



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**LADUVİGLUSİB'UN APOPTOTİK
HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİSİNDE
OTOFAJİNİN ROLÜNÜN HCT-116 VE
HT-29 HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ**

İREM ECE VAHAP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Ana Bilim Dalı
Moleküler Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

İSTANBUL, 2024



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**LADUVİGLUSİB'UN APOPTOTİK
HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİSİNDE
OTOFAJİNİN ROLÜNÜN HCT-116 VE
HT-29 HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ**

İREM ECE VAHAP

520121008

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

İSTANBUL, 2024

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR

Çalışmalarında ve tezimi tamamlama sürecimde yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a, desteğini ve bana olan güvenini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Filiz VARDAR'a, yüksek lisans sürecimde bana örnek olan, laboratuvar imkanlarını sunan ve akademik bilgilerini benimle paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Cenk SESAL'a ve ekibine, Prof. Dr. Yıldız AYDIN'a ve ekibine, Prof. Dr. Nagihan GÜLSOY ve ekibine,

Tez çalışmalarında laboratuvar imkanlarını sunan Gebze Teknik Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsüne ve değerli hocam Prof. Dr. Elif Damla ARISAN'a,

Yüksek lisans sürecimde beni yalnız bırakmayan ve yardımcı olan arkadaşlarım Merve SARIDAL, Gizem AY, Kübra KURT, Orçun TOKSÖZ ve Gamze KURTULUŞ'a,

Hayatımda olumlu ve olumsuz her türlü olayda yanımda olan, desteklerinden ve dostluklarından dolayı minnettar olduğum arkadaşlarım Burçin ÖZBEKLE ve Gizem KUĞU'ya,

Tezimde anmaktan mutluluk duyduğum ve varlığını her daim hissettiğim, başarılarıyla bana umut olan değerli Tuncay ALDATMAZ'a,

İlk günümünden beri yanımda olan, güvenini ve sevgisini esirgemeyen, kayb olduğum yollarda bana ışık tutan sevgili babam Muhsin VAHAP, annem Sabah VAHAP, kardeşlerim canlarım Kerem Ali VAHAP ve Cem Şahut VAHAP'a şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans çalışmalarında bursiyeri olduğum TÜBİTAK 2210/A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı'na sunduğu destek için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam Marmara Üniversitesi BAPKO birimi tarafından FYL-2022-10557 numaralı proje kapsamında desteklenmiş ve sözlü sunum bildirisi olarak 27 Ocak 2024 tarihinde 3. Ulusal Bilimsel Araştırmalar Kongresi'nde sunulmuştur.

Mart, 2024

İrem Ece VAHAP

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
SEMBOLLER	vii
KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
TABLO LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Kolorektal Kanser	3
1.1.1.Kolorektal Kanserin Epidemiyolojisi.....	5
1.1.2.Kolorektal Kanser ve Risk Faktörleri	7
1.2.Kolorektal Kanser Gelişiminde Sinyal Yolakları	10
1.2.1.EGFR/MAPK Sinyal Yolağı	11
1.2.2.NOTCH Sinyal Yolağı.....	12
1.2.3.PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı.....	13
1.2.4.WNT/ β -katenin Sinyal Yolağı	15
1.3.Kolorektal Kanser ve Tedavi Yaklaşımları.....	17
1.3.1.Kolorektal Kanserde Teşhis	18
1.3.2.Kolorektal Kanserde Tedaviler.....	19
1.4.Hücre Ölümü.....	20
1.4.1.Apoptoz	20
1.4.1.1.İçsel Apoptoz.....	21
1.4.1.2.Dışsal Apoptoz	21
1.4.2.Otofaji	22

1.4.3.Nekroz	24
1.5.Laduviglusib (CHIR-99021)	25
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
2.1. Materyal	29
2.1.1. Hücre Kültürü.....	29
2.1.2. Laboratuvar Ekipmanları ve Cihazları	30
2.2. Yöntem	33
2.2.1. Laduviglusib (CHIR-99021) Temin Edilmesi ve Ana Stok Hazırlanması..	33
2.2.2. Hücre Hatlarının Açılması.....	33
2.2.3. Hücre Hatlarının Dondurulması	34
2.2.4. Hücrelerin Pasajlanması.....	34
2.2.5. MTT- Bağlı Hücre Canlılığı Deneyi	34
2.2.6. <i>In Vitro</i> Hücre Sağkalım Deneyi	35
2.2.7. Koloni Oluşturma Potansiyeli Deneyi	35
2.2.8. Yara Kapanma Deneyi.....	36
2.2.9. Floresan Boyamaları	36
2.2.9.1. 3,3' Diheksiloksakarbosiyanin İyodür (DIOC6) Boyama.....	36
2.2.9.2. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama	37
2.2.9.3. Akridin Turuncusu (AO) Boyama	37
2.2.9.4. MitoTracker Red CMXRos Boyama.....	37
2.2.9.5. 2', 7'-Diklorodihidrofloresein Diasetat (CM-H2DCFDA) Boyama	38
2.2.10. Memeli Hücrelerinden Total Protein İzolasyonu	38
2.2.11. Bradford Protein Miktar Tayini	39
2.2.12. İmmünoiblotlama Yöntemi	39
2.2.12.1. SDS Poliakrilamid Jelin Hazırlanışı.....	39
2.2.12.2. Protein Örneklerinin Hazırlanması ve Jele Yüklenmesi	40

2.2.12.3. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi ve Bloklama.....	40
2.2.12.4. Membrana Antikor Uygulaması ve Görüntü Alma	41
2.2.13. İstatiksel Analiz	42
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	43
3.1. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 ve HCT-116 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Doza ve Zamana Bağlı Etkisinin Gösterilmesi	43
3.2. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 ve HCT-116 Kolorektal Kanseri Hücre Hatlarında <i>In Vitro</i> Hücre Sağkalımı Üzerine Zamana Bağlı Etkisinin Gösterilmesi	47
3.3. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 ve HCT-116 Kolorektal Kanseri Hücre Hatlarında Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisi.....	50
3.4. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 ve HCT-116 Kolorektal Kanseri Hücre Hatlarında Yara İyileştirme Aktivitesi Üzerine Etkisi	53
3.5. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 ve HCT-116 Kolorektal Kanseri Hücre Hatları Üzerinde Floresan Boyamaların Gösterilmesi	56
3.6. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 Kolorektal Kanseri Hücre Hatlarında Apoptotik ve Otofajik Ölüm Yolakları Üzerine Etkisinin İmmünoiblotlama ile Gösterilmesi.....	59
4. SONUÇLAR.....	67
KAYNAKLAR	71

ÖZET

LADUVİGLUSİB'UN APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİSİNDE OTOFAJİNİN ROLÜNÜN HCT-116 VE HT-29 HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

Kolorektal kanser, ölüm riski en yüksek kanser türleri arasında yer alır ve adenom kökenli karsinom özelliklerine sahip bir hastalıktır. Tanı ve tedavide kolonoskopik incelemeler ve cerrahi tercih edilmektedir; ancak tedavide direnç mekanizmalarının gelişme riski, kişiye özel yaklaşımların gerekliliğini artırmaktadır. Kolorektal kanserin moleküler mekanizması EGFR/MAPK, NOTCH, PI3K/AKT/mTOR ve WNT/ β -katenin sinyal yolları ile ilişkilidir ve bu sinyal yollarını hedefleyen ajanlar kanser hücrelerinin tedavisinde önemlidir. Glikojen sentez kinaz-3 (GSK-3), kolorektal kanser gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır. Bir GSK-3 inhibitörü olan Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanseri hücreleri üzerinde zamana ve doza bağlı etkisi ve apoptotik ölüm üzerine etkisinde otofajinin rolü henüz modellenmemiştir. Bu tez ile amacımız; Laduviglusib'in HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanseri hücre hatlarında zamana ve doza bağlı hücre canlılığı, proliferasyonu, bölünmesi, yara kapanma üzerine etkisi ve apoptotik ölüm üzerine etkisinin modellenmesinde otofajinin rolünün irdelenmesidir. Laduviglusib'in doza ve zamana bağlı hücre sağkalımı, hücre proliferasyonu ve koloni oluşumu üzerindeki etkisi MTT hücre canlılık testi, yara kapanma, sağkalım testi, floresan boyama ve immünoiblotlama deneyleriyle belirlenmiştir. Sonuçlar doğrultusunda 24 saat 15 μ M Laduviglusib uygulamasının hem HT-29 hem de HCT-116 hücrelerinde zaman ve doza bağlı hücre canlılığına, proliferasyonuna ve mitokondriyal membran potansiyeline ket vurduğu belirlenmiştir. HCT-116 kolorektal kanseri hücre üzerinde 24 saat 15 μ M Laduviglusib uygulamasının anti-apoptotik Bcl-2, Mcl-1 protein anlatımını ve pro-kaspaz-3, pro-kaspaz-9 anlatımını baskıladığı, PARP kesilimini artırarak apoptotik ölüme yönlendirdiği ve Beklin-1 anlatımı ve LC3-II kesilimi ile otofajik mekanizmayı indüklediği tespit edilmiştir. Özellikle 24 saat 15 μ M Laduviglusib uygulamasının HCT-116 hücrelerinde ilaca bağlı apoptotik etkiye otofajinin düzenlendiği tespit edilmiştir.

Mart, 2024

İrem Ece VAHAP

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ROLE OF AUTOPHAGY IN THE EFFECT OF LADUVIGLUSIB ON APOPTOTIC CELL DEATH IN HCT-116 AND HT-29 CELLS

Colorectal cancer is among the cancer types with the highest risk of death and is a disease with characteristics of adenoma-derived carcinoma. Colonoscopic examinations and surgery are preferred in diagnosis and treatment; however, the risk of developing resistance mechanisms in treatment increases the necessity of personalized approaches. The molecular mechanism of colorectal cancer is related to EGFR/MAPK, NOTCH, PI3K/AKT/mTOR and WNT/ β -catenin signaling pathways, and agents targeting these signaling pathways are important in the treatment of cancer cells. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) plays a critical role in the development of colorectal cancer. The time- and dose-dependent effect of Laduviglusib (CHIR-99021), GSK-3 inhibitor, on HCT-116 and HT-29 colorectal cancer cells and role of autophagy in its effect on apoptotic death has not yet been modeled. Our aim with this thesis; To examine the role of autophagy in modeling the effect of Laduviglusib in time and dose-dependent cell viability, proliferation, division, wound healing and apoptotic cell death in HCT-116 and HT-29 cells. The dose- and time-dependent effect of Laduviglusib on cell survival, cell proliferation and colony formation was determined by MTT cell viability test, wound healing assay, cell survival test, fluorescent staining and immunoblotting experiments. Results showed; 24-hour 15 μ M Laduviglusib application inhibited cell viability, proliferation and mitochondrial membrane potential in HT-29 and HCT-116 cells, depending on time- and dose-manner. Treatment of 15 μ M Laduviglusib on HCT-116 cells for 24 hours suppressed anti-apoptotic Bcl-2, Mcl-1 protein expression and pro-caspase-3, pro-caspase-9 expression, increased PARP cleavage and led to apoptotic death. It has been determined that it induces autophagic mechanism through Beclin-1 expression and LC3-II cleavage. It was determined that autophagy was regulated especially in the drug-induced apoptotic effect of 24-hour 15 μ M Laduviglusib treatment in resistant HCT-116 cells.

March, 2024

İrem Ece VAHAP

SEMBOLLER

%	: Yüzde
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
pH	: Potansiyel hidrojen
w/v	: Hacim / Ağırlık oranı

KISALTMALAR

5-FU	: 5-florourasil
AO	: Akridin Turuncusu
AMPK	: Adenosin monofosfat aktivasyonu ile protein kinaz
Apaf-1	: Proteaz aktive edici faktör-1
APC	: Adenomatöz polipozis koli
APS	: Amonyum persülfat
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATG	: Otofaji ile ilgili
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CIMP	: CpG adası metilatör fenotipi
CIN	: Kromozomal instabilite
c-PARP	: Kesilmiş PARP
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
dH₂O	: Distile su
DiOC₆	: 3, 3'-diheksiloksakarbosianin iyodür
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DR	: Ölüm reseptörü
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
EtOH	: Etil alkol

FAP	: Ailesel adenomatöz polipozis
FBS	: Fetal sığır serumu
FIP200	: FAK adezyon kinaz ailesiyle etkileşime giren protein kDa200
GLOBOCAN	: Global kanser istatistikleri veri tabanı
HNPCC	: Kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanseri
IBD	: İnflamatuar bağırsak hastalıkları
LV	: Lökoverin
MAPK	: Mitojen ile aktive edilen protein kinaz
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
MSI	: Mikrosatellit instabilitesi
mTOR	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
MTT	: Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür
NCID	: NOTCH hücre içi sitoplazmik alan
PARP	: Poli ADP-Riboz Polimeraz
PBS	: Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PI3K	: Fosfatidil-inositol 3-kinaz
PTEN	: Protein tirozin fosfataz ve tensin homologu
PVDF	: Polivinilidenflorit
RPM	: Dakikada devir sayısı
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TBS	: Tris tamponlu salin

TBS-T	: Tris tamponlu salin- Tween
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptörü
TP53	: Tümör protein 53
ULK1	: Unc-51 benzeri kinaz 1
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1. Kanserin ayırt edici özellikleri (Hanahan, 2022).	3
Şekil 1. 2. İnsan kolorektalinin anatomisi (Kuipers ve ark., 2015).	4
Şekil 1. 3. Kolorektal kanserin morfolojik gelişimi (Simon, 2016).	5
Şekil 1.4. Kolorektal kanserde 2020 yılında her iki cinsiyet ve her yaş için yaşa standardize edilmiş oranlar, Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı.	6
Şekil 1. 5. Kolorektal kanserde 2018 yılında her iki cinsiyet için yaşa standardize edilmiş oranlar ve dünyada ölüm oranları, Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı.	7
Şekil 1. 6. Kolorektal kanser ve risk faktörleri (Sawicki ve ark., 2021).	8
Şekil 1. 7. Kolorektal kanserde polip gelişiminde sinyal yolları (Kuipers ve ark., 2015).	10
Şekil 1. 8. Kolorektal kanserde EGFR/MAPK sinyal yolağı (Krasninskas, 2011).	12
Şekil 1. 9. Kolorektal kanserde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı (Koveitypour ve ark., 2019).	15
Şekil 1. 10. Kolorektal kanserde WNT sinyal yolağı (Koveitypour ve ark., 2019).	17
Şekil 1. 11. İçsel ve dışsal apoptotik ölümün genel şeması (Cavalcante ve ark., 2019).	22
Şekil 1. 12. Otofajinin moleküler mekanizması (Lee ve ark., 2019).	24
Şekil 1. 13. Nekroptozun moleküler mekanizması (Liu ve Jiao, 2019).	25
Şekil 1. 14. Laduviglusib (CHIR-99021)'in moleküler yapısı.	28
Şekil 2. 1. HT-29 (A) ve HCT-116 (B) kolorektal kanseri hücre hatlarının ışık mikroskobu görüntüleri.	33

Şekil 3. 1. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 hücre hattında hücre canlılığı üzerine doza ve zamana bağlı etkisinin gösterilmesi..	44
Şekil 3. 2. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 hücre hattında hücre canlılığı üzerine doza ve zamana bağlı etkisinin gösterilmesi.	45
Şekil 3. 3. HT-29 hücre hattında <i>in vitro</i> hücre sağkalım deneyi.	48
Şekil 3. 4. HCT-116 hücre hattında <i>in vitro</i> hücre sağkalım deneyi.....	49
Şekil 3. 5. HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarında koloni oluşumunun gösterilmesi.	51
Şekil 3. 6. HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarında koloni oluşturma potansiyeli deneyine bağlı olarak koloni sayısı grafiği.	51
Şekil 3. 7. HT-29 hücre hattında yara kapanma aktivitesinin gösterilmesi.	54
Şekil 3. 8. HCT-116 hücre hattında yara kapanma aktivitesinin gösterilmesi.	55
Şekil 3. 9. HT-29 ve HCT-116 hücre hattında hücre ölümü üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi.....	57
Şekil 3. 10. HCT-116 hücre hattında mitokondriyal aktivitenin floresan boyamalar ile gösterilmesi.....	58
Şekil 3. 11. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 hücrelerinde apoptotik sinyal yollarına etkisinin immünoiblotlama ile gösterilmesi.	60
Şekil 3. 12. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 hücrelerinde otofajik sinyal yollarına etkisinin immünoiblotlama ile gösterilmesi.	64

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Hücre hatları ve hücre kültürü sarf malzemeleri.....	29
Tablo 2.2. Kullanılan laboratuvar ekipmanları ve cihazları.....	30
Tablo 2.3. Kullanılan laboratuvar kimyasalları.....	31
Tablo 2.4. Poliakrilamid Jel İçerikleri (%4 ve %12).....	40
Tablo 2.5. Kemiluminesans Görüntüleme Tamponları (A ve B) İçerikleri.....	41



1. GİRİŞ

İnsanlık tarihi boyunca karşılaştığımız ve çağımızın en sık görülen hastalıklarından biri olan kanser, kontrolsüz bir şekilde büyüyen ve kendi doğal sınırları olmadan vücudun bölgelerine yayılabilmek yeteneği olan bir hastalıktır. Birçok çeşidi olan kanser türleri dünyada ve ülkemizde birçok araştırmacı tarafından incelenmektedir. Dünyada her yaşta ve her iki cinsiyette de ölüm riski en yüksek olan kanserlerin başında akciğer, göğüs, kolorektal ve prostat kanseri gelmektedir (Sung ve ark., 2021). Ölüm riski ile üçüncü sırada yer alan kolorektal kanser tanısı her yıl yaklaşık 2 milyon insana koyulmaktadır. Kolorektal kanser, kolon ve rektumda anormal şekilde hücre ve doku gelişim gösteren kanserdir ve yaygın olarak adenom kökenli olan bir adenokarsinom özelliği taşımaktadır (Korphaisarn ve ark., 2019). Kolorektal kanser yüksek heterojenliğe sahip ve spesifik belirtileri olan bir hastalıktır. Tanı ve tedavi sürecinde altın standart olarak kolonoskopi incelemesi ve cerrahi yöntemler ilk sıradadır. Çoklu direnç mekanizmaları geliştirme riski yüksek olan kolorektal kanserinde kombine tedavi yöntemleri hastaya ve hastalık seyrine göre değişiklik göstermektedir. Kolorektal kanser hücrelerinde kümülatif genetik ve epigenetik değişimlerin bir sonucu olarak gelişip ilerlediği fikri üzerine durulmaktadır; belirli mutasyonlar sürekli olarak meydana gelmekte ve hastalık seyrinin aşamalarında bulunmaktadır (Waldner ve Neurath, 2011). Ajduvan terapiler, cerrahi yöntemler, kemoterapi ve radyoterapi, genomik incelemeler ile P53, KRAS, NRAS, TP53, BRAF, EGFR, MH1, MH2, SMAD4 ve diğer genlere yönelik kombinasyon tedavileri kolorektal kanserinde sıklıkla kullanılmaktadır (Mármol ve ark., 2017). Laduviglusib (CHIR-99021), bir glikojen sentaz kinaz 3 α ve β (GSK-3 α/β) inhibitörü ve WNT/ β -katenin stimülatörü olan bir amino-pirimidin türevidir. Hücre ve doku gelişiminde özellikle embriyonik kök hücrelerde transformasyon, rejenerasyon, yeniden programlama çalışmalarında kullanılmaktadır (Li ve ark., 2009). Glikojen sentaz kinaz 3 β 'nin (GSK-3 β) bir substratı olan β -katenin, Kanonik WNT sinyal yolağının önemli bir bileşenidir. Bu nedenle bir GSK-3 β inhibitörü olan Laduviglusib (CHIR-99021) WNT yolağı araştırmaları için bilinen bir kimyasal biyolojik ajan olarak kullanılmaktadır (Law ve Zheng, 2022). Bunlara ek olarak GSK-3 β , Adenosin monofosfat aktivasyonu ile protein kinaz (AMPK)'ın negatif düzenleyicisidir ve otofaji aracılı hücre ölüm kontrolünde önemli bir bileşendir (Marchand ve ark., 2015). Laduviglusib (CHIR-99021)'in kanserle

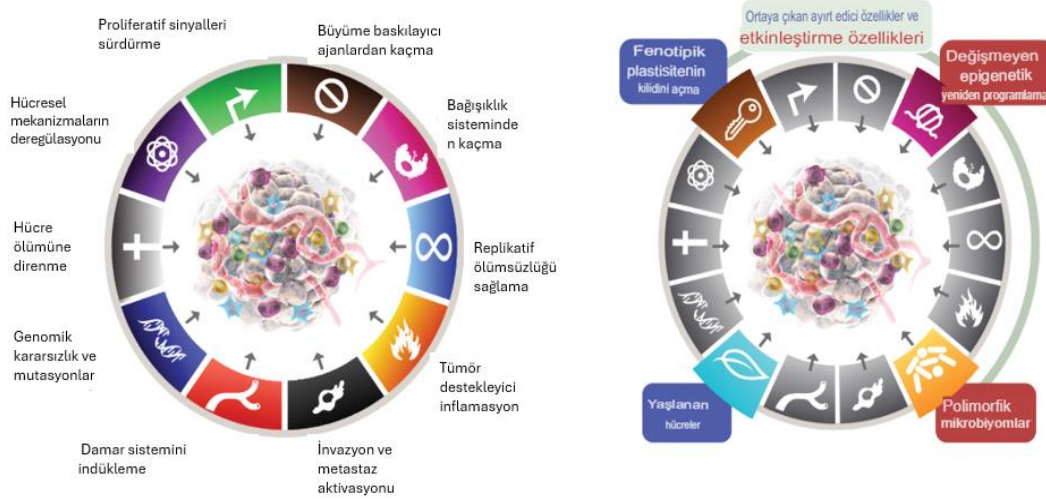
ilişkisi GSK-3 β inhibisyonuna dayanmaktadır. Kanser gelişiminde önemli rol oynayan GSK-3 β inhibisyonunun tümör gelişimini baskıladığı ortaya konulmuştur (Kingwell, 2018).

Bu tez çalışmasındaki amacımız; Laduviglusib (CHIR-00921)'in doza ve zamana bağlı HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanseri hücrelerinin canlılığı, bölünmesi, koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesini takiben, Laduviglusib (CHIR-99021)'e karşı dirençli HCT-116 kolon kanseri hücreleri üzerine ilaca bağlı apoptotik ölümün otofajik mekanizma göz önünde tutularak irdelenmesidir.



1.1. Kolorektal Kanser

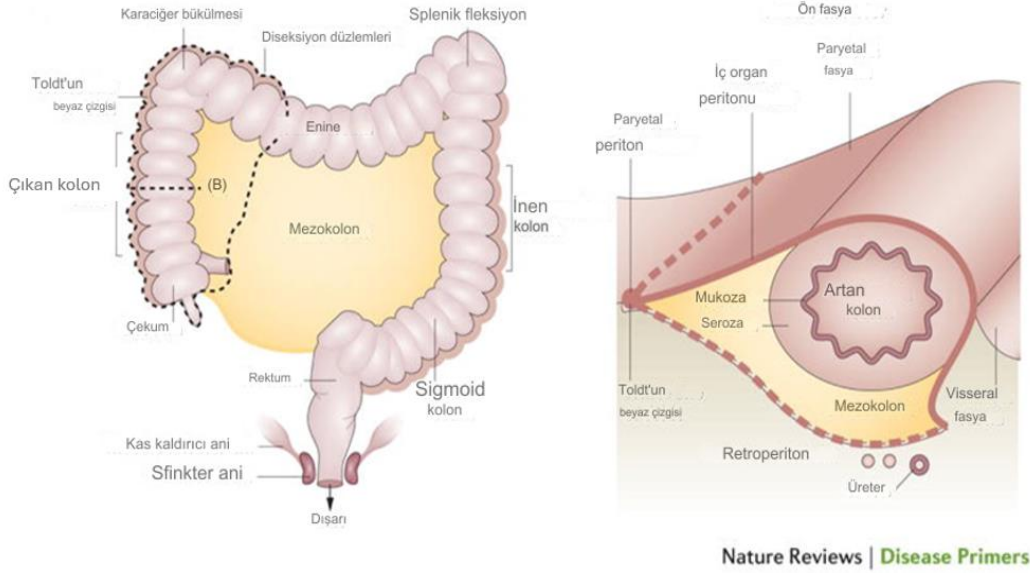
Kanser, vücuttaki herhangi bir dokuda veya organda kontrolsüzce bölünen ve gelişen hücrelerin neden olduğu bir hastalıktır. Oluştığı dokuya ve organa göre adlandırılan çeşitli kanser tipleri bulunmaktadır (Cox, 2021; Zhang ve ark., 2014). Dünya genelinde ve ülkemizde kanser, ölüm oranı en çok olan hastalıkların başında yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yürütülen geniş çaplı çalışmalar sonucunda kanser nedenli ölümler ilk sıralarda yerini almaktadır (Sung ve ark., 2021). Özellikle sağlıklı beslenme, sigara tüketimi, ailesel özgeçmiş ve diğer çevresel faktörler ile toplumlarda her iki cinsiyette de kanser görülme sıklığı artış göstermiştir. Bununla birlikte var olan tedavi yaklaşımlarına yeni terapötik tedavilerin de eklenmesi ile kanserlerin ölüm oranlarının düşürülmesi hedeflenmektedir (Dessale ve ark., 2022). Kanser hücrelerini özel kılan belirli karakteristik ayırt edici özellikleri vardır ve Cell dergisinde 2000 yılında bu ayırt edici özellikleri açıklayan Weinberg R. ve Hanahan D., sekiz biyolojik yetenek ile iki etkinleştirme yeteneği ortaya koymuştur (Hanahan ve Weinberg, 2000). Yapılan çalışmalarla güncellenen ayırt edici özellikler Şekil 1.1’de verilmiştir (Hanahan,2022).



Şekil 1. 1. Kanser ayırt edici özellikleri (Hanahan, 2022).

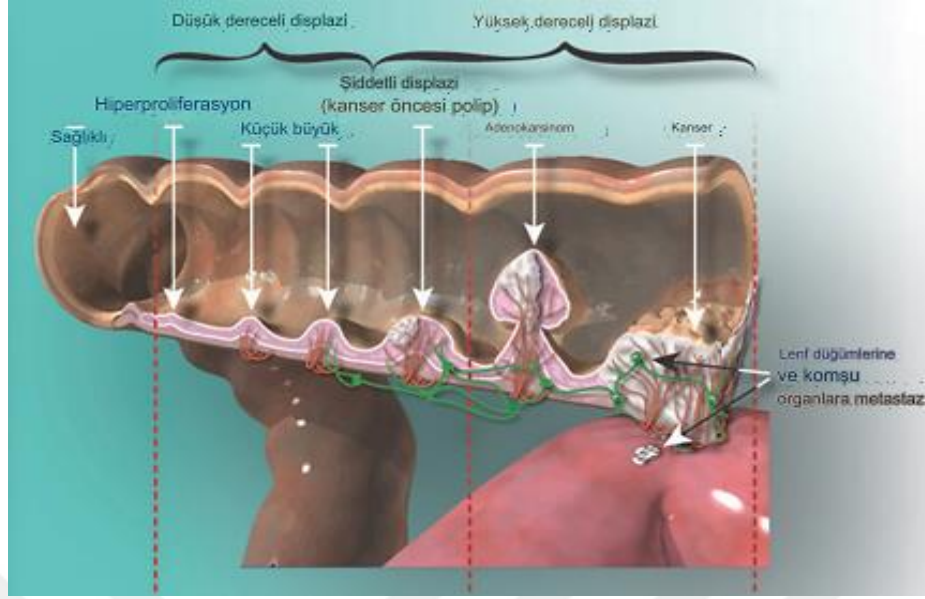
Sindirim sisteminde emilim ve boşaltımda görevli olan kalın bağırsağın üstündeki uzun kısmına ‘kolon’; altındaki kısa kısmına ise ‘rektum’ adı verilmektedir (Şekil 1.2) (Kuipers ve ark., 2015). Kolorektal kanser (KRK), kolon ve rektumda anormal ve kontrolsüz şekilde hücre ve doku gelişim gösteren kanserdir ve yaygın olarak adenom

kökenli olan bir adenokarsinom özelliği taşımaktadır (Korphaisarn ve ark., 2019). Adenomların üç özelliği, kansere dönüşme potansiyelini belirlemektedir: boyutsal olarak büyük, karsinom riski en yüksek kabul edilen villöz patoloji bulgusu, adenomda olan displazi (dokudaki öncül kanser hücresi derecesi varlığı) (O'Brien ve ark., 1990).



Şekil 1. 2. İnsan kolorektalinin anatomisi (Kuipers ve ark., 2015).

Çoğu kolorektal malignite, ‘polip’ adı verilen rektum veya kolonun iç astar dokusundaki anormal büyümeler olarak başlamakta ve zamanla kansere dönüşebilmektedir. Kolon tümörlerinin çoğu, bir dizi histolojik, morfolojik ve genetik değişikliğin bir sonucu olarak zamanla ortaya çıkmaktadır (Şekil 1.3) (Simon, 2016). Kolorektal kanserin ilerlemesinin çeşitli aşamalarının yanında histolojik, morfolojik ve genetik olarak değişiklikler de bulunmaktadır. Her yıl dünya genelinde yaklaşık 2 milyon yeni kolorektal kanser tanısı konulmaktadır ve en sık görülen üçüncü kanserdir. Kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir, kolorektal kanser ile en yüksek ölüm riski bulunan kanser türleri akciğer ve mide kanserleridir (Mármol ve ark., 2017).



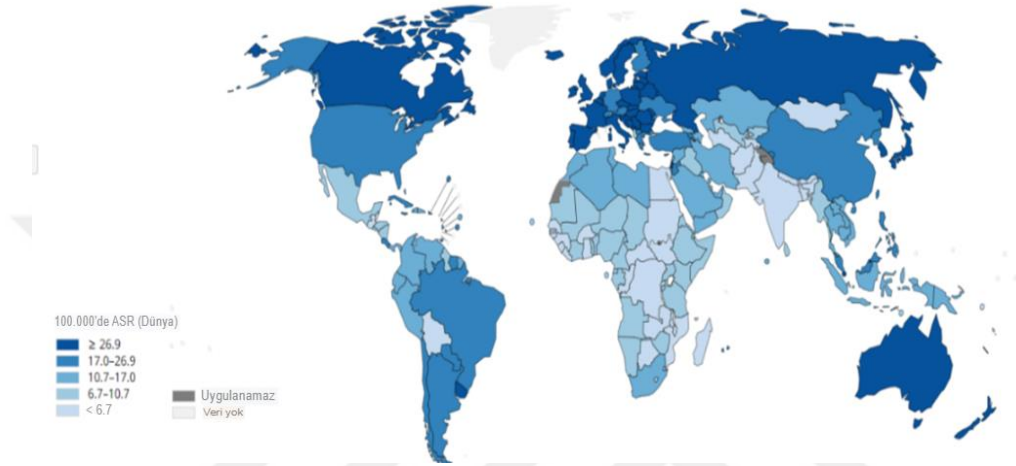
Şekil 1. 3. Kolorektal kanserin morfolojik gelişimi (Simon, 2016).

Kolorektal kanserde tedavi karmaşık bir şablona sahiptir; sağkalım oranı tanı koyulduğunda hastalık evresine göre farklılık göstermektedir, tipik olarak polipli kanserli hastalarda %90'dan metastatik hastalarda ise %14'e kadar sağkalım oranları değişebilmektedir. Kişiye yönelik ilaçların ve tedavilerin kullanılması, radyoterapi ve cerrahi yöntemler de dahil olmak üzere son yıllarda kaydedilen ilerlemelere göre sağkalım oranında artış gerçekleşmektedir (Freitas ve ark., 2023).

1.1.1. Kolorektal Kanserın Epidemiyolojisi

Kansere yakalanma olasılığı, nerede oluştuklarına, neden oluştuklarına ve ne kadar süredir var olduklarına göre farklılık göstermektedir. Dünya genelinde erkeklerde kadınlardan daha sık görülmekte olan kolorektal kanser, cinsiyet bazında kadınlarda en sık üçüncü, erkeklerde en sık ikinci sırada ortaya çıkmaktadır (Dekker ve ark., 2019). Gelişmiş ülkelerde görülme sıklığının daha yüksek olduğu bilinmektedir ve bunun nedeni olarak gelişmiş ülkelerde tarama programlarının ve kolonoskopi ile tanı koyulmasının artması gösterilmektedir (Dekker ve ark., 2019; Siegel, 2017). Yılda yaklaşık olarak 1.096.000 yeni kolon kanseri ve 704.000 yeni rektum kanseri vakasının ortaya çıkacağı öngörülmektedir. Kolorektal kanser açısından görülme sıklığı bazında en riskli ülkeler başlıca Güney Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda ve Kuzey Avrupa'dır. (Siegel ve ark., 2023; Bailey ve ark., 2015). Dönemsel veriler sonucunda her yıl toplam 1,8-2 milyon yeni

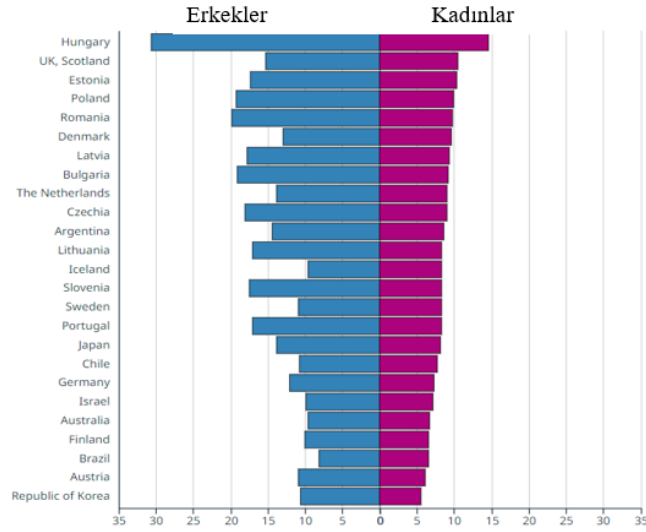
kolorektal kanser vakası ile karşılaşmaktadır. Her 100.000 Kolorektal kanser vakası başına yaşa standardize edilen insidans oranları, her iki cinsiyette de kadınlar için %19,7 ve erkekler için %23,6 olarak belirlenmiştir (Ravla ve ark., 2019). Dünya Sağlık Örgütü'ne bağlı Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından kolorektal kanserde her iki cinsiyet ve her yaş için 2020'de yaşa standardize edilmiş insidans oranları Şekil 1.4'te verilmiştir.



Şekil 1. 4. Kolorektal kanserde 2020 yılında her iki cinsiyet ve her yaş için yaşa standardize edilmiş oranlar, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (<https://gco.iarc.fr/en>).

Kolorektal kanser vakalarında hayatta kalma oranları çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bunlar kanserin bulunduğu evreyi, hastanın yaşını ve genel sağlık durumunu ve tedavi etkinliğini içerir. Evre I ve II'deki kolorektal kanser için 5 yıllık ortalama sağkalım yaklaşık olarak %90 oranındadır. Erken evrelerde hastaların yaklaşık %37'sine tanı konmaktadır. Kanserın çevre organlara veya dokulara ve ayrıca lokal lenf düğümlerine metastatik olarak ilerlediği durumlarda, 5 yıllık sağkalım oranı %73'e düşmektedir. Bu aşamada, hastaların yaklaşık %30'u tanı almaktadır (Bray ve ark., 2018). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından yapılan Kolorektal kanserde 2018 yılında her iki cinsiyet için yaşa standardize edilmiş oranlar ve dünyadaki ölüm oranları Şekil 1.5'te gösterilmiştir.

2018 yılına ait 100,000 kişi başına yaşa göre standardize edilmiş ölüm oranları, kadınlar ve erkekler
Kolorektum

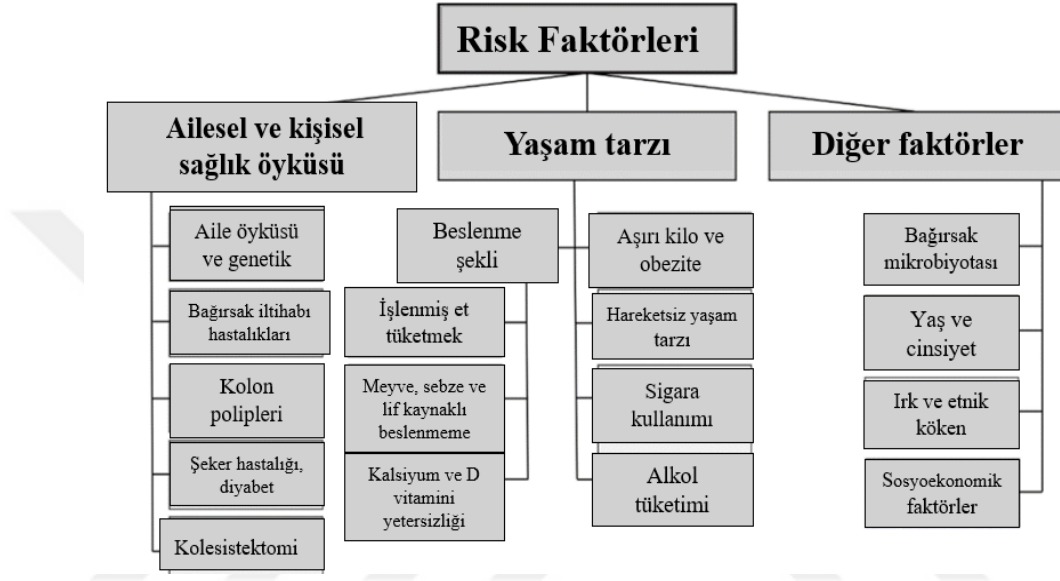


Şekil 1. 5. Kolorektal kanserde 2018 yılında her iki cinsiyet için yaşa standardize edilmiş oranlar ve dünyada ölüm oranları, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (<https://gco.iarc.fr/en>).

1.1.2. Kolorektal Kanser ve Risk Faktörleri

Risk faktörleri, bir hastalığa yakalanma ihtimalini artıran veya yakalanmaya eğilimli hale getiren etmenlerdir. Kolorektal kanserin risk faktörleri değiştirilebilir ve değiştirilemez olarak farklılık göstermektedir. Değiştirilemez risk faktörleri olarak ırk, diyabet, yaş, cinsiyet, kalıtsal mutasyonlar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları (IBD) örnektir (Rawla ve ark., 2018; Desautels ve ark., 2016). Kolorektal kanser çoğunlukla genetik ve çevresel faktörlerin kombinasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır ve kolorektal kanserlerin büyük çoğunluğu sporadiktir; hastaların yarısından fazlasında ailesel hastalık öyküsüne rastlanmamaktadır. Sporadik kolorektal kanserlerde, etkilenen bir aile üyesi bulunduğu takdirde kişide kanser gelişme risk artmaktadır ve bu durum kalıtsal genetik faktörlerden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla ailesinde kolorektal kanser öyküsü bulunan kişilerde hastalığa yakalanma riski %15 oranında artmaktadır (Kuipers ve ark., 2015; Dubeni ve ark., 2012). Birinci veya ikinci derece akrabalarda KRK sıklığı göz önünde bulundurulduğunda, yaklaşık %30'unun risk taşıyan bir genetik altyapıya sahip olabileceği tahmin edilmektedir. Kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser (HNPCC) örneği olan Lynch sendromu ile ailesel adenomatoz polipozis (FAP) kalıtsal kolorektal

kanserde en çok bilinen genetik hastalıklardır (Sawicki ve ark., 2021; Shussman ve Wexner, 2014). Genetik altyapısında DNA tamir mekanizması (MMR) genleri olan MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 genlerinde yaşanan mutasyonlar Lynch Sendromuna yol açmaktadır. Kalıtsal olarak değiştirilemez risk faktörleri olan bu otozomal baskın heterozigot genler, mutasyon sonucu germ hattında kalıtsal olarak aktarılmaktadır (Ismael ve ark., 2017) (Şekil 1.6).



Şekil 1. 6. Kolorektal kanser ve risk faktörleri (Sawicki ve ark., 2021).

Bunlarla beraber değiştirilebilir risk faktörleri arasında sağlıksız beslenme, hareketsizlik, kilo problemleri, sigara ve alkol kullanımı yer almaktadır. Özellikle obezite ve fiziksel hareketsizlik, kolon kanseri gelişimine ciddi oranda etki etmektedir. Düzenli yapılan fiziksel aktivite kolorektal kanser riskini % 25 azaltırken, hareketsiz bireylerin riskini % 50 kadar artırmaktadır. Ayrıca obezite ve sağlıksız beslenme tarzı bağırsak mikroflorasını değiştirmektedir, kalın bağırsak epitel dokusuna kalıcı zarar vermektedir ve dolayısıyla karsinogenezi desteklemektedir. Azami indeks üzeri vücut ağırlığı metabolik süreçleri bozmaktadır ve akabinde mutasyona sebep olan serbest oksijen radikallerinin salınımında artış meydana gelmektedir. Diyet, bakterilerle kolon ve rektum yapısındaki mikrobiyota sağlığına etki ettiği için kolorektal kanserin gelişimini de önemli derecede etkilemektedir (O'Keefe, 2016; Dahm ve ark., 2010).

Biyobelirteçler: Kolorektal kanser risk faktörleri arasında DNA hasarı sonucu ile ortaya çıkan genetik mutasyonlar da bulunmaktadır. Biyobelirteç olarak kabul edilen bu mutasyonların incelenmesi ile kolorektal kanser teşhislerinde önemli saptamalar sağlanmaktadır. Somatik olan kolorektal kanser hücrelerinde APC (Adenomatöz polipozis koli) (%81), TP53 (%60), KRAS (%43), PIK3CA (%18), SMAD4 (%10), NRAS (%9), CTNNB1 (-katenin) (%5) ve SOX9 (%4) genlerinde mutasyonlar bulunmaktadır. Bu belirtilen genler, kolorektal kanser gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmalarda ve yolaklarda yer almaktadır (Inamura, 2018; Koncina ve ark., 2019).

Moleküler biyobelirteçler, kolorektal kanseri anlamak ve araştırmak için önem taşımaktadır. Biyobelirteçler ile doğru teşhis, tedavi yanıtı ve nüksetme riski tahmin edilebilmekte ve kişiye özel terapötiklerde doğru yaklaşımlar oluşturulmaktadır. Kolorektal kanser biyobelirteçlerinde sıklıkla bulunan DNA'da genomik kararsızlık birikimi sonucu ortaya çıkan ayırt edici CIN, MSI ve CIMP mekanizmalarıdır (Inamura, 2018; Chang ve ark., 2017).

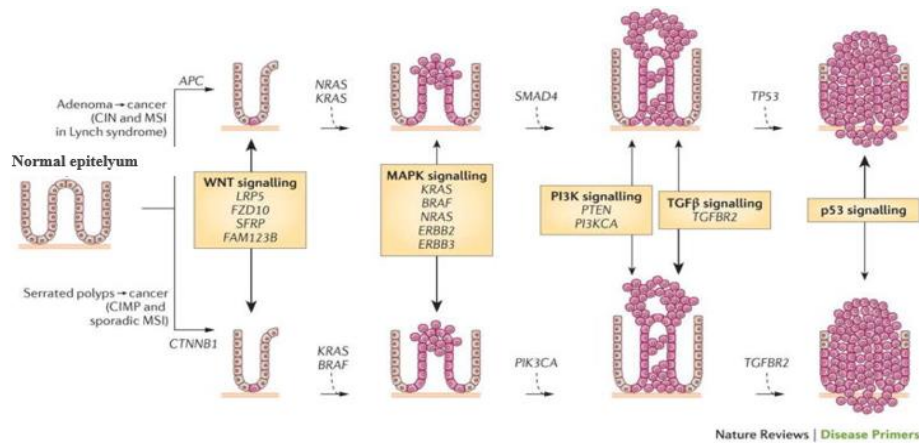
CIN (Kromozomal instabilite), kolorektal kanserlerde en yaygın bulunan mekanizmadır (>%75). Bunun nedeni, TP53 ve APC gibi tümör baskılayıcı genleri etkileyen kromozomal ayrışma, telomerde meydana gelen hasarlar ve DNA tamir mekanizmasındaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Pino ve Chung, 2010; Cancer Genome Atlas Network, 2012). P53 ve APC mutasyonlarındaki bozukluklar CIN ile bağlantılıdır ve kolorektal kanser gelişimini etkilemektedir (Phipps ve ark.,2015).

MSI (Mikro satelit instabilitesi), sporadik kolorektal kanserde CIN mekanizmasından sonra görülen yaygın bir mekanizmadır (%15-25). MSI, kolorektal hücrelerinde somatik mutasyonlara neden olmaktadır ve bu mutasyon birikimi, neo-antijen ekspresyonunun artmasına ve bir tümör inflamasyon yanıtı örneği olan tümör-infiltrasyon gibi hücrelerel olaylara yol açmaktadır (Boland ve ark.,1998; Gelsamino ve ark.,2016). Bunlara ek olarak DNA tamir mekanizma genleri olan MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 genlerinde yaşanan mutasyonlar, MSI için diagnostik belirteç görevi görmektedir (Salem ve ark., 2020).

Kolorektal kanserlerinde bulunan bir diğer ayırt edici mekanizma, **CIMP (CpG adası metilatör fenotipi)**'ye neden olan epigenetik bir kararsızlıktır. Gen sessizleşmesi ve protein üretimi eksikliği sonucu kansere bağlı genlerin promotörlerinin hipermetilasyonu ile CIMP-pozitif maligniteler görülmektedir. CIMP, APC mutasyonları ve WNT sinyal yolağının aktive olması ile negatif ilişki içerisinde. Yapılan bazı çalışmalarda adenom ve benzeri öncül tümörlerin CIMP-pozitif kolorektal kanserlere neden olduğu ortaya konmuştur (Jia ve ark., 2016).

1.2. Kolorektal Kanser Gelişiminde Sinyal Yolakları

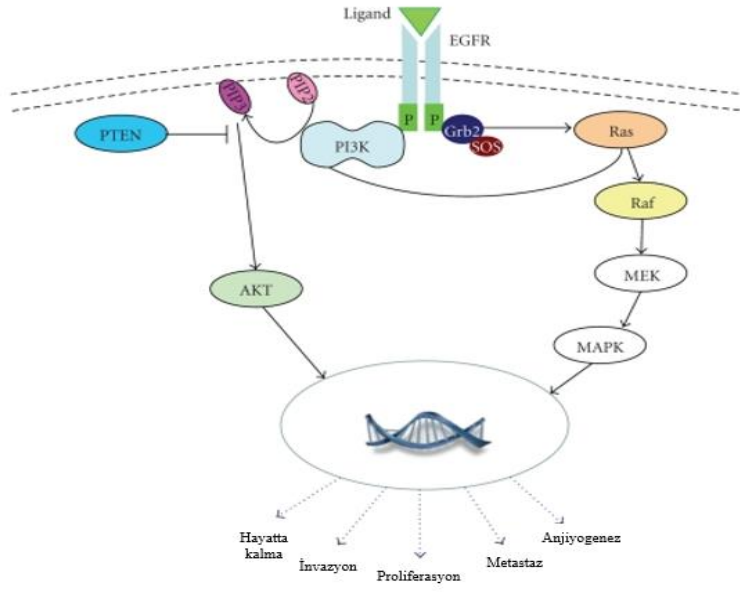
Kanserlerin gelişim mekanizmaları, kanserin ilerlemesi ile meydana gelen mutasyonları içeren karmaşık ve birçok aşamadan oluşan bir süreçtir (Fearon, 2011). KRK'nin, kanser hücrelerinde genetik ve epigenetik değişimlerin bir sonucu olarak geliştiği fikri üzerine durulmaktadır; belirli mutasyonlar sürekli olarak meydana gelmekte ve hastalık sürecinde görülmektedir (Waldner ve Neurath, 2011). Kolorektal kanser gelişiminde belli başlı bazı yolaklar ön plana çıkmaktadır. EGFR/MAPK, NOTCH, PI3K/AKT/mTOR ve WNT/ β -katenin sinyal yolakları, hücre bölünmesi, farklılaşması, anjiyogenez, programlı hücre ölümü ve benzeri biyolojik süreçleri düzenlemede görev almaktadır (Bertrand ve ark., 2012). Bu yolaklarda meydana gelen düzensizlikler ve mutasyonlar kolorektal kanser gelişiminde sıklıkla görülmektedir (Koveitypour ve ark., 2019). Kolorektal kanserde polip gelişiminde sinyal yolakları Şekil 1.7'de gösterilmiştir (Kuipers ve ark., 2015).



Şekil 1. 7. Kolorektal kanserde polip gelişiminde sinyal yolakları (Kuipers ve ark., 2015).

1.2.1. EGFR/MAPK Sinyal Yolağı

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), çeşitli organlardaki gliomaları ve karsinomları etkileyen, kanserin ilerlemesinde önemli rolü olan bir sinyal yolağıdır. Akciğer, kolorektal, pankreas, meme, yumurtalık, karaciğer ve diğer karsinomların çoğunun EGFR'yi eksprese ettiği bilinmektedir (Citri ve Yarden, 2006). EGFR de dahil olmak üzere hücre membranındaki reseptörlerin çoğu 'ErbB' ailesine aittir. Bu ailedeki diğer reseptörler HER2/c-neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3) ve Her4(ErbB-4)'tür. Bu membran reseptörleri, hücre dışı bir ligand bağlama bölgesine, membranı kapsayan alana ve bir sitoplazmik tirozin-kinaz bölgesine sahiptir. Ayrıca bu reseptörlerin otofosforilasyonu çeşitli sinyal iletim yollarını aktive etmede görev almaktadır (Şekil1.8) (Krasinskas, 2011). Birden fazla ligand ve ErbB ailesinin üyeleri arasındaki sinyalleşmeyi içeren bir sistem olan EGFR sinyal yolağı, kolorektal kanseri gelişimi ve ilerlemesinde kritik öneme sahiptir. Bu sistem bozulduğunda malign dönüşüm ve metastaz gerçekleşebilmektedir. Hücre büyümesini ve farklılaşmasını, hücre ölümünü ve hayatta kalmasını düzenleyen Ras/Raf sinyal yolağıyla da bağlantılıdır. Hem Ras hem Raf, hücre homeostazisinin düzenlenmesinde rol oynayan EGFR/MAPK yolağının sinyal akış şemasında yer almaktadır. Ras/Raf mutasyonları ve Her2 somatik mutasyonları, kolorektal kanser vakalarında yüksek oranda bulunmaktadır ve tedavi süreçlerinde hedeflenmektedir (Nandan ve Yang, 2011). Malign transformasyon ilerlemesinde hücre proliferasyonu artışı, anjiyogenez, anti-apoptotik protein ekspresyonunu ve metastazı içeren EGFR/MAPK sinyal yolağındaki düzensizlikler sonucu ortaya çıkmaktadır. Yolağın anormal ifadesi, Kolorektal kanser tedavisi için bir hedef olarak tanımlanmıştır (Krasinskas, 2011; Spano ve ark., 2005).



Şekil 1. 8. Kolorektal kanserde EGFR/MAPK sinyal yolağı (Krasinskas, 2011).

1.2.2. NOTCH Sinyal Yolağı

NOTCH sinyal yolağı, hücrenin kaderinin belirlenmesinde; hücre gelişimi, farklılaşması, çoğalması ve apoptozda yer alan önemli bir hücresel yolaktır. Aynı zamanda kanserde, kanser kök hücrelerinin rejenerasyonunu, farklılaşmasını ve hücre ölümünü kontrol eden terapötik bir hedeftir. Hem tümör süpresör hem onkogenik Sinyal yolağı, sinyal alan ligandlar olan Jagged-1, Jagged-2, Delta, Delta-3 ile p21, Hes-1 ve Deltex gibi birkaç hedef genden oluşmaktadır (Previs ve ark., 2015). Hedef olan hücre NOTCH reseptörlerine bağlandığı zaman NOTCH sinyali, γ -sekretaz protein kompleksinin aktive edilmesi ve NOTCH reseptörlerinin ayrılmasıyla aktive edilmektedir. Bu adım, NOTCH'un aktif formu olan NICD (NOTCH hücre içi sitoplazmik alan)'nin üretilmesi için gereklidir (Tagami ve ark., 2008). NOTCH sinyal yolağı kolorektal goblet hücrelerinin ve öncül kök hücrelerin farklılaşmasını kontrol etmektedir, bu kontrol mekanizması ile kolorektal gelişimine ve homeostazisini korumaya katkı sağlamaktadır (Jensen ve ark., 2000). Kolorektal kanserde NOTCH'un en iyi karakterize edilmiş hedefi, özellikle bağırsaktaki Hes-1 (hairy/enhancer of split) gen ailesidir. İleri evredeki kolorektal kanserlerinde, NOTCH-1 ve onun hedef geni olan Hes-1'in erken evredeki tümörlere göre daha yüksek seviyelerde ekspresyonu olmaktadır. NOTCH-1 sinyalleşmesinin son zamanlarda kolorektal kanserde önemli

olduğu Tiwari ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı bir çalışma ile gösterilmiştir. Çalışma sonucunda NOTCH ligandlarının, NOTCH reseptörlerinin 1-4 ve bazı NOTCH sinyal yolağının aşağı akış hedeflerinin (Hes-1, Deltex ve NICD) kolorektal kanser hücrelerinde aşırı eksprese edildiği ortaya konmuştur (Tiwari ve ark., 2018).

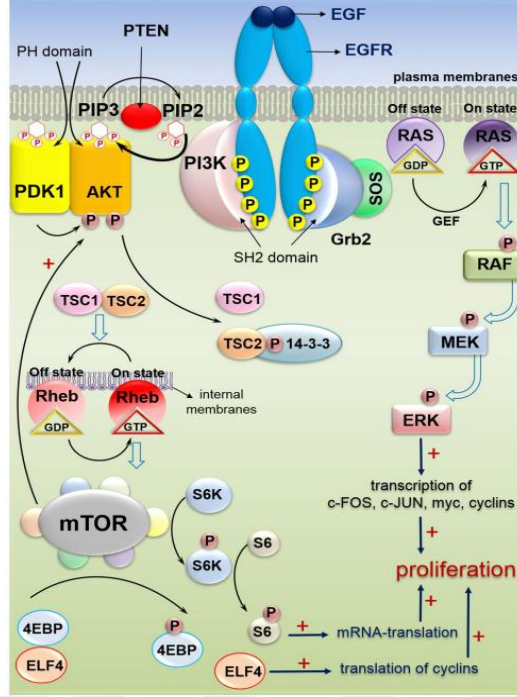
1.2.3. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı

PI3K (Fosfatidil-inositol 3-kinaz), hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve göçü gibi çeşitli hücrel aktivitelere sorumlu olan hücre içi sinyal yollarından biridir. PI3K, onkogeneze ve kanser ilerlemesi, metastaz gibi çeşitli hücrel olaylarda yer almaktadır. Fonksiyonel görevlerine göre PI3K'ler farklı sınıflara ayrılmaktadır. Sınıf IA, insanlarda bulunan kanserlerde en çok görülen türdür. Bu sınıf, iki alt birim içeren heterodimerik proteinlerdir: bir düzenleyici (p85) ve bir katalitik (p110) alt birim (Koveitypour ve ark., 2019). Sınıf IA PI3K'ler insan kanser mekanizmalarının çoğunda yer almaktadır. PIK3CA p110 α 'yı, PIK3CB p110 β 'yı ve PIK3CD p110 γ 'yı kodlamaktadır (Zhang ve ark., 2011).

p85, RTK fosfotirozin kalıntılarına bağlanarak p110 üzerindeki inhibisyonunu ortadan kaldırır ve PI3K aktivasyonunu indüklemektedir. PI3K, PIP2'yi fosforillemektedir ve AKT'yi aktive ederek hücre çoğalmasını ve hayatta kalmasını destekleyen PIP3'ü oluşturmaktadır. AKT, mTOR gibi aşağı yöndeki hedefleri düzenleyerek anjiyogenezi, protein transkripsiyonunu, translasyonu ve hücrel moleküler metabolizmalarında yer almaktadır. PI3K sinyal yolağında kilit rolü olan bir diğer molekül ise AKT'dir. Bir serin/treonin protein kinaz olan AKT, PI3K'nin kanser büyümesi ve ilerlemesi üzerindeki etkilerine aracılık yapmaktadır. AKT'nin fosforilasyonu, insan kolorektal kanserinde hücre çoğalmasının ve apoptozun inhibe edilmesi ile ilişkilendirilmiştir (McDonald ve ark., 2010; Bader ve ark., 2005). PI3K ayrıca reseptör tirozin kinazlar (RTK) gibi hücre dışı uyaranlarla veya kolorektal kanseri ilerlemesinde önemli bir rol oynayan aktifleştirilmiş Ras molekülünün uyarılmasıyla da aktif hale gelebilmektedir (Papadatos-Pastos ve ark., 2015). Çoğu kanser türünde mTOR aktivasyonunda oluşan mutasyonlar, mTOR'un iki protein kompleksi (mTORC1 ve mTORC2) ile etkileşimini bozmaktadır. mTORC1 ve mTORC2, farklı hücrel görevleri vardır; mTORC1, mTOR'un yukarı akış düzenleyicisi olarak bulunmaktadır. mTORC2 ise AKT'nin bir aşağı akış efektörü olarak görev almaktadır. AKT kanserde aşırı aktivite

gösteren mTORC2 için bir substrat görevi görmektedir ve hücrenin hayatta kalmasını, gelişmesini ve çoğalmasını desteklemek için PI3K/mTORC2 yolağından gelen sinyalleri değerlendirmektedir. mTOR mutasyonları, kolorektal kanserlerin yaklaşık olarak %4'ünde bulunmaktadır (Peng ve ark., 2022). Kolorektal epitel hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR yolağı, glikoz ve amino asit Emilimi ve salınımını ve ayrıca hücre dışı sinyallere yanıt için de gereklidir. mTOR aşırı aktivasyonu insan kolorektal kanserinde yaygındır ve kanserin başlaması, ilerlemesi ve ilaç direnciyle bağlantılıdır (Zhong ve ark., 2023). Kolorektal kanserde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı Şekil 1.9'da gösterilmiştir (Koveitypour ve ark., 2019).

PIK3CA mutasyonları birçok kanser türünde bulunmaktadır; meme, rahim ağzı, kolorektal, safra kesesi, küçük hücreli olmayan akciğer ve yumurtalık kanserleri PIK3CA tipi mutasyonun en sık görüldüğü karsinom türleridir (Narayanankutty, 2019). Bu mutasyonların kolorektal kanserde proksimal hücrelerde daha yaygın olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda PIK3CA mutasyonlarının kanser lokasyonu veya evresi gibi klinik özelliklerle ilgisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Kalıtsal olarak sendromu bulunan hastalarda gelişen kolorektal tümörler, sporadik olarak gelişenlerle aynı PIK3CA mutasyon sıklığına sahip olarak bulunmuştur. Sonuç olarak PI3K sinyal yolağının kolorektal kanserin gelişmesinde onkojenik bir rol oynadığı bulunmuştur (Zhang ve ark., 2011).



Şekil 1. 9. Kolorektal kanserde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı (Koveitypour ve ark., 2019).

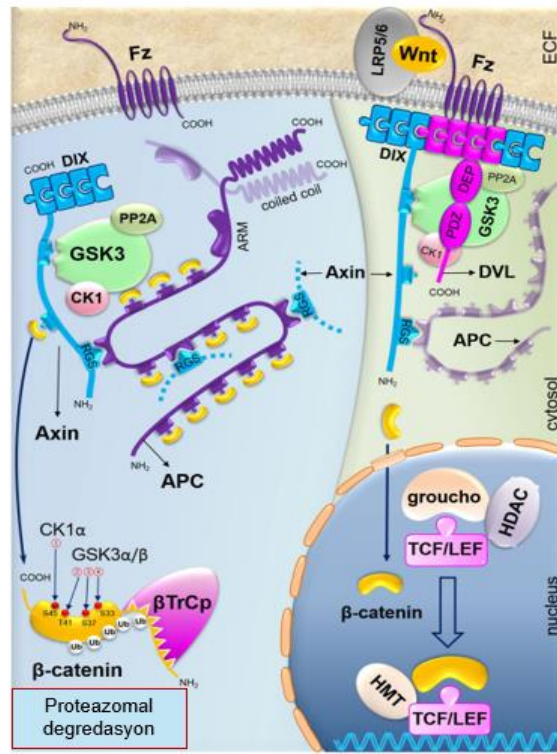
1.2.4. WNT/β-katenin Sinyal Yolağı

WNT ailesi, hücre kaderi spesifikasyonu, proliferasyon, göç ve asimetric hücre bölünmesi dahil olmak üzere çeşitli gelişimsel ve biyolojik süreçleri düzenleyen 19 adet salgı, sistein içermekte olan zengin glikoproteinden oluşmaktadır. Yolak, kanonik (β-katenine bağımlı) veya kanonik olmayan (β-kateninden bağımsız) olarak sınıflandırılmaktadır (Koveitypour ve ark., 2019). Kanonik WNT yolağı, hücre çoğalmasından sorumludur, kanonik olmayan WNT yolağı ise hücre membran polaritesi ve göçünden sorumludur (Liu ve ark., 2022). Kanonik yolak doku gelişimi, kıl folikülü oluşumu, hasarlı dokuların yenilenmesinde görevli bir yolaktır ve birkaç aşamalı bir transkripsiyonel yanıtla sonuçlanan protein lokalizasyonu, fosforilasyon ve protein bozunmasını içermektedir (Niehrs, 2012). WNT sinyal yolağı kanser ve koroner arter hastalığı gibi bir dizi hastalıkla ilişkili olarak araştırılmıştır. Geniş çaplı araştırılan WNT sinyal yollarından biri olan ve kanonik yolak olarak da bilinen WNT/β-katenin sinyal yolunun kilit elemanı β-katenin'e bağlıdır. β-katenin, glikojen sentaz kinaz 3β'nin (GSK-3β) bir substratıdır. Bu nedenle GSK-3β inhibitörleri, WNT yolağı araştırmaları için bilinen bir kimyasal biyolojik ajan olarak kullanılmaktadır (Law ve Zheng, 2022).

Kanonik yolak evrimsel süreçte yüksek oranda korunmaktadır ve hücrel WNT ligandlarının membranda bulunan spesifik reseptörlerine otokrin/parakrin bağlanması yoluyla etkinleştirilmektedir. Wnt- β -katenin aktivitesi, sitoplazmada bulunan β -katenin miktarına bağlıdır. WNT yolağı aktive edildiğinde, β -katenin stabil duruma gelmektedir ve çekirdeğe transfer olmaktadır; hücre çoğalması, farklılaşması ve hücre göçünde rol oynayan genlerin ekspresyonlarının artmasıyla sonuçlanmaktadır. WNT sinyal yolağının aktivasyonu, benign adenomların büyümesinin ilk adımıdır. Çeşitli çalışmalar, WNT/ β -katenin sinyallemesinin anormal işleyişinin, kardiyovasküler hastalık, akciğer hastalıkları, ayrıca nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi çeşitli hastalıkların oluşumunda ve gelişiminde rol oynadığını ortaya koymuştur (Liu ve ark., 2022). APC proteini, WNT aktivitesini regüle etmektedir ve kolorektal kanserinde APC değişikliklerinin araştırılması ile çoğu vakada yüksek oranda WNT yolağı aktivitesine sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Bu nedenle GSK-3 ve APC etkileşimi, kolorektal kanser gelişimindeki temel mekanizmalardan biridir ve bu mekanizmaların anlaşılması önem arz etmektedir. Kanser Genomu Atlası'nın 2012 tarihli bir raporuna göre, sporadik kolorektal kanserlerinin %92'sine kadar bilinen bir WNT düzenleyicisinde birden fazla değişiklik bulunmuştur (Cancer Genome Atlas Network, 2012). APC, β -katenin'in proteozomal olarak degrade olmasına neden olan bir proteindir. WNT ligandları FWD reseptörüne bağlanarak β -katenin bozulmasını önlemektedir ve böylece hedef genler aktive olmaktadır. Bir WNT ligandının yokluğunda, APC, APC eksen inhibitörü (AXIN) ve glikojen sentaz kinaz-3- β (GSK-3 β) tarafından oluşturulan bir 'yıkım kompleksi', daha sonra ubiquitin-proteazom sistemi tarafından parçalanan sitozolik β -katenini fosforile etmektedir. Daha sonra, GSK-3 β 'nin fosforilasyonu sonucu inhibisyonu, hücre içindeki sitozolik β -katenin konsantrasyonunun artmasını sağlamaktadır (Parker ve Neufeld, 2020; Zhang ve Wang, 2020).

Kanonik yolakta WNT ligandları salgılanıp biriktiğinde, kıvrımlı (frizzled)(FZD) ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP) ile etkileşime girerek DVL (Dishevelled) proteinini aktive etmektedir. Fosforile edilen ve FZD reseptörüne transloke edilen aktive edilmiş DVL, β -katenini yıkım kompleksinden ayırmakta ve çekirdeğe yol almaktadır (Şekil 1.10) (Koveitypour ve ark., 2019). Çekirdekte biriken β -katenin, T hücresi transkripsiyon faktörü (TCF) veya lenfoid arttırıcı faktör (LEF) ile birleşerek c-MYC, c-Jun, proliferasyon ve diğer hedef genleri aktive edebilmektedir (Schatoff ve ark.,

2017; Novellademunt ve ark., 2015). Wnt sinyali aktive edildiğinde, β -katenin, otofaji proteinlerinden biri olan p62'nin bir çekirdek baskılayıcısı görevi görmektedir (Lorzadeh ve ark., 2021). Sonuç olarak, araştırmalar kolorektal kanserin büyük çoğunluğunun WNT sinyal yolağı değişikliklerine sahip olduğunu göstermektedir. Spesifik WNT yolağı genlerindeki mutasyonlarda yaşanan seçim hakkında hala ortaya çıkarılmayan moleküler mekanizmalar bulunmaktadır ve bunlar, bu tür değişiklikleri terapötik kazanç için kullanımı üzerinde önemli bir etki taşımaktadır (Schatoff ve ark., 2017). Kanser gelişim sürecinde ön planda olan PI3K / AKT ve WNT sinyal yolakları aktive olarak GSK-3 inhibisyonuna yol açmaktadır. Bu nedenle WNT sinyal yolağı kanser araştırmalarında sıklıkla çalışılan bir biyokimyasal süreçtir (Vincent ve ark.,2014).



Şekil 1. 10. Kolorektal kanserde WNT sinyal yolağı (Koveitypour ve ark., 2019).

1.3. Kolorektal Kanser ve Tedavi Yaklaşımları

Kolorektal kanser, etkilenen hastaların önemli bir kısmı için klinik öncesi aşamalar nedeniyle yüksek oranda hastalarda taranan bir malignitedir ve bu da popülasyonda araştırılması için öncelik sağlamaktadır (de Wijkerslooth ve ark., 2012). Kolorektal kanseri taramalarındaki gelişmeler, birçok ülkede görülme sıklığının artmasının yanında

gelişmiş birçok ülkede ölüm oranını azaltmıştır (Glynne-Jones ve ark., 2017). Akıllı ilaçlar, NSAID'ler (Non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar), statinler ve bifosfonatlar gibi sıklıkla kullanılan ilaçlar, kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde kullanıldığında kolorektal kansere karşı bir nevi koruma sağlayabilmektedir. Tarama yöntemleri arasında kolonoskopi çeşitleri, kapsül endoskopiler ve sigmoidoskopi çeşitleri kullanılmaktadır (Rawla ve ark., 2018).

1.3.1. Kolorektal Kanserde Teşhis

Kolorektal kanserin polipoid bir öncülden gelişmesi ve hastalığın ileri evrede ortaya çıkan semptomları çeşitli tarama programları ile tespit edilebilmektedir. Kolorektal kanserlerin teşhisinde belirtiler doğrultusunda teşhis amaçlı çeşitli yaklaşımlar yapılmaktadır. Klinik semptomlar, tıbbi görüntüleme, patolojik sonuçlar ve laboratuvar değerlendirmeleri ile kolorektal kanser ve bulunduğu evre belirlenebilmektedir (Alexander ve ark., 2007). Ayrıca kolorektal kanser teşhislerinde moleküler tespitlere de hastalığın tanısında başvurulmaktadır. Kolorektal kanser teşhisli hastalarda rektal kanama, bağırsakta belirgin değişiklikler, anemi veya sıradan karın ağrısı gibi klinik semptomlar ortaya çıkabilmektedir. Bunların yanı sıra, ileri evreye geçmemiş durumlarda çoğunlukla asemptomatik belirtiler görülmektedir (Kumar ve ark., 2021). Kolonoskopi ile teşhis etmenin yanı sıra polip gelişiminin önüne de geçebilme olanağı bulunmaktadır; moleküler değişiklikler meydana gelmeden ve lezyonlar malignite seviyesine ulaşmadan önce poliplerin kolonoskopi yöntemlerle temizlenme yöntemi de kullanılmaktadır (Manne ve ark., 2010).

Kolorektal kanserin moleküler tespitinde kullanılan FOBT (gaita gizli kan testi) birden fazla hastayı toplu olarak incelemek üzere kullanılan ve invaziv olmayan bir testtir. Gaita testleri yardımıyla erken ve ileri evredeki kanserlerin tespiti sağlanırken, 50 yaş ve üzeri hastalarda kan şekeri ve kolesterol kontrollerinin yanı sıra diğer kan testleri de incelenmektedir (Grützmann ve ark., 2008). Rektal kanama hem iyi huylu hem de kötü huylu sonuçların belirtisidir ve bunun yanında kolonoskopi incelemesi gerektiren durumları belirlemek için ek değerlendirmelere ve risk faktörlerinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Breugom ve ark., 2015). Kolonoskopinin ihtiyaç duyulduğu durumlarda sıklıkla rektal kanama gözlemlenmektedir. FOBT kolorektal polipinde kanamayı değerlendirmek üzere kullanılmaktadır (Taieb ve ark., 2017; Mousavinezhad

ve ark., 2016). Hastalık seyrinde metastazları tespit etmek için göğüs, karın ve pelvis çevresinin BT (bilgisayarlı tomografi) taraması kullanılmaktadır. Bununla beraber ihtiyaç duyulduğunda diğer görüntüleme testleri olan PET (Pozitron emisyon tomografisi) ve MRI (Manyetik rezonans görüntüleme)'ya da başvurulmaktadır. Tümörün lokal evresinin belirlenmesinde ve en iyi cerrahi yaklaşımın planlanmasında MRI incelemesi sıklıkla yapılmaktadır (Cunningham ve ark., 2010).

1.3.2. Kolorektal Kanserde Tedaviler

Kolorektal kanserde ölüm riski evrelere göre değişkenlik gösteren bir kanser türüdür. Erken teşhis ile müdahale edilen vakalarda hayatta kalma oranı artmaktadır. Heterojen karakterdeki kolorektal kanserin tedavisinde hastalık seyri, hastanın genetik altyapısı (örneğin KRAS, NRAS, TP53 ve BRAF gen mutasyonları, kalıtsal sendromlar) metabolizması ve bağışıklık sistemi, tedavi yönetimi için kritik bir öneme sahiptir (Benson ve ark., 2017). Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi uzun zamandır başvuru alan kolorektal tedavileri çoğunlukla uzak mesafedeki organ ve dokulara metastaz olmadığında etkilidir. Tedavilerde kemoterapi uygulamalarına ek olarak birincil kolorektal tedavisi, poliplerin ve civardaki dokuların cerrahi olarak kolonoskopi uygulamalarıyla bölgeden alınmasıdır. Ancak ileri evredeki hastalarda, lenf nodlarının etkilendiği ve metastazların olduğu durumlarda tedaviler kombine halde uygulanmaktadır (Ahmed, 2020). Terapötik yaklaşımlarda floropirimidinler (örneğin, 5-florourasil (5-FU)) lökovorin (LV) ve oksaliplatin (5-FU/LV/oksaliplatin (FOLFOX) sitotoksik ajanlarla kombinasyon halinde palyatif kemoterapi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Mármol ve ark., 2017). Kemoterapi ve radyasyon temelli terapiler gibi sitotoksik etkisi olan tedavilerin, tümör mikro çevresini etkilediği ve immünojenik hücre ölümüne sebep olduğu, tümör antijenlerinin salınımını indüklediği ve adaptif bir bağışıklık tepkisini tetiklediği belirlenmiştir (Tesniere ve ark., 2010). Kolorektal kanserde 5-FU bazlı tedavilere ek olarak oksaliplatin ve irinotekanın kullanılması, kolorektal kanserin tedavisinde önemli bir adımdır. Bu kullanım, hastaların hayatta kalma oranının 4 katına kadar çıkmasını sağlamıştır. Artan hayatta kalma ve pozitif tedavi yanıtları, hastalık seyrinin doğru yönetilmesinin ve geliştirilmiş multidisipliner yaklaşımın neticesinde sağlanmıştır. Bunlara ek olarak, kişiye özel akıllı ilaçların geliştirilmesi de kolorektal kanser tedavi yaklaşımlarının arasında yer almaktadır. (Golshani ve Zhang, 2020).

1.4. Hücre Ölümü

Hücre ölümü, hücrelerin büyümesinde ve gelişmesinde gerekli olan önemli bir biyolojik süreçtir. Hücrenin yaşamsal faaliyetlerini sürdürmek için metabolizmasındaki değişikliklere bağlı olarak membran bütünlüğünün geri dönüşümsüz bozulmasının bir sonucu olarak meydana gelir. Hücre ölümü, canlılığın sürdürülmesi, rejenerasyon, Hücre ölümü, homeostazinin sürdürülmesi için temel olarak gerekli olduğundan dolayı herhangi bir bozulma, çeşitli hastalıklara ve işlevsel bozukluklarla sonuçlanmaktadır (Dehghan ve ark., 2023). Kanser hücrelerinin en önemli ayırt edici özelliklerinden biri hücre ölümünden kaçma ve kontrolsüz çoğalma yetenekleridir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanser hücreleri, DNA hasarı, besin ve oksijen eksikliği ve benzeri streslerin tetiklediği programlı hücre ölüm mekanizmalarından kaçmaya yönelmektedir. Kanser hücrelerinin en belirgin hayatta kalma adaptasyonu, nekroz gibi apoptotik olmayan hücre ölümü tiplerine karşı ve otofaji ve benzeri hayatta kalma mekanizmalarına direnen apoptotik direnç yeteneğidir (Li ve ark, 2021). Morfolojik olarak çeşitlere ayrılan hücre ölümü, birden fazla moleküler mekanizmaya sahiptir.

1.4.1. Apoptoz

1972 yılında ilk kez Kerr ve arkadaşları tarafından adlandırılan apoptoz, hücrel stres, DNA hasarı, immün sistem yanıtları gibi biyolojik süreçlerde görev alan programlı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Hücrel intihar olarak da anılan apoptoz, doku gelişimi sürecinde bazı dokuların programlı olarak yok edilmesi örneğin menstrüasyon döneminde uterus yüzeyindeki hücrelerin uzaklaştırılması, hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması, herhangi bir virüs veya bakteri ile enfekte olmuş hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından uyarılması sonucu ölmesi apoptoza birer örnektir (Degretev ve Yuan, 2008). Apoptoz sürecinde; proteinlerin kaspaz-bağımlı proteolizi, membranın düzgün bir şekilde parçalanması ve kromozomal DNA'nın endo-nükleolitik olarak parçalara bölünmesi görülmektedir. Buna ek olarak bir hücre apoptoz sinyali aldığında, kromatini ve sitoplazması yoğunlaşmaktadır ve böylece hücrenin boyutu küçülmektedir; sürecin sonunda hücre 'apoptotik cisimcikler' olarak bilinen daha küçük parçalara paketlenmektedir (Lossi, 2022). Apoptoz ile diğer hücre ölüm tipleri arasındaki önemli bir fark; apoptozdaki sinyalin, dışsal apoptozda görülen ölüm reseptörü veya içsel yolda görülen mitokondri tarafından tetiklenebilmesidir. Apoptoz, Fas ve TNF (tümör nekrozis

faktör) reseptörleri gibi hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri ligandları tarafından aktive edildiğinde veya Bcl-2 ailesi gibi pro-apoptotik proteinler mitokondriyal dış membran geçirgenliği artışına neden olduğu zaman başlatılmaktadır. Hem içsel hem de dışsal mekanizmada apoptozun kilit endo-proteaz enzimleri olan kaspazlar yer almaktadır (Lossi, 2022; Elmore, 2007).

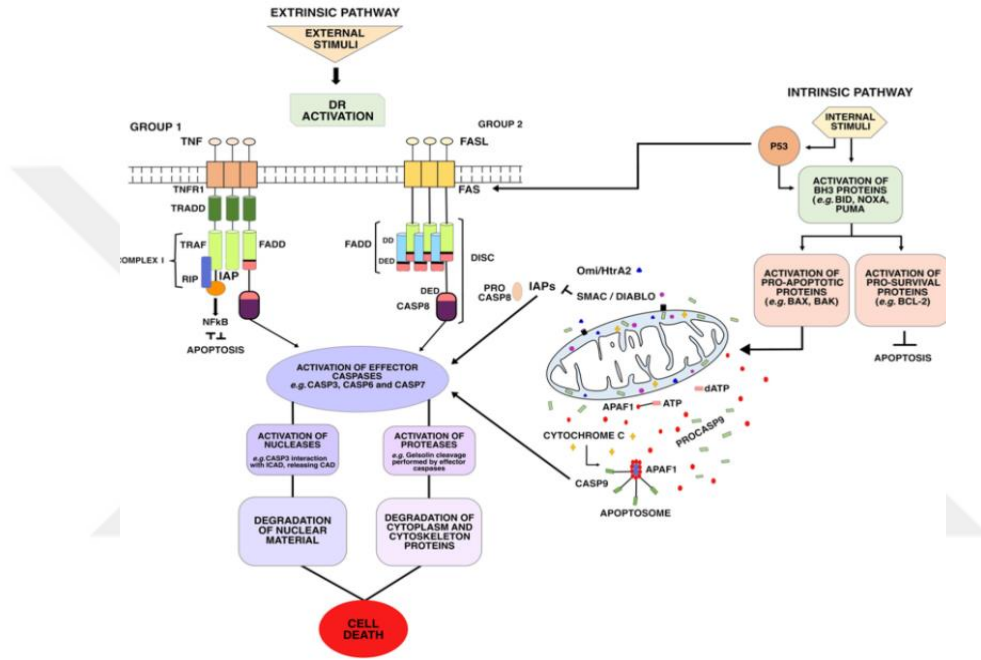
1.4.1.1.İçsel Apoptoz

İçsel apoptoz veya diğer adıyla mitokondriyal apoptoz, hücresel olaylarda hücrede meydana gelen stresle beraber ortaya çıkmaktadır. Bcl-2 ailesi tarafından yönetilen içsel apoptozda hücrenin kaderi bu ailedeki pro ve anti-apoptozda görevli proteinlerin dengesine bağlı gerçekleşmektedir (Li ve Dewson, 2015). DNA genotoksik hasarı, büyüme faktör eksikliği ve endoplazmik retikulum (ER) stresi gibi içsel uyaranlar ile sitozolde bulunan BID, BIM, BAD, Noxa, PUMA ve HRK proteinlerini aktif hale getirmektedir. Bu proteinler kendi aralarında etkileşime girmektedir ve apoptotik ölümü durdurarak veya indükleyerek anti-apoptotik veya pro-apoptotik proteinleri aktifleştirmektedir. Anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W veya Mcl-1 apoptoz aktivitesini inhibe etmektedir. Bunun yanı sıra, pro-apoptotik proteinler olan BAX ve BAK aktivitesi, mitokondriyal dış membran geçirgenliği (MOMP) yaratmaktadır; MOMP ile hücre içinde salınan Sitokrom-c, Apaf-1 ile birleşerek apoptozom adlı bir kompleks oluşturmaktadır. Apoptozom oluşması sonucu hücre içerisinde olan inaktif apoptoz başlatıcı pro-kaspaz-9 aktifleşerek kaspaz-9 oluşturmaktadır ve diğer görevli kaspazları bir 'kaskad' şelalesi ile etkin hale getirmektedir. Aktif kaspazlar da hücrenin apoptotik ölüm sürecinde yer almaktadır (Şekil 1.11) (Cavalcante ve ark., 2019).

1.4.1.2.Dışsal Apoptoz

Dışsal apoptoz veya diğer adıyla ölüm reseptörüne bağlı apoptoz, bir dış uyaran varlığında hücrenin apoptotik ölüme sürüklenmesidir. İçsel apoptozda olduğu gibi mitokondri ile kaspaz aktivasyonunu artması yerine, hücre membranına Fas veya FasL gibi ölüm reseptörleri (DR) bağlandığında dışsal apoptoz yolu aktifleşmektedir (Şekil 1.11) (Cavalcante ve ark., 2019). Ölüm reseptörleri, sistein amino asidi açısından zengin olan ve apoptozu indükleyen, ölüm domainleri bulunduran Tümör Nekroz Faktörü

(TNFR) reseptörleridir. Örneğin Fas ve DR5 gibi bazı ölüm reseptörleri, p53 ve c-MYC ve benzeri düzenleyici proteinler tarafından etkin hale getirilebilmektedir, bu da DR5/TRAIL (TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand) ve FasP/FasL ölüm reseptörlerinin aktivasyonunu artırmaktadır. Ölüm reseptörlerinin hücrenin membranına bağlanması ile pro-kaspaz 8 ve pro-kaspaz 10 aktifleşerek kaspaz-8 ve kaspaz-10 formunu oluşturmaktadır ve bu kaspazlar hücrenin apoptotik ölümü için diğer gerekli kaspazları aktifleştirmektedir (Pobezinskaya ve Liu, 2012; Elrod ve Sun, 2008).



Şekil 1. 11. İçsel ve dışsal apoptotik ölümün genel şeması (Cavalcante ve ark., 2019).

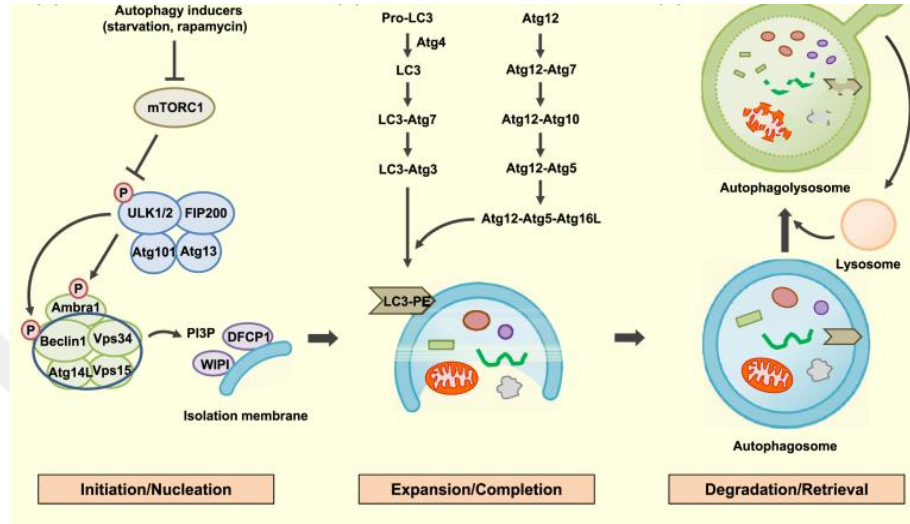
1.4.2. Otofaji

Otofaji; hücrede organel hasarı, hipoksi, besin eksikliği, patojen varlığı, ilaç ve benzeri biyolojik streslere yanıt olarak hücresel molekülleri ve organelleri parçalayan kontrollü bir hayatta kalma stratejisidir. Katabolik bir süreç olan otofaji, yüksek oranda korunmuş ve patofizyolojik bir adaptasyondur. Apoptozun yetersiz kaldığı durumlarda hücresel homeostaziyi korumak için otofaji mekanizmasının da kullanılması, hücrenin birden fazla ‘geri besleme’ mekanizmasına sahip olmasına bağlıdır (Yang ve Klionsky, 2009; Tanida ve ark, 2005). Otofaji üç alt çeşide sahiptir: makro otofaji, hücrede sindirilmesi gereken büyük biyomoleküller ve organellerin ‘otofagozom’ adlı yapı ile hücrenin kontrolünde sindirilmesidir. Mikro otofaji, makro otofajiden farklı olarak daha

küçük yapıya sahip biyomoleküllerin lizozom içerisine doğrudan alınıp degradasyonunun yapılmasıdır. Şaperon aracılı otofaji ise diğer iki çeşitten farklı olarak spesifiktir ve yanlış katlanmış proteinlerin veya istenmeyen protein komplekslerinin membranda bulunan ısı-şok proteinleri olan ‘şaperonlar’ tarafından lizozoma yönlendirilip sindirilmesidir (Qian ve ark., 2017). Hastalıklarla ve kanserle ilişkili en bilinen otofaji çeşidi makro otofajidir. Makro otofaji beş aşamadan oluşmaktadır: otofagozomun başlatılması, çekirdeklenmesi, otofagozom membranının genişlemesi ve uzaması, otofagozom/lizozom füzyonu ile otolizozom oluşumu ve intravesikül içeriklerin sindirilmesidir. Ribozomdan bağımsız endoplazmik retikulumun (Rough ER) çift katmanlı membranın bir kısmından ayrılmasına ve sitoplazmanın, organellerin, proteinlerin ve makromoleküllerin parçalanmasıyla başlamaktadır. Parçalanma sonrası ‘otofagozomlar’ oluşmaktadır ve bunlar daha sonra otolizozomları oluşturmak için lizozomlarla birleşmektedir. Otolizozomda bulunan lizozomal enzimler daha sonra organellerin ve hücre metabolizmasının ihtiyaçlarını karşılamak için hücresel içerikleri parçalamaktadır. Otofaji sürecine bu mekanizmalarda yer alan otofaji ilişkili genler (Atg) eşlik etmektedir (Cao ve ark., 2021). Kansere karşı immün sistem ve otofaji yakın ilişkidir; hücrede azaltılan otofaji, bağışıklık sistemini baskılamakta ve öncül tümör gelişim riskini artırabilmektedir. Artırılmış otofaji, pre-malign potansiyeli olan lezyonlarda kanser ilerlemesini önlemektedir (White, 2012).

Hücre içinde veya mikro çevresinde yaşanan stres sonucu otofaji mekanizması tetiklendiğinde AMPK'nin aktivasyonu ve mTORC1'in inhibe edilmesi ile başlamaktadır. ULK kompleksi, doğrudan mTOR'un aşağı sinyal yolundadır. Otofajiyi başlatmak için mTORC1, ULK1' defosforile etmektedir ve sonuç olarak ULK kompleksi oluşmaktadır. ULK kompleksi otofajinin indüksiyonunu kontrol etmek için yukarı akış yönündeki besin ve enerji sinyallerini almaktadır. Ardından ER membranından bir fagofor yani öncül otofagozom oluşumunda Atg13/Atg101/ULK1/FIP200 kompleksi oluşmaktadır. Otofagozom oluşması için çekirdeklenme aşamasında ULK1'nin Beclin-1' fosforile etmesi ile Beclin1/Vsp14/Vsp15 kompleksi aktif hale gelmektedir. Otofagozomun olgunlaşması ve uzaması için LC3 proteini ve Atg5/Atg10/Atg12 kompleksi görev almaktadır. Otofagozom uzaması esnasında LC3 proteini, Atg4 proteazı tarafından LC3-I proteinine parçalanmaktadır. Otofagozomun uzamasını tamamlamak üzere LC3-1 proteini, Atg7 ve Atg3 proteinleri tarafından LC3-II formuna dönüştürülmektedir. İçinde

sindirilmek istenilen içerikleri bulunduran otofagozom, füzyon aşamasında lizozom ile birleşmektedir ve sonuç olarak otofagolizozom oluşmaktadır. Son aşamada otofagolizozomun içinde bulunan spesifik proteazlar tarafından intravesikül içerikler sindirilmektedir (Mulcahy Levy ve Thorburn, 2020). Makro otofaji mekanizması Şekil1.12’de gösterilmiştir (Lee ve ark., 2019).

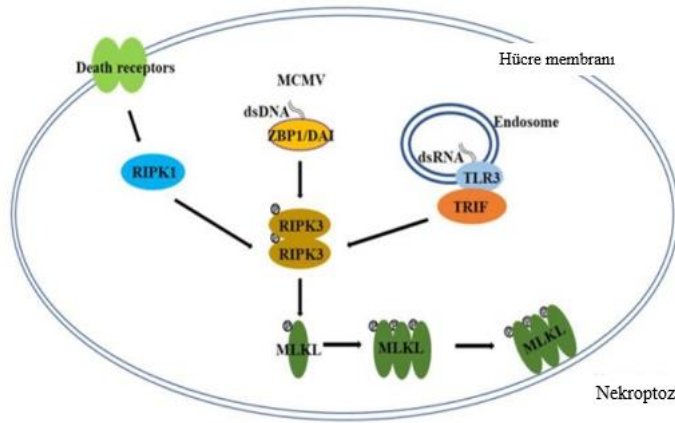


Şekil 1. 12. Otofajinin moleküler mekanizması (Lee ve ark., 2019).

1.4.3. Nekroz

Diğer bir hücre ölümü çeşidi olan nekroz, hücrenin dışardan aldığı fiziksel zorlanma, hipoksi, travma (ısı, radyasyon), toksinler veya enfeksiyon nedeniyle inflamasyon ve benzeri fiziksel stresin hücrenin işlevini yerine getiremez hale getirecek kadar ciddi hasara uğramasına neden olduğu istemsiz veya kontrol edilemeyen hücre ölümüdür. Apoptoz ve otofajiden farklı olarak genetik bir kontrol mekanizması olmaksızın ani bir hücre ölümü gerçekleşmektedir. Nekrotik ölüm esnasında sıklıkla NF-kB (nükleer faktör-kappa B) ve benzeri birçok pro-inflamatuvar proteinin hücre içerisinde ekspresyonu artmaktadır. Hücrenin yaşadığı stres nedeniyle ani bir şekilde homeostazisini kaybetmesi ile hücre zarının yırtılmasına yol açarak hücrenin içeriklerinin dışarı sızmasına, doku hasarına ve yüksek düzeyde inflamasyona neden olmaktadır (D'Arch 2019). Nekroptoz terimi, programlanmış nekrotik ölümü ifade etmektedir. Bağışıklık sistemini tehdit eden herhangi bir viral veya bakteriyel kaynaklı inflamasyon esnasında hücrenin kendini korumak amacıyla gerçekleştirdiği programlı bir ölümdür. Nekroptoz, hücre dışı sinyaller (ölüm reseptörü ve ligand bağlanması) veya hücre içi sinyaller (enfeksiyon) ile

tetiklenebilmektedir ve kaspaz inhibisyonu ile aktive edilmektedir. Nekroptotik ölüm, kaspaz inhibitörleri varlığında reseptör etkileşimli proteinler olan RIP2 ve RIP3 tarafından kontrol edilmektedir. Birçok durumda FADD (Fas-ilişkili ölüm reseptörleri), TNFR1 (tümör nekroz faktörü reseptörü 1), TRAIL (tümör nekroz faktörüne bağlı apoptozu indükleyen ligand) ve Fas reseptörleri nekroptozu kontrol etmektedir (Wu ve ark., 2012). Bir ligand TNFR1'e bağlandığında pro-survival kompleks I, TRADD (TNFR ilişkili ölüm domaini)'i ve RIPK (reseptör etkileşimli protein kinaz-3) 'ü indüklemektedir. İndüklenen RIPK3, MLKL (Karışık soy kinaz alanı benzeri) proteinini fosforile etmektedir ve fosforile olan MLKL oligomerizasyon ile membrana bağlanmaktadır. MLKL bağlanması sonucu hücre membranında yırtık meydana gelmektedir ve böylece hücre içeriği hücre dışına sızmaktadır (Galluzi ve ark., 2017). Nekroptozun mekanizması Şekil 1.13'te gösterilmiştir (Liu ve Jiao, 2019).



Şekil 1. 13. Nekroptozun moleküler mekanizması (Liu ve Jiao, 2019).

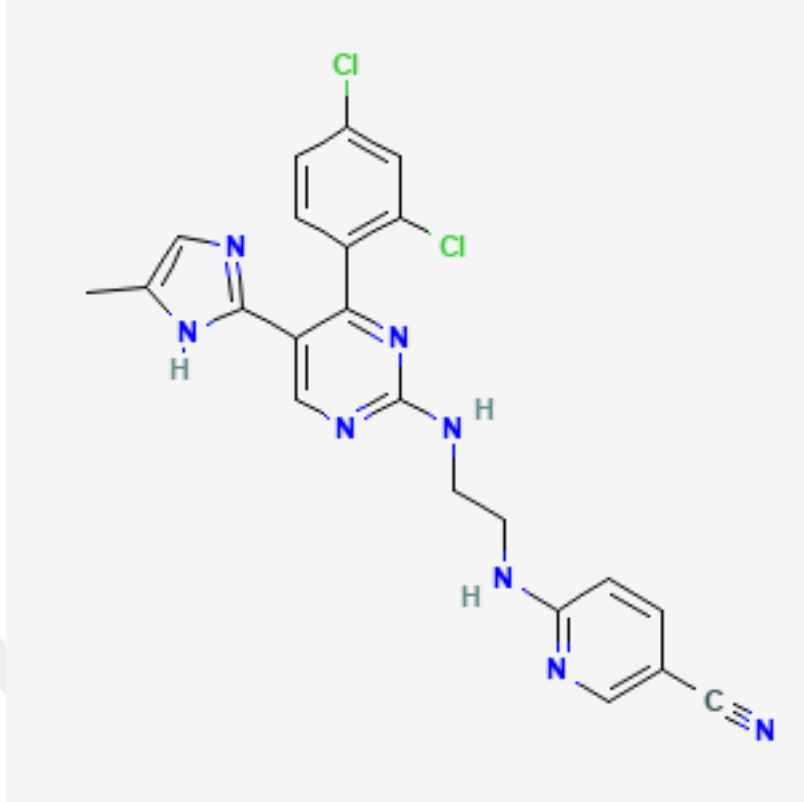
1.5. Laduviglusib (CHIR-99021)

Laduviglusib (CHIR-99021), moleküler adıyla 6-[[2-[[4-(2,4-diklorofenil)-5-(5-metil-1H-imidazol-2-il)-2-pirimidinil]amino]etil]amino]-3-piridinkarbonitril, bir glikojen sentaz kinaz-3 α/β (GSK-3 α/β) inhibitörü ve WNT stimülatörü olan bir aminopirimidin türevidir. Laduviglusib (CHIR-99021)'in moleküler yapısı Şekil 1.14'te gösterilmiştir. Serin fosforilasyonu (S9) ile GSK-3 β ve (S21) GSK-3 α inhibisyonuna yol açmaktadır (Ring ve ark., 2003). GSK-3 α/β inhibitörü Laduviglusib (CHIR-99021), kanonik WNT sinyal yolağını aktive ederek embriyonik kök hücrelerin rejenerasyonunda, farklılaşmasında ve yeniden programlanmalarında rol oynamaktadır (Liao ve ark., 2018).

Bunlara ek olarak GSK-3 için CDC2 (Siklin bağımlı kinaz), ERK2 (Ekstrasellüler sinyal düzenlenmiş kinaz 2) ve diğer protein kinazlara göre 500 kattan fazla seçicilik göstermektedir (Ring ve ark., 2003). Fare ve benzeri deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda pluripotent ve embriyonik kök hücrelerinde kemik gelişimi, kalp hücrelerinin farklılaşması, epitelyal ve mezenkimal geçişlerinde GSK-3 inhibisyonu sağlayarak rol oynadığı ortaya konulmuştur (Lian ve ark., 2013; Maurizi ve ark., 2023). Ayrıca Laduviglusib (CHIR-99021) mikrotübül dinamiği, GSK-3β'nın düzenleyici olarak görev aldığı insülin sinyali ve glikojen sentezi, nörotrofik faktörlerin sinyali, WNT sinyali, nörotransmitter sinyali gibi önemli hücresel süreçlerde etkiye sahiptir (An ve ark., 2012). Hücre ve doku gelişiminde önemli rol oynayan GSK-3 sinyal yolağının, beyin kök hücrelerinden oluşturulmuş organoidler üzerinde yapılan bir çalışmada düşük dozda kullanılan Laduviglusib (CHIR-99021) organoid boyutunu arttırırken, yüksek doz kullanımının ise organoid gelişimini engellediği sonucuna ulaşılmıştır (Delepine ve ark., 2021).

Laduviglusib (CHIR-99021)'in kanserle ilişkisi, özellikle hücresel sinyal yolları üzerindeki etkisi üzerinden anlaşılmaktadır. GSK-3, çeşitli kanser türlerinde anormal düzenlemelerle ilişkilendirilmiştir. GSK-3β, kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığın patogenezinde yer almaktadır (Russi ve ark., 2021). GSK-3'ün hücre proliferasyonu, programlı hücre ölümü, hücre farklılaşması, metastaz ve benzeri önemli hücresel süreçlerde rol almaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda GSK-3α inhibisyonunun lösemi başlangıcını baskıladığı ve istenmeyen yan etkilerin engellenerek akut miyeloid lösemisinin (AML) *in vivo* fare modellerinde yaşam süresini uzattığı ortaya konulmuştur (Kingwell, 2018). Bu çalışmalara ek olarak kanser kök hücrelerinde GSK-3β inhibisyonu ile kanser gelişimi üzerine de çalışmalar bulunmaktadır. 2017 yılında Ishida ve arkadaşları tarafından kolon kanseri kök hücre hücrelerinin yapılanması üzerine yaptıkları çalışmada Laduviglusib (CHIR-99021)'in GSK-3β inhibisyonunun kolon kanseri kök hücrelerinin gelişimine ket vurduğu bildirilmiştir (Ishida ve ark., 2017). Russi ve arkadaşları tarafından 2021 yılında yürütülen bir başka çalışmada 100 µM Laduviglusib (CHIR-99021)'in GSK-3β inhibisyonunun epitelyal yumuşak doku sarkoma hücrelerinde hücre döngüsü tutulmasına ve otofajik aktiviteye neden olarak hücre çoğalmasını engellediği görülmüştür ve Laduviglusib (CHIR-99021)'in epitelyal sarkomada tedaviye yönelik klinik öncesi çalışmalarda başarılı bir etkinliğe sahip olduğu

belirlenmiştir (Russi ve ark., 2021). Literatürde Laduviglusib (CHIR-99021)'in akciğer kanseri hücrelerinde tümör sferoid modellerinde endotel-mezenkimal geçişin (EMT) inhibisyonuna yardımcı olduğu da ortaya konulmuştur (Kim ve ark., 2019). Laduviglusib (CHIR-99021)'in EMT inhibisyonunda rol aldığını ortaya koyan başka bir çalışma da 2024 yılında Song ve arkadaşları tarafından dirençli hepatoselüler karsinoma hücreleri üzerinde yürütülmüştür. Çalışma sonucunda Laduviglusib (CHIR-99021)'in Sorafenib ile kombine kullanımının anti-kanser etkinliği arttırdığı ve EMT inhibisyonuna bağlı olarak hepaselüler karsinoma hücrelerinin farklılaşmasına yardımcı bir anti-fibrotik ilaç adayı olabileceği bildirilmiştir (Song ve ark., 2024). WNT/ β -katenin sinyal yolağı, hayatta kalma, hücre ölümü ve metastaz gibi biyokimyasal süreçlerde rol olması nedeniyle kanserde sıklıkla çalışılmaktadır. Laduviglusib (CHIR-99021)'in WNT/ β -katenin aktivatörü olarak görev aldığı bir çalışmada malign fenotipteki glioma hücrelerinin agresyonunu başarılı bir şekilde baskıladığı bildirilmiştir (Yang ve ark., 2024). Kanser gelişiminde β -katenin'in rol aldığı farklı sinyal yolaklarından bir diğeri NOTCH sinyal yolağıdır. Notch1'in karsinojenik etki göstermesi β -katenine bağlıdır ve Notch-1 aktive edilmesi ile kanser hücrelerinin metastatik özelliğini desteklenmektedir. Li ve arkadaşlarının 2013 yılında NOTCH ve WNT sinyal yolakları arasındaki ilişkiyi incelemek üzere akciğer kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmada Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının WNT sinyal yolağını aktive ettiği ve hücre ölümünü indüklediği sonucuna ulaşılmıştır (Li ve ark., 2013). Bir başka çalışmada pankreas hücrelerinde GSK-3 inhibisyonun canlılık ve proliferasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir ve immüno blotlama sonuçlarına göre 72 saat 5 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in pankreas hücrelerinin canlılığına ket vurduğu ve hücrenin apoptotik ölüm yanıtını tetiklediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada makro otofaji ilişkili proteinlerin anlatımına etkisi araştırılmıştır. Çalışma çıktısına göre hücrelerde GSK-3 inhibisyonuna bağlı olarak makro otofaji ile ilişkili proteinlerin anlatımlarının etkin olarak arttığı tespit edilmiştir (Marchand ve ar., 2015). Laduviglusib (CHIR-99021)'in kanserle ilgili potansiyel tedavi stratejileri üzerinde klinik tabanlı bilimsel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, bu alandaki araştırmaların çoğu hala klinik öncesi aşamada olup, Laduviglusib (CHIR-99021)'in kanser tedavisi için klinik kullanımı konusunda daha fazla çalışma gerekmektedir (Naujok ve ark., 2014).



Şekil 1. 14. Laduviglusib (CHIR-99021)'in moleküler yapısı
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9956119#section=2D-Structure>).

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Hücre Kültürü

Marmara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü Hücre Kültürü Araştırma Laboratuvarında mevcut olan HCT-116 (CCL-247) kolorektal kanseri ve HT-29 (HTB-38) kolorektal kanseri hücre hatları Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC, Rockville, MD, ABD) tedarik edilmiştir. Hücre hatları, McCoy 5A Hücre Büyüme Medyası %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiştir ve %5 CO₂ ile 37°C'de inkübe edilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan hücre kültürü materyalleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Hücre hatları ve hücre kültürü sarf malzemeleri.

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
HT-29 hücre hattı	HTB-38™	ATCC
HCT-116 hücre hattı	CCL-247™	ATCC
McCoy Hücre Büyüme Medyası	MCC-A	Capricorn
Penisilin/Streptomisin (Pen/Strep), 100x	CP22-5399	Capricorn
Trypsin 0,05% EDTA, 0,02% DPBS	P10-0231SP	PAN Biotech
Gibco™ Fetal Bovin Serum (FBS)	16000044	Life Technologies
Dulbecco's 1X Fosfat Tamponlu Salin (DPBS) pH: 7,4	P04-36503	PAN Biotech

2.1.2. Laboratuvar Ekipmanları ve Cihazları

Bu tez çalışmasında kullanılan laboratuvar ekipmanları, cihazları ve kimyasalları Tablo 2.2’de ve Tablo 2.3’te gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Kullanılan laboratuvar ekipmanları ve cihazları.

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Mikropipet (100µL-1000µL)	EP3123000063	Eppendorf
Mikropipet (10µL-100µL)	EP3123000047	Eppendorf
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EP3123000020	Eppendorf
Vortex cihazı	LB.DL.8031102000	DLAB
25 cm ² hücre büyüme flaskı	90026	TPP
75 cm ² hücre büyüme flaskı	90076	TPP
6 kuyulu petri	92006	TPP
24 kuyulu büyüme flaskı	92024	TPP
96 kuyulu petri	92096	TPP
0,22 µm steril filtre	LB.IS.094.07.001	ISOLAB
Buzdolabı (No Frost)	NF 45010 402 Lt	REGAL
-80° Dondurucu	DW-86L628	Haier
Mini santrifüj cihazı	D3024	DLAB
Makro santrifüj cihazı	NF200	Nüve
Soğutmalı santrifüj cihazı	3-30KS	Sigma-Aldrich
Forma 371 Steri Cycle CO ₂ İnkübatör	TC 230	Thermo Fisher Scientific
Class II 2023 Biyogüvenlik Kabini Laminar Flow	ELİT BSC	BİLSER
Cryo tüp	LB.IS.091.11.105	ISOLAB
50 mL santrifüj tüpü	5100050C	CAPP

Tablo 2.2. Devamı

15 mL santrüf t���	5100015C	CAPP
1,5 mL Ependorf	5100505C	CAPP
Hemositometre	C964730	ORLAB
10 ��L pipet ucu	5130010	CAPP
100 ��L pipet ucu	5130070	CAPP
1000 ��L pipet ucu	5130130	CAPP
Spektrofotometre	Cytation3	BioTek
Floresan Mikroskobu	Cytation3	BioTek
Floresan Mikroskobu (ZOE)	1450031	Bio-Rad Laboratories
Invert Mikroskop	CKX41	Olympus Life Science
Otoklav cihazı	DB-45	Systec
Invitrogen Mini Jel Tank Sistemi	NW2000	Thermo Fisher Scientific
G��� kayna��ı	PS0302	Powerase
Kemiluminesans Cihazı	UV-6L1-2020	ER Biyotek

Tablo 2.3. Kullanılan laboratuvar kimyasalları.

MitoTrackerTM Red CMXRos	M7512	Invitrogen
Akridin Turuncusu	65-61-2	Sigma-Aldrich
DAPI	28718-90-3	BioShop
DiOC6	2129966	Fluka
CM-H2DCFDA Genel Oksidatif Stres İndikat���	C6827	Invitrogen
Etil Alkol	64-17-5	Sigma-Aldrich
Glasiyel Asetik Asit	27225	Sigma-Aldrich

Tablo 2.3. Devamı

Bovin Serum Albumin (BSA)	9048-46-8	Neofroxx
Tripan Mavisi	15250061	Thermo Fisher Scientific
MPER	89842	Thermo Fisher Scientific
Yağsız süt tozu	68514-61-4	Neofroxx
Bradford 1X Dye Reagent	5000205	Bio-Rad Laboratories
Tris baz	77-86-1	Neofroxx
Tris-HCl	1185-53-1	Neofroxx
Akrilamid bis akrilamid %30 (37.5:1)	AB3751100	Ecotech Biotechnology
Sosyüm Dodesil Sülfat (SDS)	151-21-3	Neofroxx
Amonyum persülfat (APS)	7727-54-0	Neofroxx
TEMED	110-18-9	Neofroxx
Laduviglusib (CHIR-99021) 5mg	HY-10182	MedChemExpress
Tiazolil tetrazolyum (MTT)	298-93-1	NeoFroxx
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	67-68-5	NeoFroxx
H ₂ O ₂ (Hidrojen peroksit)	107209	Merckmillipore
Kristal Viyole	B21932	Thermo Fisher Scientific
İzopropanol	67-63-0	KimyaLab
β-Merkaptoetanol	60-24-10	Neofroxx
Luminol	A2185	Applchem
Antikorlar	4445 42867 12620 34811	Cell Signaling Technology

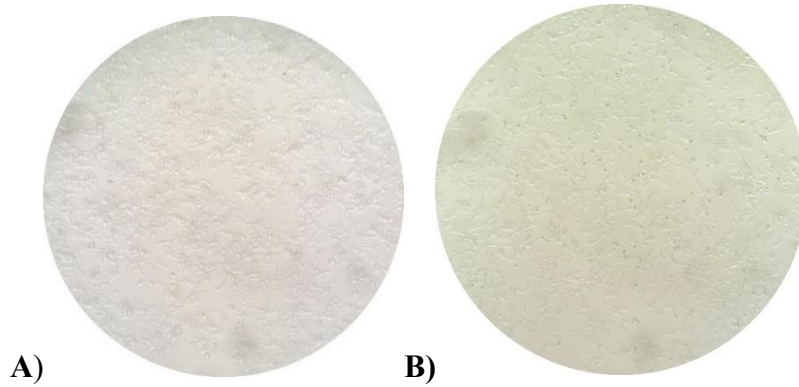
2.2. Yöntem

2.2.1. Laduviglusib (CHIR-99021) Temin Edilmesi ve Ana Stok Hazırlanması

Yerel bir distribütör firması olan BOGA Medikal ve Laboratuvar Ürünleri A.Ş.'den satın alınan 5 mg Laduviglusib (CHIR-99021), ürün yönergesinde belirtilen stok molariteleri doğrultusunda net ana stok 10 mM olması amacıyla 1.0745 mL steril DMSO içerisinde çözülmüştür. Homojen hale gelene kadar pipetaj yapılan solüsyon 20 µL olacak şekilde steril ependorflara alikotlanarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.2. Hücre Hatlarının Açılması

-80°C cryo tüplerde dondurulmuş olarak bulunan HT-29 ve HCT-116 hücreleri çözündürülmüştür ve taze besiyeri eklenerek santrifüj tüplerinde 1200 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelleti uygun miktarda besiyeri ile pipetaj yapılmış ve homojen hale getirilmiştir. 25 cm² petrilere 3 mL besiyeri eklenmiş ve hücre sayımından sonra istenilen sayıda hücre hesaplanarak hücreler ekilmiştir. Petriler 37°C, %95 nem oranında ve %5 CO₂ inkübatöre koyulmuştur. Hücreler petri yüzeyini kapladığı durumda hücrelerin canlılığını ve devamlılığını sağlamak amacıyla pasaj işlemi sürdürülmüştür.



Şekil 2. 1. HT-29 (A) ve HCT-116 (B) kolorektal kanseri hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri.

2.2.3. Hücre Hatlarının Dondurulması

Çalışılan hücreler, yapılan çalışmada duyulan ihtiyaçtan daha fazla sayıda çoğaldığında veya yapılan çalışma bitmiş ise dondurulmuştur. Hücre dondurma işleminde petri yüzeyine yapışmış halde olan hücreler 1 mL Tripsin-EDTA ile yapıştıkları petri yüzeyinden kaldırılmıştır. Tripsin-EDTA aktivitesi, kullanılmış olan Tripsin-EDTA miktarı kadar 1:1 oranda hücrelerin yüzüğü besiyeri içerisine eklenerek engellenmiştir. Toplanan hücreler 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Çöken hücre süspansiyonundan 10 µL alınmış ve hemositometrede sayılan hücrelerin 10^4 katı ile hücre sayısı hesaplanmıştır. Hücre sayısına bağılı olarak ($2-5 \times 10^6$) yeterli görülen hücreler, 9:1 oranında karıştırılmış olan steril 1 mL FBS/DMSO ile nazikçe homojenize edilmiş ve dondurulmak üzere cryo tüplerde muhafaza edilmiştir.

2.2.4. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre hatlarının sağlıklı bir şekilde devamlılığını sağlamak amacıyla hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi yapılmıştır. Hücrelerin petri yüzeyini kaplaması durumunda besiyeri atılmıştır ve 25 cm² petri kapları 2 mL 1XPBS ile iki kere yıkanmış ve 1 mL Tripsin-EDTA uygulanmasıyla 3 dakika 37 °C, %95 nem, %5 CO₂'de inkübatörde bekleterek hücreleri kaldırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin petri yüzeyindeki yapışması mikroskop ile kontrol edilmiştir ve ardından tripsin aktivitesinin önlenmesi için 1 mL besiyeri petriye koyulmuştur. Petri kabında yüzen hücreler 15 mL tüplere alınmış ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Ardından süpernatant atılmıştır ve hücre pelleti 1 mL besiyeri ile pipetaj yapılarak homojenize hale getirilmiştir. Ardından 10 µL alınarak hemositometre ile çift tekrarlı hücre sayımı yapılmıştır. Hücre ekimi yapılacak petrilere besiyeri eklenmiştir ve uygun sayıda hücre içeren hücre süspansiyonu petrilere ekilerek inkübatöre koyulmuştur.

2.2.5. MTT Hücre Canlılığı Deneyi

Laduviglusib (CHIR-99021)'in doza ve zamana bağılı hücre canlılığına ket vurma potansiyelinin irdelenmesi MTT testi ile belirlenmiştir. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri 96 kuyucuklu plakalara, 1×10^4 hücre/kuyu ekildikten sonra gece boyunca yüzeye yapışmaları beklenmiştir. Hücreler 1-100 µM Laduviglusib (CHIR-

99021) ile muamele edildikten 24-48 saat sonra MTT tetrazolyum tuzu ile yaklaşık olarak 4 saat inkübasyona bırakılan örneklerdeki kesilmiş hale gelen formazan bileşikleri uygulama sonrası canlı hücrelerin hücre yüzeyinde birikmiştir, 4 saatin sonunda besiyeri atılmıştır ve her kuyucuğa 100 µL DMSO eklenmiştir ve 15 dakika karanlıkta bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası Cytation™ 3 cihazında 570 nm’de spektrofotometrik okuma yapılmıştır ve ilaç uygulanmamış kontrol örneklerle oranlama yapılarak Laduviglusib (CHIR-99021)’in hücre canlılığı üzerine etkisi belirlenmiştir. Her bir deney en az 3 tekrarlı ve iki ayrı hücre kültürü petrisinde gerçekleştirilmiştir. Belirlenen Laduviglusib (CHIR-99021) dozu ve zamanı diğer çalışmaların yürütülmesinde kullanılmak üzere belirlenmiştir.

2.2.6. *In Vitro* Hücre Sağkalım Deneyi

Laduviglusib (CHIR-99021)’in doza ve zamana bağlı hücre sağkalım kapasitelerine etkisinin irdelenmesi Tripan Boyaması ile yapılmıştır. MTT ile tespit edilen Laduviglusib (CHIR-99021) dozunun 24, 48 ve 72 saatte HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerinin bölünmeleri üzerine etkileri incelenmiştir. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri 6 kuyulu petriye $2-5 \times 10^4$ hücre/kuyu ekilmiştir. Bir gece hücrelerin petride yapışması beklenilmiştir ve 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması yapılmıştır ve 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İlaç uygulama saatleri tamamlandığında hücreler tripsin ile kaldırılmış ve 1200 rpm 5 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüj işleminin ardından petriden süpernatant atılıp 1 mL taze besiyeri ile süspanse edilmiştir. Ependorf tüpüne 10 µL hücre ve 10 µL tripan mavisini eklenmiştir ve homojenize edilmiştir. Boyalı hücrelerden 10 µL alınmıştır ve hemositometrede canlı hücreler sayılmıştır.

2.2.7. Koloni Oluşturma Potansiyeli Deneyi

Hücrelerin koloni oluşturma potansiyellerinin incelenmesi koloni boyama yöntemiyle yapılmıştır. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri 6 kuyucuk petriye 500 hücre/kuyu ekilmiştir. Hücrelerin bir gece boyu yapışması beklenilmiştir. Hücreler kontrol edildikten sonra hücrelere 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması yapılmıştır ve sonra petri 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İlaç uygulamasının 24 saati tamamlandığında petrideki kuyuların medyaları taze medya ile

değiştirilmiştir ve her 3 günde bir medya değişimi yapılarak 7 gün hücrelerin koloni oluşturması beklenmiştir. Koloni oluşumu gözlemlendikten sonra petride oluşan koloniler kristal viyole ile boyanmıştır. 7 günün sonunda petri kuyularındaki medyalar atılmış ve her kuyu 2 kez 1X PBS ile nazikçe yıkanmıştır. Hücrelerin fiksasyonu için her kuyuya 1 mL -20°C’de metanol (%100) koyulmuştur ve 10 dakika -20°C’de bekletilmiştir. Fiksasyon süresi tamamlandığında kuyulardaki metanol atılmıştır ve her kuyuya 1 mL %0,5 Kristal Viyole koyularak oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Boyama süresi tamamlandığında kuyulardaki kristal viyole atılmıştır ve her kuyu 2 kez distile su ile yıkanmıştır. Kuyulardaki boya kalıntıları yıkandıktan sonra petri kurumaya bırakılmıştır. Boyanan kolonilerin fotoğrafları çekilmiştir.

2.2.8. Yara Kapanma Deneyi

Hücrelerin yara iyileştirme aktivitesi yara kapanma deneyi ile gerçekleştirilmiştir. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petriye 3×10^5 hücre/kuyu ekilmiştir ve hücrelerin bir gece hücrelerin yapışması için beklenmiştir. Hücrelerin yapışma durumu kontrol edildikten sonra kuyulardaki hücre yüzeyinde 10’luk pipet ucuyla dikey bir şekilde yaralar oluşturulmuştur. Yaralar oluşturulduktan sonra kuyulardaki besiyerleri atılmıştır. Her kuyu 1X PBS ile yıkanmıştır ve hücrelere 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması yapılarak 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İlaç uygulamasının 0, 24, 48 ve 72. saatleri tamamlandığında oluşturulan yaraların görüntüleri Olympus CKX41 mikroskobu ile alınmıştır. Yaraların zamana bağlı olarak boyutları ve alanları ImageJ programı ile hesaplanmıştır.

2.2.9. Floresan Boyamaları

Laduviglusib (CHIR-99021)’in doza ve zamana bağlı hücre ölümü ve canlılığı üzerine etkisi floresan boyama ile irdelenmiştir.

2.2.9.1. 3,3’ Diheksiloksakarbosiyanin İyodür (DIOC6) Boyama

Laduviglusib (CHIR-99021)’in sağlıklı hücrelerdeki mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisini incelemek üzere HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin bir gece boyu yapışması beklenmiştir. Hücreler kontrol edildikten sonra hücrelere 15 μ M

Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması yapılmıştır ve petri 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İlaç uygulamasının 24 saati tamamlandığında hücreler 0,25 μ M DiOC6 içeren serumsuz besiyeri ile 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon tamamlandığında hücrelerin Cytation3 (BioTek) cihazında yeşil filtrede eksitasyon 488 nm ve emisyon 525 nm’de floresan görüntüleri alınmıştır.

2.2.9.2. 4’,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

Laduviglusib (CHIR-99021)’in hücre ölümü ve nükleer kondenzasyon üzerine etkisini incelemek üzere HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin bir gece boyu yapışması beklenmiştir. Hücreler kontrol edildikten sonra hücrelere 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması yapılmıştır ve petri 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İlaç uygulamasının 24 saati tamamlandığında hücrelere 0,5 mg/mL DAPI boyası (Ana Stok: 5 mg/ml) içeren serumsuz besiyeri ile 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon tamamlandığında hücrelerin Cytation3 cihazında DAPI filtresinde eksitasyon ve emisyon sırasıyla 377 nm ve 447 nm’de floresan görüntüleri alınmıştır.

2.2.9.3. Akridin Turuncusu (AO) Boyama

Laduviglusib (CHIR-99021)’in asidik veziküler organel birikimi ile otofajik aktivite üzerine etkisini incelemek üzere HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir ve hücrelerin bir gece boyu yapışması beklenmiştir. Hücreler kontrol edildikten sonra hücrelere 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması yapılmıştır ve petri 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İlaç uygulamasının 24 saati tamamlandığında hücreler 1 μ L %0,5 Glasiyel Asetik Asit içeren Akridin Turuncusu içeren serumsuz besiyeri ile 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon tamamlandığında Cytation3 cihazında Texas Red filtresinde eksitasyon ve emisyon sırasıyla 586 nm ve 647 nm’de floresan görüntüleri alınmıştır.

2.2.9.4. MitoTracker Red CMXRos Boyama

Hücrelerdeki mitokondriyal kütleyi ve oksidatif aktiviteyi incelemek için HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir ve hücrelerin bir gece boyu yapışması beklenmiştir. Hücreler kontrol edildikten sonra hücrelere 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması yapılmıştır ve petri 24

saat inkübasyona bırakılmıştır. İlaç uygulamasının 24 saati tamamlandığında hücreler 1XPBS ile yıkanmıştır ve 1:1000 oranında serumsuz besiyerinde seyreltilmiş 500 µL MitoTracker™ Red CMXRos boyası ile boyanmıştır. Daha sonra hücreler 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından canlı hücrelerin hücre içi mitokondriyal kütlesi ve oksidatif aktivitesi gözlemlenmiştir. Hücrelerin fotoğrafları, ZOE floresan mikroskobu kullanılarak eksitasyon ve emisyon sırasıyla 579 nm ve 599 nm’de floresan görüntüleri alınmıştır.

2.2.9.5. 2', 7'-Diklorodihidrofloresein Diasetat (CM-H2DCFDA) Boyama

Reaktif oksijen türlerinin tespiti için HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir ve hücrelerin bir gece boyu yapışması beklenmiştir. Hücreler kontrol edildikten sonra hücelere 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması yapılmıştır ve petri 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İlaç uygulamasının 24 saati tamamlandığında hücreler 1XPBS ile yıkanmıştır ve 1:1000 oranında serumsuz besiyerinde seyreltilmiş CM-H2DCFDA ile boyanmıştır. Daha sonra hücreler 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon tamamlandığında ZOE floresan mikroskobu kullanılarak eksitasyon ve emisyon sırasıyla 495 nm ve 529 nm’de floresan görüntüleri alınmıştır.

2.2.10. Memeli Hücrelerinden Total Protein İzolasyonu

HCT-116 kolon kanseri hücrelerinden protein izolasyonu için hücreler 1×10^6 hücre/petri olacak şekilde 60 mm hücre kültürü kaplarına ekilerek 37 °C %5 CO₂ ortamda memeli hücre kültürü inkübatöründe bir gece yapışmıştır. Hücelere 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) 24 saat uygulanmıştır. Ayrıca ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerde eş zamanlı deney planına katılmıştır. 24 saat ilaç uygulamasını takiben hücreler 1X PBS ile yıkanmıştır. Ardından tekrar 1X PBS ile petri yüzeyinde yapışık olan hücreler hücre kazıyıcı ile kazınmıştır. Eppendorflarda toplanan hücreler 1X PBS ile yıkanmıştır ve 100-150 µL (hücre yoğunluğuna bağlı olarak) Memeli Hücresi Lizis Tamponu (M-PER) ile re-süspanse edilerek 20 dakika boyunca oda sıcaklığında bulunan çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası yaklaşık 20 dakika 16.000 x g ve +4°C’de santrifüj edilmiştir ve süpernatant “total protein lizati” olmak üzere steril tüplerde -20°C’de saklanmıştır.

2.2.11. Bradford Protein Miktar Tayini

İlaç ve kontrol grubu hücrelerinden izole edilen proteinlerin toplam miktarlarını belirlemek amacıyla Bradford tayini yapılmıştır. 2 mg/mL ana stok BSA 1X PBS içinde hazırlanmıştır. Hazırlanan BSA'dan artan miktarlarda (150 -1000 µg/mL) standart eğri hazırlanmak için 96-kuyucuklu mikropalakaya eklenmiştir. Ayrıca konsantrasyonu tayin edilmek üzere her bir örnekten 1 µL alınmıştır ve 96 kuyucuklu plakaya etiket sırasıyla eklenmiştir. Bütün kuyucuklara 200 µL Bradford Solüsyonu 1X Bradford ayırıcı koyulmuştur ve karanlık ortamda 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir, ardından spektrofotometrede 595 nm'de ölçüm alınmıştır. BSA örnekleri tayini ile elde edilen konsantrasyon ve absorbans değerleri kullanılarak bir grafik oluşturulmuştur ve grafiğe ait standart eğri elde edilmiştir. Hazırlanan standart eğrinin denklemi yardımıyla ilaç ve kontrol grubu örneklerinin protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

2.2.12. İmmüno blotlama Yöntemi

2.2.12.1. SDS Poli akrilamid Jel Hazırlanışı

Bradford protein miktar tayini aracılığıyla hesaplanan konsantrasyonlardaki ilaç uygulanmamış HCT-116 hücre özütleri ve 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulanmış HCT-116 hücre lizatları Poli akrilamid Jel Elektroforezi ile yürütülmüştür. Yürütme jeli (%12) hazırlanmıştır ve 1 mm aralıklı iki cam arasına dökülmüştür ve jel yüzeyini korumak amacıyla izopropil alkol koyulmuştur. Yürütme jelinin polimerizasyonu ile donması tamamlanınca arta kalan izopropil alkol ise filtre kâğıdı yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Ardından yükleme jeli (%4) hazırlanmıştır ve polimerleşmiş yürütme jelinin üstüne eklenmiştir. Uygun kalınlıktaki taraklar iki cam arası oturtulmuştur ve yükleme jelinin de polimerleşmesi beklenilmiştir. Yürütme ve yükleme jeli içerikleri Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4. Poliakrilamid Jel İçerikleri (%4 ve %12)

	Yükleme Jeli (%4)	Yürütme Jeli (%12)
dH ₂ O (distile su)	1,5 mL	3,5 mL
1,5 M Tris-HCl pH: 8,8	-	2,6 mL
0,5 M Tris-HCl pH: 6,8	0,625 mL	-
SDS (%10)	0,02 mL	0,1 mL
Akrilamid/Bis-Akrilamid (%30)	0,4 mL	4 mL
APS (%10)	0,05 mL	0,08 mL
TEMED	0,005 mL	0,01 mL

2.2.12.2. Protein Örneklerinin Hazırlanması ve Jele Yüklmesi

Bradford protein miktar tayini ile belirlenmiş örnek konsantrasyonları ve 30-50 µg protein örneği Laemmli (4X) tamponu ile oranı 3:1 olacak şekilde karıştırılmıştır ve yaklaşık 5-6 dakika boyunca 95°C inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan jeller, 1X SDS-PAGE Yürütme Tamponu eklenen Invitrogen Tank sistemine yerleştirilmiş, taraklar nazik bir şekilde dikey elektroforez sisteminden çıkartılarak, kuyucuklar 1X SDS-PAGE Yürütme Tamponu ile yıkanmıştır. Laemmli Yükleme tamponu ile hazırlanan örnekler ilk kuyucuğa Pre-Stain Protein belirteci, kalan kuyucuklara da sırasıyla örnekler koyulmuştur. Örnek yükleme işleminin ardından jel 70-80 Volt'ta yürütülmüştür.

2.2.12.3. Protein Örneklerinin Membran Transferi

Jel yürütmenin ardından camlar ticari firmanın ayırıcı yardımı ile birbirinden ayrılmış ve yükleme jeli atılmıştır. Yürütme jeli ilk olarak distile su içine sonra transfer tamponu içine koyulmuştur. 0.22 µm PVDF malzemeli membran önce metanol içerisinde 45 saniye-1 dakika arasında etkin hale getirilmiştir ve sonrasında önce distile su sonra 1X transfer tamponu içerisine aktarılmıştır. Uygun boyuttaki kaba filtre kağıtları ve kullanılacak süngerler de transfer tamponuna alınmıştır ve ıslak olmaları sağlanmıştır. Transfer aşaması sırasıyla sandviç kalıbı ile ilk sünger, filtre kâğıdı, PVDF membran,

yürütme jeli, filtre kâğıdı, son sünger olarak oluşturulmuştur ve sandviç kalıbı transfer tankı içerisine yerleştirilmiştir. Tank içerisinde yaklaşık olarak 500 mL 1X transfer tamponu koyulmuştur ve jeldeki örnekleri membrana transfer etmek üzere 20 Volt'ta ortalama 1 saat bırakılmıştır. Jeldeki örneklerin transferi tamamlanınca PVDF membran bloklamak üzere yağsız süt (%5 süt 1:1000 / 1X TBS-Tween) bulunan falkona koyulmuştur oda sıcaklığı koşullarında 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.12.4. Membrana Antikor Uygulaması ve Görüntü Alma

Çalışma dahilinde kullanacak olan Primer antikor çeşitleri 1:1000 ve sekonder antikor çeşitleri 1:3000 olacak şekilde %5 blokama süt içinde hazır hale getirilmiştir. Transfer edilmiş proteinleri bulunduran membran blokama sonrası primer antikor çeşitleri ile bir gece +4°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Primer antikor uygulamasının ardından membrana 3 x 15 dakika TBS-Tween yıkaması yapılmıştır ve primer antikor çeşidine uyumlu HRP-bağlı sekonder antikor içeren blokama sütüne koyulmuştur ve bir gece +4°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Sekonder antikor inkübasyonu tamamlandıktan sonra 3 x 15 dakika TBS-Tween yıkaması yapılmıştır. Membran görüntülerini almak amacıyla kemiluminesans çözeltiler olan A tamponu ve B tamponu oranları 1:1 olacak şekilde karıştırıldıktan sonra 4-5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası PVDF membranlar A-B tampon çözelti karışımına koyulmuştur ve CCD kamera ve/veya Proxima cihazı ile karanlık ortamda görüntü alınmıştır. Görüntüleme tamponlarının içerikleri Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.5. Kemiluminesans Görüntüleme Tamponları (A ve B) İçerikleri

	A-tampon	B-tampon
dH ₂ O (distile su)	9 mL	9 mL
Luminol	0,15 mL	-
Kumarik Asit	0,075 mL	-
Tris baz (p:8,5)	1 mL	1 mL
H ₂ O ₂ (Hidrojen peroksit)	-	0,015 mL

2.2.13. İstatiksel Analiz

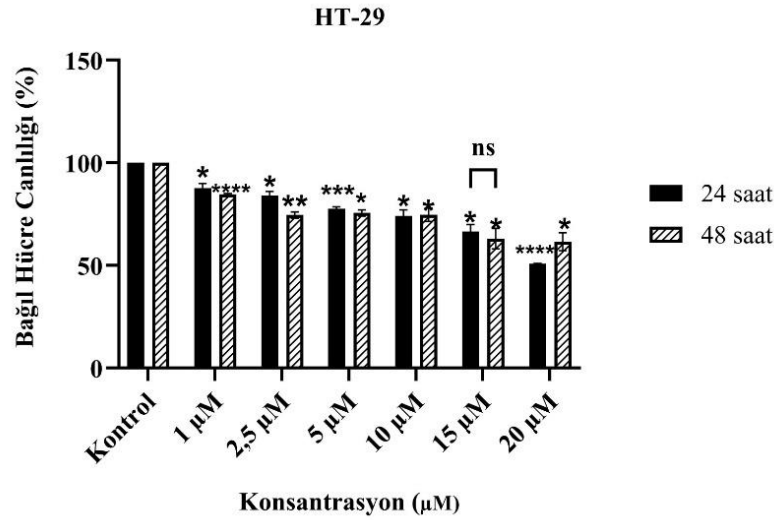
Deney tekrarları üç kez yapılmıştır ve istatiksel ortalamaları hesaplanmıştır. Deney sonuçları istatiksel analiz kapsamında GraphPad Prism v10.1.2 aracılığıyla değerlendirilmiştir. İstatiksel farklılıklar için Two-way ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$).



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 ve HCT-116 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Doza ve Zamana Bağlı Etkisinin Gösterilmesi

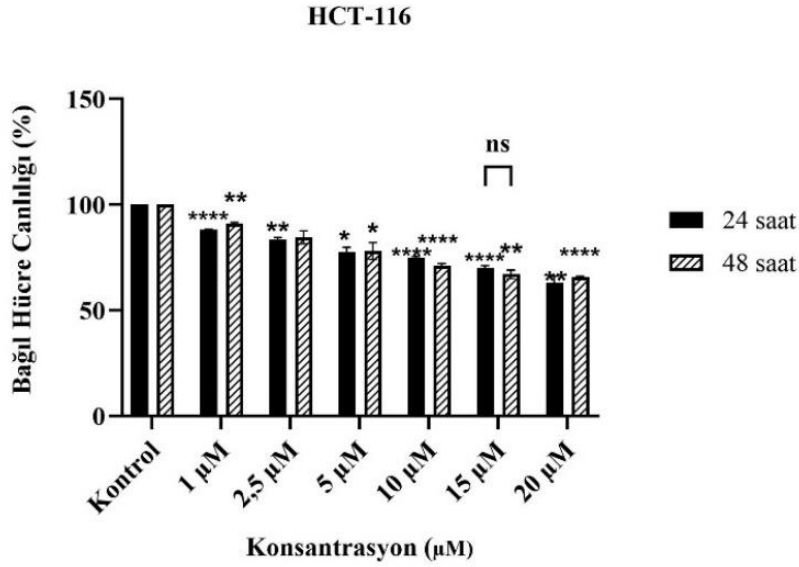
Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 kolorektal kanseri hücrelerinin canlılığı üzerine doza ve zamana bağlı etkisi MTT hücre canlılığı testi ile gösterilmiştir. MTT testi sonucuna göre 24 saat 1 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in ilaç uygulanmamış kontrole oranla HT-29 hücrelerinin canlılığına %12,4 (*p:0,045), 48 saat 1 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) ilaç uygulamasının da hücre canlılığına %15,5 oranında ket vurduğu görülmüştür (****p<0,0001). 24 saat 2,5 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in ilaç uygulanmamış kontrole oranla HT-29 hücrelerinin canlılığına %16,1 (*p:0,022), 48 saat 2,5 μ M ilaç uygulamasının ise hücre canlılığına %25,5 oranında ket vurduğu görülmüştür (**p:0,004). 24 saat 5 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in ilaç uygulanmamış kontrole oranla HT-29 hücrelerinin canlılığına %22,5 (***p:0,009), 48 saat 5 μ M ilaç uygulamasının ise %24,5 oranında ket vurduğu görülmüştür (**p:0,005). 24 saat 10 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in ilaç uygulanmamış kontrole oranla HT-29 hücrelerinin canlılığına %25,9 (*p:0,017), 48 saat 10 μ M ilaç uygulamasının ise %25,3 oranında ket vurduğu görülmüştür (*p:0,021). 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in ilaç uygulanmamış kontrole oranla HT-29 hücrelerinin canlılığına %33,5 (*p:0,015), 48 saat 15 μ M ilaç uygulamasının ise %37 oranında ket vurduğu görülmüştür (*p:0,024). 24 saat 20 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in ilaç uygulanmamış kontrole oranla HT-29 hücrelerinin canlılığına %49,1 (****p<0,0001), 48 saat 20 μ M ilaç uygulamasının ise %38,5 oranında ket vurduğu görülmüştür (*p:0,017) (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 hücre hattında hücre canlılığı üzerine doza ve zamana bağlı etkisinin gösterilmesi. Sitotoksik yanıtları değerlendirmek için 0, 1, 2,5, 5, 10, 15 ve 20 µM Laduviglusib (CHIR-99021) ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edilen HT-29 hücrelerinin karşılaştırmalı MTT hücre canlılığı analizi. Sütunlar, en az beş tekrara sahip üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ Std. sapmasını temsil eder (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerinin canlılığı üzerine doza ve zamana bağlı etkisi MTT bağıl hücre canlılığı testi ile gösterilmiştir. MTT testi sonucuna göre 24 saat 1 µM Laduviglusib (CHIR-99021)'in ilaç uygulanmamış kontrole oranla HCT-116 hücrelerinin canlılığına %11,8 (**** $p < 0,0001$), 48 saat 1 µM Laduviglusib (CHIR-99021) ilaç uygulamasının da hücre canlılığına %9,2 oranında ket vurduğu görülmüştür (** $p < 0,009$). 24 saat 2,5 µM Laduviglusib (CHIR-99021)'in ilaç uygulanmamış kontrole oranla HCT-116 hücrelerinin canlılığına %16,6 (** $p < 0,005$), 48 saat 2,5 µM ilaç uygulamasının ise hücre canlılığına %15,5 oranında ket vurduğu görülmüştür (ns: $p > 0,01$). 24 saat 5 µM Laduviglusib (CHIR-99021)'in ilaç uygulanmamış kontrole oranla HCT-116 hücrelerinin canlılığına %22,3 (* $p < 0,012$), 48 saat 5 µM ilaç uygulamasının ise %22,2 oranında ket vurduğu görülmüştür (* $p < 0,043$). 24 saat 10 µM Laduviglusib (CHIR-99021)'in ilaç uygulanmamış kontrole oranla HCT-116 hücrelerinin canlılığına %25,2 (**** $p < 0,0001$), 48 saat 10 µM ilaç uygulamasının ise %29,1 oranında ket vurduğu görülmüştür (**** $p < 0,0001$). 24 saat 15 µM

Laduviglusib (CHIR-99021)'in ilaç uygulanmamış kontrole oranla HCT-116 hücrelerinin canlılığına %30,3 (**** $p<0,0001$), 48 saat 15 μM ilaç uygulamasının ise %32,1 oranında ket vurduğu görülmüştür (** $p<0,005$). 24 saat 20 μM Laduviglusib (CHIR-99021)'in ilaç uygulanmamış kontrole oranla HCT-116 hücrelerinin canlılığına %35,9 (** $p<0,009$), 48 saat 20 μM ilaç uygulamasının ise %34,5 oranında ket vurduğu görülmüştür (**** $p<0,0001$) (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 hücre hattında hücre canlılığı üzerine doza ve zamana bağlı etkisinin gösterilmesi. Sitotoksik yanıtları değerlendirmek için 0, 1, 2,5, 5, 10, 15 ve 20 μM Laduviglusib (CHIR-99021) ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edilen HCT-116 hücrelerinin karşılaştırmalı MTT hücre canlılığı analizi. Sütunlar, en az beş tekrara sahip üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ Std. sapmasını temsil eder (ns: $p>0,05$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$).

Literatürde Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerinin canlılığı üzerine doza ve zamana bağlı etkisine ait herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücre hatlarında gerçekleştirilen zamana ve doza bağlı Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması sonucunda bağlı hücre canlılığının her iki hücre hattında artan doza bağlı anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir. MTT testi sonucuna göre HCT-116 hücre hattı ile HT-29 hücre hattı karşılaştırıldığında HCT-116 hücre hattında daha dirençli bir sitotoksik yanıt

tespit edilmiştir. Bunun sebebi olarak HT-29 kolorektal kanseri hücrelerinin p53 mutasyonu taşıması ve HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerinin doğal tip p53 ve Mikrosatelit kararsızlığı taşıması olduğu düşünülmektedir (Yao ve ark., 2005). Her iki hücre hattında da hücre canlılığına ket vurmada 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının 24 ve 48 saatte kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farkının bulunmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar kapsamında 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

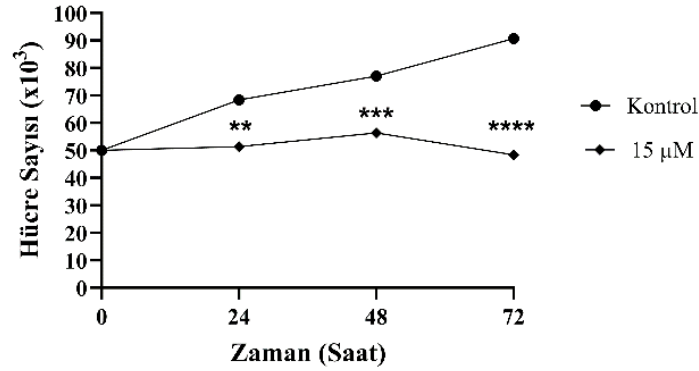
GSK-3 aktivitesinin onkogenezi baskıladığı ve oral, karaciğer ve akciğer dahil olmak üzere kanser türlerinde sıklıkla inaktive edildiği çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (Schatoff ve ark., 2017). Yang ve arkadaşlarının 2024 yılında glioma hücreleri üzerinde yaptığı bir çalışmada β -katenin stimülatörü olarak Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının WNT/ β -katenin sinyal yolağını aktive ettiğini ve transmembran protein 64 (TMEM64) ile susturulmuş A172 ve T98G hücre hatlarında gliomanın malign fenotipini ve agresyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir. Ayrıca Laduviglusib (CHIR-99021)'in erken ve geç apoptotik hücreler oranında TMEM64 susturulmasına bağlı artışı etkili bir şekilde engellediğini de ortaya koymuştur (Yang ve ark., 2024). Laduviglusib (CHIR-99021)'in çeşitli kanser hücrelerinde kombine olarak kullanımı yaygın olarak yapılmaktadır. Doza ve zamana bağlı kombine tedavi çalışmalarda çeşitli dozlarda kullanılan Laduviglusib (CHIR-99021)'in GSK-3 β inhibisyonu ele alınmaktadır. Akciğer hücreleri ile oluşturulan tümör sferoid modellerde GSK-3 β inhibitörü olarak kullanılan Laduviglusib (CHIR-99021)'in akciğer kanseri hücre hatlarında kemoterapötik bir ajan olan Gefitinib ile kombinasyon halinde kullanıldığında belirgin bir şekilde proliferasyonu azalttığı ve akciğer kanseri tedavisinde umut edici bir etkiye sahip olduğu Kim ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan bir çalışmada ortaya konulmuştur. Çalışma sonucunda 1 ve 2 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının kombine kullanımının akciğer tümör modellerinde başarılı bir etki gösterdiği görülmektedir (Kim ve ark., 2019). GSK-3 β inhibisyonu, kanonik WNT/ β -katenin yolağı ile ilişkilidir ve inhibisyon sonucu hücrelerin hayatta kalma mekanizmalarının engellendiği bilinmektedir. Kanser hücrelerinde GSK-3 β inhibisyonu hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerinde baskılayıcı bir etki yaratmaktadır (Law ve Zheng, 2022). Yapılan başka bir çalışmada ise Cisplatin ile Laduviglusib (CHIR-99021)'in yumurtalık kanseri hücrelerinde kombine olarak kullanımının hücre canlılığını

azaltma açısından daha başarılı olduğu bildirilmiştir (Huang ve ark., 2016). GSK-3 β inhibisyonun WNT/ β -katenin yolağı ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. GSK-3 β inhibisyonu ile WNT/ β -katenin yolağı arasındaki ilişkiyi incelemek üzere nadir olarak karşılaşılan bir tür olan epitelyal sarkoma hücrelerinde Russi ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptıkları çalışmada GSK-3 β inhibisyonunda doza ve zamana bağlı Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması yapılmıştır. Hücre canlılığı deneyi olan sonucunda belirlenen 24 ve 48 saat 50 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulanan yumuşak doku sarkoma hücrelerinde hücre canlılığına ket vurma sırasıyla %30 ve %60 olarak tespit edilmiştir ve hücre döngüsünün tutulması, hücre proliferasyonunda azalma, mitotik katastrofi (MC) ve otofajik aktivitede artış gözlemlenmiştir (Russi ve ark., 2021). Laduviglusib (CHIR-99021)'in çeşitli kanserlerde tek başına kullanımının da kanser hücrelerinin karakterini baskıladığı düşünülmektedir.

3.2. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 ve HCT-116 Kolorektal Kanseri Hücre Hatlarında *In Vitro* Hücre Sağkalımı Üzerine Zamana Bağlı Etkisinin Gösterilmesi

MTT bağıl hücre canlılığı testine göre belirlenen 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 kolorektal kanseri hücrelerinde *in vitro* hücre sağkalımı deneyi gerçekleştirilmiştir. 50x10³ hücre/kuyucuk olarak ekilen HT-29 kolorektal kanseri hücreleri 24, 48 ve 72 saatte ilaç uygulanmamış kontrol grubunda sırasıyla 70x10³, 179,7x10³ ve 211,3x10³ hücre sayısına ulaşmıştır. 50x10³ olarak ekilen HT-29 kolorektal kanseri hücreleri 24, 48 ve 72 saatte 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulanmış ilaç grubunda sırasıyla 51,3x10³, 38x10³ ve 46x10³ hücre sayısına ulaşmıştır (24 saat için **p: 0,0016, 48 saat için ***p:0,0006, 72 saat için ****p<0,0001 bulunmuştur.). HT-29 kolorektal kanseri hücrelerinde hücre sağkalımı deneyi sonucunda 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının 24 ve 48 saatte hücre proliferasyonuna ket vurmada sitostatik ve 72 saatte sitosidal etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 3.3).

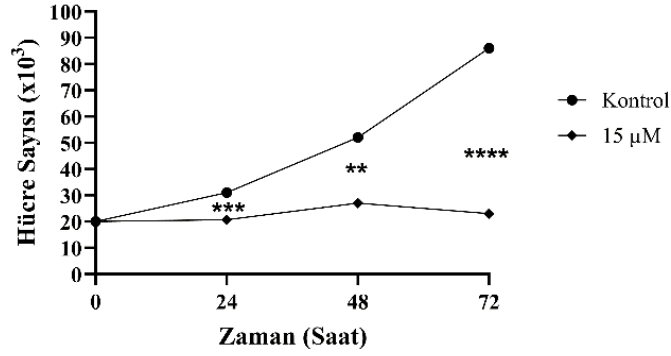
HT-29 hücre hattında hücre sağkalım deneyi



Şekil 3. 3. HT-29 hücre hattında *in vitro* hücre sağkalım deneyi. Hücrelere 0, 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulanmıştır. İlaç uygulama süresi sonunda canlı hücreler sayılmıştır. Deney sonuçları üç tekrarlı uygulamanın ortalaması olarak verilmiştir (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

MTT hücre canlılığı testine göre belirlenen 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerinde hücre sağkalımı deneyi gerçekleştirilmiştir. 20×10^3 hücre/kuyucuk olarak ekilen HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri 24, 48 ve 72 saatte ilaç uygulanmamış kontrol grubunda sırasıyla $31,2 \times 10^3$, $52,4 \times 10^3$ ve 86×10^3 hücre sayısına ulaşmıştır. 20×10^3 olarak ekilen HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri 24, 48 ve 72 saatte 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulanmış ilaç grubunda sırasıyla $20,3 \times 10^3$, 27×10^3 ve 23×10^3 hücre sayısına ulaşmıştır (24 saat için *** p : 0,0003, 48 saat için ** p : 0,0016, 72 saat için **** p : 0,0001 bulunmuştur.) HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerinde hücre sağkalımı deneyi sonucunda 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının 24, 48 ve 72 saatte hücre proliferasyonuna ket vurmada sitostatik etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 3.4).

HCT-116 hücre hattında hücre sağkalım deneyi



Şekil 3. 4. HCT-116 hücre hattında *in vitro* hücre sağkalım deneyi. Hücrelere 0, 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulanmıştır. İlaç uygulama süresi sonunda canlı hücreler sayılmıştır. Deney sonuçları üç tekrarlı uygulamanın ortalaması olarak verilmiştir (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücre hatlarında hücre sağkalımı üzerine etkisi incelendiğinde zamana bağlı ilaç uygulamasının kontrol grubuna kıyasla hücre proliferasyonunu anlamlı olarak engellediği tespit edilmiştir. Her iki hücre hattında da 48 saat 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması sonucu hücrelerin çoğalma direncinin kırıldığı görülmüştür. Ayrıca HCT-116 hücre hattının HT-29 hücre hattına kıyasla hücre sağkalım yüzdesinin daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

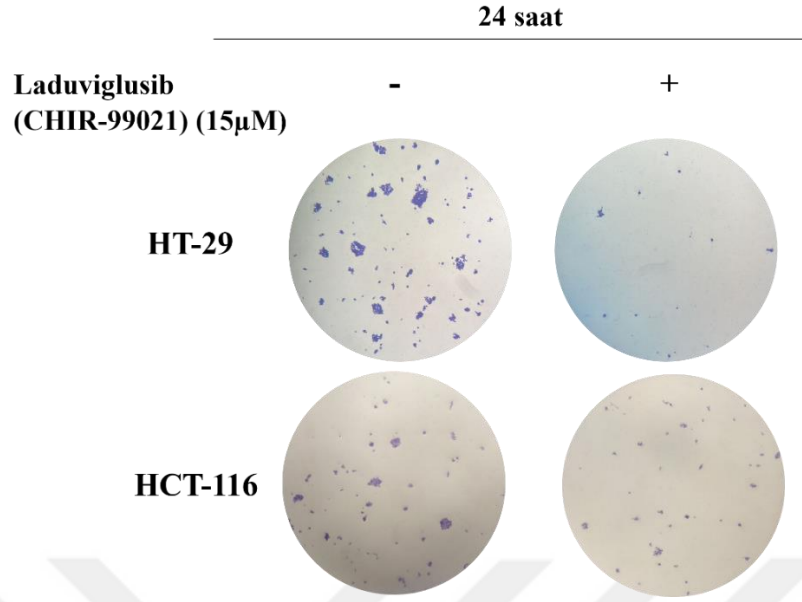
Literatürde hücre proliferasyonu üzerine etkisini incelemek üzere Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının epitelyal sarkoma hücrelerinde yapılan çalışmada 48 saat 50 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının hücre sayısında %50 azalmaya neden olduğu görülmüştür. Ayrıca Laduviglusib (CHIR99021) ile GSK-3 β inhibisyonunun Mitotik Katastrofi ve otofaji aracılı hücre ölümünün indüklenmesinde kilit bir role sahip olduğu da çalışma sonucunda söz konusudur (Russi ve ark., 2021). Vincent ve arkadaşlarının 2014 yılında Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri hücrelerinde (NSCLC) üzerine yaptıkları çalışmada 24, 48 ve 72 saat uygulanan 0, 5 ve 10 µM Laduviglusib (CHIR99021)'in GSK-3 inhibisyonu üzerine hücre proliferasyonuna etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda artan zamana bağlı olarak 10 µM Laduviglusib (CHIR99021) uygulamasının diğer dozlara oranla daha etkili şekilde hücre

proliferasyonunu engellediği bildirilmiştir (Vincent ve ark., 2014). Literatürde yapılan çalışmalar doğrultusunda Laduviglusib (CHIR-99021)'in çeşitli kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunda engelleyici bir etkisi olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücre hatlarında uygulanan 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021), bahsedilen çalışmalar ile destekleyici ve paralel bir sağkalım baskılayıcı özellik gösterdiği tespit edilmiştir.

3.3. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 ve HCT-116 Kolorektal Kanseri Hücre Hatlarında Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisi

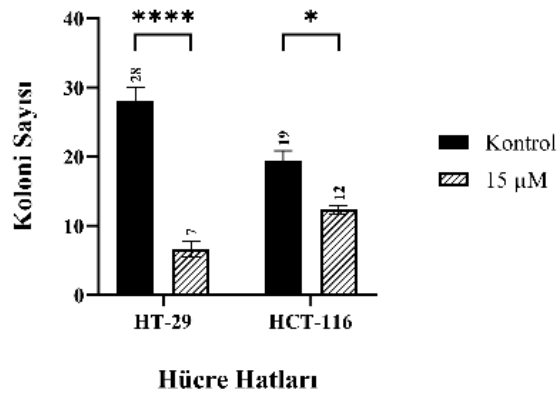
HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerinde 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021)'in koloni oluşturma potansiyelini incelemek üzere koloniler kristal viyole boyama tekniği gerçekleştirilmiştir. 500 hücre/kuyucuk olarak ekilen her iki hücre hattı da 24 saat 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulama sonrası yaklaşık 10 gün boyunca koloni oluşumunu gözlemlemek üzere büyütülmüştür. HT-29 kolorektal kanseri hücrelerine 24 saat ilaç uygulanmamış kontrol grubunda ve ilaç uygulanmış grupta sırasıyla 28 ve 7 koloni sayılmıştır (**** $p < 0,0001$). HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerine 24 saat ilaç uygulanmamış kontrol grubunda ve ilaç uygulanmış grupta sırasıyla 19 ve 12 koloni sayılmıştır (* $p: 0,015$) (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6).

Koloni oluşturma potansiyeli, hücrelerin belirli bir sayıda ve sürede oluşturdukları koloni grupları ile incelenmektedir. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerinde 24 saat boyunca yapılan ilaç uygulaması sonucunda hücrelerin koloni oluşturma potansiyellerinde anlamlı bir azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. 24 saat 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması sonucunda HT-29 hücre hattında HCT-116 hücre hattına göre koloni oluşumunun daha etkin şekilde baskılandığı belirlenmiştir (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6).



Şekil 3. 5. HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarında koloni oluşumunun gösterilmesi. Koloni oluşumunu değerlendirmek için HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerine 24 saat 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulanmıştır. Daha sonra, hücrelerin karşılaştırmalı koloni oluşumu her iki günde bir besiyeri takviyesiyle 10 günlük uygulamadan sonra sayılmıştır. Temsili görüntüler iki bağımsız kopyadan alınmıştır.

HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarında koloni oluşumu deneyi



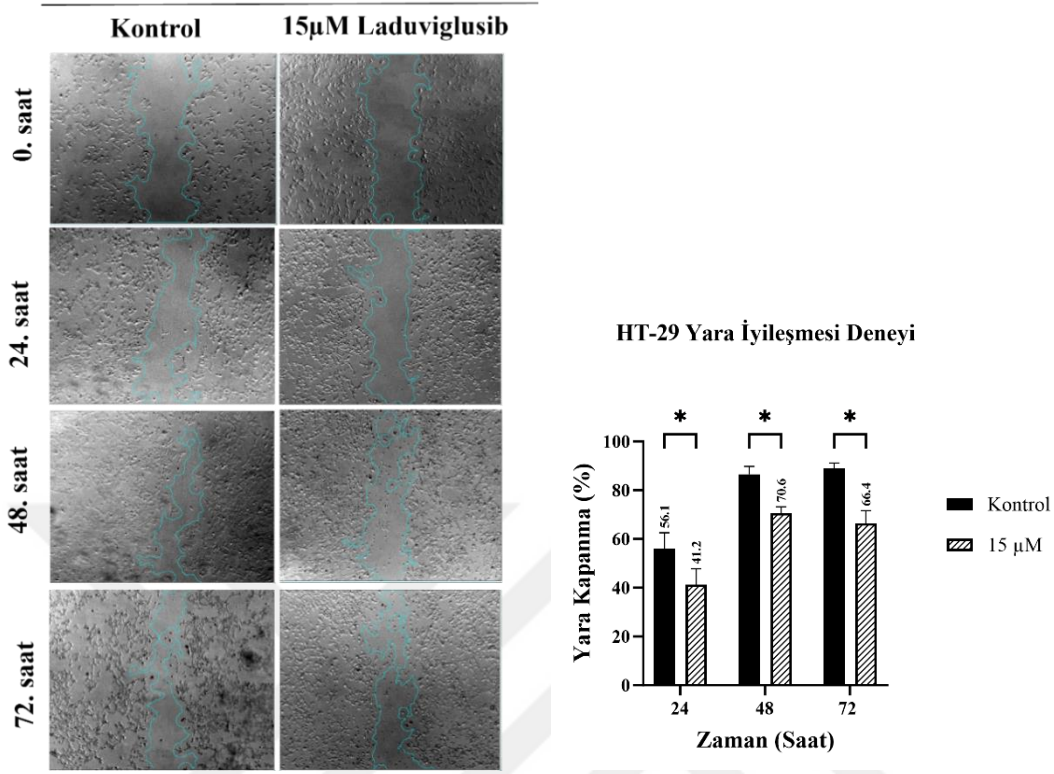
Şekil 3. 6. HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarında koloni oluşturma potansiyeli deneyine bağlı olarak koloni sayısı grafiği (*p<0,05, ****p<0,0001).

Koloni oluşturma aktivitesinin incelenmesi kapsamında tekil bir hücrenin koloni oluşturma yeteneğine dayanan *in vitro* bir hücre hayatta kalma deneyidir. GSK-3 'nın hayatta kalma, farklılaşma, gelişimde rol oynayan EMT ve benzeri biyokimyasal süreçlerde rol oynadığı göz önünde bulundurulduğunda 15  M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması ile GSK-3  inhibisyonunun hücrelerin koloni oluşturma potansiyellerine ket vurduğu görülmektedir. HCT-116 hücrelerinin ve HT-29 hücrelerinin farklı mutasyon profillerine sahip olmaları nedeniyle ilaç uygulamasına karşı gösterdikleri hayatta kalma ve sağkalım yanıtının da farklılık gösterdiği düşünülmektedir. 2024 yılında A172 ve T98G glioma hücre hatlarında yapılmış olan bir çalışmada TMEM64'in lentiviral siRNA aracılı susturulması ile Laduviglusib (CHIR-99021)'in beraber uygulamasının glioma hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelini azalttığı gözlemlenmiştir. Çalışma  ıktısı olarak Laduviglusib (CHIR-99021)'in WNT/ -katenin aktivatörü olarak kullanılması malign özelliğe sahip glioma hücrelerinin fenotipini baskılamıştır (Yang ve ark., 2024). Endotelyal mezankimal geçişler biyolojik gelişimde rol alan ve kanser oluşumunda anjiyojenez, metastaz ve hücre proliferasyonunda rol alan dinamik bir mekanizmadır (Wang ve ark., 2022). Laduviglusib (CHIR-99021)'in EMT inhibisyonunu ortaya koyan başka bir çalışma da 2024 yılında Song ve arkadaşları tarafından dirençli hepatoselüler karsinoma hücreleri üzerinde yürütülmüştür. Çalışma sonucunda 1  M Laduviglusib (CHIR-99021)'in Sorafenib ile kombine kullanımının anti-kanser etkinliğini arttırdığı ve EMT inhibisyonuna bağlı olarak hepasel ler karsinoma hücrelerinin gelişimini engelleyen yardımcı bir anti-fibrotik aday gösterilebileceği bildirilmiştir (Song ve ark., 2024). Doku gelişimi ve tamirinde kök hücre çalışmaları doğrultusunda tekil hücrelerin doku bazında gelişmesi ve özelleşmesi üzerine araştırmalar bulunmaktadır. Kök hücre gelişimi ve farklılaşmasında rol oynayan GSK-3  inhibisyonunun kanser kök hücreleri üzerinde engelleyici bir etkiye sahip olduğu söz konusudur (Chen ve ark., 2012). Ishida ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada indüklenmiş kolon kanser kök hücrelerinde Laduviglusib (CHIR-99021) kullanımı ile GSK-3  inhibisyonu sağlanması hücrelerin sferoid koloni oluşturma potansiyelini baskıladığı gözlemlenmiştir (Ishida ve ark., 2017).

3.4. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 ve HCT-116 Kolorektal Kanseri Hücre Hatlarında Yara İyileştirme Aktivitesi Üzerine Etkisi

Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında oluşturulan yaraları iyileştirme aktivitesi üzerine yara kapanma deneyi gerçekleştirilmiştir. 3×10^5 hücre/kuyucuk olarak ekilen hücrelerin plaka yüzeyinde oluşturdukları hücre tabakasında pipet ucuyla yaralar açılmıştır ve eş zamanlı olarak ilaç grubu ile kontrol grubunda açılan yaraların zamana bağlı olarak kapanma yüzdeleri incelenmiştir. HT-29 hücre hattında ilaç uygulanmamış kontrol grubunda 24, 48 ve 72 saatte yara kapanma yüzdeleri sırasıyla %56,1, %85,3, %91,2 olarak hesaplanmıştır. 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulanan HT-29 hücre hattında 24, 48 ve 72 saatte yara kapanma yüzdeleri ise sırasıyla %41,2 (*p: 0,041), %70,6(*p: 0,035) ve %66,4 (*p:0,012) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulanan HT-29 hücrelerinde zamana bağlı olarak kontrol grubunda oluşturulan yaraların kapanma oranları artarken, ilaç grubunda yara kapanma aktivitesinin anlamlı olarak baskılandığı tespit edilmiştir. Ayrıca HT-29 hücre hattında 48 saat ilaç uygulamasının 24 saatlik ilaç uygulamasına göre daha etkili bir şekilde yara kapanma aktivitesini önemli ölçüde engellediği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 3.7).

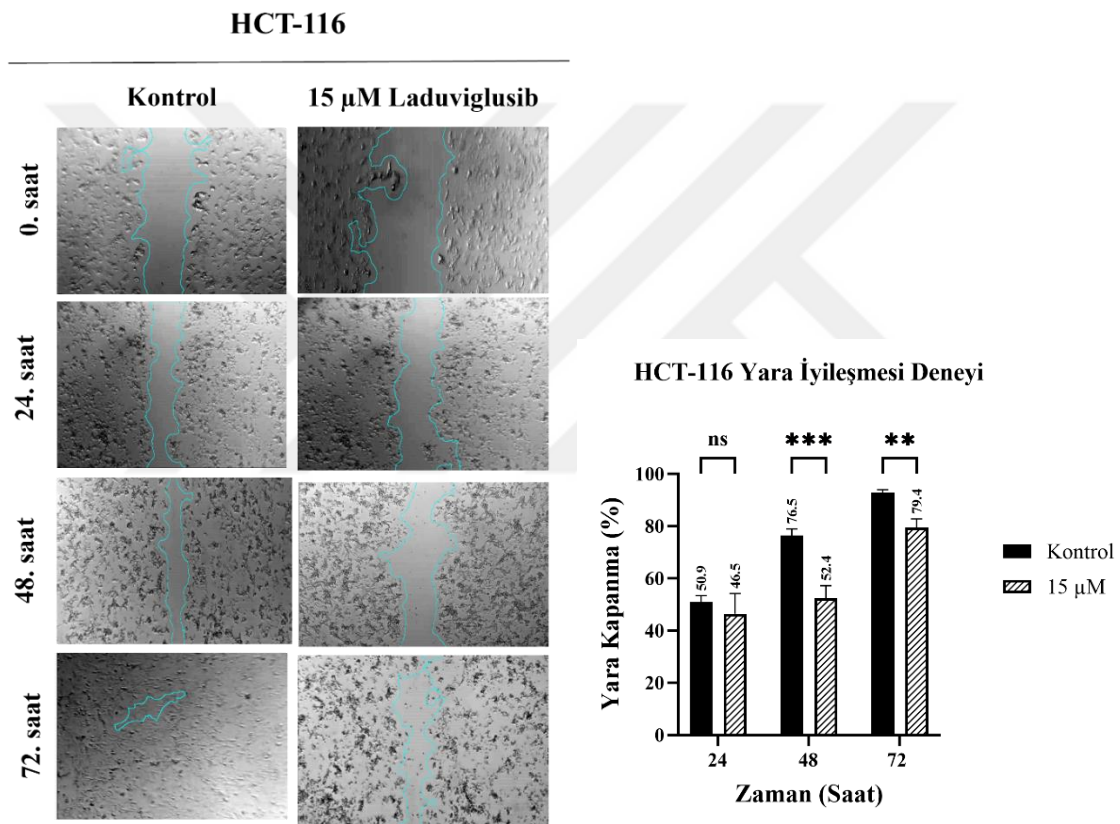
HT-29



Şekil 3. 7. HT-29 hücre hattında yara kapanma aktivitesinin gösterilmesi. 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021)'in farklı zaman aralıklarına karşı HT-29 kolorektal kanseri hücrelerinin yara kapatma kapasitesi üzerindeki etkisini belirlemek için yara kapanma deneyi yapılmıştır. Yara kapanma görüntüleri her 24 saatte bir Olympus CKX41 mikroskobu ile çekilmiştir (0. saat-24. saat-48. saat-72. saat) (*p<0,05).

Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 kolorektal kanseri hücre hattında oluşturulan yaraları kapatma aktivitesi üzerine yara kapanma deneyi gerçekleştirilmiştir. 3×10^5 hücre/kuyucuk olarak ekilen hücrelerin plaka yüzeyinde oluşturdukları hücre tabakasında pipet ucuyla yaralar açılmıştır ve eş zamanlı olarak ilaç grubu ile kontrol grubunda açılan yaraların zamana bağlı olarak kapanma yüzdeleri incelenmiştir. HCT-116 hücre hattında ilaç uygulanmamış kontrol grubunda 24, 48 ve 72 saatte yara kapanma yüzdeleri sırasıyla %50,9, %76,5 ve %93,4 olarak hesaplanmıştır. 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulanan HCT-116 hücre hattında 24, 48 ve 72 saatte yara kapanma yüzdeleri ise sırasıyla %46,5 (ns: $p > 0,05$), %52,5 (** $p < 0,0008$) ve %79,4 (** $p < 0,0067$) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021)

uygulanan HCT-116 hücrelerinde zamana bağlı olarak zamana bağlı olarak kontrol grubunda oluşturulan yaraların kapanma oranları artarken ilaç grubunda yara kapanma aktivitesinin anlamlı olarak baskılandığı tespit edilmiştir. Ayrıca HCT-116 hücre hattında 48 ve 72 saat ilaç uygulamasının 24 saatlik ilaç uygulamasına göre daha etkili bir şekilde yara kapanma aktivitesini engellediği sonucuna ulaşılmıştır. 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının iki hücre hattının yara kapanma aktiviteleri üzerine etkileri kıyaslandığında HCT-116 hücre hattının HT-29 hücre hattına göre yara kapanmada direnç eğiliminde olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 3.8).



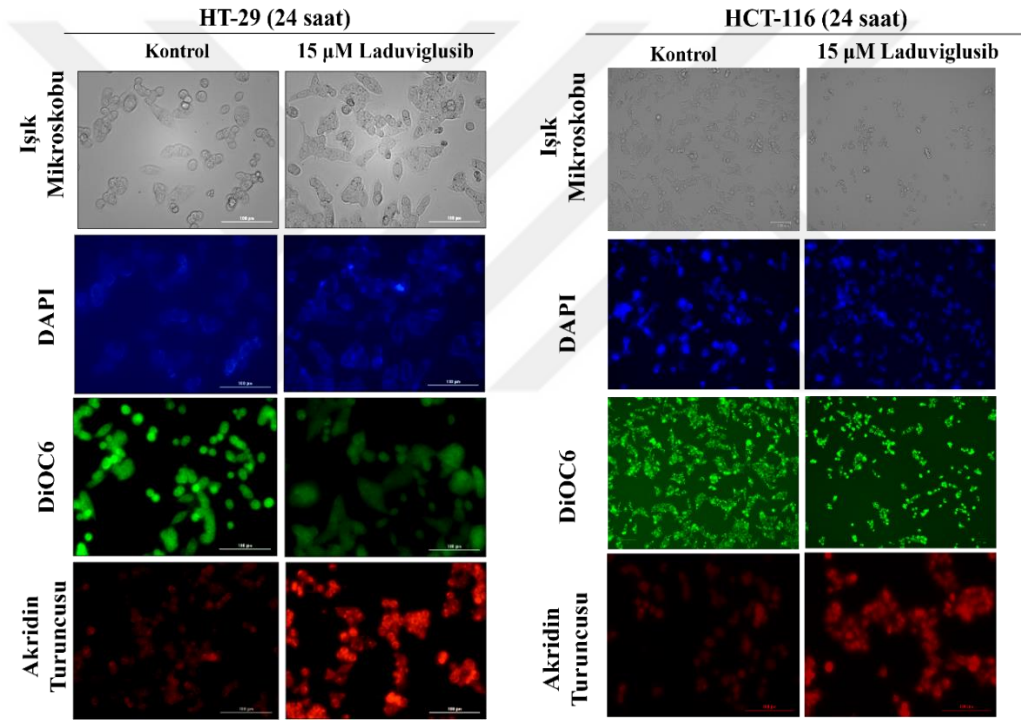
Şekil 3. 8. HCT-116 hücre hattında yara kapanma aktivitesinin gösterilmesi. 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in farklı zaman aralıklarına karşı HT-29 kolorektal kanseri hücrelerinin yara kapatma kapasitesi üzerindeki etkisini belirlemek için yara kapanma deneyi yapılmıştır. Yara kapanma görüntüleri her 24 saatte bir Olympus CKX41 mikroskobu ile çekilmiştir (0. saat-24. saat-48. saat-72. saat) (**p<0,01, ***p<0,001).

Yara kapanma deneyi, hücrelerin plaka yüzeyinde oluşturdukları iki boyutlu tabakada oluşturulan yaraları zamana bağlı olarak kapatma potansiyellerini incelemek üzere yapılmıştır. Yara bölgesini kapatmak amacıyla kanser hücrelerinin çoğalarak bölgeye göç etmesi ve hücre-hücre etkileşiminin artışı söz konusudur. Bu bağlamda HT-29 ve HCT-116 hücrelerinin ilaç uygulanmamış kontrol gruplarında kapanma oranının 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 ve HCT-116 hücrelerinde bulunan metastatik ve göç etme özelliklerini baskıladığı düşünülmektedir. GSK-3 β 'nin hücre çoğalması, hücre ölümü, hayatta kalma ve metastatik yollarda yer aldığı bilinmektedir (Maurizi ve ark., 2023). Laduviglusib (CHIR-99021)'in GSK-3 β inhibisyonu nedeniyle HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerinde oluşturulan yaraları kapatma aktivitelerinde azalmaya neden olduğu düşünülmektedir. Lee ve arkadaşlarının 2021 yılında Tenon's fibrozis hastalığında fibroblast hücreleri üzerine yaptıkları bir çalışmada 10 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının 1 μ M uygulamaya göre yara kapanma aktivitesini %50 oranında azalttığı bildirilmiştir. Çalışmanın odak noktası olan Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β), GSK-3 β yolağında da yer alan ve hücrelerdeki metastaz, invazyon, farklılaşma ve hayatta kalma süreçlerinde rol olan ve fibrozis dışında kanser gelişiminde de rol olan bir faktördür. Bu nedenle Laduviglusib (CHIR-99021)'in GSK-3 β inhibisyonunun kanser hücrelerinin metastatik özelliklerini azalttığı düşünülmektedir (Lee ve ark., 2021).

3.5. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HT-29 ve HCT-116 Kolorektal Kanseri Hücre Hatları Üzerinde Floresan Boyamaların Gösterilmesi

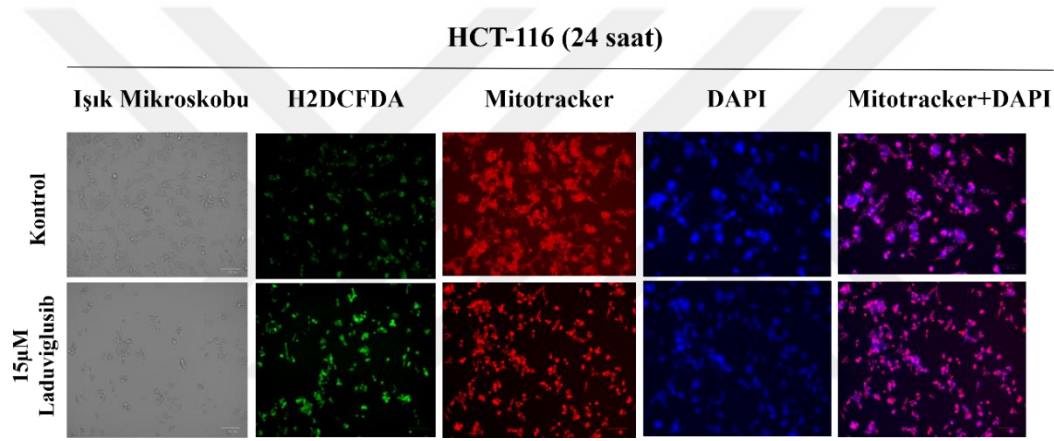
Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücre hattında programlı hücre ölümü, nükleer kondenzasyon ve mitokondriyal membran potansiyeline etkisi DAPI, DiOC6 ve Akridin Turuncusu boyamaları ile incelenmiştir. Her iki hücre hattında da 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının ilaç uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranda hücrenin nükleer kondenzasyonu sayısında artışa neden olduğu DAPI boyaması ile tespit edilmiştir. Otofajik aktiviteyi irdelemek amacıyla yapılan Akridin Turuncusu boyaması ile HT-29 ve HCT-116 hücrelerinde ilaç uygulamasının hücrelerde asidik veziküler organeller olan otofagozomların birikiminde artışa neden olarak otofajik aktiviteyi belirgin olarak

indüklediği de gözlemlenmiştir. Ayrıca 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının her iki hücre hattında da kontrol grubuna kıyasla hücre enerji metabolizmasında görevli olan mitokondrinin membran potansiyelini belirgin şekilde azalttığı tespit edilmiştir. Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının her iki hücre hattı üzerine etkisi kıyaslandığında HCT-116 hücre hattının HT-29 hücre hattına göre daha etkin olarak nükleer kondenzasyona neden olduğu ve mitokondriyal aktivitenin düşmesi üzerine daha yüksek dirençte yanıt verdiği gözlemlenmektedir. HT-29 kolorektal kanseri hücrelerinde otofajik aktivitenin indüklenmesinin HCT-116 hücre hattından daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3. 9. HT-29 ve HCT-116 hücre hattında hücre ölümü üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi. HT-29 ve HCT-116 hücrelerinde 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması sonucu DAPI ile çekirdeğin floresan sinyalleri, DiOC6 ile canlı hücrelerin mitokondrileri ve akridin turuncusu ile otofagozom birikiminin floresan ışımlarının tespiti (Ölçek Çubuğu=100 μ m, 20X).

HCT-116 kolorektal kanseri hücre hattının sahip olduğu mutasyon profili nedeniyle Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasına daha dirençli olduğu süreç içerisinde yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Bunun üzerine 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 hücrelerinde Reaktif Oksijen Türleri (ROS) oluşumu H2DCFDA floresan boyama ile ve hücre içi mitokondriyal yoğunluğa etkisi MitoTracker boyama ile irdelenmiştir. HCT-116 hücrelerine Laduviglusib (CHIR-99021)'in ilaç uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranda ROS oluşumunu tetiklediği ve hücrelerde mitokondriyal aktiviteyi belirgin şekilde azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Buna ek olarak ilaç uygulamasının HCT-116 hücrelerinde hücre içi ölü hücre sayısını arttırdığı Mitotracker ve DAPI görüntülerinin birleştirilmesi sonucu tespit edilmiştir. (Şekil 3.10).



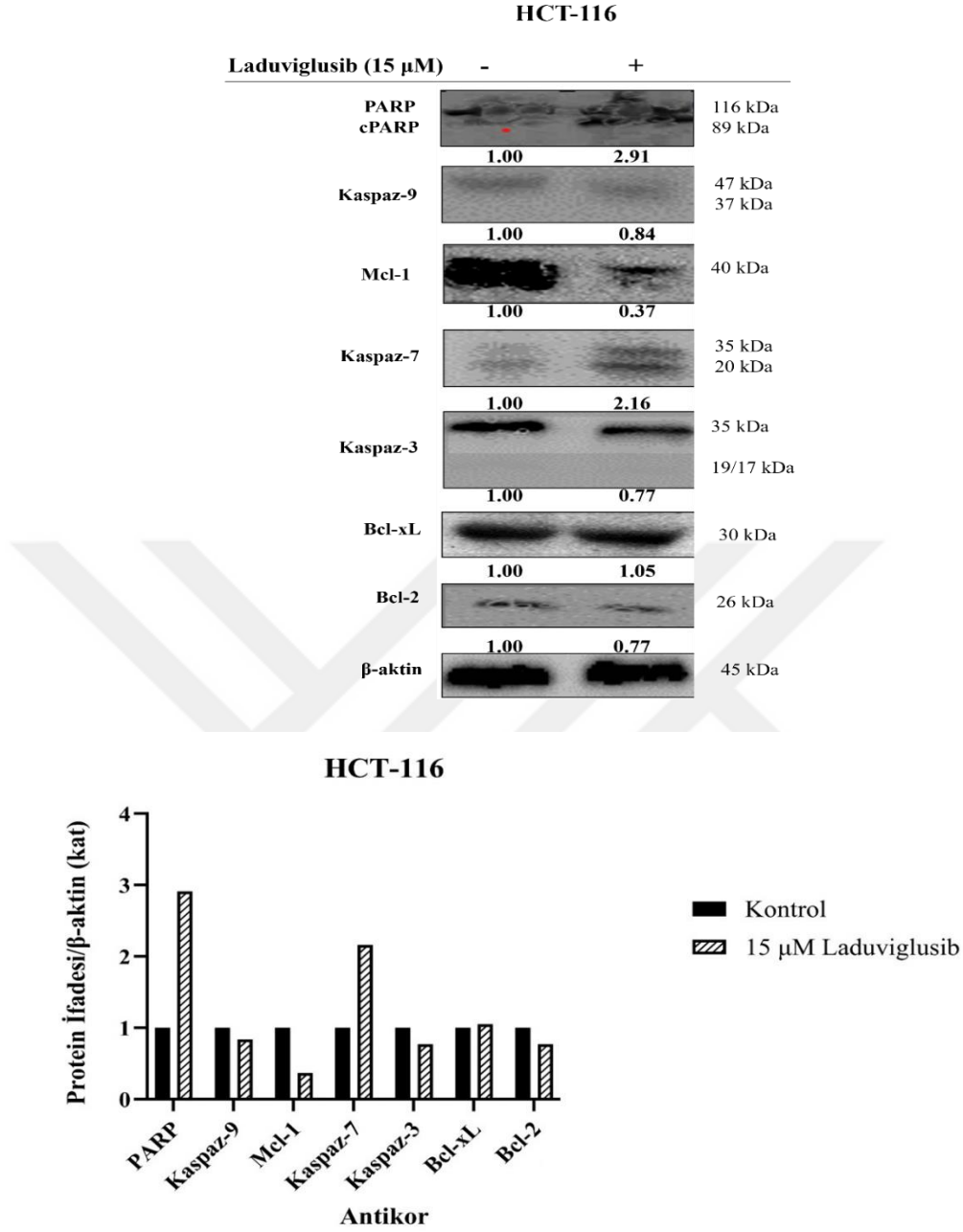
Şekil 3. 10. HCT-116 hücre hattında mitokondriyal aktivitenin floresan boyamalar ile gösterilmesi. HCT-116 hücrelerinde Mitotracker ile mitokondriyal değişiklikleri, DAPI ile çekirdeğin floresan sinyalleri, H2DCFDA ile hücre içi ROS miktarının floresan ışımlarının tespiti. Hücrelere 24 saat boyunca 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulanmıştır (Ölçek Çubuğu=100 μ m, 20X).

Hücre gelişiminde rol alan GSK-3 inhibisyonunun hücre canlılığı, hücre ölümü ve hücresel yapıların aktivitesini göstermek amacıyla yapılan floresan boyamalar ile gösterilmiştir ve ilaç uygulamasının HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerindeki etkileri incelenmiştir. 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in 24 saat uygulamasının hücrelerdeki enerji metabolizmasını etkilediği, otofajik ölümü indüklediği ve hücre içi ROS oluşumunu arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. 2015 yılında Marchand ve arkadaşlarının pankreas kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmada 24 saat 5 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının hücrelerde otofajik vezikül oluşumunu

arttırığı floresan boyamalar ile gösterilmiştir. Hücre içindeki otofagozom oluşumları ve GSK-3 inhibisyonunun otofajiyi indüklediği bildirilmiştir (Marchand ve ark., 2015). Farklı floresan boyamalarla hücresel aktivite ve hücre ölümü de incelenebilmektedir. Li ve arkadaşlarının akciğer kanseri üzerine yaptıkları çalışmada 24 saat 5 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının akciğer kanseri hücrelerinde apoptotik ölümü indüklediği immüno floresan boyamalar ile gösterilmiştir (Li ve ark., 2013).

3.6. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 Kolorektal Kanseri Hücre Hatlarında Apoptotik Ölüm Üzerine Etkisinin İmmüno blotlama ile Gösterilmesi

24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri üzerine apoptotik etkisinin modellenmesi için immüno blotlama yöntemi gerçekleştirilmiştir. İmmüno blotlama sonuçlarına göre 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının HCT-116 hücreleri üzerinde hücre ölümü düzenleyici proteinlerden biri olan ve anti-apoptotik Bcl-2 anlatımını ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerine kıyasla protein anlatımını baskıladığı tespit edilmiştir. Ayrıca 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının 24 saat içinde ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerine kıyasla Mcl-1 anlatımını çok daha etkin bir şekilde protein seviyesinde baskıladığı immüno blotlama sonucuna göre belirlenmiştir. Ancak 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in anti-apoptotik proteinlerden bir diğeri olan Bcl-xL anlatımı üzerine etkin bir baskılama tespit edilememiştir. 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri üzerinde apoptoz sürecinde aktif rol alan ve endoproteaz görevi görerek hücre içi yapıların degradasyonunda görevli proteinler olan pro-kaspaz-9, pro-kaspaz-3 anlatımını ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerine kıyasla anlatımında olarak baskılandığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar ile paralellik göstererek apoptozda hücre içi yapıların yıkımında rol alan bir diğer endoproteaz olan kaspaz-7 kesiliminin Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması ile 24 saat zaman zarfında etkin şekilde 2,17 kat arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması ile DNA hasar tamiri, programlı hücre ölümü ve genomik stabilite mekanizmalarında rol alan PARP kesiliminin kontrol hücrelerine kıyasla etkin şekilde 2,91 kat arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3. 11. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 hücrelerinde apoptotik sinyal yollarına etkisinin immünoiblottlama ile gösterilmesi. %10-12 SDS-PAGE jele 30 μ g ilaç uygulanmış ve uygulanmamış protein yüklenmiş, anti-apoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-xL), Mcl-1, kaspazlar (kaspaz-7, kaspaz-9 ve kaspaz-3) ve PARP özgül primer antikor uygulaması primer antikorlara özgül sekonder antikor uygulamasını takiben, kemiluminesans görüntü CCD kamera aracılığıyla tespit edilmiştir. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Image J programı ile bant yoğunlukları belirlenmiş ve hedef proteinler β -aktine normalize edilerek verilmiştir.

Hücresel gelişimde kritik bir öneme sahip olan programlı hücre ölümü, hücre kaderinin belirlenmesinde ve hücre içi homeostazinin sağlanmasında görevli olan bir süreçtir ve hayatta kalma yolları ile ilişki içerisinde. Doku ve embriyo gelişiminde, DNA hasarı yanıtında, enfekte olmuş hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından uyarılması sonucu ölmesinde programlı hücre ölümü olan apoptoz mekanizması devreye girmektedir. Hücrenin apoptoz sürecinde; proteinlerin kaspaz-bağımlı proteolizi, membranın parçalanması ve DNA'nın endo-nükleolitik olarak parçalara bölünmesi aşamaları bulunmaktadır. Hücre içerden veya dışarıdan bir apoptoz sinyali aldığında, kromatini ve sitoplazması yoğunlaşmaktadır ve böylece hücrenin boyutu küçülmektedir; sürecin sonunda hücresel yapı 'apoptotik cisimcikler' olarak adlandırılan daha küçük parçalara paketlenmektedir (Lossi, 2022). Kanser hücrelerinde meydana gelen moleküler değişiklikler sonucunda apoptozda görevli olan anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerin anlatımlarında da değişiklikler söz konusudur. Kolorektal kanserin de dahil olduğu birçok kanser türünde, hücre içinde apoptozun inhibisyonu veya apoptozun azalması görülmektedir. Kanser hücrelerinde apoptozu inhibe eden veya azaltan faktörler arasında anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'in anlatımında artış görülmektedir. Bu proteinler, hücrenin apoptotik sinyali almasını engellemekte ve hücrenin programlı ölümden kaçmasını sağlamaktadır (Fang, 2024). Bunun yanı sıra kanser hücrelerinde normal hücrelerden farklı olarak apoptozu aktive eden pro-apoptotik proteinlerin anlatımında azalmalar olduğu belirlenmiştir. Apoptozu başlatan ve özellikle hücre yıkımında rol alan kritik elemanlar endoproteaz aktivite gösteren kaspazlardır. Başlatıcı kaspazlar (örneğin kaspaz-9), apoptoz sinyalini almaktadır ve apoptozu başlatmaktadır. Efektör kaspazlar (örneğin, kaspaz-3 ve kaspaz-7), hücrenin parçalanmasını ve ardından hücrenin programlı ölümünü tamamlamasını gerçekleştirmektedir (Cavalcante ve ark., 2019; Arya ve ark., 2024). Apoptozda rol alan bir diğer apoptotik protein olan PARP (poli ADP-riboz polimeraz), hücresel stres ve DNA hasarı yanıtında hayatta kalma mekanizmalarından biri olan DNA tamir mekanizmasında görev almaktadır ve PARP kesilimi (cPARP), apoptotik yolağın tetiklenmesinin bir göstergesi olarak bilinmektedir (Bastos ve ark., 2024). GSK-3 sinyal yolağı, apoptozu düzenleyen proteinlerin fosforilasyonunu ve anlatımını etkilemektedir ve apoptozun aktivasyonunu da düzenlemektedir. Örnek olarak GSK-3'ün anti-apoptotik protein olan Bcl-2 fosforilasyonu apoptozun engellenmesine neden olabilmektedir.

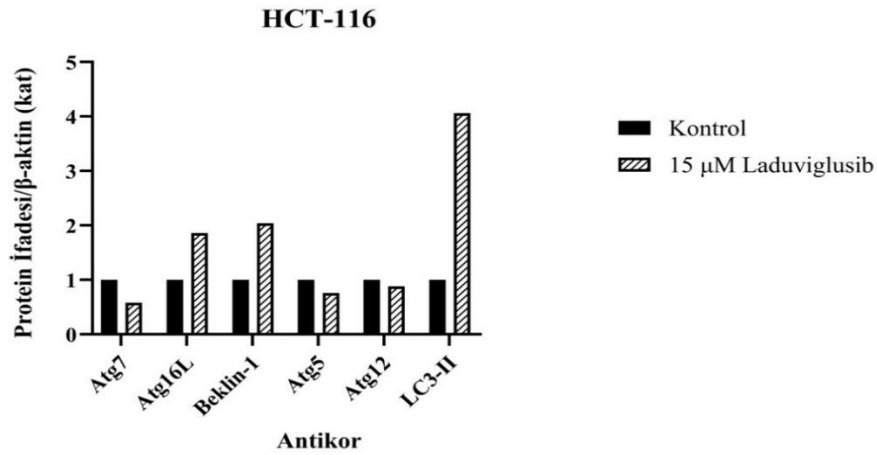
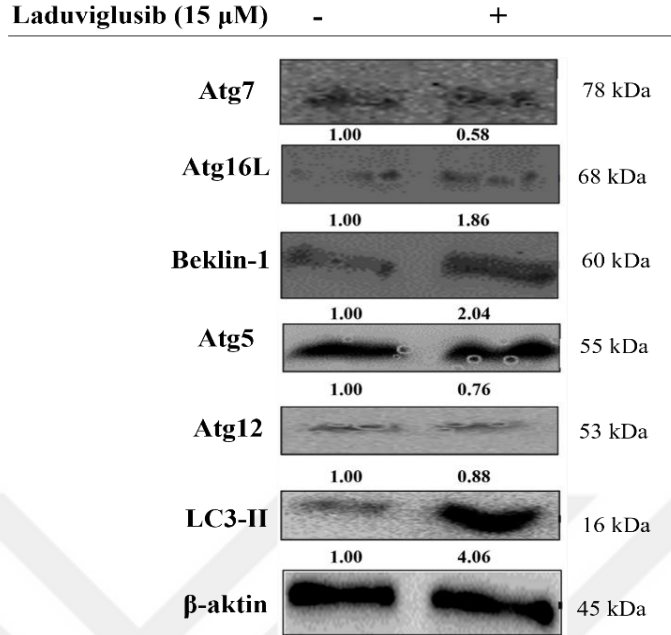
GSK-3 inhibisyonu, hücre döngüsü tutulmasına ve apoptozun tetiklenmesine yol açmaktadır. Ayrıca, GSK-3'nin WNT/ β -katenin yolağında etkin bir rol oynaması nedeniyle, GSK-3 β inhibisyonu WNT/ β -katenin yolağını etkileyerek kanser hücrelerinin bölünmesini ve invaziv profilini engelleyebilmektedir (Lin ve ark., 2020; Thapa ve ark., 2023). Laduviglusib (CHIR-99021)'in GSK-3 α/β inhibitörü olarak HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerinde uygulanması ile apoptotik ölümü tetiklediği elde edilen sonuçlar neticesinde görülmüştür. 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerinde anti-apoptotik proteinler olan Mcl-1 ve Bcl-2 anlatımının baskılanmasına fakat Bcl-xL anlatımına etkisi olmadığına, PARP kesiliminin etkin derecede artmasına ve kaspaz-7 anlatımının artmasına neden olduğu ve bu sonuçlar neticesinde HCT-116 hücrelerinde apoptotik ölüm yolağını tetiklediği düşünülmektedir. HCT-116 kolorektal kanseri hücre hattında bulunan APC mutasyonu nedeniyle WNT inhibisyonunda önemli bir faktör olan GSK-3 regülasyonu sekteye uğramaktadır (Wang ve ark., 2022). Literatür çalışmalarında Laduviglusib (CHIR-99021)'in doza bağlı olarak kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği çalışmalar bulunmaktadır. Vincent ve arkadaşlarının 2014 yılındaki çalışmalarında akciğer kanseri hücreleri olan PC9, H1295 ve Hcc193 hatlarına uygulanan 10 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in GSK-3 inhibisyonu, NF-kB anlatımının GSK-3 aktivitesinin hücre çoğalması ve canlılığı üzerinde baskılayıcı etkisi olduğunu göstermiştir (Vincent ve ark., 2014). Bir başka çalışma, HepG2 ve LX2 hepatoselüler karsinoma ve Huh7 böbrek kanseri hücrelerinde GSK-3 inhibisyonu amacıyla 1 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) ile 20 ng/ml TGF- β 1 kombine uygulamasının EMT bağlantılı proteinler olan Snail ve α -SMA anlatımını etkin şekilde baskılayarak karaciğer hücrelerinde filament oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada 0,5 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in 3 μ M Sorafenib ile kombine kullanımının karaciğer hücrelerinde Kaspaz-3 anlatımını artırarak apoptotik ölümü indüklediğini bildirmiştir (Song ve ark., 2024). Apoptotik sinyal yolağın aktive edilmesi üzerine immünoablota sonuçlarını destekleyen bir başka çalışma Marchand ve arkadaşları tarafından 2015 yılında PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinde yapılmıştır. Çalışma çıktısı olarak 72 saat 5 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması ile uzun süreli GSK-3 inhibisyonun, artan PARP kesilimi ve kaspaz-7 seviyelerinin yanı sıra kaspaz-3 aktivitesinin de 6 kat arttığını ve dolayısıyla apoptotik ölümün indüklendiğini tespit etmiştir (Marchand ve ark., 2015). Bu çalışmalar doğrultusunda

Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının HCT-116 dışında diğer kanser hücrelerinde de GSK-3 inhibisyonuna bağlı olarak apoptotik proteinlerinin anlatımını arttırdığı ve düşük/yüksek dozda hücreler üzerinde apoptotik ölümü indüklediği sonucuna varılmıştır.

3.7. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 Kolorektal Kanseri Hücre Hatlarında Otofajik Ölüm Yolakları Üzerine Etkisinin İmmünoiblotlama ile Gösterilmesi

24 saat 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri üzerinde apoptotik ölüm üzerine etkisinin modellenmesinin altında yatan moleküler mekanizmada otofajinin rolünü tespit edilmesi için immünoiblotlama ile Atg7, Atg16, Beklin-1, Atg5, Atg12, LC3-II hedef alan primer antikorlar uygulanmıştır. İmmünoiblotlama sonucuna göre, pre-otofagozom oluşumunda rol alan anahtar molekül Beklin-1 anlatımının 24 saat 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması sonucu HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri üzerine ilaç uygulanmamış kontrole kıyasla anlatımında etkin şekilde 2,04 kat arttığı immünoiblotlama sonucuna göre tespit edilmiştir. Otofajik aktiviteyi incelemek amacıyla anahtar bir protein olan ve otofagozom oluşumunun en yaygın belirteci olan LC3-II anlatımının 24 saat 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması sonucu HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri üzerine ilaç uygulanmamış kontrole kıyasla anlatımında daha etkin bir şekilde 4,06 kat arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca bir başka otofajik protein olan ve LC3 lipidasyonu ve otofagozom oluşumunda görev olan Atg16L anlatımının 24 saat 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması sonucu HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri üzerine ilaç uygulanmamış kontrole kıyasla anlatımında 1,86 kat arttığı tespit edilmiştir. Hücre homeostazisinde Atg12-Atg5-Atg16L kompleksi, makro otofaji sürecinde fagoforun uzamasında görevlidir. Atg12 ve Atg5'in anlatımının 24 saat 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması sonucu HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri üzerine ilaç uygulanmamış kontrole kıyasla anlatımının baskılandığı immünoiblotlama sonucu ile tespit edilmiştir. Bu sonuçlar paralelinde bir diğer otofajik protein olan Atg7 anlatımının Atg12 ve Atg5 anlatımına göre daha etkin şekilde baskılandığı görülmüştür (Şekil 3.12).

HCT-116



Şekil 3. 12. Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 hücrelerinde otofajik sinyal yollarına etkisinin immünoblotlama ile gösterilmesi. %12-15 SDS-PAGE jele 30 μ g ilaç uygulanmış ve uygulanmamış protein yüklenmiş, PVDF membrana proteinler aktarılmış, %5 yağsız süt ile muameleyi takiben, membranlar Atg 7, Atg16L, Beklin-1, Atg5, Atg12 ve LC3-II özgü primer antikor (1:1000) uygulaması, primer antikorlara özgü sekonder antikor (1:3000) uygulamasını yapılmış ve kemiluminesans görüntü CCD kamera aracılı tespit edilmiştir. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Image J programı ile bant yoğunlukları belirlenmiş ve hedef proteinler β -aktine normalize edilerek verilmiştir.

Otofaji, hücrede bulunan zararlı veya gereksiz hücresel bileşenlerin yıkımını sağlayan bir hücresel bozulma ve yeniden düzenleme sürecidir. Hücrelerin hayatta kalması, homeostazinin sağlanması ve çeşitli stres koşullarına uyum sağlaması açısından otofaji mekanizması önem taşımaktadır (Yang ve Klionsky, 2009). Makro otofaji, hücrelerin hasarlı bileşenlerden kurtulmalarını, ayrıca enerji ve hammadde kaynaklarını yeniden kullanmalarını sağlamaktadır. Bu nedenle makro otofaji, hücre sağlığının korunması ve çeşitli hastalıkların önlenmesinde kritik bir öneme sahiptir. Makro otofaji mekanizmasında yer alan proteinler, süreç aşamalarında birbirleri ile etkileşim halinde çalışmaktadır. Makro otofaji şu aşamalardan oluşmaktadır: otofagozomun başlatılması, otofagozom membranının uzaması, otofagozom/lizozom füzyonu ve içeriklerin sindirilmesidir. Makro otofaji ULK1 (Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1) ve Beklin-1 kompleksi tarafından başlatılmaktadır. ULK1, hücre içindeki yapıları özellikle endoplazmik retikulum (ER), mitokondri ve diğer zararlı organelleri tanımakta ve bu yapıları otofagozom oluşumu için işaretlemekte görevlidir. Otofagozom oluşumu, Atg (Otofaji-ilişkili) ailesi proteinlerinin katılımıyla devam etmektedir. Atg12, öncelikle Atg7 tarafından etkinleştirilmektedir, ardından Atg10 tarafından Atg5'in komplekse bağlanmasıyla enzimatik süreç yaşanmaktadır. Daha sonra, Atg12-Atg5, Atg16L ile bir kompleks oluşturmaktadır. Otofagozom membranının uzaması aşamasında Atg12-Atg5:Atg16L kompleksi LC3-I'yi fosfatidiletanolamin ile birleştirerek, LC3'ün bağlanmasını ve LC3-II'ye transformasyonunu sağlamaktadır. Otofagozom uzaması esnasında LC3 proteini, Atg4 proteazı tarafından LC3-I proteinine parçalanmaktadır. Otofagozomun uzamasını tamamlamak üzere LC3-II proteini, Atg7 ve Atg3 proteinleri tarafından LC3-II formuna dönüştürülmektedir. Otofagozom oluşumundan sonra, Atg12-Atg5:Atg16L kompleksi otofagozomdan ayrılmaktadır. Son olarak otofagozom lizozomla birleşerek hücresel içerik sindirilmektedir (Cao ve ark., 2021; Holzer ve ark., 2024). Makro otofaji, hücrenin yaşamsal faaliyetlerinde rol olan diğer sinyal yolları ile yakın ilişki içerisinde. GSK-3 inhibisyonunun makro otofajiyi indükleyebileceği, WNT sinyal yolağında görev alması nedeniyle düşünülmektedir. Laduviglusib (CHIR-99021)'in GSK-3 inhibisyonuna neden olmasıyla ilgili olarak otofajik aktivite üzerine çalışmalar mevcuttur. Wang ve arkadaşlarının 2022 yılında osteoblast hücreleri üzerine yaptıkları çalışmada 10 µM Laduviglusib (CHIR-99021)'in kanonik ve otofaji aracılı WNT sinyalleşmesini indüklediği ve LC3-II anlatımını etkin derecede artırdığı bildirilmiştir.

(Wang ve ark., 2022). Russi ve arkadaşlarının 2021 yılında VA-ES-BJ ve NEPS yumuşak doku sarkoma hücreleri üzerine yaptıkları çalışmada 24 ve 48 saat 100 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının otofajik belirleyici olan LC3-II anlatımını artırdığı ve AMPK/mTORC1/ULK1 yolağı ilişkili otofajik mekanizmayı indüklediğini bildirmiştir. İmmüno blotlama çalışmaları sonucunda VA-ES-BJ ve NEPS sarkoma hücrelerinde 48 saat 100 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının 24 saat uygulamaya göre daha etkili şekilde otofajik protein anlatımını artırdığı tespit edilmiştir (Russi ve ark. 2021). İmmüno blotlama sonuçlarını destekleyici bir başka çalışma da Marchand ve arkadaşları tarafından PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada 5 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in 24, 48 ve 72 saat uygulamasının PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinde makro otofaji ilişkili proteinlerin anlatımına etkisi araştırılmıştır. Çalışma çıktısına göre hücrelerde GSK-3 inhibisyonuna bağlı olarak 24 ve 72 saatte PARP kesiliminin ve kaspaz-7 anlatımının etkin olarak arttığı, LC3-1 anlatımında herhangi bir değişikliğe rastanmadığı ve LC3-II anlatımının 24 ve 48 saatte aynı seviyede ve 72 saate daha etkin şekilde arttığı tespit edilmiştir. Çalışmada eş zamanlı olarak gerçekleştirilen HPDE normal pankreas hücrelerinde 24 ve 48 saat 5 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının LC3-II anlatımında benzer bir artışa sebep olduğu bildirilmiştir (Marchand ve ark., 2021). Bu tez çalışmasında HCT-116 kolorektal kanseri hücre hattında gerçekleştirilen immüno blotlama sonuçlarına göre 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının sonucu ile paralelik gösteren önceki çalışmalar ile bir GSK-3 inhibitörü olan Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 hücre hattında otofajik aktiviteyi tetiklediği ve makro otofaji ile ilişkili proteinlerin anlatımını arttırdığı tespit edilmiştir.

4. SONUÇLAR

Kanser, insanlık tarihi boyunca karşılaşılan ve çağımızın en yaygın hastalıklarından biridir. Kontrolsüz hücre büyümesi ve yayılmasıyla karakterize olan kanser, birçok çeşidi bulunan ve dünya genelinde yoğun bir şekilde araştırılan bir hastalıktır. Kolorektal kanser, kolon ve rektumda anormal hücre ve doku gelişimiyle karakterize olan ve adenom kökenli bir adenokarsinom özelliği taşımaktadır. Dünya genelinde ölüm riski en yüksek kanser türlerinde üçüncü sırada yer alan kolorektal kanserin risk faktörleri arasında ırk, diyabet, yaş, cinsiyet, kalıtsal mutasyonlar ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları bulunmaktadır. Kolorektal kanser genellikle genetik ve çevresel faktörlerin bir kombinasyon halinde ve çoğunlukla sporadik olarak görülmektedir. Somatik kolorektal kanser hücrelerinde sıkça görülen APC, TP53, KRAS, PIK3CA, SMAD4, NRAS, CTNNB1 (β -katenin) ve SOX9 genlerinde mutasyonlar kolorektal kanser gelişiminde önemli rol oynayan moleküler mekanizmalarda yer almaktadır. WNT/ β -katenin sinyal yolunun ana bileşeni β -katenin, GSK-3 β 'nın bir substratıdır ve GSK-3 inhibitörleri, WNT yolağı araştırmalarında önemli bir kimyasal biyolojik ajan olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, GSK-3 inhibisyonu, kolorektal kanser gelişiminde temel mekanizmanın anlaşılması açısından önem taşımaktadır.

Laduviglusib (CHIR-99021), GSK-3 inhibitörü ve WNT aktivatörü olan bir aminopirimidin türevidir. Laduviglusib'in kanserle ilişkisi, özellikle hücresel sinyal yolları üzerindeki etkisiyle anlaşılmaktadır. GSK-3, çeşitli kanser türlerinde anormal düzenlemelerle ilişkilendirilmiştir ve kanserden, hücre proliferasyonundan, programlı hücre ölümünden, hücre farklılaşmasından sorumlu tutulmuştur. GSK-3 β , insülin sinyali, glikojen sentezi, WNT sinyal yolağı ve nörotransmitter sinyali dahil birçok önemli hücresel süreçte düzenleyici bir rol almaktadır. Laduviglusib'in kanserle ilgili potansiyel tedavi stratejileri üzerinde klinik tabanlı bilimsel çalışmalar gerekmektedir. Ancak, bu alandaki araştırmaların çoğu hala klinik öncesi aşamada olup, Laduviglusib'in kanser tedavisinde klinik kullanımı için daha fazla çalışma gerekmektedir. Literatürde bulunan çalışmalar incelendiğinde Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanseri hücreleri üzerinde zamana ve doza bağlı etkisi ve apoptotik ölüm üzerine etkisinde otofajinin rolü henüz modellenmemiştir. Bu tez çalışmasının amacı; Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanseri hücre hatlarında zamana ve doza bağlı hücre canlılığı, proliferasyonu, yara kapanma üzerine etkisi ve

apoptotik ölüm üzerine etkisinin modellenmesinde otofajinin rolünün irdelenmesidir. Laduviglusib (CHIR-99021)'in doza ve zamana bağlı olarak hücre sağkalımı, hücre proliferasyonu, koloni oluşumu üzerindeki etkisi MTT hücre canlılık testi, hücre sağkalım testi, floresan boyama, yara kapanma ve immüno blotlama deneyleriyle incelenmiştir. Çalışma sonuçları ele alındığında HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücre hatlarında gerçekleştirilen Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması sonucunda hücre canlılığının her iki hücre hattında artan doza bağlı anlamlı bir şekilde azaldığı ve 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının 24 ve 48 saatte kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir farkının bulunmadığı görülmüştür. Bu nedenle 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. Literatürdeki çalışmalarda GSK-3 inhibisyonunun çeşitli kanser türlerindeki hücre canlılığına ket vurma etkisi incelendiğinde tekil olarak kullanılan Laduviglusib (CHIR-99021)'in kombine kullanıma göre zamana bağlı olarak daha yüksek dozda uygulandığı görülmektedir. Bu tez çalışmasında HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücrelerine uygulanan 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in 24 ve 48 saatte hücre canlılığına ket vurma oranı yaklaşık %30'dur ve literatüre bakıldığında çeşitli kanser hücrelerine tekil olarak uygulanan Laduviglusib (CHIR-99021)'in 24 ve 48 saatte hücre canlılığına ket vurma potansiyeli farklılık göstermektedir. Tez çalışması kapsamında yapılan 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücre hatlarında hücre sağkalımı üzerine etkisi incelendiğinde zamana bağlı ilaç uygulamasının kontrol grubuna kıyasla hücre proliferasyonunu anlamlı olarak engellediği tespit edilmiştir. Her iki hücre hattında da 48 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması sonucu hücrelerin çoğalma direncinin kırıldığı görülmüştür. Ayrıca HCT-116 hücre hattının HT-29 hücre hattına kıyasla hücre sağkalım direncinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Literatür çalışmalarında çeşitli kanser hücrelerinde Laduviglusib (CHIR-99021)'in hücre sağkalımı üzerine etkisi incelendiğinde uygulama süresine bağlı olarak 48 saat Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması ile çoğu kanser hücresinde sağkalım direncinin kırıldığı görülmektedir. Bu bağlamda 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in uygulamasının HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücre hatlarında hücre sağkalımına zamana bağlı olarak ket vurduğu sonuçlar paralelinde tespit edilmiştir.

GSK-3'ün hayatta kalma, farklılaşma ve benzeri biyokimyasal süreçlerde rol oynadığı göz önünde bulundurulduğunda 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması ile glioma ve akciğer kanseri hücrelerinde GSK-3 inhibisyonunun hücrelerin koloni oluşturma potansiyellerine ket vurduğu literatür çalışmalarında görülmektedir. Laduviglusib (CHIR-99021)'in GSK-3 inhibisyonuna yol açarak epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) baskıladığı ve hücrelerin koloni oluşturma potansiyellerini azalttığı öngörülmektedir. Bu tespit doğrultusunda HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücre hatlarında koloni oluşturma potansiyellerini azaltmada etkili olduğu sonucu desteklenmektedir. Tez çalışması dahilinde yapılan bir yara kapanma deneyi ile kanser hücrelerinin bölgeye göç etmesi ve hücre-hücre etkileşiminin incelenmesi amaçlanmıştır. Literatür çalışmalarında çeşitli kanser türlerinde Laduviglusib (CHIR-99021) uygulaması ile GSK-3 inhibisyonunun hücre göçünde ve metastazda önemli olan EMT'yi baskıladığı görülmektedir. Sonuçlar incelendiğinde 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının HT-29 ve HCT-116 hücrelerinde yara kapanma aktivitelerini hücre göçünü engellediği ve hücreler arası etkileşimi azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerindeki etkileri incelenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar ile hücre gelişiminde rol alan GSK-3 inhibisyonunun hücre canlılığı, hücre ölümü ve hücresel yapıların aktivitesini göstermek amacıyla yapılan floresan boyamalar ile incelenmiştir. Sonuçlar doğrultusunda Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının kanser hücrelerinde ölü hücre sayısını artırdığı, hücre ölümünü indüklediği belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında yer alan floresan boyamalar ile literatür sonuçlarına paralel olarak 24 saat 15 µM Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerindeki enerji metabolizmasından sorumlu olan mitokondrinin membran potansiyelini baskıladığı; ilaca karşı dirençli hücre hattı olan HCT-116 hücrelerinde gerçekleştirilen floresan boyamalar ile otofajik ölümü indüklediği ve hücre içi ROS oluşumunu arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır.

Literatürde bulunan immünoiblotlama sonuçları paralelinde, Laduviglusib (CHIR-99021)'in çeşitli kanser hücre hatlarında apoptotik ve otofajik ölümü üzerine etkisi, çeşitli dozlarda zamana bağlı olarak kullanılan Laduviglusib (CHIR-99021)'in apoptozda yer alan proteinlerin anlatımında sebep olduğu değişikliklere bakılmıştır. Elde edilen sonuçlarda Laduviglusib (CHIR-99021)'in tek başına ve kombine halinde uygulamasının kullanılan anti-apoptotik proteinlerin anlatımlarını baskıladığı, pro-apoptotik proteinlerin

anlatımlarını arttırdığı ve ayrıca otofaji mekanizmasında yer alan proteinlerin anlatımlarını arttırdığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmaların çıktısı olarak Laduviglusib (CHIR-99021)'in sebep olduğu GSK-3 inhibisyonunun kanser hücrelerinde apoptotik ölümü ve otofajik mekanizmayı indüklediği görülmektedir. Literatür çıktıları paralelinde bu tez çalışmasında yer alan immnoblottlama sonuçlarına göre dirençli HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerinde 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının anti-apoptotik proteinler olan anlatımlarını baskımlarken pro-apoptotik protein anlatımlarını arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca otofaji mekanizmasında yer alan başlıca proteinlerin ilaç uygulaması ile anlatımlarının etkin bir şekilde arttığı belirlenmiştir.

Tez çalışmasının amacı olarak Laduviglusib (CHIR-99021)'in HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanseri hücre hatlarında zamana ve doza bağlı hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, hücre bölünmesi, yara kapanma ve apoptotik ölüm üzerine etkisinde otofajinin rolünün araştırılması kapsamında gerçekleştirilen deney sonuçlarının ışığında bir GSK-3 inhibitörü olan 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021)'in farklı direnç yanıtlarına ve genotip profiline sahip HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanseri hücre hatlarında GSK-3 inhibisyonuna bağlı olarak her iki hücre hattında da hücre canlılığına ket vurduğu, hücre proliferasyonunu azalttığı, hücre bölünmesini ve hücre göçünü engellediği, HCT-116 hücrelerinin HT-29 hücrelerine göre Laduviglusib (CHIR-99021)'e daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca daha dirençli olan HCT-116 kolorektal kanseri hücrelerinde 24 saat 15 μ M Laduviglusib (CHIR-99021) uygulamasının apoptotik ölümü ve otofaji mekanizmasını indüklediği belirlenmiştir. Kolorektal kanseri üzerine anti-kanser özelliğe sahip molekülerin keşfedilmesi ve etkinliklerinin araştırılması amacıyla yapılan çalışmaların umut vadettiği bilinmektedir. Laduviglusib (CHIR-99021)'in kolorektal kanserinde ve başka kanser türlerinde *in vivo* çalışmalarla desteklenerek etkisinin incelenmesi, farklı moleküllerle kombine uygulama sonucu anti-kanser profilinin çeşitli kanser hücrelerinde olası tedavi seçeneklerinin açığa çıkarılması gelecek çalışmaların konusu olarak görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmed M. (2020). Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019. *Gastroenterology research*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.14740/gr1239>
- Alexander, D. D., Waterbor, J., Hughes, T., Funkhouser, E., Grizzle, W., & Manne, U. (2007). African-American and Caucasian disparities in colorectal cancer mortality and survival by data source: an epidemiologic review. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 3(6), 301–313. <https://doi.org/10.3233/cbm-2007-3604>
- An, W. F., Germain, A. R., Bishop, J. A., Nag, P. P., Metkar, S., Ketterman, J., Walk, M., Weiwer, M., Liu, X., Patnaik, D., Zhang, Y. L., Gale, J., Zhao, W., Kaya, T., Barker, D., Wagner, F. F., Holson, E. B., Dandapani, S., Perez, J., Munoz, B., ... Schreiber, S. L. (2012). Discovery of Potent and Highly Selective Inhibitors of GSK3b. In *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*. National Center for Biotechnology Information (US).
- Arya, P., Malhotra, H., Chaudhary, B., Sarwara, A., Goyal, R., Wan, C., Mishra, D. K., & Gautam, R. K. (2024). Mechanism-based Suppression of Cancer by Targeting DNA-Replicating Enzymes. *Current protein & peptide science*, 25(1), 4–11. <https://doi.org/10.2174/1389203724666230512144011>
- Bader, A. G., Kang, S., Zhao, L., & Vogt, P. K. (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature reviews. Cancer*, 5(12), 921–929. <https://doi.org/10.1038/nrc1753>
- Bailey, C. E., Hu, C. Y., You, Y. N., Bednarski, B. K., Rodriguez-Bigas, M. A., Skibber, J. M., Cantor, S. B., & Chang, G. J. (2015). Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010. *JAMA surgery*, 150(1), 17–22. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2014.1756>
- Bastos, I. M., Rebelo, S., & Silva, V. L. M. (2024). A review of poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP1) role and its inhibitors bearing pyrazole or indazole core for cancer therapy. *Biochemical pharmacology*, 221, 116045.

Benson, A. B., 3rd, Venook, A. P., Cederquist, L., Chan, E., Chen, Y. J., Cooper, H. S., Deming, D., Engstrom, P. F., Enzinger, P. C., Fichera, A., Grem, J. L., Grothey, A., Hochster, H. S., HOFFE, S., Hunt, S., Kamel, A., Kirilcuk, N., Krishnamurthi, S., Messersmith, W. A., Mulcahy, M. F., ... Freedman-Cass, D. (2017). Colon Cancer, Version 1.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN, 15(3), 370–398. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0036>

Bertrand, F. E., Angus, C. W., Partis, W. J., & Sigounas, G. (2012). Developmental pathways in colon cancer: crosstalk between WNT, BMP, Hedgehog and Notch. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 11(23), 4344–4351. <https://doi.org/10.4161/cc.22134>

Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodriguez-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., & Srivastava, S. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer research, 58(22), 5248–5257.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Breugom, A. J., Swets, M., Bosset, J. F., Collette, L., Sainato, A., Cionini, L., Glynne-Jones, R., Counsell, N., Bastiaannet, E., van den Broek, C. B., Liefers, G. J., Putter, H., & van de Velde, C. J. (2015). Adjuvant chemotherapy after preoperative (chemo)radiotherapy and surgery for patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. The Lancet. Oncology, 16(2), 200–207. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71199-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71199-4)

Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature, 487(7407), 330–337. <https://doi.org/10.1038/nature11252>

Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407), 330–337.

Cao, W., Li, J., Yang, K., & Cao, D. (2021). An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bulletin du cancer*, 108(3), 304–322. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2020.11.004>

Cavalcante, G. C., Schaan, A. P., Cabral, G. F., Santana-da-Silva, M. N., Pinto, P., Vidal, A. F., & Ribeiro-Dos-Santos, Â. (2019). A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4133. <https://doi.org/10.3390/ijms20174133>

Chang, C. C., Lin, P. C., Lin, C. C., Lan, Y. T., Lin, H. H., Lin, C. H., Yang, S. H., Liang, W. Y., Chen, W. S., Jiang, J. K., Lin, J. K., & Chang, S. C. (2017). Molecular and Clinicopathological Differences by Age at the Diagnosis of Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1441. <https://doi.org/10.3390/ijms18071441>.

Chen, L., Kasai, T., Li, Y., Sugii, Y., Jin, G., Okada, M., Vaidyanath, A., Mizutani, A., Satoh, A., Kudoh, T., Hendrix, M. J., Salomon, D. S., Fu, L., & Seno, M. (2012). A model of cancer stem cells derived from mouse induced pluripotent stem cells. *PloS one*, 7(4), e33544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033544>

Citri, A., & Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(7), 505–516. <https://doi.org/10.1038/nrm1962>

Cox, T. R. (2021). The matrix in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 21(4), 217–238. [doi:10.1038/s41568-020-00329-7](https://doi.org/10.1038/s41568-020-00329-7)

Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H. J., Lynch, H. T., Minsky, B., Nordlinger, B., & Starling, N. (2010). Colorectal cancer. *Lancet (London, England)*, 375(9719), 1030–1047. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60353-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60353-4)

Dahm, C. C., Keogh, R. H., Spencer, E. A., Greenwood, D. C., Key, T. J., Fentiman, I. S., Shipley, M. J., Brunner, E. J., Cade, J. E., Burley, V. J., Mishra, G., Stephen, A. M., Kuh, D., White, I. R., Luben, R., Lentjes, M. A., Khaw, K. T., & Rodwell Bingham, S. A. (2010).

Dietary fiber and colorectal cancer risk: a nested case-control study using food diaries. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(9), 614–626. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq092>

D'Arcy M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582–592.

de Wijkerslooth, T. R., de Haan, M. C., Stoop, E. M., Bossuyt, P. M., Thomeer, M., Essink-Bot, M. L., van Leerdam, M. E., Fockens, P., Kuipers, E. J., Stoker, J., & Dekker, E. (2012). Burden of colonoscopy compared to non-cathartic CT-colonography in a colorectal cancer screening programme: randomised controlled trial. *Gut*, 61(11), 1552–1559.

Degterev, A., & Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(5), 378–390. <https://doi.org/10.1038/nrm2393>

Dehghan, S., Kheshtchin, N., Hassannezhad, S., & Soleimani, M. (2023). Cell death classification: A new insight based on molecular mechanisms. *Experimental cell research*, 433(2), 113860. Advance online publication.

Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *Lancet (London, England)*, 394(10207), 1467–1480.

Delepine, C., Pham, V. A., Tsang, H. W. S., & Sur, M. (2021). GSK3 β inhibitor CHIR 99021 modulates cerebral organoid development through dose-dependent regulation of apoptosis, proliferation, differentiation and migration. *PloS one*, 16(5), e0251173. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251173>

Desautels D, Czaykowski P, Nugent Z, et al. Risk of colorectal cancer after the diagnosis of prostate cancer: a population-based study. *Cancer* 2016; 122: 1254-60.

Dessale, M., Mengistu, G., & Mengist, H. M. (2022). Nanotechnology: A Promising Approach for Cancer Diagnosis, Therapeutics and Theragnosis. *International journal of nanomedicine*, 17, 3735–3749.

- Doubeni, C. A., Major, J. M., Laiyemo, A. O., Schootman, M., Zauber, A. G., Hollenbeck, A. R., Sinha, R., & Allison, J. (2012). Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(18), 1353–1362. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs346>
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Elrod, H. A., & Sun, S. Y. (2008). Modulation of death receptors by cancer therapeutic agents. *Cancer biology & therapy*, 7(2), 163-173.
- Fang, X. L., Cao, X. P., Xiao, J., Hu, Y., Chen, M., Raza, H. K., Wang, H. Y., He, X., Gu, J. F., & Zhang, K. J. (2024). Overview of role of survivin in cancer: expression, regulation, functions, and its potential as a therapeutic target. *Journal of drug targeting*, 32(3), 223–240. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2024.2309563>
- Fearon E. R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual review of pathology*, 6, 479–507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130235>
- Freitas SC, Sanderson D, Caspani S, Magalhães R, Cortés-Llanos B, Granja A, Reis S, Belo JH, Azevedo J, Gómez-Gaviro MV, et al. (2023). New Frontiers in Colorectal Cancer Treatment Combining Nanotechnology with Photo- and Radiotherapy. *Cancers*, 15(2), 383.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Chan, F. K., & Kroemer, G. (2017). Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annual review of pathology*, 12, 103–130. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100247>
- Gelsomino, F., Barbolini, M., Spallanzani, A., Pugliese, G., & Cascinu, S. (2016). The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer treatment reviews*, 51, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.10.005>
- Glynne-Jones, R., Wyrwicz, L., Tiret, E., Brown, G., Rödel, C., Cervantes, A., Arnold, D., & ESMO Guidelines Committee (2017). Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(suppl_4), iv22–iv40.

- Golshani, G., & Zhang, Y. (2020). Advances in immunotherapy for colorectal cancer: a review. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 13, 1756284820917527. <https://doi.org/10.1177/1756284820917527>
- Grützmann, R., Molnar, B., Pilarsky, C., Habermann, J. K., Schlag, P. M., Saeger, H. D., Miehlke, S., Stolz, T., Model, F., Roblick, U. J., Bruch, H. P., Koch, R., Liebenberg, V., Devos, T., Song, X., Day, R. H., Sledziewski, A. Z., & Lofton-Day, C. (2008). Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PloS one*, 3(11), e3759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003759>
- Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Holzer, E., Martens, S., & Tulli, S. (2024). The Role of ATG9 Vesicles in Autophagosome Biogenesis. *Journal of molecular biology*, 168489. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2024.168489>
- Inamura K. (2018). Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. *Cancers*, 10(1), 26. <https://doi.org/10.3390/cancers10010026>
- Ismael, N. E., El Sheikh, S. A., Talaat, S. M., & Salem, E. M. (2017). Mismatch Repair Proteins and Microsatellite Instability in Colorectal Carcinoma (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2): Histopathological and Immunohistochemical Study. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 5(1), 9–13.
- Jensen, J., Pedersen, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., & Madsen, O. D. (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nature genetics*, 24(1), 36–44. <https://doi.org/10.1038/71657>
- Jia, M., Gao, X., Zhang, Y., Hoffmeister, M., & Brenner, H. (2016). Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review. *Clinical epigenetics*, 8, 25. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0191-8>

- Kim, S. H., Song, Y., & Seo, H. R. (2019). GSK-3 β regulates the endothelial-to-mesenchymal transition via reciprocal crosstalk between NSCLC cells and HUVECs in multicellular tumor spheroid models. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR, 38(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1050-1>
- Kingwell K. (2018). Anticancer drugs: Flipping the switch for selective GSK3 inhibition. *Nature reviews. Drug discovery*, 17(5), 314.
- Koncina, Haan, Rauh, & Letellier. (2020). Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers for Colorectal Cancer: Updates and Challenges. *Cancers*, 12(2), 319. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12020319>
- Korphaisarn, K., Morris, V., Davis, J. S., Overman, M. J., Fogelman, D. R., Kee, B. K., Dasari, A., Raghav, K. P. S., Shureiqi, I., Trupti, M., Wolff, R. A., Eng, C., Menter, D. G., Hamilton, S., & Kopetz, S. (2019). Signet ring cell colorectal cancer: genomic insights into a rare subpopulation of colorectal adenocarcinoma. *British journal of cancer*, 121(6), 505–510.
- Koveitypour, Z., Panahi, F., Vakilian, M., Peymani, M., Seyed Forootan, F., Nasr Esfahani, M. H., & Ghaedi, K. (2019). Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell & bioscience*, 9, 97. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0361-4>
- Krasinskas A. M. (2011). EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. *Pathology research international*, 2011, 932932. <https://doi.org/10.4061/2011/932932>
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Kumar, R., Harilal, S., Carradori, S., & Mathew, B. (2021). A Comprehensive Overview of Colon Cancer- A Grim Reaper of the 21st Century. *Current medicinal chemistry*, 28(14), 2657–2696. <https://doi.org/10.2174/0929867327666201026143757>
- Law, S. M., & Zheng, J. J. (2022). Premise and peril of Wnt signaling activation through GSK-3 β inhibition. *iScience*, 25(4), 104159. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104159>

Lee, Y. H., Kim, J., Park, K., & Lee, M. S. (2019). β -cell autophagy: Mechanism and role in β -cell dysfunction. *Molecular metabolism*, 27S(Suppl), 92–103.

Lee, S. Y., Chae, M. K., Yoon, J. S., & Kim, C. Y. (2021). The Effect of CHIR 99021, a Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitor, on Transforming Growth Factor β -Induced Tenon Fibrosis. *Investigative ophthalmology & visual science*, 62(15), 25. <https://doi.org/10.1167/iovs.62.15.25>

Li, C., Zhang, S., Lu, Y., Zhang, Y., Wang, E., & Cui, Z. (2013). The roles of Notch3 on the cell proliferation and apoptosis induced by CHIR99021 in NSCLC cell lines: a functional link between Wnt and Notch signaling pathways. *PloS one*, 8(12), e84659. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084659>

Li, J., Ma, X., Chakravarti, D., Shalapour, S., & DePinho, R. A. (2021). Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes & development*, 35(11-12), 787–820. <https://doi.org/10.1101/gad.348226.120>

Li, M. X., & Dewson, G. (2015). Mitochondria and apoptosis: emerging concepts. *F1000prime reports*, 7, 42. <https://doi.org/10.12703/P7-42>.

Li, W., Zhou, H., Abujarour, R., Zhu, S., Young Joo, J., Lin, T., Hao, E., Schöler, H. R., Hayek, A., & Ding, S. (2009). Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 27(12), 2992–3000.

Lian, X., Zhang, J., Azarin, S. M., Zhu, K., Hazeltine, L. B., Bao, X., Hsiao, C., Kamp, T. J., & Palecek, S. P. (2013). Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nature protocols*, 8(1), 162–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.150>

Liao, S., Gan, L., Qin, W., Liu, C., & Mei, Z. (2018). Inhibition of GSK3 and MEK induced cancer stem cell generation via the Wnt and MEK signaling pathways. *Oncology reports*, 40(4), 2005–2013.

Lin, J., Song, T., Li, C., & Mao, W. (2020). GSK-3 β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1867(5), 118659. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118659>

- Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., Zhou, Z., Shu, G., & Yin, G. (2022). Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>
- Liu, Z. G., & Jiao, D. (2019). Necroptosis, tumor necrosis and tumorigenesis. *Cell stress*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.15698/cst2020.01.208>
- Lorzadeh, S., Kohan, L., Ghavami, S., & Azarpira, N. (2021). Autophagy and the Wnt signaling pathway: A focus on Wnt/ β -catenin signaling. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1868(3), 118926. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118926>
- Lossi L. (2022). The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *The Biochemical journal*, 479(3), 357–384. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210854>
- Manne, U., Shanmugam, C., Katkoori, V. R., Bumpers, H. L., & Grizzle, W. E. (2010). Development and progression of colorectal neoplasia. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 9(1-6), 235–265. <https://doi.org/10.3233/CBM-2011-0160>
- Marchand, B., Arsenault, D., Raymond-Fleury, A., Boisvert, F. M., & Boucher, M. J. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) inhibition induces prosurvival autophagic signals in human pancreatic cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 290(9), 5592–5605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.616714>.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodríguez Yoldi, M. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 197.
- Maurizi, E., Merra, A., Macaluso, C., Schioli, D., & Pellegrini, G. (2023). GSK-3 inhibition reverts mesenchymal transition in primary human corneal endothelial cells. *European journal of cell biology*, 102(2), 151302.
- McDonald, G. T., Sullivan, R., Paré, G. C., & Graham, C. H. (2010). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase promotes tumor cell resistance to chemotherapeutic agents via a mechanism involving delay in cell cycle progression. *Experimental cell research*, 316(19), 3197–3206. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.08.007>

- Mousavinezhad, M., Majdzadeh, R., Akbari Sari, A., Delavari, A., & Mohtasham, F. (2016). The effectiveness of FOBT vs. FIT: A meta-analysis on colorectal cancer screening test. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*, 30, 366.
- Mulcahy Levy, J. M., & Thorburn, A. (2020). Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients. *Cell death and differentiation*, 27(3), 843–857. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0474-7>
- Nandan, M. O., & Yang, V. W. (2011). An Update on the Biology of RAS/RAF Mutations in Colorectal Cancer. *Current colorectal cancer reports*, 7(2), 113–120. <https://doi.org/10.1007/s11888-011-0086-1>
- Narayanankutty A. (2019). PI3K/ Akt/ mTOR Pathway as a Therapeutic Target for Colorectal Cancer: A Review of Preclinical and Clinical Evidence. *Current drug targets*, 20(12), 1217–1226. <https://doi.org/10.2174/1389450120666190618123846>
- Naujok, O., Lentens, J., Diekmann, U., Davenport, C., & Lenzen, S. (2014). Cytotoxicity and activation of the Wnt/beta-catenin pathway in mouse embryonic stem cells treated with four GSK3 inhibitors. *BMC research notes*, 7, 273. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-273>
- Niehrs C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(12), 767–779. <https://doi.org/10.1038/nrm3470>
- Novellademunt, L., Antas, P., & Li, V. S. (2015). Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *American journal of physiology. Cell physiology*, 309(8), C511–C521. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00117.2015>
- O'Brien, M. J., Winawer, S. J., Zauber, A. G., Gottlieb, L. S., Sternberg, S. S., Diaz, B., Dickersin, G. R., Ewing, S., Geller, S., & Kasimian, D. (1990). The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology*, 98(2), 371–379.
- O'Keefe S. J. (2016). Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 13(12), 691–706. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.165>

- Papadatos-Pastos, D., Rabbie, R., Ross, P., & Sarker, D. (2015). The role of the PI3K pathway in colorectal cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 94(1), 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.12.006>
- Parker, T. W., & Neufeld, K. L. (2020). APC controls Wnt-induced β -catenin destruction complex recruitment in human colonocytes. *Scientific reports*, 10(1), 2957. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59899-z>
- Peng Y, Wang Y, Zhou C, Mei W and Zeng C (2022). PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? *Frontiers in Oncology*, 12:819128. doi: 10.3389/fonc.2022.819128
- Phipps, A. I., Limburg, P. J., Baron, J. A., Burnett-Hartman, A. N., Weisenberger, D. J., Laird, P. W., Sinicrope, F. A., Rosty, C., Buchanan, D. D., Potter, J. D., & Newcomb, P. A. (2015). Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology*, 148(1), 77–87.e2.
- Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2059–2072. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>
- Pobezinskaya, Y. L., & Liu, Z. (2012). The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(5), 871–876. <https://doi.org/10.4161/cc.11.5.19300>
- Previs, R. A., Coleman, R. L., Harris, A. L., & Sood, A. K. (2015). Molecular pathways: translational and therapeutic implications of the Notch signaling pathway in cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(5), 955–961. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0809>
- Qian, H. R., Shi, Z. Q., Zhu, H. P., Gu, L. H., Wang, X. F., & Yang, Y. (2017). Interplay between apoptosis and autophagy in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(37), 62759–62768. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18663>
- Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*. 2019;14(2):89-103. doi: 10.5114/pg.2018.81072.

Ring, D. B., Johnson, K. W., Henriksen, E. J., Nuss, J. M., Goff, D., Kinnick, T. R., Ma, S. T., Reeder, J. W., Samuels, I., Slabiak, T., Wagman, A. S., Hammond, M. E., & Harrison, S. D. (2003). Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo. *Diabetes*, 52(3), 588–595. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.3.588>

Russi, S., Sgambato, A., Bochicchio, A. M., Zoppoli, P., Aieta, M., Capobianco, A. M. L., Ruggieri, V., Zifarone, E., Falco, G., & Laurino, S. (2021). CHIR99021, through GSK-3 β Targeting, Reduces Epithelioid Sarcoma Cell Proliferation by Activating Mitotic Catastrophe and Autophagy. *International journal of molecular sciences*, 22(20), 11147. <https://doi.org/10.3390/ijms222011147>

Salem, M. E., Bodor, J. N., Puccini, A., Xiu, J., Goldberg, R. M., Grothey, A., Korn, W. M., Shields, A. F., Worilow, W. M., Kim, E. S., Lenz, H. J., Marshall, J. L., & Hall, M. J. (2020). Relationship between MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 gene-specific alterations and tumor mutational burden in 1057 microsatellite instability-high solid tumors. *International journal of cancer*, 147(10), 2948–2956. <https://doi.org/10.1002/ijc.33115>

Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., & Przybyłowicz, K. E. (2021). A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers*, 13(9), 2025

Schatoff, E. M., Leach, B. I., & Dow, L. E. (2017). Wnt Signaling and Colorectal Cancer. *Current colorectal cancer reports*, 13(2), 101–110. <https://doi.org/10.1007/s11888-017-0354-9>

Shussman, N., & Wexner, S. D. (2014). Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterology report*, 2(1), 1–15. <https://doi.org/10.1093/gastro/got041>

Siegel, R. L., Fedewa, S. A., Anderson, W. F., Miller, K. D., Ma, J., Rosenberg, P. S., & Jemal, A. (2017). Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974–2013. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(8), djw322. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw322>.

Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>.

Simon K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical interventions in aging*, 11, 967–976. <https://doi.org/10.2147/CIA.S109285>

Spano, J. P., Fagard, R., Soria, J. C., Rixe, O., Khayat, D., & Milano, G. (2005). Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 16(2), 189–194. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi057>

Song, Y., Kim, N., Heo, J., Shum, D., Heo, T., & Seo, H. R. (2024). Inhibition of DNMT3B expression in activated hepatic stellate cells overcomes chemoresistance in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma. *Scientific reports*, 14(1), 115. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50680-6>

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021; 71(3): 209-49.

Tagami, S., Okochi, M., Yanagida, K., Ikuta, A., Fukumori, A., Matsumoto, N., Ishizuka-Katsura, Y., Nakayama, T., Itoh, N., Jiang, J., Nishitomi, K., Kamino, K., Morihara, T., Hashimoto, R., Tanaka, T., Kudo, T., Chiba, S., & Takeda, M. (2008). Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. *Molecular and cellular biology*, 28(1), 165–176. <https://doi.org/10.1128/MCB.00863-07>

Taieb, J., Le Malicot, K., Shi, Q., Penault-Llorca, F., Bouché, O., Tabernero, J., Mini, E., Goldberg, R. M., Folprecht, G., Luc Van Laethem, J., Sargent, D. J., Alberts, S. R., Emile, J. F., Laurent Puig, P., & Sinicrope, F. A. (2016). Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(5), djw272. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw272>

Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., & Kominami, E. (2005). Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 1(2), 84–91. <https://doi.org/10.4161/auto.1.2.1697>

Tesniere, A., Schlemmer, F., Boige, V., Kepp, O., Martins, I., Ghiringhelli, F., Aymeric, L., Michaud, M., Apetoh, L., Barault, L., Mendiboure, J., Pignon, J. P., Jooste, V., van Endert, P., Ducreux, M., Zitvogel, L., Piard, F., & Kroemer, G. (2010). Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene*, 29(4), 482–491

Thapa, R., Gupta, G., Bhat, A. A., Almalki, W. H., Alzarea, S. I., Kazmi, I., Saleem, S., Khan, R., Altwaijry, N., Dureja, H., Singh, S. K., & Dua, K. (2023). A review of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) inhibitors for cancers therapies. *International journal of biological macromolecules*, 253(Pt 7), 127375.

Tiwari, A., Saraf, S., Verma, A., Panda, P. K., & Jain, S. K. (2018). Novel targeting approaches and signaling pathways of colorectal cancer: An insight. *World journal of gastroenterology*, 24(39), 4428–4435. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i39.4428>

Vincent, E. E., Elder, D. J., O'Flaherty, L., Pardo, O. E., Dzien, P., Phillips, L., Morgan, C., Pawade, J., May, M. T., Sohail, M., Hetzel, M. R., Seckl, M. J., & Tavaré, J. M. (2014). Glycogen synthase kinase 3 protein kinase activity is frequently elevated in human non-small cell lung carcinoma and supports tumour cell proliferation. *PloS one*, 9(12), e114725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114725>

Waldner, M. J., & Neurath, M. F. (2010). The molecular therapy of colorectal cancer. *Molecular aspects of medicine*, 31(2), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.02.005>

Wang, B., Khan, S., Wang, P., Wang, X., Liu, Y., Chen, J., & Tu, X. (2022). A Highly Selective GSK-3 β Inhibitor CHIR99021 Promotes Osteogenesis by Activating Canonical and Autophagy-Mediated Wnt Signaling. *Frontiers in endocrinology*, 13, 926622. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.926622>

Wang, Y., Jin, C., Tian, H., Xu, J., Chen, J., Hu, S., Li, Q., Lu, L., Ou, Q., Xu, G. T., & Cui, H. (2022). CHIR99021 balance TGF β 1 induced human corneal endothelial-to-mesenchymal transition to favor corneal endothelial cell proliferation. *Experimental eye research*, 219, 108939. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2022.108939>

White E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 12(6), 401–410. <https://doi.org/10.1038/nrc3262>

- Wu, W., Liu, P., & Li, J. (2012). Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Critical reviews in oncology/hematology*, 82(3), 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.08.004>
- Yang, H., Zhou, H., Fu, M., Xu, H., Huang, H., Zhong, M., Zhang, M., Hua, W., Lv, K., & Zhu, G. (2024). TMEM64 aggravates the malignant phenotype of glioma by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *International journal of biological macromolecules*, 260(Pt 1), 129332. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129332>
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Current topics in microbiology and immunology*, 335, 1–32. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8_1
- Yao, K., Gietema, J. A., Shida, S., Selvakumaran, M., Fonrose, X., Haas, N. B., Testa, J., & O'Dwyer, P. J. (2005). In vitro hypoxia-conditioned colon cancer cell lines derived from HCT116 and HT29 exhibit altered apoptosis susceptibility and a more angiogenic profile in vivo. *British journal of cancer*, 93(12), 1356–1363. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.660286>
- Zhang, B., Wang, J., Wang, X., Zhu, J., Liu, Q., Shi, Z., Chambers, M. C., Zimmerman, L. J., Shaddox, K. F., Kim, S., Davies, S. R., Wang, S., Wang, P., Kinsinger, C. R., Rivers, R. C., Rodriguez, H., Townsend, R. R., Ellis, M. J., Carr, S. A., Tabb, D. L., ... NCI CPTAC (2014). Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 513(7518), 382–387.
- Zhang, J., Roberts, T. M., & Shivdasani, R. A. (2011). Targeting PI3K Signaling as a Therapeutic Approach for Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 141(1), 50–61.
- Zhang, Y., & Wang, X. (2020). Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *Journal of hematology & oncology*, 13(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00990-3>
- Zhong, J., Ding, S., Zhang, X., Di, W., Wang, X., Zhang, H., Chen, Y., Zhang, Y., & Hu, Y. (2023). To Investigate the Occurrence and Development of Colorectal Cancer Based on the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 28(2), 37. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2802037>