonlarıyla inkübe edilip, kapesitabin ve oksaliplatine 17-AAG eklenmesinin hücre soylarının terapötik indekslerini iyileştirip iyileştiremeyeceğini incelediklerinde, her ajanın tek başına sitotoksik etkisinin artan konsantrasyonlarla arttığını gösterdi. Ayrıca, HCT-116 ile HT29 hücre soyları karşılaştırıldığında HT-29 hücrelerinde tüm tek ilaçlı tedavi gruplarında daha yüksek IC₅₀ değerleri elde ettiklerini ve HT-29 hücrelerinin bu ilaçlara karşı daha dirençli olduğu sonucuna varılabilir olduğunu ifade ettiler (Mohammadian ve ark., 2017). Suh ve arkadaşları tarafından HCT-116 ve HT29 kolon kanseri hücre soylarında fisetinin hücre çoğalması üzerindeki etkisini incelendiğinde her iki hücre soyunun da fisetine duyarlı olduğunu ve kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği bildirildi (Suh ve ark., 2009). Khan ve diğerleri tarafından yapılan başka çalışmada ise, 90µM fisetin ve 5-FU ile kombine tedavinin PIK3CA-mutant HCT116 ve HT29 kolon kanseri hücrelerinde inhibitör etkisinin çok yüksek olduğu belirtilmektedir (Khan ve ark., 2019).

P-gp kanser kemoterapisinde ilaç direnci ile ilişkili en iyi karakterize edilmiş ABC taşıyıcı protein ailesinin bir üyesidir. P-gp' nin yukarı regülasyonunun kanser hücrelerinde kemoterapi aracılı hücre ölümünden kaçmada etkili olduğunu belirlenmiştir (Ambudkar ve ark., 2003). P-gp ekspresyonunda değişim karaciğer, akciğer, meme, bağırsak, gastrik kanserler ve osteosarkomada kemorezistansa neden olmaktadır. Sonuç olarak, P-gp' nin ekspresyonu çeşitli sinyal yollarının birleşik eyleminin sonucudur. Bu sinyal yollarının ve düzenleyici moleküllerin keşfi, P-gp' nin rolünü açıklığa kavuşturabilir ve inhibitörlerinin tanımlanmasına da yardımcı olabilir. P-gp ekspresyonu ve MDR' yi teşvik eden bu sinyal yolları ve düzenleyici moleküller kemoterapi direncini tersine çevirmede potansiyel hedefler olarak kullanılabilir (Tian ve ark., 2023). Kemoterapiye direnç bağırsak kanserinin klinik tedavisinde de hayati bir engeldir. P-gp aşırı ekspresyonu, sisplatin, paklitaksel, 5-FU, doksorubisin ve diğer kemoterapötik ilaçları hücrelerden dışarı atmak için akış pompası fonksiyonunu

kullanarak hücre içi ilaç konsantrasyonlarını ve sitotoksiteyi azaltır. Bu nedenle kemoterapi ilaçlarının tümör hücreleri üzerindeki çoğalmayı inhibe edici etkileri yetersiz kalır (Tian ve ark., 2023). Çalışmamızda KD/HT29 hücrelerinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile P-gp mRNA ekspresyon seviyesinde artış belirlendi (Şekil 12). Bu sonuca göre, kapesitabin-direnç mekanizmasının, kolorektal kanser hücrelerinde artmış P-gp ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterildi.

Yara iyileşmesi ile kanser arasındaki ilişki uzun zamandır bilinmektedir. Yara iyileşmesini düzenleyen mekanizmaların, kötü huylu hücrelerin dönüşümünü ve büyümesini desteklediği gösterilmiştir (Arnold ve ark., 2015). Shao ve ark., tarafından yapılan çalışmada, yara iyileşmesi analizlerinden, göç oranının, hem kapesitabin ile tedavi edilen hem de si-RANK ile transfekte edilmiş HT29 hücrelerinde, negatif kontrollerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldığı belirtildi (Shao ve ark., 2022). Cheng-Fang Tsai ve arkadaşları tarafından, fisetin dozu arttıkça, 4T1 ve JC meme kanseri hücrelerinde hücre göçünün kontrol grubuna kıyasla azaldığını ve hem 4T1 hem de JC meme kanseri hücrelerinde koloni oluşma yeteneğini önemli ölçüde inhibe olduğu gösterildi (Tsai ve ark., 2018). Başka bir çalışmada hücre göçünün belirgin olarak kapesitabin tedavisi ile engellendiği, ancak RANK aşırı ekspresyonu ile belirgin bir şekilde tersine çevrildiği gösterildi. DMSO ile tedavi edilen ve pcDNA3.1-RANK ile transfekte edilmiş hücrelere kıyasla, aynı anda RANK aşırı ekspresyonu ve kapesitabin eklenmesiyle hücre göçünün belirgin şekilde azaldığı görüldü (Shao ve ark., 2022). Hosseini ve arkadaşları tarafından yapılan başka çalışmada kanser hücrelerinin migrasyonu üzerinde kuersetin ve fisetinin etkisinin, çizilen alanın boyutuna bağlı olarak, MCF7 hücrelerinde yaklaşık 24 saat ve MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saat sonra iyileşmelerin gözlemlendiği belirtildi (Hosseini ve ark., 2023). Bu tez çalışmasında yara iyileşme deneyi sonuçlarına göre, yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde tüm ilaç grupları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında inhibe olduğu belirlendi. Ancak, yabancı-tip HT29 hücrelerinde fisetinin inhibisyon etkisi %66 iken, KD/HT29 hücrelerinde %34,2 inhibisyona neden olduğu görüldü. Fisetinin inhibe edici etkisi, direncin kısmen aşılabildiğini göstermiştir. Ayrıca her iki hücre soyunda fisetin ve kapesitabin ile kombine tedavi edilen gruplarda da yara iyileşmesinde azalma olduğu gözlemlendi.

Sim ve arkadaşlarının çalışmasında, kolorektal kanser hücrelerinde laktik asit kalsiyum tuzu (LCS) ve kapesitabinin uzun süreli tek ve kombine tedavi etkileri karşılaştırıldı. LCS ve kapesitabinin birlikte uygulanmasında, tek tedavilerle karşılaştırıldığında daha küçük koloni formlarına neden oldu. Kombine tedavinin, HT29 ve HCT116 kolonilerinin sayısını tek başına kapesitabin ve LCS tedavilerine kıyasla önemli ölçüde azalttığı gösterildi (Sim ve ark., 2018). Hosseini ve arkadaşları, MCF7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında kuersetin ve fisetinin tek

başına veya birlikte tedavisinin koloni oluşumu üzerindeki etkilerini inceledi. Kombinasyon tedavisi ile, hem MCF7 hücrelerinde hem de MDA-MB-231 hücrelerinde koloni sayısını ve formlarını önemli ölçüde azalttığı gösterildi. Ek olarak, ilaçların MCF7 hücrelerinde daha etkili olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle, MCF7 hücrelerinde koloni oluşumunda MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla daha fazla inhibisyona neden olduğu belirtildi (Hosseini ve ark., 2023). Khan ve arkadaşları, fisetin veya tek başına 5-FU ile tedavinin hem HCT116 hem de HT29 kolon kanseri hücrelerinde koloni sayısını azalttığı ancak fisetin ve 5-FU kombinasyonunun ise daha dramatik azalmaya neden olduğu belirtildi (Khan ve ark., 2019). Bu çalışmada, kapesitabin, yabancı-tip HT29 hücre soyu koloni oluşumu yüzdesi KD/HT29 hücre soyunun koloni oluşumu yüzdesinden daha azdır bunun nedeni KD/HT29 hücre soyunun kapesitabine direnç geliştirmesinden dolayıdır. Yabancı-tip HT29 hücre soyunda fisetin ve kapesitabin kombine gruplarında koloni oluşumunda inhibisyon daha fazladır. Koloni oluşumunda yabancı-tip HT29 hücre soyunda kapesitabine olan inhibisyon yanıtının KD/HT29 hücre soyuna göre daha fazla olması yanı sıra yabancı-tip HT29 hücre soyunda fisetinle kapesitabinin kombine etkisi daha fazla inhibisyona neden olduğu görüldü.

miRNA' ların anormal ekspresyonunun, fonksiyonel proteinlerin düzenlenmesi ve hücre çoğalması, hücre göçü ve istilası, programlanmış hücre ölümü ve hücrenin hayatta kalmasıyla ilgili sinyal yolları ile birçok kanser türünün gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynadığı gösterilmiştir. miRNA' lar, kanser gelişimini, ilerlemesini ve metastazı modüle etmek için diğer onkogenleri ve/veya tümör baskılayıcıları hedef alarak tümör baskılayıcılar veya onkogenler olarak işlev görebilir (Lu ve ark., 2005).

miRNA' lar, kapesitabin, 5-FU ve oksaliptatin direncinin gelişiminden sorumlu anahtar oyuncular olarak görülür. miRNA aracılı ilaç direnci moleküler mekanizmalarının çoğunun anlaşılması zordur. Kapesitabin tedavisine hücre adaptasyonuna katkıda bulunan miRNA ile tetiklenen direnç mekanizmasını daha iyi anlamak için, hem yabancı-tip HT29 hem de KD/HT29 hücrelerinin, hsa-mir-381, hsa-mir-21 ve hsa-mir-181-a miRNA ekspresyon düzeyleri incelendi. KD/HT29 hücrelerde yabancı HT29 hücrelerine göre hsa-mir-381 ekspresyonunun azaldığı görüldü. Ayrıca KD/HT29 hücrelerinin kontrol grubuna göre fisetin ve kapesitabinle kombine fisetin gruplarında hsa-mir-381 düzeylerinde azalma meydana geldi. Bu çalışmanın sonucuna göre, KD/HT29 hücrelerinde, hsa-mir-381 düzeyindeki azalma ve kemo-direnç arasında ilişki olduğu öne sürülebilir. Yi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, sisplatine dirençli meme kanseri hücrelerinde insan miR-381 ekspresyon düzeyinin azaldığı gösterildi (Yi ve ark., 2019). Galati ve arkadaşları, kuarsetinin miR-381 gibi tümör baskılayıcı miRNA' ları yukarı yönde düzenlendiğini gösterdi (Galati ve O'Brien, 2004). Chan

ve arkadaşları, renal hücreli karsinom hücre soylarında miR-381'in aşırı ekspresyonunun, sisplatin (Ci) ve paklitakselin (Pa) antitümör etkilerini artırdığını ayrıca bu hücre soylarında miR-381'in inhibisyonunun hücre çoğalmasını destekleyebileceğini önermişlerdir. miR-381 inhibisyonuna sahip hücreler, nude farelere enjekte edildiğinde miR-381 inhibisyonunun sisplatin ve paklitaksel'e kemodirenci arttırdığı belirtildi (Chan ve ark., 2019).

Kanser hücrelerinde P-gp ekspresyonunun artışı yönünde düzenlenmesi kemoterapi ilaçlarına direnci artırır (Mirzaei ve ark., 2022). Çok sayıda çalışma, kanser dokularındaki miRNA ekspresyonlarının P-gp düzeyleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir. miRNA' lar proteinlere çevirmese de çeşitli sinyal yolları yoluyla P-gp' nin düzenlenmesinde rol oynar. miR-381 , miR-34a, miR-451, miR-149 ve miR-495' in yukarı regülasyonunun P-gp ifadesini önemli ölçüde azalttığı, dolayısıyla çeşitli kanser dokularının kemoterapötik ilaçlara duyarlılığının artırılabilmesi rapor edilmiştir (Tian ve ark., 2023). Yaptığımız çalışmada yabancı-tip HT29 hücrelerine göre KD/HT29 hücrelerinde hsa-miR-381' in ekspresyonunun azalması ve P-gp ekspresyonunda artış olması kemoterapötik ilaçlara duyarlılığın azalmasına ve direnç gelişimine katkıda bulunabilir.

miR-21 ekspresyonu kanserler arasında farklılık göstermektedir. miR-21 seviyelerinin yükselmesinin ardından tümör hücre çoğalması ve istilasının arttığı gösterilmiştir. miR-21' in aşırı ekspresyonu apoptozu ve hasarlı hücreleri yok eden otofajiyi engeller. Meme kanserinde miR-21 seviyelerindeki azalma, örneğin MCF-7 ksenograftlarında birincil tümör büyümesinin azalmasına neden olduğu belirtilmektedir (Si ve ark., 2007). miR-21 doğrudan birçok tümör baskılayıcı geni hedef alır, böylece tümör hücrelerinin agresifliğini artırır. Ayrıca kanserde ilaç direnci gelişimine aracılık eder (Chi ve ark., 2022). Çalışmamızda yabancı-tip HT29 ve KD/HT29 hücrelerinde, kapesitabin, fisetin ve bunların kombinasyonu ile hsa-miR-21 ekspresyon düzeylerinde inhibisyon olduğu belirlendi. miR-21' in kanserlerde onkogenik bir işlevi vardır, aşırı ekspresyonu apoptozu önleyebilir. Bu nedenle yüksek miR-21' in ekspresyon seviyeleri apoptozun önünde engeldir (Magura ve ark., 2021). Kanserlerde miR-21 ekspresyonundaki artış, kemoterapi ve radyoterapiye karşı dirençle sonuçlanır. Apoptoz yolları ve kemodirenç ile ilişkili miRNA' lardan; miR-21' in inhibisyonunun, hücre döngüsünün durmasına yol açabileceği ve antikanser ajanlara karşı kemosenstiviteyi artırabileceği önerilmektedir. miRNA-21, akciğer kanseri (Ni ve ark., 2019), kolon kanseri (Dehghan ve ark., 2019), meme kanseri (Kalinina ve ark., 2020), mide kanseri (Gu ve ark., 2020), hepatoselüler karsinom (Aalami ve ark., 2021; Feng ve ark., 2021; Hashemi ve ark., 2023) dahil olmak üzere birçok insan tümör hücresinde yaygın olarak eksprese edilir (Hashemi

ve ark., 2023). Kolon kanser hücrelerine izole edilmiş eksozomlar ile ve miR-21 ile tedavi, hücre çoğalması, invazyon ve ekstrasellüler matris oluşumunda rol alan genlerin ifadesinde artışa yol açmıştır. miR-21, PDCD4 ve PTEN genlerini hedeflemektedir. He ve arkadaşları tarafından, hepatosellüler karsinoma (HCC)' da sorafenibe dirençli HCC hücre soylarının daha düşük otofaji seviyeleri ve yüksek miR-21 seviyeleri olduğu belirtildi. miR-21 aracılı sorafenib direnci, PTEN/Akt yolunu düzenleyerek otofaji üzerindeki inhibitör etkilerinden kaynaklanmakta olduğu önerildi (He ve ark., 2015). Tropomyosin ailesi üyesi TPM1 hücresel transformasyonu baskılar. Meme kanseri hücre soyunda miR-21' in indüklenmesi, TM1 ekspresyonunun aşağı regülasyonuna ve hücre soyunun anti-miR-21 ile tedavisi sonrasında TM1 ekspresyonunun yukarı regülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2007). Ayrıca, PDCD4, TPM1 ve PTEN gibi miR-21' in çeşitli hedef genlerinin, kolon kanseri hücrelerinden gelen eksozomlar tarafından aşağı regüle edildiği belirtildi. miR-21, PDCD4' ün aşağı regülasyonu aracılığıyla 5-FU gibi tedavilerde dirence aracılık edebileceği belirtilmiştir (Sun ve ark., 2020). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) miR-21' in susturulması çoklu ilaç direncini tersine çevirdiği ve ardından transkripsiyonel faktör E2F-1 ve Twist' in ekspresyon seviyelerini modüle etmek için Akt fosforilasyonunu azalttığı bildirilmiştir. Dolayısıyla miR-21' in ilaç direncinde anahtar rol oynadığı belirtilmektedir (Yang ve ark., 2013; Dong ve ark., 2015). Bu çalışmada yabancı-tip HT29 hücrelerinin KD/HT29 hücrelerine göre miR-21 ekspresyonunun daha fazla olduğu belirlendi. Yabancı-tip HT29 hücre soyunda miR-21 ekspresyonu kontrol grubuna göre fisetin ve fisetinle kombine kapesitabin gruplarında inhibe oldu ancak KD/HT29 hücre soyunda miR-21 ekspresyonunun, fisetin ve fisetinle kombine kapesitabin gruplarında daha da fazla inhibe olduğu görüldü. Bu durumda kapesitabin ve fisetinin, KD/HT29 hücrelerinde miR-21 aracılı ilaç duyarlılığının artmasına katkıda bulunacağı söylenebilir.

İnsan microRNA-181a-1' in (hsa-miR-181a) anormal ekspresyonu, bir onkogen veya tümör baskılayıcı olarak görev yaparak çeşitli kanserlerin patogenezinde rol oynadığı belirtilmektedir (He ve ark., 2015). Son zamanlarda yapılan birkaç çalışmada, miR-181a' nın, mamosfer veya primer meme tümörlerinden kökenli meme epitel kök hücre agregatlarının oluşumunu azalttığı, tümör istilasını ve metastazı önlediği, kanser hücresi ölümünü uyarak ve ilaç duyarlılığını artırarak meme kanserine karşı etkiler gösterdiği önerildi (C. Yang ve ark., 2017). hsa-miR-181a' nın aşırı ekspresyonu, kolorektal kanserde hücre proliferasyonunu ve göçünü teşvik ederken apoptozun inhibisyonunu sağladığı bildirilmektedir (Ji ve ark., 2014). İnsan meme kanseri direnç proteini (BCRP/ABG2), büyük ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı süper ailesinin G alt ailesinin ikinci üyesidir. BCRP ilk olarak mitoksantron gibi kemoterapötik

ajanlara direnç kazandırdığı çoklu ilaca dirençli meme kanseri hücre hatlarında keşfedildi. miR-181a' nın, BCRP' yi hedefleyerek mitoksantrona dirençli meme kanseri hücrelerinde ilaç duyarlılığını artırdığı önerildi (Jiao ve ark., 2013). Ayrıca Jiao ve diğerleri, miR-181a' nın aşırı ekspresyonunun, BCRP mRNA'nın 3'-UTR'sine bağlanarak BCRP ifadesini azalttığını ve mitoksantrona dirençli MCF-7 hücrelerini mitoksantrona duyarlı hale getirdiğini gösterdi. Böylece miR-181a' nın meme kanserinde ilaç direncini önlemek ve tersine çevirmek için potansiyel bir hedef olabileceği öne sürüldü (Jiao ve ark., 2013; C. Yang ve ark., 2017). Kolorektal kanserde hsa-miR-181a' nın aşırı ekspresyonu, hücre çoğalmasını ve migrasyonunu teşvik ederken apoptozun inhibisyonunu sağladığı belirtilmiştir. Kolon ve kolorektal kanserde miR-181a' nın seviyesindeki artış (Ping ve ark., 2016) ve PTEN' in baskılanması yoluyla onkojenik özelliklerle veya WIF-1 aracılığıyla metastatik süreçle ilişkilendirilmiştir (Ji ve ark., 2014; Ping ve ark., 2016). KRK' da, miR-181a-5p' nin Wnt/ β -katenin sinyal yolağını düzenleyerek tümör büyümesini baskıladığı gösterildi (Han ve ark., 2017; Lv ve ark., 2018). miR-181a-5p' nin diğer hedefi ise p53' tür. miR-181a-5p' nin yukarı regülasyonu, Bax ve Bcl-2' yi modüle ederek apoptozu desteklediği önerilmektedir (Shang ve ark., 2020; Li ve ark., 2023). Ek olarak, önceki çalışmalar, lncRNA-ANRIL' in miR-181a-5p' nin, kolon kanseri hücrelerinde apoptozu ve radyosensitiviteyi inhibe edebildiğini ortaya çıkardı (Sun ve ark., 2021; Li ve ark., 2023). Bu çalışmada, hsa-miR-181a ekspresyonu yabancı-tip HT29 hücrelerinde KD/HT29 hücrelerine göre az eksprese olmaktadır. hsa-miR-181a ekspresyonunun KD/HT29 hücrelerinde yüksek olması hücre çoğalmasında artışa katkıda bulunabilir. Ancak fisetin ve fisetin kombine kapesitabin gruplarında hsa-miR-181a ekspresyonu yabancı-tip HT29 hücrelerinde artarken KD/HT29 hücrelerde azalmıştır. Dolayısıyla ilaçlarla KD/HT29 hücrelerde hsa-mir-181-a ekspresyonun azalması tümör baskılanmasına ve direncin gerilemesine katkı sağlayabilir.

Son zamanlarda fisetinin hücre döngüsü durmasını, apoptozu indüklediği ve üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde kemoterapötiklerin anti-tümör etkisini güçlendirdiği bulundu (Smith ve ark., 2016; Jeng ve ark., 2018; Hosseini ve ark., 2023). Apoptoza karşı direnç hayatta kalmak için kritik öneme sahiptir ve kanser hücrelerinin ilaç direncine katkıda bulunur. Bu nedenle apoptozun indüksiyonu, kanser kemoterapisinin temel bir mekanizmasıdır (Khan ve ark., 2007; Suh ve ark., 2009). Fisetin tedavisinin cyt c salınımını, kaspaz-8 aktivasyonunu ve parçalanmış kaspaz-3 ekspresyonunu arttırdığı, LoVo hücrelerinin apoptozuna katkıda bulunduğu ve kanserli hücrelerin ölümüne yol açtığı önerildi. Fisetin ile tedavi edilen oksaliplatin dirençli LoVo hücrelerinde de benzer sonuçlar görüldü. Oysa CPT11-LoVo hücrelerinde fisetin tedavisinin, sitokrom-c ve kaspaz-8 ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı ve kaspaz-3

ekspresyonunu hafifçe indüklediği gösterildi. Bu sonucun, farklı davranış veya fenomenlere sahip farklı dirençli kanser hücre soylarından kaynaklandığı önerildi (Jeng ve ark., 2018). Fisetinin sitotoksik etkisinin moleküler mekanizması ile, antiapoptotik Bcl-2' nin baskılanması ve proapoptotik kaspaz-3 ve kaspaz-9' un indüksiyonunun apoptozu tetiklediği gösterildi. Bu bulguların, 1,2-Dimethylhydrazine (DMH) ile uyarılan, anti-inflamatuar ve antioksidan etkilerin, kolorektal kansere karşı antitümör aktivitesi ile olası bir ilişkisi olabileceği öne sürüldü (Fan ve ark., 2020; Zhong ve ark., 2022). Bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler ışığında, yabancı-tip HT29 hücreleri fisetin ve/veya kapesitabin gruplarında kaspaz-3, kaspaz-9, AIF, Bax/ Bcl-2 ve cyt c ekspresyon düzeylerinin arttığı gösterildi. Yabancı-tip HT29 hücrelerinde kaspaz-8 seviyeleri kontrole kıyasla fisetin grubunda arttı. KD/HT29 hücreleri yabancı-tip HT29 hücreleriyle karşılaştırıldığında, KD/HT29 hücrelerinde kaspaz-9' daki artış hariç, kaspaz-3, kaspaz-8, AIF, Bax/ Bcl-2 ve cyt c protein düzeylerinin azaldığı gözlemlendi. KD/HT29 hücrelerindeki KD/HT29 kontrol gruplarına kıyasla fisetin ve kapesitabin kombinasyon gruplarının, AIF ifade düzeyinin çok az arttığı gösterildi. Bununla birlikte, KD/HT29 hücrelerinde Bax/Bcl-2 protein ifadesi, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kapesitabin, fisetin ile artmış, ancak kapesitabin ve fisetin birlikte uygulandığında azaldığı belirlendi. Yabancı-tip HT29 hücrelerinde, kapesitabin, kapesitabin ve fisetin birlikte uygulandığında cyt c ekspresyonlarının arttığı gösterildi. KD/HT29 hücrelerinde kapesitabin, cyt c düzeylerini biraz artırdı, ancak fisetin bunu önemli ölçüde inhibe etti. Bu yabancı-tip HT29 hücreleri ile KD/HT29 hücre grupları karşılaştırıldığında, KD/HT29 hücrelerinin tüm ilaç gruplarında cyt c ekspresyon düzeylerinin inhibe olduğu gözlemlendi. Kapesitabin tedavisinden sonra yabancı-tip HT29 hücreleri ölmeye başladı ancak dirençli hücreler uzun süre hayatta kaldı. Yani KD/HT29 hücrelerinin kaspaz-3, kaspaz-8 kaspaz-9, AIF ve cyt c düzeylerinin yabancı-tip HT29 hücrelerine göre azalması kapesitabin direncinin geliştiğini göstermektedir. Sonuç olarak KD/HT29 hücrelerinin apoptozdan kısmen korunduğu görülmektedir. Fisetinin, hem yabancı-tip HT29 hücrelerinde hem de KD/HT29 hücrelerinde kapesitabinin apoptotik yolağı üzerindeki ilave etkileri hücre çoğalması analizlerinde de görülmüştür.

Çalışmamızda kolorektal kanser hücrelerinde kapasitabine direnç geliştirilmesi literatüre katkı sağlayacaktır. Fisetinin, KD/HT29 hücrelerinde tek başına ve kapesitabin ile kombinasyonunun hücre çoğalması, apoptoz ve miRNA' ların düzenlenmesindeki etkileri saptanmıştır. Çalışmamızda ortaya çıkan veriler ile, kanser önleme ve tedavide ilaç direncine yönelik yeni mekanizma temelli stratejileri belirlemek için gereken moleküler mekanizmaların anlaşılmasına yönelik daha yeni bilgilere katkı sağlanmıştır. Sonuç olarak, kolorektal kanserin yaygın ilaç direnci mekanizmalarına karşı geniş kemosensitivitesi göz önüne alındığında, yanıt

oranlarını arttırmak, potansiyel olarak hayatta kalma süresini uzatmak ve kemoterapinin etkinliğini arttırmak için mevcut çalışmamız, olası terapötik uygulamasını anlamak için yeni bilgilere katkı sağlayabilir. Ayrıca araştırma sonuçlarımız hücre sinyal ileti yolları ve protein-gen ekspresyon çalışmalarına zemin oluşturacaktır. Literatürde kısıtlı olan yayınlara destek olması yanısıra flavonoidlerin kemoterapi ilaçlarıyla kombinasyonları kolorektal kanserin patofizyolojisine ve direnç mekanizmasının çözömlenmesine katkı sağlayacağı düşünölmektedir. Çok sayıda çalışma, kemoterapiye fisetin eklemenin etkinliği artırabileceğini göstermiştir. Ayrıca flavonoid kombinasyonları, terapötik ilaçların etkili dozunu azaltabilir ve böylece doza bağı yan etkilerinin azaltılmasına katkıda bulunabilir. Ancak diğ er ilaçlarla güvenli bir şekilde kullanılmadan önce fisetinin bu farmasötiklerin farmakolojik metabolizması üzerindeki etkisinin daha fazla araştırılması gerekmektedir. Potansiyel kimyasal sinerji ve ilaç kombinasyonunun başlangıç şekli ve moleküler yol üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Kanser tedavisinde bu yapı bozun eksik parçalarını bulmak ve kanser hastalarında ilaç direncini azaltmak için klinikte bu bilgiden tam anlamıyla yararlanmak üzere daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Kanser geliştikçe ve ilaç direnci gibi mekanizmalarla tedaviden kaçındıkça terapiler ve tedavinin de değ işmesi gerekiyor ve özellikle hücreden hücreye iletişim ve sinyal ileti yolları üzerine yapılan yeni araştırmalar bize bu yıkıcı hastalığın nasıl tedavi edileceğı ve yönetileceğı konusunda giderek daha fazla şey öğ retmesi yanı sıra daha kapsamlı araştırmaların yapılması gerekliliğide ortaya çıkıyor.

8. KAYNAKLAR

- Aalami, A. H., Abdeahad, H., & Mesgari, M. (2021). Circulating miR-21 as a potential biomarker in human digestive system carcinoma: a systematic review and diagnostic meta-analysis. *Biomarkers*, 26(2), 103-113. <https://doi.org/10.1080/1354750x.2021.1875504>
- Abubakar, M. B., Abdullah, W. Z., Sulaiman, S. A., & Suen, A. B. (2012). A review of molecular mechanisms of the anti-leukemic effects of phenolic compounds in honey. *Int J Mol Sci*, 13(11), 15054-15073. <https://doi.org/10.3390/ijms131115054>
- Adams, J. M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*, 17(20), 2481-2495. <https://doi.org/10.1101/gad.1126903>
- Adan, A., & Baran, Y. (2016). Fisetin and hesperetin induced apoptosis and cell cycle arrest in chronic myeloid leukemia cells accompanied by modulation of cellular signaling. *Tumour Biol*, 37(5), 5781-5795. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4118-3>
- Afzal, M., Alarifi, A., Karami, A. M., Ayub, R., Abduh, N. A. Y., Saeed, W. S., & Muddassir, M. (2023). Antiproliferative Mechanisms of a Polyphenolic Combination of Kaempferol and Fisetin in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7). <https://doi.org/ARTN 639310.3390/ijms24076393>
- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknaes, M., Hektoen, M., Lind, G. E., & Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(9), e71. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.35>
- Al Saihati, H. A., & Rabaan, A. A. (2023). Cellular resistance mechanisms in cancer and the new approaches to overcome resistance mechanisms chemotherapy. *Saudi Med J*, 44(4), 329-344. <https://doi.org/10.15537/smj.2023.44.4.20220600>
- Alian, D. M. E., Helmy, M. W., Haroun, M., & Moussa, N. (2024). Modulation of autophagy and apoptosis can contribute to the anticancer effect of Abemaciclib/Celecoxib combination in colon cancer cells. *Medical Oncology*, 41(2). <https://doi.org/ARTN 4310.1007/s12032-023-02288-z>
- Alkan, A., Yasar, A., Karci, E., Köksoy, E. B., Ürün, M., Senler, F. Ç., Ürün, Y., Tuncay, G., Ergün, H., & Akbulut, H. (2017). Severe drug interactions and potentially inappropriate medication usage in elderly cancer patients. *Supportive Care in Cancer*, 25(1), 229-236. <https://doi.org/10.1007/s00520-016-3409-6>
- Allegra, C. J., Yothers, G., O'Connell, M. J., Beart, R. W., Wozniak, T. F., Pitot, H. C., Shields, A. F., Landry, J. C., Ryan, D. P., Arora, A., Evans, L. S., Bahary, N., Soori, G., Eakle, J. F., Robertson, J. M., Moore, D. F., Mullane, M. R., Marchello, B. T., Ward, P. J., Wolmark, N. (2016). Neoadjuvant 5-FU or Capecitabine Plus Radiation With or Without Oxaliplatin in Rectal Cancer Patients: A Phase III Randomized Clinical Trial (vol 107, djv248, 2015). *Jnci-Journal of the National Cancer Institute*, 108(4). <https://doi.org/10.1093/jnci/djw057>
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81334-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81334-3)
- Alqahtani, S., Alzaidi, R., Alsultan, A., Asiri, A., Asiri, Y., & Alsaleh, K. (2022). Clinical pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites in colorectal cancer patients. *Saudi Pharm J*, 30(5), 527-531. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.02.019>
- Alvarez, M., Paull, K., Monks, A., Hose, C., Lee, J. S., Weinstein, J., Grever, M., Bates, S., & Fojo, T. (1995). Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdr-1/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *J Clin Invest*, 95(5), 2205-2214. <https://doi.org/10.1172/JCI117910>
- Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E., & Gottesman, M. M. (2003). P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, 22(47), 7468-7485. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206948>

- Andrade, F., Roy, S., Nicholson, D., Thornberry, N., Rosen, A., & Casciola-Rosen, L. (1998). Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: Implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity*, 8(4), 451-460. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80550-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80550-6)
- Andre, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I., de Gramont, A., & Investigators, M. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *New England Journal of Medicine*, 350(23), 2343-2351. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032709>
- André, T., Boni, C., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Bonetti, A., Clingan, P., Bridgewater, J., Rivera, F., & de Gramont, A. (2009). Improved Overall Survival With Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin As Adjuvant Treatment in Stage II or III Colon Cancer in the MOSAIC Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 27(19), 3109-3116. <https://doi.org/10.1200/Jco.2008.20.6771>
- Androutsopoulos, V. P., Papakyriakou, A., Vourloumis, D., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. (2010). Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacol Ther*, 126(1), 9-20. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.01.009>
- Ansari, B., Coates, P. J., Greenstein, B. D., & Hall, P. A. (1993). In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol*, 170(1), 1-8. <https://doi.org/10.1002/path.1711700102>
- Ansó, E., Zuazo, A., Irigoyen, M., Urdaci, M. C., Rouzaut, A., & Martínez-Irujo, J. J. (2010). Flavonoids inhibit hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression by a HIF-1 independent mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 79(11), 1600-1609. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.02.004>
- Arlanov, R., Lang, T., Jedlitschky, G., Schaeffeler, E., Ishikawa, T., Schwab, M., & Nies, A. T. (2016). Functional characterization of common protein variants in the efflux transporter ABCC11 and identification of T546M as functionally damaging variant. *Pharmacogenomics Journal*, 16(2), 193-201. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.27>
- Arnold, K. M., Opdenaker, L. M., Flynn, D., & Sims-Mourtada, J. (2015). Wound Healing and Cancer Stem Cells: Inflammation as a Driver of Treatment Resistance in Breast Cancer. *Cancer Growth and Metastasis*, 8, 1-13. <https://doi.org/10.4137/Cgm.S11286>
- Arruebo, M., Vilaboa, N., Saez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M., & Gonzalez-Fernandez, A. (2011). Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers (Basel)*, 3(3), 3279-3330. <https://doi.org/10.3390/cancers3033279>
- Augeron, C., & Labois, C. L. (1984). Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res*, 44(9), 3961-3969. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6744312>
- Ayna, A., Özbolat, S. N., & Darendelioglu, E. (2020). Quercetin, chrysin, caffeic acid and ferulic acid ameliorate cyclophosphamide-induced toxicities in SH-SY5Y cells. *Molecular Biology Reports*, 47(11), 8535-8543. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05896-4>
- Baguley, B. C. (2010). Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol Biotechnol*, 46(3), 308-316. <https://doi.org/10.1007/s12033-010-9321-2>
- Barbato, A., Iuliano, A., Volpe, M., D'Alterio, R., Brillante, S., Massa, F., De Cegli, R., Carrella, S., Salati, M., Russo, A., Russo, G., Riccardo, S., Cacchiarelli, D., Capone, M., Madonna, G., Ascierto, P. A., Franco, B., Indrieri, A., & Carotenuto, P. (2021). Integrated Genomics Identifies miR-181/TFAM Pathway as a Critical Driver of Drug Resistance in Melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4). <https://doi.org/10.3390/ijms22041801>

- Barczyk, K., Kreuter, M., Pryjma, J., Booy, E. P., Maddika, S., Ghavami, S., Berdel, W. E., Roth, J., & Los, M. (2005). Serum cytochrome c indicates apoptosis and can serve as a prognostic marker during cancer therapy. *International Journal of Cancer*, 116(2), 167-173. <https://doi.org/10.1002/ijc.21037>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Basli, A., Soulet, S., Chaher, N., Mérillon, J. M., Chibane, M., Monti, J. P., & Richard, T. (2012). Wine Polyphenols: Potential Agents in Neuroprotection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/805762>
- Bedi, A., Pasricha, P. J., Akhtar, A. J., Barber, J. P., Bedi, G. C., Giardiello, F. M., Zehnbauer, B. A., Hamilton, S. R., & Jones, R. J. (1995). Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res*, 55(9), 1811-1816. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7728743>
- Benavente-Garcia, O., & Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem*, 56(15), 6185-6205. <https://doi.org/10.1021/jf8006568>
- Berretta, M., Caraglia, M., Martellotta, F., Zappavigna, S., Lombardi, A., Fierro, C., Atripaldi, L., Muto, T., Valente, D., De Paoli, P., Tirelli, U., & Di Francia, R. (2016). Drug-Drug Interactions Based on Pharmacogenetic Profile between Highly Active Antiretroviral Therapy and Antitubercular Chemotherapy in Cancer Patients with HIV Infection. *Frontiers in Pharmacology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00071>
- Bertino, J. R. (1997). Chemotherapy of colorectal cancer: history and new themes. *Semin Oncol*, 24(5 Suppl 18), S18-13-S18-17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9420015>
- Bhowmick, S. S., Bhattacharjee, D., & Rato, L. (2020). Integrated analysis of the miRNA mRNA next-generation sequencing data for finding their associations in different cancer types. *Computational Biology and Chemistry*, 84. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.107152>
- Biovendor, (2019, July). Colorectal Cancer- More People Screened, More Lives Saved. https://www.biovend.com/colorectal-cancer--more-people-screened-more-lives-saved?utm_source=google&utm_medium=organic
- Blondy, S., David, V., Verdier, M., Mathonnet, M., Perraud, A., & Christou, N. (2020). 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. *Cancer Sci*, 111(9), 3142-3154. <https://doi.org/10.1111/cas.14532>
- Bofill-De Ros, X., & Vang Orom, U. A. (2024). Recent progress in miRNA biogenesis and decay. *RNA Biol*, 21(1), 1-8. <https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2288741>
- Boren, T., Xiong, Y., Hakam, A., Wenham, R., Apte, S., Chan, G., Kamath, S. G., Chen, D. T., Dressman, H., & Lancaster, J. M. (2009). MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with ovarian cancer response to chemotherapy. *Gynecologic Oncology*, 113(2), 249-255. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.01.014>
- Borner, M. M., Dietrich, D., Stupp, R., Morant, R., Honegger, H., Wernli, M., Herrmann, R., Pestalozzi, B. C., Saletti, P., Hanselmann, S., Muller, S., Brauchli, P., Castiglione-Gertsch, M., Goldhirsch, A., & Roth, A. D. (2002). Phase II study of capecitabine and oxaliplatin in first- and second-line treatment of advanced or metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 20(7), 1759-1766. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.07.087>
- Borrhalho, P. M., Kren, B. T., Castro, R. E., da Silva, I. B. M., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. P. (2009). MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *Febs Journal*, 276(22), 6689-6700. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07383.x>

- Boumendjel, A., Bois, F., Beney, C., Mariotte, A. M., Conseil, G., & Di Pietro, A. (2001). B-ring substituted 5,7-dihydroxyflavonols with high-affinity binding to P-glycoprotein responsible for cell multidrug resistance. *Bioorg Med Chem Lett*, 11(1), 75-77. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(00\)00595-3](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(00)00595-3)
- Bousbaa, H. (2021). Novel Anticancer Strategies. *Pharmaceutics*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020275>
- Brar, B., Ranjan, K., Palria, A., Kumar, R., Ghosh, M., Sihag, S., & Minakshi, P. (2021). Nanotechnology in Colorectal Cancer for Precision Diagnosis and Therapy. *Frontiers in Nanotechnology*, 3. <https://doi.org/ARTN 69926610.3389/fnano.2021.699266>
- Brattain, M. G., Brattain, D. E., Fine, W. D., Khaled, F. M., Marks, M. E., Kimball, P. M., Arcolano, L. A., & Danbury, B. H. (1981). Initiation and Characterization of Cultures of Human Colonic-Carcinoma with Different Biological Characteristics Utilizing Feeder Layers of Confluent Fibroblasts. *Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2(5), 355-366. <Go to ISI>://WOS:A1981MQ59400005
- Brattain, M. G., Fine, W. D., Khaled, F. M., Thompson, J., & Brattain, D. E. (1981). Heterogeneity of Malignant-Cells from a Human Colonic-Carcinoma. *Cancer Research*, 41(5), 1751-1756. <Go to ISI>://WOS:A1981LN54300027
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In *CA Cancer J Clin* (2018/09/13 ed., Vol. 68, pp. 394-424).
- Brenner, H., Kloor, M., & Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *Lancet*, 383(9927), 1490-1502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9)
- Buendia, B., Santa-Maria, A., & Courvalin, J. C. (1999). Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *Journal of Cell Science*, 112(11), 1743-1753. <Go to ISI>://WOS:000080953500010
- Burger, H., van Tol, H., Brok, M., Wiemer, E. A., de Bruijn, E. A., Guetens, G., de Boeck, G., Sparreboom, A., Verweij, J., & Nooter, K. (2005). Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. *Cancer Biol Ther*, 4(7), 747-752. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.7.1826>
- Bykov, V. J. N., Eriksson, S. E., Bianchi, J., & Wiman, K. G. (2018). Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 18(2), 89-102. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.109>
- Cabrera, M., & Finkelstein, J. (2016). A Use Case to Support Precision Medicine for Frequently Hospitalized Older Adults with Polypharmacy. *AMIA Jt Summits Transl Sci Proc*, 2016, 16-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27570642>
- Cai, J. Y., Yang, J., & Jones, D. P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis:: the role of cytochrome. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1366(1-2), 139-149. [https://doi.org/Doi 10.1016/S0005-2728\(98\)00109-1](https://doi.org/Doi 10.1016/S0005-2728(98)00109-1)
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes and at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524-15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- Cao, G. H., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749-760. [https://doi.org/Doi 10.1016/S0891-5849\(96\)00351-6](https://doi.org/Doi 10.1016/S0891-5849(96)00351-6)

- Cao, Q. H., Liu, F., Ji, K. Y., Liu, N., He, Y., Zhang, W. H., & Wang, L. T. (2017). MicroRNA-381 inhibits the metastasis of gastric cancer by targeting TMEM16A expression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36. <https://doi.org/ARTN2910.1186/s13046-017-0499-z>
- Caro, I., Boulenc, X., Rousset, M., Meunier, V., Bourrie, M., Julian, B., Joyeux, H., Rogues, C., Berger, Y., Zweibaum, A., & Fabre, G. (1995). Characterization of a Newly Isolated Caco-2 Clone (Tc-7), as a Model of Transport Processes and Biotransformation of Drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 116(2), 147-158. [https://doi.org/Doi10.1016/0378-5173\(94\)00280-I](https://doi.org/Doi10.1016/0378-5173(94)00280-I)
- Carrel, S., Sordat, B., & Merenda, C. (1976). Establishment of a Cell Line (Co-115) from a Human Colon Carcinoma Transplanted into Nude Mice. *Cancer Research*, 36(11), 3978-3984. <Go to ISI>://WOS:A1976CJ49400016
- Cassidy, J., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., Koski, S., Lichinitser, M., Yang, T. S., Rivera, F., Couture, F., Sirzén, F., & Saltz, L. (2008). Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(12), 2006-2012. <https://doi.org/10.1200/Jco.2007.14.9898>
- Caterina, P., Antonello, D., Chiara, G., Chiara, C., Giacomo, L., Antonio, S., Giovambattista, D., & Luca, G. (2013). Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management. *Journal of Research in Medical Sciences*, 18(7), 600-609. <Go to ISI>://WOS:000328110300013
- Cavalu, S., Antoniac, I. V., Mohan, A., Bodog, F., Doicin, C., Mates, I., Ulmeanu, M., Murzac, R., & Semenescu, A. (2020). Nanoparticles and Nanostructured Surface Fabrication for Innovative Cranial and Maxillofacial Surgery. *Materials (Basel)*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/ma13235391>
- Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P. Ve Karagin, P.H. . (2020). ‘‘Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi’’. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 24/3/2020, ISSN 1301-2487. , Page; 103-111.
- Chakraborty, A., Patton, D. J., Smith, B. F., & Agarwal, P. (2023). miRNAs: Potential as Biomarkers and Therapeutic Targets for Cancer. *Genes*, 14(7). <https://doi.org/ARTN137510.3390/genes14071375>
- Chan, J. K., Blansit, K., Kiet, T., Sherman, A., Wong, G., Earle, C., & Bourguignon, L. Y. W. (2014). The inhibition of -promotes apoptosis and chemosensitivity in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 132(3), 739-744. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.01.034>
- Chan, Y., Yu, Y., Wang, G., Wang, C., Zhang, D., Wang, X., Wang, Z., Jian, W., & Zhang, C. (2019). Inhibition of MicroRNA-381 Promotes Tumor Cell Growth and Chemoresistance in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Med Sci Monit*, 25, 5181-5190. <https://doi.org/10.12659/MSM.915524>
- Chao, P. D. L., Hsiu, S. L., & Hou, Y. C. (2002). Flavonoids in herbs: Biological fates and potential interactions with xenobiotics. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(4), 219-228. <Go to ISI>://WOS:000180888900004
- Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., & Sengupta, P. K. (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(1), 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.12.003>
- Chen, H., Xu, Z., & Liu, D. (2019). Small non-coding RNA and colorectal cancer. *J Cell Mol Med*, 23(5), 3050-3057. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14209>
- Chen, T., Yang, I., Irby, R., Shain, K. H., Wang, H. G., Quackenbush, J., Coppola, D., Cheng, J. Q., & Yeatman, T. J. (2003). Regulation of caspase expression and apoptosis by

- adenomatous polyposis coli. *Cancer Res*, 63(15), 4368-4374. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907606>
- Chen, T. R., Dorotinsky, C. S., Mcguire, L. J., Macy, M. L., & Hay, R. J. (1995). Dld-1 and Hct-15 Cell-Lines Derived Separately from Colorectal Carcinomas Have Totally Different Chromosome Changes but the Same Genetic-Origin. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 81(2), 103-108. [https://doi.org/Doi 10.1016/0165-4608\(94\)00225-Z](https://doi.org/Doi 10.1016/0165-4608(94)00225-Z)
- Chen, Y., Zhao, Y. L., Jin, W. J., Li, Y. F., Zhang, Y. H., Ma, X. J., Sun, G. R., Han, R. L., Tian, Y. D., Li, H., Kang, X. T., & Li, G. X. (2019). MicroRNAs and their regulatory networks in Chinese Gushi chicken abdominal adipose tissue during postnatal late development. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/ARTN 77810.1186/s12864-019-6094-2>
- Chi, L. H., Cross, R. S. N., Redvers, R. P., Davis, M., Hediye-zadeh, S., Mathivanan, S., Samuel, M., Lucas, E. C., Mouchemore, K., Gregory, P. A., Johnstone, C. N., & Anderson, R. L. (2022). MicroRNA-21 is immunosuppressive and pro-metastatic via separate mechanisms. *Oncogenesis*, 11(1). <https://doi.org/ARTN 3810.1038/s41389-022-00413-7>
- Chintala, L., Vaka, S., Baranda, J., & Williamson, S. K. (2011). Capecitabine versus 5-fluorouracil in colorectal cancer: where are we now? *Oncology Reviews*, 5(2), 129-140. <https://doi.org/10.1007/s12156-011-0074-3>
- Chu, E. (2012). An update on the current and emerging targeted agents in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 11(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2011.05.005>
- Cisterna, B. A., Kamaly, N., Choi, W. I., Tavakkoli, A., Farokhzad, O. C., & Vilos, C. (2016). Targeted nanoparticles for colorectal cancer. *Nanomedicine*, 11(18), 2443-2456. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0194>
- Crasci, L., Lauro, M. R., Puglisi, G., & Panico, A. (2018). Natural antioxidant polyphenols on inflammation management: Anti-glycation activity vs metalloproteinases inhibition. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 58(6), 893-904. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1229657>
- Czech, B., & Hannon, G. J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature Reviews Genetics*, 12(1), 19-31. <https://doi.org/10.1038/nrg2916>
- De Angelis, P. M., Stokke, T., Thorstensen, L., Lothe, R. A., & Clausen, O. P. F. (1998). Apoptosis and expression of Bax, Bcl-x, and Bcl-2 apoptotic regulatory proteins in colorectal carcinomas, and associations with p53 genotype/phenotype. *Journal of Clinical Pathology-Molecular Pathology*, 51(5), 254-261. <Go to ISI>://WOS:000076701100003
- de Assis, J. V., Coutinho, L. A., Oyeyemi, I. T., Oyeyemi, O. T., & Grenfell, R. (2022). Diagnostic and therapeutic biomarkers in colorectal cancer: a review. *American Journal of Cancer Research*, 12(2), 661-680. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35261794>
- De Lorenzo, S., Tovoli, F., Barbera, M. A., Garuti, F., Palloni, A., Frega, G., Garajova, I., Rizzo, A., Trevisani, F., & Brandi, G. (2018). Metronomic capecitabine vs. best supportive care in Child-Pugh B hepatocellular carcinoma: a proof of concept. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/ARTN 999710.1038/s41598-018-28337-6>
- De Palma, F. D. E., D'Argenio, V., Pol, J., Kroemer, G., Maiuri, M. C., & Salvatore, F. (2019). The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/cancers11071017>
- Dehghan, F., Boozarpour, S., Torabizadeh, Z., & Alijanpour, S. (2019). miR-21: a promising biomarker for the early detection of colon cancer. *Onco Targets Ther*, 12, 5601-5607. <https://doi.org/10.2147/OTT.S199508>
- Deng, J., Lei, W., Xiang, X. J., Zhang, L., Lei, J., Gong, Y., Song, M. J., Wang, Y., Fang, Z. L., Yu, F., Feng, M., Sun, Z., Chen, J., Zhan, Z. Y., & Xiong, J. P. (2016). Cullin 4A (CUL4A), a direct target of miR-9 and miR-137, promotes gastric cancer proliferation

- and invasion by regulating the Hippo signaling pathway. *Oncotarget*, 7(9), 10037-10050. <https://doi.org/DOI 10.18632/oncotarget.7048>
- Denlinger, C. S., & Barsevick, A. M. (2009). The challenges of colorectal cancer survivorship. *J Natl Compr Canc Netw*, 7(8), 883-893; quiz 894. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2009.0058>
- DeVeale, B., Swindlehurst-Chan, J., & Blelloch, R. (2021). The roles of microRNAs in mouse development. *Nature Reviews Genetics*, 22(5), 307-323. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00309-5>
- Dexter, D. L., Spremulli, E. N., Fligiel, Z., Barbosa, J. A., Vogel, R., Vanvoorhees, A., & Calabresi, P. (1981). Heterogeneity of Cancer-Cells from a Single Human-Colon Carcinoma. *American Journal of Medicine*, 71(6), 949-956. [https://doi.org/Doi 10.1016/0002-9343\(81\)90312-0](https://doi.org/Doi 10.1016/0002-9343(81)90312-0)
- Di Costanzo, F., Sdrobolini, A., & Gasperoni, S. (2000). Capecitabine, a new oral fluoropyrimidine for the treatment of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 35(2), 101-108. [https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(00\)00059-7](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(00)00059-7)
- Di Desidero, T., Orlandi, P., Fioravanti, A., Cremolini, C., Loupakis, F., Marmorino, F., Antoniotti, C., Masi, G., Lonardi, S., Bergamo, F., Zagonel, V., Falcone, A., & Bocci, G. (2018). Pharmacokinetic analysis of metronomic capecitabine in refractory metastatic colorectal cancer patients. *Invest New Drugs*, 36(4), 709-714. <https://doi.org/10.1007/s10637-018-0579-8>
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26(17). <https://doi.org/ARTN 537710.3390/molecules26175377>
- Díaz-Rubio, E., Evans, T. R. J., Tabernero, J., Cassidy, J., Sastre, J., Eatock, M., Bisset, D., Regueiro, P., & Baselga, J. (2002). Capecitabine (Xeloda®) in combination with oxaliplatin:: a phase I, dose-escalation study in patients with advanced or metastatic solid tumors. *Annals of Oncology*, 13(4), 558-565. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf065>
- Ding, Z., Yang, L., Xie, X., Xie, F., Pan, F., Li, J., He, J., & Liang, H. (2010). Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 136(11), 1697-1707. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0828-5>
- Dirimanov, S., & Hogger, P. (2019). Screening of Inhibitory Effects of Polyphenols on Akt-Phosphorylation in Endothelial Cells and Determination of Structure-Activity Features. *Biomolecules*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/biom9060219>
- Dong, Z. L., Ren, L., Lin, L., Li, J., Huang, Y. W., & Li, J. H. (2015). Effect of microRNA-21 on multidrug resistance reversal in A549/DDP human lung cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 11(1), 682-690. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2662>
- Douaiher, J., Ravipati, A., Grams, B., Chowdhury, S., Alatisé, O., & Are, C. (2017). Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. *J Surg Oncol*, 115(5), 619-630. <https://doi.org/10.1002/jso.24578>
- Döring, B., & Petzinger, E. (2014). Phase 0 and phase III transport in various organs: Combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metabolism Reviews*, 46(3), 261-282. <https://doi.org/10.3109/03602532.2014.882353>
- Drebber, U., Lay, M., Wedemeyer, I., Vallbohmer, D., Bollschweiler, E., Brabender, J., Monig, S. P., Holscher, A. H., Dienes, H. P., & Odenthal, M. (2011). Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Oncol*, 39(2), 409-415. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1036>
- Drewinko, B., Romsdahl, M. M., Yang, L. Y., Ahearn, M. J., & Trujillo, J. M. (1976). Establishment of a Human Carcinoembryonic Antigen-Producing Colon

- Adenocarcinoma Cell Line. *Cancer Research*, 36(2), 467-475. <Go to ISI>://WOS:A1976BD83400030
- Dudhipala, N., & Puchchakayala, G. (2018). Capecitabine lipid nanoparticles for anti-colon cancer activity in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer: preparation, cytotoxic, pharmacokinetic, and pathological evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(10), 1572-1582. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1445264>
- Echevarria-Vargas, I. M., Valiyeva, F., & Vivas-Mejia, P. E. (2014). Upregulation of miR-21 in cisplatin resistant ovarian cancer via JNK-1/c-Jun pathway. *PLoS One*, 9(5), e97094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097094>
- Eshleman, J. R., Lang, E. Z., Bowerfind, G. K., Parsons, R., Vogelstein, B., Willson, J. K. V., Veigl, M. L., Sedwick, W. D., & Markowitz, S. D. (1995). Increased Mutation-Rate at the Hprt Locus Accompanies Microsatellite Instability in Colon-Cancer. *Oncogene*, 10(1), 33-37. <Go to ISI>://WOS:A1995QA98000005
- Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(4), 259-269. <https://doi.org/10.1038/nrc1840>
- Estevinho, M. M., Fernandes, C., Silva, J. C., Gomes, A. C., Afecto, E., Correia, J., & Carvalho, J. (2022). Role of ATP-binding Cassette Transporters in Sorafenib Therapy for Hepatocellular Carcinoma: An Overview. *Curr Drug Targets*, 23(1), 21-32. <https://doi.org/10.2174/1389450122666210412125018>
- Evans, W. E., & McLeod, H. L. (2003). Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*, 348(6), 538-549. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020526>
- Ewing, I., Hurley, J. J., Josephides, E., & Millar, A. (2014). The molecular genetics of colorectal cancer. *Frontline Gastroenterol*, 5(1), 26-30. <https://doi.org/10.1136/flgastro-2013-100329>
- Falcone, A., Masi, G., Allegrini, G., Danesi, R., Pfanner, E., Brunetti, I. M., Di Paolo, A., Cupini, S., Del Tacca, M., & Conte, P. (2002). Biweekly chemotherapy with oxaliplatin, irinotecan, infusional fluorouracil, and leucovorin: A pilot study in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(19), 4006-4014. <https://doi.org/10.1200/Jco.2002.12.075>
- Fan, Q. L., Wang, X. Y., Chinnathambi, A., Alharbi, S. A., & Wang, Q. K. (2020). Fisetin suppresses 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis in Wistar rats via enhancing the apoptotic signaling pathway. *Journal of King Saud University Science*, 32(3), 1959-1964. <Go to ISI>://WOS:000528950800025
- Farhan, M. (2023). Insights on the Role of Polyphenols in Combating Cancer Drug Resistance. *Biomedicines*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061709>
- Farshchi Zarabi, S., Chan, S., Gupta, V., Khalaf, D., Lutynski, A., Minden, M. D., Rostom, A., Rydlewski, A., Schuh, A. C., Sibai, H., Yee, K. W. L., & Schimmer, A. D. (2018). Remissions after third induction chemotherapy for primary non-responders with acute myeloid leukemia (AML) are uncommon and short-lived. *Leuk Lymphoma*, 59(1), 237-240. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1323273>
- Fearon, E. R. (2011). Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, Vol 6, 6, 479-+. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130235>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)
- Feng, Y., Shu, J., Yao, L., Lan, Y., Ye, L., Mei, W., & Ding, Y. (2020). Recognizing and stabilizing miR-21 by chiral ruthenium(II) complexes. *BMC Chem*, 14(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13065-020-00672-8>
- Feng, Y. S., Zhou, J. M., Sun, C. H., Zhu, J., Yang, J., & Guo, L. (2021). The diagnostic value of miR-21 combined with CT in patients with liver cancer. *Clinical & Translational Oncology*, 23(6), 1238-1244. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02514-4>

- Fitzgerald, R. C., Omary, M. B., & Triadafilopoulos, G. (1997). Acid modulation of HT29 cell growth and differentiation. An in vitro model for Barrett's esophagus. *J Cell Sci*, 110 (Pt 5), 663-671. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.5.663>
- Fogh, J. (1975). Characterization of 200 Cell Lines from Human Tumors. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 16(Mar), 31-31. <Go to ISI>://WOS:A1975W050300124
- Fojo, A. T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M., & Pastan, I. (1987). Expression of a Multidrug-Resistance Gene in Human-Tumors and Tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(1), 265-269. <https://doi.org/DOI 10.1073/pnas.84.1.265>
- Formosa, A., Markert, E. K., Lena, A. M., Italiano, D., Finazzi-Agró, E., Levine, A. J., Bernardini, S., Garabadgiu, A. V., Melino, G., & Candi, E. (2014). MicroRNAs, miR-154, miR-299-5p, miR-376a, miR-376c, miR-377, miR-381, miR-487b, miR-485-3p, miR-495 and miR-654-3p, mapped to the 14q32.31 locus, regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion in metastatic prostate cancer cells. *Oncogene*, 33(44), 5173-5182. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.451>
- Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1(5), 2315-2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
- Fu, D., & Arias, I. M. (2012). Intracellular trafficking of P-glycoprotein. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(3), 461-464. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.009>
- Fu, Z. W., Wang, L., Li, S. J., Chen, F., Au-Yeung, K. K. W., & Shi, C. (2021). MicroRNA as an Important Target for Anticancer Drug Development. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/ARTN 73632310.3389/fphar.2021.736323>
- Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y. X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*, 14(10), 1014-1022. <https://doi.org/10.1038/ni.2703>
- Galati, G., & O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 287-303. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034>
- Gardini, A. C., Foca, F., Scartozzi, M., Silvestris, N., Tamburini, E., Faloppi, L., Brunetti, O., Rudnas, B., Pisconti, S., Valgiusti, M., Marisi, G., Foschi, F. G., Ercolani, G., Tassinari, D., Cascinu, S., & Frassineti, G. L. (2017). Metronomic capecitabine versus best supportive care as second-line treatment in hepatocellular carcinoma: a retrospective study. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/ARTN 4249910.1038/srep42499>
- Garzon, R., Marcucci, G., & Croce, C. M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 9(10), 775-789. <https://doi.org/10.1038/nrd3179>
- Gatti, L., & Zunino, F. (2005). Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods Mol Med*, 111, 127-148. <https://doi.org/10.1385/1-59259-889-7:127>
- Goss, K. H., & Groden, J. (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol*, 18(9), 1967-1979. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.9.1967>
- Gottesman, M. M., Pastan, I., & Ambudkar, S. V. (1996). P-glycoprotein and multidrug resistance. *Current Opinion in Genetics & Development*, 6(5), 610-617. [https://doi.org/Doi 10.1016/S0959-437x\(96\)80091-8](https://doi.org/Doi 10.1016/S0959-437x(96)80091-8)
- Gottesman, M. M., Robey, R. W., & Ambudkar, S. (2023). New mechanisms of multidrug resistance: an introduction to the special collection. *Cancer Drug Resistance*, 6(3), 590-595. <https://doi.org/10.20517/cdr.2023.86>
- Gover, K. E., Isik, M., Barut, D., Sengel-Turk, C. T., Amasya, G., Derkus, B., Cabuk, A., & Celik, P. A. (2022). Capecitabine-loaded bacterial membrane vesicles derived

- from promotes apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Biochemical Engineering Journal*, 189. <https://doi.org/ARTN 10872210.1016/j.bej.2022.108722>
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., & Falanga, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *J Invest Dermatol*, 137(2), e11-e16. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>
- Green, R. A., & Kaplan, K. B. (2003). Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in. *Journal of Cell Biology*, 163(5), 949-961. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307070>
- Green, S. D., & Konig, H. (2020). Treatment of Acute Myeloid Leukemia in the Era of Genomics-Achievements and Persisting Challenges. *Front Genet*, 11, 480. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00480>
- Gu, Y. F., Fei, Z. W., & Zhu, R. H. (2020). miR-21 modulates cisplatin resistance of gastric cancer cells by inhibiting autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Anti-Cancer Drugs*, 31(4), 385-393. <https://doi.org/10.1097/Cad.0000000000000886>
- Guo, Q. Q., Yin, X. L., Gao, J., Wang, X. W., Zhang, S. C., Zhou, X. M., Wang, Z., & Zhang, Q. Y. (2020). MiR-381-3p redistributes between cytosol and mitochondria and aggravates endothelial cell injury induced by reactive oxygen species. *Tissue & Cell*, 67. <https://doi.org/ARTN 10145110.1016/j.tice.2020.101451>
- Guo, Y. P., Kotova, E., Chen, Z. S., Lee, K., Hopper-Borge, E., Belinsky, M. G., & Kruh, G. D. (2003). MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl) adenine. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29509-29514. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304059200>
- Hammond, W. A., Swaika, A., & Mody, K. (2016). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol*, 8(1), 57-84. <https://doi.org/10.1177/1758834015614530>
- Han, P., Li, J. W., Zhang, B. M., Lv, J. C., Li, Y. M., Gu, X. Y., Yu, Z. W., Jia, Y. H., Bai, X. F., Li, L., Liu, Y. L., & Cui, B. B. (2017). The lncRNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation and chemoresistance via miR-181a-5p-mediated regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Molecular Cancer*, 16. <https://doi.org/ARTN 910.1186/s12943-017-0583-1>
- Hano, M., Tomášová, L., Seres, M., Pavlíková, L., Breier, A., & Sulová, Z. (2018). Interplay between P-Glycoprotein Expression and Resistance to Endoplasmic Reticulum Stressors. *Molecules*, 23(2). <https://doi.org/ARTN 33710.3390/molecules23020337>
- Hashemi, M., Mirdamadi, M. S. A., Talebi, Y., Khaniabad, N., Banaei, G., Daneii, P., Gholami, S., Ghorbani, A., Tavakolpournegari, A., Farsani, Z. M., Zarrabi, A., Nabavi, N., Zandieh, M. A., Rashidi, M., Taheriazam, A., Entezari, M., & Khan, H. (2023). Pre-clinical and clinical importance of miR-21 in human cancers: Tumorigenesis, therapy response, delivery approaches and targeting agents. *Pharmacological Research*, 187. <https://doi.org/ARTN 10656810.1016/j.phrs.2022.106568>
- He, C., Dong, X., Zhai, B., Jiang, X., Dong, D., Li, B., Jiang, H., Xu, S., & Sun, X. (2015). MiR-21 mediates sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting autophagy via the PTEN/Akt pathway. *Oncotarget*, 6(30), 28867-28881. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4814>
- He, H. L., Jazdzewski, K., Li, W., Liyanarachchi, S., Nagy, R., Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Franssila, K., Suster, S., Kloos, R. T., Croce, C. M., & de la Chapelle, A. (2005). The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19075-19080. <https://doi.org/DOI 10.1073/pnas.0509603102>

- He, X. X., Wei, Y. N., Wang, Y., Liu, L., Wang, W., & Li, N. F. (2016). MiR-381 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting Twist1. *Oncotargets and Therapy*, 9, 1231-1239. <https://doi.org/10.2147/Ott.S99228>
- Hector, S., Bolanowska-Higdon, W., Zdanowicz, J., Hitt, S., & Pendyala, L. (2001). In vitro studies on the mechanisms of oxaliplatin resistance. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 48(5), 398-406. <https://doi.org/DOI 10.1007/s002800100363>
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Plevin, E., & Scheiner, J. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 179(4561), 663-666. <https://doi.org/10.1038/179663a0>
- Heijnen, C. G. M., Haenen, G. R. M. M., Oostveen, R. M., Stalpers, E. M., & Bast, A. (2002). Protection of flavonoids against lipid peroxidation: The structure activity relationship revisited. *Free Radical Research*, 36(5), 575-581. <https://doi.org/10.1080/10715760290025951>
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776. <https://doi.org/10.1038/35037710>
- Hill, M., & Tran, N. (2021). miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. *Dis Model Mech*, 14(4). <https://doi.org/10.1242/dmm.047662>
- Hosseini, S. S., Ebrahimi, S. O., Haji Ghasem Kashani, M., & Reisi, S. (2023). Study of quercetin and fisetin synergistic effect on breast cancer and potentially involved signaling pathways. *Cell Biol Int*, 47(1), 98-109. <https://doi.org/10.1002/cbin.11942>
- Hosseinzadeh, A., Poursoleiman, F., Biregani, A. N., & Esmailzadeh, A. (2023). Flavonoids target different molecules of autophagic and metastatic pathways in cancer cells. *Cancer Cell Int*, 23(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-02960-4>
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*, 6(3), 1769-1792. <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>
- Hu, T., Li, Z., Gao, C. Y., & Cho, C. H. (2016). Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World J Gastroenterol*, 22(30), 6876-6889. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i30.6876>
- Huang, H., Weng, H., & Chen, J. (2020). m(6)A Modification in Coding and Non-coding RNAs: Roles and Therapeutic Implications in Cancer. *Cancer Cell*, 37(3), 270-288. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.02.004>
- Huang, M. C., Hsueh, T. Y., Cheng, Y. Y., Lin, L. C., & Tsai, T. H. (2018). Pharmacokinetics and Biliary Excretion of Fisetin in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(25), 6300-6307. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00917>
- Husain, A., Makadia, V., Valicherla, G. R., Riyazuddin, M., & Gayen, J. R. (2022). Approaches to minimize the effects of P-glycoprotein in drug transport: A review. *Drug Dev Res*, 83(4), 825-841. <https://doi.org/10.1002/ddr.21918>
- Ichimatsu, D., Nomura, M., Nakamura, S., Moritani, S., Yokogawa, K., Kobayashi, S., Nishioka, T., & Miyamoto, K. (2007). Structure-activity relationship of flavonoids for inhibition of epidermal growth factor-induced transformation of JB6 Cl 41 cells. *Molecular Carcinogenesis*, 46(6), 436-445. <https://doi.org/10.1002/mc.20292>
- Im, A., & Pavletic, S. Z. (2017). Immunotherapy in hematologic malignancies: past, present, and future. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0453-8>
- Imran, M., Saeed, F., Gilani, S. A., Shariati, M. A., Imran, A., Afzaal, M., Atif, M., Tufail, T., & Anjum, F. M. (2021). Fisetin: An anticancer perspective. *Food Science & Nutrition*, 9(1), 3-16. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1872>
- Inkielewicz-Stepniak, I., Radomski, M. W., & Wozniak, M. (2012). Fisetin prevents fluoride- and dexamethasone-induced oxidative damage in osteoblast and hippocampal cells.

- Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), 583-589.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.015>
- Inoue, S., Browne, G., Melino, G., & Cohen, G. M. (2009). Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death and Differentiation*, 16(7), 1053-1061. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.29>
- Ireland, M. J., March, S., Crawford-Williams, F., Cassimatis, M., Aitken, J. F., Hyde, M. K., Chambers, S. K., Sun, J., & Dunn, J. (2017). A systematic review of geographical differences in management and outcomes for colorectal cancer in Australia. *BMC Cancer*, 17(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3067-1>
- Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B., & Speed, T. P. (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*, 31(4), e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gng015>
- Islami, F., Goding Sauer, A., Miller, K. D., Siegel, R. L., Fedewa, S. A., Jacobs, E. J., McCullough, M. L., Patel, A. V., Ma, J., Soerjomataram, I., Flanders, W. D., Brawley, O. W., Gapstur, S. M., & Jemal, A. (2018). Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA Cancer J Clin*, 68(1), 31-54. <https://doi.org/10.3322/caac.21440>
- Issa, J. P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(12), 988-993. <https://doi.org/10.1038/nrc1507>
- Ito, M., Kanno, S., Nosho, K., Sukawa, Y., Mitsuhashi, K., Kurihara, H., Igarashi, H., Takahashi, T., Tachibana, M., Takahashi, H., Yoshii, S., Takenouchi, T., Hasegawa, T., Okita, K., Hirata, K., Maruyama, R., Suzuki, H., Imai, K., Yamamoto, H., & Shinomura, Y. (2015). Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer*, 137(6), 1258-1268. <https://doi.org/10.1002/ijc.29488>
- Jash, S. K., & Mondal, S. . (2014). Bioactive flavonoid fisetin—A molecule of pharmacological interest, signpost open access. . *Organic & Biomolecular Chemistry*, , 2, 89–128.
- Jasperse, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044-2058. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.054>
- Jeng, L. B., Kumar Velmurugan, B., Chen, M. C., Hsu, H. H., Ho, T. J., Day, C. H., Lin, Y. M., Padma, V. V., Tu, C. C., & Huang, C. Y. (2018). Fisetin mediated apoptotic cell death in parental and Oxaliplatin/irinotecan resistant colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*, 233(9), 7134-7142. <https://doi.org/10.1002/jcp.26532>
- Ji, D., Chen, Z., Li, M., Zhan, T., Yao, Y., Zhang, Z., Xi, J., Yan, L., & Gu, J. (2014). MicroRNA-181a promotes tumor growth and liver metastasis in colorectal cancer by targeting the tumor suppressor WIF-1. *Mol Cancer*, 13, 86. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-86>
- Jiang, L. L., Wang, C. J., Lei, F. Y., Zhang, L. J., Zhang, X., Liu, A. B., Wu, G. Y., Zhu, J. R., & Song, L. B. (2015). miR-93 Promotes Cell Proliferation in Gliomas through Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway. *Oncotarget*, 6(10), 8286-8299. <https://doi.org/DOI 10.18632/oncotarget.3221>
- Jiao, X., Zhao, L., Ma, M., Bai, X., He, M., Yan, Y., Wang, Y., Chen, Q., Zhao, X., Zhou, M., Cui, Z., Zheng, Z., Wang, E., & Wei, M. (2013). MiR-181a enhances drug sensitivity in mitoxantone-resistant breast cancer cells by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Breast Cancer Res Treat*, 139(3), 717-730. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2607-x>
- Jin-Song, Y., Zhao-Xia, W., Cheng-Yu, L., Xiao-Di, L., Ming, S., Yuan-Yuan, G., & Wei, D. (2011). Prognostic significance of Bcl-xL gene expression in human colorectal cancer. *Acta Histochem*, 113(8), 810-814. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.01.002>

- Jin, D., Guo, J. W., Wu, Y., Chen, W. W., Du, J., Yang, L. J., Wang, X. H., Gong, K. K., Dai, J. J., Miao, S., Li, X. L., & Su, G. M. (2020). Metformin-repressed miR-381-YAP-snail axis activity disrupts NSCLC growth and metastasis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1). <https://doi.org/ARTN 610.1186/s13046-019-1503-6>
- Johdi, N. A., & Sukor, N. F. (2020). Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies. *Front Immunol*, 11, 1624. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01624>
- Joye, I., & Haustermans, K. (2014). Early and late toxicity of radiotherapy for rectal cancer. *Recent Results Cancer Res*, 203, 189-201. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08060-4_13
- Kai, K., Dittmar, R. L., & Sen, S. (2018). Secretory microRNAs as biomarkers of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 78, 22-36. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.12.011>
- Kalinina, T. S., Kononchuk, V. V., Yakovleva, A. K., Alekseenok, E. Y., Sidorov, S. V., & Gulyaeva, L. F. (2020). Association between Lymph Node Status and Expression Levels of Androgen Receptor, miR-185, miR-205, and miR-21 in Breast Cancer Subtypes. *International Journal of Breast Cancer*, 2020. <https://doi.org/Artin 325939310.1155/2020/3259393>
- Kanaan, Z., Rai, S. N., Eichenberger, M. R., Barnes, C., Dworkin, A. M., Weller, C., Cohen, E., Roberts, H., Keskey, B., Petras, R. E., Crawford, N. P. S., & Galandiuk, S. (2012). Differential MicroRNA Expression Tracks Neoplastic Progression in Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancer (vol 33, pg 551, 2012). *Human Mutation*, 33(5), 899-899. <https://doi.org/10.1002/humu.22063>
- Kang, K. A., Piao, M. J., & Hyun, J. W. (2015). Fisetin induces apoptosis in human nonsmall lung cancer cells via a mitochondria-mediated pathway. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 51(3), 300-309. <https://doi.org/10.1007/s11626-014-9830-6>
- Karthika, C., Sureshkumar, R., Zehravi, M., Akter, R., Ali, F., Ramproshad, S., Mondal, B., Tagde, P., Ahmed, Z., Khan, F. S., Rahman, M. H., & Cavalu, S. (2022). Multidrug Resistance of Cancer Cells and the Vital Role of P-Glycoprotein. *Life (Basel)*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/life12060897>
- Kashyap, D., Garg, V. K., Tuli, H. S., Yerer, M. B., Sak, K., Sharma, A. K., Kumar, M., Aggarwal, V., & Sandhu, S. S. (2019). Fisetin and Quercetin: Promising Flavonoids with Chemopreventive Potential. *Biomolecules*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/biom9050174>
- Kashyap, D., Sharma, A., Sak, K., Tuli, H. S., Buttar, H. S., & Bishayee, A. (2018). Fisetin: A bioactive phytochemical with potential for cancer prevention and pharmacotherapy. *Life Sci*, 194, 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.005>
- Kasi, A., Handa, S., Bhatti, S., Umar, S., Bansal, A., & Sun, W. (2020). Molecular Pathogenesis and Classification of Colorectal Carcinoma. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 16(5), 97-106. <https://doi.org/10.1007/s11888-020-00458-z>
- Kaur, V., Amandeep Singh, A. S., Kaur, K., & Rath, G. (2020). Targeted Based Drug Delivery System for Colon Cancer. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10, 111-122.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Khan, N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2007). Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis*, 28(2), 233-239. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl243>
- Khan, N., Jajeh, F., Eberhardt, E. L., Miller, D. D., Albrecht, D. M., Van Doorn, R., Hruby, M. D., Maresh, M. E., Clipson, L., Mukhtar, H., & Halberg, R. B. (2019). Fisetin and 5-

- fluorouracil: Effective combination for PIK3CA-mutant colorectal cancer. *Int J Cancer*, 145(11), 3022-3032. <https://doi.org/10.1002/ijc.32367>
- Khan, P., Ebenezer, N. S., Siddiqui, J. A., Maurya, S. K., Lakshmanan, I., Salgia, R., Batra, S. K., & Nasser, M. W. (2022). MicroRNA-1: Diverse role of a small player in multiple cancers. *Semin Cell Dev Biol*, 124, 114-126. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.05.020>
- Khodapasand, E., Jafarzadeh, N., Farrokhi, F., Kamalidehghan, B., & Houshmand, M. (2015). Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? *Iran Biomed J*, 19(2), 69-75. <https://doi.org/10.6091/ibj.1366.2015>
- Kim, J., Yao, F., Xiao, Z., Sun, Y., & Ma, L. (2018). MicroRNAs and metastasis: small RNAs play big roles. *Cancer Metastasis Rev*, 37(1), 5-15. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9712-y>
- Kim, P. J., Plescia, J., Clevers, H., Fearon, E. R., & Altieri, D. C. (2003). Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet*, 362(9379), 205-209. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13910-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13910-4)
- Kim, S. Y., Jung, J. H., Lee, H. J., Soh, H., Lee, S. J., Oh, S. J., Chae, S. Y., Lee, J. H., Lee, S. J., Hong, Y. S., Kim, T. W., & Moon, D. H. (2017). [(18)F]fluorothymidine PET Informs the Synergistic Efficacy of Capecitabine and Trifluridine/Tipiracil in Colon Cancer. *Cancer Res*, 77(24), 7120-7130. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1406>
- Kizil, H. E., Gür, C., Ayna, A., Darendelioglu, E., Küçükler, S., & Sag, S. (2023). Contribution of Oxidative Stress, Apoptosis, Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy Pathways to the Ameliorative Effects of Hesperidin in NaF-Induced Testicular Toxicity. *Chemistry & Biodiversity*, 20(3). <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200982>
- Kohler, E. M., Derungs, A., Daum, G., Behrens, J., & Schneikert, J. (2008). Functional definition of the mutation cluster region of adenomatous polyposis coli in colorectal tumours. *Hum Mol Genet*, 17(13), 1978-1987. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn095>
- Kong, Y. W., Ferland-McCollough, D., Jackson, T. J., & Bushell, M. (2012). microRNAs in cancer management. *Lancet Oncology*, 13(6), e249-258. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70073-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70073-6)
- Koornstra, J. J., de Jong, S., Hollema, H., de Vries, E. G., & Kleibeuker, J. H. (2003). Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol*, 45(1), 37-53. [https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(01\)00228-1](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(01)00228-1)
- Kotlinska-Lemieszek, A., Klepstad, P., & Haugen, D. F. (2019). Clinically Significant Drug-Drug Interactions Involving Medications Used for Symptom Control in Patients With Advanced Malignant Disease: A Systematic Review. *Journal of Pain and Symptom Management*, 57(5), 989-+. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2019.02.006>
- Kovalchuk, O., Filkowski, J., Meservy, J., Ilnytsky, Y., Tryndyak, V. P., Chekhun, V. F., & Pogribny, I. P. (2008). Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Mol Cancer Ther*, 7(7), 2152-2159. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0021>
- Koveitpour, Z., Panahi, F., Vakilian, M., Peymani, M., Seyed Forootan, F., Nasr Esfahani, M. H., & Ghaedi, K. (2019). Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell Biosci*, 9, 97. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0361-4>
- Krasteva, N., & Georgieva, M. (2022). Promising Therapeutic Strategies for Colorectal Cancer Treatment Based on Nanomaterials. *Pharmaceutics*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061213>
- Kubina, R., Krzykowski, K., Kabala-Dzik, A., Wojtyczka, R. D., Chodurek, E., & Dziedzic, A. (2022). Fisetin, a Potent Anticancer Flavonol Exhibiting Cytotoxic Activity against

- Neoplastic Malignant Cells and Cancerous Conditions: A Scoping, Comprehensive Review. *Nutrients*, 14(13). <https://doi.org/10.3390/nu14132604>
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Kumar, R., Khursheed, R., Kumar, R., Awasthi, A., Sharma, N., Khurana, S., Kapoor, B., Khurana, N., Singh, S. K., Gowthamarajan, K., & Wadhwani, A. (2019). Self-nanoemulsifying drug delivery system of fisetin: Formulation, optimization, characterization and cytotoxicity assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 54. <https://doi.org/ARTN 10125210.1016/j.jddst.2019.101252>
- Kumar, R., Kumar, R., Khursheed, R., Awasthi, A., Khurana, N., Singh, S. K., Khurana, S., Sharma, N., Gunjal, P., Kaur, J., & Corrie, L. (2021). Development and validation of RP-HPLC method for estimation of fisetin in rat plasma. *South African Journal of Botany*, 140, 284-289. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.05.010>
- Kumar, R. M., Kumar, H., Bhatt, T., Jain, R., Panchal, K., Chaurasiya, A., & Jain, V. (2023). Fisetin in Cancer: Attributes, Developmental Aspects, and Nanotherapeutics. *Pharmaceuticals*, 16(2). <https://doi.org/ARTN 19610.3390/ph16020196>
- Kutanzi, K. R., Yurchenko, O. V., Beland, F. A., Checkhun, V. F., & Pogribny, I. P. (2011). MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer. *Clin Epigenetics*, 2(2), 171-185. <https://doi.org/10.1007/s13148-011-0040-8>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853-858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>
- Lai, E. C., Burks, C., & Posakony, J. W. (1998). The K box, a conserved 3' UTR sequence motif, negatively regulates accumulation of enhancer of split complex transcripts. *Development*, 125(20), 4077-4088. <https://doi.org/10.1242/dev.125.20.4077>
- Lai, E. C., & Posakony, J. W. (1997). The Bearded box, a novel 3' UTR sequence motif, mediates negative post-transcriptional regulation of Bearded and Enhancer of split Complex gene expression. *Development*, 124(23), 4847-4856. <https://doi.org/10.1242/dev.124.23.4847>
- Lai, J. I., Tseng, Y. J., Chen, M. H., Huang, C. Y. F., & Chang, P. M. H. (2020). Clinical Perspective of FDA Approved Drugs With P-Glycoprotein Inhibition Activities for Potential Cancer Therapeutics. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/ARTN 56193610.3389/fonc.2020.561936>
- Lakhani, S. A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G. A., Jr., Booth, C. J., Mehal, W. Z., Inayat, I., & Flavell, R. A. (2006). Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 311(5762), 847-851. <https://doi.org/10.1126/science.1115035>
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 858-862. <https://doi.org/10.1126/science.1065062>
- Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 862-864. <https://doi.org/10.1126/science.1065329>
- Lee, Y. M., Danahey, K., Knoebel, R. W., Ratain, M. J., Meltzer, D. O., & O'Donnell, P. H. (2019). Analysis of comprehensive pharmacogenomic profiling to impact in-hospital prescribing. *Pharmacogenet Genomics*, 29(2), 23-30. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000346>
- Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B., McCoy, C. E., Mazur, K. C., & Mabry, N. D. (1976). Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Research*, 36(12), 4562-4569. <Go to ISI>://WOS:A1976CM52800031
- Leivonen, S. K., Icaý, K., Jäntti, K., Siren, I., Liu, C. Y., Alkodsí, A., Cervera, A., Ludvigsen, M., Hamilton-Dutoit, S. J., d'Amore, F., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Delabie, J.,

- Holte, H., Lehtonen, R., Hautaniemi, S., & Leppä, S. (2017). MicroRNAs regulate key cell survival pathways and mediate chemosensitivity during progression of diffuse large B- cell lymphoma. *Blood Cancer Journal*, 7. <https://doi.org/ARTN65410.1038/s41408-017-0033-8>
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, 386(6625), 623-627. <https://doi.org/10.1038/386623a0>
- Leonard, G. D., Fojo, T., & Bates, S. E. (2003). The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*, 8(5), 411-424. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.8-5-411>
- Levitzen, M. W., Lai, E. C., & Posakony, J. W. (1997). The Drosophila gene Bearded encodes a novel small protein and shares 3' UTR sequence motifs with multiple Enhancer of split Complex genes. *Development*, 124(20), 4039-4051. <Go to ISI>://WOS:A1997YE93400012
- Li, J., Cheng, Y. Y., Qu, W. X., Sun, Y., Wang, Z. P., Wang, H. Z., & Tian, B. Q. (2011). Fisetin, a Dietary Flavonoid, Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis through Activation of p53 and Inhibition of NF-Kappa B Pathways in Bladder Cancer Cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 108(2), 84-93. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00613.x>
- Li, J., Pu, W. C., Sun, H. L., Zhou, J. K., Fan, X., Zheng, Y. Y., He, J., Liu, X. S., Xia, Z. C., Liu, L. X., Wei, Y. Q., & Peng, Y. (2018). Pin1 impairs microRNA biogenesis by mediating conformation change of XPO5 in hepatocellular carcinoma. *Cell Death and Differentiation*, 25(9), 1612-1624. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0065-z>
- Li, J., Shen, J., Zhao, Y., Du, F., Li, M., Wu, X., Chen, Y., Wang, S., Xiao, Z., & Wu, Z. (2023). Role of miR-181a-5p in cancer (Review). *Int J Oncol*, 63(4). <https://doi.org/10.3892/ijo.2023.5556>
- Li, J. F., Ying, Y. F., Xie, H. Y., Jin, K., Yan, H. Q., Wang, S., Xu, M. J., Xu, X., Wang, X., Yang, K., Zheng, X. Y., & Xie, L. P. (2019). Dual regulatory role of CCNA2 in modulating CDK6 and MET-mediated cell-cycle pathway and EMT progression is blocked by miR-381-3p in bladder cancer. *Faseb Journal*, 33(1), 1374-1388. <https://doi.org/10.1096/fj.201800667R>
- Li, L., Sarver, A. L., Khatri, R., Hajeri, P. B., Kamenev, I., French, A. J., Thibodeau, S. N., Steer, C. J., & Subramanian, S. (2014). Sequential expression of miR-182 and miR-503 cooperatively targets FBXW7, contributing to the malignant transformation of colon adenoma to adenocarcinoma. *J Pathol*, 234(4), 488-501. <https://doi.org/10.1002/path.4407>
- Li, M. L., Zhang, N., & Li, M. X. (2017). Capecitabine treatment of HCT-15 colon cancer cells induces apoptosis via mitochondrial pathway. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(7), 1529-1536. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i7.10>
- Liao, Y. C., Shih, Y. W., Chao, C. H., Lee, X. Y., & Chiang, T. A. (2009). Involvement of the ERK Signaling Pathway in Fisetin Reduces Invasion and Migration in the Human Lung Cancer Cell Line A549. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 8933-8941. <https://doi.org/10.1021/jf902630w>
- Liga, S., Paul, C., & Peter, F. (2023). Flavonoids: Overview of Biosynthesis, Biological Activity, and Current Extraction Techniques. *Plants (Basel)*, 12(14). <https://doi.org/10.3390/plants12142732>
- Lim, D. Y., & Park, J. H. (2009). Induction of p53 contributes to apoptosis of HCT-116 human colon cancer cells induced by the dietary compound fisetin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296(5), G1060-1068. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90490.2008>
- Lin, M. T., Lin, C. L., Lin, T. Y., Cheng, C. W., Yang, S. F., Lin, C. L., Wu, C. C., Hsieh, Y. H., & Tsai, J. P. (2016). Synergistic effect of fisetin combined with sorafenib in human cervical cancer HeLa cells through activation of death receptor-5 mediated caspase-

- 8/caspase-3 and the mitochondria-dependent apoptotic pathway. *Tumor Biology*, 37(5), 6987-6996. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4526-4>
- Liu, C., Tian, X., Zhang, J., & Jiang, L. (2018). Long Non-coding RNA DLEU1 Promotes Proliferation and Invasion by Interacting With miR-381 and Enhancing HOXA13 Expression in Cervical Cancer. *Front Genet*, 9, 629. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00629>
- Liu, X., Ou, K., Ma, X. T., Gao, L. Z., Wang, Q., Zhang, H. Z., & Yang, L. (2022). Safety and efficacy of irinotecan, oxaliplatin, and capecitabine (XELOXIRI) regimen with or without targeted drugs in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*, 22(1). <https://doi.org/ARTN 80710.1186/s12885-022-09889-3>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3(5), 330-338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Lothe, R. A. (1997). Microsatellite instability in human solid tumors. *Mol Med Today*, 3(2), 61-68. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(96\)10055-1](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(96)10055-1)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., & Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834-838. <https://doi.org/10.1038/nature03702>
- Lu, S., Jia, C. Y., & Yang, J. S. (2023). Future therapeutic implications of new molecular mechanism of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 29(16), 2359-2368. <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i16.2359>
- Luthi, A. U., & Martin, S. J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation*, 14(4), 641-650. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402103>
- Lv, S. Y., Shan, T. D., Pan, X. T., Tian, Z. B., Liu, X. S., Liu, F. G., Sun, X. G., Xue, H. G., Li, X. H., Han, Y., Sun, L. J., Chen, L., & Zhang, L. Y. (2018). The lncRNA ZEB1-AS1 sponges miR-181a-5p to promote colorectal cancer cell proliferation by regulating Wnt/beta-catenin signaling. *Cell Cycle*, 17(10), 1245-1254. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1471317>
- Magura, J., Hassan, D., Moodley, R., & Mackraj, I. (2021). Hesperidin-loaded nanoemulsions improve cytotoxicity, induce apoptosis, and downregulate miR-21 and miR-155 expression in MCF-7. *Journal of Microencapsulation*, 38(7-8), 486-495. <https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1979673>
- Mahar, A. L., Compton, C., Halabi, S., Hess, K. R., Weiser, M. R., & Groome, P. A. (2017). Personalizing prognosis in colorectal cancer: A systematic review of the quality and nature of clinical prognostic tools for survival outcomes. *J Surg Oncol*, 116(8), 969-982. <https://doi.org/10.1002/jso.24774>
- Marcus, A., Gowen, B. G., Thompson, T. W., Iannello, A., Ardolino, M., Deng, W., Wang, L., Shifrin, N., & Raulet, D. H. (2014). Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol*, 122, 91-128. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800267-4.00003-1>
- Martin, D. A., Siegel, R. M., Zheng, L., & Lenardo, M. J. (1998). Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem*, 273(8), 4345-4349. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.8.4345>
- Martinez-Maqueda, D., Miralles, B., & Recio, I. (2015). HT29 Cell Line. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. Lopez-Exposito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* (pp. 113-124). https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_11

- Mattiuzzi, C., Sanchis-Gomar, F., & Lippi, G. (2019). Concise update on colorectal cancer epidemiology. *Ann Transl Med*, 7(21), 609. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.07.91>
- Maurin, T., Cazalla, D., Yang, J. S., Bortolamiol-Becet, D., & Lai, E. C. (2012). RNase III-independent microRNA biogenesis in mammalian cells. *RNA*, 18(12), 2166-2173. <https://doi.org/10.1261/rna.036194.112>
- McKendrick, J., & Coutsouvelis, J. (2005). Capecitabine: effective oral fluoropyrimidine chemotherapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 6(7), 1231-1239. <https://doi.org/10.1517/14656566.6.7.1231>
- McQuade, R. M., Stojanovska, V., Bornstein, J. C., & Nurgali, K. (2017). Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches. *Curr Med Chem*, 24(15), 1537-1557. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170111152436>
- Mehrgou, A., Ebadollahi, S., Seidi, K., Ayoubi-Joshaghani, M. H., Ahmadiyeh Yazdi, A., Zare, P., Jaymand, M., & Jahanban-Esfahlan, R. (2021). Roles of miRNAs in Colorectal Cancer: Therapeutic Implications and Clinical Opportunities. *Adv Pharm Bull*, 11(2), 233-247. <https://doi.org/10.34172/apb.2021.029>
- Mehta, A., & Baltimore, D. (2016). MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic (vol 16, pg 279, 2016). *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 401-401. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.65>
- Mehta, P., Lohidasan, S., & Mahadik, K. R. (2017). Pharmacokinetic behaviour of clinically important TCM prescriptions. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 17(3), 171-188. <https://doi.org/10.1007/s13596-017-0281-y>
- Mehta, P., Shah, R., Lohidasan, S., & Mahadik, K. R. (2015). Pharmacokinetic profile of phytoconstituent(s) isolated from medicinal plants-A comprehensive review. *J Tradit Complement Med*, 5(4), 207-227. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.041>
- Meng, J., Song, X. Y., Yan, G. L., Wang, H. H., Li, H. T., & Lou, D. F. (2021). Dendrobine suppresses endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through upregulating microRNA miR-381-3p to decrease caspase-4. *Bioengineered*, 12(1), 4452-4463. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1956672>
- Meng, X. M., & Fu, R. (2018). miR-206 regulates 5-FU resistance by targeting Bcl-2 in colon cancer cells. *Oncotargets and Therapy*, 11, 1757-1765. <https://doi.org/10.2147/Ott.S159093>
- Menon, A., Abd-Aziz, N., Khalid, K., Poh, C. L., & Naidu, R. (2022). miRNA: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Int J Mol Sci*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911502>
- Meschini, S., Calcabrini, A., Monti, E., Del Bufalo, D., Stringaro, A., Dolfini, E., & Arancia, G. (2000). Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells. *International Journal of Cancer*, 87(5), 615-628. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20000901\)87:5<615::Aid-Ijc1>3.3.Co;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20000901)87:5<615::Aid-Ijc1>3.3.Co;2-W)
- Messersmith, W. A. (2019). NCCN Guidelines Updates: Management of Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 17(5.5), 599-601. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2019.5014>
- Mirzaei, S., Gholami, M. H., Hashemi, F., Zabolian, A., Farahani, M. V., Hushmandi, K., Zarrabi, A., Goldman, A., Ashrafizadeh, M., & Orive, G. (2022). Advances in understanding the role of P-gp in doxorubicin resistance: Molecular pathways, therapeutic strategies, and prospects. *Drug Discovery Today*, 27(2), 436-455. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.09.020>
- Miwa, M., Ura, M., Nishida, M., Sawada, N., Ishikawa, T., Mori, K., Shimma, N., Umeda, I., & Ishitsuka, H. (1998). Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes

- concentrated in human liver and cancer tissue. *European Journal of Cancer*, 34(8), 1274-1281. [https://doi.org/Doi 10.1016/S0959-8049\(98\)00058-6](https://doi.org/Doi%2010.1016/S0959-8049(98)00058-6)
- Miyazaki, S., Yamamoto, H., Miyoshi, N., Wu, X., Ogawa, H., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Konno, M., Doki, Y., Mori, M., & Ishii, H. (2015). A Cancer Reprogramming Method Using MicroRNAs as a Novel Therapeutic Approach against Colon Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 22, S1394-S1401. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-4217-1>
- Mohammadian, M., Zeynali, S., Azarbaijani, A. F., Khadem Ansari, M. H., & Kheradmand, F. (2017). Cytotoxic effects of the newly-developed chemotherapeutic agents 17-AAG in combination with oxaliplatin and capecitabine in colorectal cancer cell lines. *Res Pharm Sci*, 12(6), 517-525. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.217432>
- Mohan, S., Abdelwahab, S. I., Kamalidehghan, B., Syam, S., May, K. S., Harmal, N. S., Shafifiyaz, N., Hadi, A. H., Hashim, N. M., Rahmani, M., Taha, M. M., Cheah, S. C., & Zajmi, A. (2012). Involvement of NF-kappaB and Bcl2/Bax signaling pathways in the apoptosis of MCF7 cells induced by a xanthone compound Pyranocycloartobiloxanthone A. *Phytomedicine*, 19(11), 1007-1015. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.05.012>
- Mollazadeh, S., Sahebkar, A., Hadizadeh, F., Behravan, J., & Arabzadeh, S. (2018). Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors. *Life Sciences*, 214, 118-123. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.048>
- Mueller, B. U., Seipel, K., Bacher, U., & Pabst, T. (2018). Autologous Transplantation for Older Adults with AML. *Cancers (Basel)*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/cancers10090340>
- Munteanu, I., & Mastalier, B. (2014). Genetics of colorectal cancer. *J Med Life*, 7(4), 507-511. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25713610>
- Murtaza, I., Adhami, V. M., Hafeez, B. B., Saleem, M., & Mukhtar, H. (2009). Fisetin, a natural flavonoid, targets chemoresistant human pancreatic cancer AsPC-1 cells through DR3-mediated inhibition of NF-kappaB. *Int J Cancer*, 125(10), 2465-2473. <https://doi.org/10.1002/ijc.24628>
- National Institutes of Health, (2023). Capecitabine structure (3D conformer). National Library of Medicine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60953>
- National Institutes of Health, (2023). Fisetin 2D Chemical Structure Depiction and 3D conformer) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fisetin>)
- Nehls, O., Okech, T., Hsieh, C. J., Enzinger, T., Sarbia, M., Borchard, F., Gruenagel, H. H., Gaco, V., Hass, H. G., Arkenau, H. T., Hartmann, J. T., Porschen, R., Gregor, M., & Klump, B. (2007). Studies on p53, BAX and Bcl-2 protein expression and microsatellite instability in stage III (UICC) colon cancer treated by adjuvant chemotherapy: major prognostic impact of proapoptotic BAX. *Br J Cancer*, 96(9), 1409-1418. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603728>
- Ni, K., Wang, D., Xu, H., Mei, F., Wu, C., Liu, Z., & Zhou, B. (2019). miR-21 promotes non-small cell lung cancer cells growth by regulating fatty acid metabolism. *Cancer Cell Int*, 19, 219. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0941-8>
- Nicum, S., Midgley, R., & Kerr, D. J. (2000). Chemotherapy for colorectal cancer. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 93(8), 416-419. [https://doi.org/Doi 10.1177/014107680009300807](https://doi.org/Doi%2010.1177/014107680009300807)
- Nishimura, J., Handa, R., Yamamoto, H., Tanaka, F., Shibata, K., Mimori, K., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikeda, M., Sekimoto, M., Ishii, H., Doki, Y., & Mori, M. (2012). microRNA-181a is associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Oncology Reports*, 28(6), 2221-2226. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2059>
- Nixon, N. A., Blais, N., Ernst, S., Kollmannsberger, C., Bebb, G., Butler, M., Smylie, M., & Verma, S. (2018). Current landscape of immunotherapy in the treatment of solid

- tumours, with future opportunities and challenges. *Curr Oncol*, 25(5), e373-e384. <https://doi.org/10.3747/co.25.3840>
- Nowak, M. A., Komarova, N. L., Sengupta, A., Jallepalli, P. V., Shih Ie, M., Vogelstein, B., & Lengauer, C. (2002). The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(25), 16226-16231. <https://doi.org/10.1073/pnas.202617399>
- O'Brien, M. A., & 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. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2008.00363.x>
- O'Donnell, M. R., Tallman, M. S., Abboud, C. N., Altman, J. K., Appelbaum, F. R., Arber, D. A., Bhatt, V., Bixby, D., Blum, W., Coutre, S. E., De Lima, M., Fathi, A. T., Fiorella, M., Foran, J. M., Gore, S. D., Hall, A. C., Kropf, P., Lancet, J., Maness, L. J., . . . Ogburn, N. (2017). Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, 15(7), 926-957. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0116>
- Osaka, A., Hasegawa, H., Tsuruda, K., Inokuchi, N., Yanagihara, K., Yamada, Y., Aoyama, M., Sawada, T., & Kamihira, S. (2009). Serum cytochrome c to indicate the extent of ongoing tumor cell death. *International Journal of Laboratory Hematology*, 31(3), 307-314. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2008.01033.x>
- Overman, M. J., McDermott, R., Leach, J. L., Lonardi, S., Lenz, H. J., Morse, M. A., Desai, J., Hill, A., Axelson, M., Moss, R. A., Goldberg, M. V., Cao, Z. A., Ledezne, J. M., Maglinte, G. A., Kopetz, S., & Andre, T. (2017). Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncology*, 18(9), 1182-1191. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30422-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30422-9)
- Özgün, A., Karagoz, B., Bilgi, O., Tuncel, T., Baloglu, H., & Kandemir, E. G. (2013). MicroRNA-21 as an Indicator of Aggressive Phenotype in Breast Cancer. *Onkologie*, 36(3), 115-118. <https://doi.org/10.1159/000348678>
- Padanilam, B. J. (2003). Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284(4), F608-627. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00284.2002>
- Pagotto, S., Colorito, M. L., Nicotra, A., Apuzzo, T., Tinari, N., Protasi, F., Stassi, G., Visone, R., Di Franco, S., & Veronese, A. (2022). A perspective analysis: microRNAs, glucose metabolism, and drug resistance in colon cancer stem cells. *Cancer Gene Therapy*, 29(1), 4-9. <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00298-5>
- Pal, H. C., Sharma, S., Strickland, L. R., Katiyar, S. K., Ballesteras, M. E., Athar, M., Elmets, C. A., & Afaq, F. (2014). Fisetin Inhibits Human Melanoma Cell Invasion through Promotion of Mesenchymal to Epithelial Transition and by Targeting MAPK and NFκB Signaling Pathways. *PLoS One*, 9(1). <https://doi.org/ARTN e8633810.1371/journal.pone.0086338>
- Pallante, P., Visone, R., Ferracin, M., Ferraro, A., Berlingieri, M. T., Troncone, G., Chiappetta, G., Liu, C. G., Santoro, M., Negrini, M., Croce, C. M., & Fusco, A. (2006). MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocrine-Related Cancer*, 13(2), 497-508. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01209>
- Pan, Y. Z., Gao, W., & Yu, A. M. (2009). MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting. *Drug Metab Dispos*, 37(10), 2112-2117. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.027680>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/ARTN e4710.1017/jns.2016.41>
- Pancione, M., Remo, A., & Colantuoni, V. (2012). Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Patholog Res Int*, 2012, 509348. <https://doi.org/10.1155/2012/509348>

- Park, C. H., Han, D. S., Oh, Y. H., Lee, A. R., Lee, Y. R., & Eun, C. S. (2016). Role of Fusobacteria in the serrated pathway of colorectal carcinogenesis. *Sci Rep*, 6, 25271. <https://doi.org/10.1038/srep25271>
- Park, H. H., Lee, S., Son, H. Y., Park, S. B., Kim, M. S., Choi, E. J., Singh, T. S. K., Ha, J. H., Lee, M. G., Kim, J. E., Hynn, M. C., Kwon, T. K., Kim, Y. H., & Kim, S. H. (2008). Flavonoids Inhibit Histamine Release and Expression of Proinflammatory Cytokines in Mast Cells. *Archives of Pharmacal Research*, 31(10), 1303-1311. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-2110-5>
- Parrish, A. B., Freel, C. D., & Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008672>
- Pavlikova, L., Seres, M., Breier, A., & Sulova, Z. (2022). The Roles of microRNAs in Cancer Multidrug Resistance. *Cancers (Basel)*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/cancers14041090>
- Perl, M., Chung, C. S., & Ayala, A. (2005). Apoptosis. *Crit Care Med*, 33(12 Suppl), S526-529. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000185499.28006.4c>
- Petrelli, N., Douglass, H. O., Jr., Herrera, L., Russell, D., Stablein, D. M., Bruckner, H. W., Mayer, R. J., Schinella, R., Green, M. D., Muggia, F. M., & et al. (1989). The modulation of fluorouracil with leucovorin in metastatic colorectal carcinoma: a prospective randomized phase III trial. Gastrointestinal Tumor Study Group. *J Clin Oncol*, 7(10), 1419-1426. <https://doi.org/10.1200/JCO.1989.7.10.1419>
- Petrelli, N., Herrera, L., Rustum, Y., Burke, P., Creaven, P., Stulc, J., Emrich, L. J., & Mittelman, A. (1987). A Prospective Randomized Trial of 5-Fluorouracil Versus 5-Fluorouracil and High-Dose Leucovorin Versus 5-Fluorouracil and Methotrexate in Previously Untreated Patients with Advanced Colorectal-Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 5(10), 1559-1565. <https://doi.org/Doi 10.1200/Jco.1987.5.10.1559>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Ping, P. H., Bo, T. F., Li, L., Hui, Y. N., & Hong, Z. (2016). IL-1 β /NF-kb signaling promotes colorectal cancer cell growth through miR-181a/PTEN axis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 604, 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.06.001>
- Poon, M. A., Oconnell, M. J., Moertel, C. G., Wieand, H. S., Cullinan, S. A., Everson, L. K., Krook, J. E., Mailliard, J. A., Laurie, J. A., Tschetter, L. K., & Wiesenfeld, M. (1989). Biochemical Modulation of Fluorouracil - Evidence of Significant Improvement of Survival and Quality of Life in Patients with Advanced Colorectal-Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 7(10), 1407-1418. <https://doi.org/Doi 10.1200/Jco.1989.7.10.1407>
- Pouya, F. D., Gazouli, M., Rasmi, Y., Lampropoulou, D. I., & Nemati, M. (2022). MicroRNAs and drug resistance in colorectal cancer with special focus on 5-fluorouracil. *Mol Biol Rep*, 49(6), 5165-5178. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07227-1>
- Power, C., Fanning, N., & Redmond, H. P. (2002). Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: A review. *Shock*, 18(3), 197-211. <https://doi.org/Doi 10.1097/00024382-200209000-00001>
- Pritchard, C. C., & Grady, W. M. (2011). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*, 60(1), 116-129. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.206250>
- Qaed, E., Al-Hamyari, B., Al-Maamari, A., Qaid, A., Alademy, H., Almoiliqy, M., Munyemana, J. C., Al-Nusaif, M., Alafifi, J., Alyafeai, E., Safi, M., Geng, Z., Tang, Z., & Ma, X. (2023). Fisetin's Promising Antitumor Effects: Uncovering Mechanisms and Targeting for Future Therapies. *Glob Med Genet*, 10(3), 205-220. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1772219>

- Quinn, L. A., Moore, G. E., Morgan, R. T., & Woods, L. K. (1979). Cell-Lines from Human-Colon Carcinoma with Unusual Cell Products, Double Minutes, and Homogeneously Staining Regions. *Cancer Research*, 39(12), 4914-4924. <Go to ISI>://WOS:A1979HV86600024
- Raedler, L. A. (2016). Lonsurf (Trifluridine plus Tipiracil): A New Oral Treatment Approved for Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Am Health Drug Benefits*, 9(Spec Feature), 97-100. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27668054>
- Raisova, M., Hossini, A. M., Eberle, J., Riebeling, C., Wieder, T., Sturm, I., Daniel, P. T., Orfanos, C. E., & Geilen, C. C. (2001). The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol*, 117(2), 333-340. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01409.x>
- Ramos, S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem*, 18(7), 427-442. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.11.004>
- Rana, R., Huirem, R. S., Kant, R., Chauhan, K., Sharma, S., Yashavarddhan, M. H., Chhabra, S. S., Acharya, R., Kalra, S. K., Gupta, A., Jain, S., & Ganguly, N. K. (2022). Cytochrome C as a potential clinical marker for diagnosis and treatment of glioma. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/ARTN 96078710.3389/fonc.2022.960787>
- Rao, L., Perez, D., & White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 135(6), 1441-1455. <https://doi.org/DOI 10.1083/jcb.135.6.1441>
- Rashmi, R., Kumar, S., & Karunakaran, D. (2005). Human colon cancer cells lacking Bax resist curcumin-induced apoptosis and Bax requirement is dispensable with ectopic expression of Smac or downregulation of Bcl-XL. *Carcinogenesis*, 26(4), 713-723. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi025>
- Ravaioli, M., Cucchetti, A., Pinna, A. D., De Pace, V., Neri, F., Barbera, M. A., Maroni, L., Frega, G., Palloni, A., De Lorenzo, S., Ripoli, M. C., Pantaleo, M. A., Cescon, M., Del Gaudio, M., & Brandi, G. (2017). The role of metronomic capecitabine for treatment of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/ARTN 1130510.1038/s41598-017-11810-z>
- Reidy, E., Leonard, N. A., Treacy, O., & Ryan, A. E. (2021). A 3D View of Colorectal Cancer Models in Predicting Therapeutic Responses and Resistance. *Cancers (Basel)*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/cancers13020227>
- Reigner, B., Blesch, K., & Weidekamm, E. (2001). Clinical pharmacokinetics of capecitabine. *Clinical Pharmacokinetics*, 40(2), 85-104. <https://doi.org/Doi 10.2165/00003088-200140020-00002>
- Renault, T. T., Floros, K. V., & Chipuk, J. E. (2013). BAK/BAX activation and cytochrome c release assays using isolated mitochondria. *Methods*, 61(2), 146-155. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.03.030>
- Renz, A., Berdel, W. E., Kreuter, M., Belka, C., Schulze-Osthoff, K., & Los, M. (2001). Rapid extracellular release of cytochrome c is specific for apoptosis and marks cell death in vivo. *Blood*, 98(5), 1542-1548. <https://doi.org/DOI 10.1182/blood.V98.5.1542>
- Ricafrente, A., Nguyen, H., Tran, N., & Donnelly, S. (2021). An Evaluation of the miRnome Predicts a Targeted Regulation of Mammalian Innate Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/ARTN 60868610.3389/fimmu.2020.608686>
- Roberto, M., Rossi, A., Panebianco, M., Pomes, L. M., Arrivi, G., Ierino, D., Simmaco, M., Marchetti, P., & Mazzuca, F. (2021). Drug-Drug Interactions and Pharmacogenomic Evaluation in Colorectal Cancer Patients: The New Drug-PIN((R)) System Comprehensive Approach. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/ph14010067>

- Robertson, J. D., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2000). Nuclear events in apoptosis. *Journal of Structural Biology*, 129(2-3), 346-358. <https://doi.org/DOI 10.1006/jsbi.2000.4254>
- Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C., & Gaforio, J. J. (2019). Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies. *Antioxidants*, 8(5). <https://doi.org/ARTN 13710.3390/antiox8050137>
- Rothschild, S. I., Tschan, M. P., Jaggi, R., Fey, M. F., Gugger, M., & Gautschi, O. (2012). MicroRNA-381 Represses ID1 and is Deregulated in Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(7), 1069-1077. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31824fe976>
- Rui, X., Gu, T. T., Pan, H. F., Shao, S. L., & Shao, H. X. (2019). MicroRNA-381 suppresses proliferation and invasion of prostate cancer cells through downregulation of the androgen receptor. *Oncology Letters*, 18(2), 2066-2072. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10471>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*, 234(5), 5451-5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Salonga, D., Danenberg, K. D., Johnson, M., Metzger, R., Groshen, S., Tsao-Wei, D. D., Lenz, H. J., Leichman, C. G., Leichman, L., Diasio, R. B., & Danenberg, P. V. (2000). Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clinical Cancer Research*, 6(4), 1322-1327. <Go to ISI>://WOS:000086633500016
- Saltz, L. B., Cox, J. V., Blanke, C., Rosen, L. S., Fehrenbacher, L., Moore, M. J., Maroun, J. A., Ackland, S. P., Locker, P. K., Pirotta, N., Elfring, G. L., & Miller, L. L. (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med*, 343(13), 905-914. <https://doi.org/10.1056/NEJM200009283431302>
- Saltz, L. B., Niedzwiecki, D., Hollis, D., Goldberg, R. M., Hantel, A., Thomas, J. P., Fields, A. L. A., & Mayer, R. J. (2007). Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: Results of CALGB 89803. *Journal of Clinical Oncology*, 25(23), 3456-3461. <https://doi.org/10.1200/Jco.2007.11.2144>
- Sancho, E., Batlle, E., & Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol*, 15(6), 763-770. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.012>
- Sansom, O. J., Reed, K. R., Hayes, A. J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I. P., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I. S., Clarke, A. R., & Winton, D. J. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev*, 18(12), 1385-1390. <https://doi.org/10.1101/gad.287404>
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B., & Fesik, S. W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 275(5302), 983-986. <https://doi.org/10.1126/science.275.5302.983>
- Schetter, A. J., Leung, S. Y., Sohn, J. J., Zanetti, K. A., Bowman, E. D., Yanaihara, N., Yuen, S. T., Chan, T. L., Kwong, D. L., Au, G. K., Liu, C. G., Calin, G. A., Croce, C. M., & Harris, C. C. (2008). MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*, 299(4), 425-436. <https://doi.org/10.1001/jama.299.4.425>
- Schmoll, H. J., & Arnold, D. (2006). Update on capecitabine in colorectal cancer. *Oncologist*, 11(9), 1003-1009. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-9-1003>
- Schmoll, H. J., Stein, A., Van Cutsem, E., Price, T., Hofheinz, R. D., Nordlinger, B., Daisne, J. F., Janssens, J., Brenner, B., Reinel, H., Hollerbach, S., Caca, K., Fauth, F., Hannig, C.

- V., Zalcborg, J., Tebbutt, N., Mauer, M. E., Marreaud, S., Lutz, M. P., & Haustermans, K. (2021). Pre- and Postoperative Capecitabine Without or With Oxaliplatin in Locally Advanced Rectal Cancer: PETACC 6 Trial by EORTC GITCG and ROG, AIO, AGITG, BGDO, and FFCD. *Journal of Clinical Oncology*, 39(1), 17-+. <https://doi.org/10.1200/Jco.20.01740>
- Schüller, J., Cassidy, J., Dumont, E., Roos, B., Durston, S., Banken, L., Utoh, M., Mori, K., Weidekamm, E., & Reigner, B. (2000). Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 45(4), 291-297. <https://doi.org/DOI.10.1007/s002800050043>
- Seelig, A. (2020). P-Glycoprotein: One Mechanism, Many Tasks and the Consequences for Pharmacotherapy of Cancers. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/ARTN.57655910.3389/fonc.2020.576559>
- Sengupta, B., Banerjee, A., & Sengupta, P. K. (2005). Interactions of the plant flavonoid fisetin with macromolecular targets: insights from fluorescence spectroscopic studies. *J Photochem Photobiol B*, 80(2), 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.03.005>
- Sha, H. H., Gan, Y. J., Xu, F., Zhu, Y., Zou, R. R., Peng, W. W., Wu, Z. Y., Ma, R., Wu, J. Z., & Feng, J. F. (2022). MicroRNA-381 in human cancer: Its involvement in tumour biology and clinical applications potential. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(4), 977-989. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17161>
- Shang, A., Wang, W., Gu, C., Chen, W., Lu, W., Sun, Z., & Li, D. (2020). Long non-coding RNA CCAT1 promotes colorectal cancer progression by regulating miR-181a-5p expression. *Aging (Albany NY)*, 12(9), 8301-8320. <https://doi.org/10.18632/aging.103139>
- Shang, A., Zhou, C., Bian, G., Chen, W., Lu, W., Wang, W., & Li, D. (2019). miR-381-3p restrains cervical cancer progression by downregulating FGF7. *J Cell Biochem*, 120(1), 778-789. <https://doi.org/10.1002/jcb.27438>
- Shang, R., Lee, S., Senavirathne, G., & Lai, E. C. (2023). microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet*, 24(12), 816-833. <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00611-y>
- Shang, R. F., Zhang, F. J., Xu, B. Y., Xi, H. R., Zhang, X., Wang, W. H., & Wu, L. G. (2015). Ribozyme-enhanced single-stranded Ago2-processed interfering RNA triggers efficient gene silencing with fewer off-target effects. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/ARTN.843010.1038/ncomms9430>
- Shao, M., Jiang, C., Yu, C., Jia, H., Wang, Y., & Mao, X. (2022). Capecitabine inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and proliferation of colorectal cancer cells by mediating the RANK/RANKL pathway. *Oncol Lett*, 23(3), 96. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13216>
- Sharifi-Azad, M., Fathi, M., Cho, W. C., Barzegari, A., Dadashi, H., Dadashpour, M., & Jahanban-Esfahlan, R. (2022). Recent advances in targeted drug delivery systems for resistant colorectal cancer. *Cancer Cell Int*, 22(1), 196. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02605-y>
- Sharma, M., Vadhariya, A., Chikermane, S., Gopinathan, S., Chavez-MacGregor, M., Giordano, S. H., Johnson, M. L., & Holmes, H. M. (2019). Clinical Outcomes Associated with Drug-Drug Interactions of Oral Chemotherapeutic Agents: A Comprehensive Evidence-Based Literature Review. *Drugs Aging*, 36(4), 341-354. <https://doi.org/10.1007/s40266-019-00640-5>
- Shi, L., Cheng, Z. H., Zhang, J. X., Li, R., Zhao, P., Fu, Z., & You, Y. P. (2008). hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Research*, 1236, 185-193. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.085>
- Shia, C. S., Tsai, S. Y., Kuo, S. C., Hou, Y. C., & Chao, P. D. L. (2009). Metabolism and Pharmacokinetics of 3,3',4',7-Tetrahydroxyflavone (Fisetin), 5-Hydroxyflavone, and 7-

- Hydroxyflavone and Antihemolysis Effects of Fisetin and Its Serum Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1), 83-89. <https://doi.org/10.1021/jf802378q>
- Shibata, D., Peinado, M. A., Ionov, Y., Malkhosyan, S., & Perucho, M. (1994). Genomic Instability in Repeated Sequences Is an Early Somatic Event in Colorectal Tumorigenesis That Persists after Transformation. *Nature Genetics*, 6(3), 273-281. <https://doi.org/DOI 10.1038/ng0394-273>
- Shimada, Y., Rougier, P., & Pitot, H. (1996). Efficacy of CPT-11 (irinotecan) as a single agent in metastatic colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 32a, S13-S17. [https://doi.org/Doi 10.1016/0959-8049\(96\)00292-4](https://doi.org/Doi 10.1016/0959-8049(96)00292-4)
- Showalter, S. L., Showalter, T. N., Witkiewicz, A., Havens, R., Kennedy, E. P., Hucl, T., Kern, S. E., Yeo, C. J., & Brody, J. R. (2008). Evaluating the drug-target relationship between thymidylate synthase expression and tumor response to 5-fluorouracil. *Cancer Biology & Therapy*, 7(7), 986-994. <https://doi.org/DOI 10.4161/cbt.7.7.6181>
- Si, M. L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., & Mo, Y. Y. (2007). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, 26(19), 2799-2803. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210083>
- Sicard, F., Gayral, M., Lulka, H., Buscail, L., & Cordelier, P. (2013). Targeting miR-21 for the Therapy of Pancreatic Cancer. *Molecular Therapy*, 21(5), 986-994. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.35>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Ahnen, D. J., Meester, R. G. S., Barzi, A., & Jemal, A. (2017). Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, 67(3), 177-193. <https://doi.org/10.3322/caac.21395>
- Siegel, R. L., Wagle, N. S., Cercek, A., Smith, R. A., & Jemal, A. (2023). *Colorectal cancer statistics, 2023* (Publication Number 3) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36856579>
- Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Bastos, M. D., & Remiao, F. (2015). Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics*, 149, 1-123. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.013>
- Sim, J. J., Park, M. H., Baek, J. H., Lee, H., Jeong, K. Y., & Kim, H. M. (2018). Investigation into Enhancing Capecitabine Efficacy in Colorectal Cancer by Inhibiting Focal Adhesion Kinase Signaling. *Anticancer Research*, 38(8), 4667-4676. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12772>
- Sinicrope, F. A., & Sargent, D. J. (2012). Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*, 18(6), 1506-1512. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1469>
- Slee, E. A., Adrain, C., & Martin, S. J. (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6(11), 1067-1074. <https://doi.org/DOI 10.1038/sj.cdd.4400601>
- Slika, H., Mansour, H., Wehbe, N., Nasser, S. A., Iratni, R., Nasrallah, G., Shaito, A., Ghaddar, T., Kobeissy, F., & Eid, A. H. (2022). Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112442. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112442>
- Smith, M. L., Murphy, K., Doucette, C. D., Greenshields, A. L., & Hoskin, D. W. (2016). The Dietary Flavonoid Fisetin Causes Cell Cycle Arrest, Caspase-Dependent Apoptosis, and Enhanced Cytotoxicity of Chemotherapeutic Drugs in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *J Cell Biochem*, 117(8), 1913-1925. <https://doi.org/10.1002/jcb.25490>
- Smyth, G. (2005). "Limma: linear models for microarray data" Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor. *Springer: New York*, 397-420, .

- Souglakos, J., Androulakis, N., Syrigos, K., Polyzos, A., Ziras, N., Athanasiadis, A., Kakolyris, S., Tsousis, S., Kouroussis, C., Vamvakas, L., Kalykaki, A., Samonis, G., Mavroudis, D., & Georgoulis, V. (2006). FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC):: a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *British Journal of Cancer*, 94(6), 798-805. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603011>
- Spoelstra, E. C., Dekker, H., Schuurhuis, G. J., Broxterman, H. J., & Lankelma, J. (1991). P-Glycoprotein Drug Efflux Pump Involved in the Mechanisms of Intrinsic Drug-Resistance in Various Colon Cancer Cell-Lines - Evidence for a Saturation of Active Daunorubicin Transport. *Biochemical Pharmacology*, 41(3), 349-359. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90531-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90531-9)
- Stang, A., Weilert, H., Lipp, M. J., Oldhafer, K. J., Hoheisel, J. D., Zhang, C. Y., & Bauer, A. S. (2021). MicroRNAs in blood act as biomarkers of colorectal cancer and indicate potential therapeutic targets. *Molecular Oncology*, 15(9), 2480-2490. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13065>
- Stepney, R., Lichtman, S. M., & Danesi, R. (2016). Drug-drug interactions in older patients with cancer: a report from the 15th Conference of the International Society of Geriatric Oncology, Prague, Czech Republic, November 2015. *Ecancermedicalscience*, 10. <https://doi.org/ARTN 61110.3332/ecancer.2016.611>
- Strotbek, M., Schmid, S., Sanchez-Gonzalez, I., Boerries, M., Busch, H., & Olayioye, M. A. (2017). miR-181 elevates Akt signaling by co-targeting PHLPP2 and INPP4B phosphatases in luminal breast cancer. *Int J Cancer*, 140(10), 2310-2320. <https://doi.org/10.1002/ijc.30661>
- Sturm, I., Köhne, C. H., Wolff, G., Petrowsky, H., Hillebrand, T., Hauptmann, S., Lorenz, M., Dörken, B., & Daniel, P. T. (1999). Analysis of the / pathway in colorectal cancer:: Low is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *Journal of Clinical Oncology*, 17(5), 1364-1374. <https://doi.org/10.1200/Jco.1999.17.5.1364>
- Su, Y., Yuan, J., Zhang, F., Lei, Q., Zhang, T., Li, K., Guo, J., Hong, Y., Bu, G., Lv, X., Liang, S., Ou, J., Zhou, J., Luo, B., & Shang, J. (2019). MicroRNA-181a-5p and microRNA-181a-3p cooperatively restrict vascular inflammation and atherosclerosis. *Cell Death & Disease*, 10(5), 365. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1599-9>
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget*, 6(11), 8474-8490. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3523>
- Suh, Y., Afaq, F., Johnson, J. J., & Mukhtar, H. (2009). A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-kappaB-signaling pathways. *Carcinogenesis*, 30(2), 300-307. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn269>
- Sun, C., Shen, C., Zhang, Y., & Hu, C. (2021). LncRNA ANRIL negatively regulated chitooligosaccharide-induced radiosensitivity in colon cancer cells by sponging miR-181a-5p. *Adv Clin Exp Med*, 30(1), 55-65. <https://doi.org/10.17219/acem/128370>
- Sun, L. H., Tian, D., Yang, Z. C., & Li, J. L. (2020). Exosomal miR-21 promotes proliferation, invasion and therapy resistance of colon adenocarcinoma cells through its target PDCD4. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/ARTN 827110.1038/s41598-020-65207-6>
- Sun, X. R., Xu, B. Y., Xue, Y. C., Li, H. L., Zhang, H. R., Zhang, Y. Y., Kang, L. Y., Zhang, X. L., Zhang, J. P., Jia, Z. F., & Zhang, X. (2017). Characterization and structure-activity relationship of natural flavonoids as hERG K channel modulators. *International Immunopharmacology*, 45, 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.02.012>

- Svoronos, A. A., Engelman, D. M., & Slack, F. J. (2016). OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res*, 76(13), 3666-3670. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0359>
- Syed, D. N., Suh, Y., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2008). Dietary agents for chemoprevention of prostate cancer. *Cancer Lett*, 265(2), 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.050>
- Szakacs, G., Annereau, J. P., Lababidi, S., Shankavaram, U., Arciello, A., Bussey, K. J., Reinhold, W., Guo, Y., Kruh, G. D., Reimers, M., Weinstein, J. N., & Gottesman, M. M. (2004). Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell*, 6(2), 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.026>
- Szliszka, E., & Krol, W. (2011). The role of dietary polyphenols in tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis for cancer chemoprevention. *Eur J Cancer Prev*, 20(1), 63-69. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e32833ecc48>
- Tabas, I., & Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology*, 13(3), 184-190. <https://doi.org/10.1038/ncb0311-184>
- Tang, W. M., Zhou, W. J., Xiang, L., Wu, X. S., Zhang, P., Wang, J., Liu, G. N., Zhang, W. J., Peng, Y., Huang, X. T., Cai, J. Q., Bai, Y., Bai, L., Zhu, W., Gu, H. X., Xiong, J., Ye, C., Li, A. M., Liu, S. D., & Wang, J. D. (2019). The p300/YY1/miR-500a-5p/HDAC2 signalling axis regulates cell proliferation in human colorectal cancer. *Nature Communications*, 10. <https://doi.org/ARTN 66310.1038/s41467-018-08225-3>
- Tannenbaum, C., & Sheehan, N. L. (2014). Understanding and preventing drug-drug and drug-gene interactions. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 7(4), 533-544. <https://doi.org/10.1586/17512433.2014.910111>
- Terahara, N. (2015). Flavonoids in Foods: A Review. *Natural Product Communications*, 10(3), 521-528. <Go to ISI>://WOS:000352177700036
- Tian, C. Y., Li, J., Ren, L. L., Peng, R., Chen, B. B., & Lin, Y. M. (2017). MicroRNA-381 serves as a prognostic factor and inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer by targeting LRH-1. *Oncology Reports*, 38(5), 3071-3077. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5956>
- Tian, J., Shen, R., Yan, Y. Z., & Deng, L. H. (2018). miR-186 promotes tumor growth in cutaneous squamous cell carcinoma by inhibiting apoptotic protease activating factor-1. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(5), 4010-4018. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6679>
- Tian, W. Y., Pang, X. Q., & Luan, F. J. (2022). Diagnosis value of miR-181, miR-652, and CA72-4 for gastric cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(6). <https://doi.org/ARTN e2441110.1002/jcla.24411>
- Tian, Y., Lei, Y., Wang, Y., Lai, J., Wang, J., & Xia, F. (2023). Mechanism of multidrug resistance to chemotherapy mediated by P-glycoprotein (Review). *Int J Oncol*, 63(5). <https://doi.org/10.3892/ijo.2023.5567>
- Tibbetts, L. M., Chu, M. Y., Hager, J. C., Dexter, D. L., & Calabresi, P. (1977). Chemotherapy of Cell-Line-Derived Human Colon Carcinomas in Mice Immunosuppressed with Antithymocyte-Serum. *Cancer*, 40(5), 2651-2659. [https://doi.org/Doi 10.1002/1097-0142\(197711\)40:5+<2651::Aid-Cncr2820400939>3.0.Co;2-V](https://doi.org/Doi 10.1002/1097-0142(197711)40:5+<2651::Aid-Cncr2820400939>3.0.Co;2-V)
- Toden, S., Zumwalt, T. J., & Goel, A. (2021). Non-coding RNAs and potential therapeutic targeting in cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1875(1), 188491. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188491>
- Tong, S. J., Liu, J., Wang, X., & Qu, L. X. (2014). microRNA-181 promotes prostate cancer cell proliferation by regulating DAX-1 expression. *Exp Ther Med*, 8(4), 1296-1300. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1846>

- Tong, Z., Cui, Q. H., Wang, J., & Zhou, Y. (2019). TransmiR v2.0: an updated transcription factor-microRNA regulation database. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D253-D258. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1023>
- Tong, Z. G., Liu, N., Lin, L. Q., Guo, X. G., Yang, D. D., & Zhang, Q. F. (2015). miR-125a-5p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in colon cancer via targeting BCL2, BCL2L1 and MCL1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 75, 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.036>
- Tormo, E., Ballester, S., Adam-Artigues, A., Burgues, O., Alonso, E., Bermejo, B., Menendez, S., Zazo, S., Madoz-Gurpide, J., Rovira, A., Albanell, J., Rojo, F., Lluch, A., & Eroles, P. (2019). The miRNA-449 family mediates doxorubicin resistance in triple-negative breast cancer by regulating cell cycle factors. *Scientific Reports*, 9. <https://doi.org/ARTN 531610.1038/s41598-019-41472-y>
- Touil, Y. S., Auzeil, N., Boulinguez, F., Saighi, H., Regazzetti, A., Scherman, D., & Chabot, G. G. (2011). Fisetin disposition and metabolism in mice: Identification of geraldol as an active metabolite. *Biochemical Pharmacology*, 82(11), 1731-1739. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.097>
- Trevisani, F., Brandi, G., Garuti, F., Barbera, M. A., Tortora, R., Gardini, A. C., Granito, A., Tovoli, F., De Lorenzo, S., Inghilesi, A. L., Foschi, F. G., Bernardi, M., Marra, F., Sacco, R., & Di Costanzo, G. G. (2018). Metronomic capecitabine as second-line treatment for hepatocellular carcinoma after sorafenib discontinuation. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144(2), 403-414. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2556-6>
- Tsai, C. F., Chen, J. H., Chang, C. N., Lu, D. Y., Chang, P. C., Wang, S. L., & Yeh, W. L. (2018). Fisetin inhibits cell migration via inducing HO-1 and reducing MMPs expression in breast cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 528-535. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.059>
- Tsamandas, A. C., Kardamakis, D., Petsas, T., Zolota, V., Vassiliou, V., Matatsoris, T., Kalofonos, H., Vagianos, C. E., & Scopa, C. D. (2007). Bcl-2, bax and p53 expression in rectal adenocarcinoma. Correlation with classic pathologic prognostic factors and patients' outcome. *In Vivo*, 21(1), 113-118. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17354623>
- Tu, C., Wang, F., & Wan, J. (2018). MicroRNA-381 inhibits cell proliferation and invasion in endometrial carcinoma by targeting the IGF-1R. *Mol Med Rep*, 17(3), 4090-4098. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8288>
- Twelves, C., Wong, A., Nowacki, M. P., Abt, M., Burris, H., Carrato, A., Cassidy, J., Cervantes, A., Fagerberg, J., Georgoulas, V., Hussein, F., Jodrell, D., Koralewski, P., Kröning, H., Maroun, J., Marschner, N., McKendrick, J., Pawlicki, M., Rosso, R., Scheithauer, W. (2005). Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *New England Journal of Medicine*, 352(26), 2696-2704. <https://doi.org/DOI 10.1056/NEJMoa043116>
- Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A. H., & Jaremkow, M. (2020). Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, 25(22). <https://doi.org/ARTN 524310.3390/molecules25225243>
- Van Cutsem, E., Findlay, M., Osterwalder, B., Kocha, W., Dalley, D., Pazdur, R., Cassidy, J., Dirix, L., Twelves, C., Allman, D., Seitz, J. F., Scholmerich, J., Burger, H. U., & Verweij, J. (2000). Capecitabine, an oral fluoropyrimidine carbamate with substantial activity in advanced colorectal cancer: results of a randomized phase II study. *J Clin Oncol*, 18(6), 1337-1345. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.6.1337>
- Van der Jeught, K., Xu, H. C., Li, Y. J., Lu, X. B., & Ji, G. (2018). Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 24(34), 3834-3848. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i34.3834>

- Varisli, B., Caglayan, C., Kandemir, F. M., Gür, C., Ayna, A., Genç, A., & Taysi, S. (2023). Chrysin mitigates diclofenac-induced hepatotoxicity by modulating oxidative stress, apoptosis, autophagy and endoplasmic reticulum stress in rats. *Molecular Biology Reports*, 50(1), 433-442. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07928-7>
- Vasan, N., Baselga, J., & Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299-309. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>
- Vela, L., & Marzo, I. (2015). Bcl-2 family of proteins as drug targets for cancer chemotherapy: the long way of BH3 mimetics from bench to bedside. *Current Opinion in Pharmacology*, 23, 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.014>
- Verbrugge, I., Johnstone, R. W., & Smyth, M. J. (2010). SnapShot: Extrinsic Apoptosis Pathways. *Cell*, 143(7), 1192-+. <https://doi.org/ARTN1192.e110.1016/j.cell.2010.12.004>
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*, 29, 235-271. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>
- Viswanath, B., Kim, S., & Lee, K. (2016). Recent insights into nanotechnology development for detection and treatment of colorectal cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 2491-2504. <https://doi.org/10.2147/Ijn.S108715>
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther*, 206, 107447. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107447>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1998). *The genetic basis of human cancer*. McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Waghray, D., & Zhang, Q. (2018). Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Cancer Treatment. *J Med Chem*, 61(12), 5108-5121. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01457>
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., & Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 9(7), 489-499. <https://doi.org/10.1038/nrc2645>
- Wang, B., Lu, F. Y., Shi, R. H., Feng, Y. D., Zhao, X. D., Lu, Z. P., Xiao, L., Zhou, G. Q., Qiu, J. M., & Cheng, C. E. (2018). MiR-26b regulates 5-FU-resistance in human colorectal cancer via down-regulation of Pgp. *American Journal of Cancer Research*, 8(12), 2518-2527. <Go to ISI>://WOS:000454545200013
- Wang, H., Peng, R., Wang, J. J., Qin, Z. L., & Xue, L. X. (2018). Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. *Clinical Epigenetics*, 10. <https://doi.org/ARTN5910.1186/s13148-018-0492-1>
- Wang, J. J., & Huang, S. X. (2018). Fisetin inhibits the growth and migration in the A549 human lung cancer cell line via the ERK1/2 pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(3), 2667-2673. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5666>
- Wang, K., Shen, R., Meng, T., Hu, F., & Yuan, H. (2022). Nano-Drug Delivery Systems Based on Different Targeting Mechanisms in the Targeted Therapy of Colorectal Cancer. *Molecules*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092981>
- Wang, X., Zhang, H., & Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist*, 2(2), 141-160. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>
- Wen, Q. Q., Zhang, X., Cai, J., & Yang, P. H. (2014). A novel strategy for real-time and detection of cytochrome c and caspase-9 in Hela cells during apoptosis. *Analyst*, 139(10), 2499-2506. <https://doi.org/10.1039/c3an02205f>
- White, B. D., Chien, A. J., & Dawson, D. W. (2012). Dysregulation of Wnt/beta-catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*, 142(2), 219-232. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.001>

- Wu, K. L., Lee, K. C., Yen, C. K., Chen, C. N., Chang, S. F., & Huang, W. S. (2021). Visfatin and Resveratrol Differentially Regulate the Expression of Thymidylate Synthase to Control the Sensitivity of Human Colorectal Cancer Cells to Capecitabine Cytotoxicity. *Life (Basel)*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/life11121371>
- Wu, M. S., Lien, G. S., Shen, S. C., Yang, L. Y., & Chen, Y. C. (2014). N-acetyl-L-cysteine enhances fisetin-induced cytotoxicity via induction of ROS-independent apoptosis in human colonic cancer cells. *Mol Carcinog*, 53 Suppl 1, E119-129. <https://doi.org/10.1002/mc.22053>
- Xi, Y. G., Shalgi, R., Fodstad, O., Pilpel, Y., & Ju, J. F. (2006). Differentially regulated micro-RNAs and actively translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(7), 2014-2024. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-05-1853>
- Xia, B., Li, H., Yang, S., Liu, T., & Lou, G. (2016). MiR-381 inhibits epithelial ovarian cancer malignancy via YY1 suppression. *Tumour Biol*, 37(7), 9157-9167. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4805-8>
- Xiao, Z., Chen, S., Feng, S., Li, Y., Zou, J., Ling, H., Zeng, Y., & Zeng, X. (2020). Function and mechanisms of microRNA-20a in colorectal cancer. *Exp Ther Med*, 19(3), 1605-1616. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8432>
- Xie, T., Huang, M. X., Wang, Y., Wang, L. Y., Chen, C., & Chu, X. Y. (2016). MicroRNAs as Regulators, Biomarkers and Therapeutic Targets in the Drug Resistance of Colorectal Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(1-2), 62-76. <https://doi.org/10.1159/000452525>
- Xie, Y. H., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*, 5(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
- Xie, Y. L., Qi, J., Zhu, C. B., Zhao, D. M., & Liao, G. Q. (2019). MiR-381 functions as a tumor suppressor in gastric cancer by targeting ROCK2. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12(1), 164-172. <Go to ISI>://WOS:000458740400014
- Xin, F. X., Li, M., Balch, C., Thomson, M., Fan, M. Y., Liu, Y., Hammond, S. M., Kim, S., & Nephew, K. P. (2009). Computational analysis of microRNA profiles and their target genes suggests significant involvement in breast cancer antiestrogen resistance. *Bioinformatics*, 25(4), 430-434. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn646>
- Xing, J., Liao, Y., Zhang, H., Zhang, W., Zhang, Z., Zhang, J., Wang, D., & Tang, D. (2022). Impacts of MicroRNAs Induced by the Gut Microbiome on Regulating the Development of Colorectal Cancer. *Front Cell Infect Microbiol*, 12, 804689. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.804689>
- Xuan, Y. W., Liao, M., Zhai, W. L., Peng, L. J., & Tang, Y. (2019). MicroRNA-381 inhibits lung adenocarcinoma cell biological progression by directly targeting LMO3 through regulation of the PI3K/Akt signaling pathway and epithelial-to-mesenchymal transition. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(19), 8411-8421. https://doi.org/10.26355/eurrev_201910_19152
- Yaffee, P., Osipov, A., Tan, C., Tuli, R., & Hendifar, A. (2015). Review of systemic therapies for locally advanced and metastatic rectal cancer. *J Gastrointest Oncol*, 6(2), 185-200. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2014.112>
- Yang, C., Tabatabaei, S. N., Ruan, X. Y., & Hardy, P. (2017). The Dual Regulatory Role of MiR-181a in Breast Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(3), 843-856. <https://doi.org/10.1159/000485351>
- Yang, G., Jiang, O., Ling, D., Jiang, X., Yuan, P., Zeng, G., Zhu, J., Tian, J., Weng, Y., & Wu, D. (2015). MicroRNA-522 reverses drug resistance of doxorubicin-induced HT29 colon cancer cell by targeting ABCB5. *Mol Med Rep*, 12(3), 3930-3936. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3890>

- Yang, J. S., & Lai, E. C. (2011). Alternative miRNA Biogenesis Pathways and the Interpretation of Core miRNA Pathway Mutants. *Molecular Cell*, 43(6), 892-903. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.024>
- Yang, N., Kaur, S., Volinia, S., Greshock, J., Lassus, H., Hasegawa, K., Liang, S., Leminen, A., Deng, S., Smith, L., Johnston, C. N., Chen, X. M., Liu, C. G., Huang, Q. H., Katsaros, D., Calin, G. A., Weber, B. L., Butzow, R., Croce, C. M., . . . Zhang, L. (2008). MicroRNA Microarray Identifies Let-7i as a Novel Biomarker and Therapeutic Target in Human Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 68(24), 10307-10314. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-08-1954>
- Yang, P. M., Tseng, H. H., Peng, C. W., Chen, W. S., & Chiu, S. J. (2012). Dietary flavonoid fisetin targets caspase-3-deficient human breast cancer MCF-7 cells by induction of caspase-7-associated apoptosis and inhibition of autophagy. *International Journal of Oncology*, 40(2), 469-478. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1203>
- Yang, T., Zheng, Z. M., Li, X. N., Li, Z. F., Wang, Y., Geng, Y. F., Bai, L., & Zhang, X. B. (2013). MiR-223 modulates multidrug resistance via downregulation of ABCB1 in hepatocellular carcinoma cells. *Experimental Biology and Medicine*, 238(9), 1024-1032. <https://doi.org/10.1177/1535370213497321>
- Yang, X., Chang, H. Y., & Baltimore, D. (1998). Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell*, 1(2), 319-325. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80032-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80032-5)
- Yang, X., Ruan, H., Hu, X., Cao, A., & Song, L. (2017). miR-381-3p suppresses the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by directly targeting FGFR2. *American Journal of Cancer Research*, 7(4), 913-922. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28469963>
- Yang, Y., Meng, W. J., & Wang, Z. Q. (2022). MicroRNAs (miRNAs): Novel potential therapeutic targets in colorectal cancer. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/ARTN 105484610.3389/fonc.2022.1054846>
- Yang, Z., Wan, X., Gu, Z., Zhang, H., Yang, X., He, L., Miao, R., Zhong, Y., & Zhao, H. (2014). Evolution of the mir-181 microRNA family. *Comput Biol Med*, 52, 82-87. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2014.06.004>
- Yaqoob, A. A., Ahmad, H., Parveen, T., Ahmad, A., Oves, M., Ismail, I. M. I., Qari, H. A., Umar, K., & Ibrahim, M. N. M. (2020). Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/ARTN 34110.3389/fchem.2020.00341>
- Yi, C., Zhang, Y., Yu, Z., Xiao, Y., Wang, J., Qiu, H., Yu, W., Tang, R., Yuan, Y., Guo, W., & Deng, W. (2014). Melatonin enhances the anti-tumor effect of fisetin by inhibiting COX-2/iNOS and NF-kappaB/p300 signaling pathways. *PLoS One*, 9(7), e99943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099943>
- Yi, D., Xu, L., Wang, R., Lu, X., & Sang, J. (2019). miR-381 overcomes cisplatin resistance in breast cancer by targeting MDR1. *Cell Biol Int*, 43(1), 12-21. <https://doi.org/10.1002/cbin.11071>
- Yin, Y., Li, X., Guo, Z., & Zhou, F. (2019). MicroRNA-381 regulates the growth of gastric cancer cell by targeting TWIST1. *Mol Med Rep*, 20(5), 4376-4382. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10651>
- Yoshimura, A., Kuwazuru, Y., Furukawa, T., Yoshida, H., Yamada, K., & Akiyama, S. (1990). Purification and Tissue Distribution of Human Thymidine Phosphorylase - High Expression in Lymphocytes, Reticulocytes and Tumors. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1034(1), 107-113. [https://doi.org/Doi 10.1016/0304-4165\(90\)90160-X](https://doi.org/Doi 10.1016/0304-4165(90)90160-X)
- Young, P. E., Womeldorph, C. M., Johnson, E. K., Maykel, J. A., Brucher, B., Stojadinovic, A., Avital, I., Nissan, A., & Steele, S. R. (2014). Early Detection of Colorectal Cancer

- Recurrence in Patients Undergoing Surgery with Curative Intent: Current Status and Challenges. *Journal of Cancer*, 5(4), 262-271. <https://doi.org/10.7150/jca.7988>
- Yu, Y., Nangia-Makker, P., Farhana, L., S, G. R., Levi, E., & Majumdar, A. P. (2015). miR-21 and miR-145 cooperation in regulation of colon cancer stem cells. *Mol Cancer*, 14, 98. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0372-7>
- Yuan, C., Steer, C. J., & Subramanian, S. (2019). Host(-)MicroRNA(-)Microbiota Interactions in Colorectal Cancer. *Genes (Basel)*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/genes10040270>
- Zeestraten, E. C., Benard, A., Reimers, M. S., Schouten, P. C., Liefers, G. J., van de Velde, C. J., & Kuppen, P. J. (2013). The prognostic value of the apoptosis pathway in colorectal cancer: a review of the literature on biomarkers identified by immunohistochemistry. *Biomark Cancer*, 5, 13-29. <https://doi.org/10.4137/BIC.S11475>
- Zeynali-Moghaddarn, S., Mohammadian, M., Kheradmand, F., Fathi-Azarbayjani, A., Rasmi, Y., Esna-Ashari, O., & Malekinejad, H. (2019). A molecular basis for the synergy between 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin with Capecitabine and Irinotecan in human colorectal cancer cells through VEGF and MMP-9 gene expression. *Gene*, 684, 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.016>
- Zhai, Z., Mu, T. L., Zhao, L. N., Li, Y. L., Zhu, D. S., & Pan, Y. S. (2022). MiR-181a-5p facilitates proliferation, invasion, and glycolysis of breast cancer through NDRG2-mediated activation of PTEN/AKT pathway. *Bioengineered*, 13(1), 83-95. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2006974>
- Zhang, B. H., Pan, X. P., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.028>
- Zhang, H., Li, Y., Huang, Q., Ren, X., Hu, H., Sheng, H., & Lai, M. (2011). MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. *Cell Death and Differentiation*, 18(11), 1702-1710. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.28>
- Zhang, H. W., Hu, J. J., Fu, R. Q., Liu, X., Zhang, Y. H., Li, J., Liu, L., Li, Y. N., Deng, Q., Luo, Q. S., Ouyang, Q., & Gao, N. (2018). Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3K gamma mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K/ULK signaling pathway in human breast cancer cells. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/ARTN 1125510.1038/s41598-018-29308-7>
- Zhang, J., Gu, Y., & Chen, B. (2019). Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *Onco Targets Ther*, 12, 1937-1945. <https://doi.org/10.2147/OTT.S191621>
- Zhang, L., Yu, J., Park, B. H., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2000). Role of in the apoptotic response to anticancer agents. *Science*, 290(5493), 989-+. <https://doi.org/DOI 10.1126/science.290.5493.989>
- Zhang, M. M., Huang, S. S., & Long, D. (2017). MiR-381 inhibits migration and invasion in human gastric carcinoma through downregulatedting SOX4. *Oncology Letters*, 14(3), 3760-3766. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6637>
- Zhang, Q. Q., Zhao, S. X., Pang, X. L., & Chi, B. R. (2016). MicroRNA-381 suppresses cell growth and invasion by targeting the liver receptor homolog-1 in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 35(3), 1831-1840. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4491>
- Zhang, T., Yang, Z., Kusumanchi, P., Han, S., & Liangpunsakul, S. (2020). Critical Role of microRNA-21 in the Pathogenesis of Liver Diseases. *Front Med (Lausanne)*, 7, 7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00007>
- Zhang, X., Wang, Q., Jia, C., Li, D., Lv, Z., & Yang, J. (2022). Role of atrial natriuretic peptide receptor in inhibition of laterally spreading tumors via Wnt/beta-catenin signaling. *Arch Med Sci Atheroscler Dis*, 7, e104-e108. <https://doi.org/10.5114/amsad/151928>
- Zhang, Y., Geng, L. Y., Talmon, G., & Wang, J. (2015). MicroRNA-520g Confers Drug Resistance by Regulating p21 Expression in Colorectal Cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 290(10), 6215-6225. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.620252>

- Zhang, Y., Tian, S., Li, X., Ji, Y., Wang, Z., & Liu, C. (2018). UBE2C promotes rectal carcinoma via miR-381. *Cancer Biol Ther*, 19(3), 230-238. <https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1416939>
- Zhao, W., Ning, L., Wang, L., Ouyang, T., Qi, L., Yang, R., & Wu, Y. (2021). miR-21 inhibition reverses doxorubicin-resistance and inhibits PC3 human prostate cancer cells proliferation. *Andrologia*, 53(5), e14016. <https://doi.org/10.1111/and.14016>
- Zheng, H., Liu, J., Yu, J., & McAlinden, A. (2021). Expression profiling of mitochondria-associated microRNAs during osteogenic differentiation of human MSCs. *Bone*, 151, 116058. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116058>
- Zheng, H. C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, 8(35), 59950-59964. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048>
- Zheng, T. S., Wang, J. B., Chen, X., & Liu, L. X. (2010). Role of microRNA in anticancer drug resistance. *International Journal of Cancer*, 126(1), 2-10. <https://doi.org/10.1002/ijc.24782>
- Zhong, R. T., Farag, M. A., Chen, M. W., He, C. W., & Xiao, J. B. (2022). Recent advances in the biosynthesis, structure-activity relationships, formulations, pharmacology, and clinical trials of fisetin. *Efood*, 3(1-2). <https://doi.org/ARTN e310.1002/efd2.3>
- Zhou, J., Zhou, Y., Yin, B., Hao, W., Zhao, L., Ju, W., & Bai, C. (2010). 5-Fluorouracil and oxaliplatin modify the expression profiles of microRNAs in human colon cancer cells in vitro. *Oncol Rep*, 23(1), 121-128. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19956872>
- Zhou, S., Cui, Y., Yu, D., Liang, J., Zhang, M., & Ye, W. (2017). MicroRNA-381 enhances radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma by targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Onco Targets Ther*, 10, 2527-2538. <https://doi.org/10.2147/OTT.S134551>
- Zhou, X., Ren, Y., Moore, L., Mei, M., You, Y., Xu, P., Wang, B., Wang, G., Jia, Z., Pu, P., Zhang, W., & Kang, C. (2010). Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. *Lab Invest*, 90(2), 144-155. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.126>
- Zhu, S., Si, M. L., Wu, H., & Mo, Y. Y. (2007). MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*, 282(19), 14328-14336. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611393200>
- Ziegler, U., & Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *News in Physiological Sciences*, 19, 124-128. <https://doi.org/10.1152/nips.01519.2004>
- Zou, H., Li, Y. C., Liu, H. S., & Wang, X. D. (1999). An APAF-1•cytochrome multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11549-11556. <https://doi.org/DOI 10.1074/jbc.274.17.11549>
- Zweibaum, A., Pinto, M., Chevalier, G., Dussaulx, E., Triadou, N., Lacroix, B., Haffen, K., Brun, J. L., & Rousset, M. (1985). Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *J Cell Physiol*, 122(1), 21-29. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041220105>

9.ÖZGEÇMİŞ

10. BİLİMSEL FAALİYETLER

Makale

- Aydin, B., Goren, M. Z., Kanli, Z., & Cabadak, H. (2022). Cross-talk of cholinergic and β -adrenergic receptor signalling in chronic myeloid leukemia K562 cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. Volume 49, Issue 4, April 2022, Pages 515-524. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13627>.
- Kanli Z., Aydın, B., & Cabadak, H. (2019). Effects of cholinergic compounds and TNF-alpha on human erythroleukemia K562 cell proliferation and caspase expression. *Marmara Medical Journal*, 32(1), 20-26. <https://doi.org/10.5472/marumj.518797>
- Kanlı Z., Cabadak H., & Aydın B (2023). Potential antiproliferative and apoptotic effects of pilocarpine combined with TNF alpha in chronic myeloid leukemia cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2023 Jul;396(7):1513-1524. doi: 10.1007/s00210-023-02418-4. Epub 2023 Feb 13. PMID: 36781441.
- Zehra, K., Banu, A., Can, E. et al. Fisetin and/or capecitabine causes changes in apoptosis pathways in capecitabine-resistant colorectal cancer cell lines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2024). <https://doi.org/10.1007/s00210-024-03145-0>

Proceeding

- Kanli, Z Aydın B. & Cabadak H (2022). Investigation of the Role of M₃ muscarinic receptor in Chronic Myeloid Leukemic Cells. *MolBiyoKon'19 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*. (2022). Supplement: Abstract Proceedings of the 7th International Congress Of The Molecular Biology Association Of Turkey, Turkish Journal of Biology: Vol. 43: No. 5, Article 7. <https://doi.org/10.55730/1300-0152.1125>.
- Kanlı Z (2019). Tümör Nekrozis Faktör-Alfa, PD153035, M3 Muskarinik Reseptörüne Özgü Agonist ve Antagonistlerin, İnsan Kronik Miyeloid Lösemi Hücrelerinde Sitokrom C, Kaspaz 3, 8 ve 9 Ekspresyonuna Etkileri. 31. Ulusal Biyofizik Kongresi, Adana, 09–12 Ekim 2019 (Abstract Özet Yayın)

Bildiri (Poster veya Sözel)

- Aydin B., Kanli Z., Gören Z. & Cabadak H. (2018). The Effect of Beta Adrenergic Agonist and Antagonists on Caspase 3, Caspase 8 and Caspase 9 Expression on K562 Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Europhysiology 2018*. Eylül 14-16, 2018, Queen Elizabeth II Center, London -England (poster bildirimi).
- Kanli Z., Aydın B. & Cabadak H. (2018). Regulation of acetylcholineesterase activity, CXCL8 production and proliferation by pilocarpine in human K562 erythroleukemia cells. *Europhysiology 2018*. Eylül 14-16, 2018, Queen Elizabeth II Center, London-England (poster bildirimi).
- Kanli Z., Aydın B. & Cabadak H. (2019). Investigation of the Role of M₃ muscarinic receptor in Chronic Myeloid Leukemic Cells. *MolBiyoKon'19, 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*. September 27-29, 2019, Süleyman Demirel Cultural Center, Istanbul Technical University, TR (poster bildirimi).
- Kanlı Z. (2019). Tümör Nekrozis Faktör-Alfa, PD153035, M3 Muskarinik Reseptörüne Özgü Agonist ve Antagonistlerin, İnsan Kronik Miyeloid Lösemi Hücrelerinde Sitokrom C, Kaspaz 3, 8 ve 9 Ekspresyonuna Etkileri. 31. Ulusal Biyofizik Kongresi, Adana, 09–12 Ekim 2019 (Sözlü Sunum).
- Kanli Z, Aydın B, Erzik C, Arga Y.K. & Cabadak H. (2022). Effect of chemotherapy drugs combined with flavonoid on colorectal cancer cells. *International Marmara Sciences Congress (Imascon Autumn)*. 09-10.2022 Körfez Belediyesi Körfez/Kocaeli/Türkiye (Sözlü sunum).

Proje

- Aydin B. Dirençli epilepsi tedavisinde kontrollü ilaç salımı yapan ilaç yüklü Gel-g-poliNIPAA hidrojel bazlı mikroiğne ve ilaç yüklü ipek fibroin (Silk-Ma) bazlı enjekte edilebilir hidrojellerin kullanımı. Marmara Üniversitesi ADEP projesi ADT-2023-10836, 2023-2026 (Araştırmacı)
- Cabadak H. Fisetin ile Kombine Edilmiş Kemoterapi İlaçlarının Kolorektal Kansere Hücrelerine Etkisi Üzerine Çalışmalar. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı TDK-2021-10284, 2021-2024 (Araştırmacı)
- Gündüz O. Nöron Hasarı İlişkili Hastalıkların Tanı, İzlem ve Tedavisine Yönelik Biyobelirteç ve İleri Teknolojik Uyarı Sistemlerinin Geliştirilmesi. 1004 Mükemmeliyet Merkezi Destek Programı, 2023-2024 (Doktora Bursiyeri)

