

"İSLİM KALELER"

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

KOLON KANSERİNDE NRF2 EKSPRESYONU VE
ANTIÖKSİDAN SİSTEM İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

İSLİM KALELER

DANIŞMAN
PROF. DR. İLHAN YAYLIM

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

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 çalışmasıyla elde edilmeyen 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.

İslim Kaleler

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimde akademik bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren kıymetli danışmanım ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İlhan YAYLIM'a,

Tez çalışmamda biyolojik örneklerin temini için desteklerini esirgemeyen Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği'nde görev yapan Sayın Prof. Dr. Soykan ARIKAN'a ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı'nda görev yapan Sayın Prof. Dr. Filiz AKYÜZ'e,

Doktora eğitimimdeki katkılarından dolayı Moleküler Tıp Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli hocalarıma, tezimin laboratuvar çalışmalarında ilgilerini ve desteklerini esirgemeyen, bilgileri ile katkılar sağlayan Sayın Prof. Dr. Özlem KÜÇÜKHÜSEYİN'e, Sayın Doç. Dr. Cem HOROZOĞLU'na, Öğr. Gör. Dr. Mehmet Tolgahan HAKAN'a ve Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim tüm arkadaşlarıma,

Her zaman her koşulda sabır ve destekleri ile yanımda olan çok kıymetli aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38911

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Doktora öğrencisi İslim KALELER tarafından Prof. Dr. İlhan YAYLIM'ın danışmanlığında hazırlanan “Kolon Kansерinde NRF2 Ekspresyonu ve Antioksidan Sistem İle İlişkisinin İncelenmesi” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 13/08/2024 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ş. Ümit ZEYBEK
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Elif ÖZKÖK
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Sinirbilim Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Ebru IŞIK ALTURFAN
Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Özlem KÜÇÜKHÜSEYİN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Doç. Dr. Cem HOROZOĞLU
Haliç Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri-(Danışman oy hakkı olmaksızın)

Prof. Dr. İlhan YAYLIM
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
TEZ ONAYI	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolon Kanseri	3
2.1.1. Etiyolojisi	3
2.1.2. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	4
2.1.3. Sınıflandırma.....	4
2.1.4. Tanısı.....	5
2.1.5. Tedavisi	5
2.2. Oksidatif Stres.....	6
2.2.1. Antioksidanlar	8
2.2.1.2. Enzimatik Antioksidanlar	9
2.2.1.2.1. Süperoksit Dismutaz	9
2.2.1.2.2. Katalaz.....	9
2.2.1.2.3. Glutasyon Peroksidaz	9
2.2.1.3. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	10
2.3. Oksidatif Stres ve Kanser.....	10
2.4. Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2	12
2.4.1. NRF2 Yapısı	12
2.4.2. NRF2 Aktivitesinin Düzenlenmesi	13
2.5. Kanserde NRF2 ve Oksidatif Stres	15
2.6. NRF2 ve Glutamin Metabolizması	17

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Kullanılan Malzemeler.....	19
3.2. Kullanılan Cihazlar	20
3.3. Biyolojik Örneklerin Toplanması	21
3.4. NRF2 Gen Ekspresyon Analizi.....	21
3.4.1. Dokulardan RNA İzolasyonu.....	21
3.4.2. cDNA Sentezi	22
3.4.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	22
3.5. NRF2 Western Blot Analizi.....	23
3.5.1. Dokulardan Proteinlerin İzolasyonu ve Konsantrasyonlarının Ölçümü	23
3.5.2. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi.....	23
3.5.3. Bloklama, primer ve sekonder antikor ile inkübasyon	23
3.6. Spektrofotometrik Analizler	24
3.6.1. Doku Homojenizasyonu.....	24
3.6.2. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi, Glutamat-Glutamin ve NRF2 Düzeylerinin Ölçümleri	24
3.6.3. Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçülmesi.....	25
3.7. İstatistiksel Analiz.....	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. Hastaların demografik özellikleri	27
4.2. Doku NRF2 mRNA ekspresyon seviyeleri.....	28
4.3. Doku NRF2 protein ekspresyon seviyeleri	29
4.4. Doku ve serum NRF2 seviyeleri.....	31
4.5. Doku glutasyon peroksidaz ve SOD aktivitesi ile FRAP, AOPP ve total tiyol seviyeleri.....	31
4.1. Serum glutasyon peroksidaz ve SOD aktivitesi ile FRAP, AOPP ve total tiyol seviyeleri.....	32
4.2. Doku ve serum glutamat-glutamin düzeyleri ile doku glutamat dehidrogenaz aktivitesi.....	33
4.3. NRF2 ekspresyonu UP ve DOWN olan hastaların doku ve serumdaki parametrelerinin karşılaştırılması.....	34
4.4. ROC Analizi.....	47
TARTIŞMA	51

5. KAYNAKLAR	58
ETİK KURUL KARARI	68
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	69



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Kolon kanser ve kontrol grubuna ait demografik özellikler	27
Tablo 4-2: Doku ve serum NRF2 seviyeleri	31
Tablo 4-3: Tümör ve tümör çevre dokularında glutatyon peroksidaz ve SOD aktivitesi ile FRAP, AOPP ve total tiyol seviyeleri	31
Tablo 4-4: Serum glutatyon peroksidaz ve SOD aktivitesi ile FRAP, AOPP ve total tiyol seviyeleri	32
Tablo 4-5: Doku ve serum glutamat-glutamin düzeyleri ile doku glutamat dehidrogenaz aktivitesi	33
Tablo 4-6: NRF2 ekspresyonu UP ve DOWN olan hastaların doku parametrelerinin karşılaştırması	34
Tablo 4-7: NRF2 ekspresyonu UP ve DOWN olan hastaların serum parametrelerinin karşılaştırması	35
Tablo 4-8: Kolon kanserli hastaların tümör dokusundaki parametrelerin korelasyon analizi	37
Tablo 4-9: Tümör çevre dokusundaki parametrelerin korelasyon analizi	39
Tablo 4-10: Kolon kanserli hastaların serum parametrelerinin korelasyon analizi	40
Tablo 4-11: Sağlıklı kontrollerin serum parametrelerinin korelasyon analizi	41
Tablo 4-12: Tümör evresine ve lenf nodu metastaz durumuna göre doku ve serum parametrelerinin karşılaştırılması	42
Tablo 4-13: Diferansiyasyon, perinöral invazyon ve anjiyolenfatik invazyon durumuna göre doku ve serum parametrelerinin karşılaştırılması	45
Tablo 4-14: ROC analiz sonuçları	48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kolon karsinogenezin aşamaları (13).....	3
Şekil 2-2: Biyobelirteç odaklı terapötikler ve kanser aşamasına özgü terapötik stratejiler (27).....	6
Şekil 2-3: Serbest radikallerin kaynakları ve organizma üzerindeki etkileri (30)	7
Şekil 2-4: Başlıca reaktif oksijen türevleri (32).....	8
Şekil 2-5: Kanser hücrelerinin reaktif oksijen türevlerine adaptasyonu (48)	12
Şekil 2-6: NRF2 yapısı (59).....	13
Şekil 2-7: Keap1 yapısı (60)	14
Şekil 2-8: NRF2'nin kanserde ikili rolü (38).....	16
Şekil 4-1: Kolon kanser tümör dokusu ile tümör çevre dokusunun NRF2 mRNA düzeylerinin karşılaştırılması.....	29
Şekil 4-2: Tümör ve tümör çevre dokularındaki NRF2 ve GAPDH protein ekspresyonları	30
Şekil 4-3: Rölatif NRF2 protein miktarı. **, $p<0,01$	30
Şekil 4-4: ROC eğrileri	50

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- OH: Hidroksil radikali
- AOPP: İleri oksidasyon protein ürünleri
- ARE: Antioksidan yanıt elemanı
- BCA: Bikinkoninik asit
- CAR: Kimerik antijen reseptörü
- CIMP: CpG adası metilatör fenotip
- CIN: Kromozomal insitabilite
- CNV: Kopya numara varyasyonları
- CREB: cAMP yanıt eleman bağlayıcı protein
- CTLA-4: Sitotoksik T-lenfositle ilişkili antijen-4
- FRAP: Ferrik demir iyonu indirgeyici antioksidan güç
- G6PDH: Glikoz-6-P dehidrogenaz
- GAPDH: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrojenaz
- GDH: Glutamat dehidrogenaz
- GPx: Glutasyon peroksidaz
- GSH: Glutasyon
- GSK-3β: Glikojen sentaz kinaz-3β
- GSSG: Okside glutasyon
- H₂O₂: Hidrojen peroksit
- KAT: Katalaz
- Keap1: Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1
- LO·: Alkoksil radikali
- LOO·: Lipid peroksil radikali
- MDA: Malondialdehit
- MSI: Mikrosatellit instabilitesi
- NADPH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit
- NO·: Nitrik oksit radikali
- NRF2: Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2

O₂^{•-}: Süperoksit
ONOO⁻: Peroksinitrit anyonu
OS: Oksidatif stres
PBS: Fosfat buffer saline
PD-1: Programlanmış hücre ölümü proteini 1
PET: Pozitron emisyon tomografisi
PGD: Fosfo glikonat dehidrogenaz
PVDF: Poliviniliden diflorür
RIPA: Radyoimmünopresipitasyon assay tamponu
RNS: Reaktif nitrojen türevleri
ROS: Reaktif oksijen türevleri
RXRa: Retinoik-alfa X reseptörü
SDS: Sodyum dedosil sülfat
sMAF: küçük kas aponörotik fibrosarkom
SNPs: Tek nükleotid polimorfizmleri
SOD: Süperoksit dismutaz
TCA: Trikarboksilik asit döngüsü
 α -KTG: α -ketoglutarat
 β -TrCP: Beta-transdusin tekrarları içeren proteinler

ÖZET

KALELER, İ. (2022). Kolon kanserinde NRF2 ekspresyonu ve antioksidan sistem ile ilişkisinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2024.

Kolon kanserinde NRF2 ekspresyonunu ve bunun antioksidan savunma sistem ile klinik özellikler arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık. Çalışma kapsamına dahil edilen 30 tümör ve tümöre uzak çevre dokusunda NRF2 gen ekspresyonu qPCR, NRF2 protein düzeyi western blot ve ELİZA yöntemiyle, glutamat-glutamin, glutatyon peroksidaz aktivitesi ELİSA yöntemiyle ve antioksidan sistem parametreleri ise spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. ELİZA ve spektrofotometrik analizler aynı hastalardan ve 30 sağlıklı kontrolden alınan serum örneklerinde çalışılmıştır. Tümör dokusunda NRF2 mRNA düzeyi düşük olmasına rağmen anlamlılık bulunamamıştır. NRF2 protein düzeylerinin ise hem western blot hem de ELİZA sonuçlarına göre azaldığını bulduk. Ancak serumda NRF2 düzeylerinin azalışı anlamlı bulunamamıştır. Hasta tümör dokusunda ve serumlarında antioksidan sistem belirteçlerinden olan SOD, GPx, total tiyol ve FRAP düzeylerinin de azaldığı tespit edilmiştir. Glutamat-glutamin düzeylerinin hem tümör dokusunda hem de serumda kontrole göre değişmediği bulundu. Kolon kanserli hastaların, tümör dokusunda NRF2 ekspresyonu up ve down olanların, NRF2 protein ve antioksidan parametrelerinin karşılaştırmasında anlamlı farklılık bulunamamışken, serumda ise NRF2 up olanlarda AOPP düzeyinin azaldığı, total tiyolün ise arttığı bulunmuştur. Klinik verilerle karşılaştırıldığında, tümör doku NRF2 protein ekspresyonunun perinöral invazyonu olanlarda daha yüksek, serum NRF2 düzeyinin ise anjiyolenfatik invazyon olanlarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tümör evresi, diferansiyasyon ve lenf nodu metastazına göre karşılaştırıldığında ise anlamlı farklılık bulunamamıştır. NRF2 düzeyinin kolon kanserinde düşük olmasının, antioksidan sistemin azalmasına ve hücrede oksidatif stresin artmasına neden olabileceğini ve bunların hastalığın patolojisi ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler : Kolon kanseri, NRF2, Antioksidan sistem

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38911

ABSTRACT

KALELER, İ. (2024). Investigation of NRF2 expression and its relationship with the antioxidant system in colon cancer. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine. Doktoral Thesis. İstanbul.

We investigated NRF2 expression in colon cancer and its relationship with antioxidant system and clinical features. NRF2 gene expression was measured by qPCR, NRF2 protein level by western blot and ELISA, glutamate-glutamine, glutathione peroxidase activity by ELISA and antioxidant system parameters were measured spectrophotometrically in 30 tumor and surrounding tissue. ELISA and spectrophotometric analyses were performed on serum samples from patients and 30 controls. Although NRF2 mRNA levels were lower in tumor tissue, it was not significant. We found that NRF2 protein levels decreased according to both western blot and ELISA results. However, decrease in NRF2 levels in serum were not significant. SOD, GPx, total thiol and FRAP levels were found to be decreased in tumor tissue and serum. Glutamate-glutamine levels didn't change in both tissue and serum compared to control. No significant difference was found in the comparison of NRF2 protein and antioxidant parameters of colon cancer patients with up and down NRF2 expression in tumour tissue. However, it was found that AOPP level decreased and total thiol increased in patients with NRF2 up. Tumor tissue NRF2 protein expression was higher in patients with perineural invasion and serum NRF2 level was higher in patients with angiolymphatic invasion. No significant difference was found when compared according to tumor stage, differentiation and lymph node metastasis. We suggest that low level of NRF2 in colon cancer may lead to a decrease in the antioxidant system and an increase in oxidative stress in cell and that these are related to the pathology of the disease.

Key Words: Colon cancer, NRF2, Antioxidant system

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 38911

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oksidatif stres, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşumundaki artış ile birlikte ROS'a karşı ortaya çıkan antioksidan savunma mekanizmalarının zayıflamasının bir sonucudur. ROS'un kanser dahil birçok hastalıkta önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. ROS'un kanserin gelişiminde ve ilerlemesindeki rolü yapılan çalışmaların önemli bir konusu olmaktadır (1). "Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2" (NRF2), hücrede ortaya çıkan oksidatif strese karşı antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenleyen antioksidan savunmanın modülatörüdür (2). Kanser hücrelerinin oksidatif strese yanıt olarak antioksidan kapasiteyi arttırdığı bilinmektedir (3). Normal fizyolojik koşullarda NRF2 düzeyinin artması hücreyi oksidatif hasara karşı korurken, kanser hücrelerinde ise NRF2 tarafından sağlanan antioksidan aktivite hücrede oluşan ROS'u ortadan kaldırarak, kanser hücrelerini korur ve büyümesi için avantaj sağlar. Böylece NRF2'nin aşırı aktivasyonu kanser gelişimini destekleyici rol oynamaktadır (4). NRF2'nin bazal seviyedeki işlevi, kolon kanser gelişimini önlemek için gereklidir ve NRF2 genindeki değişiklikler kolon kanser gelişimini destekleyebilmektedir (5). Kolon kanserinde NRF2 düzeyleri hem in vivo hem de in vitro çalışmalar ile araştırılmıştır. İn vivo çalışmalar sonucunda kolon kanser dokularındaki NRF2 ekspresyonunun normal dokuya göre daha yüksek olduğu bulunurken (6,7), benzer şekilde in vitro çalışmalarda da kolon kanser hücrelerinde NRF2 ekspresyonunun daha yüksek olduğu bildirilmiştir (8,9). NRF2, sadece normal hücreleri kanserli hücreye dönüşmekten korumakla kalmaz, ayrıca kanser hücrelerinin hücresel stresten korunmasında, büyümesinde ve kanserin ilerlemesinde rol alır (10). NRF2 sadece antioksidan savunmaya değil aynı zamanda metabolizmaya da etki ederek kanser gelişimine katkıda bulunmaktadır (8). Kanser hücrelerinde yüksek glukoz konsantrasyonuna rağmen glutamin bağımlı mitokondriyal solunum aktiftir. Glutamin metabolizma ara ürünü olmasının yanı sıra glutatyon sentezine, nükleotidlerin ve esansiyel olmayan aminoasitlerin biyosentezine katkı sağlar (11). NRF2 kanser hücrelerinde glutamin metabolizmasının kontrolünde son derece etkilidir. Kanser hücrelerinde artan glutamat, hem glutatyon sentezine hem de karbon kaynağı sağlamak amacıyla TCA döngüsüne katılabilir. Ancak kanser hücrelerinde NRF2'nin aşırı aktivasyonu ile hücreler TCA siklusuna karbon kaynağı sağlamak için α -ketoglutarat oluşumunu arttırmak yerine yüksek seviyede antioksidan üretimini desteklemek

yönünde programlanır (9). NRF2 tarafından sağlanan antioksidan savunma kanser hücrelerinde reaktif oksijen türevlerinin ortadan kaldırılmasına aracılık eder ve böylelikle kanser hücrelerinin büyümesi için avantaj sağlar (8). NRF2 aktivasyonunun çeşitli kanser türlerinin ilerlemesine katkıda bulunduğu ve kanser hücrelerinde artmış NRF2 aktivasyonunun proliferasyon, apoptozdan kaçınma, metabolik yeniden programlama, değişmiş redoks dengesi, anjiyogenez, metastaz oluşumu ve tedaviye direnç gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Stres koşullarında NRF2'nin hücre sağkalımını arttırdığı göz önüne alındığında, artan NRF2 aktivitesinin kanser hücrelerini çeşitli moleküler mekanizmalar yoluyla koruyarak tümör destekleyici olabileceği kabul edilmektedir. Bu çalışma ile kolon kanserinde hem doku hem de serumda NRF2 düzeylerinin oksidatif stres, antioksidan sistem ve glutamin metabolizması ile ilişkisi incelenerek elde edilen veriler doğrultusunda kolon kanserinin tanısında ve tedavisinde terapötik yaklaşımlar açısından literature katkı yapılması planlanmaktadır.

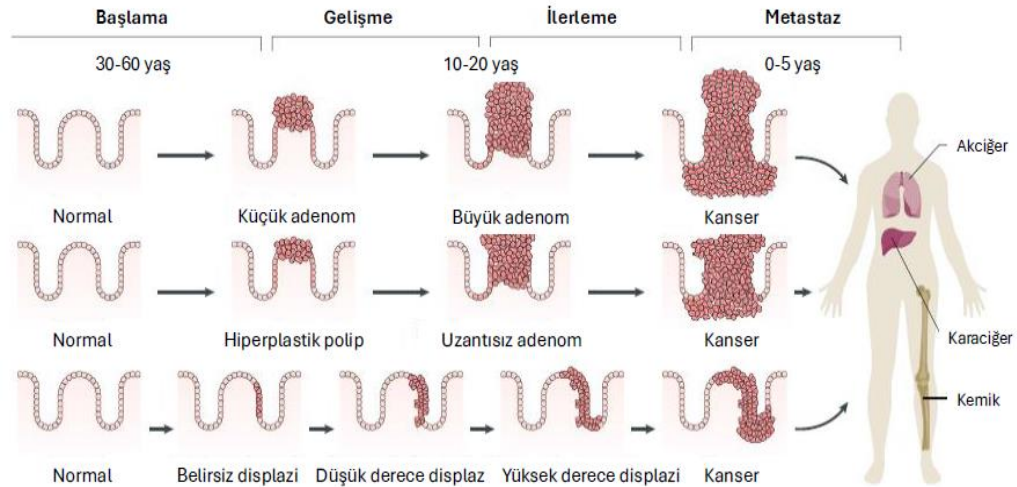
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon Kanseri

Kolondaki glandüler epitel hücrelerinin anormal çoğalmasından kaynaklanan ve sporadik, kalıtsal ve kolitle ilişkili olmak üzere üç türü bulunan bir hastalıktır (12).

2.1.1. Etiyolojisi

Kolon kanseri, epitel hücrelerinin neoplastik dönüşümünü teşvik eden ve geri dönüşümü olmayan DNA addukları gibi DNA hasarı ile kanserin başlaması, bu hücrelerin çoğalarak anormal büyümeleri ile çoğalması, genetik ve epigenetik değişiklikler geçirerek benign tümörün malign hale ilerlemesi ve kan veya lenfatik dolaşım aracılığıyla diğer organ ve dokulara yayılmasıyla sonuçlanan metastaz aşamalarından oluşur (Şekil 2-1) (13).



Şekil 2-1: Kolon karsinogenezin aşamaları (13)

Kolon epitel hücrelerinin proliferasyonlarının artmasına sebep olan genetik (gen mutasyonları, gen amplifikasyonu gibi) ya da epigenetik değişikliklerin (anormal DNA metilasyonu, kromatin modifikasyonları gibi) birikmesi kolon kanser gelişimini teşvik eden anahtar mekanizmalardır. Kolon kanserinin gelişmesinde rol oynayan genetik ve epigenetik değişiklikler; kromozomal instabilite (CIN), CpG adası metilatör fenotip

(CIMP) ve mikrosatellit instabilitesi (MSI) olarak başlıca üç gruba ayrılmaktadır (14). Kromozomal insitabilite bazların yer değıştirmesi, delesyonları veya eklemeleriyle oluşan gen dizisindeki değışiklikler; kromozom sayısındaki değışiklikler (anöploidi ve poliploidi); kromozomun yeniden düzenlenmesi ve gen amplifikasyonunu içermektedir (15). CpG adası metilatör fenotipi, tümör baskılayıcı genlerin (MLH1, MINT1, MINT2 ve MINT3 gibi) promotör bölgelerindeki tekrarlayan CG dinükleotitlerindeki (CpG adaları) hipermetilasyon sonucu genlerin susturulmasını ifade etmektedir (16).

2.1.2. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Kolon kanseri dünyada en yaygın görülen üçüncü kanserdir. 2020 yılında 1,9 milyonun üzerinde yeni tanı konulmuş ve 930.000 ölümle sonuçlanmıştır. Görülme sıklığı Avustralya ve Avrupa bölgelerinde en yüksek iken, Afrika bölgesi ile Güney Asya'da ise en düşüktür. 2040 yılına kadar 3,2 milyon yeni tanının konulması ve 1,6 milyon ölümün olabileceği öngörülmektedir (17). 2024 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 153.020 kişiye tanı konulacağı ve 52.550 kişinin hastalıktan öleceği ve bunların 3.750'sinin 50 yaş altı bireylerden oluşacağı bildirilmiştir. Özellikle daha genç yaşta görülmeye başlayan kolon kanseri, daha ileri bir evrede ve sol kolon/rektumda ortaya çıkmaktadır (18).

Kolon kanser gelişiminde rol oynayan risk faktörleri kişisel geçmiş, aile öyküsü, yaşam tarzı ve diyet, ilaç kullanımı ile hormonlardır (12). Erkeklerde kolon kanser gelişme riski kadınlara göre daha fazla olmakla birlikte (19), siyah ırkta beyaz ırka göre insidans daha yüksektir (20). Ailede birinci derece akrabada kolon kanser öyküsü olan kişilerde risk iki kat daha fazla olmaktadır. Vücut kitle indeksinin artması, fiziksel hareketsizlik, düzenli alkol tüketimi, sigara kullanımı ve işlenmiş gıdaların tüketimi kolon kanser riskinin artışına neden olmaktadır. Diğer yandan kolon kanseri inflamatuvar bağırsak hastalığı ile ilişkili olup, bu hastalarda kanser gelişme riski yaklaşık 3 kat daha fazladır (21).

2.1.3. Sınıflandırma

Kolon kanseri evre 0'dan evre 4'e kadar sınıflandırılır. Evre 0'da proliferasyonun artması iyi huylu bir polip veya adenomun oluşmasına neden olur. Evre 1'de poliplerin malign hale gelmesi ve muskularis propria tabakasını istila etmesi ile adenokarsinom oluşur. Tümörün hacim olarak büyüyerek seroza tabakasını istila etmesi

evre 2, visseral peritondaki dokuyu istila etmesi de evre 3 olarak sınıflandırılır. Evre 4'te lenf sistemi ve kan damarları yoluyla metastaz gelişir (22).

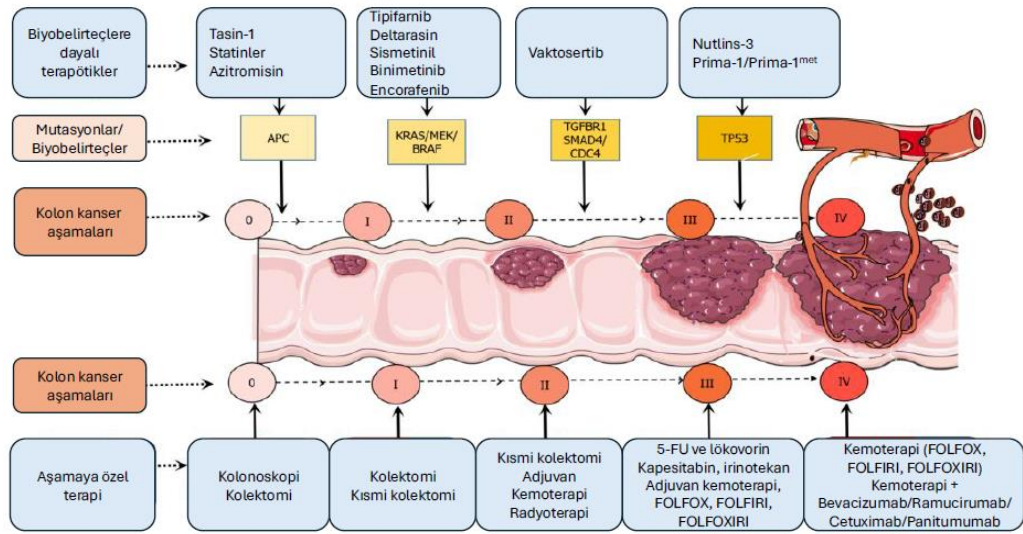
2.1.4. Tanısı

Kolon kanser tanısının konulmasında kullanılan tarama yöntemleri kanser öncesi lezyonların malign hale dönüşmeden önce çıkarılmasına ve hastalığın erken tespiti ile tedavisine imkan sağlayarak kolon kanserine bağlı ölümlerin azalmasına oldukça katkı sağlamaktadır. Dışkıda gizli kan testi, dışkıda immünokimyasal test hem kanamayı hem de kolorektal neoplazmlarla ilişkili moleküler anormallikleri (KRAS mutasyonları ve anormal NDRG4 ve BMP3 metilasyonu gibi) test eden çok hedefli dışkı DNA testi ve altın standart yöntem olan kolonoskopidir (23) (24).

2.1.5. Tedavisi

Kolon kanser tedavisinde cerrahi, radyasyon terapisi, kemoterapi, immünoterapi, gen tedavisi gibi yaklaşımlar bulunmaktadır. Kolon kanserinde birincil tedavi tümörün cerrahi olarak çıkarılmasıdır, tümör rezeksiyonu yapılamadığında ise standart tedaviler kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapidir. Ancak, bu tedavilerin tümöre spesifik olmaması ve normal hücrelere de sitotoksik olması gibi ikincil komplikasyonlara yol açan bazı dezavantajları vardır (25). Bu nedenle tümör hücrelerini hedef alacak yeni tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Kolon kanserinde meydana gelen genetik değişikliklerin en sık nedeni kromozomal instabilitedir ve en önemli olumsuz sonuçlarından biri tümör baskılayıcı genlerin kaybıdır. Bu mutasyonlar; APC (Wnt yolu), KRAS, BRAF, KRAS, RET, MAPK, TP53 ve SMAD gibi kolon kanserinin patogeneğinde rol oynayan anahtar genler düzeyinde meydana gelir ve bu mutasyonları hedef alan terapötik ajanlar Şekil 2-2'de gösterilmiştir (26).

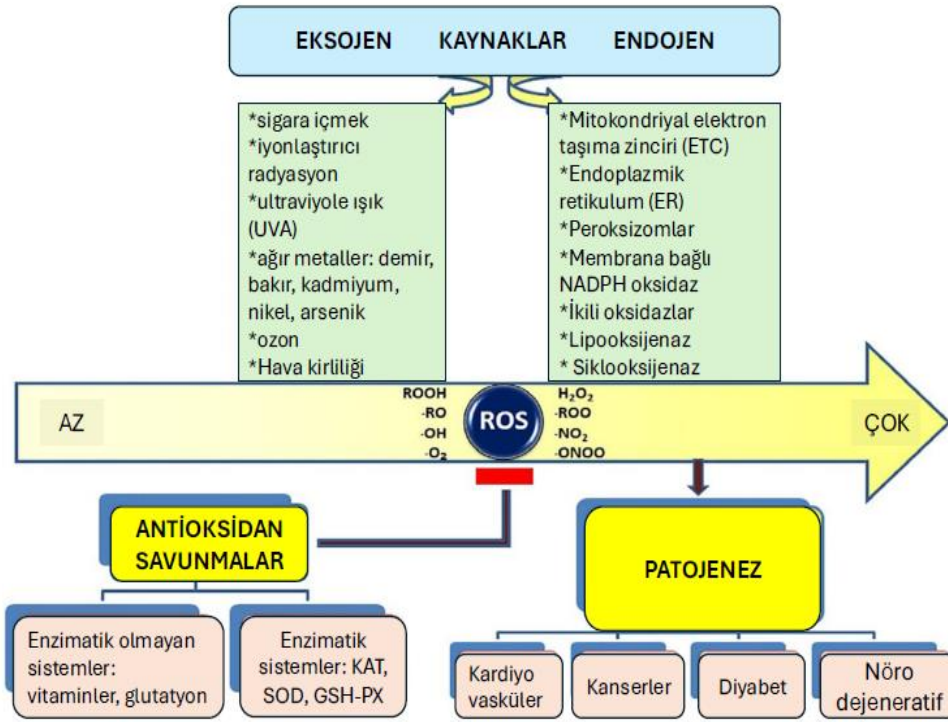


Şekil 2-2: Biyobelirteç odaklı terapötikler ve kanser aşamasına özgü terapötik stratejiler (27)

İmmün kontrol noktası inhibitörleri (sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili antijen-4 (CTLA-4), programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1)), kimerik antijen reseptörü (CAR) T hücresi terapisi, T hücresi reseptörü değişiklikleri ve sitokin tedavisi, ayrıca probiyotikler, RNA bazlı tedaviler (siRNA, mikroRNA ve kodlanmayan RNA), onkolitik viral tedaviler, doğal ürünler (alkaloitler, polisakkaritler, polifenoller, terpenoidler ve çoklu doymamış yağ asitleri) ve probiyotikler kolon kanser tedavisinde umut verici tedaviler olarak görülmektedir (27).

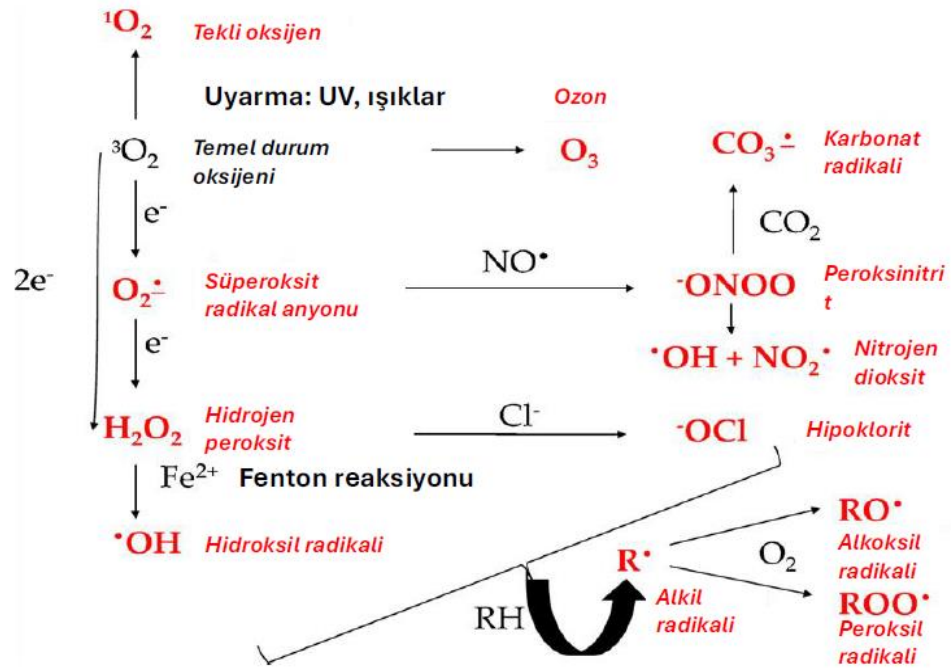
2.2. Oksidatif Stres

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşlenmemiş elektron içeren moleküllerdir ve diğer atomlara elektron vererek ya da elektronlarını alarak oksitleyici ya da indirgeyici rol oynayan reaktiftirlerdir (28). Genellikle sigara dumanı, ultraviyole radyasyon, ağır metal iyonları, ozon, alerjenler, ilaçlar, toksinler veya böcek ilaçları gibi çevresel tetikleyicilerin ya da hücrede mitokondriyal elektron taşıma zinciri, endoplazmik retikulum stresi, peroksizomal oksidatif metabolizma, zara bağlı NADPH oksidazlar ve nitrik oksit sentaz enzimlerinin sonucunda endojen olarak üretilirler (Şekil 2-3) (29).



Şekil 2-3: Serbest radikallerin kaynakları ve organizma üzerindeki etkileri (30)

Serbest radikaller reaktif oksijen türevleri (ROS) ve reaktif nitrojen türevleri (RNS) olarak iki gruba ayrılırlar. Bunlardan süperoksit ($O_2^{\cdot -}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$), lipid peroksil ($LOO\cdot$) ve alkoksil ($LO\cdot$) radikalleri ile hidrojen peroksit (H_2O_2) reaktif oksijen türevleri; nitrik oksit radikali ($NO\cdot$) ve peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) ise reaktif nitrojen türevleridir (Şekil 2-4) (31). Süperoksit radikalleri anyonik özelliklerinden dolayı biyolojik lipid membranlardan az miktarda difüze olurlar, bu nedenle hücre içerisinde sırasıyla hidrojen peroksit ve hidroksil radikale indirgenirler. Ayrıca peroksil radikali ile hipoklorit iyonları da oluştururlar (32). Hücrelerde ROS ve RNS' nin aşırı üretimi lipid, protein ve nükleik asit gibi makromoleküllerin hasarına neden olarak hücresel işlevlerin bozulmasına neden olur (31).



Şekil 2-4: Başlıca reaktif oksijen türevleri (32)

2.2.1. Antioksidanlar

Normal koşullarda organizmadaki serbest radikallerin sürekli üretiminin sebep olacağı zararlarından korunma, oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin kurulmasıyla sağlanır (30). ROS ve RNS düzeylerinin, antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerini içeren çeşitli savunma mekanizmaları tarafından kontrol edilmesi gerekmektedir. Antioksidanlar, serbest radikalleri ortadan kaldırarak veya kendilerini oksitleyerek diğer zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını inhibe ederek, makromoleküllerin oksidasyonunu önleme veya yavaşlatma yeteneğine sahip moleküllerdir (31). Antioksidan savunma sistemleri; serbest radikal üretimini bloke eder, oksidanları temizler, toksik serbest radikallerin daha az toksik maddelere dönüştürülmesini sağlarlar (33).

Hücrede bulunan antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar. Bunlarda beslenme açısından endojen ve eksojen antioksidanlar, çözünürlüklerine bağlı olarak da suda çözünür ve yağda çözünür antioksidanlar olarak sınıflandırılırlar. Hücrede homeostazın korunmasında yer alan başlıca antioksidan enzimler; süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazdır (30).

2.2.1.2. Enzimatik Antioksidanlar

2.2.1.2.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi (E.C. 1.15.1.1), aktif bölgelerinde Cu-Zn (bakır-çinko), Mn (mangan) ve Fe (demir) atomu içeren, süperoksit anyonunun moleküler oksijen ve hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen endojen bir metalloenzimdir (34).



Enziminin aktif bölgesinde bulunan metal kofaktörlere göre adlandırılan SOD izoformlarından Cu-Zn-SOD sitoplazma ve ekstrasellüler matrikste, Mn-SOD mitokondride yer alırken, Fe-SOD prokaryotlarda ve bitkilerin kloroplastlarında bulunur (35).

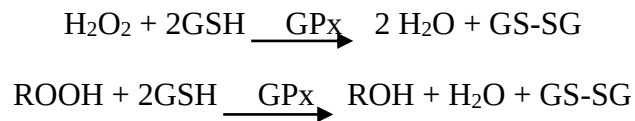
2.2.1.2.2. Katalaz

Katalaz (KAT) (E.C. 1.11.1.6), diğer adıyla H_2O_2 oksidoredüktaz, her zinciri 500'den fazla aminoasit uzunluğunda olan dört polipeptid zincirinden oluşan tetramerik bir enzimdir ve enzimin aktif bölgesinde H_2O_2 ile reaksiyona girmesini sağlayan dört porfirin-hem (demir) grubu içermektedir (36). KAT enzimi H_2O_2 'in su ve oksijene dismutasyonunu katalizler.



2.2.1.2.3. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GPx) (E.C.1.11.1.19), oksidan olarak H_2O_2 ve organik hidroperoksitleri, elektron vericisi olarak da glutatyon (GSH) kullanan selenyum-bağımlı oksidoredüktazdır. GPx ailesinin 8 izoenzimi bulunmaktadır. GPx1-4'ün katalitik bölgesinde selenosistein yer alırken, GPx5-8'de ise sistein bulunmaktadır (37). Oksitlenmiş glutatyonun (GSSG) indirgenmiş glutatyon (GSH) redüksiyonunu glutatyon redüktaz enzimi katalizler.



2.2.1.3. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

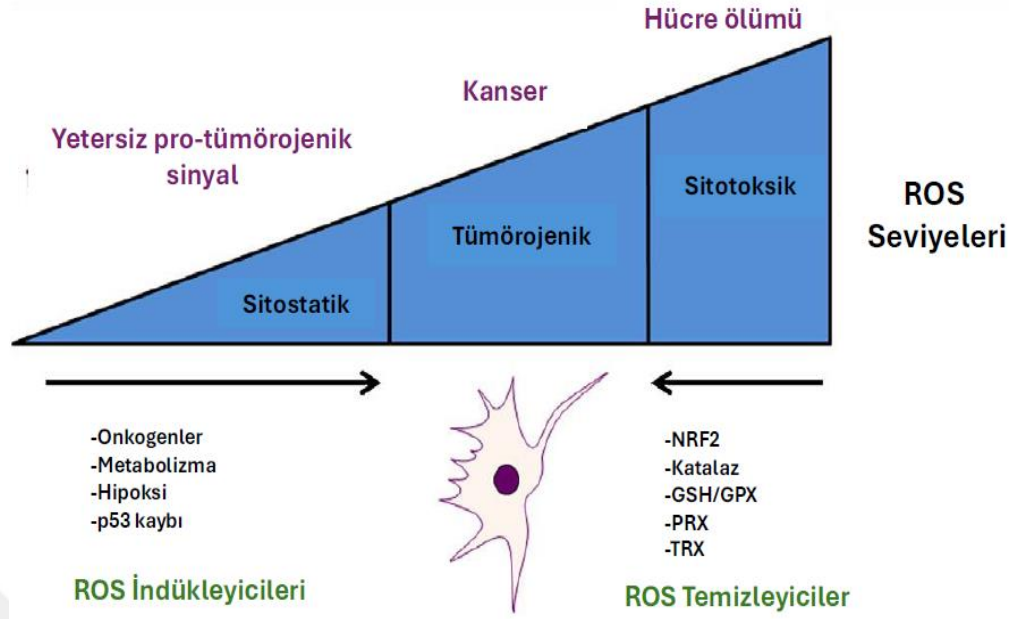
GSH, α -lipoik asit, melatonin ve koenzim Q10 (Ubikinon) endojen enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılırken; C ve E vitamini, karotenoidler (β -karoten, likopen vb.), polifenoller (fenolik asitler, kurkumin, resveratrol, kateşin vb.) ve flavonoidler (katekol, kuersetin vb.) ise eksojen enzimatik olmayan antioksidanlardır (30).

2.3. Oksidatif Stres ve Kanser

Hücrelerde ROS'un normal üretimi, çoğalma ve farklılaşma için gereklidir, sıkı bir şekilde düzenlenir ve hücre içi antioksidanlar ile kontrol altına alınır. Endojen ve eksojen uyaranların etkisi sonucu hücrede artan ROS oksidatif strese neden olur. Hücrelerdeki oksidan ve antioksidan süreçler arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkan oksidatif stres, çok sayıda kronik bozukluğun patogeneğinde önemli bir rol oynar (31). Kanseri gelişimi, çeşitli endojen ve eksojen uyaranların etkisi ile meydana gelen hücresel ve moleküler değişikliklerin sonucunda gelişen karmaşık bir süreçtir. Kanseri hücreleri, bazal koşullar altında normal hücrelerle karşılaştırıldığında sürekli olarak "yüksek" ROS seviyelerine sahiptir. Artan ROS üretimi, onkogen aktivasyonuna, metabolizma artışına, mitokondri ve peroksisomlarda işlevin azalmasına, reseptörlerin anormal aktivasyonuna, hipoksiye ve SOD, KAT ve GPx gibi pro-oksidan enzimlerin aktivitelerinin artmasına neden olur (38). ROS; DNA hasarı, bağışıklık sisteminden kaçınma, otofaji ve apoptozu kontrol eden sinyal yollarını düzenleme ve anjiyogenez gibi çeşitli mekanizmalarla tümör oluşumunu artırır (39). Oksidatif DNA hasarı karsinogenezin temel özelliklerinden birisidir ve DNA bazlarının hidroksillenmesi karsinogenezde önemli bir olaydır; genetik mutasyonlara neden olarak ve normal gen transkripsiyonunu değiştirerek sağlıklı hücre büyümesine müdahale eder (40). Hidroksil radikalleri DNA'ya bağlanarak mutasyon riskini artıran 8-OH deoksiguanozin (8-OHdG) üretirler. 8-OHdG, DNA replikasyonu sırasında GC çiftlerini TA çiftlerine dönüştürerek kansere neden olan mutajenezin başlamasına neden olur. Bu nedenle, 8-OHdG molekülleri, DNA mutasyonunda serbest radikallerin tespiti için belirteç olarak kullanılabilir (41). Aşırı ROS üretiminin kanseri hücrelerinin proliferasyonu, metastazı, invazyonu ve kötü prognozu üzerinde etkisi vardır. ROS matriks degradasyonu, hücre-hücre kontaktı, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi, gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla kanseri hücrelerinin

migrasyonuna katkıda bulunur (42). ROS ayrıca, proteinlerdeki aromatik aminoasitlerin oksidasyonu, metiyonin ve sistein kalıntılarındaki sülfidril (-SH) gruplarının oksitlenmesi ve intramoleküler disülfid köprülerinin oluşmasıyla konformasyonda meydana getirdiği değişiklikler sonucu protein aktivitesinin değişmesi gibi belirli protein modifikasyonlarına neden olur (43). Reseptörler, sinyal iletim proteinleri, enzimler ve taşıyıcılar üzerindeki bu değişiklikler proteinlerin işlevini bozar. Lipitler de en yaygın olarak hidroksil ve hidroperoksil radikali tarafından oksitlenir ve bu durum “lipit peroksidasyonu” olarak bilinir. Lipid peroksidasyonunun ürünleri, uzun yarı ömürleri ve difüzyon kapasiteleri olan lipit hidroperoksit (LOOH), malondialdehit (MDA), propanal, hekzanal ve 4-hidroksinonenaldir (4-HNE) (44). Membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu membran akışkanlığında azalmaya, membran geçirgenliğinde artışa ve membran proteinlerinde hasara neden olur. Düşük lipid peroksidasyonu, hücre sağkalımını teşvik eden antioksidan savunma sistemlerini uyarırken, orta veya yüksek lipid peroksidasyon koşulları altında, hücreler nekroz veya apoptoz programlanmış hücre ölümünü indükler (45). Bu nedenle, lipid peroksidasyonu karsinogeneizde rol oynar, ve MDA, 4-HNE ve izoprostanlar gibi peroksidasyon ürünleri biyobelirteçler olarak kullanılabilir ve kolorektal kanserde potansiyel bir terapötik strateji olarak hareket edebilir (46).

ROS'un kanser riskini artırabilmesinin en önemli nedenlerinden birisi, antioksidan savunmaların oksidatif strese karşı koruma sağlamak için yetersiz olması, özellikle $O_2^{\cdot-}$ radikal tutucu enzimlerin devre dışı bırakılmasıdır. Bu nedenle, SOD enziminin aktivitesinde azalma ciddi oksidatif stres hasarına neden olur. Diğer yandan H_2O_2 'i elimine eden enzimleri kodlayan bazı genlerin kaybı, oksidatif stresin artmasına neden olarak tümör oluşumuna zemin hazırlar (47). Kanser hücrelerinde, mitokondriyal disfonksiyon ve metabolik değişikliklerin neden olduğu sürekli oksidatif stres durumu vardır. Onkogen aktivasyonu, artmış metabolizma, hipoksi veya tümör baskılayıcı p53'ün kaybı gibi kanser hücresi özellikleri, hiper-aktif hücre sinyalleşmesine ve pro-tümörigenik sinyal olaylarına izin veren ROS birikimine yol açabilir (48). Normal koşullar altında, artan ROS seviyeleri, hücre ölümünü uyarır, ancak kanser hücreleri oksidatif strese karşı koymak, oksidatif hasarı ve hücre ölümünü önlemek, ROS seviyelerini sitotoksik sınırın altında tutmak için ROS temizleme sistemlerinden olan “nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2” (NRF2) ekspresyonunu indükleyerek, kanser hücrelerini oksidatif stresten korur (Şekil 2-5) (49).



Şekil 2-5: Kanser hücrelerinin reaktif oksijen türevlerine adaptasyonu (48)

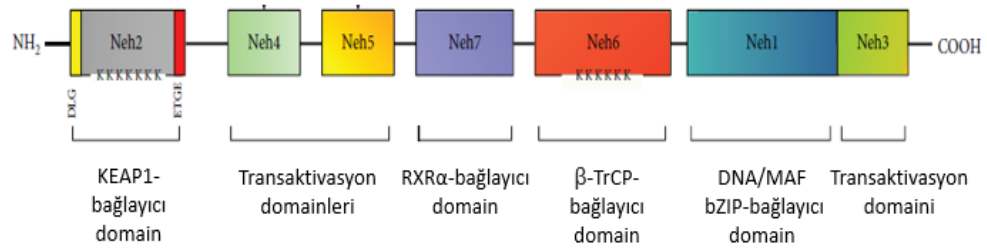
2.4. Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2

2.4.1. NRF2 Yapısı

İlk olarak 1994 yılında karakterize edilmiş, “nuclear factor, erythroid-derived 2-like 2” (NFE2L2) geni tarafından kodlanan ve “cap ‘n’ collar temel lösün fermuar transkripsiyon faktör” (CNC-bZip) ailesine ait bir transkripsiyon faktörü olup, oksidatif hasara karşı koruyucu rolü olan genlerin ekspresyonunu düzenleyen hücrel antioksidan yanıtın başlıca düzenleyicisidir (50,51).

NRF2 aminoasit dizisi, N-terminalinde Neh2 ve C-terminalinde Neh3 domaini bulunmak üzere Neh1-Neh7 olarak adlandırılan yedi homolog bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2-6) (52) (53). Neh3, Neh4 ve Neh5 transkripsiyonel aktivasyon domainleridir ve NRF2’nin hedef genlerinin ekspresyonunu aktive edebilmesi için Neh4 ve Neh5 hem bireysel olarak hem de birlikte cAMP yanıt eleman bağlayıcı proteine (CREB), Neh3 ise kromo-ATPase/helikaz DNA bağlayıcı proteine (CHD6 proteini) bağlanır (54,55). Neh1, DNA ve küçük kas aponörotik fibrosarkom-small musculoaponeurotic fibrosarcoma (sMAF) proteinin bağlanması için bir temel lösün fermuar motifi olan bZIP domaini içerir (56). Neh1 ve Neh7 domainleri arasında konumlanan Neh6 domaini serin kalıntıları içerir ve Beta-transdusin tekrarları içeren proteinler (β -TrCP) tarafından tanınarak NRF2 aktivitesinin redokstan bağımsız olarak negatif düzenlemesinde rol alır

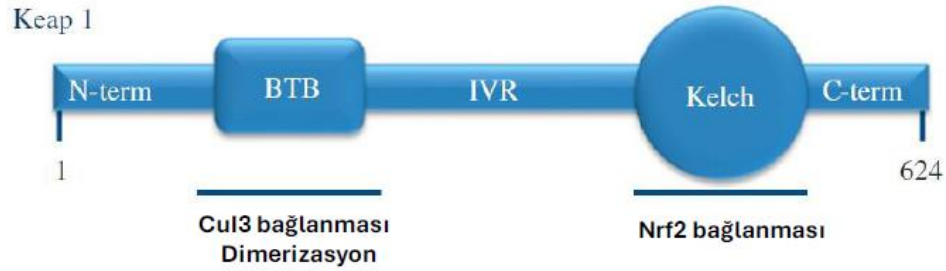
(57). Neh7 domaini, retinoik-alfa X reseptörü (RXRa) ile etkileşerek NRF2 aktivitesini baskılar ve böylece NRF2 hedef genlerinin transkripsiyonunu inhibe eder (53). NRF2'nin N-terminal ucunda bulunan Neh2 major düzenleyici domainidir. NRF2 aktivasyonunu negatif olarak düzenleyen “Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1” (Keap1), Neh2 domaininin C-terminalinde bulunan ETGE motifi ve N-terminalinde bulunan DLG motifi ile etkileşir (58).



Şekil 2-6: NRF2 yapısı (59)

2.4.2. NRF2 Aktivitesinin Düzenlenmesi

Fizyolojik koşullarda, NRF2 sitoplazmada yer alır ve düşük düzeylerde tutulur; ancak oksidatif stres (OS) durumunda NRF2 nükleusa geçerek spesifik genlerin ekspresyonunu aktive eder (52). NRF2 düzeyinin sitoplazmada düşük düzeylerde tutulması başlıca Keap1 tarafından sağlanır. Keap1 69 kDa ağırlığında ve geniş kompleks, Tramtrack ve Bric-a-Brac (BTB), araya giren bölge (IVR), çift glisin tekrarı veya Kelch tekrarı (DGR/Kelch), C-terminal bölgesi (CTR) ve N-terminal bölge olmak üzere beş domainden oluşan sitoplazmik bir proteindir (Şekil 2-7) (60). BTB domaini Keap1'in Cullin3 (Cul3) ile bağlanmasına aracılık ederken, DGR/Kelch domaini ise NRF2 yapısında yer alan Neh2 domaini üzerindeki ETGE ve DLG motifleri ile etkileşir ve Keap1-Cul3-E3 ubiquitin ligaz kompleksine NRF2'nin bağlanmasının ardından, redoks bağımlı olarak NRF2'nin proteazomal degradasyonu gerçekleşir (58). OS varlığında, Keap1 yapısında yer alan sistein kalıntıları modifikasyona uğrar ve bu durum Keap1'in konformasyonel yapısında değişime neden olur. Bu durum NRF2'nin Keap1-Cul3 kompleksine olan afinitesinin azalmasına yol açarak NRF2'nin ubiquitinizasyonunu inhibe eder ve böylece Keap1 aracılı NRF2 yıkımı önlenmiş olur (61).



Şekil 2-7: Keap1 yapısı (60)

NRF2'nin başlıca regülatörü Keap1 olmasına rağmen, NRF2 aktivitesini düzenleyen farklı yollar da bulunmaktadır. Bunlardan birisi SCF/ β -TrCP E3 ubiquitin ligazdır. Uzun süreli oksidatif stres koşullarında glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β) aktivitesi artar. GSK-3 β , NRF2 domaini olan Neh6 üzerindeki serin kalıntılarının fosforilasyonunu ve SCF/ β -TrCP E3 ubiquitin ligaz tarafından tanınıp bağlanmasını ve yıkımını uyarır. Böylece NRF2'nin stabilizasyonu KEAP1'den bağımsız olarak kontrol edilir (57,62). NRF2 baskılayıcısı olan RXRa, Neh7 domainine bağlanarak redokstan bağımsız olarak antioksidan yanıt elemanı (ARE) gen transkripsiyonunu azaltır (53). Bunlara ek olarak, endoplazmik retikulum membranı ile ilişkili yeni bir E3 ubiquitin ligaz olan HRD1'in NRF2'nin negatif düzenleyicisi olduğu tanımlanmıştır. HRD1'in, NRF2'nin Neh4/Neh5 domainleri ile etkileşime girerek endoplazmik retikulum stresi altında ubiquitinizasyonunu ve degradasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (63).

NRF2 sinyal yolağı genetik, epigenetik ve transkripsiyonel değişiklikler dahil olmak üzere birçok mekanizma tarafından etkilenmektedir. Kanser hücrelerinde NRF2 aktivasyonu; NRF2 ve KEAP1 genlerindeki somatik mutasyonlar, KEAP1 geninin epigenetik susturulması, KEAP1 ile etkileşen proteinlerin birikimi ve metabolitler tarafından KEAP1'in sistein modifikasyonu sonucunda KEAP1 ve NRF2 bağlanmasının bozulmasına bağlı olarak meydana gelebilir (64). NRF2 (fonksiyon mutasyonlarının kazancı)'nin veya KEAP1 (fonksiyon mutasyonlarının kaybı)'in somatik mutasyonları, NRF2 ve hedef genlerinin aktivasyonlarına yol açar ve bu mutasyonlar kolon kanseri dahil olmak üzere birçok farklı kanser türünde tanımlanmıştır. NRF2 mutasyonları Neh2 domaini üzerinde bulunan KEAP1 bağlanma bölgeleri (DLG1 ve ETGE) üzerinde meydana gelir. KEAP1 mutasyonları

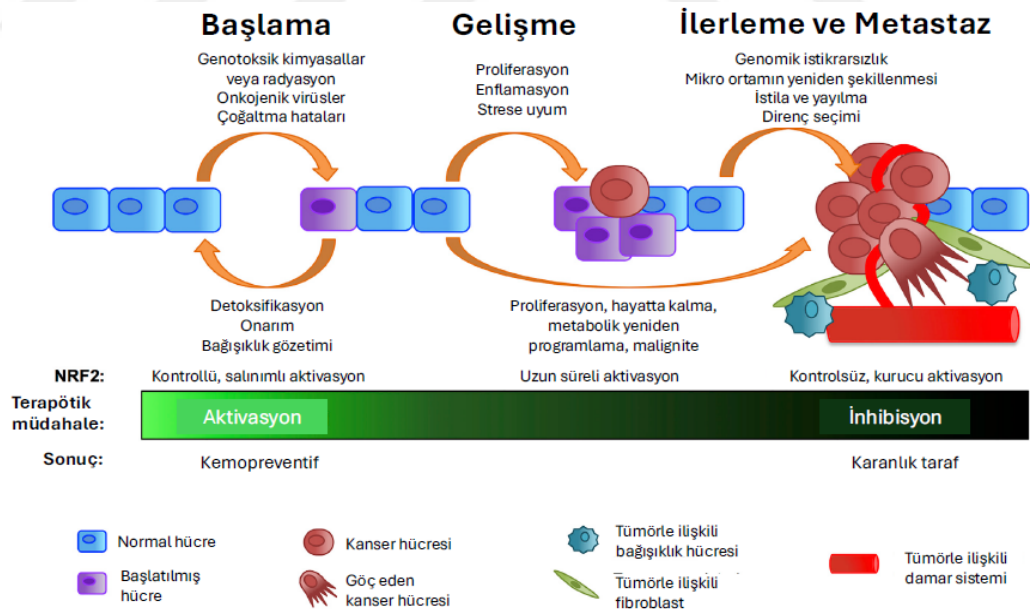
konformasyonel değişikliğe neden olur ve bu durum onun NRF2'ye olan afinitesini azaltarak NRF2'nin anormal aktivasyonuna yol açar (65). KEAP1'in somatik mutasyonlarının yanında, kolon kanserinde KEAP1 geninin promotör bölgesindeki epigenetik değişiklikler de kanser hücrelerinde NRF2 aktivasyonunun artmasına neden olmaktadır. KEAP1'in promotör bölgesinin aşırı metilasyonunun KEAP1 ekspresyonunun down-regülasyonuna ve nukleusta NRF2 birikimine neden olduğu gösterilmiştir (66). KEAP1 mutasyonunun yanı sıra NRF2 mutasyonu da meydana gelmektedir. Kolon kanserinde NRF2 promotör bölgesinin hipometilasyonuna bağlı olarak NRF2'nin aşırı ekspresyonu ve aktivitesinde artış ile aynı zamanda artan kemorezistansla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (67). KEAP1 metilasyonunun veya NRF2 demetilasyonunun tersine çevrilmesi, antikanser ilaç duyarlılığını arttırmak için yeni bir strateji olabilir. NRF2 ve KEAP1 yolağındaki genetik değişiklikler proonkojenik aktivasyonun önde gelen nedenlerinden biridir. NRF2 promotör bölgesinde tek nükleotid polimorfizminin (rs6721961), NRF2 gen ekspresyonunun azalması ile sonuçlandığı, mevcut ve hatta eski sigara içenlerde akciğer kanser riskini arttırdığı gösterilmiştir (68). Yapılan son çalışmalar, anormal NRF2 sinyalinden sadece somatik mutasyonların sorumlu olmadığını göstermektedir ve ayrıca kopya numara varyasyonları (CNV) ve tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) dahil diğer genetik değişikliklerin yakın gelecekte NRF2 fonksiyonlarının anahtar düzenleyicisi olarak ortaya çıkması beklenmektedir (64).

2.5. Kanserde NRF2 ve Oksidatif Stres

NRF2'nin regülatör bölgelerinde ARE içeren 200 üzerinde hedef geni tanımlanmıştır. NRF2 aktivasyonunun genetik ürünleri, redoks homeostazının düzenlemesi, ilaç/ksenobiyotik metabolizması ve detoksifikasyon, hücresel enerji metabolizması, demir homeostazı, aminoasit metabolizması, DNA onarımı, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, otofaji, apoptoz ve mitokondriyal fizyoloji dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri kapsayan fonksiyonel kategorilerde sınıflandırılabilir. NRF2'nin koruyucu rolleri göz önüne alındığında, hedef genlerinin ekspresyonu yoluyla oksidatif hasarı onararak ve ROS'u, DNA'ya zarar veren ajanları ve karsinojenleri elimine ederek tümör başlangıcını ve kanser metastazını önlemektedir (69). Hücrede ROS varlığında, sitoplazmada lokalize olan NRF2 nukleusa girer ve spesifik hedef genlerinin ekspresyonunu indükler. Nukleusta NRF2 DNA'ya doğrudan

bağlanamaz, sMAF proteinlerine ihtiyaç duyar. NRF2, Neh1 domaini üzerinden sMAF proteinleri ile heterodimerize olur ve antioksidan ve detoksifiye edici rolleri olan GPx, SOD ve KAT gibi çok sayıda sitoprotektif genlerin ARE-bağımlı ekspresyonunu destekleyerek ROS'u ortadan kaldırır (56,70).

NRF2 sağlıklı hücrelerde antioksidan savunmada yer alan genlerin aktivasyonunu sağlar ve reaktif oksijen türevlerini ortadan kaldırarak hücre canlılığına destek olur. Aslında, NRF2 sadece normal hücrelerin değil, aynı zamanda kanser hücrelerinin de hayatta kalmasını teşvik eder ve bu durum tümör hücrelerinde NRF2 aktivasyonunun hastalığın ilerlemesini destekleyebileceğini göstermektedir. 'NRF2'nin karanlık tarafının' tanımlanması ile, NRF2'nin kanserde bir tümör baskılayıcı olarak mı yoksa bir onkogen olarak mı hareket ettiği konusunda belirsizliğine neden olmaktadır. NRF2'nin antioksidan rolü kanserin başlamasında koruyucu rol oynayabilir ancak, ileri tümör hücrelerinde NRF2 hiperaktivasyonu, kanser hücrelerini artan oksidatif stresten, kemoterapötik ajanlardan veya radyoterapiden koruyarak hayatta kalmalarını destekleyebilecek bir ortam yaratmaktadır (Şekil 2-8) (38,71).



Şekil 2-8: NRF2'nin kanserde ikili rolü (38)

NRF2'nin bazal seviyedeki işlevinin, kolon kanser gelişimini önlemek için gerekli olabileceği ve NRF2 genindeki değişikliklerin kolon kanser gelişimini

destekleyebileceği bilinmektedir (7). Kolon kanserinde yapılan çalışmalar, NRF2 ekspresyonunun artmasının bağırsak hücrelerini oksidatif strese koruyabildiğini göstermektedir. Bu nedenle NRF2'nin aktivasyonunun kolon kanserinin önlenmesinde etkili olabileceği öngörülmektedir (72). Bununla birlikte, NRF2 kolon kanserinde kemoterapötik ilaçlara karşı direnç gelişmesine neden olabildiği için, kemoterapinin etkinliğini artırmak amacıyla NRF2'nin inhibe edilmesinin daha doğru bir strateji olabileceği düşünülmektedir. Kolon kanserinde NRF2'nin aşırı ekspresyonu aynı zamanda kanser hücrelerinin çoğalmasını ve metastazını da destekleyebilmektedir. Bu nedenle NRF2 ekspresyonunun inhibe edilmesinin kolon kanser tedavisinde etkili olabileceği görüşü savunulmaktadır (73).

NRF2, kanserde çeşitli fizyolojik süreçlerde ve düzenleyici mekanizmalarda rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinin, kontrolsüz büyümelerinin getirdiği enerji ihtiyaçları karşılamak için merkezi metabolizmalarını yeniden programladıkları iyi bilinmektedir. NRF2 iki farklı mekanizma ile birden fazla metabolik yolu kontrol edebilir: birincisi, anahtar metabolik enzimlerin doğrudan transaktivasyonunu içerirken, ikincisi peroksizom proliferatörüyle aktive edilen reseptör (PPAR) ve PI3K/AKT/mTOR gibi diğer sinyal yollarını kontrol eden proteinlerin modülasyonuna dayanmaktadır (74,75). NRF2, glikoz-6-P dehidrogenaz (G6PDH) ve fosfo glikonat dehidrogenaz (PGD) gibi NADPH üreten enzimleri kodlayan genlerin veya yine pentoz fosfat yolunda yer alan transketolaz ve transaldolaz-1 gibi enzimlerin ekspresyonunu arttırabilir (8). NRF2'nin aşırı ekspresyonu G6PDH/HIF-1a aktivasyonu üzerinden epitelden mezenkimale geçişi destekleyerek tümör proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu arttırabilmektedir (76).

2.6. NRF2 ve Glutamin Metabolizması

Glutamat ve glutamin esansiyel olmayan aminoasitlerdir. Glutamin, biyosentetik bir substrat olarak çok yönlü kullanımı nedeniyle hem plazmada hem de dokularda en bol bulunan amino asittir (500-800 $\mu\text{M/L}$) (77).

Kanser hücrelerinde başlıca yakıt olarak glikoz kullanılmasına rağmen, eş zamanlı olarak glutamin bağımlı mitokondriyal solunum aktiftir. Glutamin, glutaminaz enzimi ile glutamata dönüştürülür ve glutamat da glutamat dehidrogenaz enzimi ile α -ketoglutarata dönüştürülerek hem trikarboksilik asit döngüsü üzerinden enerji hem de kanser hücresinin büyümesi için gerekli ara ürünler üretilir (11).

Glutamat ve glutamin sadece karbon kaynağı olarak değil, aynı zamanda pürin, pirimidin, poliamin, esansiyel olmayan aminoasitlerin sentezi ve de glutatyon sentezi için gereklidir. Glutatyon sentezinde yer alan glutamin metabolizması, redoks dengesinin sağlanması açısından önemlidir (78).

Kanser hücrelerinin, kontrolsüz büyümelerinin getirdiği enerji ihtiyacını karşılamak için metabolizmalarını yeniden programladıkları iyi bilinmektedir. ATP ve diğer enerji sağlayan ekvalentlere, hücre proliferasyonunda makromolekül sentezi için biyokimyasal ara ürünlere ve artmış ROS düzeylerini azaltmak için indirgeyici kapasitenin artmasına ihtiyaç duyar. Glutamin sadece metabolizma ara ürünü ve redoks dengesinin denetleyicisi olarak yer almaz, aynı zamanda glutamin bağımlı kanserlerde moleküler bir havuzdur. Birçok kanser glutamin bağımlı olması nedeniyle, glutamin pozitron emisyon tomografisi (PET) yönteminde kullanılabilir. ¹⁸F-4-fluoroglutamin, özellikle glioma gibi glutamin bağımlı tümörler tarafından alınması nedeniyle PET için glutamin bazlı yöntemin kullanılması glikoz işaretli PET yöntemine göre daha etkili olabilir veya glutamine duyarlı kanser türlerinin sınıflandırılmasında yararlı olabilir (79). Ayrıca glutamin-PET ile, glutaminaz inhibitörlerinin varlığında, glutamin seviyelerinin takibi ve tümör hücrelerinin glutaminaz tedavisine yanıtının değerlendirilmesi yapılabilir (80).

NRF2 tarafından sağlanan antioksidan ve detoksifikasyon aktivitesi kanser hücrelerinin büyümesi için avantaj sağlar, ancak NRF2 sadece antioksidan savunmada değil aynı zamanda metabolizma üzerinde de modülatör etki göstererek kanser gelişimine etki edebilir. NRF2, kanser hücrelerinde glutamin metabolizmasının kontrolünde de son derece etkilidir. NRF2 aracılı oksidatif stres yanıtı NADPH ve glutatyon sentezinde yer alan glutaminaz, γ -glutamilsistein sentetaz, glutatyon sentetaz, glutatyon redüktaz, tiyoredoksin redüktaz enzimleri ile süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerini aktifler (81). NRF2 glutamini glutatyon sentezine yönlendirir, ayrıca glutatyon sentezi için önemli enzim olan gama-glutamil-sisteinil-ligaz (GCL) enziminin katalitik ve düzenleyici alt birimlerini kodlayan genleri doğrudan aktive ederek indüklemektedir (82).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemeler

- NRF2 Poliklonal Primer Antikor (Thermo Fisher)
- GAPDH Monoklonal Primer Antikor (Thermo Fisher)
- Sekonder Antikor (Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Invitrogen)
- Protein Ladder (iNtRON Biotechnology GangNam-STAIN)
- RIPA Lizis ve Ekstraksiyon Tamponu (Thermo Scientific)
- Proteaz İnhibitör Kokteyl (Sigma-Aldrich)
- Fenilmetilsülfonil Florür Proteaz İnhibitörü (Thermo Scientific)
- Bikinkoninik asit (BCA) Protein Ölçüm Kiti (Thermo Scientific Pierce)
- West Pico Plus Kemilüminesan Substrat (Thermo Scientific Supersignal)
- Bolt LDS Sample Tamponu (Invitrogen)
- RNA izolasyon Kiti (Invitrogen PureLink)
- cDNA Reverse Transkripsiyon Kiti (Applied Biosystems)
- qPCR Green Mix Hi-ROX (Ampigene)
- Ksantin (Sigma-Aldrich)
- Ksantin oksidaz (Sigma-Aldrich)
- Nitrotetrazolium Blue chloride (Sigma-Aldrich)
- Amonyum sülfat (Sigma-Aldrich)
- Sığır Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)
- Sitrik asit monohidrat (Sigma-Aldrich)
- Potasyum iyodür (Sigma-Aldrich)
- Sodyum asetat.3H₂O (Sigma-Aldrich)
- 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (Sigma-Aldrich)
- FeCl₃.6H₂O (Sigma-Aldrich)

- Ürik asit (Sigma-Aldrich)
- 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid) (Sigma-Aldrich)
- Adenosin 5-difosfat disodyum tuzu (ADP) (Sigma-Aldrich)
- Trietanolamin hidroklorür (Sigma-Aldrich)
- α -Ketoglutarik asit sodyum tuzu (Sigma-Aldrich)
- β -Nikotinamid adenin dinükleotid, indirgenmiş disodyum tuzu (NADH) (Sigma-Aldrich)
- Tris bazı (Sigma-Aldrich)

3.2. Kullanılan Cihazlar

- Distile su cihazı (Millipore)
- Next Advance Bullet Blender Storm Doku Homojenizatörü
- Next Advance 2.0 mm Metal ve Cam Boncuklar
- BIO-RAD ChemiDOC MP Görüntüleme Cihazı
- BIO-RAD Protein Elektroforez Ekipmanları
- DNA/RNA UV Steril Kabin
- Real Time PZR Cihazı (Bioer QuantGene 9600)
- Spektrofotometre (Thermo Multiskan SPECTRUM)
- -80 °C derin dondurucu
- Vorteks
- Hassas Terazî
- + 4°C ve -20 °C Buzdolabı
- Yüksek devirli soğutmalı mikrosantrifüj (Beckman Coulter Microfuge 20R)
- Santrifüj (Hettich)
- PowerPac Basic Güç kaynağı (BioRad)
- Otoklav
- Otomatik pipetler

3.3. Biyolojik Örneklerin Toplanması

Çalışmamız, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 19.07.2022 tarihinde onay alındı (Sayı: 1003703). Çalışma grupları Bilgilendirilmiş Onam Formunu imzalayan 30 gönüllü hasta ve 30 gönüllü sağlıklı bireylerden oluşturuldu. Çalışmaya, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Filiz Akyüz ve Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Genel Cerrahi kliniğinde Prof. Dr. Soykan Arıkan tarafından takip edilen, ultrasonografi ve patolojik testlerle kolon kanseri teşhisi konulan hastalar dahil edildi. Hasta grubunda kolon kanseri dışında kanser tanısı almış olanlar ve 40 yaşın altındakiler çalışmaya dahil edilmedi. Kolon kanser tanısı konulmuş hastalardan cerrahi operasyonla tümörlü doku ve her tümör dokusuna ait tümörlü olmayan kolon dokusu ile venöz kan örneği alındı. Kontrol grubu ise, herhangi bir patolojik bulgusu, benign ya da selim tümörü ve tercihen ailesinde kanser hikayesi olmayan gönüllü 30 sağlıklı bireylerden seçildi ve bu kişilerden venöz kan örneği alındı. Hasta ve kontrol grubuna 40-65 yaş aralığındaki bireyler dahil edildi.

Hastalardan alınan doku örneklerinin bir kısmı gen ekspresyon analizi için RNA later içeren kriyojenik tüplere, bir kısmı ise fosfat buffer saline (PBS) (pH 7,4) içeren tüpe alındı. PBS içeren tüpe alınan dokular, PBS ile yıkandıktan sonra western blot ve spektrofotometrik analizler için -80°C de saklandı. Steril EDTA'lı ve kuru tüplere alınan kan örnekleri ise 5000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek serum ve plazma elde edildikten sonra ependorflara porsiyonlanarak -80°C' ye kaldırıldı.

3.4. NRF2 Gen Ekspresyon Analizi

3.4.1. Dokulardan RNA İzolasyonu

Gen ekspresyon analizi için RNA later içerisinde kriyojenik tüplerde kaldırılmış olan doku örneklerinden, RNA izolasyon kitinin (Invitrogen PureLink) protokolüne uygun şekilde RNA izolasyonu yapıldı.

Dokuların ağırlıkları tartılıp, RNase içermeyen tüplere alındı ve üzerlerine kit protokolünde belirtildiği şekilde (30 mg doku için 0.6 mL lizis tamponu) uygun miktarlarda lizis tamponu eklendikten sonra metal boncuklar kullanılarak doku homojenizatörü ile dokular homojenize edildi. 12,000 g'de 2 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatantlar RNase içermeyen yeni tüplere aktarıldı. Üzerlerine bir hacim %70 etanol eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra spin kolona aktarıldı ve oda

sıcaklığında 12,000 *g*'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Daha sonra spin kolon sırasıyla 1 defa 700 μ L yıkama tamponu 1 ve 2 defa 500 μ L yıkama tamponu 2 ile yıkandı. Spin kolon yeni bir toplama tüpü içerisine alındı ve spin kolonun merkezine 30-100 μ L RNase içermeyen su eklendi. 1 dakikalık oda sıcaklığındaki inkübasyonun ardından 12,000 *g*'de 2 dakika santrifüj edilerek elde edilen RNA'lar çalışma yapılana kadar – 80 °C derin dondurucuda saklandı.

3.4.2. cDNA Sentezi

RNA örneklerinin NanoDrop2000 cihazı ile saflık ve konsantrasyonları ölçülerek, RNA konsantrasyonları eşitlendikten sonra “High Capacity cDNA Reverse Transkripsiyon Kit (Applied Biosystems)” protokolü uygulanarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Her bir 0,2 mL'lik steril reaksiyon tüpüne 2 μ L 10x RT tamponu, 0,8 μ L 25x dNTP karışımı, 2 μ L 10x RT random primer, 1 μ L reverse transkriptaz enzimi (50 U/mL), 4,2 μ L nükleaz içermeyen distile su ve 10 μ L RNA örneği eklenerek reaksiyon hacmi 20 μ L'ye tamamlandı. PZR cihazına reaksiyon koşulları 25 °C 10 dakika, 37 °C 120 dakika, 85 °C 5 dk ve 4 °C' de ∞ olarak ayarlandı ve reaksiyon başlatıldı. Sentezlenen cDNA örnekleri NRF2 gen ekspresyon analizinin yapılacağı zamana kadar -20 °C'de saklandı.

3.4.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

NRF2 gen ekspresyon analizi “Bioer QuantGene 9600” gerçek zamanlı PZR cihazında çalışıldı.

NRF2 ileri primer dizisi, 5'-TCA GCG ACG GAA AGA GTA TGA-3'

NRF2 geri primer dizisi, 5'-CCA CTG GTT TCT GAC TGG ATG T-3'

GAPDH geri primer dizisi, 5'- GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'

GAPDH ileri primer dizisi 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'

PZR protokolünde, 96 kuyucuklu plate içerisinde her bir örnek için 5 μ L “syber green mastermix”, 3,9 μ L RNase içermeyen distile su, 0,5 μ L primer ve 0,6 μ L cDNA sentez ürünü kullanıldı. Reaksiyon koşulları, 95 °C 2 dakika (1 döngü), 95 °C 5 saniye ve 57 °C 20 saniye (40 döngü) olarak çalışıldı.

3.5. NRF2 Western Blot Analizi

3.5.1. Dokulardan Proteinlerin İzolasyonu ve Konsantrasyonlarının Ölçümü

Tümör ve tümör olmayan dokulardaki protein izolasyonu proteaz inhibitör kokteyl ve fenilmetilsülfonil florür proteaz inhibitörü içeren RIPA tamponu ile gerçekleştirildi. Dokular tartıldıktan sonra buz üzerindeki tüplere alınarak ağırlıklarına göre 200-500 µL arasında değişen hacimlerde RIPA tamponu eklendi. Her bir tüp içerisine cam bilyeler eklenerek homojenizatör cihazı ile soğuk ortamda dokular homojenize edildi. 14,000 g ve 4 °C'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant temiz bir ependorfa alınarak protein konsantrasyon tayini yapıldı. Protein konsantrasyonu bikinkoninik asit (BCA) protein tayin kiti ile ölçüldü.

Protein örnekleri dikey elektroforez sistemi kullanılarak SDS-Page ile yürütüldü. Dikey elektroforez tankının içerisine tris-glisin ve SDS içeren 1x running tamponu eklendi. Tanka yerleştirilmiş olan jelin tarakları çıkarıldıktan sonra tüm kuyuları running tamponu ile pipetaj yoluyla yıkandı. İlk baştaki kuyuya protein ladder yüklendi. 20 µg/mL protein örnekleri ve yüklenen örnek hacminin 3 katı kadar "4X LDS Sample Tamponu" ile karıştırılarak 5 dakika 95°C' de inkübasyonun ardından her bir kuyuya yüklendi. 150 volt akım ile 60-70 dakika yürütme işlemi yapıldı. Yürütmenin ardından jeller tank içerisinden çıkarılarak transfer işlemi yapıldı.

3.5.2. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi

Transfer öncesinde, tris, glisin ve metanol ile hazırlanan 1x transfer tamponu +4°C' de soğutuldu. Kullanılacak olan sünger ve filtre kağıtları 1x transfer tamponu içerisinde dengeye gelmesi için bekletilirken, poliviniliden diflorür (PVDF) membranın aktivasyonunu sağlamak için metanolde ve ardından 1x transfer tamponu içerisinde ikişer dakika bekletildi. Her bir kasete sırasıyla sünger-filtre kağıdı-membran-jel-filtre kağıdı-sünger yerleştirilerek işleme hazır hale geldikten sonra tank içerisine yerleştirildiler ve tank blotting seviyesine kadar soğuk 1x transfer tamponu ile doldurulduktan sonra transfer işlemi +4°C' de, 100 V akımda ve 1 saat gerçekleştirildi.

3.5.3. Bloklama, primer ve sekonder antikor ile inkübasyon

Transfer işleminin ardından kasetler açıldı ve membranların kurumasına izin verilmeden hemen çıkarıldıktan sonra 1x TBST ile yıkandı. 1x TBST ile hazırlanmış olan %5'lik yağsız süt tozunda 1 saat inkübe edilerek bloklama işlemi yapıldı.

Bloklamanın ardından membranlar 1x TBST ile yıkandı. NRF2 ve GAPDH primer antikorları %5'lik yağsız süt tozu ile sırasıyla 1:3000 ve 1:2000 oranında hazırlandı ve membranlar 1 gece +4°C' de inkübasyona bırakıldılar. Membranlar primer antikor inkübasyonunun ardından 5 defa 1x TBST ile yıkandıktan sonra 1 saat sekonder antikor ile inkübe edildi. Membranlar 5 kez 1x TBST ile yıkandıktan sonra “West Pico Plus Kemilüminesan Substrat” ile görüntülemeleri yapıldı.

3.6. Spektrofotometrik Analizler

3.6.1. Doku Homojenizasyonu

Spektrofotometrik analizler için ayrılmış olan doku örnekleri tartılarak, her biri uygun hacimde pH 7,4 olan PBS ile homojenize edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısımları ependorflara ayrıldı ve protein konsantrasyonu BCA kiti ile protokoldeki adımlar izlenerek yapıldı.

3.6.2. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi, Glutamat-Glutamin ve NRF2 Düzeylerinin Ölçümleri

Doku homojenatlarında ve serumda glutasyon peroksidaz aktivitesi (FeiyueBio, katalog numarası: FY-EH5352) varyasyon katsayısı <%12, ölçüm aralığı 3,75–60 pmol/mL ve duyarlılığı 1,25 pmol/mL olan; glutamat-glutamin düzeyleri (FeiyueBio, katalog numarası: FY-EH5378) varyasyon katsayısı <%11, ölçüm aralığı 100–1600 pg/mL ve duyarlılığı 50 pg/mL olan; NRF2 seviyeleri ise (FeiyueBio, katalog numarası: FY-EH10474) varyasyon katsayısı <%8, ölçüm aralığı 0,156-10 ng/mL ve duyarlılığı 0,056 ng/mL olan ELİSA kiti ile ölçüldü.

Kit protokolünde belirtildiği şekilde standart kuyucuklarına 50 µL standart, örnek kuyucuklarına 10 µL örnek ve 40 µL dilüent eklendikten sonra 37°C' de 30 dakika inkübasyon yapıldı. 5 defa yıkama yapıldıktan sonra 50 µL HRP-Konjugat solüsyonu eklendi ve 30 dakika 37°C' de inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile 5 kez yapılan yıkamanın ardından, her bir kuyucuğa 100 µL substrat reaktifi A ve B'den eklendikten sonra 10 dakika 37°C' de inkübasyon yapıldı. 50µL durdurma solüsyonu eklendikten sonra spektrofotometre cihazında 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk değerleri okundu.

3.6.3. Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçülmesi

Oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi, “Ferrik demir iyonu indirgeyici antioksidan güç” (FRAP) seviyeleri, total tiyol düzeyleri, “ileri oksidasyon protein ürünleri” (AOPP) tayin edildi.

Enzimatik antioksidan olan total süperoksit dismutaz enziminin aktivitesi Sun ve arkadaşlarının modifiye metoduna göre ölçüldü (83). 0,3 mM ksantin, 0,6 mM Na₂EDTA, 150 µM nitroblue tetrazolyum, 400 mM Na₂CO₃, 1 g/L BSA çözeltisinden hazırlanan 285 µl reaksiyon karışımına 5 µl serum ve doku homojenat örnekleri eklendikten sonra üzerine 5 µl 167 U/L ksantin oksidaz eklendi ve 20 dakika 25°C' de inkübasyonun ardından 0,8 mM bakır klorür çözeltisinden 5 µl eklenerek reaksiyon durduruldu ve 560 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Absorbans değerleri % inhibisyon olarak hesaplandı ve %50 inhibisyon 1U enzim aktivitesini ifade etmektedir.

Antioksidan kapasitenin göstergesi olan FRAP seviyeleri Benzie ve Strain modifiye metoduna göre tayin edildi (84). 300 mM sodyum asetat tamponu, 10 mM tripiridiltriazin çözeltisi ve 20 mM FeCl₃ çözeltisi 10/1/1 oranında birleştirilerek FRAP çözeltisi hazırlandı. Standart olarak ürik asit kullanıldı ve 1 mM olarak hazırlanan ürik asit stok çözeltisinden 0,1 mM ile 1,0 mM arasında standart seri hazırlandı. Steril plate kuyucuklarından uygun yerlere 10 µL standart ve örnek eklendikten sonra 300 µL FRAP çözeltisi ilave edildi ve 37°C' de 593 nm dalga boyunda 6 dakika boyunca 1'er dakika aralığında kinetik olarak okuma yapıldı. Ürik asit standartlarından standart grafiği oluşturuldu ve örneklerdeki FRAP seviyeleri grafikten hesaplandı.

Non-enzimatik antioksidan olan total tiyol düzeyleri spektrofotometrik olarak analiz edildi (85). 20 µL örnek 1 mL 0,25 M, pH 8,2 Tris-EDTA tamponu ve 20 µL 10 mM 5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) ile karıştırıldıktan sonra 412 nm dalga boyunda okuma yapıldı.

Oksidatif stres belirteci olan AOPP ise Hanasand ve arkadaşlarının metodu modifiye edilerek spektrofotometrik ölçüldü (86). 160 µL 0,2 M sitrik asit çözeltisi ve 10 µL 1,16 M potasyum iyodür çözeltisine 40 µL örnek eklenerek reaksiyon gerçekleştirildi. Tüm örneklerin 340 nm dalga boyunda okumaları yapıldı. AOPP düzeyleri kloramin-T kullanılarak hazırlanan standart grafiğine göre hesaplandı.

Doku örneklerindeki glutamat dehidrogenaz aktivitesi Ellis ve Golberg'in metodu kullanılarak spektrofotometrik yöntemle kinetik olarak tayin edildi (87). 79 mM trietanolamin hidroklorür, 1,5 M amonyum sülfat, 11 mM NADH disodyum ile 14,2 mM ADP disodyum çözeltileri hazırlandı ve sırasıyla 190, 10, 5, 20 µL olarak plate kuyularına eklendikten sonra 60 µL örnek eklenerek 37°C' de 15 dakikalık inkübasyon yapıldı. 0,2 M α-ketoglutarik asit çözeltisinden 75 µL eklenmesinin ardından 340 nm dalga boyunda 6 dakika boyuca kinetik okuma yapıldı ve enzimin aktivitesi ünite (International Units per liter) olarak hesaplandı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda istatistiksel analiz SPSS Version 20.0 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir parametre için hasta ve kontrol gruplarının kendi içerisinde normal dağılımlarına student-t testi ile bakılmış ve parametrik dağılım göstermeyenler Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık bulunan parametrelerde ROC (receiver operating characteristics curve) analizi yapılmıştır. Çalışma gruplarının hastaların klinik verilerine göre yapılan analizlerinde Kruskal Wallis testi kullanılmış ve gruplar arası korelasyon analizi Pearson testi ile yapılmıştır. $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hastaların demografik özellikleri

Tablo 4.1’de çalışmaya dahil edilen grupların demografik özellikleri verilmiştir. Kolon kanser hastaları ile kontrol grubu arasında yaş ortalamaları bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,301$).

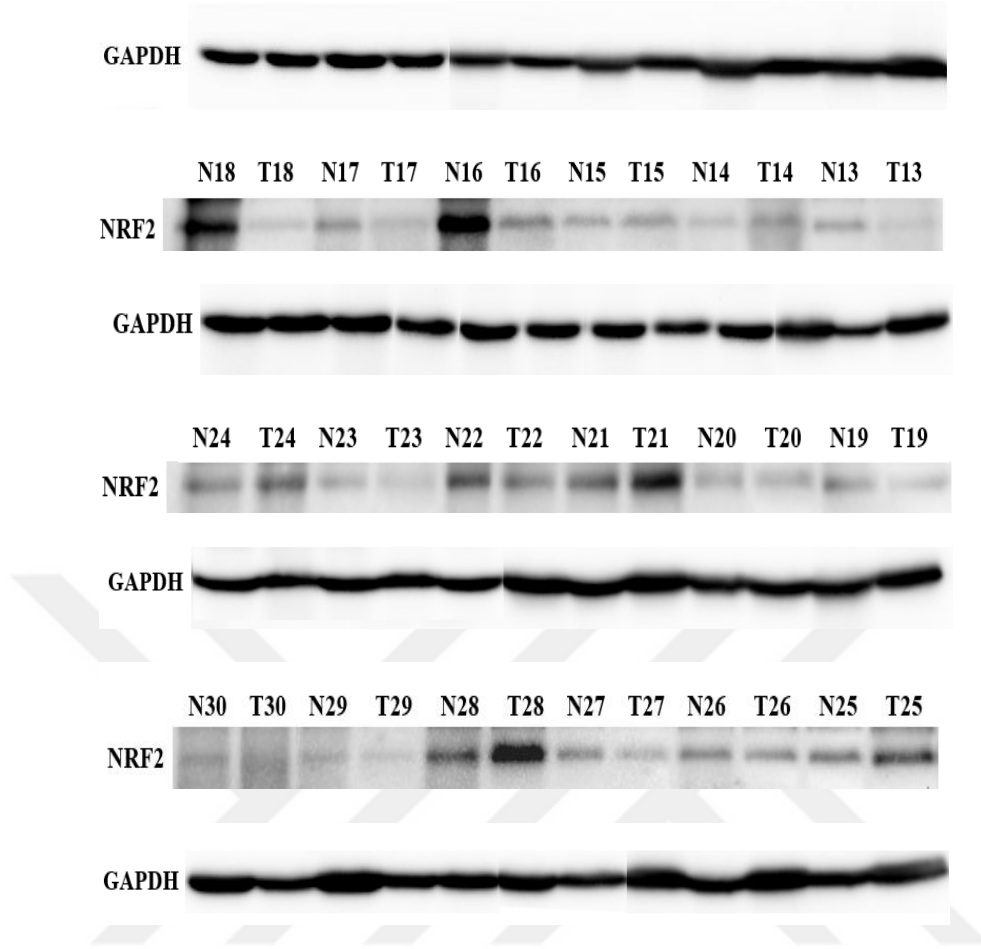
Tablo 4-1: Kolon kanser ve kontrol grubuna ait demografik özellikler

	Kolon Kanseri (n=30)	Kontrol (n=30)	P değeri
Cinsiyet			
Kadın	12 (%40)	16 (%53)	0,301
Erkek	18 (%60)	14 (%47)	
Tümör Lokalizasyonu			
Sağ Kolon	9 (%30)		
Sol Kolon	4 (%13)		
Transverskolon	2 (%7)		
Sigmoid	8 (%27)		
Rektum	6 (%20)		
Çekum	1 (%3)		
Tümör Evresi			
I	3 (%10)		
II	3 (%10)		
III	11 (%37)		
IV	13 (%43)		
Lenf Nodu Metastazı			
N0	13 (%43)		
N1	6 (%20)		
N2	10 (%33)		
N3	1 (%3)		

Uzak Organ Metastazı	
Var	3 (%10)
Yok	27 (%90)
Perinöral İnvazyon	
Var	11 (%37)
Yok	19 (%63)
Anjiolenfatik İnvazyon	
Var	17 (%60)
Yok	11 (%40)
Diferansiyasyon	
İyi	3 (%10)
Orta	22 (%76)
Az	4 (%14)
Müsinöz Komponent Varlığı	
Var	9 (%30)
Yok	21 (%70)

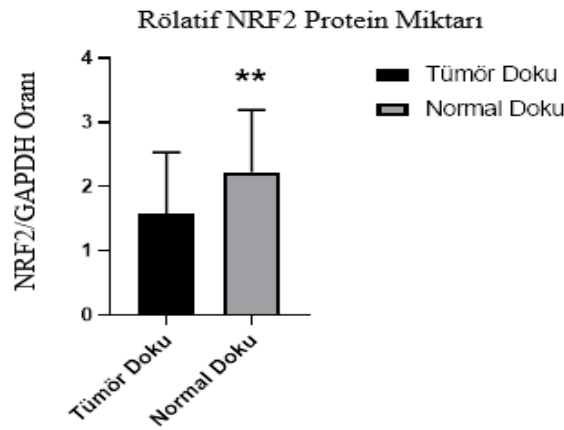
4.2. Doku NRF2 mRNA ekspresyon seviyeleri

Çalışmaya dahil edilen kolon kanserli hastalara ait tümör dokusu ve tümör çevre dokusunun NRF2 gen ekspresyonu karşılaştırıldığında 9 hastanın tümör dokusunda UP regüle iken, 21 hastada ise DOWN regüle olduğu bulunmuştur. Tümör çevre dokusunda tümör dokusuna kıyasla NRF2 ekspresyonu yaklaşık 1,12 kat daha yüksek gözlenmiş olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,15$) (Şekil 4-1).



Şekil 4-2: Tümör ve tümör çevre dokularındaki NRF2 ve GAPDH protein ekspresyonları

Tümör dokusunda tümör çevre dokusuna göre anlamlı ölçüde azalmış NRF2 protein ekspresyon düzeyi görülmüştür ($p=0,01$) (Şekil 4-2).



Şekil 4-3: Rölatif NRF2 protein miktarı. **, $p<0,01$

4.4. Doku ve serum NRF2 seviyeleri

Eliza kiti ile kolon kanserli hastalardan alınan hem tümör hem de tümör çevre dokuları ile serum örneklerinde ve sağlıklı kontrollerin serumlarında NRF2 düzeyi ölçülmüştür. Kolon kanserli hastaların serumlarında kontrole göre NRF2 düzeyi daha düşük olmasına karşın, anlamlılık bulunamamıştır ($p=0,105$). Tümör ve tümör çevre dokusundaki NRF2 düzeyleri karşılaştırıldığında ise tümörde sağlıklı dokuya göre anlamlı düzeyde azalma tespit edilmiştir ($p=0,001$) (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Doku ve serum NRF2 seviyeleri

	Kolon Kanseri	Kontrol	P değeri
Doku NRF2 (ng/mg protein)	3,94±1,19	5,83±1,11	0,001
	3,92	5,92	
	(3,39-4,31)	(4,53-6,71)	
Serum NRF2 (ng/mL)	2,17±1,32	3,35±1,31	0,105
	2,54	2,77	
	(0,65-2,75)	(2,35-4,26)	

Ortalama±SS, Orta Değer (quartiles (Q1–Q3))

4.5. Doku glutatyon peroksidaz ve SOD aktivitesi ile FRAP, AOPP ve total tiyol seviyeleri

Kolon kanserinde tümör dokusunda glutatyon peroksidaz aktivitesi ($p=0,002$), süperoksit dismutaz aktivitesi ($p=0,015$), FRAP düzeyi ($p=0,000$) ve total tiyol düzeyi ($p=0,008$) tümör çevre dokusuna göre anlamlı ölçüde düşük bulunurken; AOPP düzeyi yüksek bulunmasına karşın anlamlılık tespit edilememiştir ($p=0,142$) (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Tümör ve tümör çevre dokularında glutatyon peroksidaz ve SOD aktivitesi ile FRAP, AOPP ve total tiyol seviyeleri

	Tümör Doku	Tümör Çevre Doku	P değeri
Glutatyon Peroksidaz (pmol/mg protein)	4,64±3,25	5,30±1,78	0,002

	3,69 (3,29-4,59)	4,17 (3,98-7,15)	
SOD (U/mg protein)	26,19±13,85 21,47 (18,34-27,15)	27,91±6,26 25,76 (23,87-32,84)	0,015
FRAP (nmol/mg protein)	23,73±6,14 20,61 (19,59-31,22)	29,92±8,35 26,81 (24,31-37,41)	0,000
AOPP (nmol/mg protein)	27,78±12,36 24,26 (19,07-35,79)	21,88±10,16 24,56 (12,14-28,69)	0,142
Total Tiylol (nmol/mg protein)	109,33±59,85 97,98 (83,46-173,51)	121,49±25,46 113,46 (100,24-136,64)	0,008

Ortalama±SS, Orta Değer (quartiles (Q1–Q3))

4.1. Serum glutatyon peroksidaz ve SOD aktivitesi ile FRAP, AOPP ve total tiyol seviyeleri

Kolon kanser hastaları ile sağlıklı kontrollerin serum parametreleri karşılaştırıldığında, glutatyon peroksidaz aktivitesi ($p=0,004$), süperoksit dismutaz aktivitesi ($p=0,000$), FRAP düzeyi ($p=0,003$), total tiyol düzeyi ($p=0,000$) ve AOPP düzeyi ($p=0,000$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış bulundu (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Serum glutatyon peroksidaz ve SOD aktivitesi ile FRAP, AOPP ve total tiyol seviyeleri

	Kolon Kanseri	Kontrol	P değeri
Glutatyon Peroksidaz (pmol/mL)	6,35±1,94 6,26 (4,74-7,23)	5,48±2,51 5,67 (3,49-6,59)	0,004
SOD (U/mL)	77,42±26,86 79,97 (52,19-96,75)	98,46±19,87 100,55 (81,91-114,47)	0,000
FRAP (µM/L Ürik Asit)	134,20±54,45	203,63±45,68	

	129,83 (90,89-163,47)	204,48 (158,62-238,78)	0,003
AOPP (µM/L Kloramin T Eşdeğeri)	171,26±44,12 182,75 (137,18-208,82)	339,50±44,16 344,02 (313,17-367,01)	0,000
Total Tişol (µM/L)	367,90±188,18 306,82 (272,36-386,14)	533,58±65,56 529,24 (482,59-592,92)	0,000

Ortalama±SS, Orta Değer (quartiles (Q1–Q3))

4.2. Doku ve serum glutamat-glutamin düzeyleri ile doku glutamat dehidrogenaz aktivitesi

Hasta ve kontrol grubu karşılaştırmasında hem doku hem de serum glutamat-glutamin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır (sırasıyla $p=0,519$, $p=0,064$). Glutamat dehidrogenaz aktivitesinin ise kolon tümör dokusunda tümör çevre dokusuna göre anlamlı ölçüde azalmış olduğu bulunmuştur ($p=0,001$) (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Doku ve serum glutamat-glutamin düzeyleri ile doku glutamat dehidrogenaz aktivitesi

	Kolon Kanseri	Kontrol	P değeri
Doku Glutamat-Glutamin (ng/mg protein)	0,27±0,16 0,21 (0,19-0,28)	0,23±0,05 0,23 (0,18-0,28)	0,519
Serum Glutamat-Glutamin (pg/mL)	653,41±67,23 653,20 (617,52-711,30)	657,49±105,29 689,07 (603,66-726,34)	0,064
Doku Glutamat Dehidrogenaz (mU/mg protein)	24,66±2,17 16,99 (10,66-26,90)	30,34±15,32 30,52 (13,75-42,11)	0,001

Ortalama±SS, Orta Değer (quartiles (Q1–Q3))

4.3. NRF2 ekspresyonu UP ve DOWN olan hastaların doku ve serumdaki parametrelerinin karşılaştırılması

Kolon kanser hastalarının dokularında NRF2 ekspresyonu UP ve DOWN olanların dokuda çalışılmış olan NRF2 protein ekspresyonu, NRF2 düzeyi, glutatyon peroksidaz aktivitesi, glutamat dehidrogenaz aktivitesi ile FRAP, AOPP, total tiyol ve glutamat-glutamin düzeyleri değerlendirildiğinde anlamlılık saptanmamıştır (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: NRF2 ekspresyonu UP ve DOWN olan hastaların doku parametrelerinin karşılaştırması

Doku Parametreleri	Tümör Doku		P değeri	Tümör Çevre Doku		P değeri
	NRF2 UP	NRF2 DOWN		NRF2 UP	NRF2 DOWN	
NRF2 Protein Ekspresyonu	1,06±0,29	1,91±1,13	0,262	3,01±0,79	1,69±0,71	0,042
	1,02	1,85		2,98	1,56	
	(0,80-1,36)	(0,82-3,16)		(2,26-3,80)	(1,17-2,18)	
NRF2 (ng/mg protein)	3,63±0,88	4,14±1,39	0,935	6,82±0,69	5,16±0,79	0,076
	3,96	3,92		6,88	4,97	
	(2,70-4,25)	(3,44-4,94)		(6,13-7,45)	(4,49-5,96)	
Glutatyon Peroksidaz (pmol/mg protein)	3,78±0,49	5,22±4,23	0,600	6,02±2,23	4,82±1,43	0,862
	3,69	3,66		5,63	4,03	
	(3,35-4,29)	(2,94-7,23)		(4,15-8,28)	(3,96-5,99)	
SOD (U/mg protein)	20,87±3,95	29,73±17,28	0,572	30,84±7,88	25,94±4,67	0,433
	19,39	23,46		28,98	25,50	
	(18,18-25,05)	(20,25-37,58)		(24,48-39,08)	(21,91-30,24)	
FRAP (nmol/mg protein)	23,66±6,33	23,78±6,62	0,516	29,24±9,53	30,38±8,38	0,794
	20,60	21,11		24,89	31,79	
	(20,32-30,05)	(18,69-31,28)		(23,88-38,94)	(23,16-37,41)	
AOPP (nmol/mg protein)	35,63±14,96	22,54±7,67	0,850	26,87±11,66	18,55±8,44	0,317
	33,00	22,80		29,19	17,98	
	(23,17-50,70)	(14,58-29,07)		(14,91-36,534)	(11,30-27,56)	
Total Tiyol (nmol/mg protein)	132,36±79,61	127,30±51,31	0,883	131,41±36,72	114,87±15,06	0,408
	96,37	125,44		125,82	113,46	

	(86,43-214,29)	(76,98-173,50)		(99,75-168,65)	(99,90-131,86)	
Glutamat-Glutamin (ng/mg protein)	0,22±0,050 0,21 (0,18-0,27)	0,31±0,21 0,21 (0,19-0,38)		0,24±0,09 0,23 (0,16-0,33)	0,23±0,03 0,23 (0,21-0,26)	0,663
Glutamat Dehidrogenaz (mU/mg protein)	17,27±5,27 17,72 (12,21-21,88)	29,59±31,02 15,70 (8,56-53,06)	0,722	33,12±22,96 30,56 13,45-55,34	28,49±9,78 30,52 (21,9243-34,7402)	0,761

Ortalama±SS, Orta Değer (quartiles (Q1–Q3))

Kolon kanserli hastaların NRF2 ekspresyonu UP ve DOWN olanlarda serum parametrelerinin karşılaştırmasında ise NRF2 UP olan hastalarda serum AOPP düzeyleri anlamlı ölçüde azalmış bulunurken ($p=0,014$), total tiyol düzeyleri ise artmış olarak bulundu ($p=0,029$) (Tablo 4-7).

Tablo 4-7: NRF2 ekspresyonu UP ve DOWN olan hastaların serum parametrelerinin karşılaştırması

Serum Parametreleri	Kolon Kanseri		P değeri
	NRF2 UP	NRF2 DOWN	
NRF2 (ng/mL)	2,47±1,79 2,65 (0,74-4,03)	1,96±1,04 2,48 (0,65-2,67)	0,850
Glutasyon Peroksidaz (pmol/mL)	5,81±1,61 5,88 (4,29-7,25)	6,71±2,19 6,78 (4,74-7,93)	0,063
SOD (U/mL)	63,30±29,75 53,95 (41,25-94,69)	86,84±22,39 88,50 (69,44-100,72)	0,716
FRAP (µM/L ÜRİK ASİT)	137,98±59,56 135,38 (82,42-196,15)	131,68±56,48 115,91 (90,89-167,77)	0,210
AOPP (µM/L Kloramin T	168,10±56,55	173,37±39,65	

Eşdeğeri)	182,751 (109,64-211,90)	180,86 (137,18-208,82)	0,014
Total Tiylol (μM/L)	415,75 $\pm$ 304,82 279,70 (235,68-731,85)	336,01 $\pm$ 70,29 307,59 (288,98-386,14)	0,029
Glutamat- Glutamin (pg/mL)	661,54 $\pm$ 69,42 679,77 (588,43-716,42)	647,99 $\pm$ 71,81 651,15 (606,97-697,04)	0,312

Ortalama $\pm$ SS, Orta Değer (quartiles (Q1–Q3))

Tümör dokusundaki parametrelerin korelasyonları tablo 4-8’de gösterilmiştir.

NRF2 protein ekspresyonu ile NRF2 protein miktarı arasında güçlü pozitif korelasyon (korelasyon katsayısı=0,629, p=0,002),

Total tiyol düzeyleri ile FRAP düzeyleri arasında güçlü pozitif korelasyon (korelasyon katsayısı=0,477, p=0,009),

GDH aktivitesi ile sırasıyla NRF2 protein ekspresyonu (korelasyon katsayısı=0,547, p=0,003) ve NRF2 protein miktarı (korelasyon katsayısı=0,726, p=0,008) arasında güçlü pozitif korelasyon,

SOD aktivitesi ile sırasıyla NRF2 protein ekspresyonu (korelasyon katsayısı=0,409, p=0,038), NRF2 protein miktarı (korelasyon katsayısı=0,830, p=0,001) ve GDH aktivitesi (korelasyon katsayısı=0,790, p=0,000) arasında güçlü pozitif korelasyon,

Glutamat-glutamin düzeyleri ile sırasıyla NRF2 protein ekspresyonu (korelasyon katsayısı=0,428, p=0,026), NRF2 protein miktarı (korelasyon katsayısı=0,690, p=0,013), GDH aktivitesi (korelasyon katsayısı=0,854, p=0,000) ve SOD aktivitesi (korelasyon katsayısı=0,906, p=0,000) arasında güçlü pozitif korelasyon,

Glutasyon peroksidaz aktivitesi ile sırasıyla NRF2 protein ekspresyonu (korelasyon katsayısı=0,435, p=0,023), NRF2 protein miktarı (korelasyon katsayısı=0,831, p=0,001), GDH aktivitesi (korelasyon katsayısı=0,885, p=0,000), SOD aktivitesi (korelasyon katsayısı=0,927, p=0,000) ve glutamat-glutamin düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,913, p=0,000) arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur.

Tablo 4-8: Kolon kanserli hastaların tümör dokusundaki parametrelerin korelasyon analizi

Tümör Doku Parametre Korelasyonları		NRF2 protein ekspresyonu	NRF2 protein miktarı	FRAP	Total Tiyo	GDH Aktivitesi	SOD Aktivitesi	Glutamat- Glutamin	Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi	NRF2 Gen Ekspresyonu
NRF2 protein ekspresyonu	Korelasyon Katsayısı P değeri N	1 28								
NRF2 protein miktarı	Korelasyon Katsayısı P değeri N	,629** ,002 22	1 12							
FRAP	Korelasyon Katsayısı P değeri N	,133 ,510 27	,446 ,147 12	1 29						
Total Tiyo	Korelasyon Katsayısı P değeri N	,193 ,336 27	,459 ,133 12	,477** ,009 29	1 29					
GDH Aktivitesi	Korelasyon Katsayısı P değeri N	,547** ,003 27	,726** ,008 12	,115 ,552 29	,356 ,058 29	1 29				
SOD Aktivitesi	Korelasyon Katsayısı P değeri N	,409* ,038 26	,830** ,001 12	,171 ,385 28	,280 ,149 28	,790** ,000 28	1 28			
Glutamat- Glutamin	Korelasyon Katsayısı P değeri N	,428* ,026 27	,690* ,013 12	,106 ,583 29	,252 ,188 29	,854** ,000 29	,906** ,000 28	1 29		
Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi	Korelasyon Katsayısı P değeri N	,435* ,023 27	,831** ,001 12	,198 ,302 29	,332 ,078 29	,885** ,000 29	,927** ,000 28	,913** ,000 29	1 29	
NRF2 Gen Ekspresyonu	Korelasyon Katsayısı P değeri N	-,274 ,159 28	-,130 ,687 12	-,247 ,196 29	-,005 ,981 29	-,064 ,742 29	-,031 ,874 28	-,008 ,968 29	-,009 ,962 29	1 29

Tümör çevre dokusundaki parametrelerin korelasyonları tablo 4-9'da gösterilmiştir.

NRF2 protein ekspresyonu ile NRF2 protein miktarı arasında pozitif korelasyon (korelasyon katsayısı=0,642, $p=0,033$),

AOPP düzeyleri ile FRAP düzeyleri arasında güçlü pozitif korelasyon (korelasyon katsayısı=0,515, $p=0,005$),

Total tiyol düzeyleri ile sırasıyla FRAP düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,584, $p=0,001$) ve AOPP düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,728, $p=0,000$) arasında güçlü pozitif korelasyon,

GDH aktivitesi ile sırasıyla AOPP düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,447, $p=0,017$) ve total tiyol düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,619, $p=0,000$) arasında güçlü pozitif korelasyon,

SOD aktivitesi ile sırasıyla FRAP düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,505, $p=0,006$), AOPP düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,814, $p=0,000$), total tiyol düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,855, $p=0,000$) ve GDH aktivitesi (korelasyon katsayısı=0,637, $p=0,000$) arasında güçlü pozitif korelasyon,

Glutamat-glutamin düzeyleri ile sırasıyla FRAP düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,577, $p=0,001$), AOPP düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,795, $p=0,000$), total tiyol düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,912, $p=0,000$), GDH aktivitesi (korelasyon katsayısı=0,610, $p=0,001$) ve SOD aktivitesi (korelasyon katsayısı=0,977, $p=0,000$) arasında güçlü pozitif korelasyon,

Glutatyon peroksidaz aktivitesi ile sırasıyla FRAP düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,568, $p=0,002$), AOPP düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,828, $p=0,000$), total tiyol düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,907, $p=0,000$), GDH aktivitesi (korelasyon katsayısı=0,575, $p=0,001$), SOD aktivitesi (korelasyon katsayısı=0,980, $p=0,000$) ve glutamat-glutamin (korelasyon katsayısı=0,992, $p=0,000$) arasında güçlü pozitif korelasyon,

NRF2 gen ekspresyonu ile NRF2 protein miktarı arasında (korelasyon katsayısı=0,621, $p=0,031$) pozitif korelasyon bulunmuştur.

Tablo 4-9: Tümör çevre dokusundaki parametrelerin korelasyon analizi

Tümör Çevre Doku Parametre Korelasyonları	NRF2 protein ekspresyonu	NRF2 protein miktarı	FRAP	AOPP	Total Tiyo	GDH Aktivitesi	SOD Aktivitesi	Glutamat - Glutamin	Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi	NRF2 Gen Ekspresyonu
NRF2 protein ekspresyonu	Korelasyon Katsayısı <i>P</i> değeri N	1 27								
NRF2 protein miktarı	Korelasyon Katsayısı <i>P</i> değeri N	,642* ,033 11	1 12							
FRAP	Korelasyon Katsayısı <i>P</i> değeri N	-,244 ,230 26	,080 ,806 12	1 28						
AOPP	Korelasyon Katsayısı <i>P</i> değeri N	,112 ,585 26	,567 ,054 12	,515** ,005 28	1 28					
Total Tiyo	Korelasyon Katsayısı <i>P</i> değeri N	-,126 ,539 26	,335 ,288 12	,584** ,001 28	,728** ,000 28	1 28				
GDH Aktivitesi	Korelasyon Katsayısı <i>P</i> değeri N	-,083 ,687 26	,351 ,264 12	,105 ,595 28	,447* ,017 28	,619** ,000 28	1 28			
SOD Aktivitesi	Korelasyon Katsayısı <i>P</i> değeri N	-,140 ,495 26	,342 ,277 12	,505** ,006 28	,814** ,000 28	,855** ,000 28	,637** ,000 28	1 28		
Glutamat-Glutamin	Korelasyon Katsayısı <i>P</i> değeri N	-,202 ,321 26	,185 ,565 12	,577** ,001 28	,795** ,000 28	,912** ,000 28	,610** ,001 28	,977** ,000 28	1 28	
Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi	Korelasyon Katsayısı <i>P</i> değeri N	-,164 ,424 26	,227 ,477 12	,568** ,002 28	,828** ,000 28	,907** ,000 28	,575** ,001 28	,980** ,000 28	,992** ,000 28	1 28

NRF2 Gen Ekspresyonu	Korelasyon Katsayısı	,056	,621*	-,189	-,017	-,076	,138	-,050	-,082	-,109	1
	P değeri	,780	,031	,335	,931	,702	,485	,802	,677	,580	
	N	27	12	28	28	28	28	28	28	28	28

Kolon kanser hastalarının serum parametrelerinin korelasyonları tablo 4-10'da gösterilmiştir.

Total tiyol düzeyi ile AOPP düzeyi arasında güçlü pozitif korelasyon (korelasyon katsayısı=0,585, p=0,001),

Glutasyon peroksidaz aktivitesi ile SOD aktivitesi arasında negatif korelasyon (korelasyon katsayısı= -0,361, p=0,05) bulunmuştur.

Tablo 4-10: Kolon kanserli hastaların serum parametrelerinin korelasyon analizi

Hasta Serum Parametre Korelasyonları	FRAP	AOPP	Total Tiyol	Sod Aktivitesi	Glutamat-Glutamin	Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi	NRF2 Ekspresyonu
FRAP	Korelasyon Katsayısı P değeri N	1 30					
AOPP	Korelasyon Katsayısı P değeri N	,316 ,089 30	1 30				
Total Tiyol	Korelasyon Katsayısı P değeri N	,379* ,039 30	,585** ,001 30	1 30			
SOD Aktivitesi	Korelasyon Katsayısı P değeri N	-,075 ,693 30	-,041 ,829 30	-,121 ,525 30	1 30		
Glutamat-Glutamin	Korelasyon Katsayısı P değeri N	-,136 ,473 30	-,093 ,624 30	-,333 ,072 30	,058 ,760 30	1 30	

Glutasyon	Korelasyon	,255	,076	,167	-,361*	-,333	1	
Peroksidaz	Katsayısı							
Aktivitesi	P değeri	,174	,690	,379	,050	,072		
	N	30	30	30	30	30	30	
NRF2	Korelasyon	-,260	-,348	-,196	-,005	-,103	-,283	1
Ekspresyonu	Katsayısı							
	P değeri	,165	,059	,300	,979	,588	,130	
	N	30	30	30	30	30	30	30

Sağlıklı kontrollerin serum parametrelerinin korelasyonları tablo 4-11’de gösterilmiştir.

Total tiyol düzeyi ile AOPP düzeyi arasında güçlü pozitif korelasyon (korelasyon katsayısı=0,538, p=0,004),

SOD aktivitesi ile AOPP düzeyleri arasında (korelasyon katsayısı= -0,402, p=0,038) negatif korelasyon,

Glutasyon peroksidaz aktivitesi ile sırasıyla AOPP düzeyleri (korelasyon katsayısı=0,445, p=0,020) arasında pozitif korelasyon, SOD aktivitesi (korelasyon katsayısı= -0,425, p=0,027) arasında ve glutamat-glutamin (korelasyon katsayısı= -0,481, p=0,011) arasında negatif korelasyon,

NRF2 düzeyi ile sırasıyla AOPP düzeyi (korelasyon katsayısı=0,682, p=0,001) ve glutasyon peroksidaz aktivitesi (korelasyon katsayısı=0,834, p=0,000) arasında güçlü pozitif korelasyon, glutamat-glutamin (korelasyon katsayısı= -0,508, p=0,019) arasında ise negatif korelasyon bulunmuştur.

Tablo 4-11: Sağlıklı kontrollerin serum parametrelerinin korelasyon analizi

Kontrol Serum Parametre	FRAP	AOPP	Total Tiyol	Sod Aktivitesi	Glutamat-Glutamin	Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi	NRF2 Düzeyi
Korelasyon							
Katsayısı	1						
P değeri							
N	27						
AOPP							
Korelasyon							
Katsayısı	-,025	1					

	P değeri	,902						
	N	27	27					
Total Tirol	Korelasyon Katsayısı	,246	,538**	1				
	P değeri	,217	,004					
	N	27	27	27				
SOD Aktivitesi	Korelasyon Katsayısı	-,280	-,402*	-,275	1			
	P değeri	,157	,038	,165				
	N	27	27	27	27			
Glutamat-Glutamin	Korelasyon Katsayısı	,257	-,060	,034	-,094	1		
	P değeri	,196	,767	,865	,640			
	N	27	27	27	27	27		
Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi	Korelasyon Katsayısı	,173	,445*	,115	-,425*	-,481*	1	
	P değeri	,388	,020	,568	,027	,011		
	N	27	27	27	27	27	27	
NRF2 Düzeyi	Korelasyon Katsayısı	-,128	,682**	,104	-,364	-,508*	,834**	1
	P değeri	,581	,001	,653	,104	,019	,000	
	N	21	21	21	21	21	21	21

Çalışmamızda yer alan kolon kanser hastalarının doku ve serumda çalışılmış olan tüm parametreleri tümör evresine göre karşılaştırıldığında, erken tümör evresindeki hastalar ile ileri tümör evresindeki hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Lenf nodu metastaz durumuna göre karşılaştırıldığında ise lenf nodu metastazı olanlarda tümör çevre dokusundaki FRAP düzeyleri lenf nodu metastazı olmayanlara göre anlamlı ölçüde azalmış olarak bulunmuştur ($p=0,044$) (Tablo 4-11).

Tablo 4-12: Tümör evresine ve lenf nodu metastaz durumuna göre doku ve serum parametrelerinin karşılaştırılması

	Tümör Evresi	Ortalama±SS	P Değeri	Lenf Nodu Metastazı	Ortalama±SS	P Değeri
NRF2 Gen ekspresyonu	T3+T4	1,09±0,64	0,243	N1+N2+N3	1,23±0,68	0,109

	T1+T2	0,75±0,22		N0	0,79±0,33	
Serum NRF2	T3+T4	2,35±1,35	0,505	N1+N2+N3	2,35±1,37	0,775
	T1+T2	3,06±0,89		N0	2,47±1,29	
NRF2 protein ekspresyonu (tümör doku)	T3+T4	1,31±0,93	0,117	N1+N2+N3	1,42±1,06	0,222
	T1+T2	0,72±0,54		N0	0,91±0,55	
NRF2 düzeyi (tümör doku)	T3+T4	4,15±1,08	0,782	N1+N2+N3	4,25±1,23	0,223
	T1+T2	3,54±1,18		N0	3,64±0,84	
FRAP (tümör doku)	T3+T4	21,02±5,02	0,590	N1+N2+N3	20,66±5,12	0,280
	T1+T2	22,65±6,12		N0	22,23±5,15	
AOPP (tümör doku)	T3+T4	29,97±17,97	0,914	N1+N2+N3	32,50±20,07	0,430
	T1+T2	26,97±15,29		N0	24,32±12,89	
Total Tiylol (tümör doku)	T3+T4	107,69±42,64	0,419	N1+N2+N3	113,55±47,34	0,934
	T1+T2	123,39±44,08		N0	107,46±36,20	
GDH Aktivitesi (tümör doku)	T3+T4	22,94±17,05	0,706	N1+N2+N3	26,33±18,59	0,244
	T1+T2	23,39±12,40		N0	19,22±11,10	
SOD Aktivitesi (tümör doku)	T3+T4	26,98±9,89	0,614	N1+N2+N3	26,88±11,06	0,827
	T1+T2	24,87±7,87		N0	26,14±7,16	
Glutamat-Glutamin (tümör doku)	T3+T4	0,26±0,11	0,914	N1+N2+N3	0,27±0,12	0,589
	T1+T2	0,24±0,05		N0	0,24±0,06	
Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi (tümör doku)	T3+T4	4,38±2,18	0,829	N1+N2+N3	4,52±2,54	0,901
	T1+T2	4,31±1,75		N0	4,15±1,30	
NRF2 protein ekspresyonu (tümör çevre doku)	T3+T4	2,04±1,40	0,091	N1+N2+N3	2,04±1,07	0,088
	T1+T2	1,02±0,54		N0	1,53±1,58	
NRF2 düzeyi (tümör çevre doku)	T3+T4	5,86±1,17	0,926	N1+N2+N3	6,05±1,19	0,372
	T1+T2	5,88±0,48		N0	5,61±0,76	
FRAP (tümör çevre doku)	T3+T4	30,66±9,38	0,911	N1+N2+N3	27,84±7,82	0,044
	T1+T2	30,69±11,50		N0	35,07±10,64	
AOPP (tümör çevre doku)	T3+T4	23,71±14,36	0,502	N1+N2+N3	21,03±8,49	0,630
	T1+T2	19,83±9,28		N0	25,61±17,41	
Total Tiylol (tümör çevre doku)	T3+T4	132,95±45,79	0,823	N1+N2+N3	127,54±19,44	0,759
	T1+T2	150,72±79,05		N0	148,45±75,26	
GDH Aktivitesi (tümör çevre doku)	T3+T4	32,00±13,16	0,117	N1+N2+N3	33,71±10,91	0,759
	T1+T2	38,73±6,16		N0	32,84±13,72	
SOD Aktivitesi (tümör çevre doku)	T3+T4	32,37±20,25	0,341	N1+N2+N3	28,51±5,63	0,539
	T1+T2	33,80±11,56		N0	37,27±26,31	
Glutamat-Glutamin (tümör çevre doku)	T3+T4	0,29±0,33	0,131	N1+N2+N3	0,23±0,06	0,630
	T1+T2	0,38±0,30		N0	0,40±0,46	
Glutasyon	T3+T4	6,90±8,93	0,780	N1+N2+N3	5,04±1,39	0,930

Peroksidaz Aktivitesi (tümör çevre doku)	T1+T2	8,10±7,85		N0	9,47±12,36	
Serum FRAP	T3+T4	144,96±55,97	0,147	N1+N2+N3	142,27±52,35	0,361
	T1+T2	177,92±44,04		N0	158,30±58,83	
Serum AOPP	T3+T4	203,93±58,44	0,876	N1+N2+N3	195,15±51,53	0,427
	T1+T2	212,67±33,60		N0	211,67±61,21	
Serum Total Tiylol	T3+T4	450,95±270,26	0,178	N1+N2+N3	397,23±202,18	0,062
	T1+T2	451,61±75,30		N0	509,33±272,80	
Serum SOD Aktivitesi	T3+T4	65,63±28,43	0,641	N1+N2+N3	66,13±22,33	0,937
	T1+T2	71,34±25,81		N0	70,25±34,36	
Serum Glutamat-Glutamin	T3+T4	631,77±97,50	0,876	N1+N2+N3	658,68±88,58	0,088
	T1+T2	632,11±86,27		N0	600,82±89,91	
Serum Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi	T3+T4	6,37±1,93	0,108	N1+N2+N3	6,20±1,55	0,475
	T1+T2	8,53±3,45		N0	7,35±3,11	

Çalışmamızda yer alan kolon kanser hastalarının doku ve serumda çalışılmış olan tüm parametrelerinin diferansiyasyon durumuna göre karşılaştırılmasında tümör çevre dokusunda AOPP düzeyi kötü diferansiye grupta iyi ve orta diferansiye gruba kıyasla anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p=0,026$). Hastalarda kötü diferansiye grupta serum FRAP düzeyleri, total tiyol düzeyleri ve AOPP düzeyleri iyi ve orta diferansiye gruba göre anlamlı ölçüde azalmış olarak bulunmuştur (sırasıyla $p=0,005$, $p=0,017$, $p=0,002$). Perinöral invazyon durumuna göre yapılan karşılaştırmada ise invazyon olan hastaların tümör dokusunda NRF2 protein ekspresyonu ve glutamat-glutamin düzeyi invazyon olmayan hastalara göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0,022$, $p=0,020$). Anjiyolenfatik invazyon varlığına göre yapılan değerlendirmede invazyon olan grupta serum NRF2 düzeyi anlamlı ölçüde yüksek bulunurken, serum SOD aktivitesi ise anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,047$) (Tablo 4-12).

Tablo 4-13: Diferansiyasyon, perinöral invazyon ve anjiyolenfatik invazyon durumuna göre doku ve serum parametrelerinin karşılaştırılması

	Diferansiyasyon	Ortalama±SS	P Değeri	Perinöral İnvazyon	Ortalama±SS	P Değeri	Anjiyolenfatik İnvazyon	Ortalama±SS	P Değeri
NRF2 Gen ekspresyonu	Kötü	1,04±0,27	0,583	Var	0,87±0,33	0,292	Var	1,13±0,62	0,144
	İyi+Orta	1,04±0,63		Yok	1,12±0,67		Yok	0,87±0,53	
Serum NRF2	Kötü	2,25±0,92	0,767	Var	2,90±1,12	0,112	Var	3,18±0,90	0,001
	İyi+Orta	2,42±1,42		Yok	2,13±1,35		Yok	1,43±1,02	
NRF2 protein ekspresyonu (tümör doku)	Kötü	1,97±1,24	0,143	Var	1,76±0,99	0,022	Var	1,14±0,94	0,287
	İyi+Orta	1,05±0,81		Yok	0,91±0,71		Yok	1,39±0,84	
NRF2 düzeyi (tümör doku)	Kötü	5,14±1,97	0,637	Var	5,02±1,34	0,079	Var	4,01±1,47	0,685
	İyi+Orta	3,74±0,86		Yok	3,65±0,81		Yok	3,98±0,12	
FRAP (tümör doku)	Kötü	24,08±4,41	0,067	Var	20,03±4,73	0,333	Var	21,46±5,64	0,690
	İyi+Orta	20,93±5,25		Yok	22,08±5,26		Yok	21,63±4,56	
AOPP (tümör doku)	Kötü	20,63±7,82	0,569	Var	32,47±22,49	0,509	Var	28,59±18,03	0,825
	İyi+Orta	30,58±18,19		Yok	26,79±14,39		Yok	30,12±17,34	
Total Tiyol (tümör doku)	Kötü	113,69±30,57	0,704	Var	108,61±26,83	0,660	Var	114,74±48,84	0,400
	İyi+Orta	111,62±44,19		Yok	111,76±48,34		Yok	99,90±34,67	
GDH Aktivitesi (tümör doku)	Kötü	37,95±33,54	0,229	Var	30,96±21,31	0,053	Var	23,12±18,48	0,929
	İyi+Orta	20,74±10,73		Yok	19,04±10,59		Yok	20,16±11,92	
SOD Aktivitesi (tümör doku)	Kötü	34,44±20,28	0,431	Var	31,53±13,84	0,099	Var	27,11±11,73	0,516
	İyi+Orta	25,43±6,05		Yok	24,27±5,25		Yok	23,60±3,71	
Glutamat-Glutamin (tümör doku)	Kötü	0,34±0,25	0,950	Var	0,31±0,15	0,020	Var	0,27±0,13	0,132
	İyi+Orta	0,25±0,05		Yok	0,23±0,04		Yok	0,22±0,03	
Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi (tümör doku)	Kötü	6,32±4,86	0,487	Var	5,03±3,14628	0,202	Var	4,43±2,50	0,376
	İyi+Orta	4,07±1,13		Yok	4,01±1,12475		Yok	3,88±0,78	
NRF2	Kötü	2,74±0,52	0,084	Var	1,63±0,94	0,750	Var	1,77±1,13	0,702

protein ekspresyonu (tümör çevre doku)	İyi+Orta	1,72±1,38			1,89±1,47			2,03±1,63	
NRF2 düzeyi (tümör çevre doku)	Kötü	6,14±0,19	0,814	Var Yok	5,52±0,89	0,518	Var Yok	6,29±0,79	0,223
	İyi+Orta	5,95±1,08			5,98±1,08			5,27±1,07	
FRAP (tümör çevre doku)	Kötü	36,58±10,84	0,212	Var Yok	28,96±8,81	0,480	Var Yok	29,12±8,59	0,210
	İyi+Orta	30,28±9,68			32,04±10,19			34,19±10,98	
AOPP (tümör çevre doku)	Kötü	28,99±1,47	0,026	Var Yok	23,35±4,84	0,346	Var Yok	22,71±7,12	0,781
	İyi+Orta	21,92±14,25			22,97±15,69			24,85±18,98	
Total Tirol (tümör çevre doku)	Kötü	122,06±18,67	0,793	Var Yok	117,82±10,33	0,157	Var Yok	119,88±20,64	0,095
	İyi+Orta	140,89±56,41			145,50±61,20			158,63±74,93	
GDH Aktivitesi (tümör çevre doku)	Kötü	25,61±8,29	0,168	Var Yok	30,96±7,69	0,572	Var Yok	31,14±12,07	0,546
	İyi+Orta	34,75±12,42			34,38±13,59			34,51±12,99	
SOD Aktivitesi (tümör çevre doku)	Kötü	25,56±0,73	0,115	Var Yok	27,12±4,86	0,203	Var Yok	28,39±5,29	0,516
	İyi+Orta	34,10±19,69			34,83±21,49			37,40±27,68	
Glutamat-Glutamin (tümör çevre doku)	Kötü	0,19±0,05	0,115	Var Yok	0,21±0,06	0,157	Var Yok	0,22±0,07	0,577
	İyi+Orta	0,33±0,34			0,35±0,37			0,41±0,48	
Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi (tümör çevre doku)	Kötü	4,41±0,84	0,264	Var Yok	4,69±0,92	0,671	Var Yok	4,78±1,34	0,577
	İyi+Orta	7,59±9,22			8,08±10,06			9,90±12,81	
Serum FRAP	Kötü	82,85±10,58	0,005	Var Yok	152,71±64,47	0,869	Var Yok	165,14±58,60	0,150
	İyi+Orta	161,84±51,33			147,75±50,83			131,28±46,75	
Serum AOPP	Kötü	110,87±17,83	0,002	Var Yok	201,68±59,36	0,967	Var Yok	184,04±51,80	0,063
	İyi+Orta	218,94±44,01			203,12±55,27			220,31±55,50	
Serum Total Tirol	Kötü	278,40±55,02	0,017	Var Yok	456,86±229,76	0,836	Var Yok	437,69±217,75	0,767
	İyi+Orta	478,79±249,25			442,91±250,12			461,36±287,64	

Serum SOD Aktivitesi	Kötü	72,03±31,00	0,855	Var	58,35±19,66	0,173	Var	57,31±18,69	0,047
	İyi+Orta	66,70±28,40		Yok	73,29±30,79		Yok	78,61±33,39	
Serum Glutamat-Glutamin	Kötü	614,16±60,44	0,625	Var	628,78±98,28	0,591	Var	602,13±109,95	0,150
	İyi+Orta	633,52±98,32		Yok	634,63±91,62		Yok	653,85±118,58	
Serum Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi	Kötü	5,82±1,78	0,502	Var	6,48±1,62	0,901	Var	10,13±13,48	0,271
	İyi+Orta	6,84±2,54		Yok	6,84±2,78		Yok	6,78±3,26	

Kolon kanserli hastaların hem tümör doku ve tümör çevre dokularında hem de hasta ve kontrol serumlarında, NRF2 ekspresyonları UP ve DOWN olanlar tümör evresine, lenf nodu metastaz varlığına, diferansiyasyon, perinöral invazyon ve anjiyolenfatik invazyon durumlarına göre karşılaştırılmıştır. NRF2 DOWN olanların tümör dokusunda NRF2 protein ekspresyonu ileri evre tümör grubunda (T3+T4) ($1,60\pm0,27$) erken evre tümör grubuna göre (T1+T2) ($0,72\pm0,22$) anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur ($p=0,048$). NRF2 DOWN olanların tümör dokularında protein ekspresyonunun lenf nodu metastazı olanlarda ($1,87\pm0,37$) olmayanlara göre ($0,90\pm0,18$) anlamlı ölçüde arttığı görülmüştür ($p=0,030$). Diğer parametreler bakımından anlamlı farklılık tespit edilmemiştir.

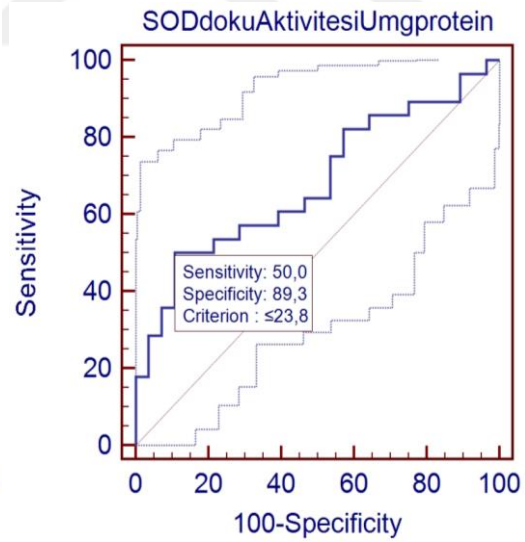
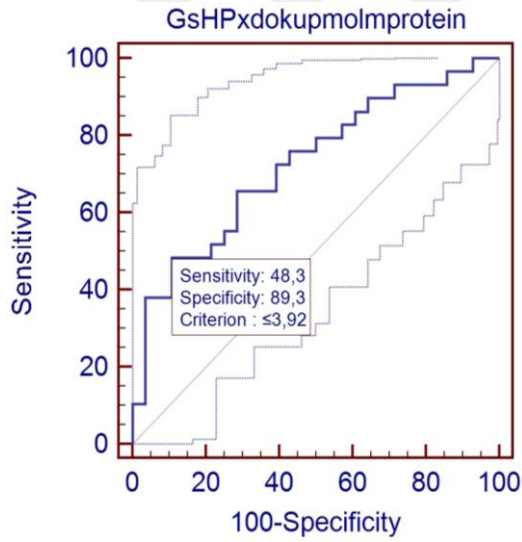
4.4. ROC Analizi

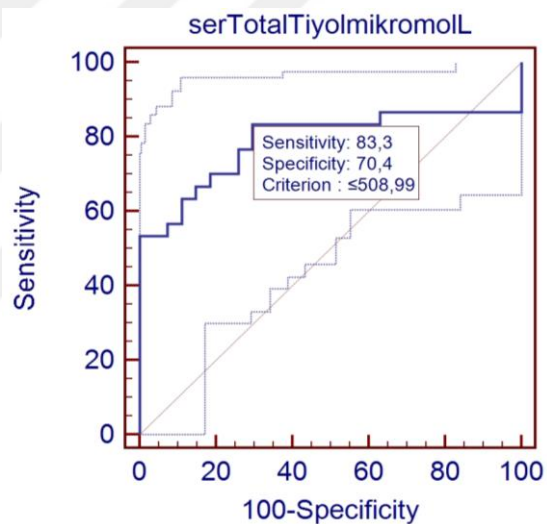
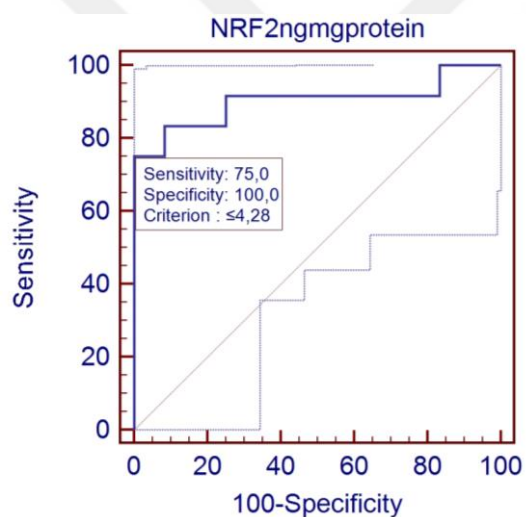
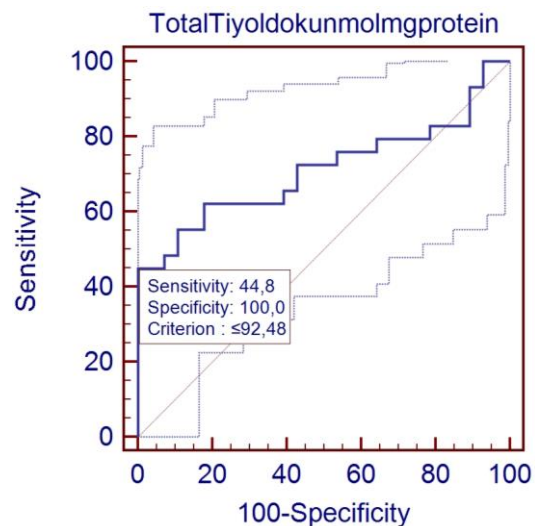
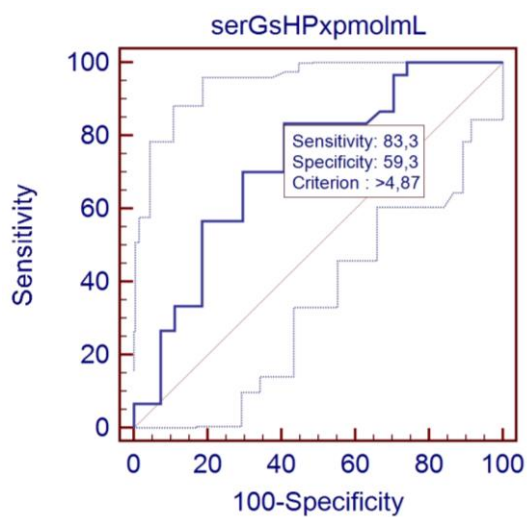
Çalışılan parametrelerin hastalığın sağlıklı bireylerden ayırt edilebilmesinde ve tanısında kullanımın uygunluğunun test edilmesi için yapılan ROC analizi sonuçları Tablo 4-14'te ve ROC eğrileri şekil 4-4'te gösterilmiştir.

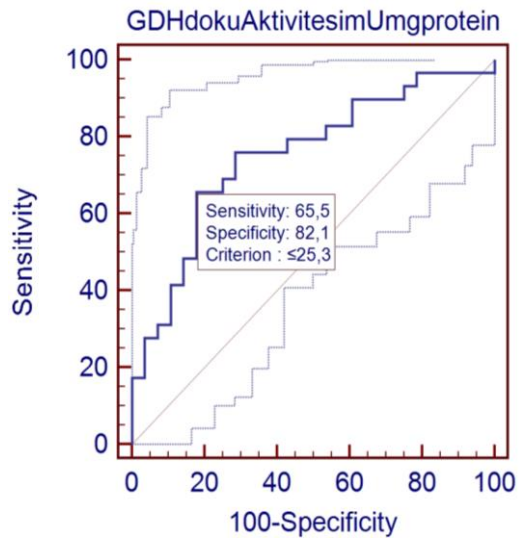
ROC eğri analizine göre hastalarımızın doku glutasyon peroksidaz aktivitesi için %48,3 duyarlılık ve %89,3 özgünlük, doku SOD aktivitesi için %50,0 duyarlılık ve %89,3 özgünlük, serum glutasyon peroksidaz için %83,3 duyarlılık ve %59,3 özgünlük, doku total tiyol için %44,8 duyarlılık ve %100 özgünlük, doku NRF2 düzeyleri için %75 duyarlılık ve %100 özgünlük, serum total tiyol için %83,3 duyarlılık ve %70,4 özgünlük, doku glutamat dehidrogenaz için %65,5 duyarlılık ve %82,1 özgünlükte olduğu saptanmıştır (Şekil 4-4).

Tablo 4-14: ROC analiz sonuçları

	Alan	SH	P değeri	%95 CI
Doku Glutasyon Peroksidaz (pmol/mg protein)	0,725	0,0675	0,0008	0,591 - 0,835
Doku SOD (U/mg protein)	0,681	0,0728	0,0129	0,543 - 0,799
Serum Glutasyon Peroksidaz (pmol/mL)	0,724	0,0691	0,0012	0,590 - 0,834
Doku Total Tiylol (nmol/mg protein)	0,711	0,0723	0,0036	0,575 - 0,823
Doku NRF2 (ng/mg protein)	0,903	0,0730	<0,0001	0,712 - 0,985
Serum Total Tiylol (μM/L)	0,788	0,0663	<0,0001	0,659 - 0,885
Doku Glutamat Dehidrogenaz (mU/mg protein)	0,751	0,0660	0,0001	0,619 - 0,856







Şekil 4-4: ROC eğrileri

TARTIŞMA

Kolon kanseri dünya çapında giderek artan önemli bir halk sağlığı sorunu olmakta ve kadınlarda meme kanserinden erkeklerde ise prostat kanserinden sonra en yüksek insidansa sahip kanserdir. Kolon kanserlerinin çoğu sporadik olarak seyretmekte, yaklaşık olarak %5 kalıtsal olan genetik bir mutasyondan kaynaklanmaktadır. Kolon kanserinin görülmesi yaşam kalitesinin düşmesine ve ölüm riskinin artmasına neden olmaktadır. Bu durum kolon kanserinin önlenmesini ve tedavisini oldukça önemli hale getirmektedir (88).

Normal koşullar altında ROS, hücre çoğalması ve sağkalımı dahil olmak üzere birçok sinyal iletim yolunu düzenlese de, kronik hale gelen oksidatif stres sonucu artan serbest radikaller kolon kanser patogenezinin başlaması, ilerlemesi ve ortaya çıkması üzerinde önemli etkilere sahiptir. Uzun süreli kronik inflamasyon kolonda tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinlerin artışına yol açarak inflamasyonu ve daha sonrasında kanser gelişimini teşvik etmektedir (89). Salınan proinflamatuvar sitokinler de reaktif oksijen türevlerinin ve reaktif nitrojen türevlerinin artışına neden olabilmekte ve de dolaylı olarak oksidatif stres yoluyla DNA hasarına sebep olarak kanser gelişimini teşvik edebilmektedir (90). Oksidatif stres kolon mukozasındaki biyolojik membranda yer alan lipidlerin oksidasyonunda, DNA hasarında ve protein ile karbonhidrat yapılarında hasara neden olarak üç farklı yol üzerinden kanser gelişimine zemin oluşturmaktadır (91). Bununla birlikte kanser hücrelerinin de kendilerini korumak amacıyla oksidatif strese yanıt olarak antioksidan kapasiteyi arttırdıkları bilinmektedir (3). NRF2'nin hücreleri oksidatif stres ve inflamasyondan koruduğu ve aynı zamanda ROS ve elektrofillerin neden olduğu endojen ve eksojen strese karşı hücrel koruyucu tepkilerin ana düzenleyicisi olduğu bilinmektedir. NRF2, kanserdeki çeşitli fizyolojik süreçlere ve düzenleyici mekanizmalara katılarak bağırsağın fizyolojik fonksiyonunda, kolon kanserinin önlenmesinde ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır (72).

NRF2'nin kanser gelişiminde ikili rol sergilediği ve etkisinin koşullara bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Serbest radikaller tarafından aktive edilen NRF2'nin aktivasyonu ya da inhibisyonu, kolon kanserinin önlenmesinde ve tedavisinde etkili olduğu kabul edilmektedir (92). Kanser başlangıcında NRF2 aktivasyonu, hücredeki

reaktif oksijen türevlerini ortadan kaldırarak ve oksidatif stresi azaltıp oksidan-antioksidan dengesini sağlayarak kanserin ilerlemesini önlemek adına yararlı olurken, kanserin ilerlemiş evrelerinde ise tedaviye direnci arttırarak kanser hücrelerinin canlılığını ve büyümesini desteklemektedir (5). Ancak NRF2'nin sağlıklı kişilerde ve kanser durumlarında olası ikili rolünün işlevsel temellerini belirlemek için çok sayıda araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır. NRF2'nin farklı kanser türlerinde spesifik antioksidan etkilerinin aydınlatılması önemli bir çalışma alanı olmaktadır.

Çalışmamıza dahil edilen 30 hastanın 21 tanesinde NRF2 gen ekspresyonunun DOWN regüle edilmiş olduğu bulunmuştur. Tümör dokusunda tümör çevre dokusuna göre NRF2 ekspresyonu daha düşük olmasına karşın, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tümör dokusunda NRF2 gen ekspresyonundaki azalışa benzer şekilde western blot yöntemiyle çalışılmış olan NRF2 protein ekspresyonu da tümör çevre dokusuna kıyasla daha düşük bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlılık elde edilmiştir. Bunun yanı sıra, ELİZA yöntemi kullanılarak tayin edilmiş olan NRF2 protein düzeylerinin de tümör dokusunda tümör çevre dokusuna göre anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Tümör dokusunda NRF2 protein ekspresyonu azalırken NRF2 protein miktarının da azaldığı bulunmuş, ve tümör dokusuna benzer şekilde tümör çevre dokusunda da NRF2 protein ekspresyonu ile protein miktarı arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Ancak tümör çevre dokusundaki NRF2 gen ekspresyonu ile NRF2 protein miktarı arasındaki pozitif korelasyon tümör dokusunda bulunamıştır. Kolon kanser dokusunda NRF2 ekspresyonunu western blot ve immünohistokimyasal yöntemle analiz eden bir çalışmada, kolon kanser dokusunda sağlıklı dokuya göre NRF2 ekspresyonunun hem western blot hem de immünohistokimya ile arttığı gösterilmiş ve NRF2 ekspresyonunun kolon kanser riskini arttırabileceği belirtilmiştir. NRF2'nin aşırı ekspresyonunun KEAP1 mutasyonu ya da NRF2 gen mutasyonu dahil olmak üzere bir çok sebepten meydana gelebileceği öngörülmüştür (6). Bir başka çalışmada, NRF2 düzeylerinin kolorektal kanserde artmış olduğu ve bu durumun hasta prognozunun kötüleşmesine yol açtığı gösterilmiştir (93).

Hu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, NRF2 protein ekspresyonunun daha büyük tümör boyutu, ileri tümör evreleri ve metastaz ile pozitif ilişkili olduğu bildirilmiştir (94). Çalışmamızda, kolon kanserli hastaların NRF2 gen ekspresyonu, protein ekspresyonu ve NRF2 düzeyleri tümörün ileri evresinde (T3+T4), erken

evresine (T1+T2) göre ve lenf nodu metastazı olanlar ile olmayanlara göre karşılaştırıldığında daha yüksek gözlenmesine karşın istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır. Perinöral invazyon olan hastaların tümör dokusunda NRF2 protein ekspresyon seviyeleri daha yüksek bulunmuşken, anjiyolenfatik invazyon olan hastaların da serum NRF2 düzeylerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. NRF2, hücre stresıyla karşı karşıya kaldığında, kolon kanser hücrelerinin tümör mikro çevresinden uzaklaşarak başka bir bölgeye metastazına ve invazyonuna destek olmakta,, tümörün ilerlemesinin hızlanmasına yardımcı olabilmektedir (94). Kolon kanserli hastaların, NRF2 mRNA düzeylerinin değişimlerine göre incelendiğinde, tümör çevre dokularında NRF2 UP regüle olanlarda DOWN regüle olanlara kıyasla NRF2 protein ekspresyonu daha yüksek bulunurken, tümör dokusunda ise NRF2 DOWN olanlarda daha yüksek bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlılık elde edilmemiştir. Kolon kanserli hastalarda, NRF2 DOWN olanların tümör dokusunda NRF2 protein ekspresyonu ileri evre tümör grubunda, erken evre tümör grubuna göre anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur. NRF2 DOWN olanların tümör dokularında protein ekspresyonunun lenf nodu metastazı olanlarda ise olmayanlara göre anlamlı ölçüde arttığı görülmüştür. Tümör dokusundaki NRF2 gen ifadesinin azalması ile birlikte artan NRF2 protein ekspresyonu, mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, NRF2'nin yıkımının engellendiğini ve bunun sonucunda NRF2'nin sitoplazmadan nukleusa translokasyonu ile kendi gen ifadesini regüle edebildiği ve NRF2'nin translasyonu sonrasındaki modifikasyonu ile yapısında değişikliğe neden olabileceği gösterilmiştir (95). Elde ettiğimiz veriler NRF2'nin kanserin ileri evresi, lenf nodu metastazı, perinöral invazyonu ve anjiyolenfatik invazyon ile ilişkili olabileceğini işaret etmektedir. NRF2 protein seviyesi yüksek iken, NRF2 mRNA seviyelerinin daha düşük bulunmuş olması sentezlenen mRNA'ların hızlıca proteine çevrilmiş olmasından kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. Diğer taraftan, antioksidan sistemin ana düzenleyicilerinden biri olan NRF2'nin, hücrel NRF2 seviyesini bir otokrin düzenleyici geri bildirim döngüsüyle korumak için kendi bozunmasını düzenleyerek redoks homeostazına yol açacağı ileri sürülmektedir (96).

NRF2, bir transkripsiyon faktörüdür ve oksidatif hasarın çeşitli türlerine karşı koruyucu rolü olan antioksidan enzimleri kodlayan genlerin, antioksidan yanıt element-bağımlı ekspresyonunu düzenleyen hücrel antioksidan yanıtın başlıca modülatörüdür ve süperoksit dismutaz ile glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimleri kodlayan

genler NRF2'nin hedef genleri arasındadır (97). Çalışmamızda NRF2 ekspresyonunun ve protein seviyesinin azalması antioksidan savunmanın azalması ve oksidatif stresin artması ile ilişkili bulunmuştur. SOD enzimi hücrede süperoksit anyonunun hidrojen perokside dismutasyonunu katalizlerken, glutatyon peroksidaz enzimi ise hidrojen peroksidin eliminasyonunda yer alan başlıca antioksidan enzimlerdir. Çalışmamızda tümör dokusunda SOD ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin tümör dokusunda anlamlı ölçüde azaldığı bulunmuştur. Bunlara ek olarak, antioksidan kapasitenin göstergesi olan FRAP düzeyleri ile non-enzimatik antioksidan olan total tiyol düzeyleri de tümör dokusunda anlamlı ölçüde azalmıştır. AOPP düzeyleri yüksek olmasına karşın bu artış anlamlı bulunamamıştır.

Kolon kanserli hastaların serum NRF2 düzeylerinde azalış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. Literatürde, kolon kanserinde serum NRF2 düzeylerini inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda kolon kanserli hastaların serumlarında SOD aktivitesi azalırken, glutatyon peroksidaz aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Hem hastaların serumlarında hem de kontrol grubunun serumlarında SOD aktivitesi ile glutatyon peroksidaz aktivitesi arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Hücrede SOD enzim aktivitesinde azalma olduğu durumlarda, bu durumu kompanse etmek için glutatyon sentezi artmakta ve böylelikle hücrelerin oksidatif stres ve ölümden korunması sağlanmaktadır (98). Tümör dokusuna benzer şekilde kolon kanserli hastaların serumlarında FRAP ve total tiyol düzeyleri kontrole göre düşük bulunurken, AOPP düzeylerinin tümör dokusunun aksine hastaların serumlarında azalmış olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışma düşük SOD aktivitesinin kolon kanser riski ile ilişkili olabileceğini, SOD aktivitesindeki artışın kolon kanser gelişimini azaltabileceğini bildirirken (99), başka bir çalışmada SOD enziminin kolon kanserinin tespit edilmesinde önemli bir biyobelirteç olabileceği ve aktivitesindeki artışın tümör evrelemesindeki artış ile orantılı olduğu gösterilmiştir (100). Glutatyon peroksidaz aktivitesinin yeni tanı konulmuş olanlarda ve ameliyat öncesinde anlamlı şekilde azaldığı, ameliyat sonrasında ise kontrole göre değişmediği bulunmuştur. Bu durumun, hastalığın evresine ve farklılaşma derecesine bağlı olabileceği, tanıda kullanılabileceği, enzimin aktivitesindeki azalmanın kolon kanser riskinin artmasıyla ilişkili olabileceği ve tedaviye yanıtın göstergeleri olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (101).

Çalışmamızda sağlıklı kontrollerin serumlarında NRF2 ile SOD ve glutatyon peroksidaz enzimi arasında pozitif korelasyon, SOD aktivitesi ile oksidatif stresin belirteçlerinden olan AOPP düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunurken, glutatyon peroksidaz aktivitesi ile AOPP düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Kolon kanser hastalarında ise AOPP düzeyleri ile hem SOD hem de glutatyon peroksidaz aktivitesi arasında korelasyon bulunmamıştır. Kontrol grubunda NRF2 düzeyleri ile hem glutatyon peroksidaz aktivitesi hem de AOPP düzeyleri arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur; ancak hasta grubunda ise korelasyon bulunmamıştır. Sağlıklı kontrollerde serumda antioksidan savunmanın artmasıyla birlikte oksidatif stres azalırken, kolon kanserli hastaların serumlarında oksidan-antioksidan dengenin bozulduğunu söyleyebiliriz.

Diferansiyasyonu kötü olan hastaların tümör dokusunda AOPP düzeyleri daha yüksek iken, serum AOPP düzeyleri daha düşük bulunmuştur. Bununla birlikte, diferansiyasyonu kötü olan hastalarda serum FRAP ve total tiyol düzeylerinin düşük olduğu görülmüştür. Anjiyolenfatik invazyonu olanlarda serum SOD düzeylerinin azaldığı bulunmuştur. Kanser karakteristik özelliklerine göre bakıldığında, oksidatif stresin kanserin prognozunda etkili olabileceğini söyleyebiliriz. Dokuda NRF2 UP ve DOWN regüle olanlarda hasta ve kontrol grubu arasında NRF2 protein düzeyi ve antioksidan parametreler bakımından anlamlı farklılık bulunamamıştır. Kolon kanserli hastaların serum değerleri karşılaştırıldığında ise, NRF2 UP regüle olanlarda DOWN regüle olanlara kıyasla AOPP düzeyleri anlamlı ölçüde azalırken, total tiyol düzeylerinin anlamlı ölçüde artmış olduğu bulunmuştur.

Glutamin kanser hücre metabolizması için önemli bir besin kaynağı olmakla birlikte, serum glutamin düzeyinin kolon kanserli hastalarda zayıf bir prognostik faktör olabileceği gösterilmiştir. Serum glutamin düzeylerinin azalmasının proinflatuvar sitokinlerin artışı, kolon kanserinin ilerlemesi ve hastalığın şiddetinin artması ile ilişkili olduğu ve serumdaki bu azalmanın kanser hücrelerinin fazla miktarda kullanımından kaynaklı olabileceği belirtilmiştir (102). Çalışmamızda, kolon kanserli hastaların hem tümör dokusunda hem de serumlarında glutamat-glutamin düzeyleri açısından kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilememiştir. Ancak tümör dokusunda glutamat dehidrogenaz aktivitesi çevre dokuya göre anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. NRF2 glutaminaz enziminin sentezini indükleyerek, glutaminden glutamat sentezini

arttırmaktadır. Eğer hücrede NRF2 ekspresyonu azalırsa, bu durum glutamatin glutatyon sentezine dahil edilmesini azaltmaktadır (8). Bilindiği gibi glutamat, antioksidan savunmayı desteklemek için glutatyon sentezinde kullanımının yanı sıra TCA döngüsünde enerji üretmek için yakıt olarak da kullanılmaktadır (11). Kanseri hücrelerinde glutamat dehidrogenaz aktivitesinin azalması ile glutamattan α -KTG sentezi ve α -KTG' dan da TCA döngüsünde sentezlenen bir sonraki ara ürün olan fumarat sentezi azalmış olur. Fumarat hücrede glutatyon peroksidaza bağlanarak enzimin aktivasyonunu sağlar. Dolaylı olarak, GDH enzimi hücredeki α -KTG düzeylerinin regülasyonu üzerinden antioksidan sisteme etki eder. Tümör dokusundaki azalmış GDH aktivitesi dolaylı olarak glutatyon peroksidaz aktivitesini regüle edebilmektedir. Çalışmamızda tümör dokusunda glutatyon peroksidaz ile GDH aktivitesi arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada, NRF2 down olan hücrelerde glutamin ve glutamat düzeylerinde belirgin bir artış saptanmış, NRF2 baskılanmasının glutatyon sentezini etkilediği ve indirgenmiş glutatyon (GSH) ile okside glutatyon (GSSG) düzeylerini azalttığı bulunmuştur (8). NRF2 ayrıca glutatyon sentezinde hız kısıtlayıcı bir enzim olan gama-glutamil-sisteinil-ligaz sentezini indükleyerek glutamini glutatyon sentezine yönlendirmektedir (82). NRF2 aynı zamanda sistin taşıyıcısının bir alt birimi olan glutamat-sistein antiporterini (xCT) kodlayan geni doğrudan aktive ederek glutamatin hücre dışına, sistinin hücre içerisine alımını destekler. Hücre içerisine alınan sistein glutatyon sentezinde kullanılarak kanser hücresinde artmış reaktif türevlerine karşı antioksidan savunmayı destekler (103). Çalışmamızda, kontrol grubunda serum NRF2 düzeyi ile glutamat-glutamin düzeyleri arasında negatif korelasyon, glutatyon peroksidaz aktivitesi arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Ancak kontrolde serum glutatyon peroksidaz aktivitesi ile glutamat-glutamin düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Kolon kanser hasta serumlarında ise bu parametreler bakımından herhangi bir korelasyon saptanmamıştır. Tümör çevre dokusunda glutamat-glutamin düzeyleri ile antioksidan sistemin belirteçlerinden olan FRAP, total tiyol, SOD aktivitesi ve glutatyon peroksidaz aktivitesi arasında güçlü pozitif korelasyonlar bulunmuştur. Diğer taraftan glutamat-glutamin düzeyleri ile GDH aktivitesi arasında da güçlü pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Tümör çevre dokusunda glutatyon peroksidaz aktivitesi ile GDH aktivitesi arasında güçlü pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Tümör dokusunda ise glutamat-glutamin düzeyleri NRF2 protein ekspresyonunun ve NRF2

protein miktarının artmasıyla birlikte artış göstermiştir. Bunun yanı sıra glutamat-glutamin düzeyleri ile GDH aktivitesi, SOD aktivitesi ve glutatyon peroksidaz aktivitesi arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur. Perinöral invazyon olan hastaların tümör dokusunda glutamat-glutamin düzeyleri yüksek tespit edilmiştir.

Oksidatif stres kolon kanserinde önemli rol oynamaktadır. Ancak neden olan mekanizmalar ve oksidatif stresin kanserin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu hala belirsizliğini korumaktadır. Bu nedenle oksidatif stresin rolünü belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. NRF2'nin kanserdeki rolü hala tartışmalı olmakla birlikte kanserde koruyucu mu yoksa destekleyici mi olduğu sorusunun cevabı belirsizliğini korumaktadır. Çalışmamızda NRF2'nin gen ekspresyon düzeyi, western blot ve ELİZA ile protein düzeyi ve serum düzeyleri ile aynı zamanda oksidan-antioksidan sistemin önemli kritik enzim ve molekülleri ile beraber değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarında NRF2 ekspresyon düzeyleri ile NRF2'nin protein seviyeleri ve serum seviyeleri arasında hastalık riski ile ilgili herhangi bir bulgu elde edilememiştir. Ancak NRF2 ekspresyonunun farklılığının, hastaların özellikle tümör progresyonu bakımından değerlendirildiğinde tümörlü ve tümörsüz dokularda farklı şekillerde NRF2 proteinine ve diğer antioksidan ve oksidatif stres moleküllerine etkileri olduğunu saptadık. Sonuçlarımıza göre NRF2 ekspresyonu tümörün ilerleyişi sırasında özellikle de tümörün ileri evrelerinde tüm oksidan-antioksidan parametrelere etki ederek onların düzeylerini serum ve özellikle de dokuda düzenlemeye yönelik süreçlerde önemli rol almaktadır. NRF2'nin kolon kanserinde düzeylerinin azalmasının antioksidan sistemin azalmasına ve hücrede oksidatif stresin artmasına neden olabileceğini söyleyebiliriz. Bunlara ek olarak, kolon kanserinde NRF2 tarafından regüle edilen ve antioksidan sistemde rol alan farklı diğer kritik moleküller ile beraber yapılacak çalışmaların bu konudaki açıklanmayan noktaları aydınlatacağını düşünümekteyiz.

5. KAYNAKLAR

1. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:956792.
2. Panieri E, Buha A, Telkoparan-akillilar P, Cevik D, Kouretas D, Veskoukis A, et al. Potential applications of NRF2 modulators in cancer therapy. *Antioxidants*. 2020;9(3):1–48.
3. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(7):579–91.
4. Jenkins T, Gouge J. Nrf2 in cancer, detoxifying enzymes and cell death programs. *Antioxidants*. 2021;10(7).
5. Gonzalez-Donquiles C, Alonso-Molero J, Fernandez-Villa T, Vilorio-Marques L, Molina AJ, Martin V. The NRF2 transcription factor plays a dual role in colorectal cancer: A systematic review. *PLoS One*. 2017;12(5):1–14.
6. Lee YJ, Kim W Il, Bae JH, Cho MK, Lee SH, Nam HS, et al. Overexpression of Nrf2 promotes colon cancer progression via ERK and AKT signaling pathways. *Ann Surg Treat Res*. 2020;98(4):159–67.
7. Hu T, Yao Y, Yu S, Guo H, Han L, Wang W, et al. Clinicopathologic significance of CXCR4 and Nrf2 in colorectal cancer. *J Biomed Res*. 2013;27(4):283–90.
8. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, et al. Nrf2 Redirects Glucose and Glutamine into Anabolic Pathways in Metabolic Reprogramming. *Cancer Cell* [Internet]. 2012;22(1):66–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.016>
9. Sayin VI, Leboeuf SE, Singh SX, Davidson SM, Biancur D, Guzelhan BS, et al. Activation of the NRF2 antioxidant program generates an imbalance in central carbon metabolism in cancer. *Elife*. 2017;6:1–23.
10. Stacy DR, Kim E, Massion PP, Yarbrough WG, Hallahan DE, Sekhar KR, et al. Increased expression of nuclear factor E2 p45-related factor 2 (NRF2) in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 2006;28(9):813–8.
11. Deberardinis RJ, Cheng T. Q's next: The diverse functions of glutamine in

- metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*. 2010;29(3):313–24.
12. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi DJ, John A, et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancer*. 2022;14(7):1732.
 13. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019;16(12):713–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>
 14. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1079–99.
 15. Aguilera A, Gómez-gonzález B. Genome instability : a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet*. 2008;9(3):204–17.
 16. Mojarad EN, Kuppen PJK, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2013;6(3):120–8.
 17. Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag CJ, Laversanne M, et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*. 2023;72(2):338–44.
 18. Mph RLS, Wagle SN, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics , 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023;73(3):233–54.
 19. Gausman V, Dornblaser D, Anand S, Richard B, Connell KO, Du M, et al. Risk Factors Associated With Early-onset Colorectal Cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;18(12):2752–9.
 20. Ellis L, Abrahao R, Mckinley M, Yang J, Somsouk M, Marchand L Le, et al. Colorectal Cancer Incidence Trends by Age , Stage , and Racial / Ethnic Group in California , 1990 – 2014. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018;27(9):1011–8.
 21. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control*. 2013;24(6):1207–22.
 22. NIH Advances in Colorectal Cancer Research: Stages of Colorectal Cancer [Internet]. 2021. Available from: <https://www.nih.gov/research->

training/advances-colorectal-cancer-research

23. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, et al. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening. *N Engl J Med*. 2014;370(14):1287–97.
24. Wieten E, Schreuders EH, Grobbee EJ, Nieboer D, Bramer WM, Lansdorp-vogelaar I, et al. Incidence of faecal occult blood test interval cancers in population-based colorectal cancer screening: a systematic review and meta-analysis. *Gut*. 2019;68(5):873–81.
25. Schuell B, Gruenberger T, Dworan N, Depisch D, Lang F, Schneeweiss B, et al. Side effects during chemotherapy predict tumour response in advanced colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2005;93(7):744–8.
26. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Med Sci (Basel, Switzerland)*. 2018;6(2):31.
27. Kumar A, Gauta V, Sandhu A, Rawat K, Sharma A, Saha L. Current and emerging therapeutic approaches for colorectal cancer: A comprehensive review. *World J Gastrointest Surg*. 2023;15(4):495–519.
28. A Adwas A, Ibrahim Elsayed AS, Elsayed Azab A, Quwaydir FA. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J Appl Biotechnol Bioeng*. 2019;6(1):43–7.
29. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9–19.
30. Sharifi-Rad M, Anil Kumar N V., Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol*. 2020;11:694.
31. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44–84.
32. Bartosz G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol*. 2009;77(8):1303–15.
33. Harwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(5):1147–50.
34. Singh YP, Patel RN, Singh Y, Butcher RJ, Vishakarma PK, Singh RKB.

- Structure and antioxidant superoxide dismutase activity of copper(II) hydrazone complexes. *Polyhedron* [Internet]. 2016;122:1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2016.11.013>
35. MatÉs JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin Biochem*. 1999;32(8):595–603.
 36. Nandi A, Yan L, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:9613090.
 37. Brigelius-flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *BBA - Gen Subj*. 2013;1830(5):3289–303.
 38. Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell*. 2018;34(1):21–43.
 39. Arfin S, Jha NK, Jha SK, Kesari KK, Ruokolainen J, Roychoudhury S, et al. Oxidative stress in cancer cell metabolism. *Antioxidants*. 2021;10(5):1–28.
 40. Smith MT, Guyton KZ, Gibbons CF, Fritz JM, Portier CJ, Rusyn I, et al. Key characteristics of carcinogens as a basis for organizing data on mechanisms of carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 2016;124(6):713–21.
 41. Sova H, Puistola U, Kauppila S, Karihtala P. 8-Hydroxydeoxyguanosine : a new potential independent prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(6):1018–23.
 42. Tothhawng L, Deng S, Pervaiz S, Yap CT. Redox regulation of cancer cell migration and invasion. *Mitochondrion*. 2012;13(3):246–53.
 43. Corcoran A, Cotter TG. Redox regulation of protein kinases. *FEBS J*. 2013;280(9):1944–65.
 44. Hermann E, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990;186:407–21.
 45. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
 46. Cai F, Dupertuis YM, Pichard C. Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012;15(2):99–106.
 47. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer*

- Cell. 2020;38(2):167–97.
48. Glasauer A, Chandel NS. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2014;92(1):90–101.
 49. Jaramillo MC, Zhang DD. The emerging role of the Nrf2 – Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev.* 2013;27(20):2179–91.
 50. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(21):9926–30.
 51. Vomund S, Schäfer A, Parnham MJ, Brüne B, Von Knethen A. Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):1–19.
 52. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1999;13(1):76–86.
 53. Wang H, Liu K, Geng M, Gao P, Wu X, Hai Y, et al. RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res.* 2013;73(10):3097–108.
 54. Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. The Carboxy-Terminal Neh3 Domain of Nrf2 Is Required for Transcriptional Activation. *Mol Cell Biol.* 2005;25(24):10895–906.
 55. Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A, Yamamoto M. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes to Cells.* 2001;6(10):857–68.
 56. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236(2):313–22.
 57. Rada P, Rojo AI, Chowdhry S, McMahon M, Hayes JD, Cuadrado A. SCF/ β -TrCP Promotes Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Degradation of the Nrf2 Transcription Factor in a Keap1-Independent Manner. *Mol Cell Biol.* 2011;31(6):1121–33.
 58. Tong KI, Katoh Y, Kusunoki H, Itoh K, Tanaka T, Yamamoto M. Keap1 Recruits Neh2 through Binding to ETGE and DLG Motifs: Characterization of

- the Two-Site Molecular Recognition Model. *Mol Cell Biol.* 2006;26(8):2887–900.
59. Panieri E, Saso L. Potential applications of NRF2 inhibitors in cancer therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019.
 60. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonenn AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol* [Internet]. 2013;1(1):45–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001>
 61. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells.* 2011;16(2):123–40.
 62. Chowdhry S, Zhang Y, McMahon M, Sutherland C, Cuadrado A, Hayes JD. Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene.* 2013;32(32):3765–81.
 63. Wu T, Zhao F, Gao B, Tan C, Yagishita N, Nakajima T, et al. Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis. *Genes Dev.* 2014;28(7):708–22.
 64. Panieri E, Saso L. Potential applications of NRF2 inhibitors in cancer therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019(4):1–34.
 65. Kerins MJ, Ooi A. A catalogue of somatic NRF2 gain-of-function mutations in cancer. *Sci Rep.* 2018;8(1):12846.
 66. Hanada N, Takahata T, Zhou Q, Ye X, Sun R, Itoh J, et al. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2012;12(1):66. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/66>
 67. Zhao XQ, Zhang YIFEI, Xia YIF, Zhou ZMEI, Cao YQ. Promoter demethylation of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 gene in drug-resistant colon cancer cells. *Oncol Lett.* 2015;10(3):1287–92.
 68. Suzuki T, Shibata T, Takaya K, Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, et al. Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol Cell Biol.* 2013;33(12):2402–12.
 69. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci*

- [Internet]. 2014;39(4):199–218. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>
70. Ahn YJ, Kim H. Lutein as a modulator of oxidative stress-mediated inflammatory diseases. *Antioxidants*. 2021;10(9):1448.
 71. Milkovic L, Zarkovic N, Saso L. Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol* [Internet]. 2017;12:727–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.013>
 72. Li J, Wang D, Liu Y, Zhou Y. Role of NRF2 in Colorectal Cancer Prevention and Treatment. *Technol Cancer Res Treat*. 2022;21:15330338221105736.
 73. Huang Y, Yang W, Yang L, Wang T, Li C, Yu J, et al. Nrf2 inhibition increases sensitivity to chemotherapy of colorectal cancer by promoting ferroptosis and pyroptosis. *Sci Rep* [Internet]. 2023;13(1):14359. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41490-x>
 74. Zhan L, Zhang H, Zhang Q, Woods CG, Chen Y, Xue P, et al. Regulatory role of KEAP1 and NRF2 in PPAR γ expression and chemoresistance in human non-small-cell lung carcinoma cells. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(4):758–68.
 75. Huang Y, Mao Y, Li H, Shen G, Nan G. Knockdown of Nrf2 inhibits angiogenesis by downregulating VEGF expression through PI3K/Akt signaling pathway in cerebral microvascular endothelial cells under hypoxic conditions. *Biochem Cell Biol*. 2018;96(4):475–82.
 76. Zhang HS, Zhang Z-G, Du G-Y, Sun H-L, Liu H-Y, Zhou Z, et al. Nrf2 promotes breast cancer cell migration via up - regulation of G6PD / HIF - 1 α / Notch1 axis. *J Cell Mol Med*. 2019;23(5):3451–63.
 77. Cruzat V, Rogero MM, Keane KN, Curi R, Newsholme P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients*. 2018;10(11):1564.
 78. Xiang L, Xie G, Liu C, Zhou J, Chen J, Yu S, et al. Knock-down of glutaminase 2 expression decreases glutathione, NADH, and sensitizes cervical cancer to ionizing radiation. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(12):2996–3005.
 79. Zhu H, Liu F, Zhang Y, Yang J, Xu X, Guo X, et al. (2S,4R)-4-[¹⁸F]Fluoroglutamine as a PET Indicator for Bone Marrow Metabolism Dysfunctional: from Animal Experiments to Clinical Application. *Mol Imaging Biol*. 2019;21(5):945–53.

80. About OA, Habib SL, Trott J, Stewart B, Liang S, Chaudhari AJ, et al. Glutamine Addiction in Kidney Cancer Suppresses Oxidative Stress and Can Be Exploited for Real-Time Imaging. *Cancer Res.* 2017;77(23):6746–58.
81. Matés JM, Campos-Sandoval JA, de los Santos-Jiménez J, Márquez J. Glutaminases regulate glutathione and oxidative stress in cancer. *Arch Toxicol* [Internet]. 2020;94(8):2603–23. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02838-8>
82. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Asp Med.* 2009;30(1–2):42–59.
83. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34(3):497–500.
84. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 1999;299(1995):15–27.
85. Hu M-L. Measurement of Protein Thiol Groups and Glutathione in Plasma. *Methods Enzymol.* 1994;233(1994):380–5.
86. Hanasand M, Omdal R, Norheim KB, Gøransson LG, Brede C, Jonsson G. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin Chim Acta.* 2012;413(9–10):901–6.
87. Ellis G, Goldberg DM. Optimal conditions for the kinetic assay of serum glutamate dehydrogenase activity at 37 degrees C. *Clin Chem.* 1972;18(6):523–7.
88. Menon G, Recio-Boiles A, Lotfollahzadeh S, Cagir B. Colon Cancer. 2024.
89. Muthusami S, Ramachandran IK, Babu KN, Krishnamoorthy S, Guruswamy A, Queimado L, et al. Role of Inflammation in the Development of Colorectal Cancer. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2021;21(1):77–90.
90. Mangerich A, Knutson CG, Parry NM, Muthupalani S, Ye W, Prestwich E, et al. Infection-induced colitis in mice causes dynamic and tissue-specific changes in stress response and DNA damage leading to colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(27):E1820-9.
91. Basak D, Uddin MN, Hancock J. The Role of Oxidative Stress and Its Counteractive Utility in Colorectal Cancer (CRC). *Cancers(basel).* 2020;12(11):3336.
92. He F, Antonucci L, Karin M. NRF2 as a regulator of cell metabolism and

- inflammation in cancer. *Carcinogenesis*. 2020;41(4):405–16.
93. Torrente L, Maan G, Rezig AO, Quinn J, Jackson A, Grilli A, et al. High NRF2 Levels Correlate with Poor Prognosis in Colorectal Cancer Patients and with Sensitivity to the Kinase Inhibitor AT9283 In Vitro. *Biomolecules*. 2020;10(10):1365.
 94. Hu T, Yao Y, Yu S, Guo H, Han L, Wang W, et al. Clinicopathologic significance of CXCR4 and Nrf2 in colorectal cancer. *J Biomed Res*. 2013;27(4):283–90.
 95. Wasik U, Milkiewicz M, Kempinska-podhor A. Protection against oxidative stress mediated by the Nrf2 / Keap1 axis is impaired in Primary Biliary Cholangitis. *Sci Rep*. 2017;7:44769.
 96. Paramasivan P, Kankia IH, Langdon SP, Deeni YY. Emerging role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in the mechanism of action and resistance to anticancer therapies. *Cancer Drug Resist*. 2019;2(3):490–515.
 97. Lee DY, Song MY, Kim EH. Role of oxidative stress and nrf2/keap1 signaling in colorectal cancer: Mechanisms and therapeutic perspectives with phytochemicals. *Antioxidants*. 2021;10(5).
 98. Lubos E, Loscalzo J, Handy D. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15:1957–97.
 99. Adachi Y, Nojima M, Mori M, Yamano H-O, Sasaki Y, Nakase H, et al. Association of serum superoxide dismutase activity and the incidence of colorectal cancer in a nested case-control study. *cancer Epidemiol*. 2023;87:102455.
 100. Irawan B, Labeda I, Erasio R, Sampetoding S, Kusuma MI, Aboyaman J, et al. Association of superoxide dismutase enzyme with staging and grade of differentiation colorectal cancer: A cross-sectional study. *Ann Med Surg* [Internet]. 2020;58:194–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2020.08.032>
 101. Al-ansari RF, AL-Gebori AM, Sulaiman GM. Serum levels of zinc, copper, selenium and glutathione peroxidase in the different groups of colorectal cancer patients. *Casp J Intern Med*. 2020;11(4):384–90.
 102. Ling HH, Pan Y-P, Fan C-W, Tseng W-K, Huang J-S, Wu T-H, et al. Clinical

- Significance of Serum Glutamine Level in Patients with Colorectal Cancer. *Nutrients*. 2019;11(4):1–10.
103. Okazaki K, Papagiannakopoulos T. Metabolic features of cancer cells in NRF2 addiction status. *Biophys Rev*. 2020;12(2):435–41.



ETİK KURUL KARARI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KOLON KANSERİNDE NRF2 EKSPRESYONU VE ANTİOKSİDAN SİSTEM İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 13	% 12	% 8	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 6
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
4	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	dspace.trakya.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Karadag, Firat. "Onobrychis Argyrea Subsp. Isauricanin (Fabaceae) Antioksidan Aktivitesinin Degerlendirilmesi", Necmettin Erbakan University (Turkey), 2021 Yayın	<% 1