



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLOREKTAL KARSİNOM İÇİN YENİ
NESİL İLAÇ ADAYI MOLEKÜLLERİN
BELİRLENMESİ, KLİNİK İLAÇLAR İLE
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

SERAP PAMAK BULUT

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MUSTAFA TURAN**

**MOLEKÜLER ONKOLOJİ ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER ONKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ
EYLÜL/2024**

İTHAF

“Mesleğini dürüstlük, doğruluk, adalet ve merhamet ile yaparak daima bize örnek olan, diğerkamlığı, insana, tabiata, eşyaya emanet titizliğiyle yaklaşmayı bize öğreten ve bu tezi yazmaya başladığım sıralar ahirete yolculadığım canım babam Arfit Pamak’a, üç kızının da okuması ve meslek erbabı olması için hep teşvik eden, en kutsal mesleği- anneliği fedakarlıkla yaparak ömrünü bize vakfeden sevgili annem Nurten Pamak’a, her daim en iyi arkadaşlarım olan sevgili kardeşlerim Gülçin ve Gülcan’a, ilim peşinde koşmaya azmetmiş hayat arkadaşına ömür boyu destek sözü veren değerli eşim Naif Bulut’a ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Tezimin tasarım aŐamasından itibaren yol gosteren, deneyleri yapabilmemiz için laboratuvarını açarak desteğini esirgemeyen saygıdeğer Prof. Dr. Yusuf Tutar ve kıymetli asistanlarına, danıŐmanım sayın Prof. Dr. Mustafa Turan'a, tez izleme komitesinde yer alan bilimsel öneri ve desteklerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Sevgi Kalkanlı TaŐ ve Doç Dr. Esra Güzel Tanoğlu'na içtenlikle teşekkür ederim.

Bilimin insanlığın ve tabiatın yararına ortak mirasımız olmasına katkıda bulunan herkese Őükranlarımı sunmayı da bir borç bilirim.

Bu tezin deneysel aŐamalarının gerçekleŐmesi için btce desteği Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nce 2022/172 no'lu proje kapsamında saęlanmıŐtır. Ayrıca SBU BAP 2017/041 projesi alt yapısı desteği ile gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ÖZET	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KOLOREKTAL KANSERLER.....	2
2.1.1 Epidemiyoloji.....	2
2.1.2. Kansere Giden Yol.....	3
2.1.2.1. Kolorektal kanserde risk faktörleri	3
2.1.2.2. Moleküler karsinogenez.....	6
2.1.3. Kanserin Doğasını Anlamak.....	10
2.1.4 Kolorektal Kanserde Tedavi	13
2.2. KANSERDE YENİ TEDAVİ ARAYIŞLARI	18
2.2.1. Yeni İlaç Geliştirilmesi.....	19
2.2.2. Hücre kültürü çalışmaları.....	19
2.3. SEÇİLEN MOLEKÜLLERİN YAPISI VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ..	21
2.3.1. PER Serisi (Heterosiklik Keten Aminaller).....	21
2.3.2. SMY370.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1.1.Cihazlar	24
3.1.2. Kimyasallar	24
3.1.3. Kitler	25
3.2. HÜCRE HATLARI	25
3.2.1. HCT116	25
3.2.2. L929	25
3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ	26
3.3.1. DMEM ve EMEM besiyerlerinin hazırlanması.....	26
3.3.2. Hücre Serilerinin Kültüre Edilmesi	26
3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması	26

3.3.4. Hücrelerin Dondurulması	26
3.3.5. Hücrelerin Plakalara Ekimi.....	27
3.4. İLAÇ UYGULAMALARI	27
3.4. HÜCRE CANLILIK DENEYLERİ.....	29
3.4.1. MTT analizi	29
3.5. KANSER YOLAK ANALİZİ	29
3.5.1. RNA İzolasyonu	30
3.5.2. cDNA Sentezi	30
3.5.3. RT-PCR	31
3.6. FLOW-SİTOMETRİK ANALİZLER	32
3.6.1. Apoptoz Belirlenmesi	32
3.7. FLUORESAN GÖRÜNTÜLEME	32
3.8. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. TARAMA SONUÇLARI	34
4.2. DOZLAMA SONUÇLARI.....	34
4.3. SAĞLIKLI HÜCRE ÇALIŞMALARI VE SELECTIVITY INDEX (SI) DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ	38
4.4. RNA İZOLASYONU VE cDNA SENTEZİ.....	40
4.5. RT-qPCR ANALİZİ	40
4.6. GEN ZENGİNLEŞTİRME ANALİZİ.....	43
4.7. HÜCRE SIKLUSU ANALİZİ.....	52
4.8. APOPTOZ ANALİZİ	53
4.9. HÜCRE GÖRÜNTÜLEME	54
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR	72
EK	75

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1: Kemoterapötiklerin etki mekanizmasına göre sınıflanması	16
Tablo 3.1: 5-FU için doz dilüsyon hesaplaması.....	28
Tablo 3.2: cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları	30
Tablo 3.3: cDNA sentez protokolü	31
Tablo 3.4: Gerçek zamanlı PCR bileşenleri.....	31
Tablo 4.1: PER serisi tarama sonuçları.....	34
Tablo 4.2: 5F için dozlama sonuçları.....	34
Tablo 4.3: 5G için dozlama sonuçları	35
Tablo 4.4: SMY370 dozlama sonuçları	35
Tablo 4.5: 5-FU dozlama sonuçları	35
Tablo 4.6: Bevacizumab dozlama sonuçları	36
Tablo 4.7: HCT116 için Graphpad Prism ile hesaplanan IC50 değerleri	37
Tablo 4.8: Sağlıklı hücrede hesaplanan IC50 değerleri	38
Tablo 4.9: Selektivite indeksi sonuçları.....	39
Tablo 4.10: RNA izolasyonu sonucu konsantrasyon değerleri.....	40
Tablo 4.11: cDNA sentezi için kullanılan bileşiklerin miktarı	40
Tablo 4.12: Kullanılan genler	41
Tablo 4.13: Belirgin değişimi gözlenen belli başlı genler ve fonksiyonları	41
Tablo 4.14: 5-FU Reactom 2022 tabanlı gen zenginleştirme analizinin istatistiksel sonuçları	45
Tablo 4.15: 5-FU KEG 2021 tabanlı gen zenginleştirme analizi istatistik sonuçları	46
Tablo 4.16: SMY370'in reactome 2022 tabanlı gen zenginleştirme analizi istatistik sonuçları.....	47
Tablo 4.17: SMY370 KEG2021 gen zenginleştirme analizi istatistik sonuçları	48
Tablo 4.18: Bevac Reactome 2022 tabanlı gen zenginleştirme analizi istatistik sonuçları	49

Tablo 4.19: Bevac KEG 2021 tabanlı gen zenginleştirme analizi istatistik sonuçları.....	50
Tablo 4.20: Gen zenginleştirme analizlerinde, her üç madde için en çok etkilenen yolaklar	51
Tablo 4.21: Her üç madde için ifadesi belirgin şekilde artıp azalan genler.....	51
Tablo 4.22: Gen ekspresyonlarının en çok azalandan en fazla artış gösterene doğru sıralanmasını gösteren tablo.....	55



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Adenom-karsinom ardışıklığı	6
Şekil 2.2: Kolorektal Karsinom için dizayn edilen ilaç adayı moleküller.....	21
Şekil 2.3: SMY370'in açık formülü.....	22
Şekil 2.4: İzatinin genel yapısı ve izatin fragmanı taşıyan bazı antikanser bileşikler.....	23
Şekil 3.1: 96 kuyucuklu plakada PER serisi ve 5-FU tarama testi (soldaki), PER serisinden 5F ve 5G için dozlama çalışması (sağdaki).	27
Şekil 4.1: 24 saat sonunda MTT analizi sonucu hücre canlılık düzeyleri	36
Şekil 4.2: 48 saat sonunda MTT analizi sonucu hücre canlılık düzeyleri	36
Şekil 4.3: 72 saat sonunda MTT analizi sonucu hücre canlılık düzeyleri	37
Şekil 4.4: IC50 değerleri	37
Şekil 4.5: HCT116 için IC50 grafiği.....	38
Şekil 4.6: Sağlıklı hücre için IC50 grafiği.....	39
Şekil 4.7: 5-FU Reactom 2022 tabanlı gen zenginleştirme analizi sonuçları p değerlerine göre sıralanmıştır.	44
Şekil 4.8: 5-FU KEG 2021 tabanlı gen zenginleştirme analizi	45
Şekil 4.9: SMY370'in reactome 2022 tabanlı gen zenginleştirme analizi sonuçları	46
Şekil 4.10: SMY370 KEG2021 gen zenginleştirme analizi sonuçları	47
Şekil 4.11: Bevac Reactome 2022 tabanlı gen zenginleştirme analizi sonuçları	48
Şekil 4.12: Bevac KEG 2021 tabanlı gen zenginleştirme analizi sonuçları.....	50
Şekil 4.13: 5-FU cell cycle analizi	52
Şekil 4.14: SMY370 cell cycle analizi	52
Şekil 4.15: Bevacizumab cell cycle analizi	53
Şekil 4.16: Apoptoz analizi sonuçları.....	53
Şekil 4.17: Zoe floresan görüntülemeye 5-FU, Bevacizumab, SMY370 ve kontrol grubunun karşılaştırılması.....	54

Şekil 4.18: SMY370 tarafından etkilenen yolakların genel görünümü (Reactome) 56



SİMGELER VE KISALTMALAR

- AIF** : Apoptosis-Inducing Factor
- AKT** : Protein Kinase B
- ANGPT1** : Angiopoietin 1
- ANGPT2**: Angiopoietin 2
- AP-1** : Activator Protein 1
- APAF1** : Apoptotic Protease Activating Factor 1
- APC** : Adenomatous Polyposis Coli
- APAF-1** : Apoptotic Protease Activating Factor 1
- ARNT** : Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
- BAD** : BCL2 Associated Agonist Of Cell Death
- BCL-2** : B-Cell CLL/Lymphoma 2
- BID** : BH3 Interacting Domain Death Agonist
- BIM** : Bcl-2-like Protein 11
- BIRC3** : Baculoviral IAP Repeat Containing 3
- BRAF** : B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
- CA9** : Carbonic Anhydrase IX
- CAF** : Kanser ilişkili fibroblastlar
- CASP2,7,9**: Caspase 2, 7, 9
- CCL2** : Chemokine (C-C motif) Ligand 2
- CCND2** : Cyclin D2
- CD40L** : Cluster of Differentiation 40 Ligand
- CDH2** : Cadherin 2
- CDK4** : Cyclin-Dependent Kinase 4

cDNA : Komplementer DNA

CFLAR : CASP8 and FADD-Like Apoptosis Regulator

CIMP : CpG Island Methylator Phenotype

CIN : Chromosomal Instability

CTL : Cytotoxic T Lymphocyte

CTLA4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4

DCC : Deleted in Colorectal Carcinoma

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

ECM : Extracellular Matrix

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EMT : Epitelyal mezenkimal geiş

FAP : Familial Adenomatous Polyposis

GGK : Gaitada gizli kan

HNPCC : Herediter non-polipozis koli

IC50 : Hücrelerin %50 canlılık gsterdiği inhibisyon konsantrasyonu

KRAS : Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog

KRK : Kolorektal Karsinom

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cells

MEK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase

MLH1 : MutL Homolog 1

MMR : Mismatch Repair

MSH1 : MutS Homolog 1

MSI : Microsatellite Instability

mTOR : Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase

MTT : Hücre Metabolik Aktivitesini Değerlendiren Bir Kolorimetrik Test

Myc : Proto-Onkojen, Transkripsiyon Faktörü

NFAT : Nuclear Factor Of Activated T-Cells

NF-κB : Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells

NK : Natural Killer cell

PD1 : Programmed Cell Death Protein 1

PDL1 : Programmed Death-Ligand 1

RAS : Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog

RB : Retinoblastoma Protein

RET : Rearranged During Transfection

ROS : Reactive Oxygen Species

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

RT : Radyoterapi

RT-qPCR: Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

TGF-β : Transforming Growth Factor Beta

TP53 : Tumor Protein p53

Treg : Regulatory T cells

TSP-1 : Thrombospondin-1

VEGF-1 : Vascular Endothelial Growth Factor 1

VEGFC : Vascular Endothelial Growth Factor C

WNT : Wingless-related integration site

XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

μL : Mikrolitre

μM : Mikromolar

KOLOREKTAL KARSİNOM İÇİN YENİ NESİL İLAÇ ADAYI MOLEKÜLLERİN BELİRLENMESİ, KLİNİK İLAÇLAR İLE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, kolorektal kanser (KRK) için yeni nesil ilaç aday moleküllerin etkinliğini ve bu moleküllerin mevcut klinik ilaçlarla, özellikle 5-fluorouracil (5-FU) ve bevacizumab ile karşılaştırmalı etkilerini değerlendirmektir. In silico yöntemlerle tanımlanan ve sentezlenen aday maddeler, HCT116 ve L929 hücre hatları üzerinde hücresel değişiklikler, sitotoksite, apoptoz, hücre siklusu ve sinyal yolları üzerine etkileri açısından incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Hücre kültürleri için RPMI ve DMEM besi yerleri kullanılarak çeşitli hücre hatları kültüre edilmiş, ilaç uygulamaları yapılmış ve MTT analizi ile hücre canlılığı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Flow sitometri analizleri ile hücre döngüsü ve apoptoz etkileri incelenmiş, gen zenginleştirme analizleri için cDNA sentezi ve RT-qPCR uygulamaları yapılmıştır.

Bulgular: İncelenen yeni aday maddenin KRK hücre hattında 5-FU ve bevacizumab'a göre benzer veya daha üstün antikanser aktiviteler gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle SMY370 molekülü, diğer adaylar arasında en etkili olanı olarak belirlenmiş ve hücrelerin büyük çoğunluğunu öldürmüştür. Gen zenginleştirme analizleri, 5-FU ve SMY370'in benzer yolakları etkilediğini ve programlı hücre ölümü, kaspaz aktivasyonu, nekroz ve SMAC/DIABLO-XIAP aracılı apoptoz cevabı regülasyonu gibi süreçleri modüle ettiğini göstermiştir.

Sonuç: Bu çalışma, özellikle SMY370 gibi yeni moleküler hedeflerin KRK tedavisinde önemli potansiyele sahip olduğunu ve bu yeni aday moleküllerin klinik kullanım öncesi daha detaylı araştırmalarla değerlendirilmesi gerektiğini belirtmiştir. İlacın etkilediği gen ekspresyonları ve sinyal yolları, ileride yapılacak çalışmalarda bu moleküllerin KRK tedavisinde kullanımının optimize edilmesine yardımcı olabilecek önemli bilgiler sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: İlaç Dizaynı, Klinik İlaç, Kolorektal Karsinom, Moleküler Mekanizma.



IDENTIFICATION OF NEW GENERATION DRUG CANDIDATE MOLECULES FOR COLORECTAL CARCINOMA, COMPARISON OF EFFECTS WITH CLINICAL DRUGS

ABSTRACT

Aim: The objective of this study was to assess the efficacy of next-generation drug candidate molecules for colorectal cancer (CRC) and to compare their effects with current clinical drugs, specifically 5-fluorouracil (5-FU) and bevacizumab. Identified and synthesized through in silico methods, these candidate compounds were tested on HCT116 and L929 cell lines for cellular alterations, cytotoxicity, apoptosis, cell cycle impact, and signaling pathways.

Materials and Methods: In terms of materials and methods, various cell lines were cultured using RPMI and DMEM media, subjected to drug applications, and cell viability was measured through MTT assay. Cell cycle and apoptosis effects were examined via flow cytometry analysis, and cDNA synthesis and RT-qPCR applications were conducted for gene enrichment analyses.

Results: The findings indicated that the new candidate compounds displayed similar or superior anti-cancer activities compared to 5-FU and bevacizumab in the CRC cell line. Specifically, the molecule SMY370 was identified as the most effective, inducing death in the majority of cells. Gene enrichment analyses suggested that 5-FU and SMY370 affected similar pathways, modulating processes such as programmed cell death, caspase activation, necrosis, and regulation of apoptosis response mediated by SMAC/DIABLO-XIAP.

Conclusion: This study suggests that new molecular targets, particularly SMY370, hold significant potential for CRC therapy and that these new candidate molecules should be subjected to more detailed investigations before clinical use. The gene expression and signaling pathways influenced by the drug provide essential information that may assist in optimizing the use of these molecules for CRC treatment in future studies.

Key Words: Clinical Drug, Colorectal Carcinoma, Drug Design, Molecular Mechanism.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanserler (KRK), en sık görülen üçüncü kanser tipidir. Kanserden ölümlerde de dördüncü sırada yer almaktadır. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi kolorektal kanserlerde de etkin ve minimum yan etkiye sahip yeni ilaç arayışları devam etmektedir. KRK'da moleküler yolakların daha iyi anlaşılması ve hedeflenmiş tedavilerin geliştirilmesi, hastalarda sağkalımı arttırmak ve toksisiteyi azaltmak için çok önemlidir.

Bu çalışmada, In silico çalışmalar ile tanımlanmış ve sentezlenmiş aday maddeler KRK hücre hatları üzerinde test edilmiştir. Etkinlik, hücresel değişiklikler, sitotoksosite, apoptoz, hücre siklusu ve sinyal yolları üzerine etkiler incelenerek, KRK'da klinikte kullanılan 5-fluorouracil ve bevacizumab ile etkileri karşılaştırılmıştır. Bu çalışma ile;

- Kolorektal karsinom alt tiplerinde ilaç etken maddesi tanımlamak,
- Etken maddeler ve klinik ilaçların moleküler sinyal yolları üzerine etkisini incelemek,
- Floresan yöntemler ile hücresel değişimleri mitokondri, hücre iskeleti ve sitozolik değişimler olarak belirlemek,
- Flow sitometri ile etken maddelerin hücre döngüsü ve apoptoza etkisini incelemek,
- Çalışmanın neticesine göre tedavi için yeni moleküler hedefler belirlemek,
- Sinyal yolları benzerlik-farklılıklarını bulmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KOLOREKTAL KANSERLER

2.1.1 Epidemiyoloji

En sık rastlanan kanser türlerinden biri olan KRK(Kolorektal kanser) kanserden ölümlerin de önde gelen nedenlerinden biridir. Her yıl 600.000den fazla insan bu sebeple hayatını kaybetmektedir(1). KRK patogenezinde hem çevresel hem genetik faktörler etkilidir. ABD ve Avrupa ülkelerindeki insidans Afrika ve Asya ülkelerinin on katıdır. İlk kuşak göçmenlerde insidans kendi ülkeleriyle uyumlu iken sonraki kuşakta yaşanan ülkenin insidans hızına uyum sağlamakta olduğu bildirilmiştir. Bununla ilgili olarak batı tarzı yaşam şekli, kırmızı et ve alkol tüketimi, obesitenin etkisi tartışılmıştır(2). Kimi epidemiyolojik çalışmalarda obes erkeklerde %30-70 risk artımından söz edilmektedir(3). Sporadik hastalık tüm vakaların %70-85'ini teşkil etmektedir. Metastatik KRK'lar tüm vakaların %13 kadarını teşkil etmekte ve genel sağkalım da %13 civarında gerçekleşmektedir(3). KRK'ler TC Sağlık Bakanlığı 2014 yılı istatistiklerine göre ülkemizde yılda yaklaşık 15.000 yeni vaka ve 7000 civarında ölümden sorumludur(4).

Kolorektal kanserler 65-74 yaş arasında daha sık görülmektedir(5). Ülkemizde 50 yaşından itibaren GGK testi ve kolonoskopi kanser tarama programlarına dahil edilmiştir(6). Randomize kontrollü çalışmalar, GGK ve fleksible sigmoidoskopinin mortalite üzerinde sırasıyla %18 ve %26 azalma sağladığını göstermiştir. Kolonoskopinin de mortaliteyi azaltmada anlamlı katkı sağladığını düşündüren bulgular mevcuttur(7). 50 yaş altında KRK insidansı %11 civarında olmakla birlikte her yıl %1-2 artıyor görünmektedir. Gençlerde bu artan insidansla ilgili olarak obesite, sedanter yaşam işlenmiş gıdalar, kırmızı et ve şekerli ürünlerin tüketimi suçlanmışsa da nedensellik kanıtlanamamıştır. Bununla birlikte özellikle risk faktörleri varlığında taramaya erken başlanması önerilmektedir(2).

Neoadjuvan ve adjuvan kemoterapi ve/veya radyoterapinin eklenmesi ile cerrahi tedavi hala temel tedavi modalitesi olarak yerini korumaktadır. Son zamanlarda, tedavi seçimi ve prognozda tümörün evresi ve hastanın durumu kadar, tümörün moleküler kimliğinin de belirleyici olduğu anlaşılmıştır. Buna bağlı olarak daha bireyselleştirilmiş tedavilerin giderek ön plana çıktığı görülmektedir. Bilhassa evre 4 tümörler için kemoradyoterapinin yanında immünoterapiler ve diğer moleküler hedefli tedavilerin kullanılması sağkalımı olumlu etkilemiştir. Yeni ilaç tedavilerinin ortaya çıkması ve bunların kombine kullanımları ile, 1970’lerde %51 civarında olan 5 yıllık genel sağkalım oranları 2000’ler itibariyle %65’e çıkmıştır(8). Lokalize tümörler için 5 yıllık sağkalım %90’larda iken bölgesel tutulum %72, uzak metastaz ise %15 sağkalım ile seyretmektedir(5). Moleküler patogeneze ve risk faktörlerine dair yoğun araştırmalar, tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen her yıl 1,3 milyon yeni vaka tespit edilmekte ve 0,7 milyon kişinin ölümüne nede olmaya devam etmektedir(7). Her ne kadar son birkaç dekatta sağkalım grafiğinde yukarı doğru bir eğim kısmi başarının göstergesi olarak yüz güldürücü olsa da hala kat edilmesi gereken çok mesafe olduğu açıktır.

Etkili bir anti kanser- ilaç tasarlamak için pek çok aday molekülden invitro ve invivo çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Yıllardır bu alanda yapılan sayısız araştırmaya ve tedavideki gelişmelere rağmen %100 kür sağlamak mümkün olmamıştır. Kanserın kompleks moleküler mekanizmaları, multifaktöryel etyopatogenezi, genetik-epigenetik-çevresel etkileşim dinamikleri, kanserin mikroçevresiyle ilişki, iletişim ve immün sistemden kaçış becerileri, hatta immün sistemi lehine manüple edebilmesi kanserin doğasındaki güçlüklerdendir. Bunun yanında tümör heterojenitesi, alt klonlar, kök kücreler, süregiden mutasyonlar, ilaçlara direnç gelişmesi gibi pek çok etken kanser tedavisinde önemli açmazlar oluşturmaktadır(9). Kemoterapötikler doğrudan toksik etki dışında immünojenik hücre ölümünü de tetikleyerek etkili olmaktadır(10) Halen KRK tedavisinde en sık kullanılan kemoterapötikler 5-Fluorouracil ve oxaliplatin dir(11).

2.1.2. Kansere Giden Yol

2.1.2.1. Kolorektal kanserde risk faktörleri: KRK’de bilinen risk faktörleri, kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen faktörler olarak ikiye ayrılabilir. Yaş, ırk, aile öyküsünde KRK varlığı, hiperinsülinemi, hipertrigliseridemi, inflamatuvar barsak

hastalıkları, genetik geçişli bazı sendromlar kontrol edilemeyen faktörlerden sayılmaktadır. 40 yaşın üstünde KRK insidansı artmaktadır. Erkeklerde kadınlara göre %25 daha yüksektir(12). Beslenme biçimi, sigara, alkol tüketimi, obesite ve gece vardiyasında çalışma gibi faktörler ise kontrol edilebilen riskler arasındadır(7,12). Bunlardan belli başlılarına kısaca göz atalım:

2.1.2.1.a. Aile öyküsü: Tüm KRK'lerin %10'u herediter geçiş göstermektedir. Birinci derece yakınında (ebeveyn, kardeş, çocuk gibi) KRK öyküsü olması durumunda aile öyküsü olmayana göre rölatif risk 1,72'dir (%95 güven aralığı: 1,34-2,19). Birden fazla birinci derece yakınında KRK olması rölatif riski 2,75'e yükselttiği hesaplanmıştır(%95 güven aralığı: 1,34-5,63). Hatta 45 yaşın altındakiler için risk iki katına çıkmaktadır(7).

2.1.2.1.b. Beslenme:Tüm kanser tiplerinde beslenme ile ilgili hususların önem taşıdığı bilinmektedir. Neredeyse %70-90 oranında beslenmeye dair etkenler kansere giden yolda etkili olmaktadır. KRK'da yüksek protein, özellikle kırmızı ve işlenmiş et kolon hücrelerinde genetik hasar oluşturmaktadır. Kırmızı etin demirden zengin olması, demirin ROS üretimini arttırması ile bazı sitokinlerin salınımını ve inflamasyon gelişimini etkiliyor görünmektedir. Özellikle işlenmiş ette bulunan N-nitroso bileşikler genotoksik maddeler olarak KRK patogenezinde suçlanmaktadır. Etin yüksek sıcaklıkta (100-300 °C) pişirilmesi sonucu oluşan heterosiklik aminler de risk artışı ile ilişkili bulunmuştur. Yüksek yağ tüketimi bilhassa hayvansal menşeli yağların tüketilmesinin riski arttırdığını öne sürenler kadar ilişkili olmadığını hatta bitkisel yağların koruyucu etkisi olduğunu öne süren çalışmalar da vardır. Yüksek omega 3 ve D vitamini içeriği ile balık tüketiminin, PGE3 gibi antimitojenik ürünler ile inflamasyon yolları üzerine etkisinin koruyucu rol oynayabileceği savunulmaktadır. Ayrıca polifenolik bileşikler, flavonoidler, selenyum, kalsiyum, vitaminler folik asidin KRK riskini önlemede olumlu etkisine dair kanıtlar bulunmaktadır. Meyve -sebze tüketiminin KRK riskini %14 azalttığı tahmin edilmektedir. Liften, posadan zengin beslenme de KRK riskini azaltmada etkili olduğu bilinmektedir(7)

2.1.2.1.c. Sigara: Uzun süre ve yoğun sigara kullanımı 2-3 kat risk artışın sebep olmaktadır. Günde 20'den fazla ve 30 yıl sigara içen bir bireyde KRK gelişme

riski %34-46 arasındadır. İlişkinin doza bağımlı olduğu ve diğer risk faktörleriyle kümülatif bir etkisi olduğu görülmektedir(7).

2.1.2.1.d. Alkol: Alkol tüketimi KRK'da anlamlı bir risk artışına yol açmaktadır. Haftada 100gr'ın üstünde etanol alınması KRK'de %18'lik risk artışına yol açmaktadır.

2.1.2.1.e. Obesite: Özellikle santral obesite KRK için risk taşımaktadır. Bir çok mekanizma ile birlikte obesitenin yol açtığı inflamasyonun KRK gelişimine zemin hazırladığı iddia edilmektedir.

2.1.2.1.f. İnsülin homeostazı: Obesite ile de ilişkili olarak insülin dengesizlikleri hiperinsülinemi ve hipertrigliseridemi KRK gelişiminde suçlanmaktadır. İnsülin kolonik mukoza hücreleri için önemli bir büyüme faktörüdür(7,12)

2.1.2.1.g. İnflamatuvar barsak hastalıkları: KRK gelişiminde inflamasyonun rolü bilinmektedir Crohn ve ülseratif kolit hastalarında %10-15'inde ölüm nedeni kanserdir. Tutulum miktarı ve süre ile risk 20 kata kadar çıkmaktadır.

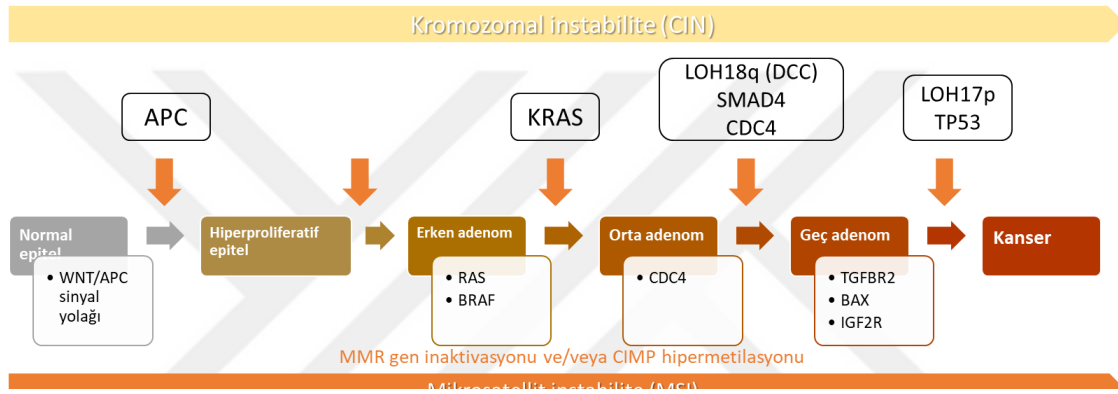
2.1.2.1.h. Karın bölgesine radyasyon: Çocukluk döneminde karın bölgesine radyasyon alan kişilerin yetişkinlik döneminde KRK görülmesi genel popülasyondan 4,2 kata kadar artmış görünmekte ve taramaya 35 yaşında veya RT'den 10 yıl sonra başlanması önerilmektedir(12).

2.1.2.1.i. Mikrobiota ve viral patojenler: Streptokokkus bovis, Helikobakter pilori, Escherichia Coli, JC, SV40, HPV, CMV KRK patogenezinde suçlanan patojenlerden bazılarıdır(7).

2.1.2.1.j. Gece çalışma: Her ay en az üç gece ve en az 15 yıl gece çalışmanın kadınlarda KRK'ni arttırdığı gösterilmiştir. Wang ve ark, 5 yıl gece vardiyasında çalışmanın %11 KRK riskini arttırdığını bulmuşlardır. Gece-gündüz ritmi, sirkadyen ritmin tümöröenez ve bağışıklık sistemi üzerine etkisi giderek daha çok ilgi çekmektedir(7).

2.1.2.1.k. Diğer: Akromegali, Renal transplantasyon, androjen blokaj tedavisi, kolesistektomi, koroner kalp hastalığı mevcudiyeti, üreterokolik anostomoz, BRCA1 mutasyonu varlığı gibi çeşitli klinik durumlarda KRK insidansının arttığına dair çalışmalar bulunmaktadır(12)

2.1.2.2. Moleküler karsinogenez: Kolorektal kanserde genetik, epigenetik moleküler yollar üzerinde çalışmalar birçok mekanizmayı açıklığa kavuşturmuş, polip-adenom-karsinom geçişleri ile ilişkilendirilmiştir(8).



Şekil 2.1: Adenom-karsinom ardışıklığı

Kolorektal kanserlerin büyük çoğunluğunun adenomatöz poliplerden geliştiği kabul edilmektedir. İlk kez Fearon ve Vogelstein tarafından öne sürülen adenom-karsinom sekansı, kolon ve rektumda bir dizi onkojen aktivasyonu ve tümör supresör gen inaktivasyonu ile mutasyonların birikiminin yol açtığı tümörögenezi tanımlar (Şekil 2.1). Daha sonra modifiye edilmiş olmasına rağmen normal kolon hücrelerinin kanser hücresine dönüşümünü açıklamada önemini korumaktadır. Başlangıçta tubuler ve tubulovillöz adenomların karsinoma ilerlediği bildirilmiş, daha sonra sesil ve klasik serrated adenomların da bu şekilde kansere ilerlediği anlaşılmıştır. Tubuler adenomatöz poliplerin karsinogenezinde APC gen inaktivasyonu ve CIN etkili bulunmuştur. Serrated adenomlarda ise MSI, CIMP ve BRAF V600E'nin etkisi gösterilmiştir(13)

Gerek sporadik gerek herediter KRK'da üç moleküler patern tanımlanmıştır:

1. Kromozomal instabilite (CIN): KRK'ların %85'inden sorumludur. Kromozomun yapısındaki değişiklikler tümör süpresör genin doğal halinin kaybıyla sonuçlanmaktadır. Neticede APC, KRAS, BRAF, SMAD4 ve TP53 gibi onkojen yahut tümör süpresör genlerde mutasyon birikimlerine yol açmaktadır. Kötü prognostik faktör olarak kabul edilmektedir(7)(13)

2. Mikrosatellit instabilite (MSI): KRK'nın %15'nde tek ya da çift nükleotidde MSI tespit edilmiştir. Genomda 1-6 baz çiftinden oluşan tekrarlı dizilerin oluşturduğu mikrosatellitler DNA yanlış eşleşme tamir mekanizmasının (MMR) çalışmaması sonucu mutasyona yatkınlık oluşturur. MSI karsinogenezinde DNA MMR genlerinin hipermetilasyon veya somatik mutasyon ile inaktivasyonu söz konusudur. MSI içeren tümörlerin CIN (+) tümörlere göre iyi prognozlu olduğu kabul edilmektedir(7,13)

3. Aberrant CpG metilasyonu: CpG ada metilatör fenotip (CIMP) olarak ifade edilen epigenetik bir modifikasyonla metilasyon paternlerinin değişmesi sonucu kanser hücrelerindeki gen ifadesinin susturulmasıdır. KRK'de genomda genel bir hipometilasyon olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte APC, MLH1 ve MSH1 gibi genlerde ise hipermetilasyon dikkat çekmektedir.

2012'de kanser genom atlası araştırmaları (TCGA) ile 224 KRK'un da kapsamlı moleküler analizleri, tam genom dizileme çalışmaları yapılmıştır. Her 10⁶ bazda 12'den fazla mutasyon izlenenler hypermutated olarak sınıflanmıştır. Tüm vakaların %16'sı bu yoğun mutasyon izlenen gruptayken %84'ünün "non-hypermutated" olduğu izlenmiştir. "Hypermutated" olanların %75'i MSI, MLH1 metilasyonu ve CIMP özelliklerine sahipken %25'i ise somatik MMR geni ve "Polymerase ε" (POLE) mutasyonları göstermektedir. "Non-hypermutated" KRK'lar ise APC, TP53, KRAS ve daha az olarak PIK3CA, FBXW7, SMAD4, TCF7L2, NRAS, FAM123B, CTNNB1(β-catenin), ACVR1B ve SOX9 genlerinde somatik mutasyonlardan zengin görünmektedir. Yine "hypermutated" grupta ACVR2A, APC, TGFBR2, BRAF, MSH3 ve MSH6 mutasyonlarına sık rastlanmaktadır. TP53 ve APC mutasyonları "non-hypermutated" grupta, "hypermutated" gruba göre daha sık görülmektedir. TCGA çalışması, WNT sinyal yolağı ve CTNNB inhibitörleri ile

MAPK ve PI3K yollarındaki birkaç proteini (IGF, IGFR, ERBB2, ERBB3, MEK, AKT, MTOR) inhibisyonunu potansiyel terapötik hedef olarak önermektedir(14)

Epigenetik değişiklikler yaşla orantılı artmakta ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Genetik değişikliklerin sinyal yollarının anlaşılması hastalığın tedavisi ve önlenmesi için yapılacak çalışmalara ışık tutması bakımından son derece önemlidir. Bu sebeple genetik mekanizmalara, sinyal yollarına biraz daha yakından bakmakta yarar bulunmaktadır.

2.1.2.2.a. APC/WNT sinyal yolağı: Adenomatöz polipozis koli (APC) 5q21 üzerinde lokalize önemli bir tümör supresör genidir. KRK'da mutasyonlar bu genin budanmasına yahut temelli kaybına neden olmaktadır. Bu haliyle "β-catenin"e bağlanamaz ve hücre büyümesi ve gelişmesinin düzenlenmesine katılamaz. Ardından gelen WNT sinyali ise kolorektal tümörögenezin ilk adımını başlatır. APC mutasyonu KRK oluşumunun erken döneminde gerçekleşir. Klasik tubuler adenom, CIN (+) tümörler ve FAP ile ilişkilidir(7,13).

2.1.2.2.b. 18q allelinin kaybı: KRK'da en sık bulunan genetik değişikliktir (%75'e varan oranda). Bu bölgede yer alan DCC (Deleted in colorectal cancer) geninin, kanserögenezisin ileri aşamalarında etkili olduğu düşünülmektedir.

2.1.2.2.c. TP53 mutasyonu: Hücre siklusu kontrol noktalarında ve apoptozda oynadığı rolden dolayı genomun muhafızı olarak adlandırılmıştır. Doğal TP53, DNA hasarı durumunda siklusu yavaşlatıp durdurmaktadır. KRK'lu hastaların %50'sinde mutanttır ve adenomun kansere dönüşümünde rol oynamaktadır(7,13).

2.1.2.2.d. TGFβ inaktivasyonu: Bir başka tümör supresör olan "transforming growth faktör β" sinyali birkaç şekilde inaktive olabilmektedir. Genellikle KRK karsinögenezin son aşamalarında heterozigotite kaybı ile 18.kromozomun uzun kolunda görülen somatik mutasyonlar gözlenmektedir. TGFβ yolağı ile ilişkili SMAD-4 molekülü KRK'ların %50'sinde saptanmaktadır ve lenf nodu metastazı, prognoz ve 5-FU'e cevapla ilgili olduğu düşünülmektedir(7,13)

2.1.2.2.e. KRAS proto-onkojeninin aktivasyonu: KRK'ların %50'sinde görülür. Aktif formda kalması hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptoz ile ilgili olaylarda rol alan intrasellüler sinyal ağını adenomadan karsinoma geçiş sürecine

yöneltir. EGFR sinyalinin BRAF aracılı MAPK yolağında yer alan bir moleküldür. KRAS mutasyonu adenom – karsinom sekansında APC mutasyonundan sonra oluştuğu kabul edilir. %10-15 vakada BRAF V600E mutasyonu vardır ve KRAS ve BRAF mutasyonlarından birinin varlığı karsinogenez için yeterlidir. KRAS mutasyonu varlığı genel sağkalım açısından kötü prognostik bir anlam taşır. Ayrıca tedavide EGFR antikorunu kullanılma kararı için de bir belirteçtir. Tümörün KRAS(+) olması EGFR antikorlarından yarar görmeyeceğini gösterir(7,13).

2.1.2.2.f. Mikrosatellit instabilite yolağı: Hem sporadik hem de HNPCC ile ilişkili KRK’da görülen bir fenotiptir. Lynch sendromunda germline mutasyonlar, sporadik vakalarda ise somatik mutasyonlar ve bilhassa MLH1 geninin hipermetilasyonu MMR sistemi devre dışı kalmaktadır. MSI taşıyan tümörler mikrosatellite instabilite insidansına göre iki gruba ayrılır: MSI-H (yüksek) ve MSI-L(düşük). Mikrosatellit instabilite göstermeyen tümörler ise MSS (stabil) olarak kategorize edilir. MSI mutasyonlarına yatkın 30 kadar gen tespit edilmiştir.

2.1.2.2.g. Aberran CpG metilasyonu: DNA metilasyonu bir enzim tarafından sitozin bazının 5. karbonuna bir metil grubu eklenmesi ile oluşan epigenetik bir düzenlemedir. Neoplastik hücrelerin genomunda genel bir metilasyon kaybı olduğu artık bilinmektedir. Genellikle kromozomun satellit veya perisentromerik bölgelerinde görülen hipometilasyonun genomik instabiliteyi arttırması sözkonusudur. Karsinogenezde bir genin promoter bölgesinin hipermetilasyonunun gen transkripsiyonunun susturulmasına yol açtığı ve mutasyonu inaktive ettiği düşünülmektedir. KRK’da en iyi bilinen epigenetik susturma örneği MLH1 geni “promoter”inin hipermetilasyonu ile oluşan MSI’dir.

2.1.2.2.h. Mikro-RNA’lar: Kodlamayan RNA molekülleri içinde kısa zincirli yüzlerce miRNA bilinmektedir. Yenileri de keşfedilmeye devam etmektedir. miRNA’ların upregülasyonu veya down regülasyonu hedef RNA’da translasyon baskılanması ile temel hücresel olaylarda regülasyona hizmet edebilir. Örneğin APC geninin regülasyonunda miR-135a ve miR135b’nin artışı rol oynamaktadır. Let-7 olarak bilinen miRNA ailesi KRAS ifadesini hedef alarak baskılamaktadır.

2.1.2.2.1. Transkripsiyon faktörleri DNA’ya bağlanarak belli genleri aktive yahut inaktive eden proteinlerdir. Tümör oluşumu, gelişimi ve metastazda rollerine

dair araştırmalar bulunmaktadır. KRK'da NF-κB(nuclear factor κB), STATs(signal transducer and activator of transcription) CREB (cAMP-response element binding protein), p53 gibi transkripsiyon faktörlerinin rolleri gösterilmiştir. Onkojenik potansiyeli olan bazı transkripsiyon faktörlerinin KRK'da tümörogenezin muhtelif aşamalarında (hücre büyümesi ve sağkalımı, epitelyal-mezenkimal geçiş, anjiogenez ve ilaç direnci vb) etkili olduğu düşünölmektedir. NF-κB, STAT, NFAT (nuclear factor of activated T cells), CREB, AP-1 (activator protein-1), Sp1 (specificity protein 1) ve FOXM1 (Forkhead box M1) bu onkojenik transkripsiyon faktörlerine örnek verilebilir. Tümör süpresör özellikli transkripsiyon faktörlerinin tümör gelişim sürecinde inaktive olduğu bilinmektedir. p53, FOXO3a (forkhead transcription factor O subfamily member 3a), RUNX3 (runt-related transcription factor 3), KLF4 (Krüppel-like factor 4) bunlara örnektir. Hücre döngüsünü durdurma, DNA onarımı, antiangiogenez ve apoptoz gibi süreçler üzerinden tümörogenezi baskırlar. Bunların KRK gelişiminde genetik veya epigenetik değişikler (hipermetilasyon ya da heterozigotite kaybı) ile downregüle olmasının tümöre giden yolu açtığı düşünölmektedir(15).

2.1.3. Kanserin Doğasını Anlamak

2000'lerin başında Hanahan ve Weinberg, kanser hücrelerini karakterize eden altı temel özellik tanımlamışlardır:

1. Hücre Proliferasyonunun Sürekli Aktivasyonu: Kanser hücreleri, normal hücrelerden farklı olarak kontrolsüz bir şekilde bölünme yeteneğine sahiptir. Gerek kendi büyüme faktörlerini üreterek gerek hücredeki büyüme faktörü reseptörlerini arttırarak ya da değiştirip ligandsız aktive olur hale getirerek mitojenik sinyallerin sürdürölmesini sağrlar.

2.Hücre ölümüne direnç: Programlı hücre ölümü hücreleri karsinogenezden koruyan bir bariyer gibidir. Kanser hücreleri, normal hücrelerin apoptozise girmesi gereken durumlarda apoptozis sürecini etkinleştirme yeteneğini kaybetmiştir.

3. Büyümeyi baskılayıcı faktörlerden kaçınma: Tümör süpresör olarak bilinen faktörler arasında TP53 ve RB özel bir yer tutar. Sinyalizasyon kavşaklarında hücrenin proliferasyon, senescence veya apoptoz yollarından hangisine devam edeceğine karar vermesinde rol oynarlar.

4. Angiogenезin Artışı: Kanser hücreleri, kan damarları oluşturarak tümörün büyümesini ve metastazını destekleyen yeni damarların oluşumunu teşvik eder. Angiogenезi uyaran (VEGF-A) ve inhibe eden (TSP-1) gibi faktörlerin etkisi altındadır. VEGF gen ifadesi hipoksi yanısıra RAS ve myc gibi onkojen sinyalleri tarafından upregüle edilebilir.

5. İnvazyon ve metastaz: Tümörogenез sırasında kanser hücreleri şekil değişikliğine uğrar ve tutunma özelliklerini kaybeder. Sağlıklı hücrelerde hücre-hücre ve hücre ECM adhezyonunda önemli rol oynayan E-cadherin ekspresyonunda azalma görülür. EMT (epithelial-mesenchymal transition) gelişimsel düzenleyici bir programdır. Snail, Slug, Twist, and Zeb1/2 gibi “pleiotropic” genler tarafından yönetilen, embriyogenез için kullanılan bu süreç karsinogenезde de devreye girmektedir. İnvazyon-metastaz kaskadı olarak da adlandırılan çok aşamalı bu süreç lokal invazyon ile başlar. İnvazyon ile kan ve lenfatik damarlarda devam eden kanser hücrelerinin yolculuğu uzak bir dokuda ekstrasvazyon ile yeni bir odak (mikrometastaz) oluşturması ile başka bir aşamaya geçmektedir. Kolonizasyon olarak tanımlanan bu son adım yeni yerleşim yerinde kanserin büyümesiyle devam eder.

6. Replikatif ölümsüzlük (Sınırsız bölünme yeteneği): Sağlıklı hücreler belirli bir mitoz döngüsünden sonra “senescence” (yaşlılık) evresine girer. Tıpkı apoptoz gibi “senescence” de hücreyi kanserden koruyan bir mekanizmadır.

2011’de bu altı karakteristik özelliğe enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi ve immün kaçış özellikleri eklenmiştir(16). Tümör hücrelerinin enerji ihtiyaçlarını aerobik glikoliz ile sağlamak üzere metabolizmalarını yeniden düzenlemeleri Warburg etkisi olarak tanımlanmıştır. Hipoksik ortamda kanser hücreleri, aktive onkojen ve mutant tümör supresörlerin etkisi altında, glikoz taşıyıcılarını ve glikolitik bir çok enzimi upregüle etmektedirler.

İlginç olan bir başka durum da tümörlerde enerji metabolizması bakımından farklılaşmış subklonların kooperasyon ile birbirlerini desteklemeleridir. Bir grup Warburg etkisi ile glukoz bağımlı metabolizmaları sonucunda laktat üretirken diğer grup enerji kaynağı olarak sitrik asit siklusunda laktatı kullanır. Birinin atığı, diğerinin yakıtı olur. Aslında bu, kaslarda da kullanılan fizyolojik bir mekanizmadır.

Tümörlerin başlangıç, büyüme ve yayılmasında immün gözetimin antagonist etkisine dair çok sayıda kanıt bulunmaktadır. Tümör eradikasyonunda doğal ve

kazanılmış immunité rol oynamaktadır. İmmunolojik olarak baskılanmış bireylerde artan kanser insidansı bilinmektedir. Hayvan deneylerinde immün kompromize farelerde gelişen tümörler sağlam immün sisteme sahip farelerde tümör oluşturmamıştır. Bir diğér bulgu da kolon ve over tümörlerinin CTL ve NK hücreleri ile infiltrasyonu iyi prognoz ile korele bulunmuştur. Kanser hücrelerinin immün gözetimden kaçmak için bir çok yol kullandığı tespit edilmiştir. Örneğin, TGF- β gibi immünsupresif faktörleri sekrete etmek veya Tregs (regülatör T hücreleri) ve MDSC (myeloid-derived suppressor cells) gibi immünsupresif enflamatuar hücreleri uyararak yapabilir.

Hanahan ve Weinberg, kansere özgü bu davranış özelliklerini kolaylaştıran iki ortam ve mekanizmaya da dikkat çekmişlerdir: İlki; genomik instabilite ve mutasyon ve diğeri tümör destekleyici enflamasyon. Kanser hücreleri, genomlarında birikmiş genetik değişiklikler ve mutasyonlarla karakterize edilen genetik instabiliteye sahiptir. Tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar veya epigenetik değişiklikler sonucunda normal hücre büyüme kontrolünü kaybeder. Ayrıca onkogenlerin aşırı aktivasyonu ile karakterize edilen, hücre büyümesi ve bölünmesinde artışa neden olan genetik değişikliklere sahiptir. Fonksiyonel olarak anlamlı epigenetik değişiklikler sadece tümör hücrelerinde değil tümör ilişkili stromada da görülmektedir.

Tümör içindeki stromal kompartmanlar, tümör mikroçevresi endotelial hücreler, perisitler, enflamatuar hücreler, CAF (kansere ilişkili fibroblastlar) ve kanser kök hücreleri ile progenitör hücreleri içermektedir. Tümör hücreleri ve tümör mikroçevresindeki hücreler arasındaki ilişkinin karşılıklı sinyalizasyon devreleriyle kanserogenez ve metastaz üzerine etkileri aydınlatılmaya devam etmektedir.

Hiperproliferasyon genetik instabiliteyle birlikte klonal heterojeniteye neden olmaktadır. Tümörlerin çoğunda değişen miktarlarda kanser kök hücrelerine de rastlanmaktadır. Ekildiği dokuda yeni tümör oluşturabilecek işlevselliğe ve kök hücrelerde görülen hücresel markerlara sahiptirler. Kanser kök hücrelerinin kaynağı onkojenik transformasyona uğramış normal bir kök hücre olabileceği gibi progenitör hücre denilen kısmen farklılaşmış geçiş hücrelerinin daha sonra kök hücre karakteri kazanması olabilir. Kanser kök hücrelerinin rekürrens ve tümör dormancy üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir.

2022’de Hanahan ve Weinberg, kanserin gelişiminde rol oynayan bir dizi ana mekanizma daha tanımlamışlardır. Fenotipik plastisite ve diferansiyasyonun

bozulmasını iki yeni kansere özgü özellik olarak önermişlerdir. Ayrıca non-mutasyonel epigenetik yeniden programlama ve polimorfik mikrobiomlar kanser oluşumunu destekleyici yapısal yetenekler olarak sunulmaktadır. Değişik orijinlerden senescent hücrelerin tümör mikroçevresindeki varlık ve rollerine de işaret edilmektedir(17).

Bireyler arasındaki mikrobiyom farklılıklarının kanser fenotipi üzerine etkisine dair kanıtlar artmaktadır. Kolon florası mikrobiom çalışmalarında olduğu gibi onkolojik mikrobiyom çalışmalarında da önemli yer tutmaktadır. Kanserle karşı koruyucu mikrobiyolojik etkenler kadar kanseri teşvik edici faktörler de belirlenmiştir. Örneğin kolon kanserinde kolon epitelinde mutagenizde bazı bakteriyel kaynaklı toksin ve diğer moleküllerin doğrudan veya dolaylı DNA hasarına yol açarak rol oynadığı ileri sürülmektedir. Ayrıca proliferasyon sinyallerini taklit eden ligandlarla kolonik epitele bağlanarak da etki edebilmektedirler. Bütirat üreten bakterilerin KKK'de arttığı da tespit edilmiştir. Polimorfik mikrobiyomlar sonuçta çok çeşitli yollarla, kemokin ve sitokinlerin salınmasıyla doğal ve adaptif immün sistemi modüle etmektedir.

Tümörlerde onkojenlerin indüklediği ve kemoterapi ve radyoterapinin yol açtığı hücrel stresin tetiklediği "senescence" izlenmektedir. Bununla birlikte normalde malign transformasyona karşı koruyucu olduğu varsayılan "senescence"nin kanserlerde tümör gelişimini teşvik ettiğine dair bulgular artmaktadır. Böylece farklı orijinli (tümör ya da stroma) senescent hücrelerin tümör dokusundaki "non-senescent" hücrelerin malign gelişimine katkı verdiği anlaşılmaktadır(17).

2.1.4 Kolorektal Kanserle Tedavi

Erken evre kanserlerde cerrahi rezeksiyon, ablasyon, embolizasyon ve radyoterapi gibi lokal tedavi yöntemleri tercih edilmektedir. Lenf nodu ve uzak metastaz gibi ileri evre kriterleri varlığında sistemik tedavi gereklidir. Kemoterapi, hedefe yönelik tedaviler ve immunoterapiler sistemik tedavilerin ana başlıklarıdır. Kanserle moleküler hedefli tedavilerin bireyselleştirilmiş yaklaşımlara evrilmesi söz konusudur. KKK'de bilhassa EGFR, VEGF, Wnt, NF-kB yolları üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır(1).

Tedavinin planlanmasında klinik evre, hastanın genel durumu, tümörün patolojik grade, lenfovasküler invazyon ve moleküler özellikleri birlikte ele alınır. Cerrahi yöntemin seçiminde tümörün yerleşimi de belirleyicidir(18)(4).

2.1.4.1. Kemoterapi: Kemoterapi terimi ilk kez Alman kimyacı Paul Erlich tarafından antibiyotikler için kullanılmış olmakla beraber günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kimyasalların akla gelmektedir(19). Kanser tedavisinde kemoterapötiklerin keşfi 1940’larda alkilleyici ilaçlarla başlamıştır.

İlk kez bir azotlu hardal olan mekloreタミン non-Hodgkin lenfomada kullanılmıştır. Alkilleyici ajan olarak kategorize edilen klorambusil ve siklofosamid de bu gruptadır. Alkilleyici ilaçlar, alkil grubu ile DNA arasında kovalent bağ oluşturur. DNA’nın hasarlanması da hücre ölümünü tetkiler. Kansere karşı sitotoksik etki gösteren kimyasalların geliştirilmesi anti-metabolit olarak ifade edilen grupla devam etmiştir. Vitamin metabolizmasının daha iyi anlaşılmasıyla DNA sentezinde rol oynayan enzimlerin inhibe edilmesi yoluyla kanser hücrelerini öldürecek yeni moleküller klinikte yer bulmaya başlamıştır. Folik asidin pürin ve primidinlerin sentezinde kofaktör rolü oynadığı görülmüş ve anti-folat ajan olarak metotreksat (ametopterin) koriokarsinoma ve lösemi tedavisinde başarıyla kullanılmış, zamanla kanser tedavisi dışında da kullanım alanı bulmuştur(20).

Anti-metabolitler içinde vitamin antagonistleri yanında anti-pürin ve anti-primidinler de bulunmaktadır. Antipürinler içinde merkaptopürin, anti-primidinler içinde ise fluorourasil ilk onaylanan ilaçlardır.

Kanserin biyolojisi aydınlatıldıkça hedeflenmiş tedaviler, hormonoterapi ve Rimmünoterapiler, monoklonal antikorlar tedavi seçenekleri arasında yerini almıştır.

Hedeflenmiş tedaviler (Targeted therapies) kanser hücrelerinde bulunan belli bir protein veya reseptöre yönelik geliştirilen özgün maddelerin kullanılmasıdır. Son yıllarda apoptoz, metastaz, hücre sinyal iletimi, differansiyasyon, büyüme faktörlerinin modifikasyonu ile ilgili araştırmalar kanserogeneze dair pek çok değerli ipucu sağlamıştır. Anjogenez ya da diğer hücre sinyal yollarına yönelik VEGF (Bevacizumab), EGFR inhibitörü (Cetuximab) kemoterapötikler bu tür tedaviye örnek olarak verilebilir. Bunların kullanımının belli mutasyon profillerine uygun olması yararlarını kısıtlamaktadır(21).

Hormonoterapiler, meme, prostat, endometriyum gibibazı hormona duyarlı tümör tiplerinde kullanılır. Tümörü büyümek için gereksinim duyduğu hormondan mahrum etme prensibine dayanır.

İmmünoterapiler, immün sistemi regüle ederek, kanser hücreleri ile savaşmaları için uygun duruma getirmeyi amaçlar. İmmün checkpoint inhibitörleri olarak bilinen PD1, PDL1, CTLA4 üzerinden etkili yeni ajanlar kanserle immün modülasyon yoluyla savaşta yeni bir cephe açmıştır.

Tablo 2.1’de kanser tedavisinde kullanılan ilaçların sınıflanması, örnek ajanlar ve etki mekanizmaları verilmiştir.

Kanserlerde hızlı ve sınırsız bölünme, mutasyonlar tümörün kullanılan kemoterapötiklere direnç geliştirmesi sorununu da beraberinde getirmektedir. Kemoterapide hızlı bölünen tümör hücreleri yanında bir miktar sağlıklı hücreler de etkilenmektedir. Buna bağlı olarak ortaya çıkan yan etkilerin azaltılması, direnç gelişiminin azaltılması amacıyla kombinasyon tedavileri tercih edilmektedir. Kemoterapide uygulama zamanına göre neoadjuvan veya adjuvan tedaviden söz edilir. Neoadjuvan primer tedaviden önce (çoğunlukla cerrahi), adjuvan ise sonra primer tedaviye ek olarak verilmesini ifade eder. Meme, akciğer, kolorektal ve over kanserlerinde adjuvan tedavi tercih edilmektedir (19).

2.1.4.1.a. 5-Fluorourasil: 5-FU bir pirimidin analogudur. Anti-metabolit bir ajan olarak kanser tedavisinde uzun yıllardır yaygın biçimde kullanılmaktadır(22). Timidilat sentazı inhibe ederek DNA sentezi için gerekli Timidin sentezini bloke ederek etki gösterir. Timidilat sentaz, dUMP’ın (deokdiuridinmonofosfat) dTMP’a (deoksitimidinmonofosfat) dönüşümünü katalizler. Bu enzimin inhibe olması sonucu hücre yeterli timin sentezi yapılamadığı için ölür. Bu etki hızlı bölünen hücrelerde daha belirgin olacağı için kanser hücrelerine sağlıklı hücreden daha fazla zarar vermesi beklenir. Birçok kanser türünde olduğu gibi KRK’de de ilk basamak tedavi olarak tercih edilmektedir. Bununla birlikte hastaların %15-20’sinde ilaca direnç gelişmektedir. Tedavi sonrası rekürrens ise %50-60’ları bulmaktadır(23).

Tablo 2.1: Kemoterapötiklerin etki mekanizmasına göre sınıflandırılması

Grup	Alt grup	Örnekler	Etki mekanizması
Sitotoksik Kemoterapötikler	Alkilleyiciler	<ul style="list-style-type: none">Nitrogen mustard (Azotlu hardal) bileşikleri: Bendamustine, cyclophosphamide, ifosfamideNitrosoureler: Carmustine, lomustinePlatinum analogları:Carboplatin, cisplatin, oxaliplatinTriazenler: Dacarbazine, procarbazine, temozolamideAlkyl sulfonate: BusulfanEthyleneimine: Thiotepa	Alkil grupları, protein ve nükleik asitler ile etkileşime girerek DNA transkripsiyonu ve replikasyonunu bozar, DNA hasarı oluşturur.
	Antimetabolitler	<ul style="list-style-type: none">Sitidin analoları: Azacitidine, decitabine, cytarabine, gencitabineFolat antagonistleri: Methotrexate, pemetrexedPürin analogları: Cladribine, clofarabine, nelarabinePirimidin analogları: Fluorouracil (5-FU), capecitabine (5-FU için prodrug)	DNA replikasyonunu bloke eder.
	Antitümör Antibiyotikler	Actinomycin D, bleomycin, daunomycin	DNA replikasyon enzimleri ile etkileşirler
	Mitoz inhibitörleri	<ul style="list-style-type: none">Topoizomeraz inhibitörleri I ve II (Irinotecan, Topotecan)Antrasiklinler (Doxorubicin, daunorubicin, idarubicin, mitoxantrone)Taxanlar (Paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel)Vinka Alkaloidleri (vinblastine, vincristine, vinorelbine)	Hücre proliferasyonu ve bölünmesini engeller
	Diğerleri	Hidroksiüre, Tretinoin, Arsenik trioksit, proteosom inhibitörleri	
Hormonal Kemoterapötikler	Steroidler		Kemoterapi yan etkilerine karşı kullanılır
	Anti-östrojenler		
	Anti-androjenler		
	Aromataz inhibitörleri		
Biyolojik ve hedefe yönelik tedaviler	Tirozin kinaz inhibitörleri	Geftinib, Lapatinib, Erlotinib	
	Anjiogenez inhibitörleri	Bevacizumab,	
	Monoklonal antikolarlar	Rituximab, Trastuzumab, Cetuximab	
	Gen tedavisi		
	Non-spesifik immün tedaviler (sitokinler)	İnterferon, İnterlökin II	
Aşılar			

(19,24,25)

Metastaz yapmış ileri evre tümörlerde standart hale gelmiş iki rejimin ana komponentidir. İlk seçenek FOLFOX olarak bilinen 5-FU ile birlikte leucovorin ve oxaliplatin içeren tedavi protokolüdür. İkinci seçenek ise FOLFIRI olarak bilinen, 5-FU ve leucovorin ile irinotecan içeren tedavi protokolüdür(26). Hedefe yönelik tedaviler kapsamında her iki protokole de Bevacizumab (VEGF inh) veya Cetuximab (EGFR inh) eklenebilmektedir. Bevacizumab'ın bu iki rejim ile kombinasyonunun hücre hatlarının çoğunda orta derecede anjiogenezi bloke ettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada HCT116 ve SW480 hücre hatlarında bevacizumabın cetuximaba göre daha fazla apoptozise neden olduğu bulunmuştur(26).

2.1.4.1.b. Bevacizumab: VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörlerine spesifik olarak bağlanıp VEGF etkisini inhibe eden humanize monoklonal bir antikordur. 2004'de metastatik KRK'da ilk seçenek tedavi olarak FDA tarafından onaylanmıştır.

Tümör hücreleri büyümek için oksijen ve besin tedarikine bağımlıdır. Organizmanın damar ağını büyümek ve yayılmak için kullanır. Oksijen temini ile birlikte hızla büyüyen tümör dokusunun artan ihtiyacı arasındaki dengesizlik HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) düzeyini artırır. HIF-1, hipoksiye cevap olarak üretilen bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre çoğalması, migrasyonu, metabolizma, apoptoz ve anjiogenez gibi birçok biyolojik süreci düzenlemektedir. HIF-1 VEGFA transkripsiyonunu da sağlar. Anjiogenez yolağında görevli endotel üzerinde VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (FLK-1) ve co-reseptör olarak Neuropilin 1 (NRP1) tanımlanmıştır. Anjiogenezi hedefleyen tedavi arayışları 50 yıl önce başlamıştır. İlk onaylanan molekül olan Bevacizumab VEGFA'nın tüm isoformlarına karşı bir monoklonal antikordur. VEGF ailesi (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve PIGF) embriyolojik gelişme, patolojik anjiogenez ve lenfanjiogenezde kan damarlarının oluşumunda önemli rol oynar. Bu nedenle VEGF ilişkili yolların blokajı makul bir hedeftir. VEGF proteinleri BCL-2 ve BAX gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu da indüklemektedir. VEGF proteinleri için bilinen üç reseptör vardır: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3. Herbirinin VEGF proteinleriyle ilişkisi farklı biyolojik aktivite yollarını etkiliyor görünmektedir. VEGFR-1, VEGF-A, VEGF-B ve PIGF ile etkileşmesi sonucu, embriyonik anjiogenez ve patolojik anjiogenezi modüle etmektedir. VEGFR-2 ile VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D'nin etkileşimi anjiogenezi stimüle etmektedir. VEGFR-3 ile VEGF-C ve VEGF-D'nin etkileşimi ise lenfanjiogenezi uyarmaktadır(27).

Bevacizumabın kemoterapi ile kombinasyonu, KRK dışında küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC), böbrek hücreli kanser (RCC), metastatik meme kanserinde etkinliği klinik çalışmalarda da gösterilmiştir(26). Ancak tek başına etkinliğinin sınırlı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur(26)

Literatürde VEGF reseptörlerinin tümör dokusunda eksprese edilip edilmediği, sadece endotelial hücrelerde bulunup bulunmadığı veya tümör hücrelerinin parakrin ve/veya otokrin sinyalleme döngüleri yoluyla VEGFA sinyallesinden yararlanıp yararlanmadığı konusunda bir fikir birliği yoktur. Bununla birlikte tümör hücrelerinin kendisinde de reseptör ekspresyonunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur(26)(27).

Birçok çalışma Bevacizumab'ın metastatik KRK'da klinik sonuçları iyileştirdiğini desteklemektedir. Bununla birlikte NSABP c-08 ve AVANT gibi iki geniş seri içeren çalışmaların verileri aksine veriler sunmaktadır. Özellikle ikincisinde Bevacizumab verilen grupta izlenen yan etkilerin FOLFOX4 verilen gruptan çok daha sık olması dikkat çekicidir. Bu nedenle Bevacizumab için karar vermeden önce ciddi yan etki ve komplikasyonlar göz önünde tutulmalıdır(28).

2.2. KANSERDE YENİ TEDAVİ ARAYIŞLARI

Kolorektal karsinom tedavisinde 5-FU, oxaliptin, irinotecan gibi sitotoksik ilaçlar ileri evre tümörlerde kayda değer bir başarı sağlamıştır. Ancak kemoradyoterapiye histopatolojik cevabın hastalar arasında ciddi farklılıklar gösterdiğinin anlaşılmasıyla arayışlar hedefe yönelik tedavilere kaydı. Elbette bu karsinogenezde spesifik moleküler yolların daha iyi ortaya konmasını gerektiriyordu. Epidermal growth faktör reseptörüne karşı geliştirilen IgG1 kimerik monoklonal anti-EGFR antikoru olan Cetuximab, vasküler endotelial growth faktöre (VEGF) karşı bir monoklonal antikor olan Bevacizumab çok geçmeden KRK tedavi rehberlerinde yerini aldı.

Kolorektal kanser tedavisinde EGFR, VEGF dışında WNT ve NF-κB yolları en önemli hedeflerdendir. Kanser hücrelerinin adaptasyon yetenekleri, tümör mikroçevresini değiştirme yetenekleri, dirençli hücre klonlarının gelişimi terapötik stratejilerin önündeki önemli engellerdir. Bu yüzden RNA susturma, fonksiyonel genomik, nanotıp gibi yeni tekniklerin yanında kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesi devam etmektedir. Özellikle sinyal yollarını hedefleyen yeni ilaçların tasarlanması gerekmektedir(28).

2.2.1. Yeni İlaç Geliştirilmesi

1960 ve 1981 yılları arasında Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) ve Amerika Ziraat departmanı (USDA), anti-kanser bileşik keşfi için 15.000 bitki türünden 115 000 özüt ayırıştırarak test edilmesini sağlamıştır. Bu araştırmaların ürünlerine *Taxus brevifolia*'dan elde edilen Taxol (Paclitaxel) örnek verilebilir. Son yıllarda gerek muazzam veri birikimi, gerek bilgi teknolojilerindeki gelişmeler yeni moleküllerin keşfini ve test edilmesini kolaylaştırmaktadır. *In silico* yöntemlerle bilgisayar destekli ilaç adayı moleküllerin taranması, geliştirilmesi, sınanması yeni ufuklar açmakta ve genomik, transkriptomik, metabolik süreçlere yönelik hedeflenmiş moleküllerin tasarımı mümkün olmaktadır(12)

İlaç adayı moleküllerin prelinik deneylerinde önceleri hayvan deneyleri kullanılmıştır. Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI), 1950'lerde binlerce kimyasal molekülü hayvanlarda oluşturulan tümör modellerinde denemiştir. 1980'lerin sonlarından itibaren *in vivo* çalışmalardan daha pratik olan hücre kültürü deneyleri ilk basamak olarak ilaç araştırmalarında yerini almıştır. Aday moleküller, *in vitro* testlerle elendikten sonra *in vivo* deneylere daha detaylı analizler için geçilmektedir. 1940-2000 yılları arasında keşfedilen ve kullanım onayı alan 155 bileşiğin %47'sinin doğadan elde edilen maddeler veya bunların semisentetik türevleri olduğu bildirilmektedir(20,29)

Farmasötik AR-GE süreçleri genellikle on yıldan fazla sürmektedir. Klinik öncesi önce etken maddenin belirlendiği tarama testleri yapılmaktadır. Sentezlenmiş ya da doğal kaynaklardan elde edilmiş maddeler *in vitro* olarak etkinlik ve toksisite bakımından değerlendirilir. Daha sonra *in vivo* olarak emilim, dağılım, metabolizma, atılımın incelendiği farmakokinetik testler, terapötik ve toksik etkiler değerlendirilir. Genellikle sıçan, fare gibi kemirgenler veya köpek gibi memeli denekler kullanılır. Akut, subakut ve kronik toksisite deneylerine ek olarak, kanserojenik, teratojenik ve mutajenik etkiler yapılır. Bu aşamaları geçen ilaç adayı moleküller dört fazdan oluşan klinik çalışmalara girebilir. Faz çalışmalarına başlanması ile ilacın ruhsatlanması arasında geçen süre 2-10 yıl olup, tüm fazların tamamlanması 15 yılı bulabilmektedir(30).

2.2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

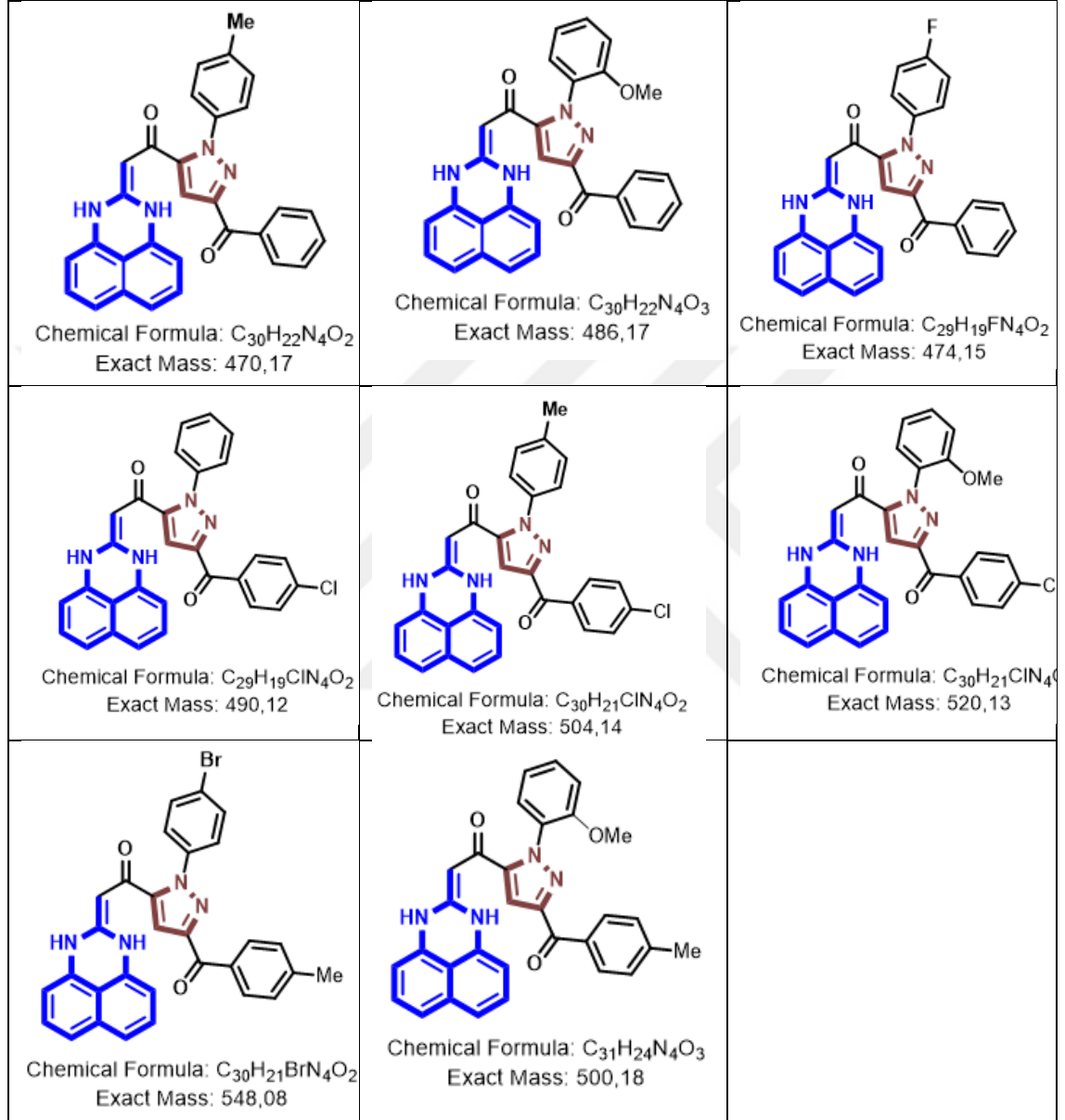
Yeni ilaç geliştirme çabalarında hücre kültürü teknikleri önemli rol oynamaktadır. Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI), 1985-90 yılları arasında beyin, kolon, lösemi,

akciğer, melanoma, over, böbrek, meme ve prostat gibi insan kanser türlerini temsilen 60 kanser hücre hattı üzerinde doğal veya sentetik moleküllerin in vitro olarak test edildiği bir tarama paneli (NCI-60) geliştirmiştir. Yılda 3000 bileşik taranabilmektedir(20,31)

Hücre hatları kolay bulunabilmesi, üretim ve işlemenin pratik oluşu, kısa sürede bir çok ilaç kombinasyonunun test edilebilmesi gibi nedenlerle ilaç denemeleri, moleküler detaylı analizler için yaygın olarak tercih edilmektedir. Çok sayıda hücre hattının detaylı bir şekilde özellikleri karakterize edilmiştir.

Hücre hatları ile yapılan çalışmalar avantajları yanında bazı noktalarda eleştirilmektedir: Hücreler kültüre edildikçe mRNA değişiklikleri gibi genetik değişimler izlenebilmektedir. Primer tümördeki heterojenite hücre hattında devam etmemektedir. Tümör mikroçevresine sahip değildir(31). Sayılan nedenlerle tümörü ve geliştiği ortamı yeterince temsil etmediği söylenebilir. Bununla birlikte Wilding ve Bodmer derlemelerinde primer tümörün sahip olduğu kromozomal değişiklikler, metilasyon ve mRNA ekspresyonlarının hücre hattıyla benzer olduğu ve uzun süreli pasajlarda major sürücü mutasyonların değiştiğine dair kanıt olmadığını ifade etmektedirler(31).

2.3. SEÇİLEN MOLEKÜLLERİN YAPISI VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ



Şekil 2.2: Kolorektal Karsinom için dizayn edilen ilaç adayı moleküller. (Bu moleküllerle uygun IC50 değerleri elde edilemediğinden ikinci aşamada PER serisi çalışılmıştır.)

2.3.1. PER Serisi (Heterosiklik Keten Aminaller)

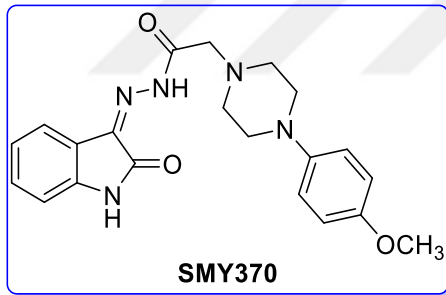
Heterosiklik keten aminaller (HKAs) siklik 1,1-endiaminler olarak bilinmektedir. Bu bileşikler heterosiklik ve halkalı heterosiklik bileşiklerin sentezlerinde sıkça

kullanılmaktadır. Literatür araştırmaları multikomponent reaksiyonların özellikle bir sentetik strateji üzerine kurgulandığını göstermiştir. Böylece sübstitüe grupların değiştirilmesi ile farklı organik bileşiklerin sentezleri gerçekleştirilecek ve organik bileşikler kütüphanesine katkıda bulunmak kolay ve hızlı olacaktır (32).

Perimidinlerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur. Çeşitli 1 ve 2 sübstitüe perimidinler antiülser, antibakteriyel, antifungal, antitümör, antihelminik ve sitotoksik etki göstermektedir(33). Furil sübstitüe perimidin türevleri gastrik asiti inhibe etmede kullanılan antiülser etkiye sahip olan oldukça faydalı bileşiklerdir (34). Birçok perimidin ve türevleri antitümör etki göstermektedir.

2.3.2. SMY370

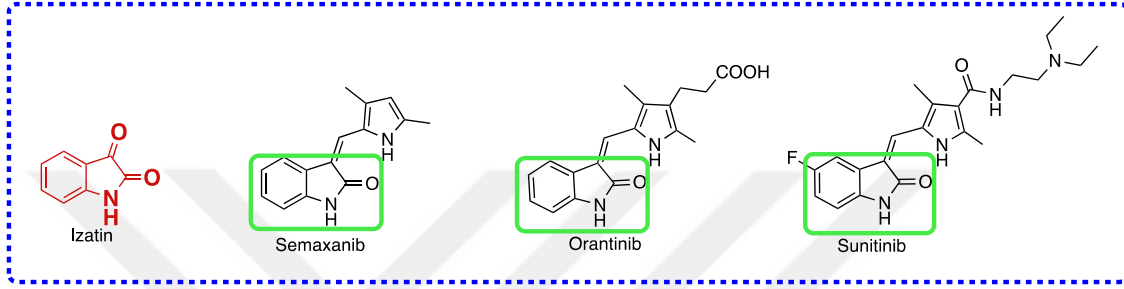
SMY370 Bileşiği: Molekln ismi: (Z)-2-(4-(4-metoksifenil)piperazin-1-il)-N'-(2-oksoindolin-3-iliden)asetohidrazit . Molekln açık formülü şekil 2.3'te görülmektedir.



şekil 2.3: SMY370'in açık formülü

Sandmayer ve Stolle reaksiyonları sonucunda elde edilebilen izatin fragmanı, birinci pozisyonda nitrojen atomu, 2. ve 3. pozisyonlarda karbonil grupları içermektedir (35). Pek çok farklı çalışma alanında aday ilaçlar geliştirilirken, elektronik özellikleri ve sentetik trevlendirmeye izin vermesi nedeniyle izatin çekirdeği tercih edilmiştir. İzatin, yeni antikanser ajanlarının geliştirilmesi için yararlı bir fragmandır. İzatin ve türevlerinin, deoksiriboz nükleik asit (DNA), tubulin, fosfatazlar, protein kinazlar, telomeraz veya P-glikoprotein ile etkileşime girerek antikanser aktivite dahil olmak üzere antiinflamatuvar, antiviral, antibakteriyel, antidiyabetik, antitüberküloz, antikonvülsan gibi birçok alanda aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (35). Semaxanib (oklu tirozin kinaz inhibitörü),

Orantinib (çoklu tirozin kinaz inhibitörü), Sunitinib (tirozin kinaz inhibitörü) ve hesperadin gibi çeşitli izatin bazlı antikanser ajanlar halihazırda kullanımda veya çeşitli kanser türlerinin tedavisi için klinik deneyler aşamasındadır (Şekil 2.4)(36,37). İzatin iskeletine diğer antikanser farmakoforlar dahil edilerek izatin bazlı hibridler elde edilebilmektedir. Böylece izatin bazlı hibritler, yeni antikanser ajanların geliştirilmesi için ilgi çekici iskelet olarak görülmekte ve üzerine çalışılmaktadır.



Şekil 2.4 İzatinin genel yapısı ve izatin fragmanı taşıyan bazı antikanser bileşikler

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.1.Cihazlar

- Soğutmalı Santrifüj (Sigma)
- RNA izolasyon kabini (EuroClone)
- Mikrosantrifüj (Weightlab)
- Nanodrop (Thermo)
- μ (Roche)
- Biyogüvenlik kabini (Euroclone Safemate Eco)
- Hücre görüntüleme mikroskobu (ZOE, BIORAD)
- CO2 inkübatör (PHCBI)
- Su banyosu (Thermomac)
- +4 buzdolabı (Uğur)
- -20 buzdolabı (Uğur)
- -86 buzdolabı (Binder)
- Otomatik pipet seti (Eppendorf)
- Flow Cytometry (Beckman Coulter)
- Zoe™ fluorescent cell imager (Biorad)

3.1.2. Kimyasallar

- DMEM-High Glucose
- Antibiyotik
- Tripsin-EDTA
- DPBS
- FBS
- Bevacizumab (25mg/ML kons.inf.çöz.içeren 1 flakon)
- Fluorourasil 500mg/10 ml flk

- Sheat fluid 10 litre
- Mavi Sitoplazmik Membran Boyası
- Yeşil Mikrotübül Hücre iskeleti boyası
- Kırmızı mitokondri boyası

3.1.3. Kitler

- Hücre Kültür RNA İzolasyon kiti
- Komplementer DNA Sentez kiti
- Gerçek Zamanlı PCR SYBR Mix Set
- Flow sitometer Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit

3.2. HÜCRE HATLARI

3.2.1. HCT116

HCT116, terapötik araştırmalarda ve ilaç taramalarında kullanılan bir insan kolon kanseri hücre dizisidir. HCT116 hücreleri, KRAS proto-onkogeninin 13. kodonunda bir mutasyona sahiptir ve gen terapisi araştırmaları için uygun transfeksiyon hedefleridir. Ayrıca CMS1 moleküler alt tipini karakterize etmektedir(38). CMS1 tipinin biyolojik ve gen ifadesi özelliklerine baktığımızda, MSI ve CIMP pozitif olduğunu, BRAF ve TGFBR2 mutasyonları bulunduğunu, hipermetilasyon ve düşük SCNA (somatik kopya sayısı değişimi) gösterdiği, immün aktivasyon, JAK/STAT ve kaspazlar üzerinde etkili olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca bu moleküler alt tipe sahip tümörlerin ileri yaş ve kadınlarda sık, proksimal kolon yerleşimli görüldüğü, yüksek histolojik grade sahip olduğu bildirilmektedir(14).

3.2.2. L929

Ana L suşu, 1940'da WR Earle tarafından 100 günlük C3H/An faresinin normal areolar subcutan ve yağ dokusundan elde edilmiştir. 929 no'lu klon ise 1948'de üretildi. L929 ilk üretilen sürekli kültürlerden biridir. Ana hücre hattının 95. Subkültüründen klonlanmıştır. HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase EC 2.4.2.8) ve APRT (adenine phosphoribosyltransferase EC 2.4.2.7) mutasyonları bakımından pozitifdir.

NCTC klon 929 hücre hattı toksisite testlerinde kullanılır. Fibroblastik ve adheren hücrelerdir(39).

3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.3.1. DMEM ve EMEM besiyerlerinin hazırlanması

Hücre hatlarının gelişimi için RPMI ve DMEM besiyeri satın alındı. 50 ml %10 fetal bovine serum (FBS), 5 ml %1 Penisilin-Streptomisin, 5 ml %1 L-glutamin eklenerek toplam hacim 500ml'ye tamamlandı. Hazırlanan medium 0.22 µm'lik filtreden süzülerek kullanıma hazır hale getirildi.

3.3.2. Hücre Serilerinin Kültüre Edilmesi

Dondurma solüsyonu içerisinde bulunan hücrelerin DMSO uzaklaştırılmak üzere hücre hatları laminer kabin içerisinde kendi besiyerlerini içeren steril santrifüj tüplerine aktarıldı ve yavaşça homojenize edildi. Oda ısısında 1500 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edildi. Süpernatant kısmı döküldükten sonra hücre pelleti uygun miktarda besiyeri ile süspanse edildi. Kültürler günlük olarak kontrol edildi. Hücrelerin yoğunluğu ve morfolojisi invert ışık mikroskopu (ZOE, BioRad) kullanılarak gözlemlendi ve dijital görüntüler kaydedildi. Hücreler flaskın %80-90'ını kaplayınca pasajlandı.

3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması

Bu işlem için besiyeri uzaklaştırılarak hücreler steril Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra %25 Trypsin-EDTA çözeltisi (2 ml) eklenip hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için 5 dk inkübasyon yapıldı. İnkübatörden alınan hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskopla kontrol edilecek flaska 1:1 oranında FBS (EuroClone) ilave edildi ve toplanan hücreler 15ml santrifüj tüpüne alınarak 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra taze medium ilave edildi.

3.3.4. Hücrelerin Dondurulması

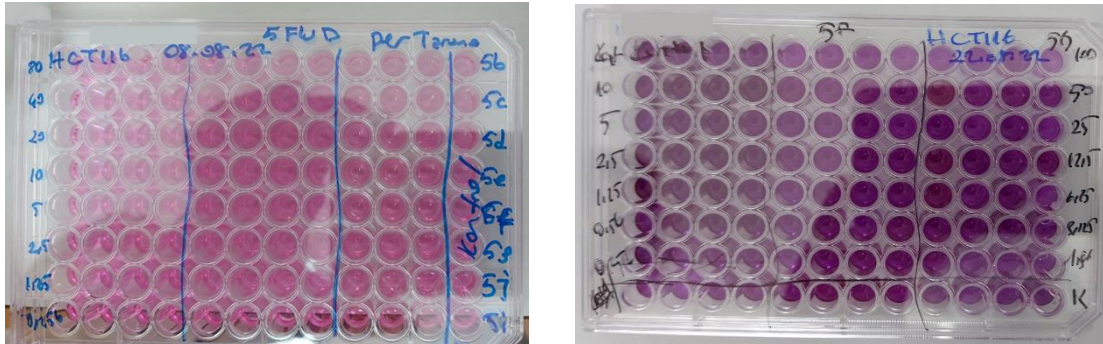
Hücre sayımından sonra her karyotüpe 1 ml besiyerinde çözülmüş 3×10^6 hücre ile önceden hazırlanmış dondurma besiyerinden 1 ml konuldu. Tüpler öncelikle Mr. Frosty içinde 24 saat -200C'de, ikinci 24 saat diliminde -800C'de bekletildi ve üçüncü gün tüpler -1960C'de sıvı azot tankına aktarılarak kademeli olarak donduruldu.

3.3.5. Hücrelerin Plakalara Ekimi

Önceden sayılmış ve besiyeri ile dilüsyonu yapılmış olan hücreler 96 kuyucuklu plakalar içerisine her kuyucukta 5×10^3 hücre $100 \mu\text{l}$ içerisinde olacak şekilde ekildi. Ekilen bu hücreler plaka yüzeyine 24 saat içerisinde tutunur ve ertesi gün belirlenen konsantrasyonda dozlama yapılarak inkübasyona bırakılır. Yeni moleküllerimiz ile klinik etken maddeler hücre hatları üzerinde farklı konsantrasyonlarda ve farklı inkübasyon sürelerinde in vitro olarak antikanser aktiviteleri belirlendi. Ayrıca sağlıklı hücrelerde toksik etkisini görebilmek için sağlıklı epitel hücrelerinde de toksisite deneyleri yapıldı.

3.4. İLAÇ UYGULAMALARI

HCT116 serisi kolorektal kanser hücreleri kültüre edilip pasajlandı. Kolorektal kanser hücre hattında (HCT116) önceden sayılmış ve besiyeri ile dilüsyonu yapılmış olan hücreler 96 kuyucuklu plakalar içerisine ekilip 24 saat inkübe edildi. PER serisinden 8 madde tarama amacıyla PER serisindeki maddeler 20 mmol ana stok olacak şekilde DMSO içinde çözüldü. $20 \mu\text{M}$ 'da tüm maddeler için tarama yapıldı (Tablo4.1). 48 sa sonunda Tarama sonucunda efektif çıkan, canlılık oranı %50'nin altında) 5F ve 5G seçilerek dozlamaya geçildi (şekil 3.1)




Şekil 3.1: 96 kuyucuklu plakada PER serisi (Sol) 5-FU tarama testi, (Sağ) PER serisinden 5F ve 5G için dozlama çalışması.

5-FU'dan 50 mmol ana stok hazırlandı. 200 mikromolardan başlanarak dozlama çalışması yapıldı. IC_{50} $1,3 \mu\text{M}$ olarak belirlendi. $50 \mu\text{M}$ 5-FU için seri dilüsyon aşağıdaki şekilde hesaplanıp dilüsyon yapıldı (Tablo 3.1).

$$50.000 \mu\text{mol} \times X = 50 \mu\text{mol} \times 1500 \mu\text{l} \rightarrow X = 1,5 \mu\text{l}$$

Tablo 3.1: 5-FU için doz dilüsyon hesaplaması

	50 μ M	25 μ M	12,5 μ M	6,25 μ M	3,125 μ M	1,56 μ M	0,78 μ M
5-FU	1,5 μ l						
DMEM	1500 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l
	750 alındı						1500 μ l



Dozlama 200 μ mol'dan başlayarak seri dilüsyonla 1,56 μ mol konsantrasyona kadar dozlandı. Dozlama sonuçlarında IC50 değerleri yüksek bulundu. İlaçlar efektif bulunmayıp yeni bir seri denenmesine karar verildi. Üniversitemiz Eczacılık Fakültesinde bulunan in-house kütüphanedeki etken maddelerden SMY serisi test edilmek üzere seçildi. İzatin, yeni geliştirilen birçok aday bileşikdeki olası etkileşimleri yakalamak için kullanılabilen, geniş bir biyolojik ve farmakolojik alana sahip nitrojen atomu içeren heterosiklik bir iskelettir. 96 lık well plate pasajlanan hücrelere 48 sa inkübasyon sonrası MTT uygulandı. SMY 370 Hücrelerin %70'den fazlasını öldürmesi ve diğer hücre hatlarında da benzer şekilde düşük canlılık düzeyine sahip olması nedeniyle en iyi IC50 değerini verdi.

3.4. HÜCRE CANLILIK DENEYLERİ

3.4.1. MTT analizi:

[3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] Bir tetrazolium bileşiği olan MTT hücrelerin üzerine eklenir. Prolifere olan hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz sarı renkli formazan tuzu olan MTT'yi mor renkli kristallere dönüştürür. MTT mor renkli formazana indirgenirken oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür. Hücre canlılığı uygulama yapılmayan hücre kuyucuklarında %100 kabul edilerek uygulama yapılanlardaki % değer hesaplanır(40,41) 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyuda 100ul besi yeri içerisine 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Etüvde gece boyunca inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra ilaç uygulaması yapıldı. 24, 48 ve 72 saatlik kültürlerin MTT analizi 570 nm dalga boyunda okundu

3.5. KANSER YOLAK ANALİZİ

Hücre canlılık çalışmaları tamamlanan ve IC50 değeri $\leq 10\mu\text{M}$ tespit edilen deney konusu etken maddelerle hücrelerde yaklaşık 90 genin ekspresyon düzeyleri tespit edildi. Birçok kanser yolak aktivitesinin eş zamanlı olarak hızlı bir şekilde taranması mümkündür. Bu deneyde, kuyucuklarda bulunan hücreler toplanıp total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'ları çoğaltmak için kantitatif PCR yapıldı. PCR karışımı içindeki floresan boyanın DNA'ya bağlanması ve bu sayede bir CT değeri vermesiyle her replikasyon sonrası DNA miktarı belirlendi. Total RNA ekstraksiyonu RNA izolasyon kit (Analytik Jena) ile yapıldı. Housekeeping geni olarak GAPDH kullanılarak normalizasyon ile veri analizi yapıldı. RNA ile mRNA izole edildikten sonra, hücre hatlarından cDNA Reverse Transcription kit (EuroClone) ile cDNA sentezlendi. Tasarlanan primerler her cDNA'da kullanılarak, SYBR Green Master Mix (EuroClone) ve referans gen olarak GAPDH ve ACTINB kullanılarak Real-time PCR (Analytik Jena) analizleri gerçekleştirildi.

3.5.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, RNA izolasyon kitinin protokolüne uygun şekilde oda sıcaklığında gerçekleştirildi. 6 kuyucuklu plakalara kuyu başına 350.000 son hacim 1ml olacak şekilde ekildi. 24 saat etüvde inkübe edildikten sonra hesaplanan IC50 değerlerine göre ilaçlar kuyulara uygulandı. 48 saat sonra Innuscreen GMBH firmasına ait innuPREP RNA minikit 2.0 kullanıldı. Hücre pelleti toplandıktan sonra tüplere 400 µL Lysis solüsyonu RL eklendi. 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası pipetaj yapıldı ve 3 dk daha inkübe edildi. Toplama tüplerine D filtresi yerleştirildi. Filtreye lysate yüklendi. 11.000 x g'de 2 dk santrifüjlendi. Filtre atıldı. Filtratın üzerine 400 µL %70'lik etanol eklendi. Pipetaj yapıldı. Toplama tüpüne R filtresi yerleştirildi. Filtrat yüklendi. 11.000 x g'de 2 dk daha santrifüjlendi. Filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Üzerine 500 µL Yıkama Solüsyonu HS eklendi. 11.000 x g'de 1 dk santrifüjlendi. Filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Üzerine 700 µL Yıkama Solüsyonu LS eklendi. 11.000 x g'de 1 dk santrifüjlendi. Filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. 3 dk 11.000 x g'de santrifüjlendi. Filtre elüsyon tüpüne yerleştirildi. Tam filtrenin üstüne 50 µL RNase içermeyen su eklendi ve 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 11.000 x g'de 1 dk santrifüjlendi. Filtre atıldı. Elüsyon tüpü buza gömüldü.

3.5.2. cDNA Sentezi

Komplementer DNA (cDNA) Sentezi: İzole edilen total RNA'dan kit ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları aşağıda Tablo 3.2'te verilmiştir.

Tablo 3.2: cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları

Total RNA (1000 ng/ul eşitlenir)	n µL
5x reaksiyon buffer karışımı	4 µL
Reverse transkriptaz enzimi	1 µL
DNase, RNase içermeyen su	20 µL'ye eşitlenir.

Bu bileşenlerle aşağıdaki protokolle (Tablo 3.3) cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentez sonunda tüpler -20 °C’de saklanmıştır.

Tablo 3.3: cDNA sentez protokolü

Sıcaklık	Zaman (dk)
25	10
42	15
85	5

3.5.3. RT-PCR

Ardından gen ekspresyon düzeyleri tespit edebilmek için elde edilen cDNA’ları çoğaltmak için kantitatif PCR yapıldı. PCR karışımı içindeki floresan boyanın (SYBR Green Master Mix) DNA’ya bağlanması ve bir sayı değeri vermesiyle her replikasyon sonrası DNA miktarı belirlendi. Gerçek zamanlı PCR bileşenleri (Tablo 3.4) aşağıda verilmiştir.

Tablo 3.4: Gerçek zamanlı PCR bileşenleri

Reaktif komponent	Hacim	Nihai konsantrasyon
FluoCycle™ II SYBR Master Mix	25µL	1x
Primers forward	değişken	50-300 nM
Primers reverse	değişken	50-300 nM
DNA template	değişken	20-100 ng
Steril su	50 µL’ye tamamlanır	-
Total reaksiyon hacmi	50 µL	

Ayrıca bu deneylerde kontrol geni olarak GAPDH ve ACTINB kullanılarak normalizasyon yapıldı. Livak metodu ile mRNA ifade değişimleri belirlendi.

3.6. FLOW-SİTOMETRİK ANALİZLER

Hücre döngüsü, kanser hücrelerindeki anormal DNA hücre dizilerini tanımlamak, ilişkili DNA indeksini tahmin etmek ve bu hücre dizilerindeki hücre fazı dağılımını belirlemek için kullanıldı. Hücreler, 5 dakika boyunca 500 G'de santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pellete 2 ml 1X soğuk tampon solüsyon eklendi ve 5 dakika 500 G'de santrifüjlendi. Pellet 2 ml soğuk %70'lik etanol ile fixe edilir. Buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. Ardından 5 dk santrifüjlenir. Pellet 2 ml tampon çözelti ile yıkanıp tekrar santrifüje edildi. Pellet 500 µL boyama solüsyonu ile çözüldü. Işık görmeyen bir yerde oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler flow sitometrisi ile analiz edildi.

3.6.1. Apoptoz Belirlenmesi

Hücre hatlarına uygulanan ajanların hücreler üzerinde apoptotik etkisinin gösterilebilmesi için “Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit” (Sigma-Aldrich) ve PI boyama yöntemi kullanıldı. Bir membran fosfolipidi olan fosfotidilserin, hücrede plazma membranının sitoplazma kısmına bakan iç yüzünde yer alır. Apoptoz başladığında plazma membranının dış yüzeyine çıkmaya baslar. Komşu hücreler, membran üzerinde fosfotidilserin bulunan hücreleri fagosite eder. Apoptozun bu özelliğinden yararlanılarak apoptotik hücreler tespit edilebilmektedir. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyindeki fosfotidilserine bağlanabilen bir proteindir. Anneksin V bağlanma oranı, o hücre topluluğunda apoptoza uğramış hücrelerin oranını verir. Hücreler santrifüj edilerek üzerine binding buffer eklendi ve homojenize edildi. Homojenize edilen hücrelerde 200 µL alındı ve üzerine 3 µL AppopnixinTM FITC eklendi. 2 µL 100X PI eklendi, karıştırıldı. 15 dakika, karanlıkta, +25 °C’ de bekletilen hücreler flow sitometri ile analiz edildi.

3.7. FLUORESAN GÖRÜNTÜLEME

Üç farklı boya kullanılarak (Hoechst 33342 Mavi Çekirdek Boyası Uzun süreli floresan hücre etiketleme ve hücre izleme çalışmaları için uygun; BioTracker 488 Yeşil Mikrotübül Hücre İskeleti Boyası Canlı hücre görüntüleme canlı hücre iskeletini görüntülemek için mikrotübül boyası hücreler; BioTracker 633 Kırmızı Mitokondri Boyası Hücre canlılığını, metabolik aktiviteyi ve genel hücre sağlığını tespit etmek için kullanılan mitokondri zarını boyayan canlı hücre görüntüleme mitokondriyal boyası) Zoe fluorescent cell imager (Biorad) ile görüntüler alındı.

3.8. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Tüm veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc. Chicago, IL, USA) ile analiz edildi. Her grupta ortalama (Ort) \pm standart deviasyon (SD) (minimum/maksimum) değerleri olarak verildi. İki den fazla grup verilerinin bir arada karşılaştırılması one way-ANOVA testi (tek yönlü varyans analizi) ile yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student t testi kullanıldı. P-değeri 0.05'den küçük değerler anlamlı olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. TARAMA SONUÇLARI

Özgün sentez serisi 20µM konsantrasyonunda taranmıştır. PER serisi için 48 saat sonra MTT analizi sonucunda alınan değerler Tablo 4.1’de görülmektedir.

Tablo 4.1: PER serisi tarama sonuçları

5B	5C	5D	5E	5F	5G	5J	5İ	KONTROL
1,457	1,544	1,065	1,06	1,03	0,752	1,733	1,623	1,761
1,414	1,705	1,301	1,366	0,784	0,732	1,559	1,149	1,731
1,135	1,207	1,287	1,084	0,797	0,555	1,079	1,108	2,23
1,33533333	1,48533333	1,21766667	1,17	0,87033333	0,67966667	1,457	1,29333333	1,90733333
69%	77%	63%	61%	45%	35%	76%	67%	100%

Canlı hücre oranı en düşük olan 5F(%45) ve 5G(%35) için dozlama çalışması yapılmıştır. Ancak efektif bulunmamıştır.

4.2. DOZLAMA SONUÇLARI

PER Serisi dozlama sonuçları incelendiğinde (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3) 5F için hücrelerin yarısına yakını öldüren doz 100 µL, 5G içinse 50 µL olduğu görülmektedir.

Tablo 4.2: 5F için dozlama sonuçları

100µL	50µL	25µL	12,5µL	6,25µL	3,125µL	1,56µL	kontrol
0,686	0,881	1,014	1,32	1,39	1,523	1,764	1,666
0,757	1,073	1,229	1,353	1,4	1,713	1,949	1,686
0,898	1,138	1,383	1,417	1,426	1,718	2,034	1,726
1,067	1,17	1,407	1,441	1,626	1,757	2,047	1,842
0,852	1,0655	1,25825	1,38275	1,4605	1,67775	1,9485	1,73
49	61	72,25	79,76	84,39	96	112,6	100%

Tablo 4.3: 5G için dozlama sonuçları

100µL	50µL	25µL	12,5µL	6,25µL	3,125µL	1,56µL	kontrol
0,631	0,765	0,953	1,308	0,957	1,54	1,456	1,666
0,703	0,882	0,955	1,36	1,176	1,557	1,544	1,686
0,878	0,89	1,34	1,411	1,365	1,619	1,655	1,726
0,934	0,939	1,34	1,639	1,489	1,778	1,871	1,842
0,7865	0,869	1,147	1,4295	1,24675	1,6235	1,6315	1,73
45	50	66	82,08	71,67	93,64	94,2	100

PER serisinin beklenen effektiviteyi göstermemesi üzerine SMY serisi ile testlere başlandı. SMY serisi yine 10 µM konsantrasyon olacak şekilde denendi. Seri içinde en efektif bulunan SMY370 ile çalışmalara devam edilme kararı alındı. SMY370 ve klinik ilaç olarak tez önerisinde belirlenen 5-FU ve Bevacizumab ilk dozu 100µM olacak şekilde dozlanmıştır. 48 saat sonra MTT analizi ile canlılıkları incelenmiştir. Sonuçlara göre sırasıyla Tablo 4.4, 4.5 ve 4.6 oluşturulmuştur.

Tablo 4.4: SMY370 dozlama sonuçları

SMY370							
100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	kontrol
0,643	0,864	1,232	2,768	3,169	3,275	3,246	3,324
0,64	0,855	1,245	2,782	3,166	3,295	3,291	3,319
0,6415	0,8595	1,2385	2,775	3,1675	3,285	3,2685	3,3215
19,31356	25,87686	37,28737	83,54659	95,36354	98,9011	98,40434	100

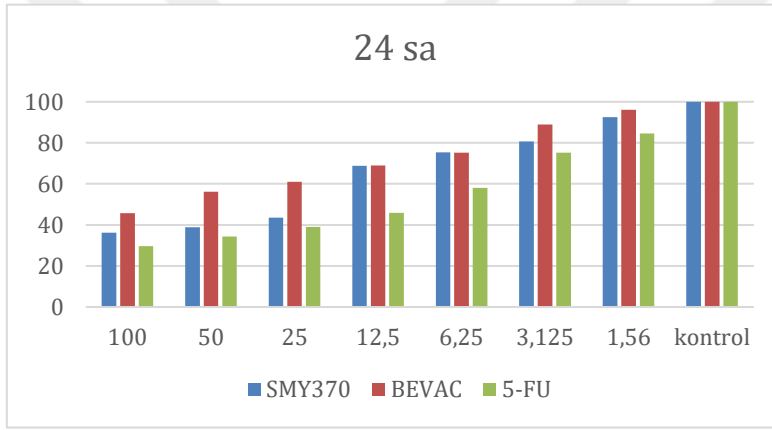
Tablo 4.5: 5-FU dozlama sonuçları

5-FU							
100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	kontrol
1,172	1,42	1,641	1,706	1,898	2,059	2,258	2,721
1,165	1,467	1,699	1,739	1,867	2,077	2,255	2,698
1,1685	1,4435	1,67	1,7225	1,8825	2,068	2,2565	2,7095
43,12604	53,27551	61,63499	63,57261	69,47776	76,32405	83,28105	100

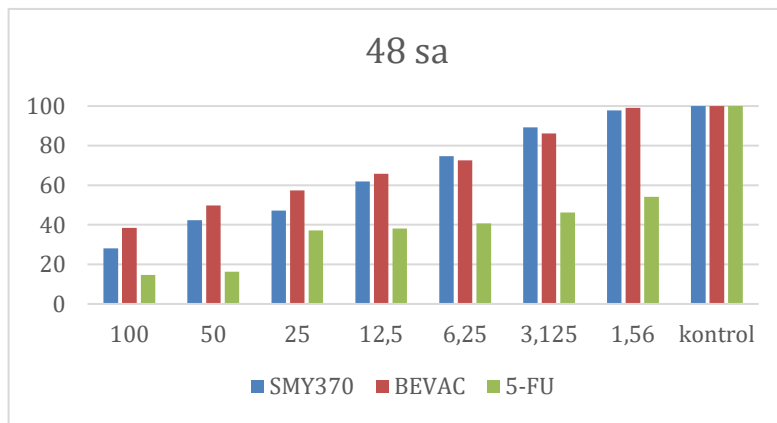
Tablo 4.6: Bevacizumab dozlama sonuçları

Bevacizumab							
100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	kontrol
1,541	1,984	2,451	2,814	2,984	3,021	3,128	3,324
1,526	1,975	2,438	2,826	2,975	3,034	3,145	3,319
1,5335	1,9795	2,4445	2,82	2,9795	3,0275	3,1365	3,3215
46,1689	59,59657	73,59627	84,9014	89,70345	91,14858	94,43023	100

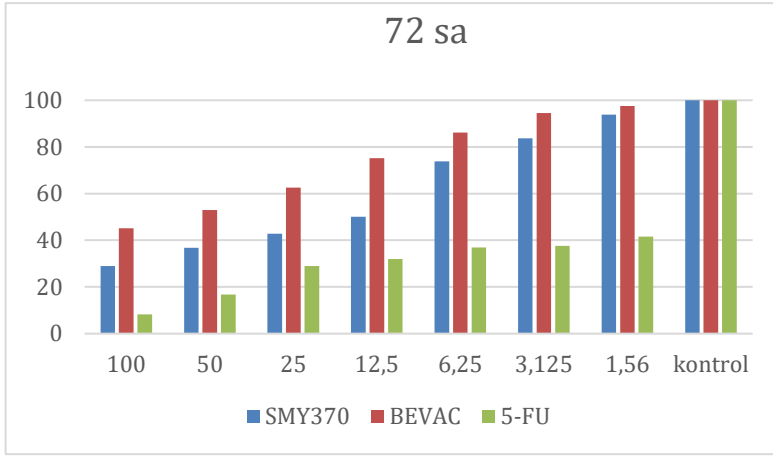
5-FU, Bevacizumab ve SMY370 için 24, 48 ve 72 saat sonra MTT analizi sonuçları grafiklerde birlikte sunulmuştur(Şekil 4.1-3).



Şekil 4.1: 24 saat sonunda MTT analizi sonucu hücre canlılık düzeyleri



Şekil 4.2: 48 saat sonunda MTT analizi sonucu hücre canlılık düzeyleri

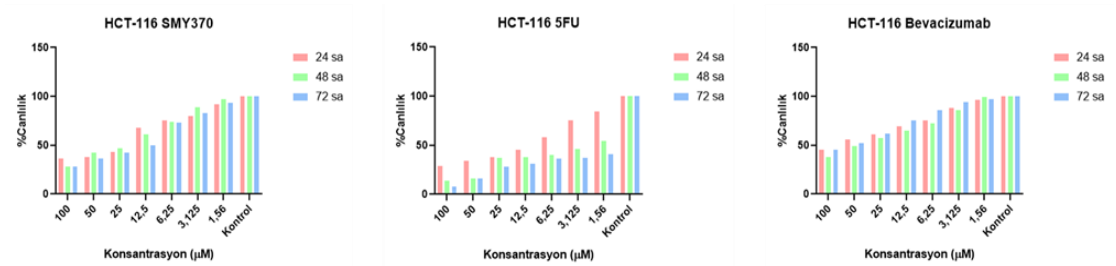


Şekil 4.3: 72 saat sonunda MTT analizi sonucu hücre canlılık düzeyleri

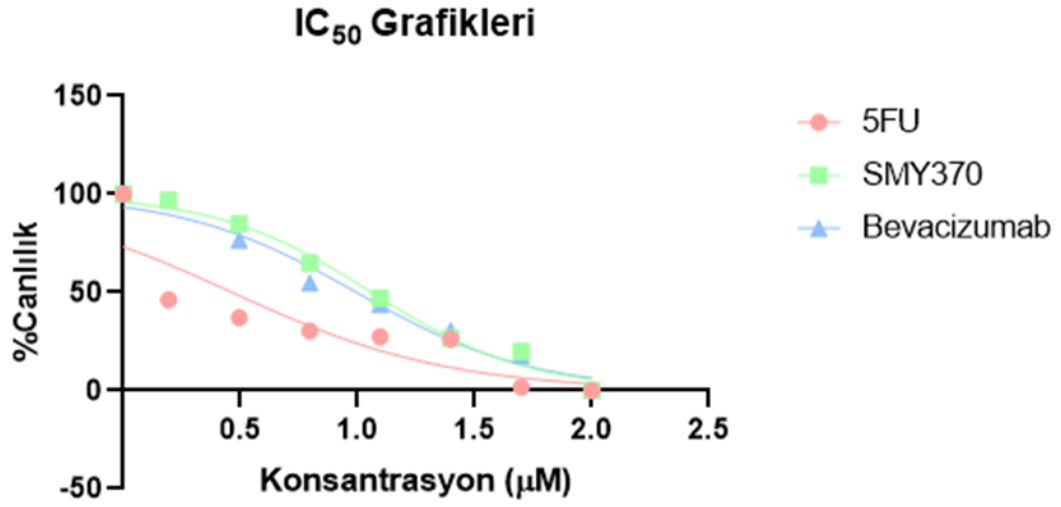
Bu değerler, Graphpad Prism kullanılarak IC50 hesaplaması yapılmıştır. IC50 değerleri tablo 4.7’de görülmektedir. Çizilen grafik ise şekil 4.4 ve 4.5’de görülmektedir.

Tablo 2.7: HCT116 için Graphpad Prism ile hesaplanan IC50 değerleri

Etken madde	IC50 değeri (µM)
5-FU	1,3
SMY370	10
Bevacizumab	9,9



Şekil 4.4: IC50 değerleri



Şekil 4.5: HCT116 için IC₅₀ grafiği

4.3. SAĞLIKLI HÜCRE ÇALIŞMALARI VE SELECTIVITY INDEX (SI) DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ

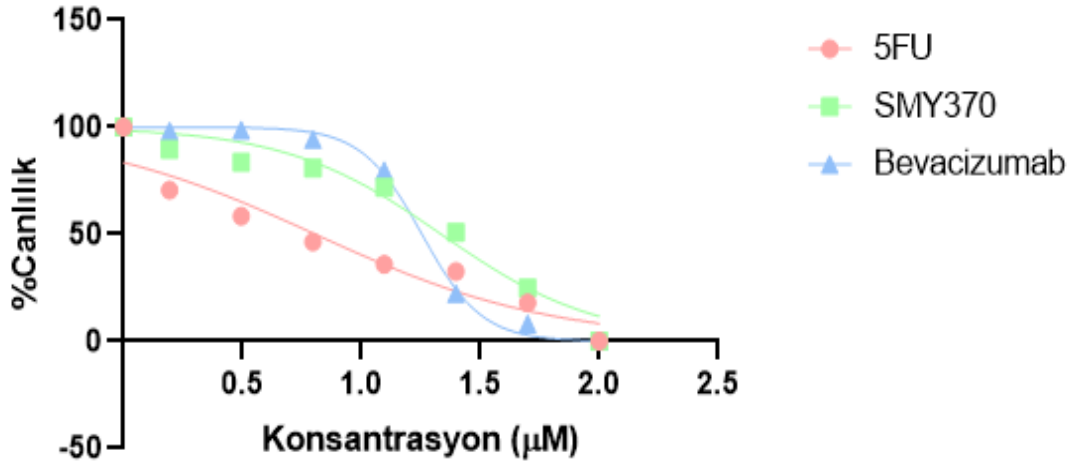
Sağlıklı hücre hattı olan L929 hücresi 96 kuyulu tabakaya eklenmiştir ve SMY370, 5-FU ve Bevac uygulaması ilk konsantrasyon 100µM olacak şekilde yapılmıştır. 48 saat sonra MTT analizi ile alınan sonuçlarla birlikte IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. 5-FU, Bevacizumab ve SMY370 için bulunan değerler aşağıdaki tabloda (tablo 4.8) verilmiştir.

Tablo 4.8: Sağlıklı hücrede hesaplanan IC₅₀ değerleri

Etken madde	IC ₅₀ değeri (µM)
5-FU	6,39
SMY370	21,68
Bevacizumab	17,98

Şekil 4.6'da ise sağlıklı hücre hattında MTT analizi grafik olarak özetlenmiştir.

L929 IC₅₀ Grafiği



Şekil 4.6: Sağlıklı hücre için IC₅₀ grafiği

Selektivite indeksi, bir ilacın hedeflenen etkiyi istenen düzeyde gerçekleştirirken, istenmeyen yan etkilerin oluşma riskini ölçmek için kullanılan bir değerdir. Her ilacın SI değeri sağlıklı hücredeki IC₅₀ değerinin kanserli hücredeki değere bölünmesiyle bulundu. Hesaplanan değerler Tablo 4.9’da verilmiştir.

$$SI = \frac{\text{Sağlıklı Hücre IC}_{50}}{\text{Kanser hücre IC}_{50}}$$

Tablo 4.9: Selektivite indeksi sonuçları

Molekül	SI değeri
5-FU	2,2
Bevacizumab	1,8
SMY370	2,1

4.4. RNA İZOLASYONU VE cDNA SENTEZİ

RNA izolasyonu protokolü sonucunda innu PREP RNA Mini kit 2.0 (Innuscreen GMBH) kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapılmış, saflık ve konsantrasyon değerleri belirlenmiştir. Tablo 4.10’da bu değerler görülmektedir.

Tablo 4.10: RNA izolasyonu sonucu konsantrasyon değerleri

Madde	RNA miktarı (ng/μL)	OD260/280
Kontrol	23	2,08
5-FU	20,66	1,98
Smy370	77	2,04
Bevac	56,8	2,1

Bu RNAlar kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Kullanılan bileşiklerin miktarı tablo 4.11’de görülmektedir.

Tablo 4.11: cDNA sentezi için kullanılan bileşiklerin miktarı

μL	Kontrol	5-FU	SMY370	Bevacizumab
Su	10,66	10,16	8,2	8,8
Buffer	4	4	4	4
Rna	4,34	4,84	1,8	1,2
enzim	1	1	1	1

4.5. RT-qPCR ANALİZİ

cDNA sentezi sonucunda ilgili protokol uygulanarak RT-qPCR reaksiyonu kurulmuştur. Kullanılan genler tablo 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.12: Kullanılan genler

ANGPT1	TEK	CASP9	STMN1	ETS2	DDIT3	PPPIR15A	GSC	EPO	GPD2	TNKS	HSP90A B4P
ANGPT2	VEGFC	CFLAR	MCM2	IGFBP3	ERCC3	CDH2	SNAI3	ACSL4	LPL	TNKS2	HSPB1
FGF2	APAF1	NOL3	MKI67	IGFBP5	ERCC5	DSP	OCLN	HMDX1	PFKL	TP53	HSP90A B1
FLT1	BIRC3	BCL2L11	SKP2	IGFBP7	LIG4	FOXC2	ACLY	LDHA	TEP1	TERF2IP	GUSB
KDR	XIAP	CCND2	AURKA	SERPINB2	POLB	KRT14	ADM	SLC2A1	UQCRFS1	TINF2	GAPDH
SERPINF1	FASLG	CCND3	WEE1	MAP2K1	SOD1	SNAI2	ARNT	CPT2	COX5A	TRAP1	GAPDH
PGF	CASP2	CDC20	BMI1	MAP2K3	TBX2	SNAI1	ATP541	DKC1	PINX1	CDC37	ACTINB
CCL2	CASP7	E2F4	MAPK14	DDB2	GADP45G	SOX10	CA9	G6PD	TERF1	CDK4	ACTINB

Tablo 4.13: Belirgin değişimi gözlenen belli başlı genler ve fonksiyonları

Gen	Açık adı	Fonksiyonu
ANGPT1	Angiopoietin 1	Damar gelişimi ve stabilizasyonunda önemli bir rol oynar.
TEK	Endothelial Tyrosine Kinase	Endotel hücre proliferasyonu ve vasküler gelişimde rol oynayan bir tirozin kinaz reseptörü.
MCM2	Minichromosome Maintenance Complex Component 2	MCM2, DNA replikasyonunun başlatılması ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynayan bir helikaz enzimidir. DNA çifte sarmallarının açılmasını ve replikasyonun ilerlemesini sağlar. Bu nedenle, hücrenin doğru şekilde çoğalması ve DNA bütünlüğünün korunması için kritik öneme sahiptir.
DKC1	Dyskerin Pseudouridine Synthase 1	DKC1, özellikle ribozomal RNA'nın düzenlenmesinde ve stabilizasyonunda rol oynayan bir enzimidir. Ribozomal RNA, hücrede protein sentezi için gereklidir ve bu nedenle hücrenin doğru işleyişi için önemlidir.
HSP90AAB1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1	HSP90AAB1, hücre stres yanıtında ve proteinlerin doğru katlanmasında önemli bir rol oynayan bir moleküler şaperon proteindir. Hücre stresi durumlarında proteinlerin yanlış katlanmasını engeller ve hücrenin hayatta kalmasını sağlar.
GUSB2	Glucuronidase Beta 2	GUSB2, glukuronik asit türevlerini hidrolize eden bir enzimidir. Bu enzim, metabolik atıkların bozunmasında ve vücuttaki çeşitli moleküllerin metabolizmasında önemli bir rol oynar.
NOL3	Nucleolar Protein 3	NOL3, hücre apoptozunda rol oynayan bir protein olan "apoptozis inhibitörü" olarak bilinir. Apoptozu önleyerek hücre hayatta kalmasını destekler.
ETS2	ETS Proto-Oncogene 2	ETS2, bir transkripsiyon faktörüdür ve hücre döngüsü, hücre farklılaşması ve kanser gelişimi gibi birçok biyolojik süreci düzenler.
IGFBP5	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 5	IGFBP5, hücre büyümesi, doku yenilenmesi gibi süreçlerde insülin benzeri büyüme faktörlerinin etkilerini düzenler. Hücre büyümesini inhibe eder.

Tablo 4.13 (devam)

PPP1R15A	Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A	PPP1R15A, hücre stres yanıtının bir parçası olan bir protein olup, stres koşullarında hücredeki çeşitli biyolojik süreçleri düzenler.
FOXC2	Forkhead Box C2	FOXC2, bir transkripsiyon faktörüdür ve embriyonik gelişim, hücre farklılaşması, angiogenez ve yağ metabolizması gibi süreçlerde rol alır.
SNAI2	Snail Family Transcriptional Repressor 2	SNAI2, epitel-mesenkimal geçiş (EMT) olarak bilinen bir süreci düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. EMT, kanser metastazı gibi önemli biyolojik süreçlerde rol oynar.
GSC	Goosecoid Homeobox	GSC, embriyonik gelişimde rol oynayan bir homeotik gen olup, özellikle baş ve merkezi sinir sistemi oluşumunda önemli bir rol oynar.
SNAI3	Snail Family Transcriptional Repressor 3	SNAI3, epitel-mesenkimal geçiş (EMT) sürecini düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Benzer şekilde, hücre farklılaşması ve kanser metastazı gibi süreçlerde rol alır.
COX5A	Cytochrome C Oxidase Subunit 5A	COX5A, mitokondriyal solunum zincirinin bir parçası olan sitokrom C oksidaz kompleksinin bir alt birimi olarak hücredeki enerji üretiminde rol oynar.
FLT1	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1	FLT1, bir tirozin kinaz reseptörüdür ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) sinyal yolunun bir parçasıdır. Vasküler gelişim ve anjiyogenezde önemli bir rol oynar.
VEGFC	Vascular Endothelial Growth Factor C	VEGFC, vasküler endotel büyüme faktörlerinden biridir ve lenfatik damarların büyümesi ve lenfatik kapillerlerin yeniden yapılanması gibi süreçlerde rol alır.
SERPINB2	Serpin Family B Member 2	SERPINB2, bir serpin proteaz inhibitörüdür ve hücre apoptozunu düzenleyen bir faktör olarak işlev görür. Ayrıca inflamasyon ve fibrinoliz gibi süreçlerde de rol alabilir.
SOX10	SRY-Box Transcription Factor 10	SOX10, bir transkripsiyon faktörüdür ve nöral krest hücrelerinin farklılaşması, nöronların ve gliyal hücrelerin gelişimi, melanositlerin farklılaşması gibi süreçlerde rol alır. Ayrıca periferik sinir sistemi ve melanosit hücrelerinin gelişiminde kritik öneme sahiptir.
UQCRC1	Ubiquinol-Cytochrome C Reductase, Rieske Iron-Sulfur Subunit 1	UQCRC1, mitokondriyal elektron taşıma zincirinin bir parçası olan sitokrom c redüktaz kompleksinin bir alt birimidir. Hücredeki enerji üretiminde ve mitokondriyal fonksiyonlarda önemli bir rol oynar.

Tablo 4.13 (devam)

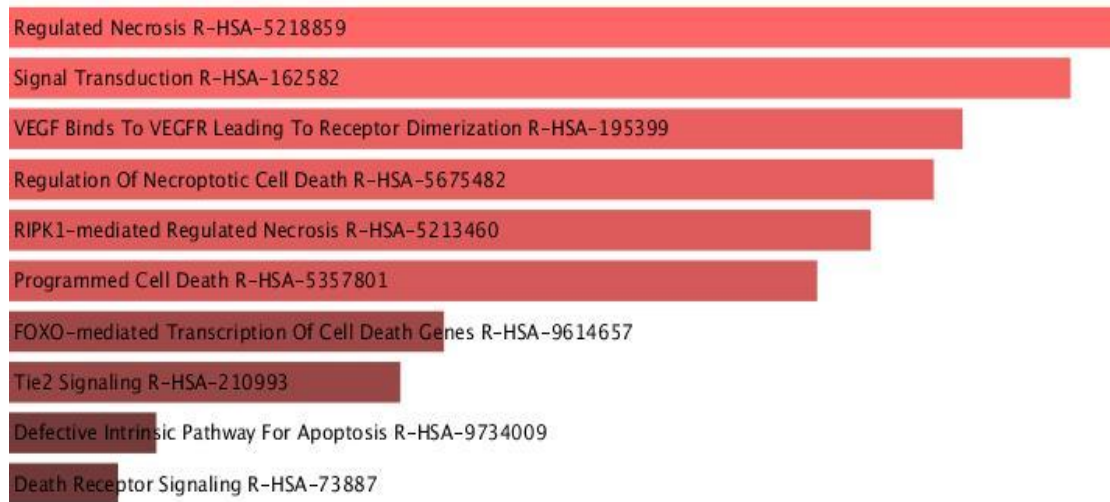
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2	FGF2, hücre büyümesi, hücre çoğalması ve dokuların yenilenmesi gibi süreçlerde rol oynayan bir büyüme faktörüdür. Ayrıca angiogenez, yara iyileşmesi ve embriyonik gelişimde de önemli bir rol oynar.
DDIT3	DNA Damage Inducible Transcript 3	DDIT3, hücre stres yanıtının bir parçası olan bir transkripsiyon faktörüdür. Stres koşullarında, özellikle endoplazmik retikulum stresinde, hücre apoptozunu düzenler.
HMOX1	Heme Oxygenase 1	HMOX1, heme metabolizmasında önemli bir enzim olan hem oksijenazın bir formudur. Heme moleküllerini parçalayarak karbon monoksit, demir ve biliverdin gibi ürünlere dönüştürür. Antioksidan ve anti-enflamatuar etkilere sahiptir.
TNKS2	Tankyrase 2	TNKS2, telomer stabilizasyonunda ve Wnt sinyal yolunda rol oynayan bir enzimdir. Telomerlerin stabilizasyonu, hücre yaşlanmasını ve kanser gelişimini etkileyen bir süreçtir.
TP53	Tumor Protein P53	TP53, hücre döngüsünün düzenlenmesinde, DNA hasarının onarılmasında ve hücre apoptozunda kritik bir rol oynayan bir tümör baskılayıcı proteindir. Genellikle "kanser baskılayıcı" bilinir.
TRAP1	TNF Receptor Associated Protein 1	TRAP1, mitokondriyal şaperon proteinlerinden biridir ve mitokondriyal fonksiyonları düzenler. Hücredeki stres yanıtında ve kanser gelişiminde rol oynayabilir.
CA9	Carbonic Anhydrase 9	CA9, karbondioksitin su ile karbonat iyonu ve protona dönüştürülmesini katalize eden bir enzimdir. Bu enzim, hücre içinde pH dengesini korumak için önemlidir ve özellikle hücrenin asidik ortamlara uyum sağlamasında rol oynar. Ayrıca, kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz yeteneklerini artırabileceği için kanser araştırmalarında da önemlidir.
TERF1	Telomeric Repeat Binding Factor 1	TERF1, telomerlerin korunması ve stabilizasyonunda önemli bir rol oynayan bir protein kompleksinin bir parçasıdır. Telomerler, kromozom uçlarındaki tekrar eden DNA dizileridir ve kromozomların istikrarını ve bütünlüğünü korumak için gereklidir. TERF1, telomerlerin yapısal bütünlüğünü sağlar ve telomerlerin hasara karşı korunmasına yardımcı olur. Bu nedenle, hücre yaşlanması, kanser ve diğer hastalıkların gelişimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir.

4.6. GEN ZENGİNLEŞTİRME ANALİZİ

EnricR, Reactome ve KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri tabanları kullanılarak gen zenginleştirme analizi yapılmıştır. Her bir madde ile etkilenen yollar p değerine göre anlamlılık oranı azalan sırada önce bar grafik olarak verilmiş. İstatistik verileri her şeklin altında ayrı bir tablo halinde sunulmuştur.

5-FU'nun HCT116 hücre hattında en çok etkilediği yollar, düzenlenmiş, nekroz, sinyal iletimi, VEGF'in VEGFR'ye bağlanması ve reseptörlerin dimerizasyonu, nekroptotik hücre ölümünün düzenlenmesi, RIPK1 aracılığıyla nekroz düzenlenmesi,

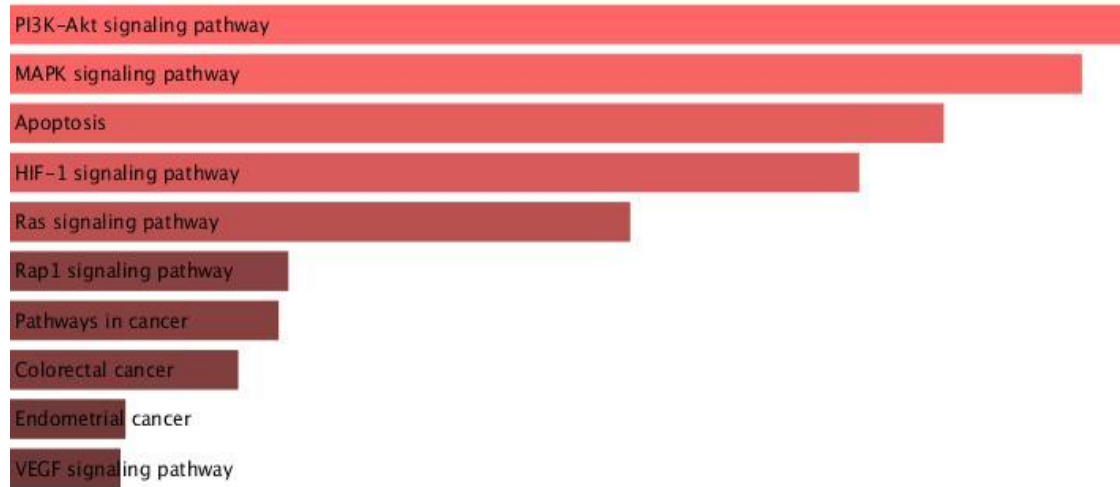
programlanmış hücre ölümü, FOXO proteinleri tarafından hücre ölümü genlerinin transkripsiyonu, Tie2 sinyalleme, apoptozun defektif intrinsik yolağı, ölüm reseptörü sinyalleme ile apoptozun ekstrinsik yolağıdır(Şekil 4.7 ve Tablo 4.14). Ayrıca KEGG analizinde apoptoz yanında kanser tedavisinde önemli bir hedef olan PI3K/AKT, MAPK, HIF-1, RAS, RAP1 sinyal yollarının belirgin şekilde etkilendiğı görülmektedir. Ayrıca kanser yolaklarının, özellikle kolorektal ve endometrial kanserlerin ve VEGF sinyal yolunun da etkilendiğı dikkat çekmektedir(Şekil 4.8 ve Tablo 4.15).



Şekil 4.7: 5-FU Reactom 2022 tabanlı gen zenginleştirme analizi sonuçları p değerlerine göre sıralanmıştır.

Tablo 4.14: 5-FU Reactom 2022 tabanlı gen zenginleştirme analizinin istatistiksel sonuçları

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	Regulated Necrosis R-HSA-5218859	6.995e-7	0.0001274	35.41	501.93
2	Signal Transduction R-HSA-162582	8.399e-7	0.0001274	4.26	59.58
3	VEGF Binds To VEGFR Leading To Receptor Dimerization R-HSA-195399	0.000001351	0.0001274	213.60	2886.70
4	Regulation Of Necroptotic Cell Death R-HSA-5675482	0.000001535	0.0001274	57.94	775.61
5	RIPK1-mediated Regulated Necrosis R-HSA-5213460	0.000002025	0.0001344	53.64	703.23
6	Programmed Cell Death R-HSA-5357801	0.000002566	0.0001420	13.22	170.19
7	FOXO-mediated Transcription Of Cell Death Genes R-HSA-9614657	0.00001329	0.0006302	82.12	922.11
8	Tie2 Signaling R-HSA-210993	0.00001610	0.0006682	76.25	841.56
9	Defective Intrinsic Pathway For Apoptosis R-HSA-9734009	0.00004722	0.001742	50.82	506.16
10	Death Receptor Signaling R-HSA-73887	0.00005587	0.001823	13.69	134.03

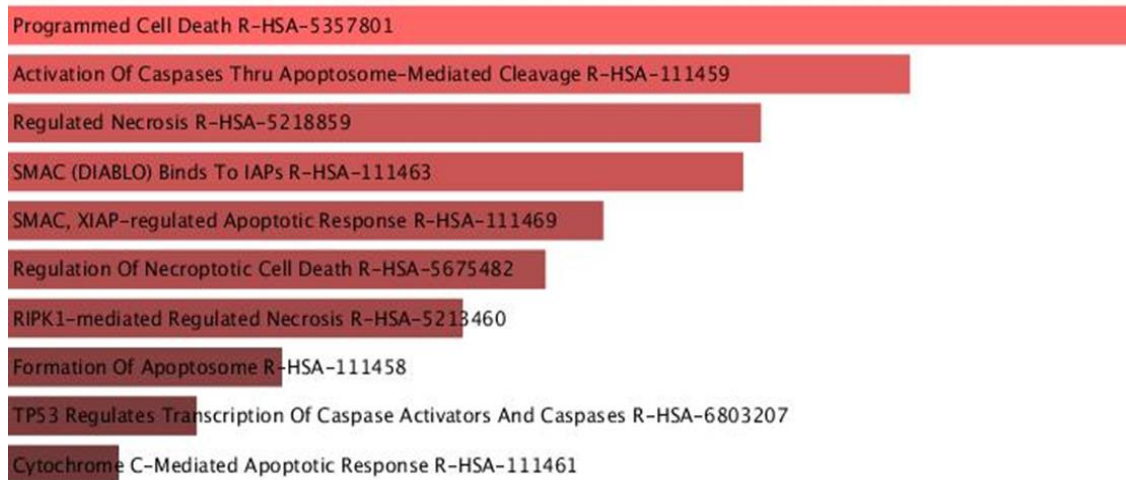


Şekil 4.8: 5-FU KEG 2021 tabanlı gen zenginleştirme analizi

Tablo 4.15: 5-FU KEG 2021 tabanlı gen zenginleştirme analizi istatistik sonuçları

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	PI3K-Akt signaling pathway	2.611e-11	3.985e-9	16.24	395.84
2	MAPK signaling pathway	4.920e-11	3.985e-9	17.80	422.46
3	Apoptosis	3.300e-10	1.782e-8	26.81	585.27
4	HIF-1 signaling pathway	1.056e-9	4.277e-8	30.81	636.87
5	Ras signaling pathway	2.472e-8	8.009e-7	15.92	278.78
6	Rap1 signaling pathway	0.00002734	0.00007227	13.09	167.66
7	Pathways in cancer	0.000003123	0.00007227	7.61	96.43
8	Colorectal cancer	0.000005451	0.0001104	22.70	275.15
9	Endometrial cancer	0.00002573	0.0004461	26.78	283.05
10	VEGF signaling pathway	0.00002754	0.0004461	26.30	276.10

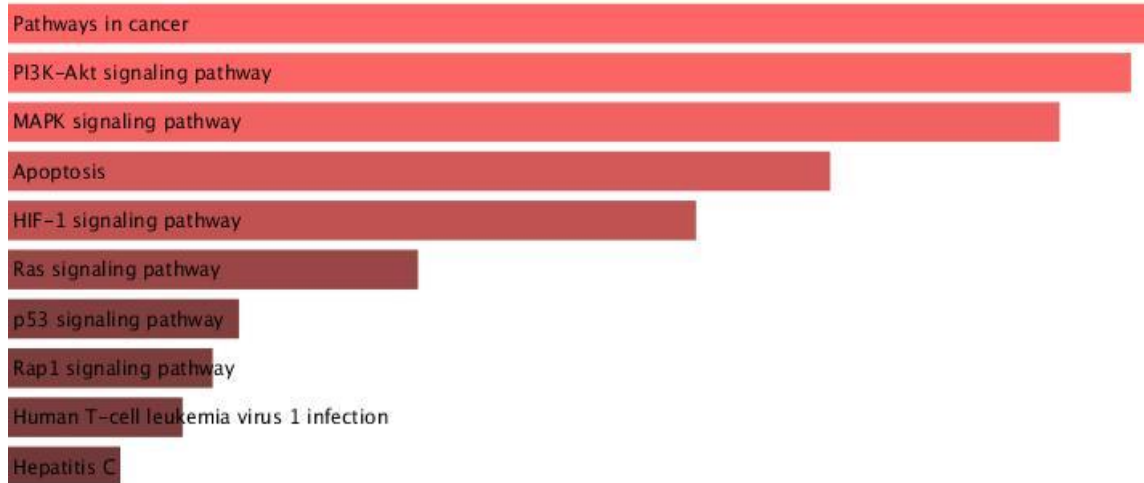
SMY370'in RT-PCR ile elde edilen gen ekspresyon verileri de EnrichR ile Reactome ve KEGG veri tabanı üzerinden analiz edildi. Reactome analizi SMY370'in özellikle hücre ölümü mekanizmaları üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Programlanmış hücre ölümü, apoptozom aracılı kaspaz aktivasyonu, düzenlenmiş nekroz indüklenmiştir. SMAC (DIABLO) IAP'I bağlar ve XIAP tarafından regüle edilen apoptotik cevabı tetikler. SMAC/DIABLO'nun IAP'lar ile etkileşimi, hücre içi ölüm baskılayıcı proteinlerin inhibisyonu üzerinden apoptozisi kolaylaştırır. Nekroptotik hücre ölümünün düzenlenmesi, RIPK1 aracılı düzenlenmiş nekroz, apoptozom oluşumu, kaspaz aktivatörleri ve kaspazların transkripsiyonunun TP53 tarafından düzenlenmesi ve sitokrom c aracılı apoptotik cevap üzerinde de etkili olduğu görülmektedir(Şekil 4.9 ve Tablo 4.16).



Şekil 4.9: SMY370'in reactome 2022 tabanlı gen zenginleştirme analizi sonuçları

Tablo 4.16: SMY370'in reactome 2022 tabanlı gen zenginleştirme analizi istatistik sonuçları

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	Programmed Cell Death R-HSA-5357801	2.836e-7	0.00009686	14.35	216.40
2	Activation Of Caspases Thru Apoptosome-Mediated Cleavage R-HSA-111459	5.917e-7	0.00009686	332.23	4764.32
3	Regulated Necrosis R-HSA-5218859	9.736e-7	0.00009686	32.97	456.32
4	SMAC (DIABLO) Binds To IAPs R-HSA-111463	0.000001033	0.00009686	249.16	3434.19
5	SMAC, XIAP-regulated Apoptotic Response R-HSA-111469	0.000001649	0.0001237	199.32	2653.98
6	Regulation Of Necroptotic Cell Death R-HSA-5675482	0.000002001	0.0001251	54.00	708.57
7	RIPK1-mediated Regulated Necrosis R-HSA-5213460	0.000002638	0.0001413	49.99	642.19
8	Formation Of Apoptosome R-HSA-111458	0.000004827	0.0002263	124.56	1524.73
9	TP53 Regulates Transcription Of Caspase Activators And Caspases R-HSA-6803207	0.000006421	0.0002676	110.71	1323.65
10	Cytochrome C-Mediated Apoptotic Response R-HSA-111461	0.000008329	0.0003123	99.64	1165.31

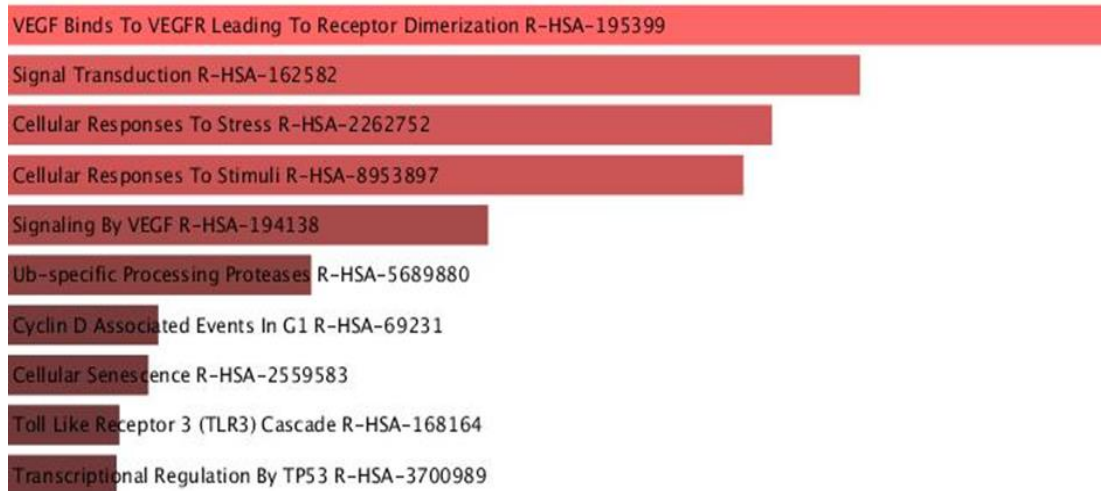


Şekil 4.10: SMY370 KEG2021 gen zenginleştirme analizi sonuçları

Tablo 4.17: SMY370 KEG2021 gen zenginleştirme analizi istatistik sonuçları

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	Pathways in cancer	8.265e-10	7.873e-8	10.73	224.45
2	PI3K-Akt signaling pathway	9.317e-10	7.873e-8	13.48	280.33
3	MAPK signaling pathway	1.795e-9	1.011e-7	14.69	295.85
4	Apoptosis	1.473e-8	6.233e-7	21.50	387.61
5	HIF-1 signaling pathway	5.058e-8	0.000001710	24.31	408.36
6	Ras signaling pathway	6.497e-7	0.00001830	12.80	182.37
7	p53 signaling pathway	0.000003360	0.00008113	25.19	317.47
8	Rap1 signaling pathway	0.000004279	0.00009040	12.15	150.21
9	Human T-cell leukemia virus 1 infection	0.000005639	0.0001059	11.63	140.56
10	Hepatitis C	0.000009985	0.0001614	13.79	158.82

SMY370'in KEGG veri tabanı ile analizinde hücre büyümesi, bölünmesi, ölüm ve metabolizması gibi çeşitli biyolojik süreçleri düzenlediği anlaşılmaktadır. PI3K-Akt ve MAPK gibi hücre büyümesi sinyallerini aktive ederek, apoptozu tetikleyerek ve HIF-1 ve NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini düzenleyerek etkili olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca birçok kanser türünde mutasyona uğrayan RAS ve p53 yolağı, hücre adezyonu, hücre göçü ve hücre büyümesi gibi süreçleri düzenler ve kanser metastazında rol oynayan RAP1 yolu etkilenmektedir. Bunların yanısıra HCV ve HTLV-1 enfeksiyonları ile ilişkili sinyallerin etkilenmiş olması SMY370'in olası antiviral potansiyeline işaret edebilir.

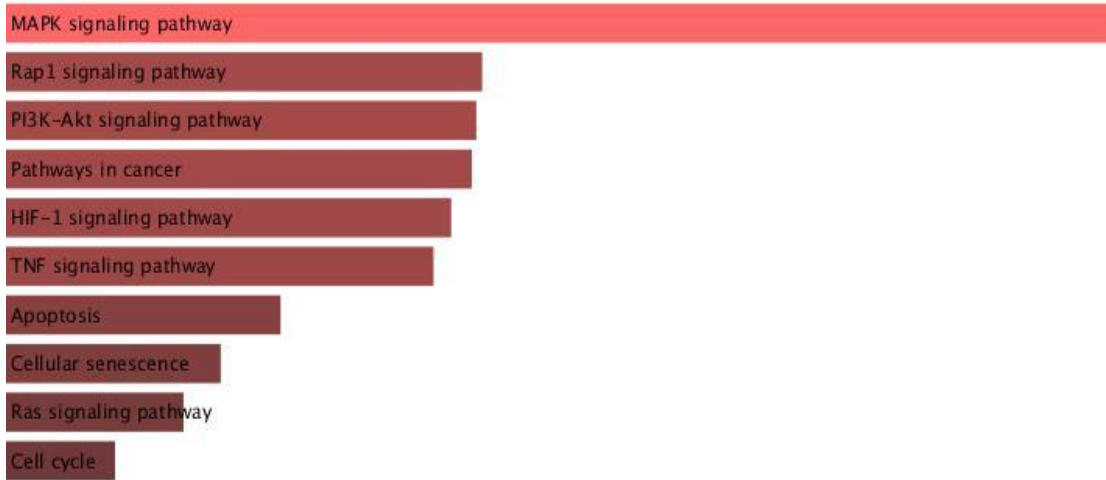


Şekil 4.11: Bevacizumab Reactome 2022 tabanlı gen zenginleştirme analizi sonuçları

Tablo 4.18: Bevacizumab Reactome 2022 tabanlı gen zenginleştirme analizi istatistik sonuçları

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	VEGF Binds To VEGFR Leading To Receptor Dimerization R-HSA-195399	8.984e-9	0.000003675	306.57	5680.04
2	Signal Transduction R-HSA-162582	6.743e-8	0.00001379	4.34	71.60
3	Cellular Responses To Stress R-HSA-2262752	1.382e-7	0.00001787	6.91	109.16
4	Cellular Responses To Stimuli R-HSA-8953897	1.748e-7	0.00001787	6.77	105.38
5	Signaling By VEGF R-HSA-194138	0.000001402	0.0001147	19.68	265.21
6	Ub-specific Processing Proteases R-HSA-5689880	0.000005940	0.0004049	11.49	138.23
7	Cyclin D Associated Events In G1 R-HSA-69231	0.00002069	0.001148	28.46	306.99
8	Cellular Senescence R-HSA-2559583	0.00002245	0.001148	11.84	126.77
9	Toll Like Receptor 3 (TLR3) Cascade R-HSA-168164	0.00002842	0.001164	15.81	165.51
10	Transcriptional Regulation By TP53 R-HSA-3700989	0.00002906	0.001164	7.42	77.55

Bevacizumab, özellikle VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) sinyallemesini hedef alarak, tümör büyümesini ve metastazını destekleyen anjiyogenez sürecini inhibe eder. Yanısıra Bevacizumab, tümör hücrelerini oksijen ve besin eksikliği gibi strese maruz bırakarak hücresel strese cevap sinyallerini etkilemektedir. Hücre döngüsünün G1 fazında Cyclin D ilişkili olayları etkilemesi hücre döngüsünü durdurarak tümör hücrelerinin proliferasyonunu engellediğini göstermektedir. Hücresel senescence de etkilenmiş olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca TLR3 (Toll Like Receptor 3) kaskadının uyarılması tümör immünolojisinin uyarılmasına ve TP53 tarafından transkripsiyonel regülasyon ile hücre ölümü üzerinde etkilerine katkı vermektedir. Reactome analizi Şekil 4.11’de özetlenmiştir. Tablo 4.18’de ise istatistik değerlendirmesi sunulmuştur.



Şekil 4.12: Bevacizumab KEG 2021 tabanlı gen zenginleştirme analizi sonuçları

Tablo 4.19: Bevacizumab KEG 2021 tabanlı gen zenginleştirme analizi istatistik sonuçları

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	MAPK signaling pathway	1.210e-12	2.202e-10	17.86	490.21
2	Rap1 signaling pathway	2.606e-9	1.344e-7	16.72	330.50
3	PI3K-Akt signaling pathway	2.798e-9	1.344e-7	12.06	237.48
4	Pathways in cancer	2.953e-9	1.344e-7	9.56	187.73
5	HIF-1 signaling pathway	3.807e-9	1.386e-7	25.75	499.18
6	TNF signaling pathway	4.726e-9	1.434e-7	25.00	479.30
7	Apoptosis	3.073e-8	7.990e-7	19.38	335.16
8	Cellular senescence	6.392e-8	0.000001454	17.53	290.40
9	Ras signaling pathway	1.008e-7	0.000002039	13.26	213.56
10	Cell cycle	2.329e-7	0.000004239	19.12	292.02

Bevacizumabın HCT116 hücrelerindeki etkisi KEGG veri tabanı ile değerlendirildiğinde PI3K/AKT, MAPK, apoptoz, TNF, HIF-1, RAP1 ve RAS sinyal yollarının da etkilendiği anlaşılmaktadır. Hücresel “senescence” ve apoptoz da teşvik edilmektedir. Hücre siklusu ve kanser yolakları Bevacizumab tarafından etkilenmektedir (Şekil 4.12 ve Tablo 4.19)

Her üç molekülün en çok etkilediği yollar tablo 4.20’te birlikte sunulmuştur.

Tablo 4.20: Gen zenginleştirme analizlerinde, her üç madde için en çok etkilenen yollar

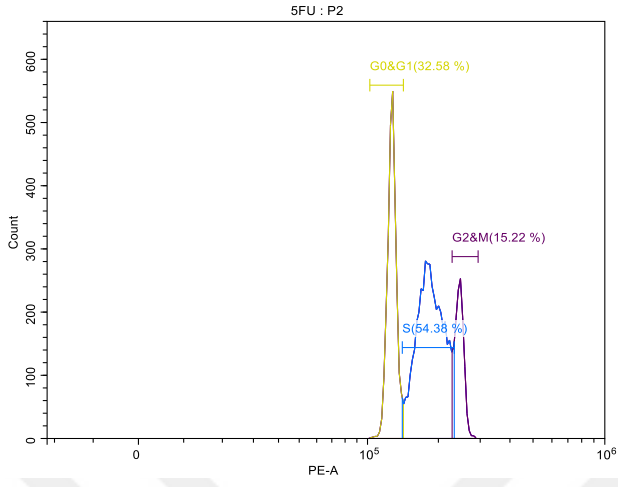
ETKİLENEN YOLAKLAR			
Veritabanı	5-FU	BEVAC	SMY370
KEGG	PI3K-AKT MAPK Apoptoz HIF-1 RAS	MAPK RAP1	Kanser yolağı PI3K-AKT MAPK Apoptoz HIF-1
Reactome	Nekroz düzenlenmesi Sinyal iletimi VEGF yolağı Nekroptotik hücre ölümü Nekroz RIPK-1 aracılı Programlı hücre ölümü	VEGF	Programlı hücre ölümü Kaspaz aktivasyonu Nekroz SMAC/ DIABLO-XIAP aracılı apoptoz cevabı regülasyonu Nekroptotik hücre ölümü

Tablo 4.21: Her üç madde için ifadesi belirgin şekilde artıp azalan genler

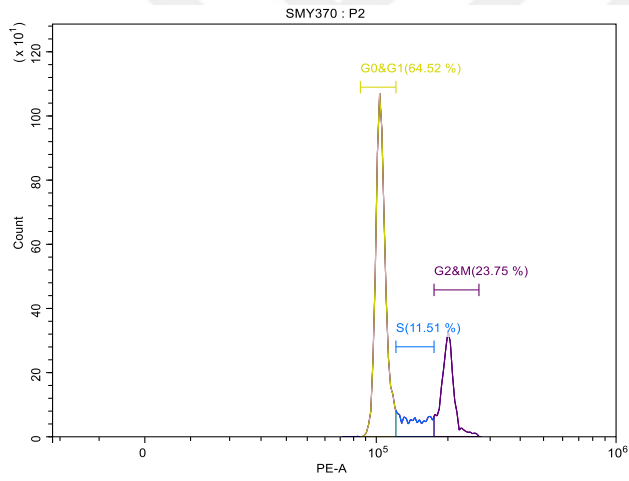
Değişimler 5-FU Bevacizumab SMY370

<i>Artış</i>	TEK	FGF2	NOL3
	NOL3	ETS2	PPP1R15A
	ETS2	DDIT3	FOXC2
	IGFBP5	HMOX1	SNAI2
	PPP1R15A	COX5A	CA9
	FOXC2	TNKS2	COX5A
	SNAI2	TP53	TERF1
	GSC	TRAP1	TP53
	SNAI3		
	COX5A		
<i>Azalış</i>	ANGPT1	ANGPT1	GUSB2
	MCM2	FLT1	
	DKC1	VEGFC	
	HSP90AAB1	SERPINB2	
	GUSB2	SOX10	
		GSC	
		UQCERS1	

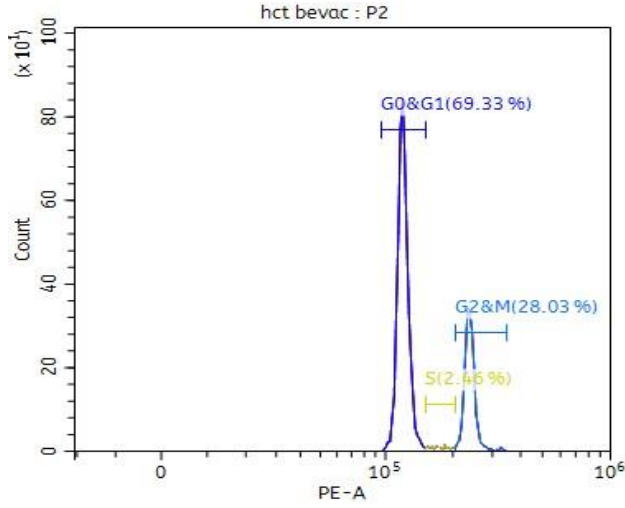
4.7. HÜCRE SIKLUSU ANALİZİ



Şekil 4.13: 5-FU cell cycle analizi



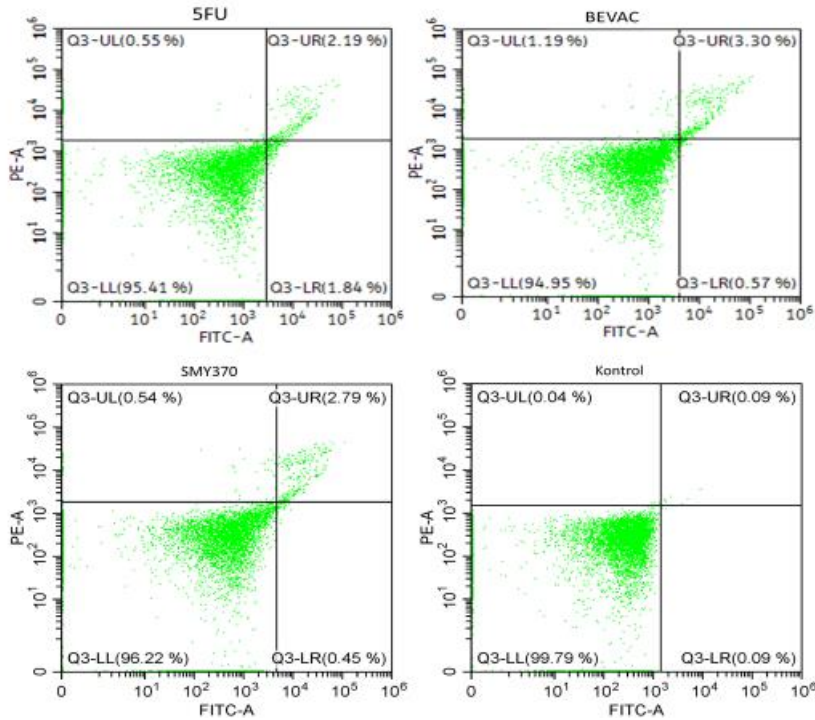
Şekil 4.14: SMY370 cell cycle analizi



Şekil 4.15: Bevacizumab cell cycle analizi

5-FU'nun etkisini en fazla S fazında gösterdiği(%54,38), SMY370'in G0&G1'de (%64,52), Bevacizumab'ın da yine G0&G1'de (%69,33) hücre siklusunu etkilediğini tespit ettik. Sonuçlar grafikte (Şekil 4.13-15)özetlenmiştir.

4.8. APOPTOZ ANALİZİ

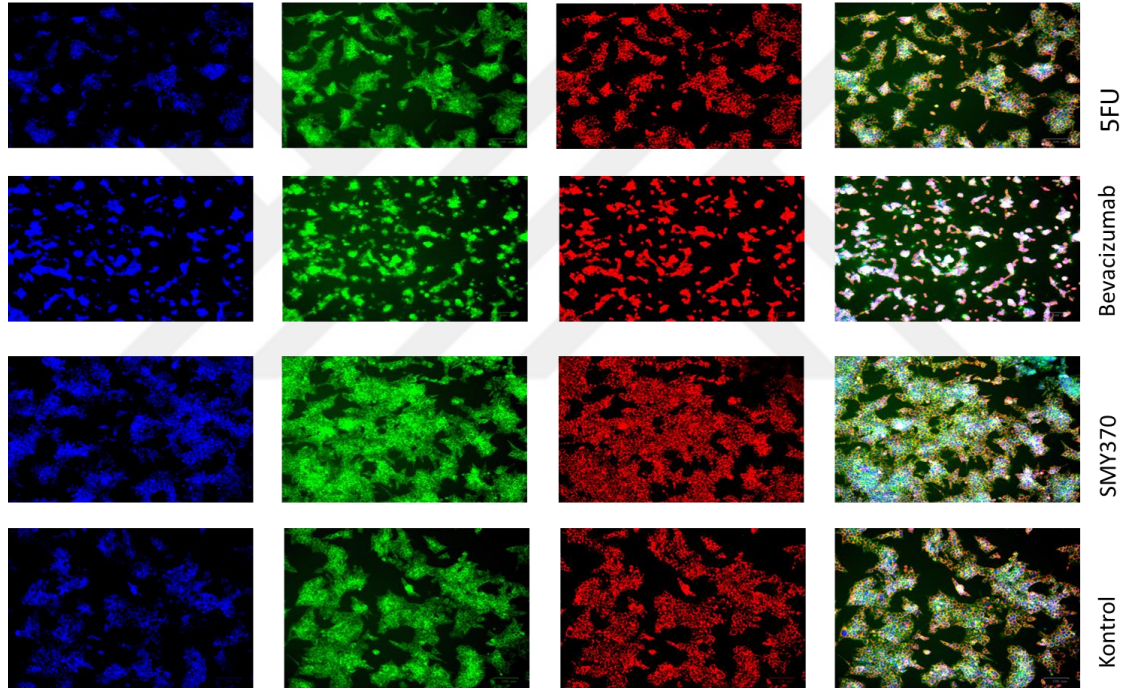


Şekil 4.16: Apoptoz analizi sonuçları

Annexin V ve Propidium iodür kullanılarak yapılan Flow sitometri analizleri Şekil 4.16’da verilmiştir. Grafikte sol üst kare nekrozu, sağ üst kare geç apoptozu, sol alt kare canlılığı, sağ alt kare ise erken apoptozu göstermektedir. 5-FU, bevacizumabta olduğu gibi SMY370’in de geç apoptozu indüklediği izlenmektedir.

4.9. HÜCRE GÖRÜNTÜLEME

Zoe kullanılarak protokole uygun biçimde alınan görüntüler aşağıdadır.

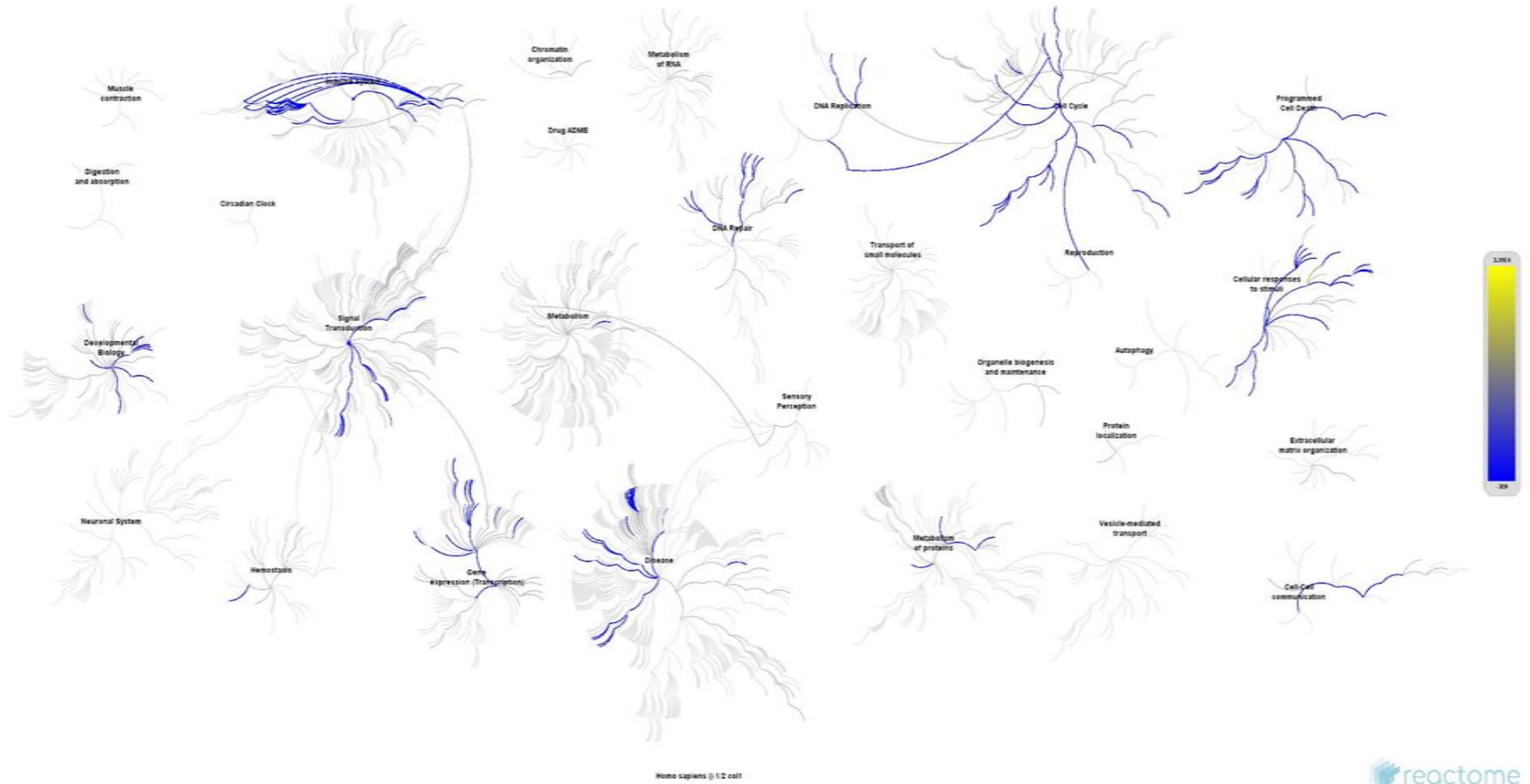


Şekil 4.17: Zoe fluoresan görüntüleme 5-FU, Bevacizumab, SMY370 ve kontrol grubunun karşılaştırılması

Mavi çekirdek boyası, yeşil mikrotübül, hücre iskeleti boyası ve kırmızı mitokondri boyları kullanılarak alınan görüntülerde kontrole göre çekirdek boyanması 5-FU’da ve Bevacizumab’ta daha çok azalmış, hücre iskeleti ve mitokondri boyasının Bevacizumab’ta en fazla azalırken SMY370’in ise bir miktar arttığı görülmüştür(Şekil 4.17).

Tablo 4.22: Gen ekspresyonlarının en çok azalandan en fazla artış gösterene doğru sıralanmasını gösteren tablo

5-FU	BEVAC	SMY370			
-10,61	GUSB2	-32,62	ANGPT1	-7,14	GUSB2
-6,62	TBX2	-26,13	FLT1	-6,99	UQCERS1
-4,95	DKC1	-16,05	UQCERS1	-3,88	ERCC3
-2,78	ARNT	-13,25	VEGFC	-3,11	MCM2
-2,11	MCM2	-11,86	GSC	-2,61	HMOX1
-1,94	CASP9	-10,83	SERPINB2	-2,39	GEPD
-1,88	ANGPT1	-8,62	SOX10	-2,14	CDC20
-1,79	MKI67	-8,10	TEK	-2,11	CASP9
-1,77	CDC20	-4,65	CDK4	-1,90	ANGPT1
-1,53	CDC37	-3,94	CASP7	-1,80	GPD2
-1,53	HSP90AAB1	-2,92	LDHA	-1,75	MAP2K1
-1,36	ATPSA1	-2,14	KRT14	-1,57	DKC1
-1,34	PFKL	-1,86	ACLY	-1,55	ARNT
-1,29	CPT2	-1,70	MAP2K1	-1,46	PINK1
-1,23	AURKA	-1,69	DKC1	-1,46	CDC37
-1,19	PINK1	-1,64	ERCC3	-1,34	TEP1
-1,15	CCL2	-1,64	LIG4	-1,29	ACSL4
-1,09	MAP2K1	-1,59	HSPB1	-1,18	ERCC5
-1,06	ACSL4	-1,56	STMN1	-1,18	LDHA
-1,03	DSP	-1,33	BM11	-1,05	LIG4
1,00	MAPK14	-1,33	IGFBP5	-1,04	MAP2K3
1,03	TEP1	-1,32	HSP90AAB1	1,02	SOD1
1,04	ERCC3	-1,30	SOD1	1,02	DDR2
1,08	CASP7	-1,25	OCLN	1,05	TNKS2
1,10	LIG4	-1,22	MAP2K3	1,10	FLT1
1,10	TNKS	-1,17	IGFBP7	1,14	CASP7
1,14	UQCERS1	-1,15	DSP	1,14	EZF4
1,25	CCND3	-1,13	ACSL4	1,16	SCL2A1
1,26	SOD1	-1,12	SERPINF1	1,18	PFKL
1,28	FGF2	-1,10	BIRC3	1,31	LPL
1,31	TERF2IP	-1,09	MAPK14	1,32	DDIT3
1,34	ACLY	-1,08	SKP2	1,36	AURKA
1,38	HMOX1	-1,07	GPD2	1,36	SOX10
1,43	LDHA	1,00	TERF1	1,41	TERF2IP
1,56	BM11	1,06	WEE1	1,44	ADM
1,58	CDK4	1,12	ANGPT2	1,46	BCL2L11
1,63	SKP2	1,13	TEP1	1,47	CDK4
1,64	IGFBP3	1,16	XIAP	1,55	GADD456
1,64	LPL	1,16	AURKA	1,63	ACLY
1,66	VEGFC	1,19	APAF1	1,65	CFLAR
1,68	IGFBP7	1,22	SCL2A1	1,78	KDR
1,71	EZF4	1,43	CPT2	1,81	TNKS
1,73	MAP2K3	1,49	TBX2	1,82	SERPINF1
1,74	WEE1	1,56	CASP9	1,86	ANGPT2
1,77	XIAP	1,65	EPO	1,97	MKI67
1,78	ERCC5	1,73	ERCC5	1,97	SKP2
1,78	OCLN	1,82	ATPSA1	1,97	HSP90AAB1
1,79	APAF1	1,86	GADD456	1,98	MAPK14
1,81	CA9	1,88	CDC37	2,01	APAF1
1,87	TERF1	2,12	CCL2	2,05	BM11
1,94	SNAI1	2,16	MKI67	2,05	DSP
2,13	DDR2	2,19	SNAI2	2,06	TINF2
2,15	TP53	2,27	ARNT	2,06	CCL2
2,15	TRAP1	2,29	FOXK2	2,15	CPT2
2,18	TINF2	2,30	BCL2L11	2,17	TRAP1
2,21	KRT14	2,43	POLB	2,21	POLB
2,25	SOX10	2,47	MCM2	2,21	HSPB1
2,27	DDIT3	2,87	EZF4	2,35	ATPSA1
2,30	TNKS2	3,06	IGFBP3	2,42	KRT14
2,37	CASP2	3,19	HSP90AB4P	2,54	WEE1
2,45	ANGPT2	3,25	CDC20	2,56	OCLN
2,52	SERPINB2	3,66	CA9	2,63	FASLG
2,52	GPD2	3,69	PFKL	2,63	BIRC3
2,68	GADD456	3,71	NOL3	2,63	SERPINB2
2,79	POLB	4,26	ADM	2,69	FGF2
2,81	FLT1	4,42	DDR2	3,08	CCND3
3,04	ADM	4,51	PGF	3,15	XIAP
3,06	HSPB1	4,83	GEPD	3,28	TBX2
3,12	BCL2L11	5,14	PPP1R15A	3,33	IGFBP7
3,30	BIRC3	5,71	SNAI1	3,72	CDH2
3,84	EPO	6,42	TNKS	4,10	SNAI2
3,90	CDH2	6,60	KDR	4,10	HSP90AB4P
4,18	FASLG	6,88	PINK1	4,13	STMN1
4,24	KDR	7,17	FGF2	4,55	EPO
4,26	STMN1	7,22	CASP2	4,58	TEK
4,35	SERPINF1	8,01	CCND3	4,64	GSC
4,42	CFLAR	8,24	CFLAR	4,98	CASP2
4,51	PGF	10,36	ETS2	5,01	VEGFC
4,83	SCL2A1	15,81	TRAP1	5,30	IGFBP5
5,11	IGFBP5	17,54	DDIT3	5,80	PGF
5,75	HSP90AB4P	19,33	HMOX1	5,80	ETS2
5,79	GSC	53,17	TP53	7,34	IGFBP3
6,69	ETS2	77,84	LPL	8,60	CA9
7,03	SNAI3	99,91	TNKS2	9,75	PPP1R15A
7,37	PPP1R15A			10,16	TP53
7,96	FOXK2			11,35	FOXK2
9,27	SNAI2			12,17	TERF1
10,29	TEK			29,96	NOL3
17,54	NOL3			38,19	SNAI1



Şekil 4.18: SMY370 tarafından etkilenen yolların genel görünümü (Reactome)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda HCT116 hücre hattında test edilen iki klinik ilaç ve ilaç adayı molekülün sitotoksiste testleri ve gen zenginleştirme analizleri değerlendirildiğinde SMY370'in 5-FU ve Bevacizumab gibi sitotoksik ve kanser yolakları üzerine etkileri mevcuttur. 5-FU ve bevacizumabın bilinen etkileriyle uyumlu olarak kanser yolakları üzerinde etkileri gözlemlendi. 5-FU'nun özellikle timidilat sentazın inhibisyonuyla ortaya çıkan DNA hasarının, apoptozu, düzenlemiş nekroz, nekroptoz gibi programlanmış hücre ölümü yolaklarını aktive ettiği ve ayrıca PI3K/AKT, MAPK, RAS yolaklarını, HIF-1 ve VEGF gibi hipoksi ilişkili yolakları da etkilediği görülmüştür. Bevacizumabın etkilediği yolaklar incelendiğinde VEGF blokajı ve MAPK1 ve RAP1 ekspresyonunun etkilendiği tespit edilmiştir. Deney konusu yeni ilaç adayı molekülümüz SMY370'in kanser yolakları üzerinde yaygın etkiler gösterdiği anlaşılmıştır. Bilhassa, PI3K-AKT, MAPK, HIF-1, programlı hücre ölümü, kaspaz aktivasyonu, nekroz, SMAC/DIABLO-XIAP aracılı apoptoz cevabı regülasyonu ve nekroptotik hücre ölümü üzerine etkili olduğuna dair bulgular elde edilmiştir.

Kolorektal kanserler dünya genelinde görülen kanser türleri içinde sıklık bakımından kadınlarda ikinci, erkeklerde ise üçüncü sırada yer almaktadır. Bu da ortalama yılda 600-750.000 vakaya karşılık gelmekte ve tüm kanserlerin %10'unu teşkil etmektedir. Olguların %55'inin gelişmiş ülke ve bölgelerde görülmesi yaşam tarzı ve beslenme ile ilişkili faktörlere işaret etmektedir. Bununla birlikte KRK'e bağlı ölümlerin %52'sinin gelişmekte olan ülkelerde görülmesi de dikkat çekicidir. Erken teşhis ve tedaviye ulaşılabilirlik bir çok kanserde olduğu gibi KRK'de de sağkalımı etkilemektedir. Türkiye'de son yıllarda beslenme alışkanlıklarında değişiklikler, fiziksel aktivite kısıtlılığı ve obezite eğilimi ile birlikte her iki cinste KRK insidansını arttığı gözlenmektedir(25).

Kolorektal karsinomda tedavi seçenekleri lokal ve sistemik olarak iki başlık altında toplanabilir. Lokal tedaviler cerrahi müdahale, ablasyon, embolizasyon ve radyoterapiyi içerir. Kemoterapi, hedeflenmiş tedaviler ve immunoterapi ise sistemik tedaviler arasında yer alır. Cerrahi tedaviler erken evre KRK'da ana tedavi modalitesidir. Tıkaçıcı lezyonlarda palyatif olarak da önemli yer tutmaktadır. Evre ve tümörün yerleşime göre polipektomi ve lokal eksizyondan geniş kolektomi ve

abdominoperineal rezeksiyon gibi daha radikal cerrahi prosedürlere kadar değişen bir yelpazede operasyonlar uygulanmaktadır(42).

Kemoterapiler neoadjuvan veya adjuvan olarak cerrahiye ek olarak yahut cerrahiden yarar görmeyecek olgularda tek başına yaygın biçimde uygulanmaktadır. KRK için en sık kullanılan kemoterapötik ilaçlar arasında 5- FU, Capecitabine, İrinotecan, Oxaliplatin, Trifluridine ve Tipiracil sayılabilir. Klasik kemoterapötikler işe yaramadığında yahut yan etkiler kullanımını engellediğinde hedeflenmiş tedaviler yeni alternatifler sunmaktadır. Bevacizumab, Ramucirumab, Ziv-aflibercept gibi VEGF inhibitörleri, Cetuximab ve Panitumumab EGFR inhibitörleri yanında BRAF inhibitörleri (Encorafenib) de kullanılmaktadır. KRAS mutasyonu EGFR inhibitörlerinin kullanımı için bir belirteç olarak kullanılmaktadır(13) BRAF inhibitörleri sadece mutant BRAF geni taşıyan tümörlerde etkilidir. Tüm KRK'de anormal BRAF genine %10'dan az rastlanmaktadır. Yine hedefli tedavilerden biri olan Regorafenib ise bir kinaz inhibitörü olarak bilinmektedir ve diğer tedavilere cevapsız ileri evre KRK'da kullanımını onaylanmıştır(42).

Hedeflenmiş tedaviler ve immunoterapilerle ilgili çalışmalar heyecan uyandırmışsa da çok sayıda araştırma ve yeni molekülün kliniğe translasyonu hem zaman almakta hem de prelinik çalışmaların vadettiği potansiyeli yansıtmamaktadır. Diğer kemoterapi ajanlarına benzer şekilde yan etkiler ve direnç gelişmesi gibi problemler klinik kullanımını kısıtlamaktadır. KRK'de erken tanı için tarama protokolleri, moleküler tip sınıflamaları, belirteç araştırmaları bir yandan bu hastalığı daha iyi tanıma ve tanımlama çabalarını sürdürürken tedavi için yeni alternatif arayışları da hız kesmemektedir.

Bu çalışmada yeni sentezlenmiş moleküller ile klinik kullanımını olan iki ilacın KRK hücre hattında etkilerini karşılaştırmak suretiyle inceledik. Moleküler mekanizmaları aydınlatmaya çalıştık.

Kanserle ilgili olarak 250'nin üstünde gen belirlenmiştir. Normal hücrelerin büyüme, çoğalma, farklılaşmasında rol alan birbiriyle ilişkili düzenleyici sistemler yolak olarak bilinmektedir. Kanser yolağı terimiyle kastedilen genetik veya epigenetik mutasyonlar neticesinde aktivasyon yahut inaktivasyon ile düzenlenen bir yolak kastedilmektedir(43). Çalışmamızda kanserle ilişkili bulunan 92 gen araştırılmıştır (Tablo 4.12)

5-FU ile HCT116 hücre hattında yaptığımız uygulamada ağırlıklı olarak PI3K-AKT, MAPK, apoptoz, HIF-1 ve RAS yolaklarını etkilediği, KEGG veritabanı ile yaptığımız gen zenginleştirme analizinde izlenmiştir (Şekil 4.8 ve Tablo 4.15). PI3K-AKT hücre büyümesi, çoğalması, hayatta kalması ve metabolizması gibi birçok biyolojik süreci düzenleyen kritik bir sinyal yoludur. Aktif PI3K-AKT sinyal yolunun hücrelerde hayatta kalma sinyallerini aktive ettiği bilinmektedir. Bu yolun etkilenmesi hücrelerin ölümüne yol açabilir veya apoptozisi artırabilir. Yine PI3K-AKT sinyal yolunun aktivasyonu, hücrelerin metabolik faaliyetlerini düzenler. Özellikle, hücrelerin enerji üretimi ve glukoz alımı gibi metabolik süreçlerde rol oynar. PI3K-AKT sinyal yolunun aşırı aktivasyonu, kanser gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, PI3K-AKT sinyal yolunu inhibe eden ilaçlar, kanser tedavisinde önemli bir rol oynaması beklenir(3).

MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) yolu hücrelerin dış uyarıcılara (örneğin büyüme faktörleri, stres, hormonlar) tepki vermesini ve çeşitli hücresel yanıtları düzenlemesini sağlar. Normal hücrelerde büyüme faktörlerinin stimüle ettiği reseptör tirozin kinazlar (RTK lar) tarafından uyarılan sinyalleri nukleusa ileterek gen ifadesinin artışına yol açarlar. Tümör hücrelerinde, RTK'ların yahut RAS'ın aktivasyonu sonucu MAPK sinyalleşmesinin arttığı bilinmektedir. MAPK yolağı klasik mitojenik kaskad veya standart yolak olarak da bilinmektedir. Sonuç olarak, MAPK yolu, hücre büyümesi, çoğalması, hayatta kalması, farklılaşması ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreci kontrol eder(3,43).

HIF-1, oksijen düzeyinin düşük olduğu koşullarda hücrelerde gen ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1, hücrelerin oksijen seviyelerindeki değişikliklere uyum sağlamasını sağlar ve bir dizi biyolojik cevabı düzenler. HIF-1'in transkripsiyonel aktivitesinin inhibe edilmesi, genellikle HIF-1'in DNA'ya bağlanma yeteneğini veya diğer transkripsiyonel koaktivatlarla etkileşimini engelleyerek gerçekleşir. Kanser tedavisinde, HIF-1 inhibisyonu, tümör hücrelerinin oksijen ve besinlere olan arzını azaltarak tümör büyümesini ve metastazı önleyebilir(44).

RAS sinyal yolunun aşırı aktivasyonu, kanser gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. RAS'ı etkileyen bir ilaç, RAS proteininin aktivitesini doğrudan inhibe edebilir. RAS proteininin GTP'ye bağlanma yeteneğini engelleyerek veya RAS-GTP

kompleksinin sinyal iletimindeki diğer adımları bloke ederek bu etki gerçekleşebilir(43).

Reactome analizinde 5-FU ağırlıklı olarak nekroz düzenlenmesi, sinyal iletimi, VEGF yolağı, nekroptotik hücre ölümü, RIPK-1 aracılı nekroz ve programlı hücre ölümünü etkilemiştir(Şekil 4.7 ve Tablo 4.14).

5-FU'nun nekroz düzenlemesi üzerindeki etkileri, genellikle apoptoz mekanizmasıyla ilişkilidir. 5-FU, kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek etki gösterir. 5-FU, tümör içi vasküler yapının bozulmasına ve hipoksiye yol açabilir. Hipoksi, nekrozun ortaya çıkmasını teşvik edebilir. 5-FU'nun hücrelerdeki sinyal iletimi üzerindeki etkileri, özellikle DNA ve RNA sentezi, hücre döngüsü kontrolü ve apoptoz gibi temel biyolojik süreçleri hedefler(44).

5-Fluorouracil (5-FU), RIPK1 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1) aracılı nekroz (necroptosis) sürecini etkiliyor görünmektedir. RIPK1, hücre ölümü sinyal iletiminde önemli bir rol oynar ve nekroptoz gibi hücre ölüm mekanizmalarının düzenlenmesinde kilit bir konuma sahiptir. 5-FU tedavisi sırasında, hücrelerde apoptoz ve nekroz arasındaki denge değişebilir. 5-FU'nun neden olduğu hücre stres, bu dengeyi bozabilir ve RIPK1 aracılı nekrozu artırabilir. 5-FU tedavisi sırasında, hücrelerde oksidatif stresin arttığı gözlemlenmiştir. Oksidatif stres, hücre ölümü sinyal iletimini etkileyebilir ve nekroptozun artmasına neden olabilir. 5-FU'nun inflamasyonu artırıcı etkisi, sitokinlerin (örneğin, TNF- α) salınımını artırabilir. Bu sitokinler, nekroptozu tetikleyen sinyal yollarını aktive edebilir ve RIPK1 aracılı nekrozu teşvik edebilir(3).

5-Fluorouracil (5-FU), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) yolunu dolaylı olarak etkileyebilir. VEGF, yeni kan damarlarının oluşumunu (anjiyogenez) teşvik eden bir protein olup, kanser büyümesi ve metastazı için önemli bir rol oynar. 5-FU'nun anti-tümör etkisi, tümör dokusundaki oksijen seviyelerindeki değişiklikler aracılığıyla, tümör hücrelerinin VEGF üretimini ve salınımını etkileyebilir. (45).

Bevacizumab, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) aktivitesini inhibe eden bir monoklonal antikör ilacıdır. KEGG analizinde MAPK ve RAS üzerine de etkili olduğu görülmektedir(Şekil 4.12 ve Tablo 4.19). Bevacizumab'ın MAPK yollarını etkileme mekanizması dolaylıdır ve genellikle VEGF'nin hücrelerdeki etkilerini inhibe ederek gerçekleşir. Bevacizumab, VEGF'ye karşı spesifik bir şekilde

bağlanarak, VEGF'nin hücrelerdeki reseptörlerine bağlanmasını engeller. VEGF'nin normalde hücrelerdeki reseptörlerine bağlanması, MAPK yollarını aktive eden sinyallerin oluşmasına neden olabilir. RAP1 (Ras-related protein 1), hücre içinde sinyal iletiminde önemli bir rol oynayan bir küçük GTPaz proteindir. RAP1, hücre proliferasyonu, hücre yapışması, hücre şekil değişikliği ve hücre sinyal iletimi gibi birçok biyolojik süreçte yer alır. Bevacizumab'ın RAP1 üzerinde de dolaylı etkileri olabileceği düşünülebilir. VEGF'nin normalde hücrelerde RAP1'ı aktive ettiği bilinmektedir. Bevacizumab'ın VEGF'yi inhibe etmesi, dolaylı olarak RAP1 üzerindeki aktiviteyi azaltabilir.

SMY370'in KEGG analizi 5-FU'ya benzer şekilde daha ziyade kanser yolağı, PI3K-AKT, MAPK, apoptoz, HIF-1 üzerine etkili olduğunu göstermiştir (Şekil 4.10 ve Tablo 4.17). Reactome analizi programlı hücre ölümü, kaspaz aktivasyonu, nekroz, SMAC/DIABLO-XIAP aracılı apoptoz cevabı regülasyonu ve nekroptotik hücre ölümünü etkilediğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.9 ve Tablo 4.16). Kaspazlar, hücre ölümü sinyal yollarının çeşitli aşamalarında aktivasyonu tetikleyen proteaz enzimlerdir. Genellikle, hücre ölümü sinyal yolları başlatıldığında, belirli bir durumu tanıyan ve bu duruma göre tepki veren proteinler (örneğin, sitokinler, DNA hasarı algılayıcıları) aktivasyon sinyalleri gönderir. Bu sinyaller, kaspazların aktivasyonunu başlatır.

SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) veya DIABLO (Direct Inhibitor of Apoptosis Protein Binding protein with Low pI), hücre içinde apoptoz sürecini düzenleyen proteinlerdir. XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein), apoptozu inhibe eden bir protein grubudur. SMY370'in apoptoz sinyal yollarını modüle ettiğini ve hücre ölümünü düzenlediğini düşündürmektedir. İlacın bu etkisi, apoptoz sinyal yollarında XIAP'nin inhibisyonunu azaltarak veya engelleyerek veya SMAC/DIABLO ile XIAP arasındaki etkileşimi artırarak gerçekleşebilir. Bu tür bir etki, özellikle kanser tedavisinde terapötik bir etki olabilir. Çünkü kanser hücreleri, apoptozu inhibe ederek normalden daha uzun süreler hayatta kalabilirler. Bu nedenle, SMAC/DIABLO ve XIAP üzerine etki eden ilaçlar, kanser hücrelerinin ölümünü tetikleyerek kanser tedavisinde potansiyel bir strateji olabilir(46).

RT-PCR analizlerini incelediğimizde 5-FU, Bevacizumab ve SMY370 uygulanan hücrelerde anlamlı değişiklik gözlenen genlerin başlıcaları Tablo 4.13’de gösterilmiştir. Bu genlerin değişimleri üzerinden her üç ilacın etkilerini inceleyebiliriz.

TEK, bir tür vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörüdür. Vasküler endotelial büyüme faktörleri, hücre büyümesi, çoğalması ve kan damarlarının oluşumu gibi süreçlerde rol oynar. Anjiogenez dışında HIF1, PI3K-AKT, RAF1, RAS yollarında da etkilidir. ETS2, bir transkripsiyon faktörüdür ve hücre proliferasyonu, doku yenilenmesi ve kanser gelişimi gibi süreçlerde rol oynar. Bir onkojen olarak RAS yolağında rol oynar. IGFBP5, “insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 5” olarak bilinir. Genellikle hücre büyümesini inhibe eder. Bu protein, senescence ile ilişkilendirilmiştir. 5-FU'nun uygulanmasıyla TEK, IGFBP5, ETS2 gibi genlerin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Bu genler, hücre büyümesi ve proliferasyonu etkileyen faktörlerdir. Artan ekspresyonları, 5-FU'nun hücre büyümesini ve proliferasyonunu inhibe ederek “senescence”e yönlendirmeye yönelik bir mekanizma olabilir.

PPP1R15A, “protein fosfataz 1 regülatör subunit 15A” olarak da bilinir ve endoplazmik retikulum stres yanıtında ve DNA hasarı onarımında rol oynar. PPP1R15A gibi genlerin artan ekspresyonu, endoplazmik retikulum stres yanıtı süreçlerinin aktive olduğunu gösterebilir. Bu, 5-FU'nun hücrelerdeki stres yanıtlarını etkileyerek hücre ölümünü tetikleyebileceği anlamına gelebilir.

FOXC2, bir transkripsiyon faktörüdür ve hücre farklılaşması, doku gelişimi, EMT (epitelyal-mezenkimal geçiş) ve kanser metastazı gibi süreçlerde rol oynar. SNAI2 ve SNAI3 de EMT sürecinde rol oynayan transkripsiyon faktörleridir.

GSC, genellikle homeotik genlerin regülatörlerinden biridir ve hücre farklılaşması, embriyonik gelişimde ve EMT’te rol oynar. FOXC2, GSC, SNAI2 ve SNAI3 gibi genlerin artan ekspresyonu, epitelyal-mezenkimal geçiş EMT sürecinde kanser hücrelerinin metastatik özelliklerini arttırabilir. Bu genlerin artışı, kanser progresyonu ve tedavi dirençliliği gibi klinik durumlarla da ilişkilendirilebilir.

COX5A, mitokondriyal sitokrom c oksidaz kompleksi'nin bir alt birimi olan COX5A proteinini kodlayan bir gen olarak bilinir ve hücre solunumunda rol oynar. Diğer genlerden farklı olarak on bin kat gibi dikkat çekecek bir ekspresyon artışı söz

konusudur. COX5A'nın ekspresyonundaki bu büyük artış, 5-FU'nun hücrelerde oluşturduğu stres yanıtının bir sonucu olabilir. Bu, hücrelerin 5-FU'ya karşı bir savunma mekanizması veya yanıtını da ifade edebilir. COX5A geninin ekspresyonundaki bu büyük artışın nedenlerini daha iyi anlamak için detaylı deneysel çalışmalar ve biyoinformatik analizler gerekebilir.

NOL3 ve SNAI2 gibi genlerin ekspresyonunda artış, apoptozun etkilenmesiyle ilişkilendirilebilir. NOL3, apoptoz sinyal yollarını düzenleyen bir protein olarak bilinirken, SNAI2 apoptozun inhibitörlerinden biri olarak tanımlanmıştır. Hem NOL3 hem de SNAI2'nin artan ekspresyonu, hücrelerin apoptoza karşı direnç geliştirmesine katkıda bulunabilir. Bu, hücrelerin stres koşullarına ve tedaviye karşı daha dirençli hale gelmesini sağlar.

Artan SNAI2 ekspresyonu, hücre hareketliliğini ve invazyon kapasitesini artırırken, NOL3, hücrelerin hayatta kalmasını sağlayarak bu süreçleri destekleyebilir.

Bevacizumab, HCT116 hücre hattında ANGPT1, FLT1, VEGFC, SERPINB2, SOX10, GSC ve UQCRFS1 genlerinin ekspresyonunu azaltmıştır. Bu genlerin birçoğu, tümör büyümesi ve metastazıyla ilişkilidir. ANGPT1 ve VEGFC, tümörlerin vasküler gelişimini ve kan damarlarının oluşumunu teşvik eder. Bevacizumab, VEGF'nin inhibisyonuyla bu genlerin ekspresyonunu azaltarak tümörlerin beslenmesini engelleyebilir. FLT1, VEGF reseptörüdür ve tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyonunu teşvik edebilir. Bevacizumab, VEGF'nin etkilerini azaltarak FLT1'in aktivitesini inhibe ederek tümör büyümesini engelleyebilir. SERPINB2 “senescence” ve invazyon ile ilgili olduğu bilinen bir gen dir. Tümör metastazı ve invazyonunda rol oynayabilir. Bevacizumab, SERPINB2'nin aktivitesini inhibe ederek tümörlerin invazyon yeteneklerini azaltabilir. SOX10, GSC ve UQCRFS1 gibi diğer genler de tümör büyümesi, metastaz ve invazyonunda rol oynayarak etkili olan genlerdir. Bevacizumab'ın bu genlerin ekspresyonunu azaltması, tümör büyümesini, metastazı ve invazyonunu azaltmaya çalıştığını gösterebilir.

Bevacizumab, HCT116 hücre hattında FGF2, ETS2, DDIT3, HMOX1, COX5A, TNKS2, TP53, TRAP1 gibi bazı genlerin ekspresyonunu artırmış gibi görünmektedir. FGF2, ETS2 gibi genlerin bazılarının tümör ilerlemesiyle ilişkilendirilmesiyle çelişir. Bu durum VEGF etkisine karşı hücrelerin başka büyüme faktörlerini veya sinyal yollarını artırarak tepki vermesine bağlanabilir. Yani, FGF2,

ETS2 ve diğerk artan gen ekspresyonu, bu kompanzasyon mekanizmasının bir parçası olabilir. Hücre hattına özgü bir durum veya deneysel hatayı da dışlamak gerekir.

Test ettiğimiz yeni ilaç adayı bileşdiğimiz SMY370'in gen analizine baktığımızda dikkate değer belli başlı değişiklikler şunlardır: HCT116 hücre hattında GUSB2 gen ekspresyonunu azaltmıştır.

GUSB2 (Glucuronidase Beta 2), glukuronidaz enziminin kodladığı bir gen dir. Glukuronidaz enzimi, glukuronidasyon adı verilen bir metabolik süreçte rol oynar. Glukuronidasyon, vücutta çeşitli metabolik atıkların glukuronik asit ile birleştirilmesini içeren bir süreçtir. Bu süreç, toksik veya fazla miktarda olan maddelerin vücuttan uzaklaştırılmasında ve su bazlı metabolitlerin oluşturulmasında önemli bir rol oynar. GUSB2 geni, glukuronidaz enziminin üretimini kodlar ve dolayısıyla glukuronidasyon sürecinin düzgün çalışması için gereklidir. Glukuronidaz enzimi, glukuronidasyonun son aşamasında glukuronid grubunu hidrolize ederek bağlı maddenin serbest hale gelmesini sağlar. Bu şekilde, glukuronidaz enzimi, vücuttaki atık maddelerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Bu genin ekspresyonunun azalması tümör hücrelerinin toksik atıklardan kurtulmasını güçleştirerek hücre ölümünü tetikleyebilir. Tümör hücreleri, normal hücrelere kıyasla daha hızlı bir şekilde büyüebilir ve daha fazla metabolik atık üretebilirler. Bu nedenle, tümör hücreleri için toksik atıklardan kurtulma mekanizmaları önemlidir. Eğer GUSB2 geninin ekspresyonu azalırsa, tümör hücreleri atıklardan kurtulma yeteneklerini kaybedebilir veya azalabilir. Bu durumda, hücrelerde toksik atıklar birikebilir ve hücre stresine neden olabilir. Hücre stresi, apoptozis gibi hücre sel ölüm mekanizmalarını tetikleyebilir.

Deneyimizde SMY370'in ekspresyonunu belirgin arttırdığı genlere baktığımızda TP53 dışındaki NOL3, PPP1R15A, FOXC2, SNAI2, CA9, COX5A, TERT gibi genlerin tümör büyümesini ve invazyon, metastazını destekleyen fonksiyonlara sahip olması dikkat çekicidir. Bu ilacın gözlemlediğimiz sitotoksik etkisi ve kanser yolakları üzerine etkisinin kompleks sinyalizasyon ağı içinde kompensatuar tepkileri de doğurduğunu akla getirmektedir.

TP53 "genomun muhafızı" olarak adlandırılmayı hakedecek önemde bir tümör supressordür. SMY370'in TP53 ifadesini arttırması bu bakımdan kayda değerdir. TP53, DNA hasarına cevap verir, hücre döngüsünü düzenler ve apoptozu tetikler.

TP53'ün ekspresyonundaki bir artış, SMY370'in hücre ölümü ve tümör baskılanması yoluyla antitümör etkileri olabileceğini göstermektedir(47). Son zamanlarda TP53'ün hücre proliferasyonunu hücre siklusunu durdurarak inhibe etmesi, apoptozu indüklemesi gibi bilinen etkileri dışında hücre gelişmesini engelleyecek metabolik etkiler oluşturduğuna dair bulgular saptanmıştır. Gerek karbonhidrat, nükleotit ve amino asit metabolizmaları, gerekse protein sentezi ve aerobik solunum yolları etkisi altındadır(48).

NOL3, apoptozu inhibe eden ve hücre hayatta kalmasına katkıda bulunan bir gen olarak işlev görür. Bu genin ekspresyonunun artması, hücrenin hayatta kalmak için alternatif yolları harekete geçirmesine bağlı olabilir. PPP1R15A (GADD34), hücre stresi ve DNA hasarı yanıtında rol oynar. Ekspresyonundaki artış, SMY370'in endoplazmik retikulum stresi veya DNA hasarı yoluyla sitotoksik etki gösterebileceğini düşündürmektedir(49). FOXC2 ve SNAI2, hücre farklılaşması, göçü ve invazyonu ile ilişkili transkripsiyon faktörleridir. Bu genlerin artan ekspresyonu, SMY370'in metastatik süreçleri etkileyebileceğini ve kanser hücrelerinin çevre dokulara göç etme yeteneğini değiştirebileceğini gösterebilir(50). CA9 (Karbonik Anhidraz IX), tümör hipoksisine ve pH düzenlenmesine katkıda bulunur. Ekspresyonundaki artış, SMY370'in hücrelerin asit-baz dengesini etkileyerek tümör mikroçevresini değiştirebileceğini gösterebilir(51). COX5A (Sitokrom c oksidaz altbirimi 5A), mitokondriyal solunumda rol alır ve enerji üretimi ile ilişkilidir. Ekspresyonundaki aşırı artış, SMY370'in mitokondriyal işlev üzerinde dramatik etkilere yol açabileceğine işaret edebilir, hücrelerde oluşturduğu stres yanıtının bir sonucu olabilir ve/veya hücrelerin SMY370'e karşı özel bir yanıtını veya adaptasyonunu yansıtır olabilir(52,53). TERF1 (Telomeric Repeat Binding Factor 1), telomerlerin korunması ve uzunluğunun düzenlenmesinde görev alır. Bu genin ekspresyonundaki artış, hücrelerin hayatta kalmak için bir kaçış yolu oluşturma çabasına işaret edebilir.

Tümör hücreleri ile etrafındaki stroma, endotelial hücreler ve immün hücreler arasındaki girift ilişkiler, tümör mikroçevresi olarak adlandırılan bu habitatı kendi lehine kullanması sonucunda tümörün proliferasyonu, immün kaçınma, invazyon ve metastaz hatta kemorezistansa hizmet etmektedir. Bu pro-tümörojenik etkiler sitokinler ve büyüme faktörleri marifetiyle gerçekleşmektedir(3)

Son derece karmaşık hücre sinyal devrelerinin birbirleriyle ilişkileri aydınlatılmaya devam ettikçe neden bir sinyal yolu yahut bir gen aktive ya da inhibe edildiğinde kendisinden doğrudan beklenen etkinin ortaya çıkmadığını anlamamız kolaylaşacaktır. Sözgelimi mTOR farmakolojik olarak inhibe edildiğinde bununla ilişkili negatif feed back ortadan kalkınca PI3K ve onun efektörü Akt/PKB aktivitesi artmakta olduğu görülmüştür. Bu da mTOR inhibisyonunun antiproliferatif etkilerini baskılamaktadır. Bu ve benzeri mekanizmalar mitojenik sinyalleri hedef alan ilaçlara adaptif direnç gelişmesine neden olmaktadır(16).

Onkojenlerin etki mekanizmalarına dair ilk çalışmalar bu tür genlerin artan ifadesinin kanser hücresi proliferasyonunu arttıracaklarını öngörüyordu. Ancak artan bilgiler ışığında bunun her zaman böyle olmadığı anlaşıldı. Örneğin RAS, MYC, RAF gibi onkoproteinlerin artmış sinyalleri karşıt hücrel tepkileri indüklemektedir. Aşırı onkojen aktivasyonuna bağlı senescence veya apoptoz tetiklenmektedir. İlk bakışta paradoksal olan bu cevaplar aşırı sinyalizasyona karşı hücreyi koruyacak savunma mekanizmaları olarak hücrel tasarımın bir parçası olabilir. Tümörögenizde onkojenik sinyallerin mitojenik etkisi ile antiproliferatif savunma mekanizmaları olarak senescence ve apoptoz yollarından hangini seçeceğini nasıl belirlendiği ise gizemini korumaktadır(16).

mRNA düzeylerindeki değişimler çoğunlukla mikroarray analizi ve revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemleriyle değerlendirilmektedir. Gen ekspresyonları Western blot olarak bilinen teknikle protein translasyonu üzerinden de değerlendirilebilir. Çalışmamızda ilaç adayları molekülümüzün hücre hattındaki etkilerinin daha ziyade aydınlatılması için proteomik profilin çalışılması gerekir.

SMY370'in etkilediği yollara baktığımızda programlı hücre ölümü, kaspaz aktivasyonu, düzenlenmiş nekroz, nekroptoz, VEGF, hipoksi, hücrel strese cevap ve "senescence" ilişkili yollar ön plana çıkmaktadır (Tablo 4.16 ve 4.17). Apoptozu tetikleyen hücrel streslerin başında onkojenler ve hiperproliferasyonla ilişkili DNA hasarı gelmektedir.

Apoptozda iki ana yol vardır: 1. İntrinsik yolak: İntrasellüler hasar, gelişimsel durumlar, eksternal uyarılar gibi çeşitli hücrel stresler tarafından indüklenir, Bcl-2 tarafından inhibe edilebilir. 2. Ekstrinsik yolak: Ölüm reseptörleri (FAS/CD95,

TNFR1, TRAIL) tarafından başlatılır, kaspaz 8/10bağımlıdır. İnfeksiyon, immün cevap, dendritic hücre aktivasyonu, T, B, NK hücrelerinin uyarıları, viral enfeksiyonlarda sitotoksik cevap ya da onkojenik transformasyon sırasında salınan FASL, TNF, LT- α , LT- β , CD40L, LIGHT, RANKL, BLYS/BAFF, APO2L/TRAIL gibi ligandlar kaspaz 8/10 aktivasyonu ile bu yolağı çalıştırır. Stresle indüklenen intrinsik yolak APAF-1 ve sitokrom c aracılığıyla kaspaz 9 aktivasyonu ile uyarılır. Mitokondrial membranın yırtılması, Bcl-2 ailesi proteinlerinin sitoplazmaya salınmasını sağlar. Bu yolağı uyaran hasar sinyallerine örnek olarak, lenfosit otoreaktivitesi, sitokin yoksunluğu, kalsiyum akımı, sitotoksik ilaçların yaptığı hücresel hasar, glukoz gibi besin maddelerinin azalması, büyüme faktörlerinin azalması, anoikis, TP53 gibi tümör supresörlerin aktivasyonu verilebilir. Pek çok non-immün hücrede ekstrinsik yolağı başlatan ölüm sinyalleri, intrinsik yolak tarafından güçlendirilebilir(54). Bizim çalışmamızda bu yolakta XIAP, FASLG, CFLAR, APAF1, DSP, CASP9, TP53, BCL2L11, OCLN, CASP7 değişimlerini gözledik. Apoptozun regülasyonu hücrenin sağkalım ya da apoptoz arasındaki yol ayrımında doku homeostazisi için vazgeçilmezdir. Bu düzenlemede protein ubiquitinasyonu ve degradasyonu önemli rol oynamaktadır(55). BH3-only üyeleri(BID,BAD, NOXA, PUMA,BIM, ve BMF) gelişimsel süreçler ve DNA hasarı gibi kimi durumlarda seçici olarak apoptozu tetikleyen gözcüler gibi hareket ederler. Bunu yaparken sağkalımı destekleyen benzerlerini bağlayıp nötralize ettikleri sanılmaktadır. BH3-only proteinlerinin aktivasyonu doğrudan veya dolaylı biçimde pro-apoptotik BAX ve BAK aktivasyonuna ve hücre ölümüne neden olur(56). BAX aktivasyonu, oligomerizasyonu dış mitokondriyal membrana entegre olması ve sitokrom c salınımını uyarması ile sonuçlanır. BAX mitokondriyal membrana sokulmasını Bid ile bağlanması tetikleyebilir(57). Apoptotik sinyallere cevap olarak sitozole salınan mitokondriyal proteinler kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız yolla hücre ölümünü uyarabilir. Sitokrom c apoptozom oluşumunu sağlar, AIF ve endonükleaz G kaspaz bağımsız apoptotik nükleer DNA hasarına neden olur. Smac/DIABLO, HtrA2/OMI her iki yolağı da kullanarak hücreyi apoptoza sürükler(58).

Kerr, 1972'de apoptozu ilk tanımladığından beri programlanmış hücre ölümü denince aklımıza sadece apoptoz gelmekteydi. Yeni bulgular ışığında apoptoz dışında da düzenlenmiş ölüm yolları olduğu bilinmektedir. Morfolojik olarak nekroz tanımına uyan fakat programlanmış bir hücre ölümü sayılan düzenlenmiş nekroz gibi, RIP1

aracılı düzenlenmiş nekroz veya piropitoz gibi... Burada moleküler karar noktası ekstrensek yolakta kaspaz-8 kavşağında bulunmaktadır. Kaspaz-8 aktivasyonu hücreyi apoptoza yönlendirirken, kaspaz-8 inhibisyonu düzenlenmiş nekroza teşvik eder(59). Bizim deneyimizde bu yollarda görevli XIAP, FASLG, CDC37, DSP, TP53, BCL2L11, OCLN, BIRC3, CFLAR, APAF1, CASP9, CASP7 genlerinin SMY370 tarafından etkilendiği bulundu. Nekrozun pasif programlanmamış bir hücre ölümünden ibaret olmadığı anlaşıldıktan sonra her biri belirli patofizyolojik şartlarda devreye giren birçok düzenlenmiş nekroz tipi ortaya çıkarıldı (parthanatos, necroptosis, glutamat tarafından uyarılan oxytosis, ferroptosis, inflamazom aracılı nekroz vb). Membran geçirgenliğine yol açan bu farklı mekanizmalar, herbirinin özgün immünolojik ve inflamatuvar sonuçlarına yol açar. Her şekilde hücrenin lizisi ve sitoplazmik içeriğin salınması yoğun bir enflamasyon ve doku hasarı oluşturabilir(44).

Hücreler, metabolik veya sinyal süreçlerini bozan yabancı moleküller ve sıcaklık veya pH değişiklikleri gibi dış moleküler ve fiziksel streslere maruz kalır. Hücreler ayrıca reaktif metabolik yan ürünlerin üretimi gibi iç moleküler streslere de maruz kalır. Hücrelerin ve dokuların bu tür streslere yanıt olarak moleküler süreçleri modüle etme yeteneği, doku homeostazisinin korunması için esastır(60). Burada açıklanan spesifik stresle ilgili süreçler hipoksiye hücrel yanıt, ısı stresine hücrel yanıt, hücrel yaşlanma, ligand varlığında steroid hormon reseptörleri (SHR) için HSP90 şaperon döngüsü, EIF2AK1'in (HRI) heme eksikliğine yanıtı, heme sinyali, kimyasal strese hücrel yanıt, açlığa hücrel yanıt ve katlanmamış protein yanıtıdır. Deneyimizde etkilenen genlere baktığımızda hücrel strese cevapta rol oynayan ARNT, CA9, MAP2K3, IGF1BP7, CCL2, SKP2, TNF2, BMI1, TERF1 COX5A, SOD1, PPP1R15A, TP53, DDIT3, EPO, HMOX1, ETS2, CDK4, TERF2IP, MAPK14, HSPB1 genlerinin değişimi gözlenmiştir.

Hipoksiye hücrel cevapta önemli rol oynayan HIF ile ilgili yollara da bakmakta yarar var. Oksijen varlığında HIF- α transkripsiyon faktör ailesi üyeleri (HIF1A, HIF2A, HIF3A) hidrosile formdadır. Hipoksi bu hidrosilasyonu inhibe ederek, HIF- α 'yı stabilize eder. HIF- α nükleusa girer ve HIF- β 'ya bağlanır(61). Sonunda EPO ve VEGF gibi hedef genler aktive olur. SMY370 bu yolla ilişkili ARNT, CA9, EPO ifadesini arttırmaktadır. HIF1AN, HIF1A ve HIF2A üzerindeki bir asparajin kalıntısını hidrosile eden bir homodimer oluşturur. Hidrosilasyonu

asparajinin, HIF1A/HIF2A ile bir histon asetilaz olan p300 arasındaki etkileşime müdahale eder ve bu nedenle HIF1A/2A'nın hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etme yeteneğini inhibe eder. Çünkü moleküler oksijen reaksiyonun bir substratıdır, hipoksi ise bu reaksiyonun negatif düzenleyicisidir ve dolayısıyla hedef genlerin HIF1A/2A tarafından transkripsiyonel aktivasyonunu artırır(62).

RIPK1 ve RIPK3 bağımlı nekroz nekroptoz veya programlanmış nekroz olarak da bilinir. Nekroptozu başlatan sinyaller, apoptozun ekstremsel sinyal yolunu da aktive eden TNF-alfa, FASL, TRAIL, TLR3 ve 4 gibi ölüm ligandlarıdır. Apoptozun aksine nekroptoz kaspazların inhibisyonuyla çalışır. Kaspaz aktivite belirli patofizyolojik şartlar yahut farmakolojik ajanlarla inhibe olduğunda deubiquine edilmiş RIPK1, RIPK3 ile birlikte nekrozom oluşumunu sağlar(44). SMY370 etkisiyle bu yolakla ilişkili bulunan XIAP, FASLG, CFLAR, CDC37 ve BIRC3 etkilenmiş olduğu gözlenmiştir.

VEGF, gerek embriyogenez dönemindeki vaskulogenezde, gerek yetişkinlerde anjiogenez süreçlerinde önemli rol oynayan bir büyüme faktörüdür. VEGF ve VEGF reseptör protein ailelerinin üyeleri farklı ancak örtüşen ligand reseptör özelliklerine, hücre tipi ekspresyonuna ve fonksiyona sahiptir. VEGF reseptör aktivasyonu, vücutta endotel hücre büyümesini, göçünü ve hayatta kalmasını teşvik eden bir sinyalleşme süreçleri ağını düzenler(63). Çalışmamızda reactome analizine göre bu yolakta bulunan VEGFC, KDR, HSPB1, FLT1, MAPK14 ve PGF SMY370 tarafından etkilenmektedir.

SMY370 tarafından etkilenen kanserle ilişkili transkripsiyon faktörlerinden biri de birçok apoptotik genin ifadesini FOXOuyan FOXO'dur. (FASLG, PINK1, BCL2L11, BCL6, BBC3 gibi) Bu genlerin FOXO tarafından uyarılmasının özellikle sinir gelişiminde önemli rol oynadığı ve dahası bir tümör supresör olarak hareket ettikleri bilinmektedir. FOXO1 transkripsiyonel aktivitesi, enterik sinir sistemi (ENS) öncüllerinin hücre ölümünde rol oynar. FOXO aracılı transkripsiyonun inhibisyonuna yol açan PI3K/AKT sinyalini aktive eden RET sinyali, ENS öncüllerinin hayatta kalmasını sağlar. Apoptoz gibi çeşitli hücreyel süreçleri düzenleyen Serin/treonin-protein kinaz STK11'i kodlayan STK11 (LKB1) geninin transkripsiyonu, FOXO3 ve FOXO4 tarafından doğrudan uyarılır(64).

Hücresel senescence onkojen aktivasyonu veya tümör supresör genlerin inaktivasyonu ile tetiklenebilir. Buna onkojenlerin indüklediği “senescence” de denir. RAS sinyalleriyle tetiklenen senescence buna örnek verilebilir. Oksidatif stres ve bunun yol açtığı ROS’a bağlı DNA hasarı, ayrıca telomer kısalmasına bağlı replikatif tükenme hücreyi senescence durumuna sokabilir. “Senescence” ilişkili salgı fenotipini (SASP) oluşturan salgılanan proteinler, aynı zamanda “senescence” mesajlaşma sekretomu (SMS) olarak da bilinir; inflamatuvar ve immün modülatör sitokinleri, büyüme faktörlerini, dökülen hücre yüzeyi moleküllerini ve hayatta kalma faktörlerini içerir(65). SMY370’in detaylı Reactome analizinde “senescence” ilişkili MAP2K3, IGFBP7, TP53, ETS2, CDK4, TERF2IP, TINF2, BMI1, TERF1, MAPK14 genlerinde değişim gözlenmiş olduğunu tespit ettik.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

SMY370'in KEGG ve Reactome analizleri, çeşitli kanser yolları ve ölüm mekanizmaları üzerinde etkili olduğu göz önünde bulundurulduğunda, kanser hücrelerinin gelişimini ve yayılmasını engelleyebilecek bir potansiyele sahip olduğunu söylemek makuldür.

İdeal olarak, bir ilacın düşük bir IC50 değerine ve yüksek bir selektivite indeksine sahip olması tercih edilir. Bu, ilacın düşük dozlarda bile etkili olabileceğini ve normal hücrelere göre kanser hücrelerine daha seçici olduğunu gösterir. G0/G1 fazının hücre döngüsünde etkilendiği ve geç apoptozun tetiklendiği gözlemleri, ilacın hücre proliferasyonunu durdurma ve programlı hücre ölümünü indükleyebilme kapasitesine işaret eder. İlaç adayının bundan sonraki aşamada deneysel validasyon çalışmaları yapılabilir.

Araştırmamız HCT116 KKK hücre hattı'nın ilaç adayımıza verdiği tepkileri yansıtmaktadır. Elbette tüm moleküler alt tipleri temsil etmemektedir. Hücre sitotoksitesisi, apoptoz gözlem çalışmaları yanında kanserle ilişkili 92 genin ekspresyon analizlerini de içermektedir. Gen ekspresyonlarının protein translasyonu üzerinde etkilerini yansıtacak analizler içermemektedir. Bunlar araştırmamızın kısıtlılıkları olarak ön plana çıkmaktadır.

Normal hücre hatları üzerindeki toksik etkilerini anlamak için daha geniş bir hücre paneli üzerinde güvenlik profili test edilmelidir. Bilhassa biyolojik etkilerin ve etkilenen sinyal yollarının detaylı analizi için Western Blot, ELISA, İmmunopresipitasyon yöntemleri ile çalışılabilir. Elbette moleküler mekanizmaları aydınlatmak için Omiks Teknolojileri de kullanılabilir. Transkriptomik ve Proteomik Analizler ilaç etkisi altındaki hücrelerin gen ve protein ekspresyon profillerini kapsamlı bir şekilde analiz eder. Bu analizler, ilacın geniş çapta biyolojik etkilerini ve etkilediği moleküler yolları belirlemeye yardımcı olur.

Çalışmamızın bundan sonraki araştırmalar için anlamlı bir katkı ve temel sağladığını umuyoruz.

KAYNAKLAR

1. Weng W, Feng J, Qin H, Ma Y. Molecular therapy of colorectal cancer : Progress and future. 2015;502:493–502.
2. Fabregas JC, Ramnarain B, George TJ. Clinical Updates for Colon Cancer Care in 2022. Clin Colorectal Cancer. 2022;21(3):198–203.
3. Stefani C, Miricescu D, Nica RI, Greabu M, Totan AR, Jinga M. Growth Factors , PI3K / AKT / mTOR and MAPK Signaling Pathways in Colorectal Cancer Pathogenesis : Where Are We Now ? 2021;
4. Sokmen S. Kolorektal Kanser Klinik Protokolu, T. C. Sa ğ l ı k Bakanl ı ğ ı Sa ğ l ı k Hizmetleri Genel M ü d ü r l ü ğ ü Sa ğ l ı k Teknolojisi De ğ erlendirme Dairesi Ba ŝ kanl ı ğ ı , Ankara. 2021.
5. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. CA Cancer J Clin [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Oct 24];71(1):7–33. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21654>
6. Kanser Taramaları [Internet]. 2021 [cited 2021 Jul 7]. Available from: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-taramalari>
7. Fichna J, editor. Introduction to Gastrointestinal Diseases Vol . 2. Vol. 2. Springer; 2017.
8. Stintzing S. Management of colorectal cancer. F1000Prime Rep. 2014;6(November).
9. Karthika C, Hari B, Rahman H, Akter R, Najda A, Albadrani GM, et al. Biomedicine & Pharmacotherapy Multiple strategies with the synergistic approach for addressing colorectal cancer. 2021;140(May).
10. Chen Y, Liu C, Zhu S, Liang X, Zhang Q, Luo X, et al. International Immunopharmacology PD-1 / PD-L1 immune checkpoint blockade-based combinational treatment : Immunotherapeutic amplification strategies against colorectal cancer. 2021;96(March).
11. Zhao X, Han Z, Ma J, Jiang S, Li X. A novel n-sulfonylamidine-based derivative inhibits proliferation, migration, and invasion in human colorectal cancer cells by suppressing wnt/ β -catenin signaling pathway. Pharmaceutics. 2021;13(5).
12. Erçolak V. Kolorektal Kanserlerde Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri. Klin Tıp Aile Hekim Derg. 2016;(1):11–5.
13. Canbay E, Buğra D. Colorectal cancer: Are genetic and molecular biology researches reflected enough in the patient management? Turkish J Surg. 2011;27(4):198–205.
14. Inamura K. Colorectal Cancers : An Update on Their. 2018;
15. Xu H, Liu L, Li W, Zou D, Yu J, Wang L, et al. Transcription factors in colorectal cancer: molecular mechanism and therapeutic implications. Oncogene [Internet]. 2021;40(9):1555–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-020-01587-3>
16. Hanahan D, Weinberg RA. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. Cell [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
17. Hanahan D. Hallmarks of Cancer : New Dimensions. 2022;(January):31–46.
18. Schmoll HJ, Cutsem E Van, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer . A personalized approach to clinical decision making. Ann Oncol [Internet]. 2012;23(10):2479–516. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mds236>
19. Amjad MT, Chidharla A KA. Cancer Chemotherapy [Internet]. StatPearls Publishing. 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/?report=classic>
20. Temel MK. The development of cytotoxic chemotherapeutics in the twentieth century. Turk Onkol Derg. 2015;30(2):96–108.
21. Xu H, Liu L, Wang L. Transcription factors in colorectal cancer : molecular mechanism and therapeutic implications. Oncogene [Internet]. 2021;1555–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-020-01587-3>
22. Fluorouracil, 5-FU - ClinicalKey [Internet]. [cited 2021 Jul 8]. Available from: https://0210s3mey-y-https-www-clinicalkey-com.sbu.proxy.deepknowledge.io/#!/content/drug_monograph/6-s2.0-258
23. Karthika C, Hari B, Rahman MH, Akter R, Najda A, Albadrani GM, et al. Multiple strategies with the synergistic approach for addressing colorectal cancer. Biomed Pharmacother. 2021;140(April).
24. Mollaei M, Hassan ZM, Khorshidi F, Langroudi L. Chemotherapeutic drugs: Cell death- and resistance-related signaling pathways. Are they really as smart as the tumor cells? Transl Oncol. 2021;14(5).

25. Prof Dr Yusuf Baran, editor. *Kanser Moleküler Biyolojisi*. Birinci ba. Ankara: Kısayol yayıncılık; 2018. 345-357, p.
26. Roh SA, Choi EY, Cho DH, Yoon YS, Kim TW, Kim YS, et al. Characterization of biological responses of colorectal cancer cells to anticancer regimens. *J Korean Surg Soc*. 2012;83(1):21–9.
27. Dakowicz D, Zajkowska M. Relationship between VEGF Family Members , Their Receptors and Cell Death in the Neoplastic Transformation of Colorectal Cancer. 2022;
28. Weng W, Feng J, Qin H, Ma Y. Molecular therapy of colorectal cancer: Progress and future directions. *Int J Cancer*. 2015;136(3):493–502.
29. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J Nat Prod* [Internet]. 2007 Mar 1;70(3):461–77. Available from: <https://doi.org/10.1021/np068054v>
30. İskit. AB. Bir İlaç Yaratmak... İyi Klin Uygulamalar Derg. 2006;(13):10–3.
31. Wilding JL, Bodmer WF. Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Res*. 2014;74(9):2377–84.
32. ÜNGÖREN, Ş. H., KOCA, İ., & Yılmaz F. Preparation of perinones via a novel multicomponent synthesis of isoindole scaffold. *Tetrahedron*. 2011;67(30):5409-5414.
33. Tkaczyk-Gobis, K., Tarasiuk, J., Seksek, O., Stefanska, B., Borowski, E., Garnier-Suillerot A. Transport of new non-cross-resistant antitumor compounds of the benzoperimidine family in multidrug resistant cells. *Eur J Pharmacol*. 2001;413:131-141.
34. Paragamian, V., Baker, M.B., Puma, B.M., Reale J. 'A study of the synthesis and some reactions of perimidines. *J Heterocycl Chem*. 1968;(5):591-597.
35. Rajarshi Nath, Shelly Pathania, Gourav Grover MJA. İsatın containing heterocycles for different biological activities: Analysis of structure activity relationship. *J Mol Struct*. 2020;1222:128900.
36. Varun, Sonam KR. Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications. *Medchemcomm*. 2019;10(3):351–68.
37. Ding Z, Zhou M ZC. Recent advances in isatin hybrids as potential anticancer agents. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2020;353(3):e1900367.
38. Fichtner M, Bozkurt E, Salvucci M, McCann C, McAllister KA, Halang L, et al. Molecular subtype-specific responses of colon cancer cells to the SMAC mimetic Birinapant. *Cell Death Dis* [Internet]. 2020;11(11). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-03232-z>
39. L929 [Internet]. Available from: <https://www.culturecollections.org.uk/nop/product/1929>
40. Pınar Erkekoğlu, Terken Baydar. Güncel In Vitro Sitotoksisite Testleri. *Hacettepe Univ J Fac Pharm*. 2021;41(1):45–63.
41. Gordon J, Brown M, Reynolds M. Cell-Based Methods for Determination of Efficacy for Candidate Therapeutics in the Clinical Management of Cancer. *Diseases*. 2018;6(4):85.
42. American Cancer Society, Surgery CC, Ablation RC, Cancer C, Therapy R, Systemic CC, et al. Treating Colorectal cancer. *Am Cancer Soc* [Internet]. 2020;1–52. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/by-stage-colon.html>
43. Pazarbaşı A, Kasap M, Kasap H. Kanser Yolakları. *Arşiv Kaynak Tarama Derg* [Internet]. 2011;20(4):187–229. Available from: <http://dergipark.ulakbim.gov.tr/arsiv/article/view/5000072612>
44. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H VP. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(2):135-147.
45. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-FLUOROURACIL : MECHANISMS OF ACTION AND CLINICAL STRATEGIES. 2003;3(May):330–8.
46. Martinez-ruiz G, Maldonado V, Ceballos-cancino G, Grajeda JPR, Melendez-zajgla J. Role of Smac / DIABLO in cancer progression. 2008;1:1–7.
47. De Angelis, P.M., Kravik, K.L., Tunheim SH et al. Comparison of gene expression in HCT116 treatment derivatives generated by two different 5-fluorouracil exposure protocols. *Mol Cancer*. 2004;3(11).
48. Hwang, PM., Kang, JG., Patino, WD., Gavrilova, O., Boehm, M., Bunz F et al. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* (80-). 2006;(312):1650-3.
49. Teresa Kosakowska-Cholody, W Cholody, Humcha Hariprakash CM and CM. Gene expression profiles in HCT116 and HT29 cells exposed to RTA 502 lead to insights into the mechanism of action. *Exp Mol Ther* [Internet]. 2007 [cited 2024 Apr 28];67(9). Available from: https://aacrjournals.org/cancerres/article/67/9_Supplement/4895/536959/Gene-expression-profiles-in-HCT116-and-HT29-cells
50. Agrawal P, Gopalan V, Hannenhalli S. Predicting gene expression changes upon epigenomic drug treatment. *bioRxiv* [Internet]. 2023 Jul 23 [cited 2024 Apr 28];2023.07.20.549955. Available from:

- <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.07.20.549955v1>
51. Adamiec-Organisciok M, Wegrzyn M, Cienciala L, Sojka D, Nackiewicz J, Skonieczna M. Compensative Resistance to Erastin-Induced Ferroptosis in GPX4 Knock-Out Mutants in HCT116 Cell Lines. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Apr 28];16(12):1710. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/16/12/1710/htm>
 52. Chen W, Kuo K, Chou T, Chen C, Wang C, Wei Y, et al. The role of cytochrome c oxidase subunit Va in non-small cell lung carcinoma cells : association with migration , invasion and prediction of distant metastasis. 2012;
 53. Zeng J, Li G, Xia Y et al. miR-204/COX5A axis contributes to invasion and chemotherapy resistance in estrogen receptor-positive breast cancers. *Cancer Lett.* 2020;(492):185-196.
 54. MacFarlane, M., Williams A. The two principal pathways of apoptosis are (1) the Bcl-2 inhibitable or intrinsic pathway induced by various forms of stress like intracellular damage, developmental cues, and external stimuli and (2) the caspase 8/10 dependent or extrinsic pathway initi. *EMBO Rep.* 2004;(5):674-8.
 55. Yu, X., Yang Y. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J.* 2003;(17):790-9.
 56. Adams, JM., Huang, DC., Cory S. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003;22:8590-607.
 57. Roucou, X., Martinou, JC., Antonsson, B., Montessuit S. Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem J.* 2002;368:915-21.
 58. van Loo, G., van Gurp, M., Vandenabeele, P., Saelens, X., Vande Walle, L., Festjens N. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 2004;23:2361-74.
 59. Szabadkai, G., Kepp, O., Nunez, G., Aaronson, SA., Bredesen, DE., Abrams J et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 2015;(22):58–73.
 60. Kültz D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol.* 2005;(67):225-257.
 61. Mazure, NM., Pouyssegur, J., Dayan F. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 2006;(441):437-43.
 62. Whitelaw, ML., Peet, DJ., Gorman, JJ., Lando, D., Whelan D. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* (80-). 2002;(295):858-61.
 63. Ellis, LM., Hicklin D. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 2005;(23):1011–27.
 64. Hu, W., Zhou, PH., Wang W. Overexpression of FOXO4 induces apoptosis of clear-cell renal carcinoma cells through downregulation of Bim. *Mol Med Rep.* 2016;(13):2229-34.
 65. Serrano, M., Blasco, MA., Collado M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell.* 2007;(130):223-33.

EK

Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 27.09.2021-64579



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı :E-46418926-050.01.04--64579
Konu : Araştırma Projesi Değerlendirme Raporu
(21/562)

27.09.2021

Sayın Prof. Dr. Mustafa TURAN

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunulan, 21/562 kayıt numaralı *"Kolorektal Karsinom için Yeni Nesil İlaç Adayı Moleküllerin Belirlenmesi, Klinik İlaçlar ile Sinerjetik Etkilerinin İncelenmesi"* başlıklı proje önerisi kurulumuzun 20.08.2021 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur. İlgili kurul kararı Ek'te sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN
Başkan

Ek:Kurul Kararı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmuştur.

Belge Doğrulama Kodu : *BSUB33FDTC* Pin Kodu : 61072
Adres: Mekteb-i Tıbbiye-i Şahane Kampüsü, Tıbbiye Cad. No:38 Selimiye
Telefon: 0216 346 36 38 Faks: 0216 346 36 40
Web: <http://sbu.edu.tr>
Kep Adresi: sbu@hs01.kep.tr

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys>

Bilgi için: Ronay COŞKUN
Unvanı: Araştırma Görevlisi



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmuştur.

Evrak Tarih ve Sayısı: 21.09.2021-4721



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Tarihi : 20.08.2021
Toplantı Sayısı : 2021/27
Karar Sayısı : 27/21

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunulan, Prof. Dr. Mustafa TURAN'ın sorumlu araştırmacı, Prof. Dr. Yusuf Tutar'ın yardımcı araştırmacı, Dr. Öğr. Üyesi Serap PAMAK BULUT'un başvuru sahibi araştırmacı olduğu, 21/562 kayıt numaralı "**Kolorektal Karsinom için Yeni Nesil İlaç Adayı Moleküllerin Belirlenmesi, Klinik ilaçlar ile Sinerjetik Etkilerinin İncelenmesi**" başlıklı proje önerisi kurulumuzun 20.08.2021 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur.

Ashı Gibidir
e-imzalıdır
Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN
Başkan

Prof. Dr. Günseli GÜVEN POLAT
Başkan Yardımcısı

Doç. Dr. Papatya KELEŞ
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Semra AÇIKSÖZ
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Şükran ÖZDATLI KURTULUŞ
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Gamze TEMİZ
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Selda RIZALAR
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Yasemin AYDIN KARTAL
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Eray Metin GÜLER
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Merve KOLCU
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Muzaffer AKDOĞAN
Etik Kurul Üyesi

21.09.2021 Araştırma Görevlisi

Arş.Gör. Ronay COŞKUN

Evrakı Doğrulamak İçin : <https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys?eD=BSDBDH36FP>

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

