



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**OBEZİTE TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI İLAÇLARIN KOLOREKTAL
KANSER GELİŞİMİNDE ETKİLİ HEDEF GENLER ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

MUHSİNE ÖZEN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

DOÇ. DR. ERCAN ÇAÇAN

ARALIK-2021

Her hakkı saklıdır.

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**OBEZİTE TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI İLAÇLARIN KOLOREKTAL
KANSER GELİŞİMİNDE ETKİLİ HEDEF GENLER ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

MUHSİNE ÖZEN

TOKAT

ARALIK-2021

Her hakkı saklıdır.



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünü tarafından 2021/09 no'lu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasın da bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

MUHSİNE ÖZEN

10 ARALIK 2021

ÖZET

OBEZİTE TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI İLAÇLARIN KOLOREKTAL KANSER GELİŞİMİNDE ETKİLİ HEDEF GENLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Özen, Muhsine

Yüksek Lisans, Biyoloji Bilimdalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ercan Çaçan

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Özdemir

Aralık 2021, xi + 72 sayfa

Dünya nüfusunun üçte biri aşırı kilolu veya obez olarak sınıflandırılmaktadır. Kentleşme ile artan hazır gıdaların tüketiminin fazlaşmasıyla birlikte kişilerin diyeti ile aldığı kalori miktarı ve harcanan enerji arasında ters bir orantı ortaya çıkmaktadır. Vücutta aşırı yağ birikimi ve olumsuz metabolitlerin artması ile çeşitli hastalıklara neden olur. Artan yağlanma kolon ve rektum olmak üzere diğer kanser çeşitlerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Kanser çeşitli sebeplerden kaynaklanarak hücrelerin kontrolsüz çoğalması, hücre döngüsü sürecinde görev alan tamir mekanizmalarının hasarı algılayamaması ile kontrolsüz çoğalan hücrelerin normal hücreler gibi işlevini yerine getirememesi sonucu oluşan hücre topluluğudur. Hücrelerde meydana gelen işlev bozukluğunun kaynağı genlerin ekspresyon miktarlarının değişmesi ve baskılanması ile oluşur. Hücrelerde bu düzeni sağlayan tümör baskılayıcı genler ve protoonkogenlerin mutasyon veya çevresel kaynakların etkisi sonunda ekspresyon miktarı değişir. Bu değişim sonucunda tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonu baskılanarak anormal hücrelerin apoptoza gitmesi gerekirken hücrenin apoptoza gitmesi engellenir. Bunun sonucunda hücreler kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalırlar. Protoonkogenler hücre döngüsünde ve hücre işlevlerinde görev alırlar. Mutasyon ve çevresel etkiler sonucunda onkogenlere dönüşerek hücrelerin hata sonucu bölünmesini engellemek yerine hücrelerin anormal şekilde bölünmesine sebep olurlar. Kolorektal kanser hücre hatlarını kullandığımız bu çalışmada obezite tedavisinde kullanılan ilaçlar olan orlistat ve semaglutidenin kolorektal kanser hücre canlılığını nasıl etkilediğini ve bazı tümör baskılayıcı ve onkogenlerin ekspresyon düzeylerini ne şekilde etkilediğini ortaya koyduk. Bu amaç doğrultusunda, hücre canlılığı MTT testi ile ve gen ekspresyon analizleri qRT-PCR ile belirlendi. Elde edilen bulgulara göre, yüksek konsantrasyonlarda kullanılan orlistat hücre canlılığını azaltırken, semaglutidenin hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlendi. Ayrıca, kullanılan ilaçların kolorektal kanser hücre hatlarında tümör baskılayıcı ve onkogenlerin ekspresyon profillerinde değişikliğe neden olduğunu ortaya koyduk.

ANAHTAR KELİMELER: Obezite, Kolorektal Kanser, Tümör Baskılayıcı Genler, Onkogenler, Orlistat, Semaglutide



ABSTRACT

INVESTIGATION THE EFFECT OF SOME DRUGS, USED IN THE TREATMENT OF OBESITY, ON TARGET GENES THAT PLAY ROLES IN THE DEVELOPMENT OF COLORECTAL CANCER

Özen, Muhsine

Master's Thesis, Department of Biology

Advisor: Associate Prof. Dr. Ercan Çağan

Second Advisor: Assistant Prof. Dr. Tuğba Özdemir

December 2021, xi + 72 pages

One-third of the world's population is classified as overweight or obese. With the increase in the consumption of ready-to-eat foods with urbanization, an inverse ratio emerges between the diet of the people and the amount of calories they take and the energy spent. Excessive accumulation of fat in the body and increase of negative metabolites causes various diseases. Increasing lubrication causes the formation of other types of cancer, especially colon and rectum. Cancer is a group of cells formed as a result of the uncontrolled proliferation of cells due to various reasons, the inability of the repair mechanisms involved in the cell cycle process to detect the damage, and the uncontrolled proliferation of cells not performing their functions like normal cells. The source of the dysfunction occurring in the cells occurs with the change and suppression of the expression amounts of the genes. The expression amount of tumor suppressor genes and protooncogenes that provide this order in cells changes as a result of mutation or the effect of environmental sources. As a result of these changes, the expression of tumor suppressor genes are suppressed, which prevent abnormal cells from undergoing apoptosis. As a result, cells multiply uncontrollably and abnormally. Protooncogenes take part in the cell cycle and cellular functions. In this study, in which we used colorectal cancer cell lines, we revealed how orlistat and semaglutide, which are drugs used in the treatment of obesity, affect cancer cell viability and how they affect the expression levels of some tumor suppressor and oncogenes. For this purpose, cell viability was determined by MTT assays and gene expression analyzes were determined by qRT-PCR. According to the findings, it was observed that high concentrations of orlistat decreased cell viability, while semegulitidine did not cause a significant change in cell viability. In addition, we revealed that the drugs used cause changes in the expression profiles of tumor suppressor and oncogenes in colorectal cancer cell lines.

KEYWORDS: Obesity, Colorectal Cancer, Tumor Suppressor Genes, Oncogenes, Orlistat, Semaglutide

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bana destek olan, yol gösteren, hedeflerime ulaşmam konusunda bana olan desteğini her zaman hissettiğim, sahip olduğu akademik bilgi ve tecrübelerinden her daim faydalandığım kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN'a sonsuz saygı ve minnetlerimi sunarım.

Tez savunmamı kabul eden, kattıkları bilgi ve düşünceleri için sayın jüri üyeleri Doç. Dr. Ali AYDIN ve Dr. Öğr. Üyesi Nilgün YERSAL'a teşekkür ederim.

Tecrübeleri ve kıymetli bilgileri sayesinde eğitim hayatıma katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca bana olan destek ve sevgileri ile her zaman beni kuvvetlendiren, her zaman arkamda durup güçlü bir birey olmamı sağlayan, babam Adli ÖZEN, annem Mucize ÖZEN'e teşekkürlerimi sunarım. Daima bana destek olan, varlıklarını her koşulda hissettiğim, ablalarım Betül KURBAN ve Tuğçe ADACI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında bana yardım eden ve desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Burak KÜÇÜK, Arş. Gör. Çağlar BERKEL, Arş. Gör. Feyzanur YILDIRIMTEPE, yüksek lisans öğrencisi Halilullah DEMİR ve doktora öğrencisi Esra YILMAZ'a teşekkür ederim.

Bu tezi kıymetli anneme ve babama ithaf ediyorum...

Muhsine ÖZEN

10 ARALIK 2021

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Obezitenin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi.....	2
2.1.1. Fazla kilo ve obezite ölçümü	3
2.1.2. Obezitenin ülkelere göre artan prevalansı.....	4
2.1.3. Obezite genetiği	4
2.1.4. Fazla kilo ve obezitenin metabolik sonuçları.....	4
2.1.5. Artan kilo ile gelen obezite ve kanser ölüm prevalansı	5
2.2. Kanser	5
2.2.1. Kolorektal kanserin epidemiyolojisi	6
2.2.2. Koloraktal kanserde analitik epidemiyoloji	7
2.2.3. Kolorektal kanserde diyet	8
2.2.4. Kolorektal kanserde sigara ve alkol tüketimi.....	9
2.2.5. Kolorektal kanserde fiziksel aktivite.....	10
2.3. Epigenetik Değişim	10
2.3.1. Epigenetik deregülasyonu ve insan hastalıkları oluşumdaki rolü.....	11
2.4. Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler	12
2.4.1. Tümör baskılayıcı genler	12
2.4.2. Protoonkogenler	13
2.4.3. Onkogenler.....	14
2.5. Gen İfadesine Bakılan Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler	14
2.5.1. Tümör baskılayıcı APC geni.....	14
2.5.2. Tümör baskılayıcı p53 geni.....	16

2.5.3. Onkogen olan Kras geni.....	18
2.5.4. Onkogen olan Krc geni	20
2.6. Obezite Tedavisinde Kullanılan İlaçlar:	21
2.6.1. Orlistat.....	23
2.6.2. Semaglutide.....	23
3. MATERYAL ve METOD.....	26
3.1. Materyal	26
3.2. Metod.....	26
3.2.1. Hücrelerin kültüre edilmesi ve kullanılan ilaç stoklarının hazırlanması.....	26
3.2.2. MTT yöntemi için hücre ekimi ve MTT uygulaması	28
3.2.3. Total RNA izolasyonu	30
3.2.4. qRT-PCR.....	31
3.2.5. Hücre migrasyon deneyleri	33
3.2.6. İstatiksel analiz ve veri görselleştirme	34
4.BULGULAR ve TARTIŞMA	35
4.1. Hücre Canlılık Testleri.....	35
4.1.1. Obezite tedavisinde kullanılan orlistatin farklı konsantrasyonlarda kolorektal kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi.....	35
4.1.2. Obezite tedavisinde kullanılan semaglutidenin farklı konsantrasyonlarda kolorektal kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi.....	38
4.1.3. Kanser tedavisinde kullanılan decitabinein farklı konsantrasyonlarda kolorektal kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi.....	40
4.1.4. Kanser tedavisinde kullanılan vorinostatın farklı konsantrasyonlarda kolorektal kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi.....	41
4.2. Obezite Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaçların Tümör Baskılayıcı ve Onkogenler ile Muamelesi Sonucu Gen Ekspresyon Miktarları	43
4.2.1. Orlistat ve semaglutide uygulaması sonrası tümör baskılayıcı genlerin gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	44
4.2.2. Orlistat ve semaglutide uygulaması sonrası bazı onkogenlerin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	46
4.3. Obezite Tedavisinde Kullanılan Orlistat ve Semaglutidein Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkileri.....	48
4.4. MTT Yöntemi Kullanılarak Yapılan Deneylerin Mikroskop Görüntüleri	51
4.4.2. Sitotoksik etkinin olmadığı konstrasyonlar ile muamele edilen durumların 6 kuyucuklu plaklardaki görüntüler	54

5. SONUÇLAR.....	56
6. KAYNAKLAR.....	60



SİMGELER ve KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
APC	Ailesel adenomatöz popozis koli
ATM	Ataksia telangieksa
BMI	Vücut kitle endeksi
DDP-4	Dipepdilpeptidaz enzimi-4
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktör reseptörü
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GLP-1	Glukagon benzeri peptid-1
GSK-3	Glikojen sentaz kinaz-3
GTP/GDP	Guanozintrifosfat/ guanozindifosfat
IARC	Uluslararası kanser araştırma ajansı
IV	İntravenöz
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
KRAS	G proteini ailesi üyesi
MDM-2	Fare çift dakika homologu
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür)

NF	Nekroz faktör
P21	Tümör protein 21
P53	Tümör protein 53
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
pRB	Tümör protein retinoblastoma
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
RSS	Rekombinasyon sinyal dizisi
SNAC	SodyumN-[2-hidroksilbenzoil -aminokaprilat]ddp
TAD	Transaktivasyon alt birimi
TNF	Tümör nekroz faktör
ZAS	Zengin asidik alan

ŞEKİL LİSTESİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Apc geninin Wnt sinyal yolağındaki rolü.....	15
Şekil 2.2. p53 geninin sinyal yolağında rolü.....	17
Şekil 2.3. Kras genin sinyal yolağındaki rolü.....	19
Şekil 2. 4. Krc geninin JNK/SAPK sinyal yolağındaki rolü.....	21
Şekil 4.1. HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak orlistatin hücrel sitotoksisitesinin belirlenmesi.....	36
Şekil 4.2. HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak orlistatin hücrel sitotoksisitesinin belirlenmesi.....	37
Şekil 4.3. HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak semaglutidenin hücrel sitotoksisitesinin belirlenmesi.....	38
Şekil 4.4. HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak semaglutidenin hücrel sitotoksisitesinin belirlenmesi.....	39
Şekil 4. 5. HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak decitabinenin hücrel sitotoksisitesinin belirlenmesi.....	40
Şekil 4.6. HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak decitabinenin hücrel sitotoksisitesinin belirlenmesi.....	41
Şekil 4.7. HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak vorinostatın hücrel sitotoksisitesinin belirlenmesi.....	42
Şekil 4.8. HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak vorinostatın hücrel sitotoksisitesinin belirlenmesi.....	43
Şekil 4.9. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücre hatlarında, orlistat ve semaglutide uygulaması sonucunda tümör baskılayıcı bir gen olan APC geninin ekspresyon miktarları.....	44
Şekil 4.10. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücre hatlarında, orlistat ve semaglutide uygulaması sonucunda tümör baskılayıcı bir gen olan p53 geninin ekspresyon miktarları.....	45
Şekil 4.11. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücre hatlarında, orlistat ve semaglutide uygulaması sonucunda onkogen olan KRAS geninin ekspresyon miktarları.....	47

Şekil 4.12. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücre hatlarında, orlistat ve semaglutide muamelesi sonucunda onkogen olan KRC geninin ekspresyon miktarları.....	48
Şekil 4.13. HT-29 kolorektal kanser hücre hattına orlistat ve semaglutidenin uygulama sonrası hücre migrasyon analizleri.....	49
Şekil 4.14. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattına orlistat ve semaglutidenin uygulama sonrası hücre migrasyon analizleri.....	51
Şekil 4.15. HT-29 kolorektal kanser hücre hattı MTT verilerinin mikroskop görüntüsü..	52
Şekil 4.16. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattı MTT verilerinin mikroskop görüntüsü.....	53
Şekil 4.17. RNA izolasyonu öncesi HT-29 kolorektal kanser hücre hattının mikroskop görüntüsü.....	54
Şekil 4.18. RNA izolasyonu öncesi HCT-116 kolorektal kanser hücre hattının mikroskop görüntüsü.....	55

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Fazla kilo ve obezite ölçümü.....	3
Tablo 2.2. Obezite tedavisinde kullanılan ve önceden kullanılmış ilaçlar.....	22
Tablo 3.1. Hücrelere uygulanacak kimyasal ajanların stoklarının hazırlanması ve saklama koşulları.....	28
Tablo 3.2. qRT-PCR deneylerinde kullanılan genlerin primer sekansları.....	31
Tablo 3.3. PCR reaktifleri.....	32
Tablo 3.4. qRT-PCR deneylerinde kullanılan her reaksiyonun hacimleri.....	32
Tablo 3.5. qRT-PCR için kullanılan lightcycler programının çalışma programı.....	33

1. GİRİŞ

Obezite dengesiz diyet ile ortaya çıkan bireylerde fizyolojik fonksiyonların bozulmasına ve çeşitli hastalıklara sebep olduğu için önemli bir sağlık problemidir. Dünya çapında yapılan sağlık ödemelerinin %20'si obezite tedavisi için harcanmaktadır (Dobbs ve Manyika, 2014). Düzensiz ve sağlıksız diyetin meydana getirdiği obezitenin ölüm oranı diğer hastalıklarla kıyaslandığında %52'lik bir kısmı obezite oluşturmaktadır. Obezite karbonhidrat ağırlıklı diyetin yanı sıra genetik, çevresel, fizyolojik, psikolojik gibi problemler ile de ortaya çıkmaktadır. Fiziksel aktivite eksikliği ve karbonhidrat ağırlıklı beslenme ile vücutta yağ doku birikimi artmaktadır. Artan yağlanma başta kolon, rektum, yemek borusu ve böbrek gibi kanserlerin riskini artırarak genel anlamda mortalite oranlarının artmasına sebep olur. Erkekler ve kadınlar arasında yapılan bir çalışmada erkeklerde yağ birikimi kadınlardan daha fazla olduğu için kolorektal kanser görülme sıklığı kadınlara göre erkeklerde daha fazladır. Kolorektal kanser siyah erkek-kadın ve beyaz erkek-kadın arasında yapılan başka bir çalışmada ise siyahi bireylerde beyaz bireylere göre daha fazla kolorektal kanser oluşturma riski meydana geldiğini göstermiştir (Howe ve ark., 2001). Yağ, et ve protein üzerine yapılan çalışmada ölüm prevalansına bakıldığında kolorektal kanser olan bireylerin ölüm oranlarının azaldığı gösterilmiştir. Sebze ve meyve tüketiminin kolorektal kanser ile ilişkisi bilinmesede yağ alımı ile kolorektal kanser arasında ilişki bulunmaktadır (Boyle ve Leon, 2002). Turpgiller ailesine ait sebzelerin kolorektal kanser oluşma riskini engellediği yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Turp ailesinden düzenli sebze tüketimi olan bireyler ve düzenli sebze tüketmeyen bireylerin p53 gen ekspresyon miktarlarına bakılmıştır. Sonuca göre düzenli sebze tüketen insanlarda p53 gen ekspresyonu arttığı görülmüştür (Freedman ve ark., 1996). Bu çalışmada kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş tümör baskılayıcı ve onkogenlerin, obezite tedavisinde kullanılan GLP-1 analogu olan semaglutide ve gastrik-pankreatik enzimleri inhibe eden orlistat muamelesi ile oluşan gen ekspresyon miktarlarına bakılmıştır. Bu tez çalışmasında, obezite ve kolorektal kanser arasında bulunan ilişki göz önüne alındığında obez olan bireyin tedavisinde aldığı ilaçlar kolorektal karsinogenezi nasıl şekillendirdiği öğrenmeyi amaçladık. Obezite tedavisinde kullanılan bu ilaçlar hücrenin apoptoza gitmesinde ve hücresel döngüde görev alan tümör baskılayıcı ve onkogenlerin miktarını anlamlı derecede artırmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Obezitenin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Dünya çapında aşırı kilo ve obezite artış oranı, 1980'den beri ikiye katlanmış durumdadır. Dünya nüfusunun üçte biri aşırı kilolu ve obez olarak sınıflandırılmaktadır. Obezite kişide fizyolojik fonksiyonların bozulmasına veya olumsuzluklara yol açtığından halk sağlığı için önemli bir sağlık sorunudur (Anonim, 2015a). Sağlık ödemelerinde önemli maliyetler getirdiğinden dünya çapında harcamalara bakıldığında tüm sağlık harcamalarının %2-7'si tip 2 diyabet için harcanırken %20 oranında obezite tedavisine harcama yapılmaktadır (Dobbs ve Manyika, 2014).

Tüm dünyada obezite 2,1 milyardan fazla insan, yaklaşık olarak küresel nüfusun %30'u fazla kilolu veya obezdir. Yetersiz ve düzensiz beslenme ile gelişen obezitenin ölüm oranlarına bakıldığında dünya çapındaki ölümlerin %5'ini oluşturmaktadır. Araştırmalara göre, 2030 yılına kadar nüfusun yarısının aşırı kilolu veya obez olacağı öngörülmektedir (Dobbs ve Manyika, 2014). Dünyanın dört bir yanından ülkelerde yaşam kalitesini etkileyen ve mortalite oranı yüksek hastalıkların artmasının risk faktörü olan obezite, yaklaşık 50 yıldır sağlık bakım maliyetlerini yükselten uluslararası bir sağlık sorunu haline almış durumdadır (Anonim, 2015b).

Kentleşme, kalorisi fazla, fast food yiyecek isteğinin artması ve fiziksel hareketsizlikle beraber azalan enerji harcaması ile günlük kalori alımı kalori harcaması miktarını geçtiğinde yağ depolaması artar. Aşırı vücut yağının birikmesi, olumsuz metabolitlerin artması ile ateroskleroz hızlanır, koroner kalp hastalığı, felç ve erken ölüm riski artar (Calle ve Thun, 2004).

Kilolu kadınların menopozla beraber kan dolaşımında artan östrojen seviyeleri sebebiyle endometriyal kanser ve meme kanseri riski artırmaktadır. Artan yağlanma kolon, rektum, yemek borusu, böbrek, pankreas, safra kesesi, yumurtalık, serviks, karaciğer, prostat kanserlerini artırarak mortalite oranlarının artmasına sebep olmaktadır (Calle ve Thun, 2004).

Obezite günlük diyet alımında kaloriye kıyasla metabolik-fiziksel aktivitede enerji kaybı meydana geldiğinden meydana gelse, obezitenin etiyolojisi karışıktır. Genetik, çevresel, fizyolojik, psikolojik gibi parametrelerde obezitenin gelişmesinde rol oynamaktadır (Aronne ve ark., 2009).

Artan obezitenin temel nedenleri arasında evrimsel, biyolojik, psikolojik, sosyolojik, ekonomik faktörler bulunmaktadır. İngiltere Araştırma Konseyleri İngiltere'nin bir projesinde, obezitenin doğrudan veya dolaylı olarak oluşmasını etkileyen faktörleri paylaştı. Bunlar arasında gıdaya kolay ulaşabilme, hareketsizlik, kalori hesabı yapmama gibi enerji dengesizlikleri bulunmaktadır (Dobbs ve Manyika, 2014).

2.1.1. Fazla kilo ve obezite ölçümü

En yaygın olarak kullanılan vücut kitle indeksi boy-ağırlık parametlerini kullanarak ölçüme dayanır. Kilogram cinsinden ağırlığın metre kare cinsinden boya bölünmesi ile Tablo-2.1'de belirli aralıklara göre obezite derecesi belirlenir (Willet, 1998).

Tablo 2.1. Fazla kilo ve obezite ölçümü (DSÖ, 1995)

BKİ (kg/m ²)	WHO sınıflandırması	Popüler açıklama
<18,5	zayıf	İnce
18,5–24,9	Normal alan	'Sağlıklı', 'normal' veya 'kabul edilebilir' ağırlık
25,0–29,9	1. sınıf fazla kilolu	Kilolu
30,0–39,9	2. derece fazla kilolu	obezite
≥ 40,0	3. derece fazla kilolu	Morbid obezite

Kaynak : DSÖ Fiziksel Durum Uzman Komitesi, 1995.

2.1.2. Obezitenin ülkelere göre artan prevalansı

Birleşik Krallık'ta ve diğer Avrupa ülkelerinde obezite hastalarının artışı 1980'lerde arttığı rapor edilmiştir (Anonim, 2002; Seidell, 2003). Aşırı kilolu veya obez olan kişilerin zamansal artışına bakıldığında erkekler de kadınlardan daha fazla bir artış olduğu görülmüştür. Doğu Avrupa'da kadınlarda görülen obezite sıklığı sabitlenmesine rağmen hala çok fazla prevalansa sahiptir (James ve ark., 2001). ABD'de, 6-19 yaş arası çocuk ve ergenlerde aşırı kilo artışı 1960'dan beri üç kat artmıştır. 1965'te %4,2 olan oran 2000 yılında %15'in üstüne çıkmıştır (Ogden ve ark., 2002).

2.1.3. Obezite genetiği

Genetik faktörlerin yapılan çalışmalarda obezite fenotipini etkilediği gösterilmiştir. Vücut ağırlığındaki bireysel değişkenliğin %40-70'i kalıtsal faktörlerle açıklanabilir. Fiziksel hareketsizlik ve bol kalorili diyet uygulanması halinde oluşan etki ile çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktörlerde obeziteyi hızlandırır. Enerji dengesi, periferik dokulardan merkezi sinir sistemine gelen endokrin ve nöral sinyallerin beraber çalışması ile dengelenir (Gülcan ve Özkan, 2006). Beynin hipotalamus bölgesinden alınan sinyaller, peptid sentezini düzenler ve enerji dengesi için enerji alımı ve harcanmasını düzenleyen sinyaller üretir. Obezite de rol oynayan gen ekspresyonları ve protein sentezi iştah, tokluk, kas, periferik doku ve yağ dokusunda yapımı olur (Woods ve ark., 1998).

2.1.4. Fazla kilo ve obezitenin metabolik sonuçları

Vücut ağırlığının artışı ile vücutta zararlı metabolitlerde artar. Bu zararlı metabolitler kanser riskini artırabilmektedir. Özellikle dolaşımda peptid, steroid hormon gibi fazla olabilen metabolitler zararlı olabilir. İnsülin, kan dokularda glikoz alımını ve harcanmasını kontrol etmede görevlidir. Aşırı kalorili diyet sonucunda kilo alımı ile dokular insüline karşı duyarsız hale gelerek vücudun bunu telafi etmek için daha fazla insülin üretmesine neden olmaktadır (Le, 1997).

2.1.5. Artan kilo ile gelen obezite ve kanser ölüm prevelansı

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan mortalite çalışmasında, erkek ve kadınlarda spesifik bölgelerde artan kanser ve diğer kanser ölüm oranlarının kilo ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada BMI kanser insidansı 900.000 kadar birey 16 yıl boyunca takip edilmiş ve bireylerden 57.000 tanesinin kanser ölümü ile sonuçlanan çalışmada bir belirleyiciliği olduğunu gösterilmiştir (Calle ve ark., 2003). IARC (The International Agency for Research on Cancer) çalışma grubu, yapılan bir çalışmada, epidemiyolojik, klinik ve deneysel verilere dayanarak artan kilo ile kolon, meme, endometrium, böbrek ve özafagus kanserlerinin riskinin artırdığını yayınladı (Anonim, 2002).

Kolorektal kanserde merkezi adipozitin meydana gelmesi ile kolorektal kanser riskinin oluşma ihtimali artar. Erkeklerde merkezi yağ birikimi kadınlara göre daha fazladır. Yapılan bir çalışmada da kolorektal kanserin erkeklerde kadınlardan daha fazla görüldüğü kanıtlanmıştır. Dolayısıyla aşırı kilo alınımı kolorektal kanser için bir potansiyel belirteç olabilir (Giovannucci ve ark., 1995).

2.2. Kanser

Kanser hücrelerin kalıtsal veya çevresel faktörler sonucu hücrelerin büyüme ve çoğalma özelliklerinin değişmesi ile artan hücre bölünmesi sonucu meydana gelen hücre topluluklarının hastalık haline gelmesidir (Furtreal ve ark., 2001). Kalıtım kaynaklı kanser oluşma riski çevresel etkenlerin kanser oluşturma riskine göre daha azdır. Bu oran değişken olmakla birlikte, kanserlerin %80 sonradan oluşan somatik mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyon ve epigenetik değişikliklerin ebeveynlerden bireye geçmesi ile kişinin çevresel etkenlere örneğin sigara, alkol, işlenmiş ve hazır yiyecekler gibi içerisinde karsinojenik ajan bulundurma ihtimali olan zararlı besinler tükettildiğinde hastalığın ortaya çıkma riski artmaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012). Çevresel etkenlere maruz kaldığımızda birçok kimyasal madde hücrelerde epigenetik değişikliklere sebep olabilir. Örneğin; kullandığımız ilaçlar, karbonhidrat ağırlıklı diyetler, sigara, alkol, kimyasal maddeler,

zararlı gazlar çevresel kaynaklı kanser oluşturma eğilimine sahiptir. Sigara kullanan farklı cinsiyete sahip bireylere bakıldığında; yüksek östrojen seviyesi kaynağı olarak sigara içen kadınlarda erkeklere oranla 3 kat fazla kanser oluşma riski gözlenmiştir. Sigara kullanan bireylerin akciğerlerinde benzopiren hücrelerin içerisine nüfuz ederek, DNA yapısında bulunan guanin ile bağ kurar. Hücre replike olacağı zaman guanine bağlanmış epoksit türü olan benzopiren guaninin timin bazı olarak görünmesine sebep olduğundan eşlenme sırasında G-C baz eşleşmesi yerine T-A baz eşleşmesi olmaktadır. Baz değişiklikleri Kras onkogeninde ve p53 tümör baskılayıcı geninde oluştuğunda akciğer hücrelerinin bölünme yeteneği kaybolur ve hücre bölünmesi sürekli devam ederek kanser hücrelerini oluşturmaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012). Helicobacter pylori, T hücreli lösemi virüsü, human papilloma virüsü gibi bakteri ve virüs türleri çeşitli kanser türlerine sebep olabilir. Vücutta bulunan biyomoleküllere zarar veren radyasyon, güneş ışığı biyomoleküllerden elektron koparabilme ya da pozitif elektron eklemesi yapabilir. Elektron koparılması ya da pozitif elektron yüklemesi DNA'da zincir kırıklarına, baz modifikasyonlarına ya da şeker modifikasyonlarına sebep olmaktadır (Yokuş ve Çakır, 2002; Heynick ve ark., 2003). Ayrıca biyolojik sistemlerde oksijenden oluşan reaktif oksijen türleri kanser oluşumunun farklı evrelerinde mekanizmaya dahil olduğu çalışmalarla desteklenmiştir (Yokus ve ark., 2008).

2.2.1. Kolorektal kanserin epidemiyolojisi

ABD'de görülen kolorektal kanser 75 yaş ve üzerinde olan bireylerde en sık rastlanan kanser tipidir (Edwards ve ark., 2002). Gelişmemiş ülkelerde artan yaşlı nüfus gelecek yıllarda kanser oranını daha da artıracaktır. Metastatik kolorektal kanserden etkilenen bireylerin 5 yıllık hayatta kalma oranları %5'ten daha az bir olasılığı içermektedir (Ciardiello ve Tortora, 2008).

Kolorektal kanserin görülme sıklığı, farklı ırklara sahip olan ülkeler arasında değişiklikler göstermektedir. Kolorektal kanserde etnik ve ırksal farklılıklar olarak göçmenlerle yapılan bir çalışmada, hastalığın etiyojisinde çevresel faktörlerin de rol oynadığı gösterilmiştir (Haenzel ve Kurihara, 1968). ABD’de kolorektal kanser ölüm oranı, siyah kadın ve erkeklerde çok fazla görülürken, beyaz kadın ve erkeklerde daha az rastlanılmaktadır (Howe ve ark., 2001). Kolorektal kanser İskandinav ülkelerinde artarken, İngiltere ve Galler’de ölüm oranları kadın ve erkeklerde azalmaktadır. İrlanda da ise kadın ve erkeklerde ölüm oranı uzun zamandır sabit olarak seyretmektedir. Kolorektal kanser, sadece batılı yaşam tarzına sahip ülkelerde değil diğer ülkelerde de insan sağlığı için artan bir tehdittir. Dünya genelinde yaşanan nüfusla beraber artan kolorektal kanser insidansını azaltabilmek için etkili önlemlerin alınması gerekmektedir (Ferlay ve ark., 2001; Boyle ve Leon, 2002). Kolon kanserinin görülme sıklığı dünyada yaklaşık 29 kat değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda fiziksel aktivitesi yüksek olan erkekler ve kadınlarda kolon kanserinin daha düşük olduğu gösterilmiştir (Slattery ve Potter, 2002).

2.2.2. Koloraktal kanserde analitik epidemiyoloji

Kolorektal kanserlerinin %90’ı bağırsak duvarını kaplayan benign, adenomatöz poliplerden ve villöz görünüme sahip büyük boyutlu displastik hücrelerden oluşan poliplerden kaynaklanmaktadır (Peipens ve Sandler, 1994). Kolorektal kanser gelişimi, viluslarda bulunan hücrelerin genetik mutasyona uğraması, tümör teşvik eden genlerin ekspresyonu ve tümör supressör genlerin baskılanması ile gen ekspresyonu kaybı ile meydana gelen bir süreci içermektedir (Vogelstein ve ark., 1988).

2.2.3. Kolorektal kanserde diyet

Kolorektal kanser üzerine olan analitik çalışmalara bakıldığında bazı besin ve gıda sınıfları ile arasında bir bağ olduğunu göstermektedir. Besinler, buldukları gıdalara bağımlıdır ve belirli bir popülasyon içerisinde kısmen tüketilen gıdaların içerisinde bulunarak diyet alımında çeşitli maddeler içerdiğinden önemlidir. Diyet alımında kalori alımının dengesizliği sonucunda çeşitli hastalıklar meydana getirebilir. Yapılan çalışmalarda diyet faktörleri ve kolon kanseri riskleri 40'dan fazla vakada değerlendirilmiştir (Higginson, 1996). Bu sonuçlara göre aynı zamanda sebze ve tahıl içeren diyetin kolon kanseri oluşumu ile ters bir orantıya sahip olduğu gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada ise et, protein ve yağ alımı fazla olan diyetle kolorektal kanserin oluşmasını etkilediği gösterilmiştir. Yumurta tüketimi, süt ve süt ürünlerinin tüketimi, D vitamini alımının kolorektal kanser riskini negatif yönde azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Utsunomiya ve Lynch, 1990).

Potter ve McMchae'nin gıda alımı sıklığı ile kolon kanseri riski arasındaki ilişki ile ilgili yaptıkları bir çalışmada her gıda alımında bağırsağa salınan safra asitleri ve safrada bulunan sekonder yağ asitlerinin konsantrasyonunun kısmen resirkülasyon sıklığı ile belirlendiğinde, gıda tüketim sıklığının kolorektal kanser riskini artıracakını düşünmüşlerdir. Çalışma sonunda gıda alımının sıklığının artması ile kolorektal kanser riskinin de artacağını bildirmişlerdir (Potter ve McMichael, 1986).

Yağ, et ve protein üzerine yapılan 13 ekolojik çalışmanın, ölüm insidansına bakıldığında 0,7 korelasyon bildirilmiştir. Lif ve tahıllarla ilgili yedi araştırmadan altısı, bağırsak kanseri insidansı ile bitkisel gıdalar arasında yaklaşık -0,7 korelasyonla ters bağlantı olduğunu gösterdi (Enstrom, 1975). McKeown-Eyssen ve Bright-See, yağ ve lif tüketiminin, erkekler arasında kolon kanseri ölüm oranlarına bakıldığında %67'sinin kolorektal kanserden oluştuğunu bildirmiştir (McKeown-Eyssen ve Bright- see, 1983).

Yapılan çalışmalarda sebze ve meyve tüketiminin kanser riski arasında ilişkisi tam belirlenemese de yağ alımı ile kolorektal kanser arasındaki ilişki bulunmaktadır (Boyle ve Leon, 2002). Amerika Birleşik Devletlerinde hemşirelerin yaptığı bir çalışmada, kanser veya inflamatuvar bağırsak hastalığı bulunmayan kadınların toplam enerji alımları belirlendikten sonra hayvansal yağ kullanımının kolon kanseri ile ilişkilendirmişlerdir. Her gün et tüketimine sahip kadınlarla ayda bir et tüketen kadınlar karşılaştırıldığında her gün et tüketen kadınlarda kolorektal kanser riskinin anlamlı derecede arttığı gorlmuştur (Willet ve ark., 1990).

Turpgiller ailesinden olan sebze alımının kolorektal kanser oluşmasını engellediği yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Kolorektal kanserin diağnozunda kullanılan p53 miktarına bakıldığında, turp ailesinden düzenli sebze tüketimi olan bireylerin ve p53 geni ekspresyonu olan bireylerle p53 geni ekspresyonu olmayan bireyler kıyaslandığında kolorektal kanserin artışı gözlendi (Freedman ve ark., 1996).

2.2.4. Kolorektal kanserde sigara ve alkol tüketimi

Epidemiyolojik çalışmalarla kanıtlanmış olan bulgular doğrultusunda uzun süreli ve fazla sigara içen bireylerde kolorektal adenom riskinin 2-3 kat arttığını göstermişlerdir (Giovannucci, 2001). Yapılan çalışmalarda alkol kullanımını ile kolorektal kanser arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir ($r=0,58-0,76$) (Manousos ve ark., 1983).

2.2.5. Kolorektal kanserde fiziksel aktivite

Günlük azaltılmış aktivite, kolorektal kanser riskini artıran bir faktördür. Ayrı cinsiyetler arasında yapılan çalışmaya bakıldığında ise erkek ve kadınlarda aynı şekilde risk faktörünü artırmaktadır. Fiziksel aktivite ile harcadıklarından daha fazla enerji tüketen kişilerde kolon kanseri riski daha yüksek olabildiğinden fazla kilolu insanlarda enerji dengesizliği nedeniyle kolorektal kanser riski artmaktadır (Albanes ve Taylor, 1990). Yapılan iki çalışmada vücut ağırlığının dağılımıyla kolon kanserinin riski değerlendirilmiştir. Sonuca bakıldığında kadınlarda belirli bir kayda değer sonuç bulunamamasına rağmen erkeklerde bel-kalça oranı kolorektal kanser olma riskinin belirlenmesinde güçlü bir belirteçtir (Lee ve ark., 1991).

2.3. Epigenetik Değişim

Kromozomal anormallikler, gen mutasyonları, proliferasyon, apoptoz ve anjiyogenez düzenleyen çeşitli genlerin epigenetik modifikasyonları içeren genetik değişiklikler, kolorektal kanserin gelişmesine sebep olmuştur (Vogelstein ve ark., 1988). Epigenetik değişimler, DNA dizisinde farklılık yaratmadan gen ekspresyonunda farklılıklar ile mitotik olarak kalıtsal farklılıklardan oluşur (Waterland ve Michels, 2007). Epigenetik değişimler, çok sayıda protein tarafından düzenlenerek DNA dizilerinin ekspresyon miktarını miktar ve zaman olarak koordine etmektedir. Epigenetik değişimler uygun gen ekspresyonu için uyum içerisinde çalışmaktadır. Epigenetik değişimleri düzenleyen mekanizmalar CpG dinükleotidlerinde DNA metilasyonu, histon proteinlerinin kovalent modifikasyonları, ncRNA'ları ve hücre nükleusu içerisinde bulunan kromatin organizasyonunu sağlar (Inbar-Feigenberg ve ark., 2013). Bazı epigenetik değişimler belli dokularda zamanla sabit olabilirken, diğerleri gelişimsel plastisite gösterebilir. Farklı mekanizma ile açığa çıkan epigenetik değişiklikler diğer adıyla epimutasyonlar, subfertilite ve damgalama bozuklukları dâhil olmak üzere çeşitli insan bozukluklarına yol açabilmektedir. Genetik ve çevresel faktörlerle birlikte epigenetik değişimler etkilenecek normal varyasyonun değişmesine sebep olarak insan hastalıkları meydana gelmektedir. Örneğin anne açlığı gibi çevresel faktörlerin embriyonun epigenomunu etkilediği

çalışmalarla gösterilmiştir. Fetal yaşamda ise anne açlığının epigenetik değişimlerle ilişkisine bakıldığında kardiyovasküler bozukluk, tip 2 diyabet gibi hastalıklara sebep olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (Mathers, 2007; Yang ve ark., 2009). DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve ncRNA'lar epigenetik değişimleri düzenlemek için görev alırlar (Otani ve ark., 2009). İnsan genomundaki tüm fonksiyonel elementleri tanımlamak için geliştirilen ENCODE projesi yakın zamanda transkripsiyonda meydana gelen histon modifikasyonları ve ek protein bağlama proteinleri yayınladı. Bu verilere göre, kombinasyonlar halinde gen ekspresyonunu düzenleyen küresel ve bölgesel karşılaştırılan epigenetik özellikleri açıklar (Anonim, 2004). Genom bazında epigenetik yeniden programlama, iki gelişim aşaması olan gametogenez ve erken embriyogenez sırasında gerçekleşmektedir. Gametogenez hem doku hemde aileden gelen epigenetik değişimlerle olur. Döllenme sonrasında, erken embriyoda, totipotensi ve hücreye özgü farklılaşma için epigenetik değişimlerin yeniden programlanması gerekir (Inbar-Feigenberg ve ark., 2013).

2.3.1. Epigenetik deregülasyonu ve insan hastalıkları oluşumdaki rolü

Epigenetik deregülasyonu, epigenetik kontrol mekanizmalarındaki bozunma, damgalanmış, ekspre edilen genlerde epigenetik düzenlemelerin değişikliklerinden kaynaklanmaktadır. Organ sistemlerinin oluşma ve büyüme evrelerinde epigenetik kontrol mekanizmalarının deregülasyonu ile bozunmalar meydana gelebilir. Epigenetik regülasyonunda rol oynayan proteinlerde meydana gelen mutasyonlar alfa talasemi, zeka geriliği gibi genetik rahatsızlıklara yol açabilir (Maunakea ve ark., 2010). İki farklı epimutasyon türü bulunur; birincil epimutasyon, epigenetik ifadelerin anormal silinmesi, yeniden yapılanması ve sürdürülmesinden kaynaklanır, ikincil epimutasyonlar, diğer adıyla somatik epimutasyonlar, anormal büyüme düzenlenmesine sebep olur.

2.4. Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler

Kanser türleri DNA dizisinde bulunan değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır. Kanser türlerinin %10-15 katılımsal, %85-90'ı çevresel etkilerden kaynaklanmaktadır. Çevresel etkiler hücrelerde DNA'nın mutajenlere maruz kalmasına sebep olması ile hücre DNA'sında epigenetik değişiklikler ve replikasyon hataları meydana gelmektedir. Epigenetik değişiklikler ve mutasyonlar sonucu değişen hücre ekspresyonu hücrenin kontrolsüz ve farklı büyümesine neden olarak kanser hücre topluluğunun oluşmasını sağlar (Yokuş ve Çakır, 2012).

Kanser hücrelerinin karsinogenezi sağlamak için hedefleri kök hücrelerdir (Devereux ve ark., 1999). Tümör oluşumu, neoplastik transformasyon yani genetik mutasyonların gelişimi ile sağlıklı hücrelerin neoplastik hücreye dönüşümü ve neoplastik gelişim olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Onkogenlerin ve kanser gelişiminin oluşumunda sağlıklı hücrelerin kanserli hücreye dönüşmesini neoplastik transformasyon ile oluşur. Neoplastik transformasyon spontan, baz değişiklikleri, delesyon, translokasyon gibi DNA'daki replikasyon ve DNA tamir mekanizmalarının düzgün çalışmaması sonucu oluşur (Elenbaas ve ark., 2001). Oluşan mutasyon ve epigenetik değişiklikler sonucunda tümör baskılayıcı genler, tümör baskılayıcı genleri düzenleyen genler, büyümeyi kontrol eden genler ve protoonkogenlerin gen ekspresyonu değişir (Bos ve van Kreijl, 1992). Neoplastik gelişme kontolsüz büyüyen hücrelerin çoğalması ve yetersiz besin kaynağı problemi olan kanser hücrelerinin diğer doku ve organlara besin için göç etmesiyle kanserin yayılma sürecidir (Butterworth ve ark., 1992).

2.4.1. Tümör baskılayıcı genler

Tümör baskılayıcı genlerde oluşan nokta mutasyonu, missense mutasyonlar, delesyon, translokasyonlar, epigenetik modifikasyonlar ve kromozomal delesyonların sebep olduğu fonksiyon kayıpları hücrenin kontrolsüz büyümesine, hücrenin apoptoza gitmesini engellemeye ve neoplastik farklılaşmaların başlamasına sebep olarak kanser hücre topluluğunun oluşmasına neden olur (Akgün ve ark., 2018).

Tümör baskılayıcı genler, aşırı büyümeyi engelleyen bileşenlerin kodlamasını yapar. Sağlıklı hücrelerde hücre bölünmesini baskılayan proteinleri kodlayan tümör supressör genlerde mutasyon meydana gelmesi ile oluşur. Tümör baskılayıcı genlerde mutasyon gelişmesi halinde onkogenlerde olduğu gibi ekspresyon artması beklenmez. Tümör baskılayıcı genlerde mutasyon meydana geldiğinde genlerde fonksiyon kaybı meydana gelir.

Tümör baskılayıcı genlerde gerçekleşen mutasyonun gen ekspresyonunu değiştirmesi için iki kromozom çiftinde de mutant geni içermelidir. Aksi halde kromozom çiftinin birisinin mutasyon olmayıp eşinde mutasyon olması durumunda ekspresyon değişmez, mutant gen ekspresyonu değiştirmeden diğer hücrelere aktarılır. pRb, p53, p21, APC proteinlerini kodlayan genlerin her iki kromozomunda da aynı mutasyon meydana geldiği takdirde, hücre büyümesinin baskılanmasını engellemesi sonucunda kanser doku oluşur (Almasan ve ark., 1995).

2.4.2. Protoonkogenler

Protoonkogenler, hücrelerin sinyalizasyon mekanizmasında büyüme, farklılaşma, çoğalma, apoptozis için sinyal başlamasında kullanılacak proteinlerin sentezininin gerçekleşmesini sağlayan genlerdir. Hücre büyümesinin düzenlenmesi, için büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, transkripsiyon faktörleri, protoonkogenler ve onkogenlerin sentezi ile meydana gelir. Hücrelerin sinyal iletiminde proteinleri kodlayan v-sis, int-2, hst-1, erb-B1, ras, abl, myc protoonkogenlerin mutasyona uğraması ile hücrelerde büyüme faktörlerinin miktarı artar, hücre membranı ve hücre çekirdeği arasındaki sinyal yollarının kontrolsüz uyarılması, transkripsiyonel faktörlerin miktarının artması ile hücre bölünmelerinin çoğalması, hücre bölünmesine engel olunamamasına sebep olur (Yokuş ve Çakır, 2012). Büyümenin düzenlenmesini kontrol altında tutan protoonkogenlerin onkogenlere dönüşmesi ile hücrelerde bulunan hücre kontrol mekanizması bozulur, bunun sonucunda kontrolsüz büyüyen hücreler kanserli hücre topluluklarını oluşturur (Pediconi ve ark., 2003).

2.4.3. Onkogenler

Onkogenler, hücre transformasyonun başlama ve sürdürmesini sağlarlar. Hücre döngüsünün çalışma mekanizmasını değiştiren onkogenler aşırı hücre bölünme olayını gerçekleştirmeyen hücrelerin apoptozise gitmesini sağlayarak ortamda sağlıklı hücre kalmasını bu sayede engeller (Labazi ve Philips, 2003). V-Sis, v-ErbB, v-kit, Ras, Raf, Jun, Bcl-2 ailesi, p53, Rb geni gibi onkogenler yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Hücrel onkogen aktivasyonuna sebep olan genetik ve çevresel olaylar aberrant gen ekspresyonu ve anormal gen ürününe sebep olur.

2.5. Gen İfadesine Bakılan Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler

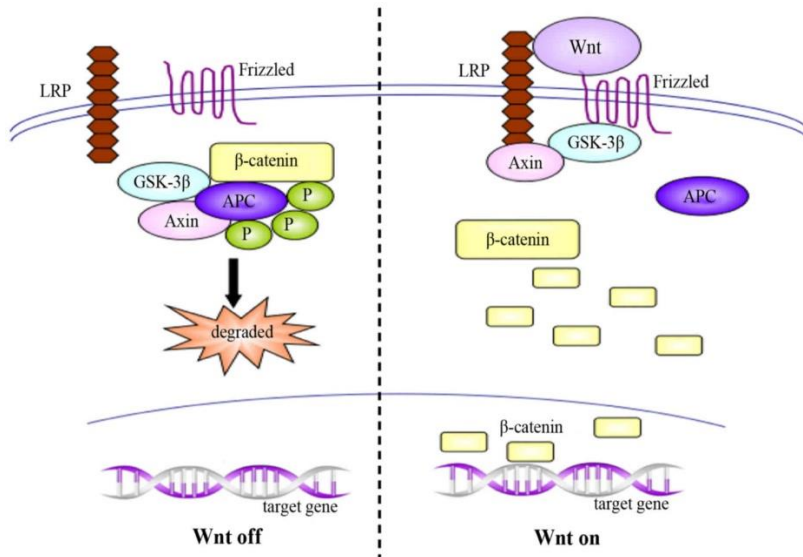
Kolorektal kanser oluşumunda yer alan majör genler, protoonkogen olan KRAS, PIK3CA, BRAF ve tümör baskılayıcı genler olan APC ve p53 genleridir (Ng ve ark., 2019).

2.5.1. Tümör baskılayıcı APC geni

Adenomatöz polipozis koli (APC), 5q21-22 kromozom bölgesinde yer alan tümör baskılayıcı gendir (Aoki ve Taketo, 2007). 16 ekzona sahip APC geni 2843 tane aminoasit kodlaması ile multifonksiyonel protein oluşturur. APC geninde meydana gelen mutasyonların bir kısmı 1286 ve 1513 aminoasitlerde gerçekleşir. Bu aminoasit bölgelerinin lokalizasyonu 16. ekzona denk gelmektedir. 16. Ekzonda ayrıca β -catein bağlayıcı bölge bulunmaktadır. APC proteini β -catein'e bağlandığında NH₂-terminalinde korunmuş serin ve treonin kalıntıları GSK-3 fosforilasyonunu gerçekleştirir. Böylece proteozom sistemi yoluyla bozunma için β -catein'leri hedefler (Orford ve ark., 1997). Bu bölgede mutasyon meydana geldiğinde β -catein bağlayıcı bölge ile aynı yere denk gelebilir (Lorca ve Garre, 2019).

Germline APC genindeki mutasyonlar 178 ve 1580 aminoasitleri arasında ucu kesilmiş varyantların ve normal proteinin üzerinde dominant negatif etki gösteren mutasyona uğramış peptid oluşumuna sebep olur (Sieber ve ark., 2006). APC geninde meydana gelen mutasyon veya epigenetik değişiklikler sonucu meydana gelen gen fonksiyon kaybı, T hücre faktörü/lenfoid güçlendirici faktörler transkripsiyon faktörlerine bağlanarak transkripsiyon faktörü olan β -catenin'in çekirdekte birikimi ile hücre büyümesinin engellenmesine sebep olur (Sparks ve ark., 1998). APC geninde meydana gelen mutasyon ve epigenetik değişiklikler kaynaklı kanserlerin %80'inde gösterilmiştir. Yapılan çoğu araştırmada, çoğu kanser türünün %20'sinin PTEN ve APC genlerinin promotör bölgesinin metillendiği gösterilmiştir (Macdonald ve ark., 2004; Salvesan ve ark., 2001).

APC geni, multifonksiyonel protein olan sinyal iletiminde, hücre adezyon, hücre migrasyonu, mikrotübül birleşiminde görevli proteini kodlar (Hankey ve ark., 2018). APC geninin tümör baskılama kabiliyeti, WNT yolağında intraselüler β -catenin miktarının azaltılması ile ilgilidir. Yani APC geninin inaktive olması ile β -catenin seviyesi artar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Apc geninin Wnt sinyal yolağındaki rolü (Mei ve Xin, 2017)

Hücre çekirdeğinde aşırı gen ekspresyonunun artması ile adenom oluşumu tetiklenir (Lorca ve Garre, 2019). Kalıtsal hastalıklar, adenomatöz poliple gelen ailesel adenomatöz polipoziste APC mutasyonları, Peutz-Jeghers sendromunda STK11 mutasyonları, nonpolipozis Lynch sendromu'nda DNA hata tamir mekanizmasında meydana gelen mutasyonlarla oluşur (Stoffel ve ark., 2015).

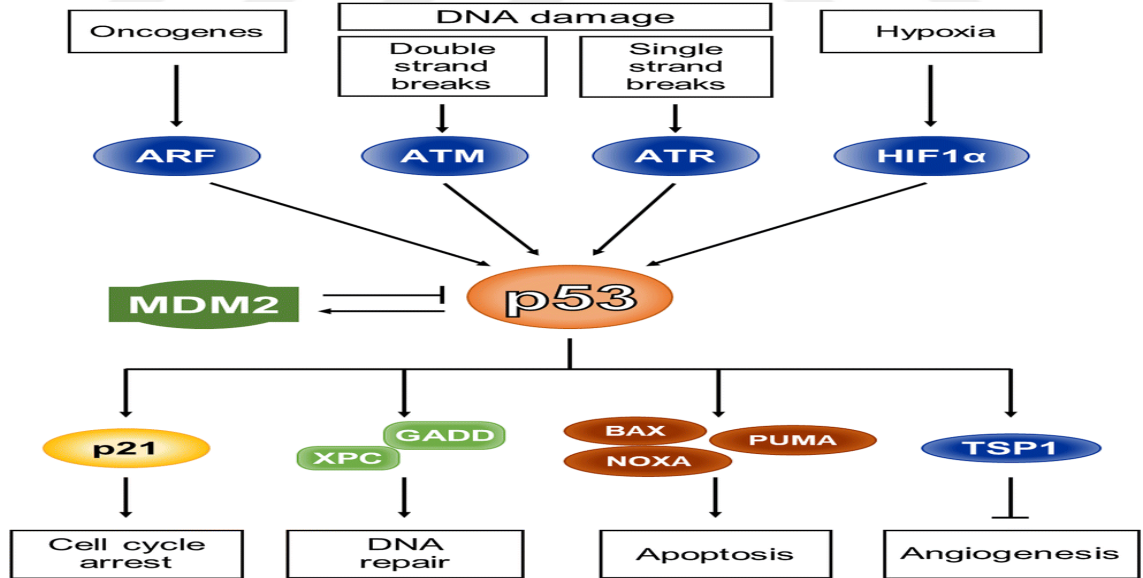
2.5.2. Tümör baskılayıcı p53 geni

Tümör baskılayıcı geni; p53, mitotik iğ iplik hasarı, DNA hasarı, onkogenler tarafından aktive edilebilen kısa ömürlü transkripsiyon faktörüdür. p53, hücre döngüsünün durdurulması, farklılaşma, yaşlanma ve apoptoz gibi hücrel işlevlerde görevlidir. p53, hücrel işlemlerde hücre döngüsünü ve apoptozu gerçekleştiren, kontrol eden genlerin düzenlenmesinde kontrol noktası gibi görev alır. p53'de meydana gelen fonksiyon bozuklukları sonucunda kanser hücreleri çoğalarak kanser hücre topluluklarını oluştururlar. Lenfoma, sarkoma, lösemi, beyin tümörleri, karsinoma gibi kanser türlerinde, p53 inaktif durumdadır (Akgün ve ark., 2018).

İnsanda 17p13.1 kromozom bölgesinde bulunan 393 aminoasitten oluşan bir protein kodlanmasını gerçekleştirmektedir. p53 yapısal ve işlevsel olmak üzere beş farklı bölge içermektedir. 1-63 arası dizili amino asitlerin oluşturduğu N-terminal transaktivasyon alt birimi (TAD) MDM-2 proteini ile p53'ün bağlanma bölgesinin yapısını oluşturmaktadır. 64-92 arasında bulunan aminoasitler içerisinde prolin amino asit sayısı diğerlerine göre fazla miktarda bulunur. 102-292 arasında bulunan aminoasitler DNA üzerinde hedef genlerin spesifik promotor bölgeleri ile bağlantı kurduğu kısmı oluşturmaktadır. 360-393 arasında bulunan aminoasitler, p53'ün C-terminal negatif düzenleyicisi bölgesini oluşturur. 360-393 arası amino asit bulunduran bölge proteazlara karşı hassastır.

DNA ve RNA'ya bağlanabilen 9 bazik aminoasit içerir. Bu sayede DNA nükleotidleri p53'ün C-terminal bölgesini aktive ederler. C-terminal bölge p53'ün tek iplikli DNA veya RNA'nın çift iplikli yapıyla tekrar yapı oluşturmasını katalizler (Toleda ve Wahl, 2006). p53 proteini 20 dakikalık bir ömre sahip olduğu için normal koşullarda hücrede bulunan miktarı azdır. DNA hasarı, hipoksi, oksidatif stres gibi stres koşullarda aktifleşerek önce kendi gen ekspresyonunun artmasını teşvik eder sonra diğer genlerin ekspresyonu için transkripsiyon faktörü olarak görev alır (Şekil 2.2).

Hücre farklı döngülerde DNA hasarını tanımak, tamir etmek için birçok protein mekanizmasını ve enzim komplekslerini kullanır. P53'ün hata sonrası aktifleşmesi ile sayısını artırarak hücre siklusundaki hatanın düzeltilmesi için farklı genlerin ekspresyonunun tetiklenmesi ile hata ortadan kaldırılabilir. Örneğin, ataksia telangiieksa (ATM) geni hatalı olan hücrelerde iyonize radyasyondan kaynaklı p53 aktivitesinin azalması ile DNA hasarını tanıyan, protein kinaz aktivitesi gösteren ATM proteininin p53 aktivitesini sağladığı yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (Kastan ve ark., 1992).

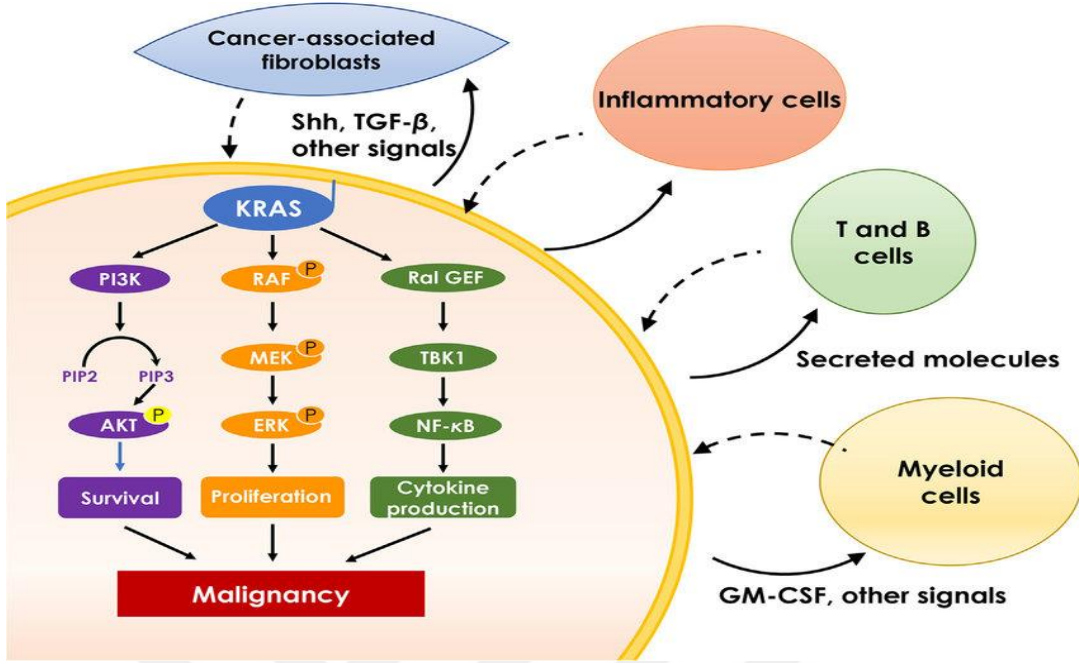


Şekil 2.2. p53 geninin sinyal yolağında rolü (Bumbaca ve Li, 2018)

Kanser görülen bireylerin mutasyon taraması sonuçlarına göre %50'sinde p53 mutasyonu görülmektedir. Mutasyonların sonucunda p53 geninin ekspre olup translyasyondan sonra proteinlerin hücre içerisinde birikmesi ya da hücre sinyal mekanizması işleyişinde baskılanması, mutasyonlar sayesinde inaktif hale gelerek onkogenik özellik kazanmasına yol açar. Mutasyonlar p53 geninde DNA'nın bağlanma bölgesinde meydana gelir. Bunun sonucunda p53 miktarı hücre sitozolünde artsa bile inaktif konumda olduğu için hücre gerekli ekspresyonları sağlamak için transkripsiyon faktörü olarak görev alamaz. Bazı mutasyonlar p53'ün doğrudan fosforlanma bölgesine bağlanarak p53'ün fosforlanarak aktif olmasını engeller (Akgün ve ark., 2018).

2.5.3. Onkogen olan Kras geni

Kras, kromozomun 12p12.1 bölgesinde bulunur, gen ekspresyonunda 38 kb'lik bir alan kaplar. Molüküler ağırlığı 21.6 kDa olan KRAS geni 188 aminoasit kalıntısından oluşmaktadır (Malumbres ve Barbacid, 2003). KRAS hücre dışı uyarana karşı hücre sel yanıtın düzenlenmesinde yer alan proteini bağlayan 21kDA guanozin trifosfat (GTP)/ guanozin difosfat (GDP) kodlayan protoonkogendir (Schubbert ve ark., 2007). KRAS epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), hepatosit büyüme faktörü, insülün benzeri büyüme faktörü reseptörlerine bağlanması ile başlatılan sinyal iletim mekanizmasında görev alır (Graziani ve ark., 1993). İnsan benign veya malign kanser dokularında en sık görülen onkogen mutasyonu ras genlerini kapsar (Yokuş ve Çakır, 2012). KRAS geni ekspresyonu gerçekleştiğinde, KRAS GTP'ye bağlanır. GTP'nin aktive olması ile Raf, Braf, mTOR, MEK1, MEK2, AKT, PIK3CA gibi proteinler aktif hale geçerek konformasyonel değişiklikler gözlenmektedir. Bu proteinlerin aktivasyonu sonucu oluşan sinyal mekanizması apoptoz baskılanması, hücrenin değişimi, anjiogenez, hücre büyümesinin gerçekleşmesi, hücre farklılaşması gibi fizyolojik olayları sağlamaktadır (Jancik ve ark., 2010) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kras genin sinyal yolağındaki rolü. (Pingyu ve ark., 2019)

KRAS geni tüm kanser türlerinin %17-25'inde meydana gelen mutasyonların kaynağıdır. Özellikle kolon kanseri görülen bireylerin %30-40'unda KRAS gen mutasyonu bulunmaktadır. KRAS mutasyonuna sahip bireylerin sağ kalım oranlarına bakıldığında diğer gen mutasyonlarına oranla daha az olduğu gösterilmiştir. Ayrıca KRAS gen mutasyonu olan bireylere uygulanan tedavi sürecine bakıldığında KRAS gen mutasyonun tedavi yöntemlerine dirençli olduğu gösterilmiştir (Lievre ve ark., 2006).

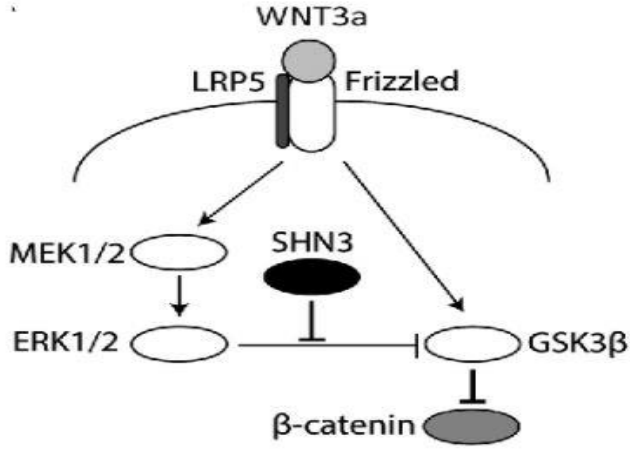
KHDAK, baş, boyun SCC, yumurtalık ve kolorektal kanser gibi türler de yapılan araştırmalara göre malignitenin küçük bir yüzdesinde KRAS amplifikasyonunun meydana geldiğini göstermişlerdir (Hanrahan ve ark., 2012; Wanger ve ark., 2011). Kolorektal kanserlerin sıklıkla onkogenlerin aktivasyon ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile pronotik etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

2.5.4. Onkogen olan Krc geni

KRC proteini, DNA rekombinasyonu, gen transkripsiyonu, sinyal transdüksiyonu gibi hücrel aktivitelere düzenlenmesinde yer alan üç sınıf proteinden oluşan ZAS DNA bağlayıcı protein ailesinin üyesidir. KRC geni tanımlanan en büyük DNA bağlayıcı proteinler arasında bulunmaktadır. KRC proteinin moleküler ağırlığı 250 kDa'dur. Yapısında C₂H₂ çinko parmak bulunduran KRC proteini her çift protein arasında ZAS bölgesini bulundurmaktadır. Bu asidik bölgede hedef genlerin pozitif transkripsiyon düzenleyicisi oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Christopher ve ark., 1999). Memeli ZAS genlerinin her biri 5 kb'den büyük ekzonlardan oluşan 59 bölgeye sahiptir. KRC'nin orta kısmı, 1 adet çinko parmak, bir asidik bölge, bir Serrich bölgesi, bir nükleer lokalizasyon sinyali ve bir GTPaz motifi içermektedir (Chi-Ho ve ark., 1998).

2 282 adet aminoasit oluşturduğu parmak çinko transkripsiyon faktörü tanıma bileşeni (KRC), V, D ve J gen basamaklarını çevreleyen rekombinasyon sinyal dizisine (Rss) bağlanma yeteneğinden yararlanarak izole edilmiştir (Hicar ve ark., 2001). KRC genine ait proteini analiz edildiğinde, cyc2, his2 çinko parmaktan oluşan bir çinko parmak asidik alan yapısı içerir. Glutasyon, asparjin miktarı fazla olan zengin asidik alan ve serin-threonin-prolin-x-arjinin-lizin amino asitlerinin bulunduğu kopyalarından DNA'ya bağlandığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Zengin asidik alan (ZAS) proteinleri, B motifi için güçlendirici ve bağlayıcı protein ailesidir. KRC rekombinant proteinleri, B motifine ve Rss dizilerine bağlanabilir. KRC geninin ekspresyonunun aşağı regülasyonu hücrenin proliferasyonu ve hücre ölümünü etkilediği açıklanmıştır (Allen ve Wu, 2000). KRC geninin ürünü olan KRC proteini mts1'in transkripsiyon aktivatörü olarak hücre sinyalizasyonunda görev almaktadır (Hjelmsoe ve ark., 2000).

Yeni yapılan çalışmalara göre; proinflamatuvar uyarılara karşı gen ekspresyonunu düzenlemede görev alan KRC, apoptoz, TNF sitokin gen aktivasyonunu sağlayarak nükleer faktör (NF), c-JUN NH₂ terminal kinaz (JNK)/SAPK aracılı sinyal yolağını inhibe etmek için TRAF2 proteini ile etkileşime girmektedir (Oukka ve ark., 2002). (Şekil 2.4)



Şekil 2. 4. Krc geninin JNK/SAPK sinyal yolağındaki rolü (Shim ve ark., 2013)

2.6. Obezite Tedavisinde Kullanılan İlaçlar:

Obezitenin takipli tedavisinde kullanılan ilaçlar iştahı baskılama, enerji tüketimini artırma, besin emilimini artırma gibi aktivitelerde kullanılır (Tablo 2.2.)

Tablo 2.2. Obezite tedavisinde kullanılan ve önceden kullanılmış ilaçlar (Şenyüz ve ark., 2019)

Etken madde	Mekanizma	Yan etkileri	Güncel durumu	Türkiye'deki durumu
Semaglutide	GLP-1 reseptör analogu	Mide bulantısı, iştahsızlık, kusma	FDA tarafından 2017 yılında kullanımı onaylanmıştır.	Enjeksiyon ve oral yol ile kullanılabilir.
Sibutramin	Noradrenalin-serotonin geri alım inhibitörü	Panik atak, kardiyovasküler sistem hastalıkları	FDA tarafından 2016 yılında kullanımı yasaklanmıştır.	-
Liraglutid	GLP-1 analogu	Bulantı, kusma, ishal, kabızlık	2014 yılında kullanılmaya başlanmıştır.	18 mg'lık IV/subkütan preparatları vardır.
Fentermin + fenfluramin	Fentermin: Nöroepinefrin salınımının artmasına bağlı iştah baskılanması Fenfluramin: Serotonin salınımını uyarma ve serotoninin geri alım inhibisyonu	Primer pulmoner hipertansiyon, kalp kapaklarında deformasyon	1997 yılında kullanımı durdurulmuştur.	-
Orlistat	Gastrik ve pankreatik lipazların geri dönüşüm inhibisyonu	Fekal inkontinans, gastrointestinal sistemde gaz, yağlı ve yumuşak dışkılama	60 ve 120 mg'lık şekilde obezite tedavisinde kullanılmaktadır.	60 ve 120 mg'lık preparatlar mevcuttur.

2.6.1. Orlistat

Gastrik ve pankreatik lipazları inhibe ederek diyetle alınan yağın emilimini %30 engellemektedir. 120 mg orlistat 1998’de düşük kalorili diyetle beraber obezitenin takipli tedavisinde kullanılması onaylanmıştır (Yen ve Ewald, 2012). Oral yoldan uygulanan orlistat, gastrointestinal sistem tarafından az miktarda emilirken yüksek oranda lipidlerin emilimini önleyerek ek lipid alınımını engeller. Orlistat, obezite tedavisinde kullanılan en güvenilir ilaç olduğu için obezite tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardandır (Şenyüz ve ark., 2019). Obezitede kullanılan diğer ilaçların sistemik yan etkileri ve bağımlılık yapması ile dezavantajlı olurken orlistatın bağımlılık yapmaması ve sistemik yan etkilerinin olmaması ayırt edici özelliğidir (Tanakol, 2003). Orlistat obez bireylerde ideal kiloya ulaşmak için terapötik yaşam tarzı değişikliklerine yardımcı olarak kullanılan antiobezite ilacı olarak kullanılmaktadır (Jain ve ark., 2011). Yapılan bir çalışmada orlistat kullanan hastalarda karaciğer, böbrek ve gastrointestinal kanalda bir detoksifikasyon enzimi olan güçlü bir karboksilesteraz-2 inhibitörü olarak çalıştığı belirlenmiştir. Karboksilesteraz-2 inhibitör enziminin aktive olması ile karaciğer ve böbrek gibi metabolizma organlarında başladığı için organ toksisitesinin arttığı ve obezite tedavisi gören kişilerin kullandığı diğer ilaçların etkinliğini değiştirdiği gösterilmiştir (Xiao ve ark., 2013).

2.6.2. Semaglutide

İnce bağırsak hücrelerinden salgılanan glukagon benzeri peptid inkretin bir hormon olup, insülin ve pankreas adacıklarından glukagon salgılarını diyet ile alınan glikoza bağımlı olarak inhibe ederek kan şekerinin düşmesini bu sayede de tokluğun artıp açlığın azalmasını sağlayarak enerji alımını azaltır (Kieffer ve Habener, 1999; Donath ve Burcelin, 2013).

Glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonistleri (GLP-1 RA) rekombinant insan proteinleri ve peptidleri takipli tedavide çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Peptid veya protein bazlı ilaçlar genelde gastrointestinal sistemdeki proteolitik bozunmaya sebep olduğu için kullanımı insan sağlığını ve günlük aktiviteyi engelleyebilir (Davies ve ark., 2017). GLP-1 RA'lar, glukozun sebep olduğu insülin sekresyonunu güçlendirmek, glukagon salınımını engellemek, mide asidinin boşalmasını önlemek, iştah artması ile gıda alımını azaltmak için tasarlanıp GLP-1'in taklidi olarak yapılmıştır (Ostergaard ve ark., 2016; Meier, 2012). Semaglutide Emilimi artırıcı sodyum N-[2-hidroksilbenzoil) amino] kaprilat (SNAC) ile beraber geliştirilmiştir. Semaglutide oral olarak alındıktan sonra midede Emilimi başlar. Emilimin başlaması ile birlikte SNAC pH'ın artmasını sağlayarak proteolitik bozunmaya karşı korumayı sağlar (Alani ve Robinson, 2008). GLP-1 RA, insülin seviyesini artırarak, glukagon seviyesini azaltarak hiperglisemiye azaltır (Meloni ve ark., 2013; Flint ve ark., 1998). GLP-1 RA iştahı azaltarak günlük enerji alımını azaltır ve bu sayede kilo kaybını kolaylaştırır (Secher ve ark., 2014; Visboll ve ark., 2012). GLP-1, beta hücre fonksiyonunu ve insülin sekresyonunu iyileştirir, glukagon salınımını baskılar, hepatik glukoz çıkışını baskılar (Dhillon, 2018). Hali hazırda vücutta bulunan GLP-1 dipeptidil peptidaz gibi proteazlar tarafından hızla bozunduğu için GLP-1 analogları geliştirilmiştir (Tran ve ark., 2017). GLP-1 beta hücrelerin proliferasyonunu, sitokin ve FFA ile indüklenen apoptozun inhibisyonunu indükleyerek beta hücrelerin korunması sağlar (Buteau ve ark., 2004).

Semaglutide, insanda bulunan GLP-1 ile üç önemli modifikasyon ve %94 homolojiye sahiptir. Semaglutide, pozisyonunda yer alan amino asit sayesinde semaglutid dipeptidil peptidaz-4 tarafından bozunması önlenir (Lau ve ark., 2015). Peptid omurgasında bir aralayıcı ve C-18 yağlı di-asit bağlanmasını engeller. Yapılan bu modifikasyonlar sayesinde GLP-1RA'nın yarı ömrünün uzatılması sağlanmıştır (Kapitza ve ark., 2015; Marbury ve ark., 2014).

Semaglutide, insanda bulunan GLP-1'e %94 sekans homolojisine sahip analog olarak tasarlanmıştır (Nordisk, 2017a). Semaglutide iki adet aminoasit, lizin 26'ncı amino asitte hidrofilik bir aralayıcı ve C-18 yağlı di-asidi ile oluşturularak, DDP-4 enzimi tarafından bozunmaya karşı sağlamlık geliştirmek için tasarlanmıştır (Lau ve ark., 2015). Semaglutide, GLP-1 reseptörüne seçici olarak bağlanıp onu aktive ederek bir GLP-1 reseptör agonisti olarak görev yapar (Nordisk., 2017b). Yapılan bir çalışmada diyabetin neden olduğu obez sıçanlara 11 hafta boyunca haftada bir kez ve günlük dozlar verilmiş sonucunda ise sıçanlarda yağ kütlesi kaybı doza bağımlı olarak meydana gelmiştir (Raun ve ark., 2015).

Diyabetes mellitusu olmayan obez hastalarda Nisan 2017'de Novo Nordisk, günde bir kez subkutan semaglutidenin güvenliğini ve etkinliğini değerlendiren faz 2 denemelerini tamamladı. Novo Nordisk, semaglutide tedavisi ile %13.8'e kadar kilo kaybının olduğu çalışmaları yayınladı (Nordisk., 2017b). Yapılan bir çalışmada semaglutide verilen ve verilmeyen hastalar arasında plasebo etkisini belirlemişler sonucuna göre plaseboya kıyasla glisemik kontrol ve vücut ağırlığının azaldığını göstermişlerdir (Dhillon, 2018).

Yapılan bir çalışmada hastalar için standart bir öğün listesi oluşturulmuş ve 12 hafta süre ile plasebo ve ilaç etkinliğine bakılmıştır. Çalışma sonucunda enerji alımının %24 azaldığı, ilaç kullanımı ile iştah bastırılması ve kilo kaybı gözlenmiştir (Blundell ve ark., 2017). Yapılan başka bir çalışmada hayvanlara verilen GLP-1 RA'nın beyin iştah düzenlemesi ile ilgili bölümlere ulaşıldığı gösterilmiştir. Hipotalamus içerisinde bulunan ayrı bölgelerin doğrudan aktivasyonunu sağlar (van Bloemendaal ve ark., 2014; Sisley ve ark., 2014).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Güvenlik kabini (ESCO, Class II, Type A2), Mc Coys 5'A media (Sigma life science), FBS (Biological Industiring), penisilin-streptomisin (Biological Industiring), serolojik pipet (Costar), PBS (Alfa Aesar), tripsin(Biological Industiring), trypan blue boyası (Biological Industiring), Thoma lamı (Bright-line), ependorf tüp (İsolap), orlistat (Cayman Chemical Company), semaglutide (Cayman Chemical Company), vorinostat (Cayman Chemical Company), decitabine (AK scientific), vorteks (Velp scientifica), 100-1000 µl, 20-200 µl ve 0,5-10 µl mikropipet (Weightlab Instruments), MTT (metiltiazoldifenil-tetrazolyum bromid) boyası (Biofrox), DMSO (Dimetil sülfoksit) (Serva), 96 kuyucuklu ve 6 kuyucuklu kültür plağı (Nest), Heidolph Unimax 1010, hibridizol (hibrigen MG-HBRZ-01), santrifüj (micro 200 R Hettich Zentrifugen), kloroform (Amresco), izopropanol (Amresco), %75'lik etanol (İsolab), nükleaz free water (Thermo scientific), thermo scientific multiskan go, thermo scientific µdrop™ N12391, Bioline qRT-PCR kiti, Roche Light Cyclers 1,5, Centrifuge adapters 11 909 312 001, Forward-Revers primerleri (Macrogen) , RNA template, pcr tüpleri (Lot No: 110802-383), Leica DFC295 S 40/0.45 floresans mikroskobu.

3.2. Metod

3.2.1. Hücrelerin kültüre edilmesi ve kullanılan ilaç stoklarının hazırlanması

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde, kanser araştırma laboratuvarı stoklarında bulunan kolorektal kanser HCT-116 ve HT- 29 hücre hatları kullanıldı. Kültür aşamasında HCT-116 ve HT-29 hücre hattı için %10 FBS (Biological Industries), %1 penisilin/ streptomisin (Biological Industries) ile besin ortamı elde edilen Mc-Coy's 5A besiyeri kullanıldı. Ayrıca besiyerleri 2 gr/L sodyum bikarbonat (Serva, Almanya) zenginleştirildi.

Besiyerleri, vakum filtreleri (TPP Vacuum Filtration “hızlı” Filtermax, 0,22 µM gözenek boyutu) kullanılarak olası kontaminasyonu engellemek için filtrelendi. Filtrelenen besiyerleri ayrı zamanlarda kullanılmak üzere +4 °C’de saklandı. -80 °C de kriyoviallerdeki hücre hatları, ayrı ayrı adlandırılmış içerisinde 10 ml besiyeri bulunan 50 ml’lik falkon tüpleri yardımıyla çözdürüldü. Hücre hatları dondurulurken içerisine koyulan DMSO’nun toksik etkilerini ortadan kaldırmak için 3000 rpm’de 3 dakika boyunca santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj sonrası falkon tüpünün dibinde oluşan peletten süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet içerisinde bulunan hücreler 15 ml taze besiyeri ile pipetaj yaparak çözdürüldü. Hücre-besiyeri çözeltisi otomatik pipet yardımı ile 75 cm²’lik flasklara eklendi. Flasklar ışık mikroskopunda süspansiyon haldeki hücreleri kontrol ettikten sonra %5 CO₂ ve %80-90’lık nem doygunluğuna sahip inkübatöre alındı. 3 günlük inkübasyondan sonra adherent ve çoğalmış hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve 1 X fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkama yapıldı. Taze besiyeri eklendikten sonra tekrar inkübe edildi. Konfluent hale ulaşan hücreler pasaj işlemlerine tabi tutuldu. Öncelikle besiyeri uzaklaştırıldı. Flask içerisinde kalan FBS kalıntılarını tripsinin etki kapasitesini etkilememesi için 5-10 ml 1X PBS ile yıkama yapıldı. 5 ml tripsin eklendikten sonra 3-5 dakika inkübatörde tripsinin hücrelerinin yüzeyle olan protein yapılı bağlantılarının parçalanması için inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrası flask içerisine tripsinin aktivitesini durdurmak için taze besiyeri eklendi. Flask içerisinde pipetaj yapıldıktan sonra adlandırılmış 50 cm²’lik falkon tüpüne alındı ve 3000 rpm’de 3 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet taze besiyeri ile çözdürüldü. Hemositometre ile hücre sayımı yapıldıktan sonra hesaplanarak flaska hücre ekimi yapıldı. Kalan hücreler 150 cm³ alana sahip flasklarda büyütüldükten sonra 1,8 mL’lik kriyoviyallerde %10 DMSO içeren dondurma ortamında kullanılarak daha sonra kullanılmak üzere stok oluşturuldu. Kriyoviyaller öncelikle -20°C’de donduruldu daha sonra -80°C olan dolaba alındı. Flask içerisindeki hücre yoğunluğu, ölü hücre miktarları belirli aralıklarla kontrol edildi. Gereksinimine göre besiyeri değiştirildi ya da pasaj yapılarak hücre yoğunluğu kontrol altında tutuldu. Hücreler yeterli şekilde pasajlandıktan sonra MTT, hücre migrasyonu ve qRT-PCR deneyleri için kullanıldı.

Hücre kültürü basamakları steril kabinde (ESCO, Class II, Type A2) gerçekleştirildi. Deney yapılan ortam ve kullanılan materyaller % 70'lik etanol, %10'luk çamaşır suyu ile temizlendikten sonra kullanıldı. Hücre kültürü kabinin bulunduğu ortam UV ışınları ile oluşabilecek kontaminasyonları azaltabilmek için deney öncesi ve sonrası temizlendi. Tek kullanımlık deney materyalleri deney sonrası otoklavlandıktan sonra atık kutusuna atıldı.

HCT-116 ve HT-29 kolon hücrelerinde denenecek kimyasal ajanların gen ekspresyon seviyelerine ve sitotoksitesine bakmak için kimyasal ajanların stokları hazırlandı. (Tablo 3.1.)

Tablo 3.1. Hücrelere uygulanacak kimyasal ajanların stoklarının hazırlanması ve saklama koşulları

Kullanılan İlaçlar	İlaç saklama koşulu (°C)	İlaç stok saklama koşulu (°C)	İlacın çözündüğü kimyasal	İlacın Molekül Ağırlığı (g/mol)
Orlistat	-20	-20	DMSO	4113,6
Semaglutide	-20	-20	DMSO	495,7
Decitabine	-20	-20	DMSO	228,208
Vorinostat	-20	-20	DMSO	264,32

3.2.2. MTT yöntemi için hücre ekimi ve MTT uygulaması

İnkübasyonda yeterli korelasyona ulaşan hücreler laminar kabin içerisinde besiyerinden uzaklaştırıldı. 1X'lik 5-10 ml PBS ile tripsinin aktivitesinin etkilenmemesi için yıkama yapıldı. 5 ml tripsin eklendikten sonra inkübatörde 3-5 dakika inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrası taze besiyeri eklenen flask içerisinde pipetaj yapıldıktan sonra 50 ml'lik falkon tüplerinde 3000 rpm'de 3 dakika santrüfuj yapıldı. Pelet taze besiyeri ile çözdürüldü, sonrasında hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. Bir kuyucukta 7500 hücre olarak şekilde hesap yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu plaklara 200 µl besiyeri+hücre karışımı eklendi.

Hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat inkübatörde steril koşullarda inkübasyon yapıldı. Kalan hücreler tekrar kullanılmak üzere flasklara ekildi. 24 saat sonra kimyasal ajanlar belirli konsantrasyonlarda hazırlanan stoklardan eklendi. 24 ve 72 saatlerde kontrol edilen hücreler 72 saat sonunda MTT testi yapıldı. MTT hücre kültürü çalışmalarında hücresel canlılığın belirlenmesinde kullanılır. MTT kimyasalı her hücrede eksprese olan dehidrogenaz enzimi ile birleştiğinde formazan bileşikleri oluşturur. MTT içerisindeki kimyasallardan dolayı sarı renklidir. Kantitatif bir sonuca da ulaşmamızı sağlayan bu yöntem canlı hücrelerde oluşan formazan bileşiğinin sarı renkten mor renge dönmesi ile hücre plağında bulunan canlı hücre miktarını görebiliriz. Spektrofotometre ile 450 nm’de ölçüm alarak deney grupları arasındaki hücre canlılığı karşılaştırıldı.

Çeşitli konsantrasyonlarda eklenen kimyasal ajanların 72 saatlik inkübasyon sonunda laminar kabinde 96’lık plaklarda bulunan eski besiyerleri çoklu mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı. FBS ve renkli besiyeri spektrofotometrik ölçümü etkileyebileceğinden 96’lık plak çoklu mikropipet yardımıyla hücrelere zarar vermeden 1X PBS ile yıkandı. Yıkama tamamlandıktan sonra fenol kırmızısı FBS içermeyen renksiz besiyeri her kuyucuğa 90 µl olmak üzere eklendi. 1 mg/ml (12 mM) konsantrasyonda PBS içerisinde çözdürülen MTT boyası 10 µl miktarında 96’lık plaklara kimyasal ajan uygulanmış hücrelerin üzerine eklendi (%10 MTT; %90 besiyeri). Eklemeler tamamlandıktan sonra 4 saat inkübatörde inkübasyon yapıldı. Oluşan mor rengin çözülmesi için kuyucuklardan 75 µl alındı ve yerine 75 µl DMSO eklendi. DMSO ilavesinden sonra 3 saat karanlık ortamda Heidolph Unimax 1010 centrifuge adaptersde inkübe edildikten sonra 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Multiskan GO mikroplate reader; Thermo Scientific) absorbans değerleri ölçüldü. Absorbans verilerinin analizi için kontrol grubu hücrelerinin ortalaması alınarak %100 hücre canlılığı verisi olarak kabul edildi. GraphPad programında analizler yapıldı, oluşan grafik ve hücre canlılığı değerlerine göre RNA izolasyonunda kullanılacak konsantrasyonlar seçildi.

3.2.3. Total RNA izolasyonu

75 cm² alana sahip flask içerisinde yeterli yoğunluğa ulaşmış hücreler yukarıda belirtilen pasaj basamağına göre yapıldı. Hücreler hemositometre sayımı yapıldıktan sonra 6 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına 550,000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin yüzeye tutunmaları için 24 saatlik bir inkübasyona tabi tutuldu. 24 saat sonrasında MTT testi sonucuna göre kimyasal ajanların belirlenen olası konsantrasyonları adherent olmuş hücrelere eklendi. 24 saatlik inkübasyon sürelerinde hücre yoğunlukları kontrol edildi. 24 saat sonunda belirlenen konsantrasyonlarda eklenen kimyasal ajanların hücrelerde mRNA seviyesindeki değişikliklere bakmak için yüzeye tutunmuş hücrelerin total RNA izolasyonu yapıldı. 6 kuyucuklu plaklarda bulunan besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Soğuk PBS ile FBS kalıntıları yıkandı ayrıca PBS'in soğuk olması sayesinde hücrelerin stabilizasyonu sağlandı. Her kuyucuğa 1 ml hibrizol eklendi. Hibridizol içeriğinde guanidyum izotisiyanat ve fenol bulunan hücreleri lizis ederek hücresel bütünlüğün bozulmasını sağlarken RNA bütünlüğünün korunmasına da katkıda bulunur. Hücredeki karbonhidrat, yağ ve proteinlerin parçalanarak RNA'nın açığa çıkmasını sağlar. Her kuyucuğa eşit şekilde pipetaj yapıldıktan sonra süspansiyon hücreler toplandı 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Hücrelerin bulunduğu ependorf tüplere 200 µl kloroform eklendi. Kloroform sayesinde membran lipitleri, hidrofobik polipeptidler, polisakkaritler parçalanır. RNA izolasyonuna başlamadan önce santrifüjün +4 °C'de olması için çalıştırıldı. Soğuk santrifüjde 12.000 rpm'de 15 dakika ayarlanarak santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda oluşan faz ayrımı sayesinde üst kısımda kalan renksiz süpernatant farklı ependorf tüplere alındı. Yağları çözmek ve temizlemek için 500 µl izopropanol eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra 12.000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj yapıldı. Santrifüj bittiğinde RNA peleti görünür hale geldi ve süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. RNA'nın yıkanması ve stabilizasyonu için 1000 µl %75'lik etanol eklendi. 7500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Pelet laminar kabinde etanolün tamamen uçması için kurumaya bırakıldı. RNaz/DNaz free su 30 µl eklenerek pelet çözdürüldü.

RNA'lar 1'er µl'lik hacimde mikropilaya okuyucusuna yüklenerek 260 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. RNA absorbansları qRT-PCR'da kullanılmak üzere OD260xseyreltme katsayısıx40µg/ ml/1000 formülü ile hesaplandı. Absorbansın "1"değeri 1cm³'lük küvete 50 µg/ml miktarı çift zincirli DNA'yı, 33 µg/ml miktar oligonükleotidleri ve 40 µg/ml miktar tek zincirli RNA'yı temsil ettiği için absorbans miktarını hesaplariken 40 µg/ml kullanıldı. Absorbansı hesaplanan total RNA'lar daha sonra qRT-PCR deneylerinde kullanılmak üzere -80°C'lik dolaba kaldırıldı.

3.2.4. qRT-PCR

Kantitatif gerçek-zamanlı PCR deneyinde kullanılacak primerler önceden sipariş edildi.

Tablo 3.2. qRT-PCR deneylerinde kullanılan genlerin primer sekansları (humanizing genomics macrogen tarafından yapılmıştır). 300 µl içerisinde çözdürülen primerlerin 100 µM konsantrasyona sahiptir. Deneylerde 100 µM konsantrasyon 10 µM konsantrasyona seyreltilerek kullanıldı.

GAPDH	F: 5'-ATGGCACCGTCAAGGCTGAG -3' R: 5'-GCAGTGATGGCATGGACTGT -3'
KRAS	F: 5'-ATGAGGGACCAGTACATGAG -3' R: 5'-CATCCTCCACTCTCTGTCTT -3'
APC	F: 5'-TCTGTACCACCCTCAGTTCT -3' R:5'- CCATAGGAACAGGACTGCAC-3'
P53	F: 5'-TGCGTGTGGAGTATTTGGATG -3' R:5'-TGGTACAGTCAGAGCCAACCTC -3'
KRC	F: 5'-GAACAAAGTGTC AAGGGCAC -3' R:5'-TCCGAGTCTCATGGGGCTAA-3'

Tablo 3.3. PCR reaktifleri. Bioline qRT-PCR kiti paket içeriği

Paket içeriğinde bulunan miktar	Hacim
Sensifast Sybr-no-rox one-step,2x	5x1 ml
Ribosafe RNase inhibitor	1x200 µl
Revers Transcriptase	1x100 µl
DEPC-treated water	2x1,8 ml

Tablo 3.4. qRT-PCR deneylerinde kullanılan her reaksiyonun hacimleri

Kullanılan reaktifler	Bir reaksiyon için kullanılan miktar	Konsantrasyon
Sensifast Sybr-no-rox one-step,2x	10 µl	1X
Ribosafe RNase inhibitor	0,4 µl	
Revers Transcriptase	0,2 µl	
DEPC-treated water	up to 16 µl	
Forward primer	0,8 µl	400 nM
Revers primer	0,8 µl	400 nM
RNA template	20 ng RNA	

cDNA sentezi için Roche LightCycler 1.5 Instrument (Roche Diagnostics GmbH) cihazı kullanıldı. Cihaz adımları aşağıda gösterildiği gibi ayarlandı:

Tablo 3.5. qRT-PCR için kullanılan lightcycler programının çalışma programı

Gerçekleşen Aşamalar	Döngü Sayısı	Analiz Modu	Sıcaklık (°C)	Süre	Acquisition mode
Renatürasyon	1	None	50	25 dakika	None
Denatürasyon	1	None	95	15 dakika	None
Amplifikasyon	40	Quantification	95	15 saniye	None
			55	30 saniye	None
			72	35 saniye	Single
Cooling	1	None	37	30 saniye	None

Deneyler tamamlandıktan sonra Ct değerleri kullanılarak analiz işlemi yapıldı. Relative genlerin Ct değerleri GAPDH geni Ct değerlerine göre normalize ederek analizler yapıldı. Relative genler arasındaki gen ekspresyonunu belirlemek için GAPDH geni housekeeping gen olarak kullanıldı.

3.2.5. Hücre migrasyon deneyleri

6 kuyucuklu plağa ekim yapılan hücreler adherent olduktan sonra RNA izolasyonun da kullanılan konsantrasyonlarda kimyasal ajanlar eklendi. Pipet ucu ile kuyucukların tam ortası hedef alınarak çizikler yapılarak hücrelerde kimyasal ajanların saat aralıklarına göre hücre migrasyonuna bakıldı. 0-24-48 saatler de Leica DFC295 S 40/0.45 floresans mikroskobu yardımı ile görüntüler çekildi.

3.2.6. İstatiksel analiz ve veri görselleştirme

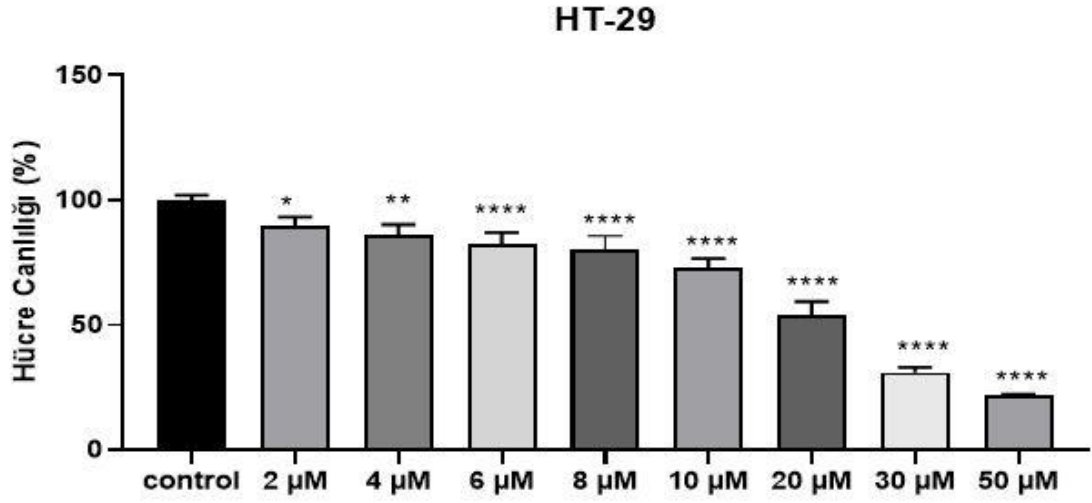
qRT-PCR deneylerinde Livak ($2^{-\Delta\Delta ct}$) metodu ile analiz edildi. Livak metoduna göre kontrol grupları 1'e eşitlenerek relative genlerdeki ekspresyon miktarları değerlendirildi. İstatiksel karşılaştırmaları kontrol grubu ve relative genler arasında Student's T-test metodu uygulandı. P değerinin 0,05 ve altında bulunan durumlar istatiksel olarak anlamlı olduğu simgelerle gösterildi. GraphPad programı ile görselleştirmeler yapıldı. Mikroskop görüntüleri ilaç uygulamalarından sonra 0-24-48 saat aralıklarında Leica DFC295 S 40/0.45 ile çekildi. Leica Application Suite v+ yazılımı kullanılarak fotoğraflar hazırlandı.

4.BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Hücre Canlılık Testleri

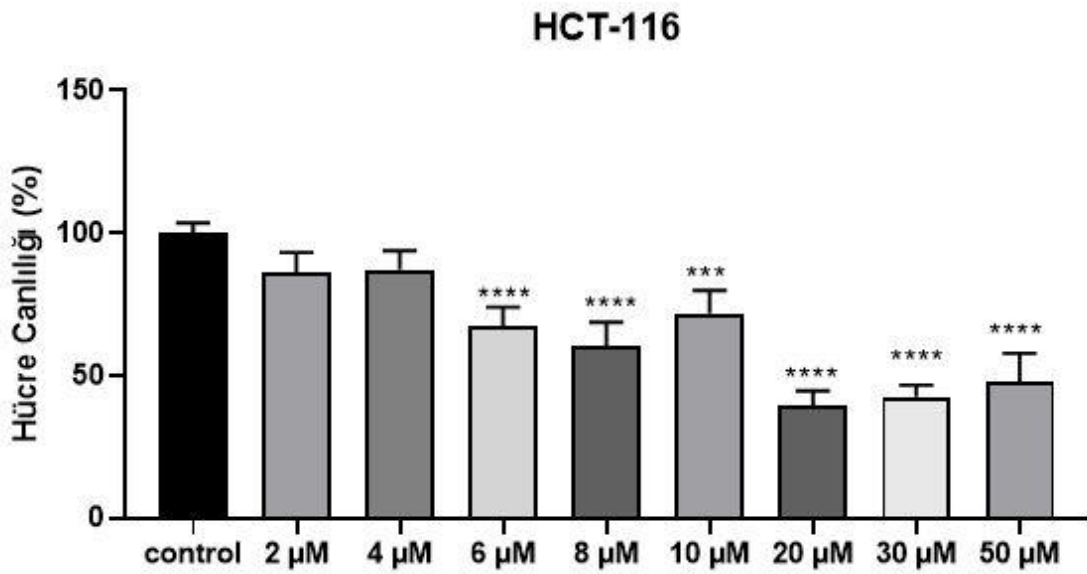
4.1.1. Obezite tedavisinde kullanılan orlistatin farklı konsantrasyonlarda kolorektal kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

Gastrik ve pankreatik lipazları inhibe ederek enerji alımının azaltılmasına yardımcı olan orlistat iki farklı kolorektal kanser hücre hatlarında öncelikle MTT yöntemi ile hücrelerin artan doza karşı yüzde canlılık oranlarına bakıldı. HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatlarında 2 μM , 4 μM , 6 μM , 8 μM , 10 μM , 20 μM , 30 μM , 50 μM konsantrasyonları kullanıldı. Hücreler 96'lık plaklara ekildikten 24 saat sonra ilaç uygulaması yapıldı. 48 saatlik inkübasyon süresinden sonra MTT yöntemi uygulanarak spektrofotometrede ölçüm yapıldı. HT-29 kolorektal kanser hücre hattı MTT yöntemi ile orlistatin sitotoksik etkisine bakıldığında artan konsantrasyona karşı artan bir sitotoksik etki görüldü. Özellikle 10 μM 'lık konsantrasyondan sonra sitotoksik etki HT-29 kolorektal kanser hücre hattında HCT-116'ya göre daha fazla olmuştur. 20 μM uygulanan konsantrasyon HT-29 kolorektal kanser hücre hattında %50 canlılığın üstündedir. 30-50 μM uygulanan konsantrasyonlarda hücre canlılığı neredeyse %25'in altına düşmektedir. Bu da gösteriyor ki hücreler yüksek orlistat konsantrasyonlarına maruz kaldığında toksik bir etki gösterebilmektedir. (Şekil 4.1.)



Şekil 4.1. HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak orlistatin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 hücre hattı hücreleri 2 µM, 4 µM, 6 µM, 8 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 50 µM konsantrasyonlarında muamele edildi. İstatiksel analizi graphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1). Deneyler üçer kez tekrarlandı.

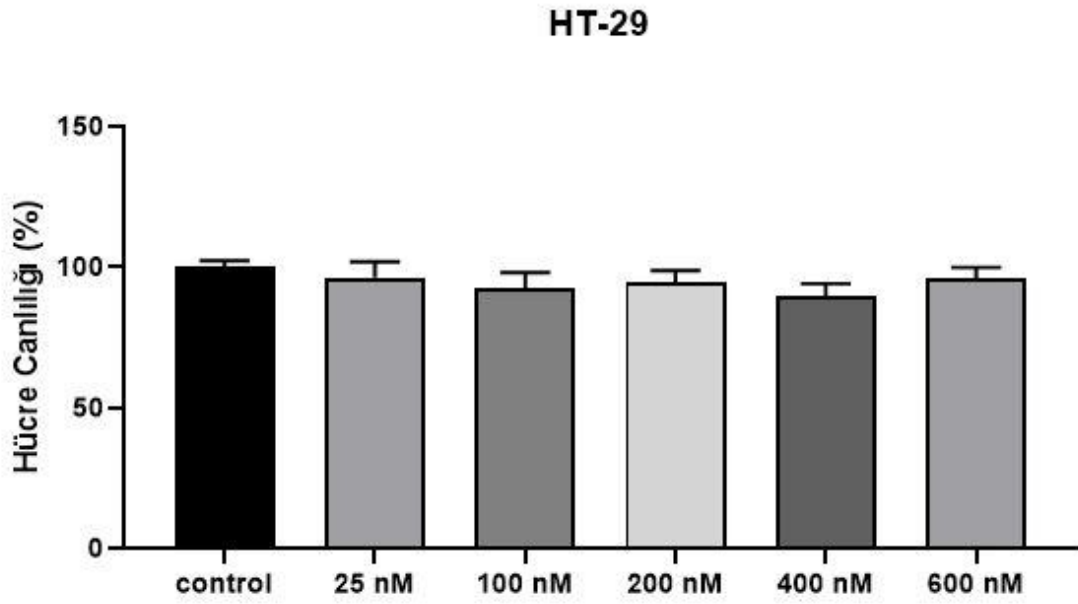
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında orlistat 4 μM 'lık bir konsantrasyondan sonra hücreler üzerinde belirli bir sitotoksik etki oluşmaya başladı. Artan konsantrasyona göre 6-8-10 μM konsantrasyonunda uygulanan ilaın hücreler üzerinde sitotoksik etkisi %50'nin altında iken diğerk artan konsantrasyon olan 20-30-50 μM konsantrasyonda uygulanan ilaçların hücreler üzerinde sitotoksik etkisi %50'den fazla olduğu gözlemlendi. (Şekil 4.2.)



Şekil 4.2. HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak orlistatin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HCT-116 hücre hattı hücreleri 2 μM , 4 μM , 6 μM , 8 μM , 10 μM , 20 μM , 30 μM , 50 μM konsantrasyonlarında muamele edildi. İstatiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (****: $P < 0.0001$, ***: $P < 0.001$). Deneyler üçer kez tekrarlandı.

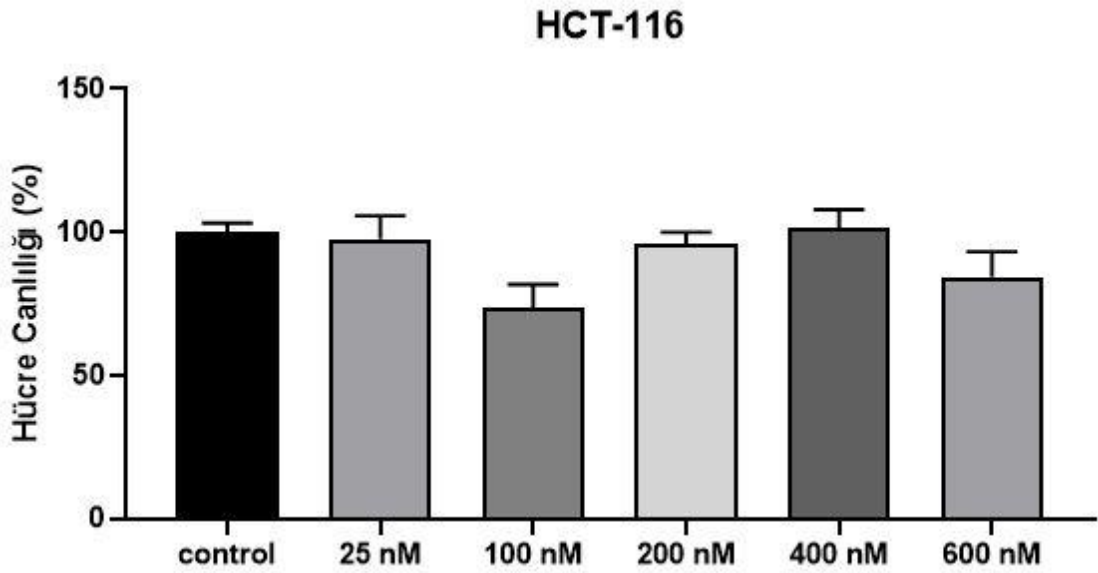
4.1.2. Obezite tedavisinde kullanılan semaglutidenin farklı konsantrasyonlarda kolorektal kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

Glukagon benzeri peptid inkretin hormon salgılamasını sağlayan semaglutide ile muamele edilen HT-29 kolorektal kanser hücre hattında hücreler üzerinde anlamlı bir sitotoksik etki görülmemiştir. (Şekil 4.3.)



Şekil 4.3. HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak semaglutidenin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 hücre hattı 25 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 600 nM konsantrasyonlarında muamele edildi. İstatiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı. Deneyler üçer kez tekrarlandı.

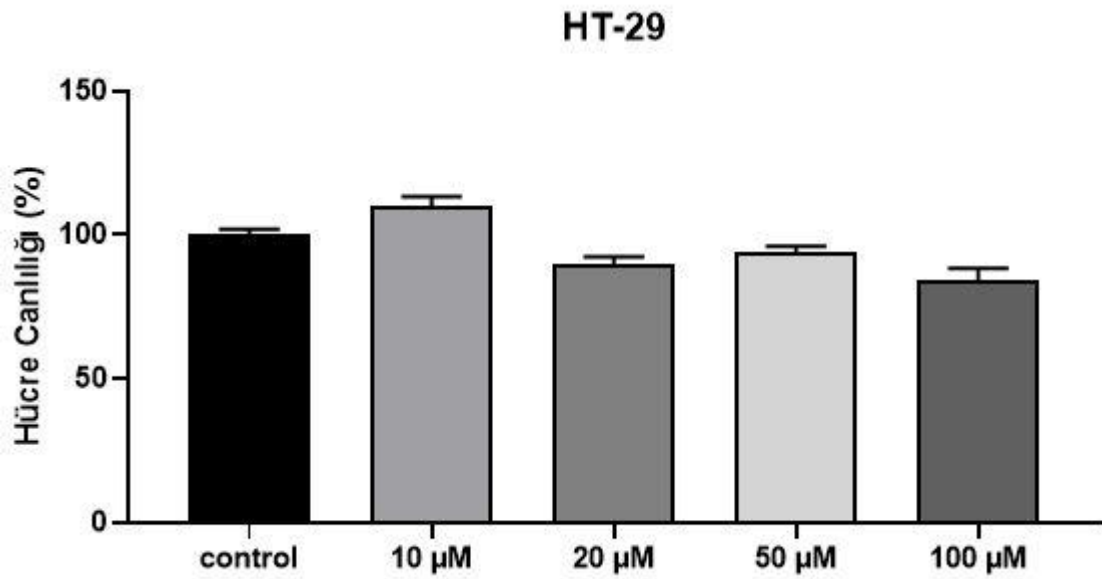
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattının muamele edildiği obezite tedavisinde kullanılan semaglutide hücreler üzerinde sitotoksik bir etki göstermiştir. Hücreler 96'lık plaklara ekildikten 24 saat sonra ilaç uygulaması yapıldı. 48 saatlik inkübasyon süresinden sonra MTT yöntemi uygulanarak spektrofotometre ölçüm yapılmıştır. Semaglutide 100 nM konsantrasyonda kullanımında anlamlı bir değişiklik olmasa da hücresel sitotoksik bir etki göstermiştir. Semaglutide 25 nM konsantrasyonda uygulandığında hücresel sitotoksik etki göstermemiştir. Kullanılan 600 nM konsantrasyon hücresel canlılığını az da olsa düşürmesine rağmen sonuçlar anlamlı olarak değerlendirilmedi. (Şekil 4.4.)



Şekil 4.4. HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak semaglutidenin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HCT-116 hücre hattı 25 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM ve 600 nM konsantrasyonlarında muamele edildi. Deneyler üçer kez tekrarlandı.

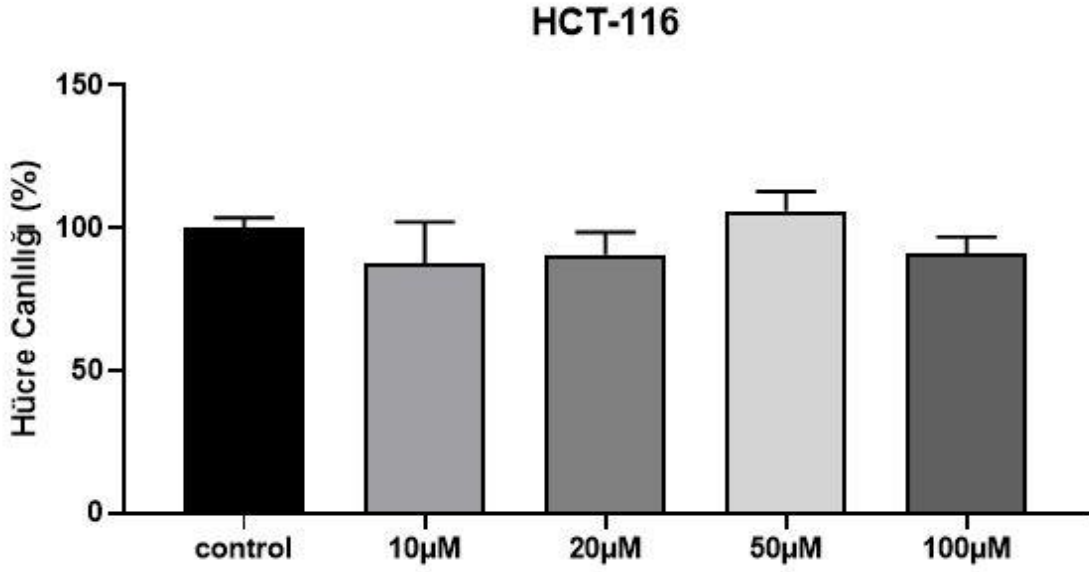
4.1.3. Kanser tedavisinde kullanılan decitabinein farklı konsantrasyonlarda kolorektal kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

Kanser tedavisinde kullanılan DNA metilasyonunu sağlayan decitabine ile hücreler 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM konsantrasyonlarda muamelede edilmiştir. Hücreler 96'lık kültür plaklarına ekildikten 24 saat sonra ilaç uygulaması yapılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresinden sonra MTT yöntemi uygulanarak spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Ölçüm sonuçları kontrol gruplarına göre normalize edildi. HT-29 kolorektal kanser hücre hattı ile muamele edilen decitabine sonuçlarına bakıldığında ise kontrol grubuna kıyaslandığında 20-100 μM 'da anlamlı bir sonuç olmasa da sitotoksik etki görülmüştür.(Şekil 4.5.)



Şekil 4. 5. HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak decitabinein hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 hücre hattı 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM konsantrasyonlarında decitabine ile muamele edildi. Deneyler üçer kez tekrarlandı.

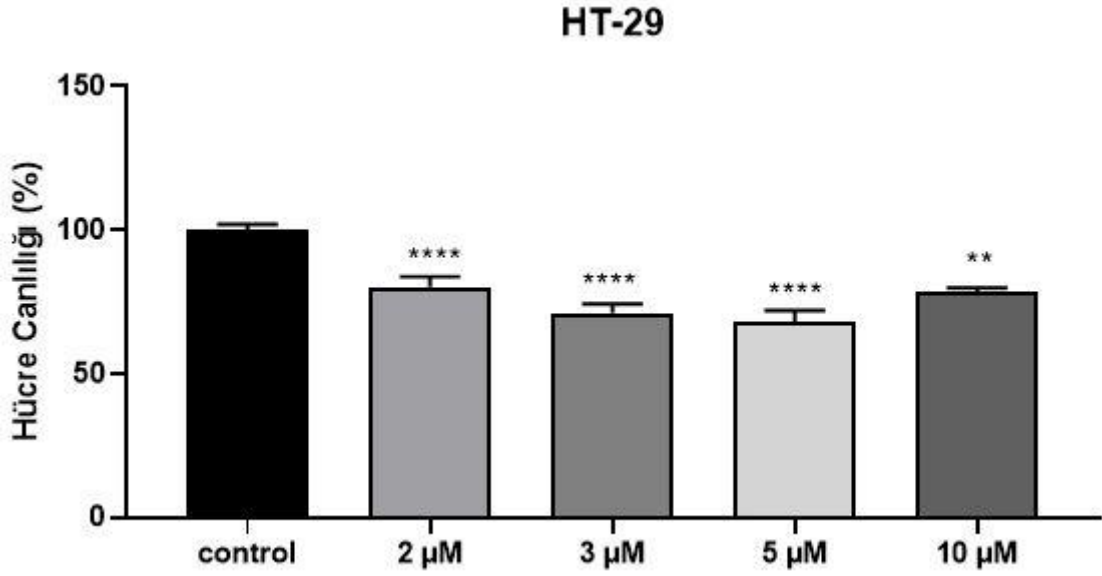
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattı ile muamele edilen decitabine hücreler üzerinde sitotoksik etkisi artan konsantrasyona göre %10-25 arasında bir etki görülmüştür. (Şekil 4.6)



Şekil 4.6. HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak decitabinein hücre sel sitotoksitesinin belirlenmesi. HCT-116 hücre hattı 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM konsantrasyonlarında muamele edildi. Deneyler üçer kez tekrarlandı.

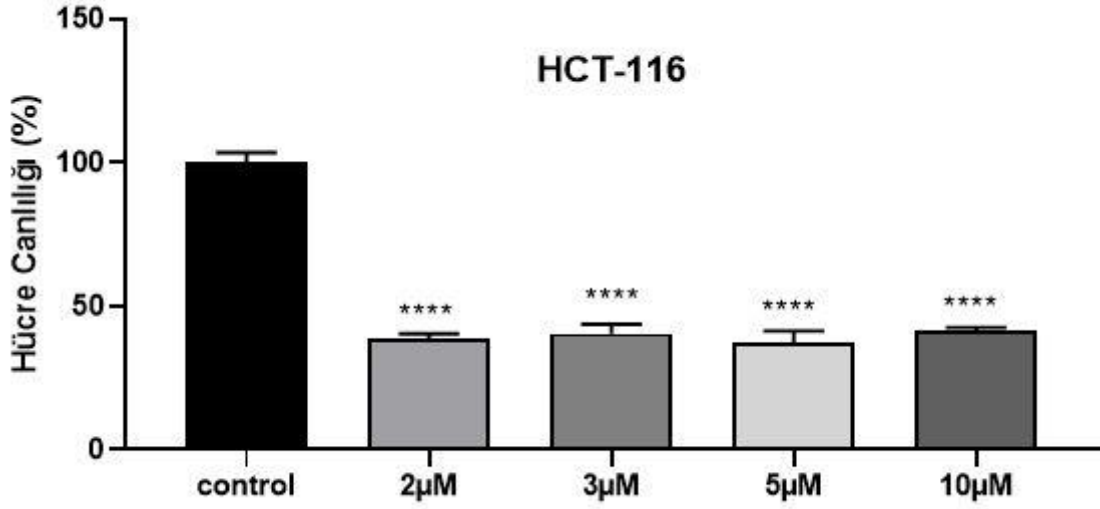
4.1.4. Kanser tedavisinde kullanılan vorinostatın farklı konsantrasyonlarda kolorektal kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

Histondeasetilazları inhibe ederek kanser dokuları tedavi etmede kullanılan vorinostat çalışmamızda kolorektal kanser hücre hatları ile 2 µM, 3 µM, 5 µM ve 10 µM konsantrasyonları kullanılarak MTT yöntemi ile datalar elde edilmiştir. Hücreler 96'lık plaklara ekildikten 24 saat sonra ilaç uygulaması yapılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresinden sonra MTT yöntemi uygulanarak spektrofotometre ölçüm yapılmıştır. HT-29 kolorektal kanser hücre hattının vorinostat ile muamelesi sonucunda artan konsantrasyona bağlı anlamlı hücre sel sitotoksikite mevcuttur. 3-5 µM konsantrasyonlarda hücre sel sitotoksikite diğer konsantrasyonlara göre daha fazladır. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında uygulanan aynı konsantrasyonlarda ilaçlar %50'den fazla sitotoksik etki gösterirken HT-29 kolorektal kanser hücre hattında %50'den daha az sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 4.7.)



Şekil 4.7. HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak vorinostatın hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 hücre hattı 2 µM, 3 µM, 5 µM, 10 µM konsantrasyonların da muamele edildi. İstatiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (****: $P < 0.0001$, **: $P < 0.01$). Deneyler üçer kez tekrarlandı.

Vorinostat ile muamele edilen HCT-116 kolorektal kanser hücresi verilerine bakıldığında artan konsantrasyona göre anlamlı bir hücrel sitotoksite mevcuttur. Kullanılan konsantrasyonlar hücreler üzerinde %50 den daha fazla bir sitotoksik etki göstermiştir. (Şekil 4.8.)



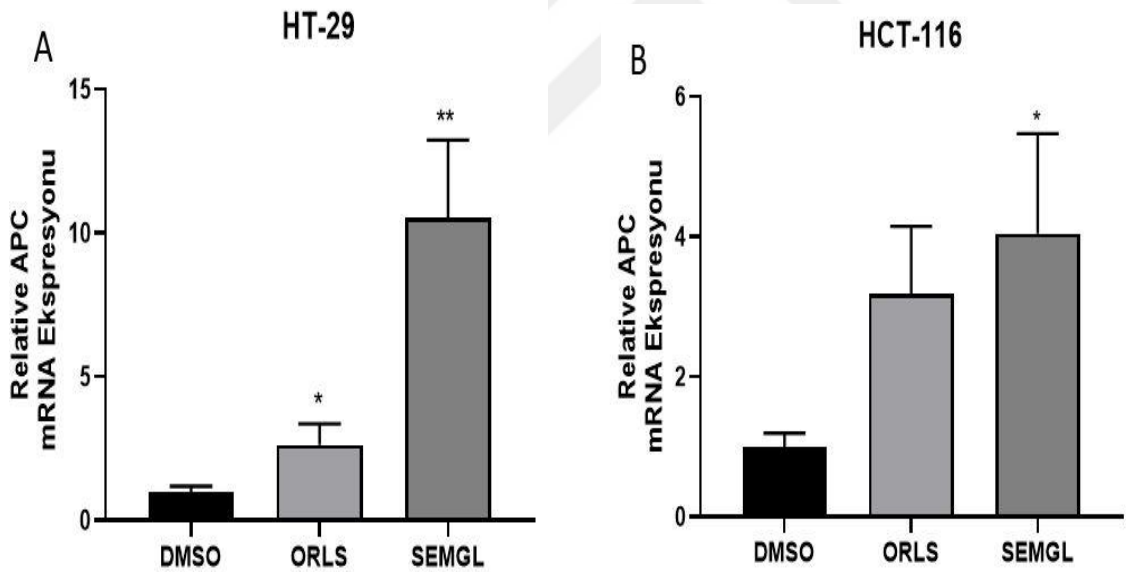
Şekil 4.8. HCT-116 kolorektal kanser hücresinde MTT yöntemi kullanılarak vorinostatın muamelesi sonrası hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HCT-116 hücre hattı 2 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M konsantrasyonlarında vorinostat ile muamele edildi. İstatiksel analizi Graphpad programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (****: P < 0.0001). Deneyler üçer kez tekrarlandı.

4.2. Obezite Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaçların Tümör Baskılayıcı ve Onkogenler ile Muamelesi Sonucu Gen Ekspresyon Miktarları

MTT yöntemi ile elde edilen veriler baz alınarak hücre canlılığının %50'nin altına düşürmeyen konsantrasyonlar yani orlistat için 10 μ M, semaglutide için 400 nM belirlenerek RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA konsantrasyonları bir NanoDrop ile ölçüldükten sonra her bir reaksiyonda 20 ng olacak şekilde qRT-PCR deneylerinde kullanılmıştır.

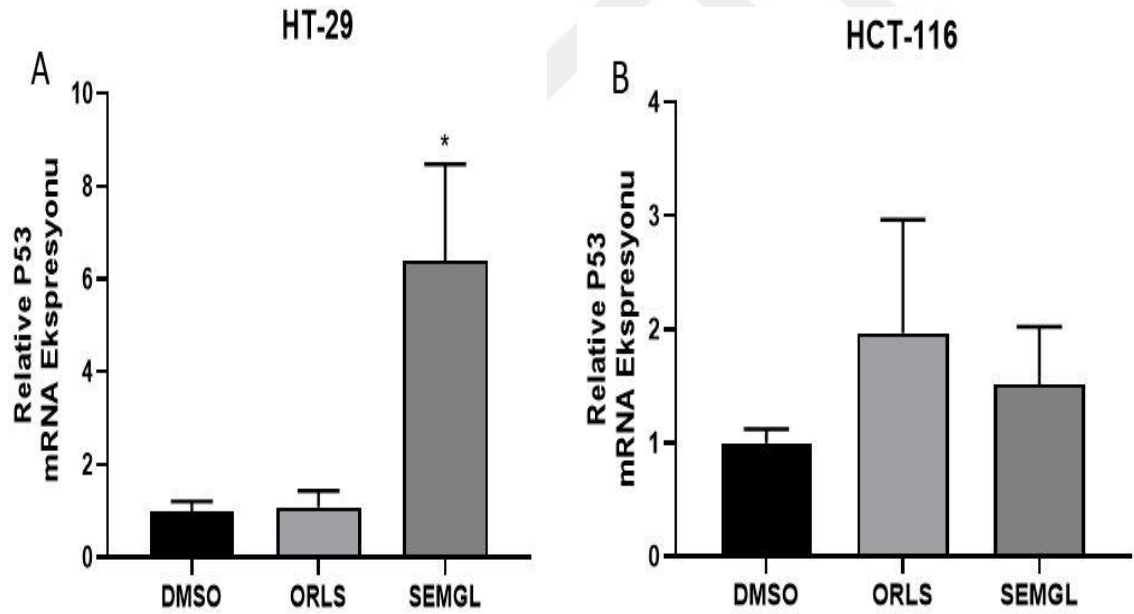
4.2.1. Orlistat ve semaglutide uygulaması sonrası tümör baskılayıcı genlerin gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

Normal hücrelerde multifonksiyonel protein sentezlenmesinden sorumlu tümör baskılayıcı gen olan APC geni ekspresyonu meydana geldikten sonra GSK-3'ün fosforillenmesini gerçekleştirir. Kolorektal kanser hücre hatları olan HT-29 ve HCT-116 semaglutide ve orlistat ile muamele edildi. Muamele edilen hücreler RNA izolasyonuna tabi tutulduktan sonra qRT-PCR yapılarak cDNA elde edildi. Elde edilen sonuçlara göre, orlistat ya da semaglutide muamelesi her iki kolorektal kanser hücre hattında da APC gen ekspresyonunu anlamlı şekilde artırdı. Semaglutide, orlistata göre APC geninin daha fazla eksprese edilmesini sağladı. Elde edilen bulgular gösteriyor ki, düşük dozda obezite ilaçlarının kullanımı tümör baskılayıcı gen ekspresyonunu artırarak potansiyel anti kanser etki oluşturmaktadır.



Şekil 4.9. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücre hatlarında, orlistat ve semaglutide uygulaması sonucunda tümör baskılayıcı bir gen olan APC geninin ekspresyon miktarları. A-HT-29 kolorektal kanser hücre hattına uygulanan ilaçların APC geninin ekspresyon miktarını göstermektedir. B- HCT-116 kolorektal kanser hücre hattına uygulanan ilaçların APC geninin değişen ekspresyon miktarını ifade etmektedir. Deneyler üç kez tekrarlandı (* :P < 0.05, ** :P < 0.005).

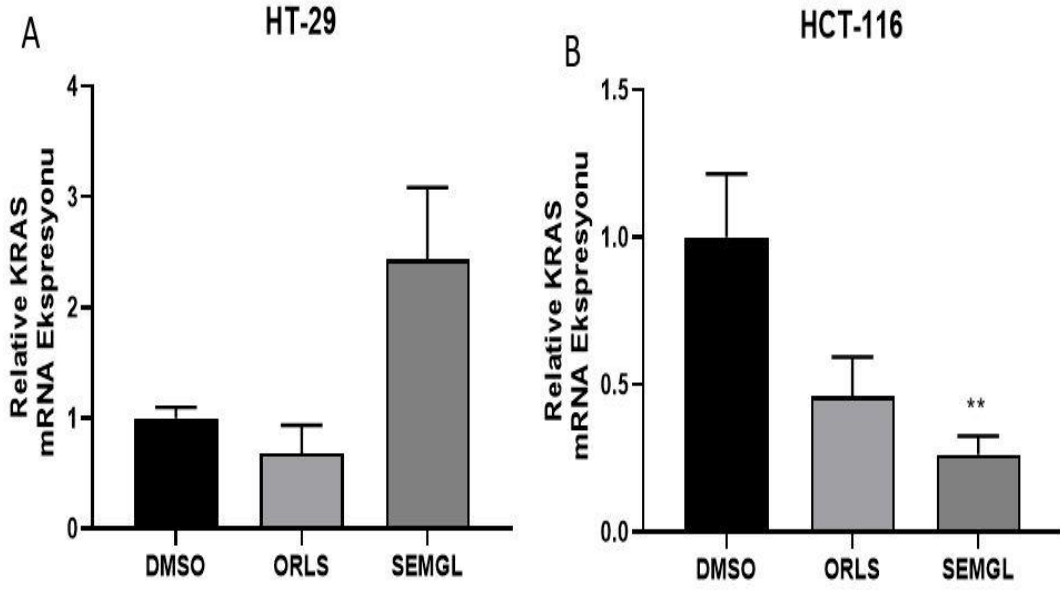
Hücre döngüsünün durdurulması, farklılaşma, yaşlanma ve apoptoz gibi hücreyel işlevlerde görevli olan onkogenler tarafından aktive edilen yarı ömürlü tümör baskılayıcı olan p53 geni iki farklı kolorektal kanser hücre hattının obezitede kullanılan orlistat ve semaglutide ilaçları ile muamele edildikten sonra qRT-PCR ile gen ifadesine bakıldı. HT-29 kolorektal kanser hücre hattında anlamlı bir gen ifadesi meydana gelmiştir, kontrol ve ilaçla muamele edilen genlerin gen ifadesinde p53 geninin orlistatla muamele edilmiş hücrelerde kontrol grubuna göre çok az ekspresyonu meydana gelmiştir. Semaglutide ilacı ise HT-29 kolorektal kanser hücre hattında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gen ekspresyon miktarı artmıştır. HCT-116 hücre hattında orlistat ve semaglutide uygulaması anlamlı bir sonuç göstermese de kontrol grubu ile kıyaslandığında artış görülmektedir. Kolorektal kanser hücre hatlarına uygulanan ilaçların tümör baskılayıcı gen olan p53 gen ifadesini değiştirmesine baktığımızda kontrol grubuna göre kıyaslandığımızda orlistatın oluşturduğu gen ifade miktarları HT-29 ve HCT-116 da yakınen semaglutidenin gen ifade miktarı HT-29 kolorektal kanser hücre hattında daha fazla olmuştur. (Şekil 4.10.)



Şekil 4.10. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücre hatlarında, orlistat ve semaglutide uygulaması sonucunda tümör baskılayıcı bir gen olan p53 geninin ekspresyon miktarları. A-HT-29 kolorektal kanser hücre hattına uygulanan ilaçların p53 geninin ekspresyon miktarını ifade etmektedir. B- HCT-116 kolorektal kanser hücre hattına uygulanan ilaçların p53 geninin değişen ekspresyon miktarını ifade etmektedir. Deneyle en az üç kez tekrarlandı (* :P < 0.1).

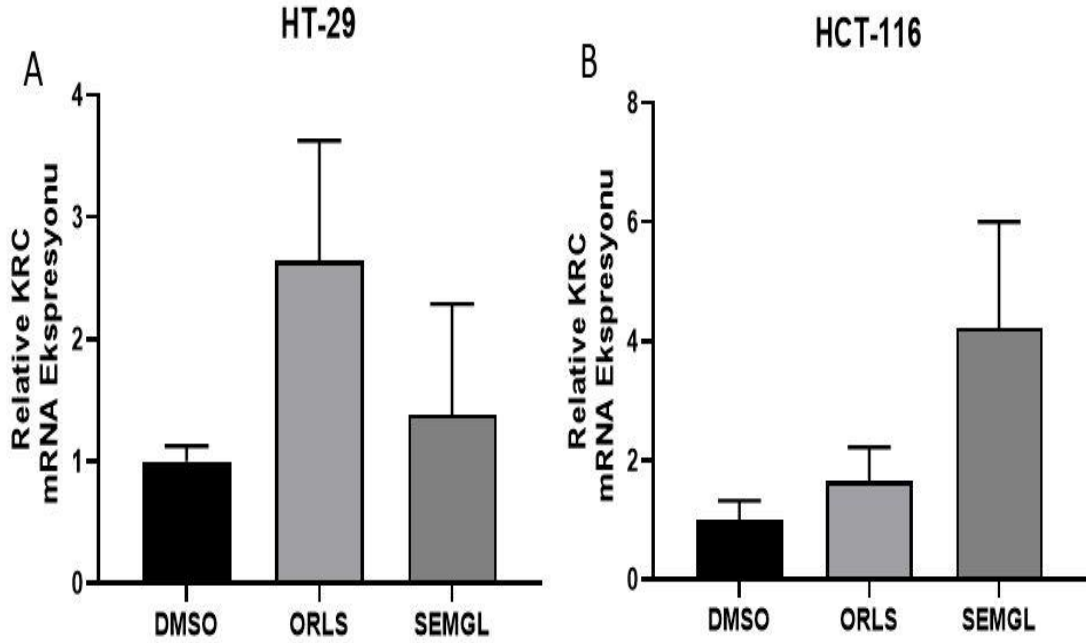
4.2.2. Orlistat ve semaglutide uygulaması sonrası bazı onkogenlerin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

Hücre dışı uyarana karşı hücresel yanıtın düzenlenmesinde yer alan proteini bağlayan 21kDA guanozin trifosfat (GTP)/guanozin difosfat (GDP) kodlayan protoonkogen olan KRAS geninin kolorektal kanser hücre hatlarının obezitede kullanılan orlistat ve semaglutide ile muamelesi sonucunda ekspresyonuna bakıldı. KRAS gen ekspresyonunda HT-29 hücre hattında kontrole göre orlistat ve semaglutidenin kıyaslanmasının sonucuna göre orlistat kontrole göre KRAS ekspresyon seviyesini azaltırken, semaglutidenin KRAS ekspresyonunu arttırdığı ancak bu artışın anlamlı olmadığı gözlemlendi. HCT-116 hücre hattında ise KRAS gen ekspresyon miktarı kontrole göre azalttığı ve semaglutide uygulamasının anlamlı bir şekilde ekspresyon miktarını düşürdüğü gözlemlendi. Her ne kadar hücreler arasındaki ekspresyon profilleri farklı olsa da, elde edilen bulgulardan yola çıkarak obezite tedavisinde kullanılan ilaçların tümör baskılayıcı genlerin aksine onkogenler üzerinde baskılayıcı bir rolü olduğunu söyleyebiliriz. Bu da bu tür ilaçlardan bazılarının sadece obezite tedavisinde değil aynı zamanda kanser tedavisinde de potansiyel olarak kullanılabileceğini göstermektedir. (Şekil 4.11.)



Şekil 4.11. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücre hatlarında, orlistat ve semaglutide uygulaması sonucunda onkogen olan KRAS geninin ekspresyon miktarları. A-HT-29 kolorektal kanser hücre hattına uygulanan ilaçların KRAS geninin ekspresyon miktarı. B-HCT-116 kolorektal kanser hücre hattına uygulanan ilaçların KRAS geninin değişen ekspresyon miktarını ifade etmektedir. Deneyler üç kez tekrarlandı (**:P< 0.05).

KRAS geni dışında, DNA rekombinasyonu, gen transkripsiyonu ve sinyal transdüksiyonu gibi hücrel aktivitelere düzenlenmesinde yer alan üç sınıf proteinden oluşan ZAS DNA bağlayıcı protein ailesinin üyesi olan KRC geninin obezite tedavisinde kullanılan orlistat ve semaglutide ile muamele edilen kolorektal kanser hücre hatlarında ekspresyonundaki değişimleri ortaya koymayı amaçladık. HT-29 kolorektal kanser hücre hattında kontrol grubu ile orlistat ve semaglutide kıyaslandığında orlistata göre semaglutide KRC gen ekspresyonunu artırmıştır ancak KRAS geninde de gözlemlediğimiz gibi bu artışın anlamlı olmadığını gördük. HCT-116 hücre hattında kontrol grubuna göre orlistat ve semaglutide ile muamele edildikten sonra KRC gen ekspresyonu kontrol grubuna kıyaslandığında gen ekspresyon miktarında yine bir artış gözlemlenirken bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunamamıştır (Şekil 4.12.). Sonuç olarak, obezite tedavisinde kullanılan orlistat veya semaglutide, bazı tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarını artırırken, onkogenlerin seviyesinde meydana gelen artışın anlamlı olmadığı ve hatta bazı durumlarda anlamlı olarak azalttığını söyleyebiliriz.

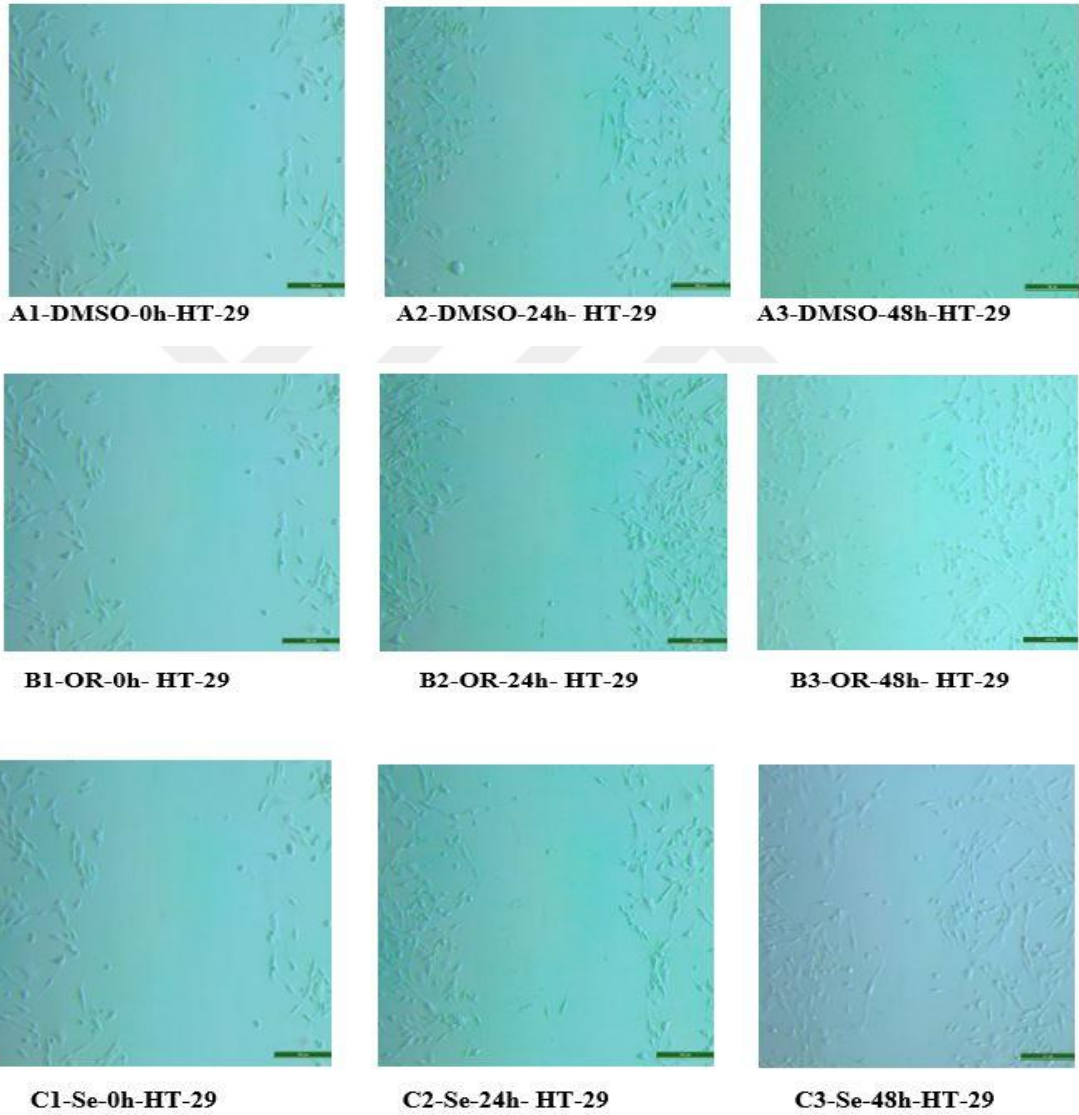


Şekil 4.12. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücre hatlarında, orlistat ve semaglutide muamelesi sonucunda onkogen olan KRC geninin ekspresyon miktarları. A-HT-29 kolorektal kanser hücre hattına uygulanan ilaçların KRC geninin ekspresyon miktarını ifade etmektedir. B- HCT-116 kolorektal kanser hücre hattına uygulanan ilaçların KRC geninin değişen ekspresyon miktarını ifade etmektedir. Deneyler üç kez tekrarlandı ve hata çubukları üç tekrarın ortalamasını göstermektedir.

4.3. Obezite Tedavisinde Kullanılan Orlistat ve Semaglutidein Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkileri

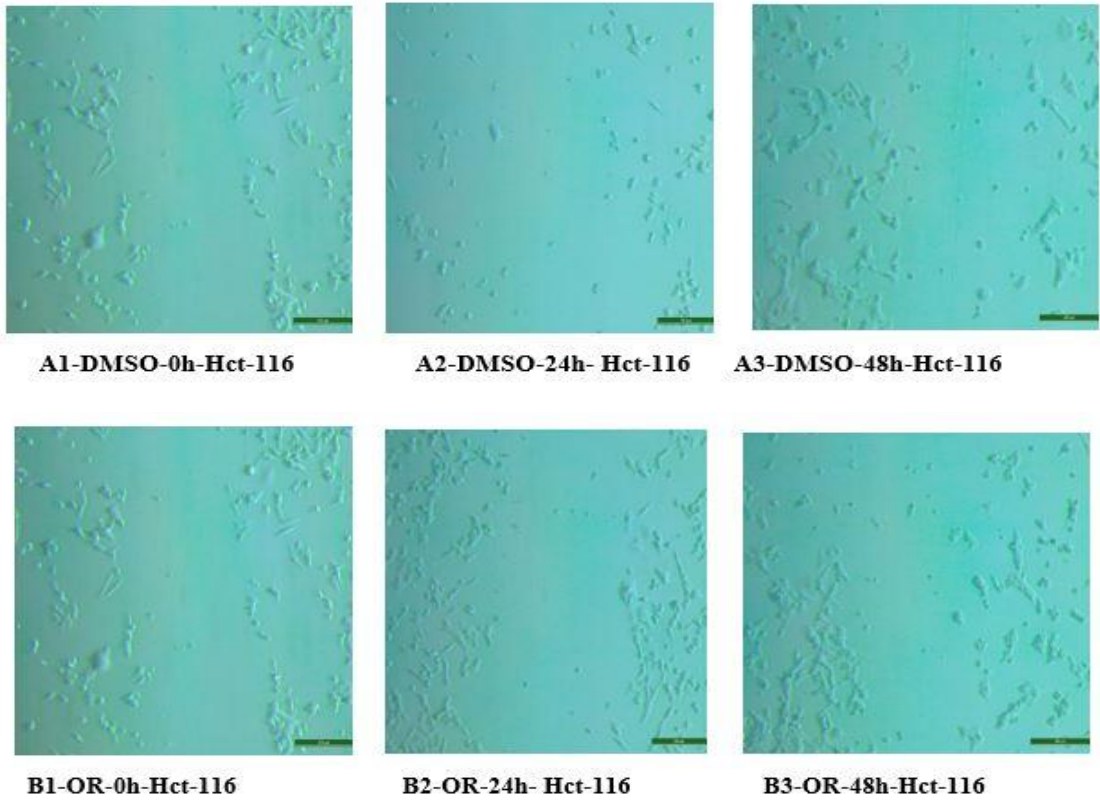
Hücreler için aşırı sitotoksikite oluşturmeyen konsantrasyonlar MTT yöntemi ile elde ettiğimiz veriler yardımı ile belirlenerek hücre migrasyon deneylerinde kullanıldı. Bu amaç doğrultusunda 6 kuyucuklu plaklara ekim yapıldıktan 24 saat sonra ilaç eklemesi yapıldı. İlaçlar eklendikten sonra 0-24-48 saat aralıklarında floresans mikroskop yardımı ile görüntüler elde edildi. Kontrol grubu olarak ilaçlar DMSO içerisinde çözdürüldüğü için DMSO kullanıldı. İlaç ve deney grupları kendi aralarında ve farklı saat dilimleri aralığında karşılaştırıldığında kayda değer farklılıklar gözlemlenmedi.

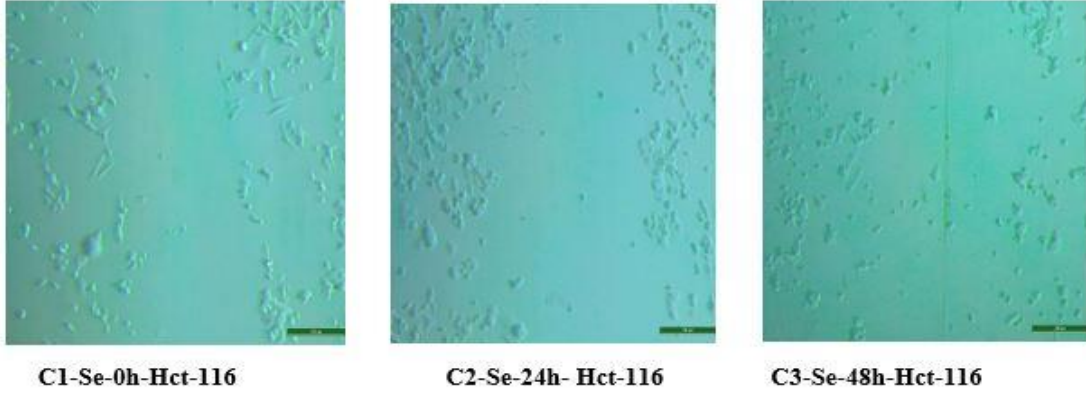
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında yapılan hücre migrasyon deneylerini karşılaştırdığımızda 24 saatte hücre göçü oluşmamışken 48 saat sonunda orlistat ile muamele edilen deney grubunda az bir hücre göçünün meydana geldiği, semaglutide ile muamele edilen deney grubunda ise 48 saat sonunda bir hücre göçünün meydana geldiği gözlemlendi. Ancak kontrol grubuna göre kıyaslandığında aralarında çok az bir fark olduğunu söyleyebiliriz (Şekil 4.13.)



Şekil 4.13. HT-29 kolorektal kanser hücre hattına orlistat ve semaglutidenin hücre migrasyon analizleri. Hücreler 6 kuyucuklu plaklara ekildikten sonra migrasyon verileri 0, 24 ve 48 saatin sonunda kaydedildi. Kontrol grubu olarak DMSO kullanıldı. Orlistat 10 µM ve semaglutide 400 nM konsantrasyonlarda kullanıldı. A1:kontrol grubu 0 saat, A2: kontrol grubu 24 saat, A3: kontrol grubu 48 saat, B1: orlistat 0 saat, B2: orlistat 24 saat, orlistat 48 saat, C1: semaglutide 0 saat, C2: semaglutide 24 saat, C3: semaglutide 48 saat.

HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında ise yapılan muameleler sonucunda 24 saate herhangi bir hücre göçü yokken 48 saat sonunda semaglutide ile muamele edilen deney grubunda nisbeten bir hücre göçü gözlemlendi. Kontrol grubu DMSO ve orlistat karşılaştırıldığı hücre göçü 24 saatte yok denecek düzeydeyken, 48 saat sonunda az bir farklılığın olduğu söylenebilir. (Şekil 4.14.)

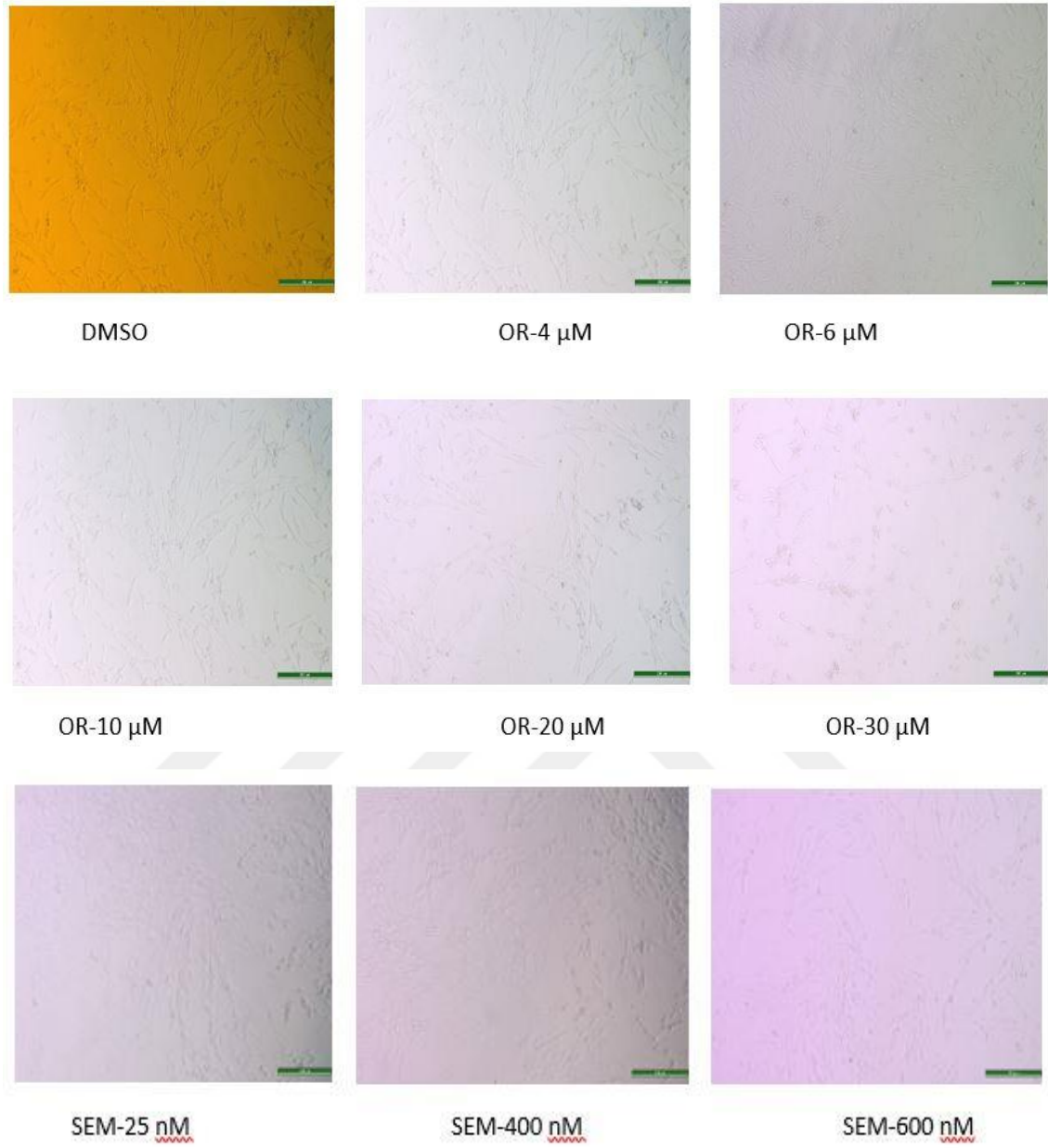




Şekil 4.14. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında uygulamalar sonrası hücre migrasyon analizleri. HT-29 hücre hattı için belirlenen konsantrasyon ve zaman aralığında hücrelerin migrasyon durumları incelendi. A1:kontrol grubu 0 saat, A2: kontrol grubu 24 saat, A3: kontrol grubu 48 saat, B1: orlistat 0 saat, B2: orlistat 24 saat, orlistat 48 saat, C1: semaglutide 0 saat, C2: semaglutide 24 saat, C3: semaglutide 48 saat.

4.4. MTT Yöntemi Kullanılarak Yapılan Deneylerin Mikroskop Görüntüleri

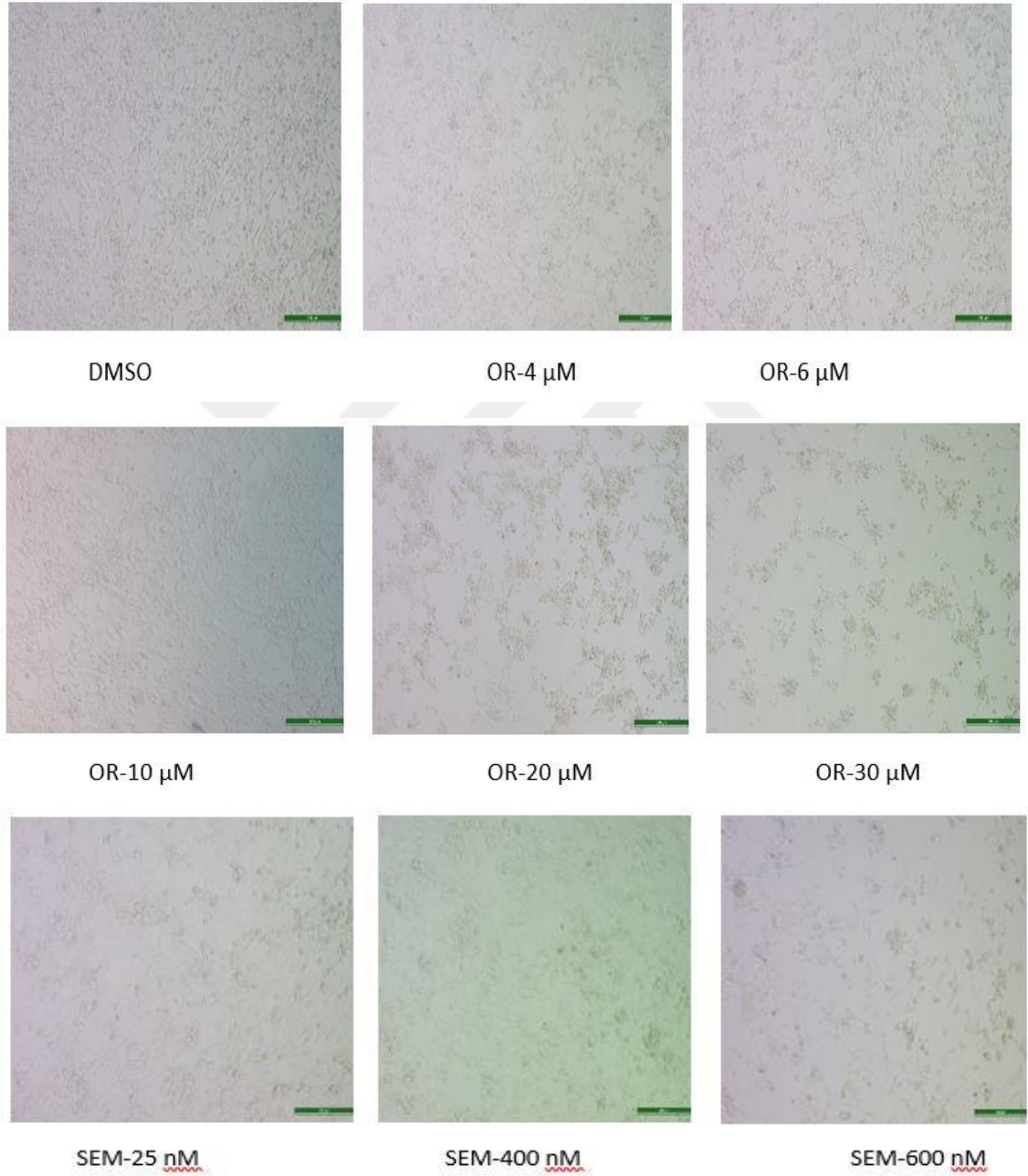
96'lı kuyucuklu plaklara hücre ekimi yapıldıktan sonra adherent olmuş hücelere önceden belirlenmiş konsantrasyonlarda ilaçlar eklendi. İlaçların etkisini gözlemlemek için 72 saat sonunda Leica DFC295 S 40/0.45 floresans mikroskobu yardımıyla görüntüler yakalandı. Artan doza bağlı olarak hücreler üzerinde sitotoksik oluşturan ilaçların MTT yöntemi sonucu ile doğruluğu gösterilmiştir. HT-29 kolorektal kanser hücre hattında 4 μ M, 6 μ M ve 8 μ M konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre hücre miktarında azalma görülmektedir. Özellikle 20 ve 30 μ M konsantrasyon eklenen hücrelerin konformasyonel değişiklikleri şekilde görülmektedir. HT-29 kolorektal kanser hücre hattına 25 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 600 nM konsantrasyonlarında semaglutide ilacı eklenmiştir. Semaglutide 25 nM konsantrasyonu ve kontrol grubu kıyaslandığında aralarında değişiklik olmadığı mikroskop görüntüleri ile desteklenmiştir. Artan konsantrasyona göre hücresel sitotoksitenin kontrol grubu ile kıyaslandığında azalış olmaması MTT verilerini desteklemektedir. (Şekil 4.15.)



Şekil 4.15. HT-29 kolorektal kanser hücre hattı MTT verilerinin mikroskop görüntüsü. İlaç eklendikten sonra 72 saatlik inkübasyon sonrası ilaçların gösterdiği sitotoksik etki.

Daha sonra HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında da aynı şekilde MTT öncesi morfolojik görüntüler analiz edildi. Bu hücre hattında, 4 µM, 6 µM ve 8 µM konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre hücre miktarında azalma görülmektedir. 20 ve 30 µM'lık konsantrasyonda eklenen ilaçların hücrelerin şekillerini değiştirdiği şekilde görülmektedir.

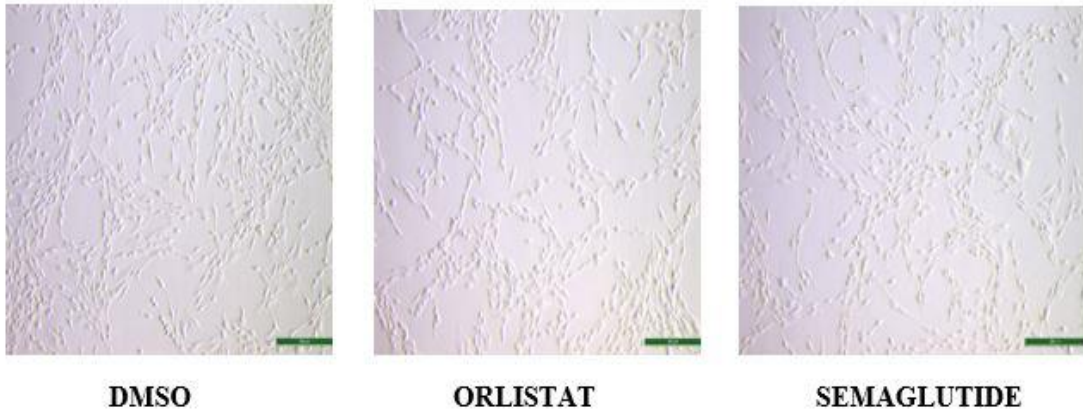
HCT-116 kolorektal kanser hücre hatına 25 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 600 nM konsantrasyonlarında semaglutide ilacı eklenmiştir. Semaglutide 400 nM uygulanan hücre ve kontrol grubu hücreleri karşılaştırıldığında hücrelerin azaldığı görülmektedir. Özellikle 600 nM uygulanan hücreler kontrol ile kıyaslandığında sitotoksik bir etki söz konusudur. (Şekil 4.16.)



Şekil 4.16. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattı MTT verilerinin mikroskop görüntüsü. İlaç eklendikten sonra 72 saatlik inkübasyon sonrası ilaçların gösterdiği sitotoksik etki.

4.4.2. Sitotoksik etkinin olmadığı konstrasyonlar ile muamele edilen durumların 6 kuyucuklu plaklardaki görüntüleri

RNA izolasyonunda kullanılan ilaç konsantrasyonları eklendikten sonra 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası RNA izolasyonu yapılmadan önce plate görüntüleri Leica DFC295 S 40/0.45 floresans mikroskobu ile görüntüler çekildi. Şekil 4.17. HT-29 kolorektal kanser hücre hattını Şekil 4.18. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattını ifade etmektedir.



Şekil 4.17. RNA izolasyonu öncesi HT-29 kolorektal kanser hücre hattının mikroskop görüntüsü. MTT yöntemi ile yapılan deneylerin data sonuçlarına göre RNA izolasyonu için seçilen konsantrasyonların 24 saatlik inkübasyon sonrası RNA izolasyonu öncesi mikroskop görüntüleri. HT-29 kolorektal kanser hücre hattının DMSO, orlistat 10 μ M, semaglutide 400 nM konsantrasyonu ile muamele edilmiş 24 saat inkübasyon sonu mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.18. RNA izolasyonu öncesi HCT-116 kolorektal kanser hücre hattının mikroskop görüntüsü. MTT yöntemi ile yapılan deneylerin data sonuçlarına göre RNA izolasyonu için seçilen konsantrasyonlarının 24 saatlik inkübasyon sonrası RNA izolasyonu öncesi mikroskop görüntüleri. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattının DMSO, orlistat 10 μ M, semaglutide 400 nM konsantrasyonu ile muamele edilmiş 24 saat inkübasyon sonu mikroskop görüntüleri.

5. SONUÇLAR

Çalışmamızda öncelikle obezite tedavisinde kullanılan pankreatik lipaz olan orlistat ve GLP-1 analogu olan semaglutide ilaçları, kanser tedavisinde kullanılan DNA metilasyonunu sağlayan decitabine ve histondeasetilaz görevi gören vorinostatın kolorektal kanser hücre hatlarında artan konsantrasyona bağlı olarak hücresel sitotoksiteyi belirlemek için MTT yöntemi ile deneyler yapıldı. Kolorektal kanser hücre hattı olan HT-29 ve HCT-116 ile muamele edilen orlistat iki hücre hattında da artan doza bağlı olarak hücresel sitotoksite meydana getirmiştir. Semaglutide ile muamele edilen kolorektal kanser hücre hatlarında ise artan konsantrasyona bağlı olarak anlamlı sonuçlar elde edilemedi. Decitabine kullanılarak muamele edilen HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarında anlamlı bir değişim meydana gelmedi. Yapılan bir çalışmada DNA metilasyon değişikliklerinin bağışıklık fonksiyonu ve metabolik bozukluk arasında ilişkili olabileceğini göstermiş ve obezitenin bağışıklık sisteminin değiştirilmiş bir epigenetik mekanizması ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (Simar ve ark., 2014). Decitabinenin kolorektal kanser ile muamelesinde artan konsantrasyona bağlı olarak 100 µM konsantrasyonda hücre canlılığını etkilemiştir. Vorinostatın kolorektal kanser hücre hatları ile muamelesi sonucunda hücre canlılığı artan konsantrasyona göre azalmıştır. Histondeasetilaz görevi gören bu ilaç β hücre farklılaşması, korunması ve çoğalmasında rol alırken ayrıca adipogenezi inhibe etmektedir (Khan ve Jena, 2014). Vorinostat kanser tedavisinde T hücrelerini güçlendirerek immün koruma sağlar ayrıca sinyal dönüştürücü, transkripsiyon aktivatörü gibi görevlerde de yer almaktadır (Cabrera ve ark., 2013). Bu çalışmaya göre obezitenin epigenetik ajanlar tarafından yavaşlatılabileceğini ortaya koymuşlardır (Arguelles ve ark., 2016).

Tümör baskılayıcı genlerin anormol DNA hipermetilasyonu, kanserin erken evresinde moleküler bir değişikliktir. Tümörlerin belirlenmesinde ve tedavisinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Laird, 2003). Onkogenlerin transformasyona uğramayan ilk halleri olan protoonkogenler, hücrelerin sinyalizasyon mekanizmasında büyüme, farklılaşma, çoğalma, apoptozis için sinyal başlamasında kullanılacak proteinlerin sentezininin olmasını sağlarlar (Yokuş ve Çakır, 2012).

Onkogenler ise hücre transformasyonun başlama ve sürdürmesini sağlarlar. Hücre döngüsünün çalışma mekanizmasını değiştiren onkogenler aşırı hücre bölünme olayını gerçekleştirmeyen hücrelerin apoptozise gitmesini sağlayarak ortamda sağlıklı hücre kalmasını bu sayede engeller (Labazi ve Philips, 2003). Çalışmamızda iki farklı tümör baskılayıcı gen olan p53, APC geni ve onkogen olan KRAS ve KRC genlerinin ekspresyon düzeylerine obezite tedavisinde kullanılan gastrik ve pankreas lipazları inaktif ederek yağ emilimini azaltan orlistat ilacı ile glukagon benzeri peptid-1 analogu olan semaglutide ile muamele edilen HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücre hatlarında miktarlarına baktık.

Tümör baskılayıcı gen olan APC geni, multifonksiyonel protein olan sinyal iletiminde, hücre adezyonu, migrasyonu ve miktotübül birleşiminde görevli proteini kodlamakla görevlidir. Tümör baskılayıcı gen olarak bilinen APC geninin kolorektal kanser hücre hattı ile muamele edilmiş obezite tedavisinde kullanılan orlistat ve semaglutide ilacının ekspresyonunu nasıl etkilediğine baktık. HT-29 kolorektal kanser hücre hattında kontrol grubuna kıyasla orlistat ve semaglutide APC gen ifadesini artırmıştır. Semaglutide APC gen ifadesini kontrol ve orlistata göre anlamlı derecede artırmıştır. HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında ise kontrole göre orlistat ve semaglutide APC gen ifadesini artırmıştır. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücrelerini kıyasladığımızda HT-29 hücre hattında APC gen ifade miktarı HCT-116 kolorektal kanser hücre hattına göre daha fazla olmuştur.

Tümör baskılayıcı gen olan p53, mitotik iğ iplik hasarı, DNA hasarı, onkogenler tarafından aktive edilebilen kısa ömürlü transkripsiyon faktörü olarak görev alır. p53, hücre döngüsünün durdurulması, farklılaşma, yaşlanma ve apoptoz gibi hücresel işlevlerde rol oynar. p53, hücresel işlemlerde hücre döngüsünü ve apoptozu gerçekleştiren, aynı zamanda kontrol eden genlerin düzenlenmesinde kontrol noktası gibi görev alır. p53'de meydana gelen fonksiyon bozuklukları sonucunda kanser hücreleri çoğalarak kanser hücre topluluklarını oluştururlar (Akgün ve ark., 2018).

Çalışmamızda tümör baskılayıcı gen olan p53 geninin ekspresyonuna baktık. Kontrole kıyasladığımız da HT-29 hücre hattında orlistat p53 gen ifadesi arttırmamış ama semaglutide p53 gen ekspresyon miktarını artırmıştır. HCT-116 hücre hattında kontrol ile kıyasladığımızda orlistat ve semaglutide p53 ekspresyon miktarını artırırken, HT-29 kolorektal kanser hücre hattı ve HCT-116 kolorektal kanser hücre hattını kıyasladığımızda HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında semaglutide uygulaması sonucunda p53 gen ifadesi daha azdır.

Genetik ve epigenetik değişiklikler kolorektal kanser görülen bireylerde sağ kalımını etkileyen ciddi bir hastalıktır. KRAS genini seçmemizin nedeni hücre sinyalizasyon sisteminde kilit görevi görmesi ve mutasyona uğradığı takdirde bireylerde sağ kalım oranını azaltan ve sık görülen mutasyon olmasıydı. KRAS gen mutasyonlarında görülen epigenetik değişikliğe bakıldığında obezitede kullanılan bu ilaçların KRAS gen ekspresyonuna etkisine baktık. HT-29 kolorektal kanser hücre hattında semaglutide KRAS ekspresyon miktarını artırırken, orlistat muamelesi ile KRAS gen ifadesi kontrol grubuna göre azalmıştır. HCT-116 hücre hattında orlistat ve semaglutide ile muamelesi sonucunda KRAS gen ifadesi kontrol grubuna göre azdır. İki farklı hücre hattını karşılaştırsak semaglutide ile muamele KRAS ekspresyon miktarını kontrol grubuna göre kıyasladığımızda HT-29 hücre hattında artarken HCT-116 hücre hattında anlamlı derecede azalmıştır.

Proinflamatuvar uyarılara karşı gen ekspresyonunu düzenlemede görev alan KRC, apoptoz, TNF sitokin gen aktivasyonunu sağlayarak nükleer faktör (NF), c-JUN NH2 terminal kinaz (JNK) /SAPK aracılı sinyal yolağını inhibe etmek için TRAF2 proteini ile etkileşime girmektedir (Oukka ve ark., 2002). Onkogen olan KRC geninin obezitede kullanılan ilaçlarla muamele edilen kolorektal kanser hücrelerinde ekspresyon miktarına baktık. HT-29 kolorektal kanser hücre hattında kontrole göre kıyasladığımızda orlistat ve semaglutide anlamlı şekilde gen ekspresyonunu artırmıştır.

HCT-116 hücre hattında kontrole göre gen ifade miktarını kıyasladığımızda orlistat ve semaglutide ilaçları KRC gen ifade miktarını artırmıştır. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücre hatları kıyasladığımızda HT-29 hücre hattına göre HCT-116 kolorektal kanser hücre hattı daha az gen ifadesi meydana gelmiştir.



6. KAYNAKLAR

- Akgün, Ş., Kucuksayan, H. ve Akca, H., 2018. Tümör Baskılayıcı Genler. Kanser Moleküler Biyolojisi, Baran, Y. Kısayol Yayıncılık, Türkiye, 151-160.
- Alani, A.W.G. and Robinson, J.R., 2008. Mechanistic understanding of oral drug absorption enhancement of cromolyn sodium by an amino acid derivative. *Pharmaceutical Research*, 25: 48-54.
- Albanes, D. and Taylor, P.R., 1990. International differences in body height and weight and their relationship to cancer incidence. *Nutr Cancer*, 14: 69-77.
- Allen, C.E. ve Wu, L.C., 2000. Downregulation of KRC induces proliferation, anchorage independence, and mitotic cell death in HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 260: 346–356.
- Almasan, A., Yin, Y., Kelly, R., Lee, E., Bradley, A., Li, W., Bertino, J. and Wahl, G., 1995. Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(12), 5436–40.
- Anonim, 2002. IARC Kanser Önleme El Kitapları. Kilo Kontrolü ve Fiziksel Aktivite. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı: Lyon.
- Anonim, 2004. ENCODE Project Consortium. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science*, 306(5696), 636–40.
- Anonim, 2015. Fazla kilo ve obezite. CDC, <https://www.cdc.gov/obesity/adult/defining> (02,12,2021).
- Anonim, 2015a. Küresel Hastalık Yüğü Çalışması. Obezite ve aşırı kilo prevalansı 1980-2015.
- Aoki, K. and Taketo, M.M., 2007. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci*, 120(19), 3327–3335.
- Arguelles, A.O., Meruvu, S., Bowman, J.D. and Choudhury, M., 2016. Are epigenetic drugs for diabetes and obesity at our door step?, *Drug Discov Today*. 21(3), 499-509.
- Aronne, L.J., Nelinson, D.S. and Lillo, J.L., 2009. Obesity as a disease state: A new paradigm for diagnosis and treatment. *Clinical Cornerstone*, 9(4), 9-29.
- Blundell, J., Finlayson, G., Axelsen, M., Flint, A., Gibbons, C., Kvist, T. and Hjerpsted, J.B., 2017. Effects of once-weekly semaglutide on appetite, energy intake, control of eating, food preference and body weight in subjects with obesity. *Diabetes Obes Metab*, 19(9), 1242-1251.

- Bos, J.L. and van Kreijl, C.F., 1992. In: Vainio, H., Magee, P.N., McGregor, D.B. and McMichael, A.J. Eds. *Genes and Gene Products that Regulate Proliferation and Differentiation: Critical Targets in Carcinogenesis. Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*. Lyon: International Agency for Research of Cancer. 57–65.
- Boyle, P. and Leon, M., 2002. Epidemiology of colorectal cancer. Division of Epidemiology and Biostatistics, European Institute of Oncology, Milan, Italy. *British Medical Bulletin*, 64.
- Bumbaca, B. and Li, W., 2018. Taxane resistance in castration-resistant prostate cancer: mechanism and therapeutic strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(4), 518-529.
- Buteau, J., El-Assaad, W., Rhodes, C.J., Rosenberg, L., Joly, E. and Prentki, M., 2004. Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipototoxicity. *Diabetologia*, 47: 806-815.
- Butterworth, B.E., Popp, J.A., Conolly, R.B. and Goldsworthy, T.L., 1992. Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis. In: Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichael AJ, eds. *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification* Lyon: International Agency for Research of Cancer, 279–305.
- Cabrera, S.M., Colvin, S.C., Tersey, S.A., Maier, B., Nadler, J.L. and Mirmira, R.G., 2013. Effects of combination therapy with dipeptidyl peptidase-IV and histone deacetylase inhibitors in the non-obese diabetic mouse model of type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol*, 172(3), 375-382.
- Calle, E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. and Thun, M.J., 2003. Overweight, obesity and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N.Engl. J. Med*, 348, 1625-1638.
- Calle, E.E. and Thun, M.J., 2004. Obesity and cancer. *Oncogene*, 23: 6365-6378.
- Chi-Ho M, Zilling L, Carl EA, Yilling L, Lai-Chu W. KRC transcripts: Identification of an unusual alternative splicing event. 1998.48:32-39.
- Christopher, B., Chi-Ho, M., Chack-Yung, Y. and Lai-Chu, W., 1991. Regulation by phosphorylation of the zinc finger protein KRC that binds the κ B motif and V(D)J recombination signal sequences. 643-648.
- Ciardiello, F. and Tortora, G., 2008. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*, 358:1160–1174.
- Davies, M., Pieber, T.R., Nielsen, M.L., Hansen, O.K., Jabbour, S. and Rosenstock, J., 2017. Effect of Oral Semaglutide Compared With Placebo and Subcutaneous Semaglutide on Glycemic Control in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized Clinical Trial. *Jama*, 318(15), 1460-1470.

- Devereux, T.R., Risinger, J.I. and Barrett, J.C., 1999. Mutations and altered expression of the human cancer genes: What they tell us about causes. IARC Scientific Publications, 146: 19-42.
- Dhillon, S., 2018. Semaglutide First Global Approval. *Drugs*, 78(2), 275-284.
- Dinu, D., Dobre, M., Panaitescu, E., Birla, R., Losif, C., Hoara, P., Caragui, A., Boeriu, M., Constantinoiu, S. and Ardeleanu, C., 2014. Prognostic significance of KRAS gene mutations in colorectal cancer - preliminary study. 7(4), 581-587.
- Dobbs, R. and Manyika, J., 2014. The Obesity Crisis. 44-57.
- Donath, M.Y. and Burcelin, R., 2013. GLP-1 Effects on Islets: Hormonal, Neuronal, or Paracrine? *Diabetes Care*, 36(2), 145-148.
- Edwards, B.K., Howe, H.L., Ries, L.A.G., Thun, M.J., Rosenberg, H.M., Yancik, R., Wingo, P.A., Jemal, A. and Feigal, E., 2002. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973–1999, featuring implications of age and aging on U.S. cancer burden. *Cancer*, 94(10), 2766–2792.
- Elenbaas, L., Spirio, F., Koerner, M.D., Fleming, D.B., Zimonjic, J.L., Donaher, N.C. and Popescu, W.C., 2001. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* 15: 50–65.
- Enstrom, J.E., 1975. Colorectal cancer and the consumption of beef and fat. *BrJ Cancer*, 32(4), 432-439.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P. and Parkin, D.M., 2000. *Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0*. IARC CancerBase No. 5. Lyon: IARC, 2001.
- Flint, A., Raben, A., Astrup, A. and Holst, J.J., 1998. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *JCI*, 101(3):515-520.
- Freedman, A.N., Michalek, A.M., Marshall, J.R., Mettlin C.J., Petrelli, N.J., Black, J.D., Zhang, Z.F., Satchidanand, S. and Asirwatham, J.E., 1996. Familial and nutritional risk factors for p53 overexpression in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5(4), 285–291.
- Futreal, P.A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J.C., Wooster, R. and Stratton, M., 2001. Cancer and genomics. *Nature*, 6822: 850-852.
- Giovannucci, E., 2001. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 10: 725–731.
- Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E.B., Colditz, G.A., Stampfer, M.J. and Willett, W.C., 1995. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med*, 122: 327-34.

- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A. and Willett, W.C., 1997. Height, body weight, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 6: 557-563.
- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Ascherio, A., Kearney, J. and Willett, W.C., 1994. A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in U.S. Men. *J Natl Cancer Inst*, 86(3), 183–191.
- Graziani, A., Gramaglia, D., Zonca, D.P. and Comoglio, P.M. 1993. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates the Ras-guanine nucleotide exchanger. *J Biol Chem*. 268(13), 9165–9168.
- Gülcan, E. ve Özkan, A., 2006. Obezite. *Dumlupınar Üniv Fen Bilimleri Enst Derg*, 10: 185-194.
- Haenszel, W. and Kurihara, M., 1968. Studies of Japanese migrants I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst*, 40: 43–68.
- Hankey, W., Frankel, W.L. and Groden, J., 2018. Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Rev*, 37:159-172.
- Hanrahan, A.J., Schultz, N., Westfal, M.L., Sakr, R.A., Giri, D.D., Scarperi, S., Janakiraman, M., Olvera, N., Stevens, E.V., She, Q.B., Aghajanian, C., King, T.A., Stanchina E., Spriggs, D.R., Heguy, A., Taylor, B.S., Sander, C., Rosen, N., Levine, D.A. and Solit, D.B., 2012. Genomic complexity and AKT dependence in serous ovarian cancer. *Cancer Discov*, 2(1), 56–67.
- Heynick, L.N., Johnston, S.A. and Mason, P.A., 2003. Radio Frequency Electromagnetic Fields: Cancer, Mutagenesis, and Genotoxicity. *Bioelectromagnetics S6*: 74-100. Higginson J. Etiological factors in gastrointestinal cancer in man. *JNCI* 1966; 37: 527-545.
- Hicar, M.D., Liu, Y., Allen, C.E. and Wu, L.C., 2001. Structure of the human zinc finger protein HIVEP3: molecular cloning, expression, exon-intron structure, and comparison with paralogous genes HIVEP1 and HIVEP2. *Genomics*, 71(1), 89–100.
- Hjelmsoe, I., Allen, C.E., Cohn, M.A., Tulchinsky, E.M. and Wu, L.C., 2000. The kappaB and V(D)J Recombination Signal Sequence Binding Protein KRC Regulates Transcription of the Mouse Metastasis-associated Gene S100A4/mts1. *J Biol Chem*, 275(2), 913-920.

- Howe, H.L., Wingo, P.A., Thun, M.J., Ries, L.A., Rosenberg, H.M., Feigal, E.G. and Edwards, B.K., 2001. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst*, 93(11), 824–842.
- Inbar-Feigenberg, M, Choufani, S., Butcher, D.T., Roifman, M. and Weksberg, R., 2013. Basic concepts of epigenetics. *Fertil steril*, 99(3), 607-615.
- Jain, Ş.Ş., Ramanand, S.J., Ramanan, J.B., Akat, P.B., Patwardhan, M.H. and Jossi, S.R., 2011. Evaluation of efficacy and safety of orlistat in obese patients. *Indian J Endocrinol Metab*, 15(2), 99-104.
- James, P.T., Leach, R., Kalamara, E. and Shayeghi, M., 2001. The Worldwide Obesity Epidemic. *Obesity Research*, 9(11), 2285-2335.
- Jancik, S., Drabek, J., Radzioch, D. and Hajduch, M., 2010. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol*, 2010:150960.
- Kapitza, C., Nosek, L., Jensen, L., Hartvig, H., Jensen, C.B. and Flint, A., 2015. Semaglutide, a once-weekly human GLP-1 analog, does not reduce the bioavailability of the combined oral contraceptive, ethinylestradiol/levonorgestrel. *J Clin Pharmacol*, 55(5), 497-504.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B. and Fornace, A.J., 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 71(4):587-597.
- Khan, S. and Jena, G.B., 2014. Protective role of sodium butyrate, a HDAC inhibitor on beta-cell proliferation, function and glucose homeostasis through modulation of p38/ERK MAPK and apoptotic pathways: study in juvenile diabetic rat *Chem. Biol. Interact*, 213: 1-12.
- Kieffer, T.J. and Habener, J.F., 1999. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev*, 20(6), 876- 913.
- Labazi, M. and Phillips, A.C., 2003. Oncogenes as regulators of apoptosis. *Essays Biochem*. 39: 89-104.
- Laird, P.W., 2003. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer*, 3:253–266.
- Lau, J., Bloch, P., Schaffer, L., Pettersson, I., Spetzler, J., Kofoed, J., Madsen, K., Knudsen, L.B., McGuire, J., Steensgaard, D.B., Strauss, H.M., Gram, D.X., Knudsen, S.M., Nielsen, F.S., Thygesen, P., Runge, S.R. and Kruse, T., 2015. Discovery of the once weekly glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue semaglutide. *J Med Chem*, 58(18), 7370-7380.

- Le R.D., 1997. Insulin-like growth factors. *N Engl Med*, 336: 663-640.
- Lee, I.M., Paffenbarger, R.S. and Hsieh, C., 1991. Physical activity and risk of developing colorectal cancer among college alumni. *JNCI*, 83(18), 1324-1329.
- Lievre, A., Bachet, J.B., Corre, D.L., Boige, V., Landi, B., Emile, J., Cote J., Tomasic, G., Penna, C., Ducreux, M., Rougier, P., Llorca, F.P. and Puig, P.L., 2006. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*, 66(8), 3992–3995.
- Lorca, V. and Garre, P., 2019. Current status of the genetic susceptibility in attenuated adenomatous polyposis. *World J Gastrointest Oncol*, 11(12), 1101- 1114.
- Macdonald, N.D., Salvesen, H.B., Ryan, A., Stefansson, I., Iversen, O.E., Akslen, L.A., Das, S. and Jacobs, I.J., 2004. Molecular differences between RER+ and RER- sporadic endometrial carcinomas in a large population- based series. *Int J Gynecol Cancer*, 14(5), 957–65.
- Malumbres, M. and Barbacid, M., 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*, 3: 459–465.
- Manousos, O., Day, N.E. and Trichopoulos, D., 1983. Diet and colorectal cancer. A case-control study in Greece. *IntJ Cancer*, 32: 1-5.
- Marbury, T.C., Flint, A., Jacobsen, J.B., Karsbol, J.D. and Lasseter, K., 2014. Pharmacokinetics and Tolerability of a Single Dose of Semaglutide, a Human Glucagon-Like Peptide-1 Analog, in Subjects With and Without Renal Impairment. *Controlled Clinical Trial*, 56(11), 1381-1390.
- Mathers, J.C., 2007. Early Nutrition: impact on epigenetics. *Nutrigenomics- Opportunities in Asia*. Forum Nutr. Basel, Karger, 60: 42-48.
- Maunakea, A.K., Chepelev, I. and Zhao, K., 2010. Epigenome mapping in normal and disease States. *Circ Res*, 107:327–39.13.
- McKeown-Eyssen, G. and Bright-See, E., 1982. Relationship between colon cancer mortality and fibre consumption: An international study (Abstract). In: Wallace G, Bell L, eds. *Fibre in Human and Animal Nutrition*. Proceedings of a Symposium, New Zealand, Wellington, New Zealand: Royal Society of New Zealand, 1983: 35.
- Mei, D. and Xin, W., 2017. Antagonism between Hedgehog and Wnt signaling pathways regulates tumorigenicity. 6327-3333.
- Meirer, J.J., 2012. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 8(12), 728-742.

- Meloni, A.R., Deyoung, M.B., Lowe, C. and Parkes, D.G., 2012. GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic β -cells: mechanism and glucose dependence. *Diabetes Obes Metab*, 15(1), 15-27.
- Ng, C., Li, H. and Wu, W.K.K., 2019. Genomics and metagenomics of colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*, 10(6), 1164- 1170.
- Nordisk, 2017a. Deri altı kullanım için OZEMPIC (semaglutid) enjeksiyonu: ABD reçete bilgileri. 2017. [HTtp://www.novo-pi.com/ozempic.pdf](http://www.novo-pi.com/ozempic.pdf)
www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209637lbl.pdf. 2017'ye erişildi.
- Nordisk, 2017b. Novo Nordisk, faz 2 denemesinde [medya yayını] semaglutid alan obezitesi olan kişilerde %13,8'e varan kilo kaybı bildirmiştir. 23 Haziran 2017.
- Ogden, C.L., Flegal, K.M, Carroll, M.D. and Johnson, C.L., 2002. Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000. *Jama*, 288(14), 1728-1732.
- Orford, K., Crockett, C., Jensen, J.P., Weissman, A.M. and Byers, S.W., 1997. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem*, 272(40), 24735-24738.
- Ostergaard, L., Frandsen, C.S. and Madsbad, S., 2016. Treatment potential of the GLP-1 receptor agonists in type 2 diabetes mellitus: a review. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 9(2), 241-265.
- Otani, J., Nankumo, T., Arita, K., Inamoto, S., Ariyoshi, M. and Shirakawa, M., 2009. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. *EMBO Rep*, 10:1235–41.10.
- Oukka, M., Kim, S.T., Lugo, G., Sun, J., Wu, L.C., and Glimcher, L.H., 2002. A mammalian homologue of *Drosophila schnurri*, KRC, regulates TNF receptor-driven responses and interacts with TRAF2. *Mol. Cell*, 9:121–131.
- Parkin, D.M., Muir, C.S., Whelan, S.L., et al. 1992. *Cancer Incidence in Five Continents. Vol 6*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, IARC Sci. Pub. No. 120.
- Pediconi, N., Ianari, A., Costanzo, A., Belloni, L., Gallo, R., 2003. Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*, 6:552-8.
- Peipens, L.A., and Sandler, R.S., 1994. Epidemiology of colorectal adenomas. *Epidemiol Rev*, 16: 273–97.

- Pingyu, L., Yijun, W. and Xin, L., 2019. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *9(5)*,871-879.
- Potter, J.D. and McMichael, A.J., 1986. Diet and cancer of the colon and rectum: A case-control study. *JNCl*, 76(4), 557- 569.
- Raun, K, Fels JJ, Rosenquist C, et al. Haftada bir glukagon benzeri peptit 1 (GLP-1) analogu olan Semaglutid, vücut ağırlığını azaltır ve diyete bağlı obez sıçanlarda daha sağlıklı bir gıda seçimini destekler. Şeker hastalığı. 2015;64(Ek 1):A293.
- Salvesen, H.B., MacDonald, N., Ryan, A., Jacobs, I.J., Lynch, E.D., Akslen, L.A. and Das, S., 2001. PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Int J Cancer*, 91(1), 22–6.
- Schubbert, S., Shannon, K. and Bollag, G., 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and .cancer. *Cancer*, 7(4), 295–308.
- Secher, A., Jelsing, J., Baquero, A.F., Hecksher-Sorensen, J., Cowley, M.A., Dalboge, L.S., Hansen, G., Grove, K.L., Pyke, C., Raun, K., Schaffer, L., Tang-Christensen, M., Verma, S., Witgen, B.M., Vrang, N. and Knudsen, L.B., 2014. The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss. *J Clin Invest*, 124(10), 4473-4488.
- Seidell, J., 2003. Obezite Araştırmalarında İlerleme. Medeiros- Neto, G., Halpern, A. and Bouchard, C., John Libbey and Company, Londra, s.571-578
- Siber, E., 2012. Teknikten Endikasyona Tüm Yönleri ile KRAS Mutasyon Analizi. 10-109.
- Sieber, O.M., Segditsas, S., Knudsen, A.L., Zhang, J., Luz, J., Rowan, A.J., Spain, S.L., Thirlwell, C., Howarth, K.M., Jaeger, E.E.M., Robinson, J., Volikos, E., Silver, A., Kelly, G., Aretz, S., Frayling, I., Hutter, P., Dunlop, M., Guenther, T., Neale, K., Phillips, K. and Tomlinson, I.P.M., 2006. Disease severity and genetic pathways in attenuated familial adenomatous polyposis vary greatly but depend on the site of the germline mutation. *Gut*, 55(10), 1440- 1448.
- Simar, D., Versteyhe, S., Donkin, I., Liu, J., Hesson, L., Nylander, V., Fossum, A. and Barres, R., 2014. DNA methylation is altered in B and NK lymphocytes in obese and type 2 diabetic human. *Metabolism*, 63(9), 1188-1197.
- Sisley, S., Gutierrez-Aguilar, R., Scott, M., D'Alessio D.A., Sandoval, D.A. and Seeley, R.J., 2014. Neuronal GLP1R mediates liraglutide's anorectic but not glucose-lowering effect. *J Clin Invest*, 124(6) 2456-2463.
- Slattery, M.L. and Potter, J.D., 2002. Physical activity and colon cancer: confounding or interaction. *Med Sci Sports Exerc*, 34(6), 913–919.

- Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W., 1998. Mutational analysis of the APC/B-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58(6), 1130-1134.
- Stoffel, E.M., Mangu, P.B., Gruber, S.B., Hamilton, S.R., Kalady, M.F., Lau, M.W.Y., Lu, K.H., Roach, N. and Limburg, P.J., 2015. Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J Clin Oncol*, 33(2), 209-217.
- Şenyüz, C., Reis, R. and Sipahi, H., 2019. Geçmişten Günümüze Obezite Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve İstenmeyen Etkileri. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 8(1), 61-75.
- Tanakol, R., 2003. Orlistat in obesity treatment. *Türk J Endocrinol Metab*, 2: 87-97.
- Toledo, F. and Wahl, G.M., 2006. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*, 6(12), 909-923.
- Tran, K.L., Park, Y.I., Pandya, S., Muliyl, N.J., Jensen, B.D., Huynh, K. and Nguyen, Q.T., 2017. Overview of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists for the Treatment of Patients with Type 2 Diabetes. *Am Healty Drug Benefits*, 10(4), 178-188.
- Utsunomiya, J. and Lynch, H.T., 1990. *Hereditary Colorectal Cancer*. New York, NY (USA): Springer-Verlag.
- Van Bloemendaal, L., IJzerman, R.G., Ten Kulve, J.S., Barkhof, F., Kondrad, R.J., Drent, M.L., Veltmen, D.J. and Diamant, M., 2014. GLP-1 Receptor Activation Modulates Appetite- and Reward-Related Brain Areas in Humans. *Diabetes*, 63(12), 4186–4196.
- Vilsbøll, T., Christensen, M., Junker, A.E., Knop, F.K. and Gluud, L.L., 2012. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on weight loss: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ*, 344(7841):d7771.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M. and Bos, J.L., 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl J. Med*, 319(9), 525-532.
- Wagner, P.L., Stiedl, A-C., Wilbertz, T., Petersen, K., Scheble, V., Menon, R., Reischl, M., Mikut, R., Rubin, M.A., Fend, F., Moch, H., Soltermann, A., Weder, W., Altorki, N.K. and Perner, S., 2011. Frequency and clinicopathologic correlates of KRAS amplification in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, 74(1), 118–123.
- Waterland, R.A. and Michels, K.B., 2007. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu Rev Nutr*, 27: 363–88.

- Willet W.C., 1998. Nutritional Epidemiology. Willett, W.C., (ed). Oxford University Press: New York.
- Willett, W.C., Stampfer M.J., Colditz, G.A., Rosner, B.A. and Speizer, F.E., 1990. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med*, 323(24), 1664–72.
- Woods, S.C., Seeley R.J., Porte, D.J. and Schwartz M.W., 1998. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, 280(5368), 1378-1383.
- Xiao, D., Shi, D., Yang, D., Barthel, B., Koch, T.H. and Yan, B., 2012. Carboxylesterase-2 is a highly sensitive target of the antiobesity agent orlistat with profound implications in the activation of anticancer prodrugs. *Biochem Pharmacol*, 85(3):439-47.
- Yang, J., Ledaki, I., Turley, H., Gatter, K.C., Montero, J.C., Li, J.L. and Harris, A.L., 2009. Role of hypoxia-inducible factors in epigenetic regulation via histone demethylases. *Ann N Y Acad Sci*, 1177:185–197.
- Yen, M. and Ewald, M.B., 2012. Toxicity of weight loss agents. *J Med Toxicol*, 8(2):145-52.
- Yokus, B., Akdag, M.Z., Dasdag, S., Cakir, D.U. and Kizil, M., 2008. Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields Cause Oxidative DNA Damage in Rats. *International Journal of Radiation Biology*, 8 (10), 789-795.
- Yokuş, B. and Çakır, D.Ü., 2002. İn vivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 22(5), 535- 543.
- Yokuş, B. and Çakır, D.Ü., 2012. Kanser biyokimyası. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1(2), 7-18.
- Zeiss, C.J., 2003. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol*, 40(5), 481-495.