

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTOSİYANİNİN KOLOREKTAL KANSERİN BİYOLOJİK
DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİSİ

Hasan KURTER

0000-0001-6851-5279

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI

Translasyonel Onkoloji

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

TEMMUZ 2021

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc -2018970124

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTOSİYANİNİN KOLOREKTAL KANSERİN BİYOLOJİK
DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİSİ**

Hasan KURTER

0000-0001-6851-5279

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI

Translasyonel Onkoloji

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tez Danışmanı: Doç.Dr.Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL
0000-0002-3201-4752**

**İkinci Danışman: Prof.Dr.Yasemin BAŞBINAR
0000-0001-9439-2217**

**Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından
2020.KB.SAG.039 proje numarası ile desteklenmiştir.
Bu çalışma 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs
Programı kapsamında Biyoteknolojik İlaç Teknolojileri tez alanında
1649B022011251 başvuru numarası ile desteklenmektedir.**

**İZMİR
TEMMUZ 2021**

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “Antosiyaninin Kolorektal Kanserin Biyolojik Davranışı Üzerindeki Etkisi” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza:

Öğrencinin Adı Soyadı: Hasan KURTER

Tarih:

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı.....	2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi	3
2.2. Kolorektal Kanser	3
2.3. Kolorektal Kanser Evreleri	3
2.4. Kolorektal Kanser Tedavisi ve Kullanılan İlaçlar	5
2.5. Kanserde İlaç Direnci	9
2.5.1. İlaç Direnci Mekanizmaları	10
2.5.1.1. Artan ilaç akışı	10
2.5.1.2. Detoksifikasyon Metabolizması	11
2.5.1.3. DNA Onarım Mekanizmalarının Aktivasyonu.....	11
2.5.1.4. Apoptozdan Kaçma.....	11
2.5.1.5. Epigenetik Değişiklikler.....	12
2.5.1.6. İlaç Hedefinin Değişmesi	12
2.5.1.7. Tümör Mikroçevresi.....	13
2.5.1.8. Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm Aracılı İlaç Direnci	13
2.5.2. Oksaliptatin İlaç Direncinden Sorumlu Mekanizmalar	14

2.5.2.1.	<i>Katı Taşıyıcı (Solid Carrier, SLC) Membran Proteinleri</i>	14
2.5.2.2.	<i>Bakır Taşıyıcı 1/2 (CTR) Protein Ailesi</i>	15
2.5.2.3.	<i>Çoklu İlaç Direnci Proteinleri</i>	15
2.5.2.4.	<i>Detoksifikasyon Metabolizması</i>	16
2.5.2.5.	<i>Apoptozdan Kaçma</i>	16
2.5.2.6.	<i>DNA Onarım Mekanizmalarının Aktivasyonu</i>	16
2.6.	<i>Reaktif Oksijen Türleri</i>	17
2.6.1.	<i>ROSRekatif Oksijen Türlerinin Oluşumu ve Eliminasyonu</i>	18
2.6.2.	<i>Reaktif Oksijen Türleri ve Karsinogenesisiz</i>	19
2.6.3.	<i>Reaktif Oksijen Türleri ve Metastaz</i>	21
2.7.	<i>Fitokimyasallar</i>	22
2.7.1.	<i>Antosiyaninler</i>	23
2.7.1.1.	<i>Antosiyaninlerin Antioksidan Özellikleri</i>	24
2.7.1.2.	<i>Antosiyanin ve Kanser</i>	25
3.1.	<i>Araştırmanın Tipi</i>	27
3.2.	<i>Araştırmanın Yeri ve Zamanı</i>	27
3.3.	<i>Araştırmanın Örneklemi</i>	27
3.4.	<i>Çalışma Materyali</i>	27
3.5.	<i>Araştırmanın Değişkenleri</i>	27
3.6.	<i>Veri Toplama Araçları</i>	27
3.6.1.	<i>Hücre Kültürü</i>	29
3.6.2.	<i>Oksaliptatin Çözeltisinin Hazırlanması</i>	30
3.6.3.	<i>Siyanidin-3-O-glukozit (C3G) Çözeltisinin Hazırlanması</i>	30
3.6.4.	<i>İlaç Direnci Geliştirme Deneyi</i>	30
3.6.5.	<i>Dirençli Hücre Karakterizasyonu</i>	31
3.6.5.1.	<i>İlaç Sitotoksisite Deneyi</i>	31

3.6.5.2.	<i>Yara İyileşmesi Deneyi</i>	31
3.6.5.3.	<i>Hücrel Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi</i>	32
3.6.5.4.	<i>Epitelyal-Mezenkimal Dönüşümün Gösterilmesi</i>	32
3.6.5.4.1.	<i>RT-PCR Analizi</i>	33
3.6.5.4.2.	<i>İmmünfloresans Boyama</i>	36
3.6.6.	<i>In Silico ADME (emilim, dağılım, metabolizma ve atılım) ve Moleküler Yerleştirme Çalışmaları</i>	37
3.6.7.	<i>İstatistiksel Analiz</i>	38
3.7.	<i>Araştırma Planı</i>	39
4.	BULGULAR	40
4.1.	Parent Hücre ile Dirençli Hücre Arasındaki Morfolojik Değişimler	40
4.2.	Oksaliptatinin Parent ve Dirençli Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi.....	41
4.4.	C3G'nin Parent Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi.....	41
4.4.	EMT Biyobelirteçlerinin mRNA Düzeyinde Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR ile Analizi	44
4.5.	EMT Biyobelirteçlerinin İmmunofloresans Boyama Yöntemi ile Analizi	46
4.6.	Reaktif Oksijen Türlerinin Analizi	48
4.7.	<i>In Silico</i> İlaç Benzerliği Analizleri	49
4.8.	Antosiyaninlerin ADME Özelliklerinin Değerlendirilmesi	49
4.9.	Moleküler Yerleştirme Çalışmaları	51
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	56
7.	EKLER	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	27
Tablo 2: HCT-116'nın karakteristik özellikleri	29
Tablo 3: PCR reaksiyonunda kullanılacak primer hazırlıkları	35
Tablo 4: PCR reaksiyonu için deney karışımları	35
Tablo 5. Lipinski'nin beş kuralı.....	49
Tablo 6: C3A, p3g ve p3a'ya ait farmokinetik ve fizikokimyasal özellikler.	51
Tablo 7. Antosiyaninler ve bilinen ALK5 reseptörü inhibitörleri ile ALK5 arasındaki bağlanma enerjileri.	52



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Platin tabanlı ilaçların kimyasal yapısı. 1: sisplatin; 2: karboplatin; 3: oksaliplatin; 4: nedaplatin; 5: laboplatin.....	7
Şekil 2. Oksaliplatinin diaminosikloheksan grubunun DNA'nın guanin-guanin nükleotidlerine bağlanması.....	9
Şekil 3. İlaç direncinden sorumlu olan mekanizmalar	10
Şekil 4. Oksaliplatin ile ilişkili direnç mekanizmaları	17
Şekil 5. ROS; proliferasyon, apoptoz, metastaz, ilaç direnci ve diferensiyasyon gibi hücresel süreçleri çeşitli sinyal yolları ile düzenler (35)	18
Şekil 6. ROS oluşumunun miktara bağlı olarak hücre içerisinde etki gösterdiği biyokimyasal ve biyolojik etki mekanizmaları.....	21
Şekil 7. Genel antosiyanidin (aglikon) iskeleti yapısı (49)	23
Şekil 8. Siyanidin oksijen radikalleri için önerilen stabilizasyon mekanizması. 25	
Şekil 9. A) Parent hücre HCT-116, B) oksaliplatin direnci kazandırılmış HCT-116-ROx. İkinci hücre arasındaki morfolojik değişimler mavi, kırmızı ve yeşil oklarla gösterilmiştir. Mavi oklar artmış psödopodia oluşumunu, kırmızı oklar iğsi hücre oluşumunu ve yeşil ok artan hücreler arası mesafeyi göstermektedir.....	40
Şekil 10. A) HCT-116 ve B) HCT-116-ROX hücreleri için oksaliplatin IC ₅₀ grafiği.	41
Şekil 11. C3G'nin HCT-116 (parent) hücre hattı üzerindeki canlılık grafiği.....	42
Şekil 12. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116-ROx hücrelerine ait migrasyon analizi görüntüleri.....	43
Şekil 13. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116-ROx hücrelerine ait yara kapanma analizi grafiği (**p<0,001).	43
Şekil 14. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116-ROx hücrelerine ait rölatif E-kaderin mRNA ekspresyon seviyeleri grafiği (*p<0,05).....	45
Şekil 15. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116-ROx hücrelerine ait rölatif vimentin mRNA ekspresyon seviyeleri grafiği (*p<0,05).....	45

Şekil 16. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116 hücrelerine ait E-kaderin, vimentin ve N-kaderin floresans yoğunluk grafiği (**p<0,001).....	47
Şekil 17. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116-ROx hücrelerine ait E-kaderin, vimentin ve N-kaderin floresans görüntüleri. Ölçek çubuğu 20 µm.....	47
Şekil 18. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116-ROx hücrelerine ait hücre içi ROS miktarı grafiği.....	48
Şekil 19. Antosiyaninlere ve bilinen ALK5 inhibitörlerine ait biyoyararlanım radarlarının karşılaştırılması.....	50
Şekil 20. Antosiyaninlerin ve ALK5 reseptörü için bilinen inhibitörlerin BOILED-Egg grafiği. Sarı alan BBB'den geçişi, beyaz alan HIA'yı ve beyaz alan ise bu özelliklere sahip olamayan molekülleri temsil etmektedir.....	51
Şekil 21. ALK5 ile P3A arasındaki etkileşim mesafelerini içeren iki boyutlu moleküler yerleştirme şeması	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl: Mikrolitre

µM: Mikro molar

ABC: ATP bağlayıcı kaset proteinleri

APC: Adenomatöz polipozis koli

C3G: Siyanidin-3-O-glukozit

cm: Santimetre

CpG: Sitozin-guanin adaları

dk: Dakika

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

EMT: Epitelyal-mezenkimal dönüşüm

FBS: Fötal sığır serum

HCl: Hidroklorik asit

HIF-1α: Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 alfa

ml: Mililitre

nm: Nanometre

PBS: Fosfat tampon çözeltisi

RAS: Rat sarkoma

ROS: Reaktif oksijen türleri

TGF-β1: Transforme edici büyüme faktörü-beta 1

TP53: Tümör protein 53

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim süresince ilk öğrencisi olmanın verdiği gururla, bana her türlü akademik desteği veren, hiçbir koşulda benden bilgisini ve tecrübesini esirgemeyerek bana yol gösteren, aynı zamanda bundan sonraki akademik hayatımda insani ve etik değerler açısından her zaman örnek alacağım çok kıymetli danışman hocam Doç.Dr.Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL’a

Anabilim Dalı öğrencileri ve çalışanları olarak fikirlerine ve düşüncelerine saygı duyduğumuz, akademik duruşunu her zaman örnek alacağımız çok değerli hocamız Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Yasemin BAŞBINAR’a

Her daim bize destek çıkan,engin bilgisi ve tecrübesi ile yolumuza ışık tutan çok kıymetli, hocamız Onkoloji Enstitüsü Müdürü saygıdeğer Prof.Dr.Nur OLGUN’a ve destekleriyle yanımızda olan güler yüzlü tüm Onkoloji Enstitüsü idari personellerine,

Yine hep yanımızda olan, varlığıyla yolumuza ışık tutan, gülümsemesiyle bize her zaman Dokuz Eylül ailesinin bir parçası olduğumuzu hatırlatan çok değerli hocamız Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof.Dr.Hülya ELLİDOKUZ’a

Hem laboratuvar çalışmalarında hem de güzel dostluklarıyla hep yanımda olan, zor zamanlarımda bana destek olan, “keşke daha erken tanışıp arkadaş olsaydık” dediğim çok değerli çalışma arkadaşlarıma,

Benim tüm kahrımı çeken, maddi-manevi her zaman yanımda olan, tüm eğitim ve öğretim hayatımda bana destek olan canım annem Hazal ve babam Şerif KURTER’e ve ninem Naciye KURTER’e, hayatımın en değerlileri olan, hiç çekinmeden dertleştiğim ve sırlarımı paylaşabildiğim kardeşlerim İlayda, Dilara ve Yunus Emre’ye

Bu çalışma 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında Biyoteknolojik İlaç Teknolojileri tez alanından 1649B022011251 başvuru numarası ile burs desteklerinden ötürü TÜBİTAK kurumuna sonsuz teşekkür ederim.

Hasan KURTER

ANTOSİYANİNİN KOLOREKTAL KANSERİN BİYOLOJİK DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Hasan KURTER

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Onkoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Cerrahi operasyon, radyoterapi ve kemoterapi kolorektal kanserin standart tedavi yöntemlerindendir. Bu tedavi yöntemleri kanserin türüne, evresine, moleküler karakteristiğine ve hastanın durumuna göre tek veya kombinasyon şeklinde uygulanabilir. Kemoterapötik tedaviler sitotoksik ajanlar ve biyolojik ajanlar olarak sınıflandırılıp hücre proliferasyonunu, apoptozu veya metastazı gibi çeşitli biyolojik ve biyokimyasal yolları hedeflerler. Fakat kanser hastaları uygulanan bu tedaviye karşı direnç gösterebilirler. ATP-bağlayıcı kaset proteinleri gibi taşıyıcı proteinlerin ekspresyonundaki artış, DNA tamir mekanizmalarının artışı, apoptozun inhibisyonu ve EMT'nin artışı tedaviye karşı gelişen ilaç direncinin başlıca sebepleri arasında gösterilebilir. Literatürde çok az çalışma kolorektal kanserde, artan ROS miktarının EMT'yi indükleyerek hücrenin ilaca karşı direnç geliştirdiğini göstermiştir. Bu çalışmanın amacı HCT-116 kolorektal kanseri hücre hattında oksaliplatine karşı oluşan kemoterapötik direncin sebep olduğu ROS artışının EMT oluşum sürecindeki etkisinin anti-oksidan ve anti-kanser özelliklere sahip olan siyanidin-3-O-glikozit (C3G) tarafından inhibisyonunun araştırılmasıdır.

İlaç direnci geliştirme deneyi için hücreler oksaliplatine artan dozlarda maruz bırakıldı. Hücrelerin uygulanan dozda proliferasyon hızının ölüm hızından yüksek olduğu dozda direnç geliştirme deneyi sonlandırıldı. Dirençli hücrelerde artan ROS miktarı ROS Detection Assay Kit ile, EMT biyobelirteçleri qRT-PCR yöntemi ve immunofloresans boyama yöntemiyle, migratif özellikleri yara iyileşmesi yöntemiyle ve dirençli hücrede ilaca karşı azalan hassasiyet ise WST-1 proliferasyon ajanı ile belirlenmiştir.

Oksaliplatin direnci geliştirildikten sonra HCT-116 ve HCT-116-ROx arasında ilaç direncinin geliştiğini kanıtlamak amacıyla karakterizasyon deneyleri yapıldı. Dirençli hücrenin migratif özelliği, vimentin ve N-kaderin miktarları parent hücreden daha fazla bulundu. Hücre içi ROS miktarı hem dirençli hem de C3G ile muamele edilen dirençli hücrelerde azalmıştır. Aynı zamanda dirençli hücrelerin oksaliplatine olan hassasiyeti azalmıştır. Deney aşamasında C3G ile muamele edilen dirençli hücrelerin migratif özelliği azalmış, epitelyal biyobelirteci olan E-kaderin miktarı artmış, vimentin ile N-kaderin miktarı azalmıştır.

Sonuç olarak, oksaliplatin ilacına karşı gelişen ilaç direnci ROS ile doğrudan ilişkili olmadan EMT yolağı üzerinden gelişebileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda C3G'nin EMT sürecini tersine çevirerek ilaç direnci oluşmasını engelleyebilecek bir molekül olarak kullanılabilirliği araştırıldı.

Anahtar Sözcükler: İlaç direnci, kolorektal kanser, oksaliplatin, siyanidin-3-O-glukozit

Tezin sayfa adedi: 83

Danışman: Doç.Dr.Gizem Çalıbaşı Koçal



THE EFFECT OF ANTHOCYANIN ON THE BIOLOGICAL BEHAVIOUR OF COLORECTAL CANCER

Master Thesis

Hasan KURTER

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Department of Oncology

ABSTRACT

Surgery, radiotherapy, and chemotherapy are standard treatment methods for colorectal cancer. These treatment methods can be applied alone or in combination depending on the type, stage, molecular characteristics of the cancer and the patient's condition. Chemotherapeutic treatments are classified as cytotoxic agents and biologic agents. Thus, they target various biological and biochemical pathways such as cell proliferation, apoptosis or metastasis. However, cancer patients may show resistance to this treatment. Increase in the expression of carrier proteins such as ATP-binding cassette proteins, increase in DNA repair mechanisms, inhibition of apoptosis and increase in EMT can be shown among the main causes of drug resistance to treatment. Few studies in the literature have shown that in colorectal cancer, the increased amount of ROS induces EMT, and the cell develops drug resistance.

The aim of this study is to investigate the inhibition of the effect of the increase in ROS caused by the chemotherapeutic resistance to oxaliplatin in the colorectal cancer HCT-116 cell line on the EMT formation process by cyanidin-3-O-glycoside, which has anti-oxidant and anti-cancer properties.

For the drug resistance development assay, cells were exposed to increasing doses of oxaliplatin. The resistance development experiment was terminated at the dose where the proliferation rate of the cells was higher than the death rate at the applied dose. The increased amount of ROS in resistant cells was determined by ROS Detection Assay Kit, EMT biomarkers were determined by qRT-PCR method and immunofluorescence staining method, their migratory properties were determined by wound healing method, and decreased sensitivity to the drug in resistant cells was determined by WST-1 proliferation agent.

After the development of oxaliplatin resistance, characterization experiments were performed to prove that drug resistance developed between HCT-116 and HCT-116-ROx. The migratory feature of the resistant cell, vimentin and N-cadherin amounts were found to be higher than the parent cell. The amount of intracellular ROS was decreased in both resistant and C3G-treated resistant cells. At the same time, the sensitivity of resistant cells to oxaliplatin is decreased. In the experimental phase, the migration feature of resistant cells treated with C3G decreased, the amount of epithelial biomarker E-cadherin increased, and the amount of vimentin and N-cadherin decreased.

In conclusion, we showed that drug resistance against oxaliplatin can develop via the EMT pathway without being directly related to ROS. We also demonstrated the usability of C3G as a molecule that can prevent drug resistance by reversing the EMT process.

Keywords: Colorectal cancer, cyanidin-3-*O*-glucoside, drug resistance, oxaliplatin

Page number: 83

Advisor: Assoc.Prof.Gizem CALIBASI-KOCAL



1. GİRİŞ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Kolorektal kanser dünyada kadınlarda ve erkeklerde görülen en yaygın üçüncü kanser türüdür. Kolorektal cerrahi sonrası kolorektal kanseri hastalarında oksaliplatin yaygın olarak birinci basamak tedavi olarak kullanılır. Bununla birlikte, oksaliplatin direncinin gelişimi bu hastalarda yaygın olarak görülen bir olgudur. Bu nedenle, oksaliplatin direncinin gelişiminin altında yatan ve kilit molekülleri hedef alan sinyal mekanizmalarının anlaşılması, kemo-direncin üstesinden gelmek için yeni stratejiler geliştirmek için yardımcı olabilir. Literatürde yer alan bu sinyal mekanizmalarından biri de epitelyal-mezenkimal dönüşüm olarak yer almaktadır.

Epitelyal-mezenkimal dönüşüm sadece embriyonik gelişimde ve malign tümör ilerlemesinde değil aynı zamanda kanser tedavisinde uygulanan ilaçlara karşı ilaç direncinin gelişiminde de rol oynar. Epitelyal-mezenkimal dönüşüm, E-kaderin gibi klasik epitelyal biyobelirteçlerin ekspresyonunun azaldığı, N-kaderin ve vimentin gibi mezenkimal biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyesinin arttığı dinamik bir yeniden programlanma sürecidir. Bu süreç sırasında hücrede meydana gelen bazı değişimler; hücre polaritesini kaybettiği ve iğsi morfolojik yapıya dönüşmesini sağlayarak hücre metastatik forma dönüşür.

Reaktif oksijen türleri, oldukça reaktif iyon ve moleküllerden oluşan, hücrenin biyolojik ve biyokimyasal süreçlerinde etkin rol oynayan ayrıca literatürde epitelyal-mezenkimal dönüşüm sürecinde etkili olan güçlü sinyal molekülleri olduğu bildirilmiştir. Artan ROS üretimi, tümörün başlaması ve ilerlemesi için gerekli biyokimyasal veya moleküler değişikliklere, apoptozdan kaçmasına ek olarak ilaç direncine de sebep olmaktadır.

Flavanoid yapılı siyanidin-3-O-glukozit antosiyanini bitkilerde bol miktarda bulunan ve bitkilere kırmızı, pembe, mor gibi renkler veren bir sekonder metabolittir. Literatürde siyanidin-3-O-glukozit'in meme, prostat, akciğer, kolorektal kanser gibi birçok kanser türünde anti-karsinojenik ve anti-oksidan özellik gösterdiği gösterilmiştir. Fakat ilaç direnci geliştirilmiş kanser hücrelerinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

1.2. Araştırmanın Amacı

Kolorektal kanseri HCT-116 hücre hattında oksaliplatine karşı oluşturulan kemoterapötik direncin sebep olduğu metastatik karakterin etkisinin siyanidin-3-O-glikozid tarafından inhibisyonunun araştırılmasıdır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Oksaliplatine direnç kazandırılan kolorektal kanseri HCT-116 hücre hattında metastatik karakterin etkisi siyanidin-3-O-glukozit tarafından inhibe edilir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi

Kolorektal kanser (KRK), dünya çapında her yıl teşhis edilen kanserlerin ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Kadınlarda en sık ikinci ve erkeklerde üçüncü teşhis edilen kanserdir. Kadınlarda insidans ve ölüm oranı erkeklere göre yaklaşık %25 daha düşüktür. Bu oranlar aynı zamanda coğrafi olarak da değişmektedir ve en yüksek oranlar en gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Fakat gelişmiş ülkelerde artan tarama programları ve kolonoskopi uygulamaları gibi erken teşhis yöntemleri ile hastalığın insidansında azalan eğilimler görülmeye başlanmıştır. Gelişmekte olan ülkelerde ise devam eden ilerlemeyle birlikte, dünya çapında kolorektal kanser insidansının 2035 yılında 2,5 milyon yeni vakaya yükseleceği tahmin edilmektedir. Genetik, yaşam tarzı, obezite ve çevresel faktörlerin ilişkileri olsa da bu artışın kesin nedenleri tam olarak anlaşılamamıştır (1).

2.2. Kolorektal Kanser

Karsinogenez süreci, neoplastik bir öncü lezyona (polip) dönüşen ve sonunda tahmini 10-15 yıllık bir süre içinde KRK'e ilerleyen anormal bir kript ile başlar (2). Genel olarak kabul gören iki ana farklı öncü lezyon yolağı vardır: KRK'lerin %70-90'ına yol açan geleneksel adeno-karsinom yolağı (kromozomal kararsızlık) ve kolorektal kanserlerin %10-20'sini oluşturan serrated (tırtıklı) neoplazi yolağı. Bu yollar, sırayla çoklu genetik ve epigenetik olayları temsil eder. Kromozomal kararsızlık fenotipleri tipik olarak bir APC mutasyonu ile başlatılan genomik olayları takiben gelişir, ardından RAS aktivasyonu veya TP53 fonksiyon kaybı gelir. Tersine, serrated neoplazi yolağı, RAS ve RAF mutasyonları ve epigenetik kararsızlık ile ilişkilidir, CpG adası metilasyon fenotipi ile karakterize edilir ve kararlı mikrosatellit ve kararsız kolorektal kansere yol açar (1).

2.3. Kolorektal Kanser Evreleri

KRK, lokal invazyon derinliğine (T evresi), lenf nodu tutulumuna (N evresi) ve uzak metastaz varlığına (M evresi) göre sınıflandırılır (Tablo 1). Bu aşamalara bağlı sınıflandırmalar, KRK'in tedavisine yön vermektedir (3).

Tablo 1: Kolorektal kanser için TNM evreleme sistemi

T-Birincil Tümör	
TX	Lokal tümör infiltrasyonu hakkında bilgi yok
Tis	Tümör mukozayla sınırlı, lamina muscularis mukozasında infiltrasyon yok
T1	Lamina muskularis mukozasından submukozaya infiltrasyon, lamina muskularis propria infiltrasyonu yok
T2	Lamina muskularis propriaya yayılmış
T3	Perikolik veya perirektal dokuya veya her ikisine yayılmış
T4a	Serozaya yayılmış
T4b	Komşu doku ve organlara yayılmış
T4b	
N-Bölgesel Lenf Nodülleri	
Nx	Lenf nodülleri hakkında bilgi yok
N0	Lenf nodüllerine metastaz yok
N1a	1 bölgesel lenf nodülünde tespit edilebilen kanser hücreleri
N1b	2-3 bölgesel lenf nodülünde kanser hücrelerinin tespiti
N1c	Bölgesel lenf nodu metastazı olmaksızın, subserozada veya peritonealize olmayan perikolik veya perirektal yumuşak dokuda tümör odakları var
N2a	4-6 bölgesel lenf nodülünde kanser hücrelerinin tespiti

N2b	7 ve daha fazla bölgesel lenf nodüllerinde kanser hücrelerinin tespiti
M-Uzak Metastaz	
Mx	Uzak metastaz hakkında bilgi yok
M0	Uzak metastaz yok
M1a	1 uzak organa veya uzaktaki lenf düğümlerine metastaz
M1b	1'den fazla uzak organa, uzaktaki lenf düğümlerine veya peritoneal metastazı var

2.4. Kolorektal Kanser Tedavisi ve Kullanılan İlaçlar

KRK'in temel tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi ve farmakoterapidir. Farmakoterapi, hedeflenmiş ilaçlar, immünoterapötikler, biyolojik ajanlar ve sitotoksik ajanlar olmak üzere sınıflandırılabilir (Tablo 2). Setuksimab (EGFR inhibitörü) ve bevacizumab (VEGF inhibitörü) gibi biyolojik ajanların kullanımının KRK tedavisi için fayda sağlamıştır. Öte yandan, KRK tedavisinde sitotoksik ajan olarak 5-florourasil (5-FU), irinotekan, oksaliplatin ve kapesitabin kullanılmaktadır (4). Bu ajanlar aynı zamanda birbirleriyle kombinasyon oluşturularak da hastaya uygulanabilir. Örneğin, FOLFOX (5-FU / leucovorin / oxaliplatin), FOLFIRI (5-FU / leucovorin / irinotecan), CAPOX (capecitabine / oxaliplatin) ve FOLFOXIRI (5-FU / leucovorin / oxaliplatin / ajanlar) ve bu kombinasyonların diğer biyolojik ajanlarla ya da hedeflenmiş ilaçlarla olan kombinasyonları mevcuttur (1).

Tablo 2: Kolorektal kanser tedavisinde kullanılan terapötikler

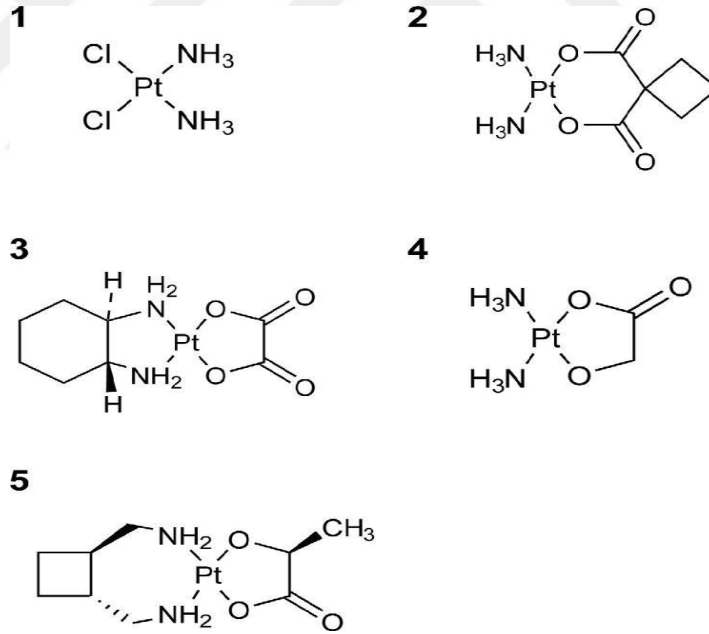
Kemoterapötikler	Biyolojik İlaçlar	Hedeflenmiş ve İmmünoterapötikler
• 5-florourasil • Kapasitabin • İrinotekan • Oksaliplatin	• Anti-VEGF antikorü: Bevasizumab, Aflibersebt, Ramusirumab • Anti-EGFR antikorü: Setuksimab, Panitumumab	• BRAF inhibitörleri • MEK inhibitörleri • Tirozin-Kinaz inhibitörleri: Regorafenib • İmmünoterapötikler: Nivolumab, Pembrolizumab

Tüm platin tabanlı ilaçlar intravenöz enjeksiyon yoluyla uygulanır ve serum proteinlerine özellikle albümin proteinine bağlanarak dolaşımda büyük ölçüde bozulmadan kalırlar (5).

Platin tabanlı ilaçlar, antioksidan bir protein olan glutatyon (GSH) başta olmak üzere sistein ve metiyoninin kükürt içeren peptit ve proteinlere kolayca bağlanabilirler. Fakat bu ilaçların en önemli hedefi nükleer DNA'dır. Ağırlıklı olarak bu ilaçlar guaninin N7 pozisyonundan bağlanır. Aynı zamanda adenin bölgelerinden de bağlanabilir. Böylece DNA'nın açılmasına ve bükülmesine engel olarak transkripsiyonu ve replikasyonu önlemiş olurlar (6).

Tüm dünyada kanser tedavisi için kullanılan platin bazlı üç ilaç vardır: sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin. Ayrıca lobaplatin ve nedaplatin gibi bireysel onaya sahip diğer platin tabanlı ilaçlar sırasıyla Çin ve Japonya gibi ülkeler tarafından kullanılmaktadır (Şekil 1) (7). Birinci nesil platin tabanlı anti-tümör ajan olan sisplatin (cisdiamminedikloridoplatin (II)) ilk testis kanseri için ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmıştır ve platin tabanlı ilaçlara olan ilgi giderek artmıştır. İkinci nesil karboplatin ve üçüncü nesil oksaliplatin, genişletilmiş spektrum ve azalan toksisite ile dünya çapında kullanılmaya başlanmıştır (8).

Sisplatin, klorür ligandlarının cis-geometride olduğu iki klorür ve iki amonyak grubuna koordine edilmiş nötr, kare düzlemsel bir platin (II) koordinasyon kompleksidir. Hücrenin içine girdikten sonra sisplatin suya maruz kalarak $[Pt(NH_3)_2Cl(OH_2)]^+$ ve $[Pt(NH_3)_2(OH_2)_2]^{2+}$ komplekslerini oluşturur. Böylece DNA'ya daha reaktif hale gelir. İlerlemiş pankreas kanseri, meme kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC), ilerlemiş mesane kanseri ve diğerlerinin tedavisi için onaylanmıştır. İkinci nesil platin tabanlı ilaçlarda, iki klorür atomu, oksijenli bir bidentat siklobutan dikarboksilat grubu ile değiştirilerek karboplatin (cis-diammin-1,1'-siklobütan dikarboksilat platin (II)) oluşturulur. Bununla birlikte, karboplatin, sisplatin ile benzer bir antikanser spektrumuna sahiptir ve birçok kanser türünde sisplatin ile çapraz direnç gözlenmektedir (9). Oksaliplatinin ise daha az DNA eklentisi üretebildiği ancak sisplatin ve karboplatine göre daha yüksek sitotoksisiteye neden olduğu ve ayrıca kolorektal ve diğer gastrointestinal kanserlerde daha güçlü aktivite gösterdiği bildirilmiştir (9).



Şekil 1. Platin tabanlı ilaçların kimyasal yapısı. 1: sisplatin; 2: karboplatin; 3: oksaliplatin; 4: nedaplatin; 5: laboplatin

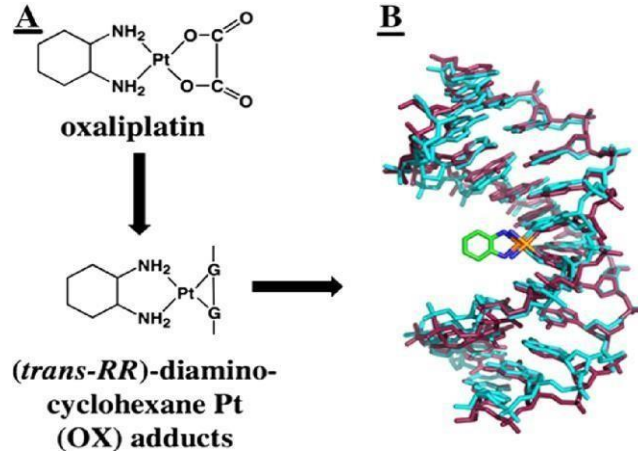
Oksaliplatin ilk olarak Sanofi-Aventis şirketi tarafından geliştirildi. Daha sonra 1996'da Fransa'da, 2002'de ABD'de ve 2005'te Japonya'da kanser tedavisinde kullanılmak üzere onaylandı. Oksaliplatin ($\{[oksalat(2-)-O, O'] [1R, 2R-$

sikloheksandiamin-N, N '] platin- (II)) üçüncü nesil platin bazlı anti-tümör bir ajandır. Bu 1,2-diaminosikloheksan (DACH) ligandı, sisplatinin amin gruplarını temsil eder. İntravenöz olarak uygulanan oksaliplatin, kolorektal kanser tedavisinde 5-florourasil (5-FU) ve lökovorin (LV) gibi diğer ajanlarla kombine edilerek uygulanır. Günümüzde FOLFOX olarak bilinen bu kombinasyon, kolorektal kanserin standart birinci basamak tedavisi olarak kabul edilmektedir ve pankreas kanseri gibi diğer malignitelerde de bu kombinasyon çalışmaları devam etmektedir. Bu kombinasyon tedavilerinde, tedavi süresi ve sitotoksosite çok önemlidir ve bu yüzden farklı etkinlik oranları ile sonuçlanmaktadır. Ne yazık ki, bu tür kombinasyonları içeren bu çalışmaların çoğu genel sağkalımı önemli ölçüde artıramamış ve kanser türlerinde yeni sistemik tedaviler için acil bir ihtiyaç yaratmıştır (10), (11).

Oksaliplatin hastaya verildiği zaman, hücre içerisine alınıcı büyük ölçüde pasif difüzyonla ile gerçekleşmektedir. Bunun yanında kolaylaştırılmış difüzyon ve aktif taşıma da oksaliplatinin hücre içine alımında rol oynamaktadır (11). Oksaliplatin, ilaç biyotransformasyonu olarak adlandırılan biyolojik sıvılarda bir dizi spontan, enzimatik olmayan dönüşüme uğrar. Bu reaksiyonlara oksalat grubunun H_2O , Cl^- ve HCO_3^- iyonları ile yer değıştirmesi aracılık eder. Bu biyotransformasyon reaksiyonları ile oluşan dikloro-, monokloro- ve diaquo-diaminosikloheksan (DACH) platin gibi reaktif türler DNA'ya bağlanarak DNA-platin kompleksleri oluştururlar (12).

Platin analogları sitotoksik etkilerini alkilleyici ajanlarla aynı şekilde gösterirler. Bu nedenle, hücre döngüsünün tüm aşamalarında DNA zincirlerine çapraz bağlanarak, DNA sentezini ve fonksiyonunu inhibe ederler ve tümör hücrelerini öldürürler.

Oksaliplatin hücre içerisine girdikten sonra özellikle DNA'ya bağlanarak etkinliklerini gösterirler. DNA etkileşim ajanı olarak, esas guanin-guanin (GG) veya guanin-adenin (GA) arasında DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bozan zincirler arası eklentileri oluşturur (Şekil 2) (10).



Şekil 2. Oksaliplatinin diaminosikloheksan grubunun DNA'nın guanin-guanin nükleotidlerine bağlanması

2.5. Kanserde İlaç Direnci

Geçtiğimiz yıllarda kanser tedavisinde elde edilen başarılarla rağmen, klasik kemoterapötik ajanlara ve yeni hedefe yönelik ilaçlara direnç, kanser tedavilerinde önemli bir sorun olmaya devam etmektedir (9). Kanser hücreleri, kemoterapinin başarısızlığından sorumlu olan ve çoklu ilaç direnci olarak adlandırılan çoklu mekanizmalarla kemoterapiye direnç geliştirir. Çoklu ilaç direnci (multidrug resistance, MDR), doğal veya edinilmiş direnç olarak kategorize edilir. Doğal direnç, genellikle hastaya ilaç uygulanmadan, önceden var olan ve genellikle ilaç tedavisinin etkinliğinin azalmasına neden olan doğuştan gelen direnç olarak tanımlanır. Doğal dirence şunlar neden olabilir: (1) hastaların çoğunda hem sitotoksik ajanlara hem de hedeflenmiş tedaviye verilen yanıtın azalmasına neden olan önceden var olan genetik mutasyonlar; (2) tümör heterojenliği; (3) çevresel toksinlere (anti-kanser ilaçlar gibi) karşı savunma olarak kullanılan sinyal yollarının aktivasyonu (9).

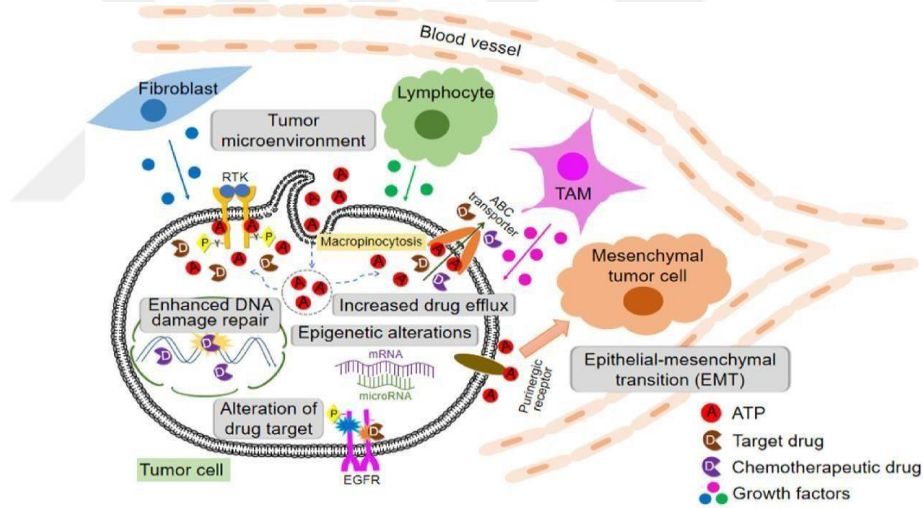
Edinilmiş ilaç direnci, ilaç tedavisinden sonra bir ilacın antikanser etkinliğinin kademeli olarak azaltılmasıyla belirlenebilir. Edinilen direnç şunların bir sonucu olabilir: (1) yeni ortaya çıkan sürücü gen haline gelen ikinci bir pro-onkogenin aktivasyonu; (2) ilaç hedeflerinin mutasyonları veya değişmiş ekspresyon seviyeleri; (3) tedaviden sonra tümör mikroçevresindeki (TMÇ) değişiklikler (9).

Sonuç olarak hem doğal hem de edinilmiş dirençte, ilacın terapötik dozu etkisizdir ve sitotoksik etkisi için daha büyük bir konsantrasyon gerektirir (13).

2.5.1. İlaç Direnci Mekanizmaları

Tümörlerin terapötik ilaçlara direnci, kemoterapi başarısızlığının başlıca nedenidir. Kullanılan her etkili anti-kanser ilaca karşı birçok mekanizma aracılığıyla direnç gelişebilir. Bu mekanizmalar şekil 3’de gösterildiği gibi; (14)

1. Artan ilaç akışı
2. Faz II detoksifikasyon enzimleri
3. DNA onarım mekanizmalarının aktivasyonu
4. Apoptozdan kaçma
5. Epigenetic değişiklikler
6. İlaç hedefinin değişmesi
7. Tümör mikroçevresi
8. Epitelyal-mezenkimal dönüşüm (epithelial-mesenchymal transition, EMT) gibi birçok mekanizma yoluyla gelişebilir (15).



Şekil 3. İlaç direncinden sorumlu olan mekanizmalar

25.1.1. Artan ilaç akışı

MDR, kanser tedavisinin başarısını engelleyen ciddi bir sorundur. P-glikoprotein (P-glycoprotein, P-gp / ABCB1), çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 1 (MRP1 / ABCC1) ve meme kanseri direnç proteini (BCRP) gibi dışarı ilaç atılımını sağlayan ATP-bağlayıcı kaset (ABC) proteinlerinin aşırı ekspresyonu hücre içerisinde ilaç birikimini azaltarak kanser hücrelerinin ilaçlara olan maruziyetini azaltır (16).

2512 Detoksifikasyon Metabolizması

Glutasyon transferazlar, diğerk bir adıyla glutasyon S-transferazlar (GST), endojen ve ekzojen kaynaklı, elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu sağlayarak, genellikle daha kolay atılabilen ve daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen Faz-II detoksifikasyon enzim ailesidir (17).

GST'lar, hücre sel makromolekülleri reaktif elektrofillerden korumak için işlev görürler. Spesifik olarak GST'lar, glutasyonun (L-g-glutamyl-l-cysteinyl-glycine, GSH) çok çeşitli endojen ve eksojen elektrofilik bileşiklere konjugasyonunu katalize eder. Böylece hücre içerisindeki zararlı bileşiklerin uzaklaştırılmasında görev alırlar (18). Elektrofilik kısımlar oluşturan birçok kemoterapötik ilaç, GSH yolu ile detoksifiye edilir ve bu nedenle direnç gelişimine yol açar (18).

Antikanser ajanlara maruz kalma, hücreyi koruyan gen ürünlerinin indüksiyonuna ve ekspresyonuna yol açabilir. GST'ler, kemoterapi ajanlarına karşı direncin gelişmesinde rol oynamaktadır (18). GST'lerin ilaç direncinde iki farklı rolü vardır. İlaç detoksifikasyonu ve MAPK yolu inhibisyonu.

2513 DNA Onarım Mekanizmalarının Aktivasyonu

Hasar görmüş DNA'nın onarımı anti-kanser ilaç direncine sebep olmaktadır. Doğrudan veya dolaylı olarak DNA'ya zarar veren kemoterapi ilaçlarına yanıt olarak, DNA hasar tepkisi mekanizmaları ilaca bağlı hasarı tersine çevirebilir. Örneğin, cisplatin gibi platin tabanlı kemoterapi ilaçları, DNA'ya çapraz bağlanarak apoptoza neden olmaktadır. Bununla birlikte, platin tabanlı ilaçlara direnç mekanizması genellikle birincil onarım mekanizması olan nükleotid eksizyon tamiri (NER) ve homolog rekombinasyon (HR) yolu ile gerçekleşmektedir (19).

2514 Apoptozdan Kaçma

Apoptoz (programlanmış hücre ölümü), kanser hücrelerinde kemoterapi ile tetiklenen yaygın hücre ölümü şeklidir. Apoptotik yol, intrinsik veya ekstrinsik olarak meydana gelebilir. İntrinsik yol, mitokondri merkezlidir ve kaspaz-9, AKT ve BCL-2 proteinlerini içerir. Hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri, ekstrinsik yolda yer alır. Her 2 apoptoz yolağının ilerlemesi, kaspaz-3'ü etkinleştirdiği bilinmektedir. Apoptozun değişmesi kemoterapiye direnç gelişmesine yol açar.

Kanser hücreleri hayatta kalmak için anti-apoptotik proteinlere bağımlıdır. Dolayısıyla, bu proteinler ilaç direnci için terapötik hedeflerdir. Bu proteinlerin aşırı ekspresyonu ve mutasyonları, kemoterapinin başarısızlığı ile ilişkilidir ve ilaç direnci gelişmektedir (20).

25.1.5. Epigenetik Değişiklikler

Kanser tedavisine dirence neden olan bir diğer mekanizma dizisi, karsinogenezi de etkileyebilen epigenetik modifikasyonlardır. İki ana epigenetik değişiklik türü, DNA metilasyonu ve asetilasyon veya metilasyon yoluyla histon modifikasyonudur. DNA metilasyonu, CpG adaları olarak bilinen bölgelerdeki CG-dinükleotidlerde sitozinlere bağlanan metil gruplarından oluşur ve esas olarak yukarı akış (up-regulation) gen promotor bölgelerinde bulunur. Bununla birlikte, genom boyunca diğer lokuslarda da metilasyon meydana gelebilir. Tersine, histon modifikasyonları kromatin yapısını değiştirir. Örneğin, histon asetilasyonu kromatini açarken deasetilasyon onu kapatır. Bu mekanizmalar nihayetinde kromozom boyunca genlerin ekspresyonunu düzenler ve kanserde bu normal düzenleme bozulur. Örneğin, tümör baskılayıcı genler genellikle hipermetilasyon yoluyla susturulur ve onkogenler hipometilasyon yoluyla aşırı ifade edilir (19).

25.1.6. İlaç Hedefinin Değişmesi

Hedef veya reseptör seviyesinde, ilaç tedavisinin etkinliği iki faktörden etkilenir: ilaç hedefindeki değişimler veya hedefin ekspresyon seviyesindeki değişiklikler. İlaç hedefi, aşırı ekspresyon veya yetersiz ekspresyon ve hedef proteinlerin mutasyonları yoluyla değişebilir (21). Örneğin prostat kanserinde androjen reseptörünün aşırı ekspresyonu bikalutamid gibi androjen reseptör antagonistlerine karşı edinilmiş direnç kazanımsına neden olur (20).

Hedef proteinlerin ekspresyonu, bloke etmek için yeterli miktarda eksprese edilemez. Bu tür bir direnç, meme kanseri için tamoksifen tedavisi sırasında gözlenir. Tümör hücreleri, östrojen reseptörlerinin kaybı nedeniyle tamoksifene (anti-östrojen) direnç geliştirerek kemoterapinin başarısız olmasına neden olur (19).

Gen mutasyonları yaygın olarak kanser hücrelerinde görülür ve direnç gelişimine önemli katkı sağlar. Mutasyona uğramış hedefin fonksiyonel aktivitesi devam ederken substrat moleküle bağlanmasını engellenir. Bu şekilde ilaç hedef bölgeye bağlanamaz ve ilaca karşı direnç gelişir (22).

25.1.7. Tümör Mikroçevresi

Tümörün sahip olduğu dinamik ve heterojen mikroçevre, malignite ve hastalığın ilerlemesi ile ilgili önemli bir faktördür (23). Tümör mikroçevresi, çeşitli kemoterapötiklerin etkisini azaltarak ilaç direncinin gelişmesine ve kemoterapinin başarısızlığına sebep olur. Tümör mikroçevresi içerisinde bulunan pH ve oksijen gibi bazı bileşenler direncin gelişmesine katkı sağlamaktadır (13).

Tümör mikroçevresinin pH'ı, kemoterapötik ajanların aktivitesini önemli ölçüde etkileyebilir (24). Tümörlerin hücre içi pH'ı alkali ile nötr arasındadır ancak hücre dışı ortam ise asidiktir. Böylece vinkristin ve doksorubisin gibi zayıf bazik ilaçlar düşük pH'ta iyonize olur ve hücre alımları azalır. Bu nedenle, hücre dışı pH'daki artış, bu ilaçların sitotoksitesini arttırmak için faydalıdır (25)

Tümördeki hipoksik ortam, hücrelerin hayatta kalmaları için anjiyogenez ile ilgili genlerin ekspresyonunu tetikler. Bu durum karsinogenez ve ilaç direncine yol açabilir (26). Aynı zamanda anti-kanser ilaçlarının çoğu, serbest radikaller üreterek kanser hücrelerin apoptoza uğramasına neden olur. Fakat hipoksi ortam aracılığıyla P-gp'nin aşırı ekspresyonu sonucu kemoterapötik ajanların etkisi tersine çevrilebilir (27).

25.1.8. Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm Aracılı İlaç Direnci

EMT, epitel hücrelerinin apikal-bazal polaritesini ve hücre-hücre adezyonunu kaybetmesi ve invaziv mezenkimal hücrelere geçiş sürecidir. EMT, embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, kanser hücresi metastazı ve ilaç direnci dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik ve patolojik süreçte yer alır. Kanser kök hücreleri (cancer stem cell, CSC), tümörjenezden sorumlu olan toplu tümör hücrelerinde küçük bir hücre alt popülasyonudur. EMT sırasında aktive edilen Wnt, Hedgehog ve Notch gibi sinyal yolları, CSC sinyal yollarında da görülmektedir. EMT'ye maruz kalan

hücrelerin kök hücre benzeri bir özelliğe sahip olduğunu, böylece CSC'lerle anahtar sinyal yollarını ve ilaç direnci fenotiplerini paylaştığı kanıtlanmıştır (28). CSC'lerde ilaç direncinin ana sebeplerinden biri ABC taşıyıcı proteinleridir. EMT'ye maruz kalan hücreler, ABC taşıyıcılarını aşırı eksprese eder ve CSC'lere benzer ilaç direnci fenotipi gösterir. Bunun sebebi Twist, Snail ve FOXC2 gibi EMT transkripsiyon faktörleri (epithelial-mesenchymal transition transcription factor, EMT-TF) ABC taşıyıcı proteinlerinin promoter bölgelerine bağlanarak ekspresyon seviyelerinin artmasına sebep olmaktadır.

Tümör mikroçevresi de EMT kaynaklı ilaç direncine aracılık eden bir diğer faktördür. Tümör stromasının bir bileşeni olan kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF), hücre-hücre etkileşimi veya hücre dışı sinyal molekülleri yoluyla kanser hücrelerinin proliferatif ve invazif davranışını desteklemede önemli bir rol oynar. CAF'lar, IL-6 ve TCF21 gibi sitokinlerin salgılanması yoluyla tümör hücrelerinin EMT'ye girmesini kolaylaştırır. Hipoksi, kanser hücrelerinin EMT'ye girmesini ve ilaç direnci kazanmasını teşvik eden bir başka önemli mikroçevre ilişkili faktördür. Hipoksik koşullar altında HIF-1a'nın aktivasyonu, hücreleri EMT'ye teşvik eder ve MRP1 ekspresyonunu artırarak ilaç direncini indükler (15).

2.5.2. Oksaliplatin İlaç Direncinden Sorumlu Mekanizmalar

Oksaliplatin için sorumlu olan ilaç direnç mekanizmaları; hücre içi/dışı taşıma, detoksifikasyon metabolizması, DNA onarım mekanizmalarındaki değişiklikler (NER ve HR) ve hücre ölüm mekanizmalarıdır (Şekil 4) (10). Ayrıca tümör mikroçevresi içerisinde bulunan çeşitli hücrelerden salgılanan TGF- β 1'in, EMT aracılı oksaliplatine direncin oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu nedenle EMT'yi inhibe edebilmek için TGF- β 1'i hedef molekül olarak almak, kanser hücrelerinin oksaliplatine karşı daha duyarlı hale gelmesini sağlayabilir (10).

2.5.2.1. Katı Taşıyıcı (Solid Carrier, SLC) Membran Proteinleri

SLC'ler organik anyon ve organik katyon (organic cation transporter, OCT) taşıyıcılar gibi alt gruplara sınıflandırılabilir. Normalde SLC'ler, endojen ve eksojen maddelerin taşınmasına aracılık ederek hücresel homeostazı sürdürmek için tüm vücutta eksprese edilir. Bununla birlikte, SLC'lerin ekspresyonu veya dağılımı, ilaç-

ilaç etkileşim etkisine bağlı olarak değişebilir ve terapötik ilaçların hücre alımında önemli bir etkiye sahiptirler (29). Cisplatin, hOCT1 (SLC22A1), hOCT2 (SLC22A2) ve hMATE1 (SLC47A1) substratıdır ve oksaliplatin ise, hOCT2, hOCT3 (SLC22A3), hMATE1 (SLC47A1) ve hMATE2-K (SLC47A2) substratıdır.

OCT'lerin ekspresyonunun azalması, oksaliplatin ve sisplatinin hücre içine alınımını azaltır ve tedavide ilaca karşı direnç gelişebilir (30).

2522 Bakır Taşıyıcı 1/2 (CTR) Protein Ailesi

Bakır taşıyıcı 1 (copper transporter 1, CTR1) dokularda her yerde eksprese olur ve yüksek afiniteli bakır alımı için gereklidir. CTR1'in cisplatin, oksaliplatin ve karboplatin taşıdığı bilinmektedir. Song ve ark. CTR1'in aşırı ekspresyonu ile küçük hücreli akciğer kanserinin sisplatin, oksaliplatin ve karboplatine hassasiyetinin arttığını göstermişlerdir (31).

CTR2, CTR1 ile benzer görevleri paylaşan düşük afiniteli bir bakır taşıyıcısıdır. CTR2'nin mRNA ve protein seviyeleri, sisplatinin ve oksaliplatinin duyarlılığı ile önemli korelasyonlara sahiptir. Bazı hücrelerde CTR2'nin ekspresyon seviyesinin düşmesi sisplatinin hücre birikimini artırır, ancak CTR2'nin aşırı ekspresyonu sisplatine duyarlılığı azaltır (9).

2523 Çoklu İlaç Direnci Proteinleri

Çoklu ilaç direnci ilişkili protein (multidrug resistance protein, MRP, ABCC) alt ailesi, ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı süper ailesine (ABC) aittir ve anyonik amfifilik bileşikler için ATP'ye bağımlı tek yönlü hücre dışına akış pompası olarak işlev görür (32). MRP2, platin-GSH konjugatının hücre dışı taşıyıcısı olarak uzun süredir tanınmaktadır. MRP2'nin yüksek seviyeli ekspresyonu, küçük hücreli akciğer karsinomu, yumurtalık kanseri ve özofagus skuamöz hücreli karsinomda intrinsik sisplatin direnci ile ilişkilidir. MRP4 ayrıca platin direnci ile ilişkili bir aday olarak tanımlanmıştır. MRP4'ün aşırı ekspresyonu sisplatin direnci ile ilgilidir ve MRP1 yerine MRP4'ün düşürülmesi, oksaliplatin ve sisplatin birikimini artırır (33).

2524 Detoksifikasyon Metabolizması

GSH, oksidatif stresi engelleyen güçlü bir antioksidandır. GSH ile oksaliplatin dahil diğer platin tabanlı ilaçlar arasında konjugatların oluşumu, bu ilaçların inaktivasyonunda önemli bir adımdır. Platin tabanlı ilaçlar kovalent olarak GSH'ye bağlandığında, ortaya çıkan kompleks ABC taşıyıcı proteinler için bir substrattır ve böylece ilaçların hücre dışarısına atılımı gerçekleşir. GSH konjugasyonu süreci, glutatyon-S-transferaz (GST) enzim ailesi tarafından katalize edilir. Böylece platin tabanlı ilaçlara dirençli tümör hücrelerinde yüksek GSH ve GST seviyeleri bulunmuştur (4).

2525 Apoptozdan Kaçma

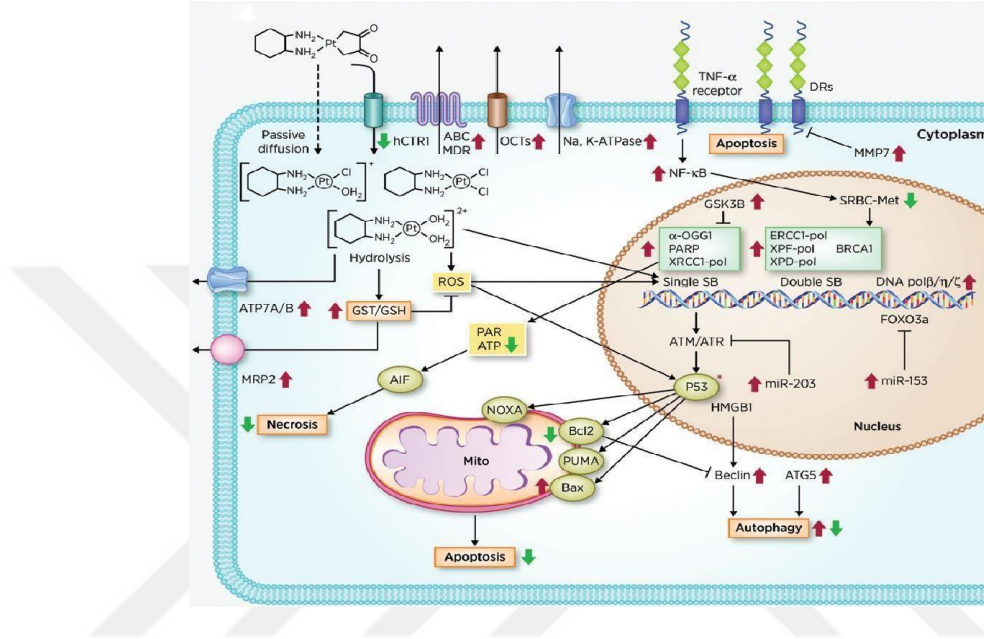
Oksaliplatin sitotoksik etkisini apoptozun içsel ve dışsal yollarını kullanarak gösterebilir. Apoptoz inhibitörleri, programlanmış hücre ölümünün endojen inhibitörleri olarak hareket eden bir protein ailesidir. Bazı üyeleri, oksaliplatine dirençle ilişkilendirilmiştir. Örneğin, oksaliplatine karşı kazanılmış dirençli insan kolorektal kanser hücre dizilerinde, ebeveyn hücrelere kıyasla daha yüksek düzeyde survivin gözlemlenmiştir.

İntrinsik apoptotik yol, Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenir. Bu aile hem proapoptotik (Bad, Bak ve Bax) hem de antiapoptotik üyeleri (Bcl-2, Bcl-xl ve Mcl-1) içerir. Proapoptotik Bax kaybı oksaliplatine hassasiyeti azaltırken, antiapoptotik üyeler Bcl-2 ve Bcl-xl'in aşağı regülasyonu oksaliplatine olan hassasiyeti artırır. Ekstrinsik apoptoz yolağına, spesifik ligandların birleşmesinden sonra ölüm reseptörlerinin (TNFR1, Fas / CD95, TRAIL, DR4 ve DR5) aktivasyonu aracılık eder. Bu yolun bozulması oksaliplatin direncini artırır (10).

2526 DNA Onarım Mekanizmalarının Aktivasyonu

DNA eklentilerinin oluşumu, platin bileşikleri tarafından anti-kanser aktivitesini indüklemek için çok önemlidir. Bu nedenle, DNA onarımında yer alan moleküler mekanizmalar, anti-kanser aktivitelerinin belirlenmesinde önemli bir role sahiptir. Sisplatin-DNA eklentileri yanlış eşleşme onarım (mismatch repair, MMR) sistemi tarafından tanınabilir ve onarılabılır, oysa oksaliplatin-DNA eklentilerinin onarımında MMR'lar sorumlu değildir. Öte yandan, oksaliplatin tarafından

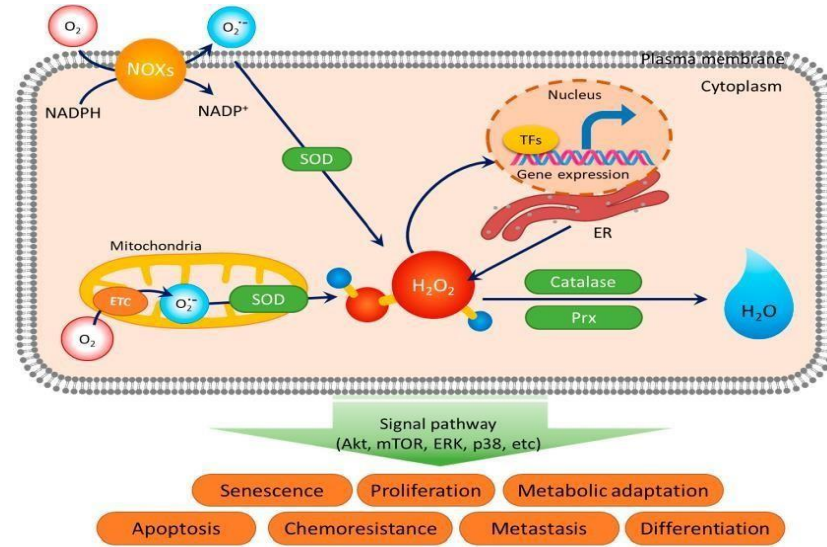
indüklenen DNA hasarı, NER sistemi tarafından onarılır. En önemli NER mediyatörlerinden biri olan eksizyon onarımı çapraz tamamlayıcı grup 1 (excision repair cross-complementing group 1, ERCC1) ve katalitik partneri XPF (xeroderma pygmentosum grup F, ERCC4) oksaliplatin direncinde rol oynadığı belirtilmiştir (34).



Şekil 4. Oksaliplatin ile ilişkili direnç mekanizmaları

2.6. Reaktif Oksijen Türleri

Oldukça reaktif iyon ve moleküllerden oluşan bir grup olan reaktif oksijen türleri (ROS), çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde yer alan güçlü sinyal molekülleridir. ROS'lar değişik patofizyolojik özelliklere sahiptir. Örneğin, kanser hücrelerinin normal hücrelere göre daha yüksek ROS seviyelerine sahip olduğu bilinmektedir. Bu kısmen, kanser hücrelerinde gelişmiş bir metabolizma ve mitokondriyal disfonksiyondan kaynaklanmaktadır. Kanser hücrelerinde artan ROS üretimi, tümörün başlaması ve ilerlemesi için gerekli biyokimyasal veya moleküler değişikliklere, apoptozdan kaçmasına ek olarak ilaç direncine de sebep olmaktadır (Şekil 5) (35).



Şekil 5. ROS; proliferasyon, apoptoz, metastaz, ilaç direnci ve diferensiyasyon gibi hücresel süreçleri çeşitli sinyal yolları ile düzenler (35).

2.6.1. ROSReaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu ve Eliminasyonu

ROS hem serbest radikal hem de radikal olmayan gruplardan oluşur. Serbest radikal grubu, süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), peroksil radikali ($RO_2^{\bullet}$), hidroksil radikali ($\bullet OH$) ve hidroperoksil radikalini ($HO_2^{\bullet}$) içerir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve tek oksijen (1O_2) radikal olmayan ROS olarak sınıflandırılır. Hücre içi ROS üretimi, mitokondride ATP sentezi, endoplazmik retikulumda (ER) protein sentezi ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (NOX) enzim ailesinin aktivasyonu ile üretilir (36).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu, birkaç eksojen ve endojen faktör tarafından tetiklenebilir. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri (ETS), çoğu memeli dokusunda ROS'un ana endojen kaynağıdır. ETS'de, esas olarak kompleks I ve III'te, $O_2^{\bullet-}$ mitokondriyal matraste O_2 'nin tek elektron indirgenmesiyle oluşur. Aynı zamanda kompleks III, mitokondriyal zarlar arası boşluğa O_2 salgılayabilir. $O_2^{\bullet-}$ ETS kompleksi II'de de üretilebilir. Mitokondride oluşan, $O_2^{\bullet-}$, voltaja bağlı anyon kanalları aracılığıyla sitozole yayılabilir. ROS'un diğer önemli endojen kaynakları, NOX, ksantin oksidaz (XO), lipoksijenazlar (LOX) ve sitokrom P450 gibi enzimlerdir (37).

NOX ailesi enzimleri, yani NOX1-5, dual oksidaz 1 (DUOX1) ve dual oksidaz 2 (DUOX2), ROS üretme işlevine sahiptir. Etkinleştirildiğinde, NOX1-3'ün tümü esas olarak $O_2^{\bullet-}$ üretirken, NOX4, DUOX1 ve DUOX2 doğrudan H_2O_2 üretebilir.

Ek olarak, yukarıda belirtildiği gibi, ROS üretimi radyasyon, ilaçlar, kimyasallar, ağır metaller ve kirleticiler gibi çok sayıda eksojen faktör tarafından da oluşturulabilir.

ROS'un çok sayıda biyolojik süreç ve hastalık durumu ile bağlantılı olması nedeniyle, ROS üretimi ve temizliği arasındaki denge kritik bir öneme sahiptir. Hücrel redoks dengesi metabolizmada bulunan güçlü antioksidan sistemler ile korunur. Bu antioksidan sistemler üç sınıfa ayrılabilirler: endojen antioksidanlar (bilirubin, katalaz (CAT), ferritin, süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon, koenzim Q, L-karnitin, alfa lipoik asit, glutatyon peroksidaz (GPx), melatonin, metalotiyonin, tioredoksinler, peroksiredoksinler (Prx) ve ürik asit), doğal antioksidanlar (askorbik asit, polifenol metabolitleri, karoten, E vitamini ve A vitamini) ve sentetik antioksidanlar (Nrf2, tiron, piruvat, selenyum ve N-asetil sistein (NAC)) (38).

Daha önce bahsedildiği gibi, SOD, $O_2^{\bullet-}$ 'nin H_2O_2 'ye ayrışmasını katalize eder ve bu daha sonra Prx sistemi, GPx sistemi ve katalaz ile suya indirgenebilir. İnsan SOD'u, barındırdıkları metal ko-faktör ve etki yerine bağlı olarak üç gruba ayrılabilir: Bakır / Çinko (CuZn)-SOD (SOD1), Manganez (Mn)-SOD (SOD2) ve hücre dışı CuZn-SOD (EC-SOD veya SOD3). Prx sistemi iki elektron vericisi ve iki tür antioksidan enzimden oluşur: Prx'in kendisi, tioredoksin redüktaz (TrxR), tioredoksin (TRX) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH). H_2O_2 metabolizması sırasında Prx oksitlenir ve inaktive edilir. TRX, acil bir elektron vericisi olarak hareket eder ve Prx'i aktif forma geri getirir. TRX daha sonra elektronlarını NADPH'den alan TrxR tarafından indirgenir (39).

2.6.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Karsinogenesisiz

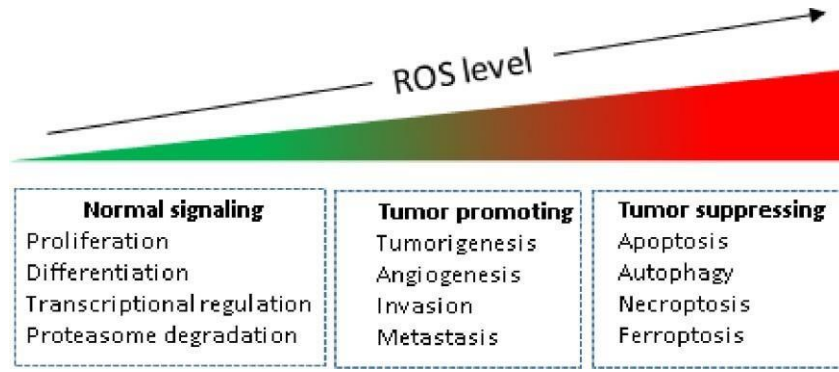
ROS, konsantrasyona ve süreye bağlı olarak, hücrel proteinleri, lipidleri ve DNA'yı etkileyebilir ve bu da genomik kararsızlığa ve karsinogenez ile ilgili çeşitli sinyalleme kaskadlarının aktivasyonuna yol açabilir (Şekil 6). ROS'un karsinogenezi

destekleyebileceği mekanizmalardan biri de onkogenlerin aktivasyonuna veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna yol açan DNA hasarıdır.

Önemli genetik değişiklikleri tetiklemenin yanı sıra, ROS, çeşitli epigenetik değişikliklere aracılık ederek tümörjenezini indükleyebilir. Tümör baskılayıcı genlerin metilasyonu ve inaktivasyonu, oksidatif stresin neden olduğu tümör oluşumunda en yaygın epigenetik değişikliklerdir (40).

Reaktif oksijen türleri, tümör hücresi proliferasyonunda yer alan birkaç proteinin veya sinyal yollarının aktivitelerini modüle edebilir. Fosfoinositid 3-kinaz/protein kinaz B (PI3K/PKB; çoğunlukla PI3K/Akt olarak belirtilir.) ve mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) sinyal yolları, tümör hücresi proliferasyonunda rol oynar. ROS'un, fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) ve protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B) gibi PI3K/Akt fosfatazlarını etkisiz hale getirdiği ve böylece pro-proliferatif PI3K/Akt sinyallemesini desteklediği gösterilmiştir. Proliferasyonu indüklemenin yanı sıra, PI3K/Akt sinyal yolu ayrıca tümör hücresinin hayatta kalmasında, kemoterapiye dirençte ve hücre ölümünden korunmada da rol oynar. Ek olarak, ROS'un, tümör hücresi proliferasyonuna ve ilerlemesine yol açan MAPK yolunu aktive ettiği gösterilmiştir (41).

ROS'un tümörjenik aktivitesinin aktivatör protein 1 (AP-1), nükleer faktör- κ B (NF- κ B), nükleer faktör eritroid 2 – ilişkili faktör 2 (Nrf2), hipoksiyle indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α) ve p53 gibi transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi aracılığıyla gerçekleştirilebilir (41).



Şekil 6. ROS oluşumunun miktara bağlı olarak hücre içerisinde etki gösterdiği biyokimyasal ve biyolojik etki mekanizmaları

2.6.3. *Reaktif Oksijen Türleri ve Metastaz*

ROS, migrasyon ve invazyonda önemli rol oynar. Literatürde birkaç çalışma, ROS'un EMT'nin önemli bir nedeni olduğunu kanıtlamaktadır (42). Meng ve ark. pankreas adenokarsinomunda, antioksidan enzim olan glutatyon peroksidaz-1'in ekspresyonunu inhibe ederek ROS aracılı Akt/glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β)/Snail yolağının aktive edildiğini göstermişlerdir. Bunun sonucu olarak artan ROS konsantrasyonu ile EMT ve ilaç direncinin de arttığını görmüşlerdir (43). TGF- β 1, ROS'a bağlı mekanizmalar yoluyla hücre göçünü ve istilasını kolaylaştırmak için uPA (Ürokinaz tipi Plazminojen Aktivatör) ve MMP-9'u düzenler (44).

Endojen büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin, tümör hücrelerinin yayılmasında önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi büyüme faktörlerinin yanı sıra tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi sitokinler, NOX veya mitokondriyal ETS aracılı ROS oluşumunu indükler ve artan tümör hücrelerinin invazivliğine sebep olur. Alternatif olarak NOX, LOX veya mitokondriyal ETS tarafından üretilen ROS, hücreleri ekstraselüler matris (ECM) bağlayan ve bir hücre yapışma reseptörü olan integrinin aktivasyonunu sağlayarak hücre göçüne sebep olur (35).

Alternatif bir mekanizmada, ROS'un fosfotirozin fosfatazı (PTP) inhibe ettiği, böylece enzimin, hücre hareketliliğinin kontrolünde yer alan fokal adezyon kinazı (FAK) defosforile etmesini ve inaktive etmesini önlediği bildirilmiştir. Örneğin, büyüme faktörü aktivasyonu ve integrin birleşmesinin bir sonucu olarak salınan ROS'un FAK aktivasyonuna aracılık ettiği ve hücre sel göçe yol açtığı bilinmektedir (35).

ROS'un hücre göçüne katıldığı bir başka olası mekanizma, aktin hücre iskeletinin modüle edilmesidir. NOX aracılı H_2O_2 oluşumunun slingshot 1L (SSH1L) proteinlerini uyarmaktadır. Bu protein ise aktin hücre iskeletinin yeniden şekillenmesini düzenleyen ve hücre göçüne yardımcı olan bir aktin bağlayıcı protein olan kofilini aktive etmektedir (35).

Glikozaminoglikanın (GAG) ve diğer ECM bileşenlerinin proteolitik bozunması, ROS'un metastaza yol açan tümör hücresi göçüne teşvik ettiği diğer birkaç mekanizmadan biridir. ECM'nin ROS bağımlı degradasyonu, bir dizi farklı mekanizma yoluyla meydana gelebilir: (1) ECM bileşenlerinin proteolitik bozunmasından sorumlu olan metaloproteinazların (MMP) aktivitesinin ve ekspresyonunun indüksiyonu. (2) MMP'lerin proteolitik aktivitelerini sınırlayan inhibitörlerin inhibisyonu ve (3) uPA ekspresyonunun indüksiyonu. MMP'lerin ve uPA'nın ekspresyonu, ROS-bağımlı MAPK aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşebilir (35).

2.7. Fitokimyasallar

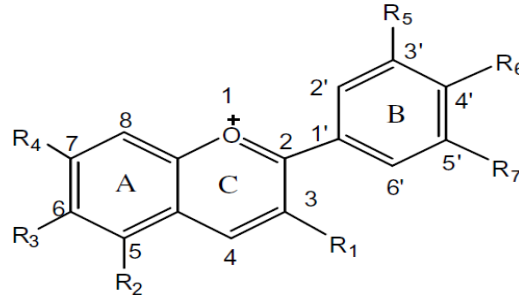
Fitokimyasallar, çoğunlukla meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda, baharatlarda ve diğer bitkisel gıdalarda bulunan, genellikle destekleyici ve hastalık önleyici özelliklere sahip, besleyici olmayan bitkisel sekonder metabolitlerdir (45). Sekonder metabolitler ilaç ve gıda endüstrilerinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda kozmetik ve tarım kimyası gibi alanlarda da kullanılmaktadır (46).

Bitkilerde biyosentez yollarına dayalı olarak, nitrojen içeren bileşikler (siyanojenik glikozitler, alkaloidler ve glukozinolatlar), fenolik bileşikler (flavonoidler ve fenilpropanoidler) ve terpenler (izoprenoidler) dahil olmak üzere üç ana bitkisel sekonder metabolit grubu vardır (46).

2.7.1. Antosiyaninler

Antosiyanin kelimesi Yunancadaki anthos (çiçek) ve kianos (mavi) kelimelerinden türemiş bir kelimedir. Antosiyaninler, fenolik bileşik sınıfından flovonoid grubuna ait bir fitokimyasaldır.

Antosiyanidinler, antosiyaninlerin temel yapılarıdır. Antosiyanidinler (aglikonlar), oksijen içeren bir heterosiklik halkaya [C] bağlı aromatik bir halkadan [A] oluşur ve bu da üçüncü bir aromatik halkaya [B] bir karbon-karbon bağıyla bağlanır (Şekil 7). Antosiyaninler, bitkilerde antosiyanidin molekülünün bir şekerle birleştiği glikozitler formunda doğal olarak bulunur (47). Antosiyaninler, B halkası üzerindeki gruplara, yapılarında bulunan konjuge şeker sayısına ve tipine ve bir açıl grubunun varlığına bağlı olarak doğada birçok çeşitte bulunabilirler (Şekil 7). Şimdiye kadar, 500'den fazla farklı antosiyanin ve 23 antosiyanidin literatürde tanımlanmıştır. Antosiyanidinlerden sadece altısı bitkilerde en yaygın olarak bulunur (Tablo 3). Bunlar pelargonidin (Pg), peonidin (Pn), siyanidin (Cy), malvinidin (Mv), petunidin (Pt) ve delfinidin (Dp)'dir (48). Meyve ve sebzelerde daha yaygın olan altı antosiyanidin dağılımı şu şekildedir: Cy %50, Dp %12, Pg %12, Pn %12, Pt %7 ve Mv %7. Doğada daha yaygın olan glikozit türevleri 3-monositler, 3-biyositler, 3,5-ve 3,7-diglukositlerdir. En yaygın antosiyanin ise Cy-3-glukoziddir (49).



Şekil 7. Genel antosiyanidin (aglikon) iskeleti yapısı (49)

Tablo 3: Antosiyanidin yapısına bağlanan gruplar ve adlandırılması (49)

<u>R₅</u>	<u>R₇</u>	<u>Antosiyanidin</u>
H	H	Pelargonidin
OH	H	Siyanidin
OCH ₃	H	Peonidin
OH	OH	Delfinidin
OCH ₃	OH	Petunidin
OCH ₃	OCH ₃	Malvidin

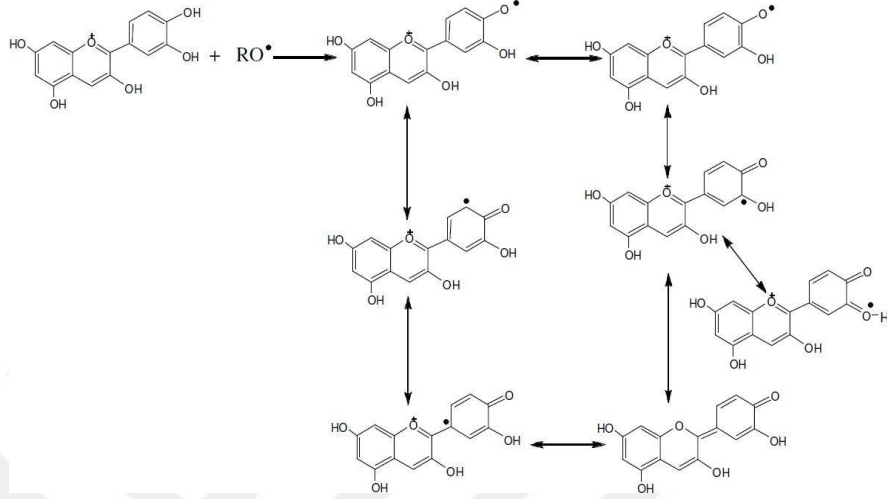
27.1.1. Antosiyaninlerin Antioksidan Özellikleri

Antosiyaninler, anti-inflamasyon, anti-proliferasyon, apoptoz indüksiyonu, hücre döngüsü regülasyonu, anti-invazyon ve anti-anjiyogenez gibi biyolojik aktivitelere sahiptirler. Bunların yanında antosiyaninler hücre içerisinde reaktif oksijen türleri temizleyerek oksidatif stresi de engellerler (45).

Oksitlenmesi daha kolay olan bileşikler genellikle en iyi antioksidanlardır (reaktif serbest radikallere bir serbest elektron veya hidrojen atomu verebilen moleküller). Çeşitli çalışmalar, antosiyanin içeriğinin ve bunlara karşılık gelen antioksidan aktivitesinin, meyvelerin ve sebzelerin dejeneratif ve kronik hastalıklara karşı koruyucu etkisine katkıda bulunduğunu ileri sürmektedir. Yüksek fenolik bileşik içerikli bazı bitki ve meyve özütlerinin, mutajenez ve karsinogenez inhibitörleri olarak işlev gördüğü bildirilmiştir. Bir antioksidan aktivite sergileyen fitokimyasal maddeler, fenolik bileşiklerin (flavonoidler) yanı sıra, azotlu bileşikler (klorofil türevleri), tokoferoller, karotenoidler ve askorbik asidi içerir (50).

Antosiyaninler, C ve E vitaminlerinden daha yüksek bir antioksidan aktivite göstermektedir. Bu bileşikler, fenolik hidrojen atomlarının verilmesiyle serbest radikalleri yakalayabilir. Ayrıca böğürtlen, kırmızı ahududu, siyah ahududu ve çilek gibi kırmızı meyvelerin antioksidan kapasite değerleri ile antosiyanin içeriği arasında

doğrusal bir ilişki olduğu bildirilmiştir; ek olarak, meyve özlerinin kimyasal olarak üretilen reaktif oksijen türlerine karşı yüksek bir temizleme aktivitesine sahip olduğu açıklanmıştır (Şekil 8) (50).



Şekil 8. Siyanidin için önerilen stabilizasyon mekanizması.

27.12 Antosiyanin ve Kanser

Antosiyonidin ve antosiyoninlerin tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu uyarmadaki ve pro-onkogenik sinyalleri aşağı regüle (down-regulation) etmenin yanı sıra proliferasyon ve apoptoz yollarını kontrol etmedeki rolleri literatürde gösterilmiştir (51). Aynı zamanda antosiyanidinlerin ve antosiyaninlerin kanser tedavisinde oluşan çoklu ilaç direncine de etki gösterdiği belirtilmiştir (52). Özellikle siyanidin-3-glukozidin de içinde bulunduğu 7 antosiyaninin ABC proteinlerine yüksek afinite gösterdiği literatürde belirtilmiştir (53). Bunun yanında direnç mekanizmalarından biri olan DNA tamir mekanizmasında bulunan topoizomerez aktivitesini de inhibe ettiği literatürde gösterilmiştir (54).

Mazewski ve ark. siyanidin-3-glikozit ve delfinidin-3-glikozit'in kolorektal kanser hücre hatları (HCT-116 ve HT-29) üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda her iki antosiyaninin de sitotoksik etki gösterdiğini ve anti-apoptotik (survivin, cIAP-2, XIAP) proteinlerin ekspresyonunu azalttığını bulmuşlardır (55). Huang ve ark. delfinidinin kolorektal kanseri hücre hatlarındaki canlılığı ve metastatik özellikler üzerindeki etkisini analiz etmişlerdir.

Bulgular doğrultusunda delfinidinin koloni oluşumunu inhibe ettiğini fakat hücre canlılığı üzerinde çok fazla etki göstermediğini bulmuşlardır. Bunun yanında integrin/FAK sinyallemesini inhibe ederek KKK hücrelerinde anti-metastatik etkiler uyguladığını ve KKK metastazında önemli bir rol oynayabileceğini göstermişlerdir (56).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu tez çalışması tanımlayıcı bir proje olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu tez çalışması Eylül 2020-Temmuz 2021 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Örneklemi

Bu tez çalışması kapsamında ticari olarak alınan hücre hattı (HCT-116) ile *in-vitro* bir araştırma olarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. Çalışma Materyali

Bu tez çalışması kapsamında American Type Culture Collection'dan (ATCC®) ticari olarak alınan insan kolorektal kanser karsinom hücre hattı olan HCT-116 (CCL-247™) kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Dirençli hücre davranışları, E-kaderin, N-kaderin, vimentin, ROS ve bağımlı değişken; C3G ile oksaliptatin ajanı bağımsız değişkendir.

3.6. Veri Toplama Araçları

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

Tablo 1: Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Malzeme Adı	Markası/Kod	Kullanım Amacı
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattı	ATCC- HTB-14	In vitro çalışmalar gerçekleştirildi
Dulbecco's Mc Coy's 5A Medium	Cegrogen Biotech GmbH-E0500-140	HCT-116 ve HCT-116-ROx hücrelerinin kültüre edilmesi
Penisilin- Streptomisin (10,000U/ml)	Cegrogen Biotech GmbH-P0100-790	U87-MG hücrelerinin kültür ortamına eklenen antibiyotik
Fetal sığır serum (FBS)	Cegrogen Biotech GmbH-A0500-3030	U87-MG hücrelerinin kültür ortamına eklendi
Siyanidin-3-O-glukozit	Sigma Aldrich-PHL89616	Fitokimyasal

Oksaliplatin	Sigma Aldrich-O9512	FDA onaylı kemoterapötik ajan
Alexa Fluor-488-goat anti-mouse	-	Sekonder E-kaderin belirteci
Alexa Fluor-568 goat anti-rabbit	-	Sekonder N-kaderin belirteci
Alexa Fluor-647 goat anti-chicken	-	Sekonder vimentin belirteci
poliklonal Ki-67 antikoru	Abcam- ab15580	Immunfloresan boyamada proliferasyon biyobelirteci
DAPI	PanReac AppliChem-A4099,0010	Hücrelerin çekirdekleri boyandı
Paraformaldehit solüsyonu%4	ChemCruz- sc281692	Immunfloresans boyama öncesi hücrelerin fiksasyonunda kullanıldı
Fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH 7.4 (10X) (PBS)	Cegrogen Biotech GmbH-H0500-550	Hücre kültürü solüsyonları hazırlandı
Tripan mavisi	Sigma Aldrich- T8154	Hücre sayımında kullanıldı
Dimetil sülfoksit (DMSO)	PanReac AppliChem-A3672,0250	Inhibitörlerin çözgeni ve hücre dondurma çözeltisinde kullanıldı
WST-1 reaktifi	Roche- 05015944001	Hücre proliferasyon analiz reaktifi
FastStart Essential DNA Green Master	Roche-06402712001	PCR reaksiyonları için gerekli enzim ve belirteç karışımı
EvoScript Universal cDNA Master	Roche- 07912374001	cDNA sentez kiti
NucleoSpin RNA Mini Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH- 740955.50	RNA izolasyon kiti
Primer Universal Optimize	Roche- 330001	PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere primerler
Trypsin-EDTA (0.05 %) in DPBS (1x)	Cegrogen Biotech GmbH-N0100-720	Hücrelerin pasajlanmasında kullanıldı

3.6.1. Hücre Kültürü

Bu projede ticari HCT-116 (ATCC® CCL-247™) kolorektal kanser hücre hattı kullanıldı. Hücre hattı ATCC'den (American Type Culture Collection) temin edilmiştir. Temin edilen hücre hattının sahip olduğu karakteristik özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 2: HCT-116'nın karakteristik özellikleri

Hücre	Hasta Bilgisi	Doku	Hastalık	Morfoloji	Mutasyon
HCT-116	Yetişkin/Erkek	Kolon	Kolorektal Karsinom	Epitelyal	RAS-kodon 13

Kolorektal kanser HCT-116 hücre hattı %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-Glu içeren Mc Coy's 5A hücre kültürü ortamında, %5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde, %80-90 doygunluğa ulaşıncaya kadar 75 cm²'lik flasklar içerisinde büyütüldü.

Kullanılacak hücreler istenilen çoğunluğa ulaştığında tek tabaka (monolayer) olarak yapışan hücrelerin flask yüzeyinden kalkmasını önlemek amacıyla hücreler pasajlandı.

Hücre pasaj aşamaları:

1. Flask içerisindeki hücre kültür ortamı serelojik pipetle ortamdan uzaklaştırıldı. Ardından hücreler yaklaşık 2-3 ml steril fosfat tamponu solüsyonu (Phosphate buffer solution, PBS) ile yıkandı. Bunun amacı flask içerisinde bulunan ortamı uzaklaştırarak tripsin/EDTA enziminin inhibe olmasını engellemek.
2. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra flask içerisindeki hücrelerin yapıştıkları ortamdan uzaklaştırmak için 1 ml tripsin/EDTA enzimi eklendi ve 37°C'de (enzim optimum sıcaklığı) 3 dk (dakika) boyunca inkübe edildi.
3. İnkübasyondan sonra kalkan hücrelerin tripsin/EDTA'dan zarar görmesini engellemek için hücre süspansiyonu üzerine 2 ml (eklenen enzim miktarının 2 katı) hücre kültür ortamı eklendi. Daha sonra hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüplerine alınarak 1200 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlendi.
4. Santrifüj işleminden sonra süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak pellet üzerine taze hücre ortamı eklenerek süspanse edildi.

5. Hücrelerin devamlılığını sağlamak amacıyla hücre sayısı belirlendi. 10^6 hücre 75 cm²'lik flask içerisine alınıp devam ettirildi. Ekim yapılmamış hücreler ise bir sonraki deneylerde kullanılmak üzere -145 °C'de depolandı.

Bir sonraki deneylerde kullanmak için hücreler donduruldu. Dondurma aşamaları aşağıda sırasıyla verilmiştir.

Hücre dondurma aşamaları

1. Enzim uzaklaştırıldıktan sonra taze hücre kültür ortamı ile süspanse edilen hücreler sayılmıştır.
2. Daha sonra süspanse olarak bulunan hücreler 1250 rpm'de 5 dk boyunca 4 °C'de santrifüjlenmiş ve süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır.
3. Kalan hücreler dondurma ortamında (%90 FBS ve %10 DMSO) tekrar süspanse edilmiştir. Her dondurma tüpüne yaklaşık 10^6 hücre eklenmiş ve önce -20°C'de yaklaşık 2 saat derecesi düşürülmüş, ardından -145 °C'ye kaldırarak hücreler dondurulmuştur.

362 Oksaliplatin Çözeltilisinin Hazırlanması

Oksaliplatin 5 mg/ml olacak şekilde 10 ml serum fizyolojik su içerisinde çözölmüştür ve 1,5 ml'lik ependorflar içerisine paylaştırılarak +4 °C'de saklanmıştır.

363 Siyanidin-3-O-glukozit (C3G) Çözeltilisinin Hazırlanması

C3G çözeltisi hazırlamak için ilk olarak metanol içerisinde %0,01 HCl (20 ml içerisinde 1 µl HCl) çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra C3G'yi çözmek için üzerine eklendi. 5000 µM olacak şekilde ana stok çözeltisi oluşturuldu. Oluşturulan ana stok dondur-çöz işleminden kaçınmak için 500 µl olacak şekilde ependorflar içerisine paylaştırıldı ve -20°C'de saklandı.

364 İlaç Direnci Geliştirme Deneyi

Kolorektal kanser HCT-116 hücre hattını oksaliplatine karşı direnç kazandırabilmek için 6'lık plakalarda her kuyucuya 2×10^4 hücre ekildi. Ekilen hücrelerin yapışmasını sağlamak için 24 saat beklendi. 24 saatin sonunda yapışmayan hücreler PBS ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelerin ilaçlı ortama alıştırmak için 1 µM oksaliplatin eklendi. Hücreler 24 saat boyunca ilaçlı ortamda bekletildikten sonra PBS ile yıkandı ve tekrardan 2 µM ilaçlı ortam eklendi. Daha sonra 3-10 µM arasındaki ilaç konsantrasyonları hücreler üzerine 48 saat uygulandı ve her 48 saatin sonunda ilaçlı hücre ortamı ilaçsız ortam

ile değiştirilerek hücrelerin prolifer olmaları sağlandı. 10 ile 40 μM arasındaki dozlar 72 saat uygulandı ve her doz artışı ikişer ikişer yapıldı. Her 72 saatin sonunda ilaçlı ortam uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra 48 saat boyunca hücrelere ilaçsız ortam verilerek hücrelerin çoğalmaları sağlandı. Bu dozlar aralığında ise oksaliplatinli ortama alışmış hücreler arasından dirençli olabilecek hücrelerin seçimi sağlandı. Daha sonra hücreler 40 ile 52 μM konsantrasyon aralığında ilaç ile muamele edildi ve her ilaç denemesinden sonra hücreler üzerine ilaçsız kültür ortamı eklendi ve hücreler yaklaşık 72 saat ilaçsız ortamda büyütüldü.

3.6.5. Dirençli Hücre Karakterizasyonu

Edinilmiş ilaç direncini kanıtlamak için parent hücreler ile karşılaştırmalı olarak çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalar;

3.6.5.1. İlaç Sitotoksite Deneyi

Oksaliplatine direnç kazanan hücre hattı (HCT-116ROx) ile parental hücrenin (HCT-116) oksaliplatine karşı IC_{50} değerleri bulundu. Bunun için WST-1 ajanı kullanıldı. HCT-116-ROx ve HCT-116 96 kuyucuklu plakalara 100 μl içerisinde 10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin kuyucuklara yapışması için 24 saat bekledi. 24 saat sonra hücreler 3, 6, 12, 24, 48, 96 ve 192 μM konsantrasyonlarında oksaliplatin ile muamele edildi ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler üzerine 10 μl WST-1 ajanı eklendi ve 4 saat inkübe edildi. Son olarak 430 nm dalga boyunda 650 nm referans dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm alınarak ilacın her iki hücre grubunda IC_{50} değeri hesaplandı. Tüm konsantrasyonlar ve deney kolu 4 tekrarlı olarak çalışıldı.

3.6.5.2. Yara İyileşmesi Deneyi

HCT-116 ve HCT-116-ROx hücrelerinin migratif özelliklerini karşılaştırmak için yara iyileşmesi modeli kullanıldı. HCT-116 ve HCT-116-ROx hücreleri 6 kuyucuklu plakalara 2 ml içerisinde 3×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler yaklaşık olarak 72 saat sonra %80-90 konfluensiye ulaştıklarında 200 μl 'lik pipet ucu ile kuyucuğun ortasından yarık açıldı ve hücre ortamı içerisinde bulunan hücreler 1X PBS ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra yarığın iki yanındaki hücrelerin açılan boşluğa hareketi 0, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde mikroskopta incelenerek görüntü alındı ve yaranın kapanması hesaplandı. Yara iyileşmesi deneyi en az 3 kere ve en az 3 tekrarlı bir şekilde çalışıldı.

% Yara kapanması = [Yara açıklığı (t₀) – Yara açıklığı (t_x)*] / Yara açıklığı (t₀) × 100 (*=12, 24, 48. saat)

3.6.5.3 Hücresel Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi

Reaktif oksijen türlerinin EMT'yi indükleyerek ilaç direncine sebep olduğunu göstermek için hücre içerisindeki total reaktif oksijen türleri ROS Detection Assay Kit (Biovision, katalog no: K936-100, ABD) protokolüne göre yapılmıştır. ROS Detection Assay Kit canlı hücrelerdeki hidroksil, peroksil veya diğer reaktif oksijen türlerinin saptanması için tasarlanmıştır. En az 3 kere tekrarlı bir şekilde çalışıldı. Kit protokolü;

1. 96'lık plakalara her kuyucuğa 100 µl içerisinde 5×10⁴ hücre olacak şekilde ekildi ve gece boyunca kuyucuklara yapışması için bekletildi. Ertesi gün hücre ortamı uzaklaştırılıp hücreler kit içerisinde olan 100 µl ROS Assay Buffer ile yıkandı.
2. 1000X ROS Label, ROS Assay Buffer ile 1X'e seyreltildi. Seyreltilen ROS Label 100 µl hücreler üzerine eklendi. 45 dk boyunca 37°C'de karanlıkta inkübe edildi.
3. ROS Label ortamdan uzaklaştırılıp 100 µl ROS Assay Buffer ya da PBS eklenip 495/529 nm'de mikropate okuyucuda floresans ölçüm alındı.
4. Deney aşamasında pozitif kontrol olarak kit içerisinde olan 250X ROS Inducer kullanıldı. Kullanımdan önce ROS Inducer, ROS Assay Buffer ile 1X'e seyreltildi.

Aynı deney kolu dirençli hücrelere (HCT-116-ROx) 20 µM C3G uygulandıktan sonra da tekrarlandı.

3.6.5.4 Epitelyal-Mezenkimal Dönüşümün Gösterilmesi

Dirençli hücrelerde mezenkimal karakterin arttığını göstermek için PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) analizi ve immünfloresans boyamalar yapıldı. Her deney setinde kontrol olarak parental hücreler kullanıldı.

20 µM C3G ile muamele edilen dirençli hücrelerde ise mezenkimal karakterin azaldığını ve epitelyal karakterin arttığını göstermek için PCR analizi ve immünfloresans boyama yapıldı. Kontrol olarak C3G ile muamele edilmeyen dirençli hücreler kullanıldı.

36541. RT-PCR Analizi

PCR analizi ile dirençli hücrelerde EMT biyobelirteçlerine bakıldı. Mezenkimal karakterin arttığını, epitelyal karakterinde azaldığını göstermek için E-kaderin ve Vimentin biyobelirteçlerin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyelerine bakıldı. Karşılaştırma yapabilmek için kontrol olarak parental hücreler kullanıldı.

İlaç uygulanan hücrelerin direnç kazandığı kanıtlandıktan sonra C3G uygulanan dirençli hücrelerde de PCR analizi yapıldı. Bu deney kolunda C3G uygulanan hücrelerde epitelyal karakterin arttığı, mezenkimal karakterin azaldığını kanıtlamak için yapıldı. Bu deney kolunda kontrol olarak C3G uygulanmamış dirençli hücreler kullanıldı.

İlk olarak hem dirençli hücrelerde hem de parental hücrelerde RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu için NucleoSpin RNA (katalog no: 740955.50, MN) kiti kullanıldı. En az 3 tekrarlı çalışıldı. İşlem basamakları şu şekilde yapıldı;

1. Flasklar içinde büyütülen hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tripsin/EDTA yardımı ile kaldırıldı.
2. Tripsin/EDTA hücre ortamı ile inhibe edildikten sonra santrifüj ile ortamdan uzaklaştırıldı ve pellet tekrardan 1 ml PBS ile yıkandı.
3. Hücreler tekrardan santrifüjlendi ve supernatant atıldı.
4. Pellete 350 µL RA1 ve 3.5 µL β-merkaptoetanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
5. Elde edilen lizat mor renkli olan kolona alındı, altına 2mL tüp takılıp 1 dk boyunca 11000 G'de santrifüjlendi ve mor halkalı kolon atıldı.
6. Ependorf üzerine 350 µl %70 etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
7. Mavi renkli kolon altına 2 ml'lik tüp takıldı ve iyice pipetaj yapılan örnek buraya alınıp 30 sn 11000 G'de santrifüjlendi ve alttaki 2 mL tüp atıldı.
8. Yeni 2 mL tüp takılarak üzerine 350 µl MDB solüsyonu eklendi ve 1 dk 11000 G'de santrifüjlendi.
9. Daha sonra başka bir tüpte her reaksiyon için; 10 µl rDNase + 90 µl reaction buffer karıştırıldı.
10. 95 µl DNase reaction mix direkt membran üzerine konur ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

Yıkamalar:

1. 200 µl RAW2 solüsyonu eklendi, 30 sn 11000 G'de santrifüjlendi ve yeni 2 mL tüp takıldı.
2. 600 µl RA3 solüsyonu eklendi, 30 sn 11000 G'de santrifüjlendi.
3. 250 µl RA3 solüsyonu eklendi, 2 dk 11000 G'de santrifüjlenip yeni 1,5 ml'lik tüp takıldı.
4. Son işlem olarak RNA'yı kolondan elue etmek için 60 µl RNase-free su eklendi ve 11000 G'de 1 dk santrifüjlendi.
5. Elde edilen RNA NanoDrop200C ile konsantrasyon hesaplandı. A260 / A280 OD değeri yaklaşık olarak 1.9-2.1 aralığında olmasına dikkat edildi.

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA elde edebilmek için cDNA sentez kiti (Evoscript universal cDNA synthesis kit, katalog no: 7912374001) kullanıldı. Yaklaşık 10 µl RNA örneği + 4 µl su + 4 µl reaction buffer 18 µl olacak şekilde her örnek için hazırlandı. Örnekler 5 dk boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında 2 µl enzyme mix eklendi ve thermal cycler'a yerleştirildi. Thermal cycler'da 15 dk 42°C, 5 dk 85 °C, 15 dk 65 °C ve en son 4°C'de inkübe edildi. Elde edilen cDNA'ların üzerine son olarak 80 µl DNase/Rnase free su eklendi ve 30 sn vortex + 30 sn spin edilerek deneylerde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

PCR reaksiyonu hazırlamak için primerler konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde 150 µl su içerisinde çözüldü. Daha sonra primer karışımı hazırlamak için 100 µl'de 100 µM primer konsantrasyonu olacak şekilde tablo 1'de gösterildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3: PCR reaksiyonunda kullanılacak primer hazırlıkları

Primer	Karışım (10 µM)
E-kaderin	10 µl reverse+ 10 µl forward + 80 µl RNase DNase free su
Vimentin	10 µl reverse+ 10 µl forward + 80 µl RNase DNase free su
GAPDH	10 µl reverse+ 10 µl forward + 80 µl RNase DNase free su

Hazırlanan primer karışımları her reaksiyonda 1 µl kullanılmak üzere 20 µl olacak şekilde ependorf tüplerine aliquotlandı.

Primer karışımları hazırlandıktan sonra PCR reaksiyonu hazırlamak için FastStart Essential DNA Green Master Kit (Katalog no: 6402712001, ROCHE), su, primer karışımları ve cDNA kullanıldı. PCR reaksiyonu gruplarının hazırlanışı aşağıda tablo 2’de gösterildiği gibi hazırlandı.

Tablo 4: PCR reaksiyonu için deney karışımları

Grup	Gen İsmi	İçindekiler
Örnek	E-kaderin	10 µl Green master mix, 1 µl E-kaderin mix 6,5 µl PCR Grade Water, 2,5 µl kalıp cDNA
Örnek	Vimentin	10 µl Green master mix, 1 µl Vimentin mix 6,5 µl PCR Grade Water, 2,5 µl kalıp cDNA
Örnek	GAPDH	10 µl Green master mix, 1 µl GAPDH mix 6,5 µl PCR Grade Water, 2,5 µl kalıp cDNA
Kontrol	E-kaderin	10 µl Green master mix, 1 µl E-kaderin mix 6,5 µl PCR Grade Water, 2,5 µl kalıp cDNA
Kontrol	Vimentin	10 µl Green master mix, 1 µl Vimentin mix 6,5 µl PCR Grade Water, 2,5 µl kalıp cDNA
Kontrol	GAPDH	10 µl Green master mix, 1 µl GAPDH mix 6,5 µl PCR

		Grade Water, 2,5 µl kalıp cDNA
Negatif Kontrol	E-kaderin	10 µl Green master mix, 1 µl E-kaderin mix 6,5 µl PCR Grade Water, 2,5 µl PCR Grade Water
Negatif Kontrol	Vimentin	10 µl Green master mix, 1 µl Vimentin mix 6,5 µl PCR Grade Water, 2,5 µl PCR Grade Water
Negatif Kontrol	GAPDH	10 µl Green master mix, 1 µl GAPDH mix 6,5 µl PCR Grade Water, 2,5 µl PCR Grade Water

PCR reaksiyonu için hazırlanan tüm örnekler reaksiyonun başlamasını engellemek için soğuk blok üzerinde çalışıldı ve toplam 20 µl tamamladıktan sonra örnekler cihaza yerleştirildi. Relatif kantitasyon yapabilmek için referans gen olarak GAPDH seçildi. Hesaplama olarak da $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanıldı.

Elde edilen PCR karışımlarında saflık kontrolünü yapabilmek için %1,5'luk agaroz jel elektorforezi kullanıldı. %1,5'luk agaroz jel hazırlamak için 200 ml 1X'lik TBE tamponu (Tris, Borik asit, EDTA) içerisine (20 ml 10X TBE + 180 ml distile su) 3 gr agaroz konularak mikrodalga fırın içerisinde kaynatarak çözüldü. Agaroz jel içerisine Gel Safe Red (BIOTUM, Katolog no: 41002) konuldu. Hazırlanan jel katılaşması için jel tepsisine döküldü ve taraklar takıldı. Daha sonra elektroforez tankı yaklaşık 2 L 1X TBE tamponu dolduruldu. Donan jel tarakları çıkartılarak tank içerisine alındı. PCR karışımları ve DNA Ladder (THERMO, Katalog no: SM0243) kuyucuklara yüklendi. Yüklenen ürünlerin yürütülmesi için cihaz 100 volt, 300 miliamper ve 300 watt değerleri girilerek 1,5 saat boyunca işlem uygulandı. Elektroforez işlemi bittikten sonra jel üzerindeki bantlar ultraviyole ışık altında DNA Ladder kontrolünde karşılaştırma yapıldı.

36542 İmmünfloresans Boyama

Hücreler Chambered Cell Culture Slides'lara (Falkon, ABD) 200 µl içerisinde 4×10^3 hücre ekildi. Bir gün boyunca yapışmasını beklemek için inkübatör içerisinde inkübe edildi. Daha sonra mezenkimal karakterin arttığını kanıtlamak için E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin boyamaları yapıldı. Kontrol olarak parental hücreler kullanıldı.

Bir diğ er deney kolunda ise dirençli hücreler kuyucuklara ekildikten 24 saat sonra C3G ile 48 saat muamele edildi. 48 saatin sonunda dirençli hücrelerde E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin boyamaları yapıldı. Kontrol olarak C3G ile muamele edilmeyen dirençli hücreler kullanıldı. En az 3 kere tekrarlı bir şekilde çalışıldı.

Boyama işlem basamakları;

1. Kuyucuklara ekilen hücreler istenilen işlemlerden geçtikten sonra hücre ortamı uzaklaştırıldı ve hücrelere zarar vermeden PBS ile yıkandı.
2. Yıkanan hücreler %4 paraformaldehit ile 20 dk oda sıcaklığında fıkse edildi.
3. Fiksasyon işleminden sonra hücreler, 1X PBS içerisinde %1'lik Triton-X100 solüsyonu hazırlanarak 5 dk permeabilizasyon işlemi yapıldı.
4. Primer antikörler için 1X PBS içerisinde %1 BSA olan boyama tamponu hazırlandı. Boyama tamponu içinde E-kaderin (dilüsyon 1:250), N-kaderin (dilüsyon 1:500) ve Vimentin (dilüsyon 1:250) antikörleri ile gece boyunca 4 C'de inkübe edildi.
5. Inkübasyon sonrası yüzeyde kalan antikör kalıntılarını uzaklaştırmak için 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi.
6. Yıkama basamakları bitince hücreler Alexa Fluor-488-goat anti-mouse (dilüsyon 1:1000), Alexa Fluor-568 goat anti-rabbit (dilüsyon 1.500) ve Alexa Fluor-647 goat anti-chicken (dilüsyon 1:1000) sekonder antikörleri ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi.
7. Hücreler tekrardan PBS ile yıkandı ve hücre n kleusunu boyamak için boyama tamponu içerisinde 4',6-Diamidino-2-Fenilindol Dihidrokl r r (DAPI) (dilüsyon 1:1000) ile 10 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. Hücreler tüm boyama işlemlerinden sonra tekrardan
9. Yıkandı ve konfokal mikroskopundan (ZEISS, LSM 800, Almanya) görüntü alındı.

3.6.6 In Silico ADME (emilim, dağılım, metabolizma ve atılım) ve Moleküler Yerleştirme Çalışmaları

Protein reseptör yapısı (ALK5, PDB ID: 1VJY, çözünürlük: 2.00  ) moleküler yerleştirme çalışmaları için Protein Veri Bankası'ndan (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) bir 3D yapı olarak alındı. Yerleştirme analizinden önce tüm su molekülleri çıkarıldı.

Autodock Vina 1.5.6 aracı ile polar hidrojen atomları ve Gasteiger yükleri eklendi. Daha sonra ALK5 yapısı, moleküler yerleştirme analizini kullanmak için PDBQT dosyaları kaydedildi.

Literatürde en çok bulunan 21 antosiyanin bulundu. Antosiyaninlerin 2D yapısı PubChem veri tabanından (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) alındı ve SDF dosya formatında kaydedildi. Daha sonra bu yapılar PyMOL 2.4 (<https://pymol.org/2/>) ile PDB dosya formatına dönüştürüldü. Kontrol olarak kullanılan ALK5'in bilinen tüm inhibitörleri (SD208, LY364947 ve SB505124) da PubChem veri tabanından alındı. Tüm ligandların enerji minimizasyonundan sonra, Autodock Vina 1.5.6 aracı ile moleküler yerleştirme analizi için PDBQT dosya formatına dönüştürüldü.

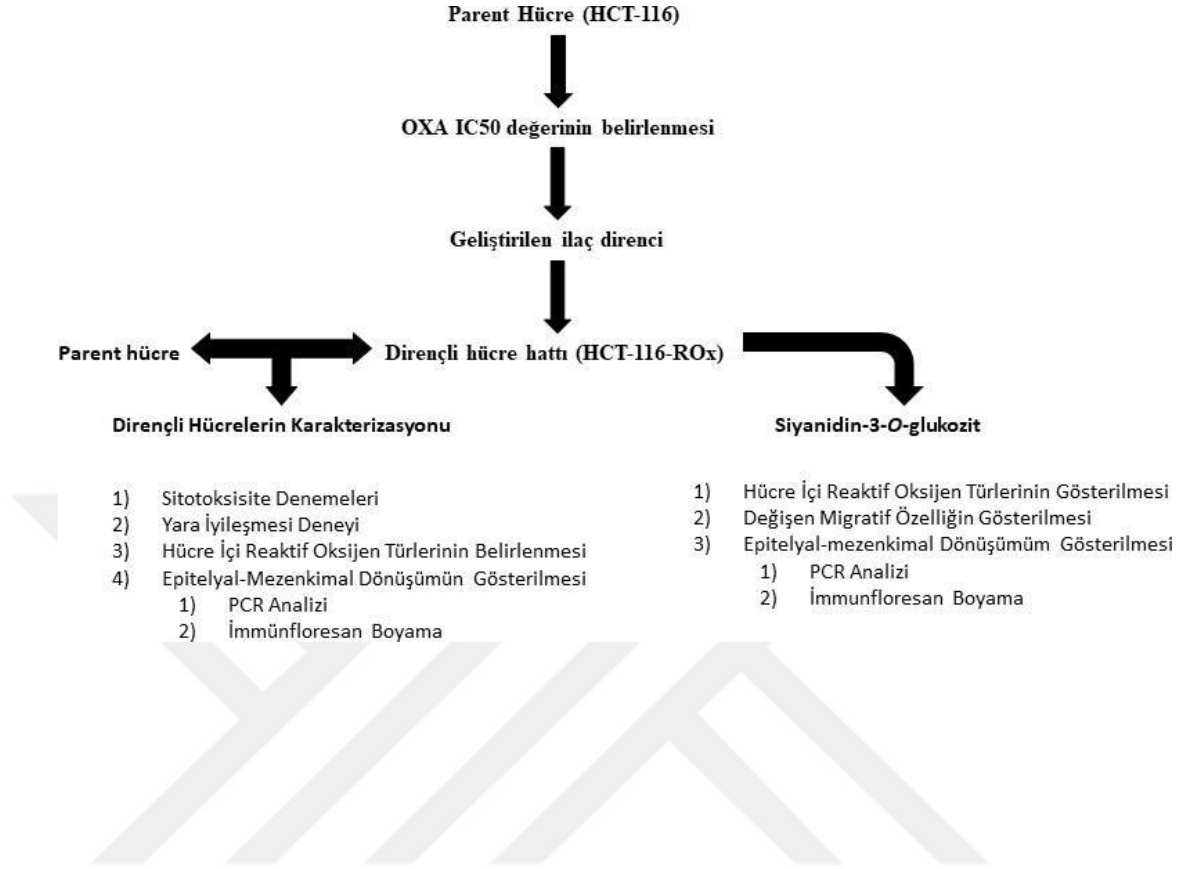
Tüm bileşiklerin farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri, ücretsiz erişilebilen web sayfası olan SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) aracı ile analiz edildi. SwissADME programı, İsviçre Biyoinformatik Enstitüsü'nün Moleküler Modelleme Grubu tarafından geliştirilmiştir. Antosiyaninlerin kimyasal yapısı PubChem veri tabanından Canonical SMILES formatında elde edildi. Bundan sonra, bileşiklerin yapısı SwissADME web sayfasına aktarıldı ve antosiyaninlerin ilaç benzerliği ve ADME özellikleri SwissADME aracı ile hesaplandı.

AutoDock Tools 1.5.2 moleküler yerleştirme çalışmaları için kullanıldı. Grid box çözünürlüğü x, y ve z noktaları boyunca sırasıyla 12.0034, 70.3969 ve 18.1330 olarak ayarlandı. Tüm moleküler yerleştirme çalışmaları için tüm reseptörlerin grid box 10x13x17'ye ayarlandı. Grafiksel gösterimlerin sonuçları Maestro Schrödinger aracılığıyla hazırlanmıştır.

3.6.7. İstatistiksel Analiz

IBM SPSS 22.0 (Armonk, NY) paket programı ile verilerin istatistiksel analizi değerlendirildi. Ölçümle belirtilen değişkenler ortalama±standart sapma, median (ortanca), minimum-maksimum ile sayımla belirtilen değişkenler yüzde dağılım ile özetlendi. Hücre kültüründe 2 deney grubu arasındaki anlamlılığın değerlendirilmesi için non-parametrik Mann Whitney U testi uygulandı. İstatistiki anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ kullanıldı. Şekiller içerisinde verilen «**» p değerinin 0,001'den küçük olduğunu «*» ise 0,05'ten küçük olduğunu göstermektedir.

3.7. Araştırma Planı

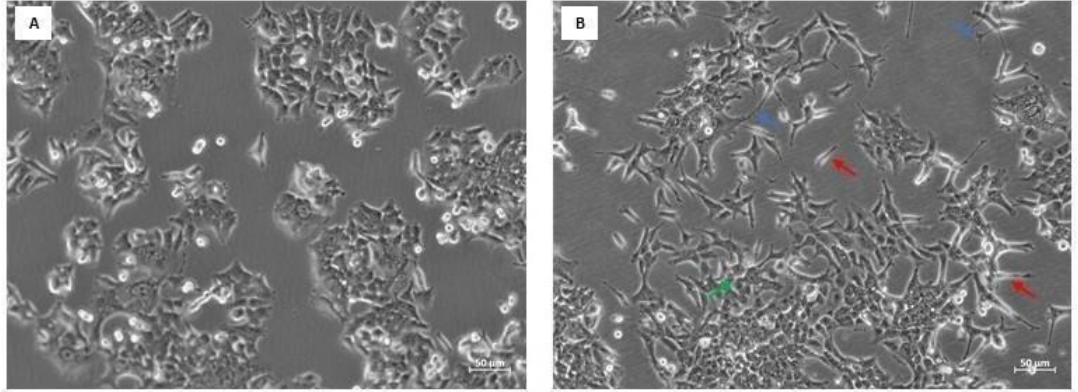


4. BULGULAR

4.1. Parent Hücre ile Dirençli Hücre Arasındaki Morfolojik Değişimler

HCT-116 hücre hattında oksaliplatine karşı ilaç direnci geliştirebilmek için oksaliplatinin hücre üzerindeki sitotoksik etkisi belirlendi. İlk olarak WST-1 proliferasyon ajanı ile oksaliplatinin IC50 konsantrasyon değeri bulundu. Daha sonra oksaliplatin ile en az 2 gün boyunca muamele edilen hücrelerin, oksaliplatin kültür ortamından alındıktan sonra hücrelerin davranışları gözlemlendi. Bu gözlemler ışığında başlangıç konsantrasyonunun 1 μ M olmasına karar verildi. Daha sonra hücreler artan oksaliplatin konsantrasyonlarına maruz bırakıldı. Hücrelerin ilaçlı ve ilaçsız ortamda bulunma süreleri proliferasyon ve ölüm hızı oranlarına göre belirlendi ve gerektiği durumlarda hücreler pasajlandı. Hücrelerin çoğalmaya başladığı oksaliplatin konsantrasyonunda (52 μ M) ilaç direncinin olduğu kabul edildi. İlaç direncinin oluşumundan sonra hücre üzerindeki ilaç direncinin devam etmesi için hücre kültür ortamında sürekli 52 μ M oksaliplatine bulunduruldu.

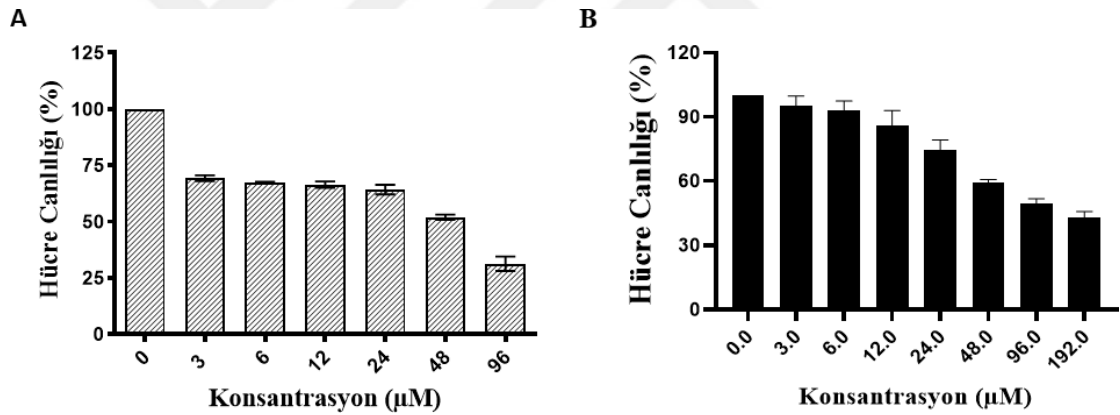
Oluşan dirençli hücreler ve parent hücreler arasında morfolojik farklar gözlemlendi. Bu morfolojik değişimler; hücreler arası adezyonun azalması, artan iğsi hücre morfolojisi (hücre polarite kaybı) ve artmış psödopodia yapılarıdır (Şekil 9).



Şekil 9. A) Parent hücre HCT-116, B) oksaliplatin direnci kazandırılmış HCT-116-ROx. İkinci hücre arasındaki morfolojik değişimler mavi, kırmızı ve yeşil oklarla gösterilmiştir. Mavi oklar artmış psödopodia oluşumunu, kırmızı oklar iğsi hücre oluşumunu ve yeşil ok artan hücreler arası mesafeyi göstermektedir.

4.2. Oksaliplatinin Parent ve Dirençli Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

HCT-116 ticari kolorektal kanser hücre hattında direnç çalışmalarını başlatabilmek için oksaliplatinin hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek gerekiyordu. Bu neden ile oksaliplatinin HCT-116 hücre hattı üzerindeki IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) değeri yani kontrole oranla hücre canlılığını %50 oranda azaltan konsantrasyonu WST-1 canlılık analizi yöntemiyle bulundu (Şekil 10A). 48 saat boyunca HCT-116 ile muamele edilen oksaliplatinin IC₅₀ değeri 52 µM olarak bulundu. Dirençli hücre hattı oluşturulduktan sonra aynı koşullar altında dirençli hücre için de IC₅₀ konsantrasyonu bulundu (Şekil 10B). Bulunan IC₅₀ değeri yaklaşık olarak 96 µM olarak bulundu. Parent hücre ile dirençli hücre arasındaki direnç indeksi yaklaşık olarak 1,8 olarak hesaplandı.

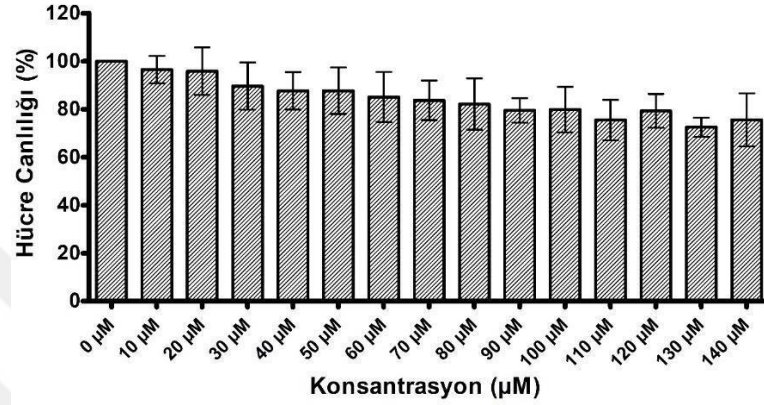


Şekil 10. A) HCT-116 (parent) ve B) HCT-116-ROX (dirençli) hücreleri için oksaliplatin IC₅₀ grafiği.

4.4. C3G'nin Parent Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

Oksaliplatine direnç oluşturulan HCT-116 hücre hattında, ilaç direncini tersine çevirmek için C3G uygulamaları yapıldı. Aynı şekilde, C3G'nin HCT-116 hücre hattındaki etkisini görebilmek için WST-1 canlılık analizi yapıldı. Hücreler üzerine 10-140 µM derişim aralığında C3G uygulandı. C3G'nin HCT-116 hücre hattı

üzerinde bir sitotoksik etkisi olmadığı görüldü. Fakat 30 μ M ve sonraki dozlarda hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü görüldü ($p \leq 0,05$). Bu yüzden hücreler üzerinde C3G'den kaynaklı bir ölümün olmaması için istatistiksel olarak anlamlı olmayan konsantrasyon kullanıldı yani 20 μ M kullanıldı (Şekil 11).

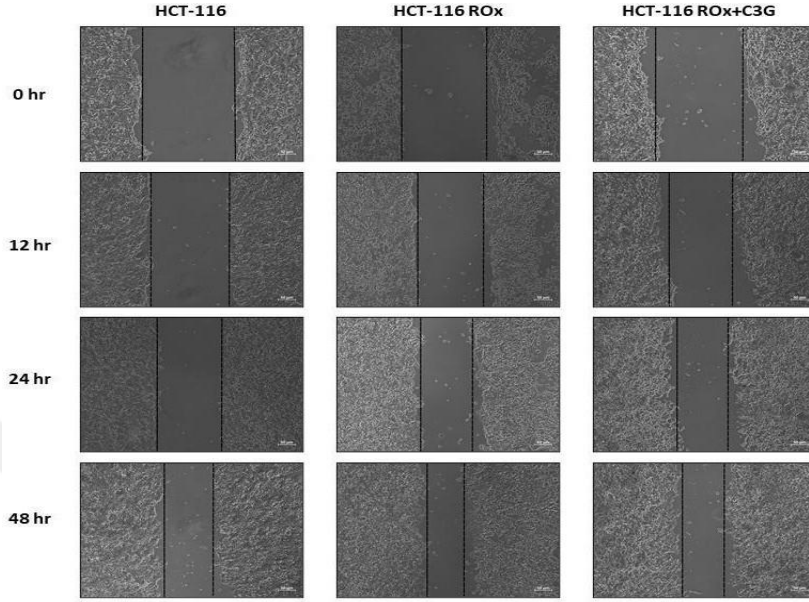


Şekil 11. C3G'nin HCT-116 (parent) hücre hattı üzerindeki canlılık grafiği

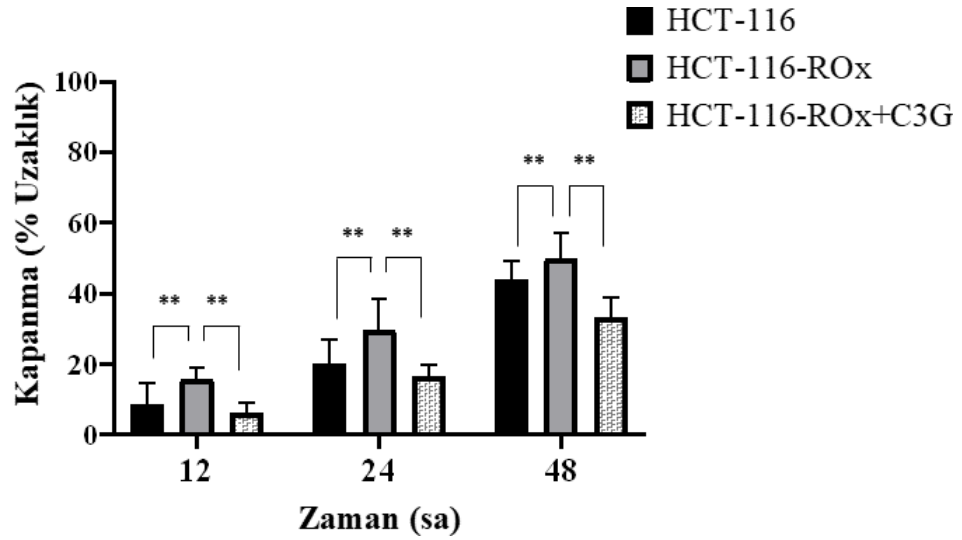
4.3. Migrasyon Analizlerinin Değerlendirilmesi

Parent ve dirençli hücre arasındaki migrasyon hızlarını belirlemek için oluşturulan yara iyileşmesi deneyi ile migrasyon analizi yapılmıştır. 6 kuyucuklu plakalara ekilen hücrelerin kuyucuk içerisindeki konfluensi durumu %80-90'a geldiğinde 200'lük pipet ucu ile kuyucuğun tam ortasından hücreler üzerinde bir yarı oluşturuldu. Oluşturulan deney düzeneğinde parent hücreler, dirençli hücreler ve 48 saat boyunca C3G ile muamele edilen dirençli hücreler bulunmaktadır. Açılan yaradan sonra 0.an görüntüsü alındı ve daha sonra aynı noktalardan 12, 24 ve 48. saatlerde görüntü alınarak yara kapanma miktarı Zen 2 (Blue edition) aracı ile uzaklık cinsinden hesaplandı (Şekil 12). Elde edilen sonuçlara göre 12, 24 ve 48. saatlerde % yara kapanma hızı parent hücrelerde sırasıyla %15,3; %27,7 ve %48,8 olarak bulunmuştur. Oksaliplatine direnç kazandırılmış hücrelerde sırasıyla %18,3; %39,4 ve %57 olarak bulunmuştur. Bu verilere göre şekil 13'te görüldüğü üzere HCT-116-ROx hücrelerinin migrasyon hızı HCT-116 hücrelerinden daha fazla bulunmuştur. C3G ile muamele edilen HCT-116-ROx hücrelerinin migrasyon hızı 12, 24 ve 48. saatlerde sırasıyla %7; %20,2 ve %39,6 olarak bulunmuştur. Böylece

C3G'nin HCT-116-ROx hücrelerinin migrasyon hızlarını önemli bir şekilde azaltmış ve migrasyon hızı parent hücrelerin migrasyon hızından da daha azalmış bir şekilde bulunmuştur.



Şekil 12. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116-ROx hücrelerine ait migrasyon analizi görüntüleri.



Şekil 13. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116-ROx hücrelerine ait yara kapanma analizi grafiği (**p<0,001).

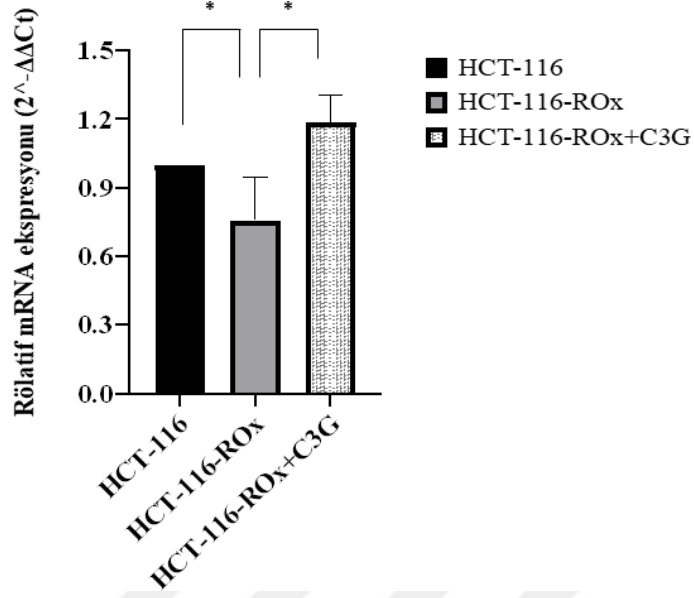
4.4. EMT Biyobelirteçlerinin mRNA Düzeyinde Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR ile Analizi

Gerçek zamanlı kantitatif PCR analizinde parent hücre ile dirençli hücre arasındaki EMT biyobelirteçlerinin (E-kaderin ve vimentin) ekspresyon seviyelerine bakıldı. Bu çalışmada deney grupları parent, dirençli ve 48 saat boyunca C3G ile muamele edilmiş dirençli hücrelerden oluşmaktadır.

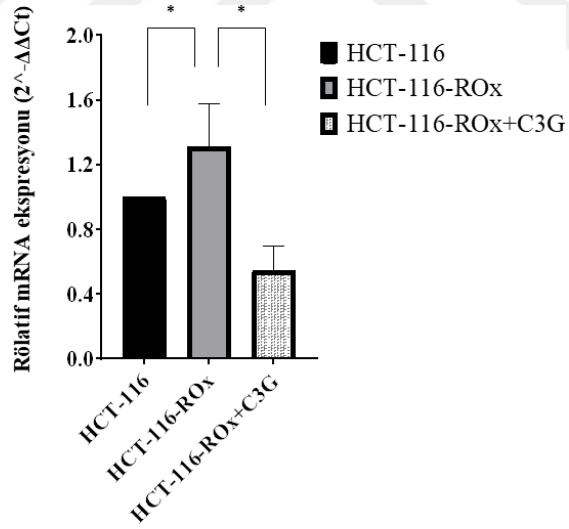
Şekil 13'te görüldüğü üzere oksaliplatine direnç kazandırılmış kolorektal kanser HCT-116 hücre hattında E-kaderin mRNA ekspresyon seviyesi parent hücre ile karşılaştırıldığında 0,73 kat azalmıştır. C3G ile muamele edilmiş dirençli hücrelerde ise E-kaderin mRNA ekspresyon seviyesi C3G ile muamele edilmemiş dirençli hücreler ile karşılaştırıldığında 1,38 kat artmış olarak bulunmuştur. Bu verilerin yanı sıra C3G ile muamele edilmiş dirençli hücrelerdeki E-kaderin mRNA ekspresyon seviyesi parent hücredeki E-kaderin mRNA ekspresyon seviyesinden fazla bulunmuştur.

Şekil 14'te görüldüğü üzere oksaliplatine direnç kazandırılmış HCT-116 hücre hattında vimentin mRNA ekspresyon seviyesi parent hücre ile karşılaştırıldığında 1,5 kat artmış olarak bulunmuştur. 48 saat boyunca C3G ile muamele edilmiş dirençli hücrelerde vimentin ekspresyon seviyesi dirençli hücre ile karşılaştırıldığında 0,57 kat azalmış olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak EMT biyobelirteçlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine bakıldığında dirençli hücrelerde E-kaderin ekspresyon seviyesinin arttığı, vimentin ekspresyon seviyesinin ise azaldığı görülmüştür. Böylece kolorektal kanserde oksaliolatine karşı gelişen ilaç direncinde EMT'nin rol oynadığı doğrulanmıştır. Aynı zamanda C3G ile muamele edilen dirençli hücrelerde EMT süreci tersine çevrilmiştir. Kullanılan deney grubunda E-kaderin ekspresyon seviyesi artmış ve vimentin ekspresyon seviyesi ise azalmıştır.



Şekil 14. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116-ROx hücrelerine ait rölatif E-kaderin mRNA ekspresyon seviyeleri grafiği (* $p<0,05$).



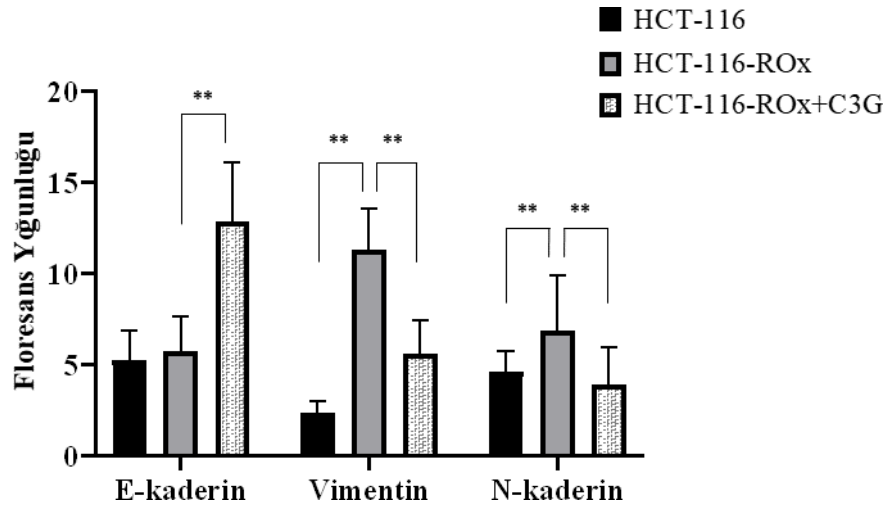
Şekil 15. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116-ROx hücrelerine ait rölatif vimentin mRNA ekspresyon seviyeleri grafiği (* $p<0,05$).

4.5. EMT Biyobelirteçlerinin İmmunofloresans Boyama Yöntemi ile Analizi

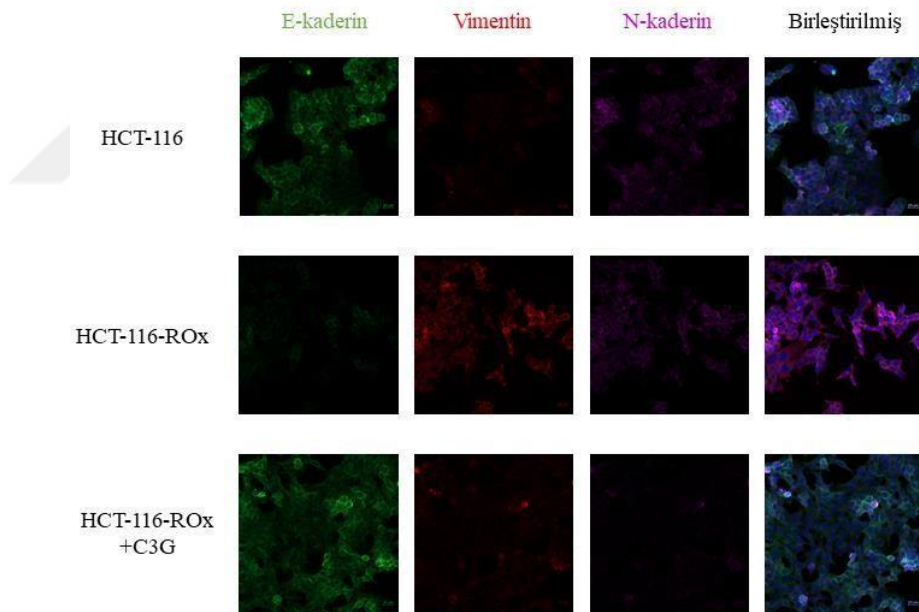
Kolorektal kanser HCT-116 hücrelerinde EMT sürecinin bir ilaç direnç mekanizması olduğunu kanıtlamak için HCT-116 ve oksaliplatin direnci kazandırılmış HCT-116-ROx hücrelerinde epitelyal biyobelirteci olan E-kaderin ve mezenkimal biyobelirteçleri olan vimentin ve N-kaderin boyaması yapılarak görüntüler konfokal mikroskopta (Zeiss, LSM 800) alındı ve hücre yapısındaki artış ve azalış miktarı floresans yoğunluklarına göre analizlendi. Analiz işlemleri LSM yazılımı Zen 2’de (Blue Edition) yapıldı.

Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında dirençli hücredeki E-kaderin artış miktarı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmamıştır. Fakat C3G ile muamele edilen dirençli hücredeki E-kaderin miktarı, dirençli hücre ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. Dirençli hücredeki vimentin miktarı parent ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde artmıştır. C3G ile muamele edilen hücrelerde ise vimentin miktarı dirençli hücre ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde azalmıştır. Son olarak mezenkimal bir biyobelirteç olan N-kaderin miktarı ise dirençli hücrede daha fazla bulunmuştur. C3G ile 48 saat boyunca muamele edilen dirençli hücrelerde ise N-kaderin miktarında bir azalma gözlemlenmiştir.

Böylece EMT sürecinin ilaç direnci mekanizmalarından biri olduğu gösterilmiştir. C3G antosiyanini uygulandığında ise mezenkimal biyobelirteçlerde bir azalma ve epitelyal biyobelirteçte de bir artışın meydana geldiği şekil 16 ve şekil 17’de gösterilmiştir.



Şekil 16. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116 hücrelerine ait E-kaderin, vimentin ve N-kaderin floresans yoğunluk grafiği (**p<0,001).

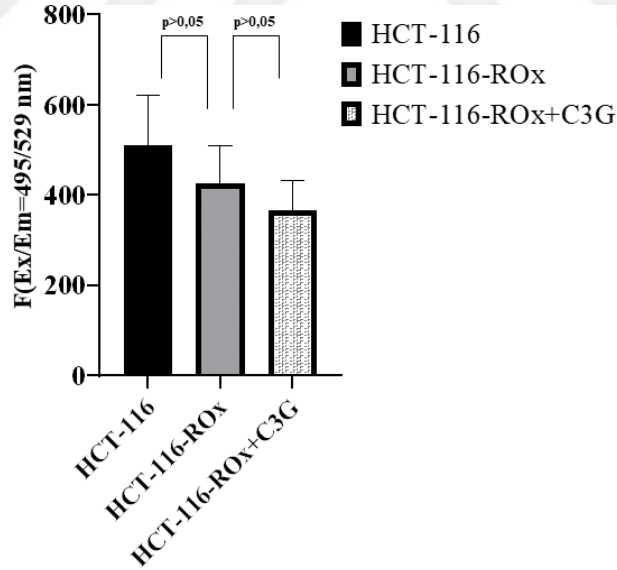


Şekil 17. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116-ROx hücrelerine ait E-kaderin, vimentin ve N-kaderin floresans görüntüleri. Ölçek çubuğu 20 µm.

4.6. Reaktif Oksijen Türlerinin Analizi

Reaktif oksijen türleri hücre içerisinde birçok biyolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olur. Bunun yanında apoptozdan kaçma ve ilaç direncinin gelişiminde rol oynamaktadır.

ROS analizi için oluşturulan gruplar parent, dirençli ve 48 saat boyunca C3G ile muamele edilen dirençli hücrelerdir. ROS analizi için uyarma/emisyon (Ex/Em= 495/529) dalga boylarında floresans okuma alındı. Şekil 18’de görüldüğü üzere parent hücrenin Floresans Birim Oranı (RFU) 509,435; dirençli hücrelerde alınan RFU değeri 426,046 ve C3G ile muamele edilen hücrelerde RFU değeri 365,856 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre dirençli hücrelerdeki ROS miktarı parent hücrelerdeki ROS miktarıyla kıyaslandığında azalmış olarak görülmektedir. Fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Aynı zamanda C3G antosiyanini ile muamele edilmiş dirençli hücrelerdeki ROS miktarı dirençli hücreler ile karşılaştırıldığında hücre içerisindeki ROS miktarının azaldığı bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 18. HCT-116 (parent), HCT-116-ROx (dirençli) ve C3G ile muamele edilmiş HCT-116-ROx hücrelerine ait hücre içi ROS miktarı grafiği.

4.7. *In Silico* İlaç Benzerliği Analizleri

Antosiyaninlerin ilaç benzerliği özellikleri SwissADME web aracıyla belirlendi. Antosiyaninlerin ilaç benzerliği özelliği Lipinski, Ghose, Veber, Egan ve Muegge olmak üzere beş farklı filtre ile değerlendirilmiştir. Lipinski'nin beş kuralı için sadece üç antosiyanin, siyanidin-3-arabinozid (C3A), pelargonidin-3-glukozit (P3G) ve peonidin-3-arabinozid (P3A) uygun bulundu (Tablo 4). Antosiyaninlerin moleküler ağırlığı sırasıyla 419.36, 433.39 ve 433.39'dur. Bu moleküler ağırlıklar, Lipinski filtresi ($MA \leq 500$) için kabul edilebilir aralıktır. Hidrojen verici sayısı (number -OH and -NH, nOHNH)) sırasıyla 7, 7 ve 6 olarak bulundu. Antosiyaninlerdeki hidrojen alıcılarının (number of O and N, nON) sayısı da 10 olarak bulunmuştur. Lipinski'nin beş kuralına göre hidrojen verici ve alıcı sayısı sırasıyla 5 ve 10 olmalıdır. Ancak bu antosiyaninler, Lipinski kurallarındaki hidrojen verici sınırını ihlal etmektedir. Antosiyaninlerin lipofilitesi (n-oktanol/su katsayısı (MLogP)) sırasıyla -1.22, -1.27 ve -1.00 olarak bulundu. Lipinski kurallarına göre bu değer 4,15'ten küçük olmalıdır.

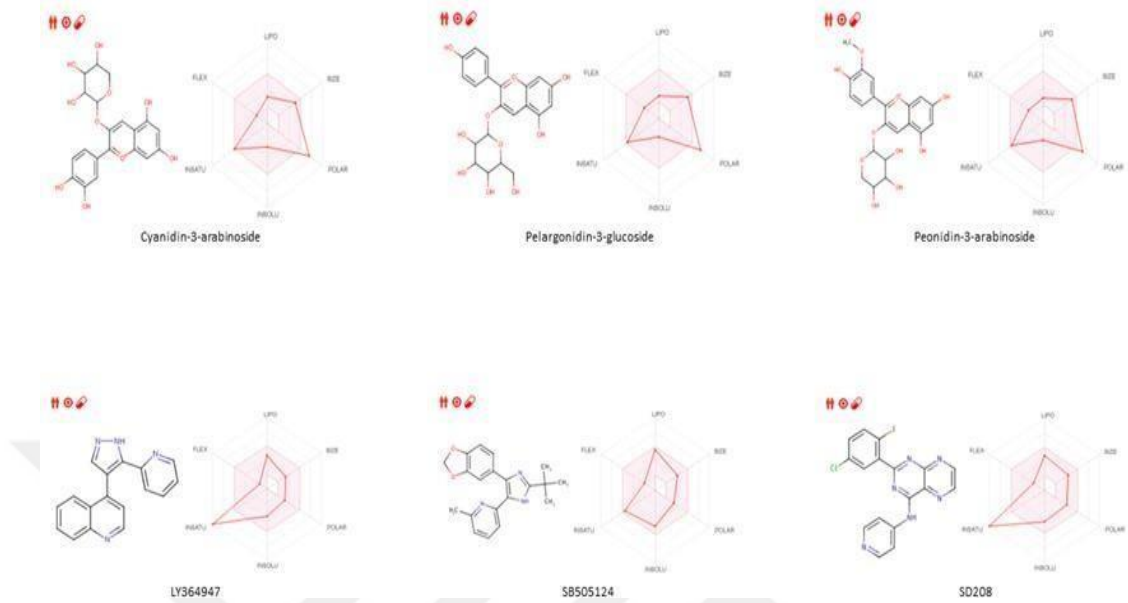
Tablo 5. Lipinski'nin beş kuralı

Moleküler Ağırlık	≤ 500
Lipofilite (MLOGP)	≤ 4.15
Hidrojen Verici Sayısı	≤ 5
Hidrojen Alıcı Sayısı	≤ 10

4.8. Antosiyaninlerin ADME Özelliklerinin Değerlendirilmesi

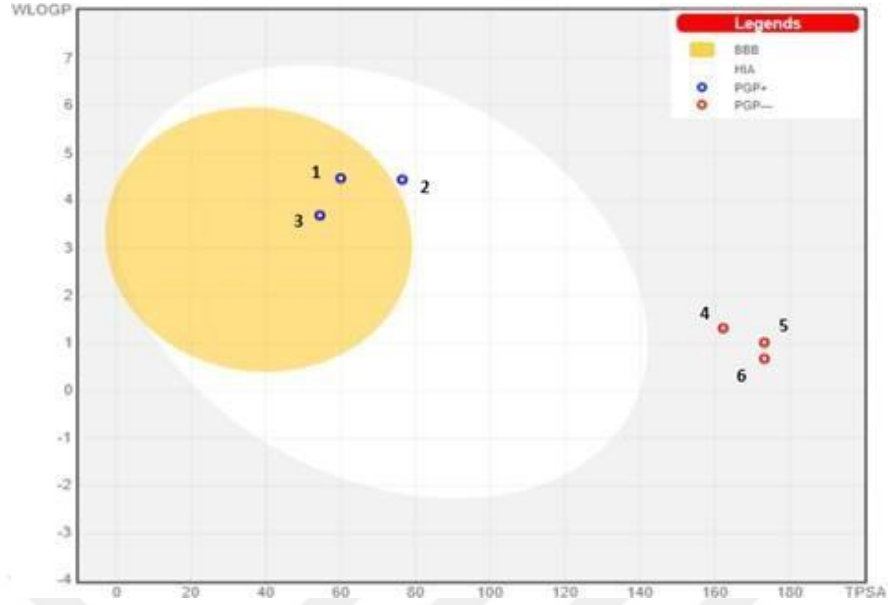
İlaç benzerliğine sahip antosiyaninlerin fizikokimyasal ve farmakokinetiği gibi ADME özellikleri değerlendirildi. Antosiyaninlerin ADME özellikleri Tablo 5'te gösterildiği üzere topolojik yüzey alanlarına (Topological Surface Area, TPSA), dönebilir bağlara (number of rotatable bonds, nrotb), suda çözünürlüğe (Log S), insan bağırsak absorpsiyonuna (Human Intestinal Absorption, HIA) ve kan-beyin bariyeri (Blood-Brain Barrier, BBB) erişimine göre değerlendirildi. TPSA değeri,

biyoyararlanım radarının renkli bölgesine göre 20 Å² ile 130 Å² arasında olmalıdır (Şekil).



Şekil 19. Antosiyaninlere ve bilinen ALK5 inhibitörlerine ait biyoyararlanım radarlarının karşılaştırılması.

C3A, P3G ve P3A'nın TPSA değerleri sırasıyla 173.21 Å², 173.21 Å² ve 162.21 Å² olarak bulundu. Dönebilen bağların sayısı, biyoaktif moleküllerin esnekliğini ifade eder. Bu bağ sayısının kabul edilebilir aralığı 0 ile 9 arasında olmalıdır. Antosiyaninlerin dönebilen bağları sırasıyla 3, 4 ve 4'tür. Antosiyaninlerin LogS (SILICOS-IT) değeri sırasıyla -1.36, -1.52 ve -2.05'tir, yani hepsi suda çözünürlüğü gösterir. WLOGP ve TPSA değerleri, bileşiklerin HIA ve BBB Bu grafik, bileşiklerin HIA ve BBB özelliklerini tahmin etmemizi sağlar. BOILED-Egg grafiği sarı, beyaz ve gri olmak üzere 3 renkli alana ayrılmıştır (Şekil). Grafikteki sarı alan BBB erişimini temsil eder, beyaz alan HIA'yı temsil eder ve gri alan bu özelliklerin her ikisini de göstermeyen bileşikleri temsil eder. Bu çizelgeye göre, antosiyaninlerin kan-beyin bariyeri erişim özelliklerine sahip olmadığı bulundu. Bağırsak emilim özellikleri de düşük bulundu. Ayrıca bu grafik bileşiklerinin P-glikoprotein (P-gp) substratları olup olmadığını tahmin etmemizi sağlar. Bu grafiğe göre antosiyaninlerin P-gp substratları olmadığı bulunmuştur. Böylece P-gp taşıyıcı protein yoluyla hücre dışına atılmaz.



Şekil 20. Antosiyaninlerin ve ALK5 reseptörü için bilinen inhibitörlerin BOILED-Egg grafiği. Sarı alan BBB'den geçişi, beyaz alan HIA'yı ve beyaz alan ise bu özelliklere sahip olamayan molekülleri temsil etmektedir.

Tablo 6: C3A, P3G ve P3A'ya ait farmokinetik ve fizikokimyasal özellikler.

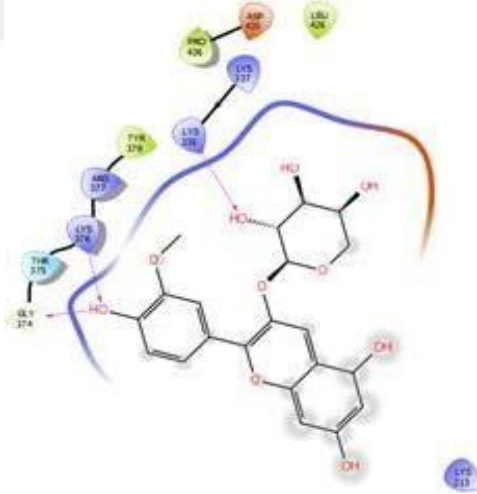
4.9. Moleküler Yerleştirme Çalışmaları

Bu çalışmada, ALK5 ile P3A, C3A, P3G, LY364947, SB505124 ve SD208 arasında moleküler yerleştirme çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlara göre ALK5 üzerindeki en yüksek ve en düşük bağlanma enerjileri sırasıyla P3A ve LY364947 için -8.3 ve -7.0 kcal/mol olarak bulunmuştur (Tablo 6).

Tablo 7. Antosiyaninler ve bilinen ALK5 reseptörü inhibitörleri ile ALK5 arasındaki bağlanma enerjileri.

Bileşikler	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
C3A	-8.0
P3A	-8.4
P3G	-8.3
LY364947	-7.0
SB505124	-7.1
SD208	-7.4

P3A'nın hidroksi grubu ile ALK5'in içerisinde bulunan Gly374 ve Lys376 ile hidrojen bağı yaptığı bulunmuştur (bağ uzaklıkları sırasıyla 1.89 ve 2.18'dir). Ayrıca P3A yapısında bulunan arabinozun hidroksi grubu ile ALK5'in Lys335 ile hidrojen bağı yaptığı bulunmuştur (Bağ uzaklığı 2.04) (Şekil 20).



Şekil 21. ALK5 ile P3A arasındaki etkileşim mesafelerini içeren iki boyutlu moleküler yerleştirme şeması.

Kolorektal kanser, dünya çapında en yaygın üçüncü ve kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen sebebidir. KRK hastaları başlangıçta fluorourasil ve platin bazlı kemoterapiden fayda görseler de çoğu içsel veya kazanılmış direnç nedeniyle kemoterapi direnci gözlenir ve medyan sağkalım sadece yaklaşık yirmi aydır (57).

Oksaliplatin, kolorektal kanser için kombinasyon uygulamalarının çok önemli bir bileşeni olduğundan oksaliplatine karşı gelişen ilaç direnci klinik tedaviler için önemli bir engel olmaktadır. Birinci nesil platin bileşiği olan sisplatine karşı direncin altında yatan mekanizmalar hakkında çok fazla bilgi edinilmiş olmasına rağmen, oksaliplatin direnci ile ilgili olan mekanizmalar hala iyi karakterize edilememiştir (58). Literatürde oksaliplatin için olası direnç mekanizmaları hakkında hücre içi taşıma mekanizmalarından, DNA onarım mekanizmalarındaki değişimlerden, hücre ölüm mekanizmalarından ve epigenetik değişimlerden kaynaklanabileceğinden bahsedilmektedir (10). Bu çalışmada KRK'de EMT sürecinin oksaliplatin direnci oluşumundaki etkisine odaklandık. Daha sonra bitkisel sekonder bir metabolit olan C3G'nin bu süreçte hücre üzerine olan etkisini değerlendirdik.

Genel olarak, EMT'nin geleneksel olarak tümör invazyonu ve metastazına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Örneğin, Chen ve ark. oksaliplatin direnci geliştirdikleri HCT-116 hücre hattının invaziv ve migratif özelliği parent hücreye göre daha fazla bulmuşlardır. Bu çalışmada da literatüre uygun olarak dirençli hücrenin migratif özelliği parent hücreye göre daha yüksek bulundu. Daha sonra C3G ile muamele ettiğimiz dirençli hücrelerde migrasyon hızı anlamlı bir şekilde azaldı.

Son yıllarda, biriken kanıtlar, EMT'nin bazı insan malign kanserlerinde ilaç duyarlılığının düzenlenmesinde de önemli bir rol oynadığını göstermiştir (59) (60). Bizim bulduğumuz sonuçlarda literatürle uyumlu bir şekilde EMT süreci oksaliplatin direnci kazandırılmış hücrelerde aktiflenmiş olarak bulundu. PCR sonuçlarına göre E-kaderin mRNA ekspresyon seviyesi parent hücre ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma elde ettik. Bunun yanında mezenkimal biyobelirteci olan vimentin mRNA ekspresyonunda da parent hücre ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış görüldü. C3G ile muamele ettiğimiz dirençli hücrelerde de aktiflenen EMT prosesi tersine çevrilmiştir. İmmünfloresans boyamalarda protein ekspresyonuna bakıldığında dirençli hücrelerdeki E-kaderin miktarındaki azalma parent hücre ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma görülemedi. Fakat vimentin ve N-kaderin miktarlarına bakıldığında ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir şekilde artış gözlemlenmiştir. Aynı şekilde C3G ile muamele edilen dirençli hücrelerde E-kaderin miktarında artış, vimentin ve N-kaderin miktarında da anlamlı bir düşüş

gözlemlenmiştir. Böylece bu veriler ışında EMT sürecinin ilaç direnci gelişimine katkı sağladığı ve dirençli hücrelerde oksaliplatine karşı hassasiyetin azaldığı bulunmuştur.

Ek olarak EMT süreci ilaç direncini indüklemek için diğer hücre içi sinyal mekanizmaları ile de etkileşime girebilir. Örneğin miRNA regülasyonu (61), ERK ya da AKT/GSK-3 β sinyal yolları (62), MAPK/AKT sinyal yolları (63) ya da hücre içerisindeki ROS (64) ile etkileşime girerek ilaç direncini indükleyebilir. Bizde çalışmamızda ROS aracılı EMT'nin ilaç direncine sebep olup olmadığını aydınlatabilmek için çalışmamızda EMT ile hücre içi ROS miktarı arasında bir ilişki olup olmadığına odaklandık. Çünkü bu bağlamda literatürde birbirine zıt hipotezler bulunmaktadır. Örneğin Jiao ve ark. yaptıkları çalışmada yüksek seviyedeki ROS miktarının Akt ve Snail gibi onkogenleri aktifleyerek EMT sürecinin aktiflendiğini belirtmişlerdir. Aksi bir çalışmada Jeong ve ark. nitrik oksit sentaz 3 (NOS3) enziminin aşırı fosforilasyonu ile hücre içi ROS miktarının azaldığını ve oksaliplatin direnci gelişimine katkı sağladığını göstermişlerdir. NOS3 enziminin inhibisyonu sayesinde süperoksit dismutaz 2 enziminin ekspresyonu azalarak hücre içi ROS miktarının arttığını bulmuşlar ve böylece dirençli hücre içerisindeki ROS miktarının artmasına bağlı olarak otofajinin arttığını kanıtlamışlardır. Bizde çalışmamızda direnç gelişiminde artan EMT karakterinin ROS miktarına bağlı olup olmadığını göstermek için hücre içi ROS ölçümü yaptık. Elde ettiğimiz sonuçlar göre dirençli hücrelerdeki ROS miktarı parent hücre ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gerçekleşmemiştir. Aynı zamanda 20 μ M C3G ile dirençli hücreleri muamele ettiğimizde anlamlı bir azalma ile karşılaşmadık. Bu konu ile alakalı C3G'nin artan konsantrasyonları denenerek daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

Sonuç olarak, diğer kanser türlerinin tedavisinde olduğu gibi kolorektal kanser tedavisinde de en büyük zorluk radyoterapiye ve kemoterapiye karşı gelişen içsel ya da edinilmiş direnç mekanizmalarıdır. Aynı zamanda kişiden kişiye değişen genetik varyasyonları ve beslenme çeşitlerini de ele aldığımızda bu durumun üstesinden gelmek hem klinisyenler hem de temel bilimciler açısından çözülmesi giderek zorlaşan bir durum olmaktadır. Bu yüzden, bu alandaki çalışmaların artması ve

direnç mekanizmalarının altında yatan biyolojik ve biyokimyasal süreçlerin daha ayrıntılı bir şekilde çalışılması gerekmektedir. Böylece mevcut tedaviyi iyileştirmek ya da yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesi bu durum için elzem bir hal almaktadır. Biz de çalışmamızda bu yönde ilerleyerek ilaç direncinde tümör metastazına katkı sağlayan EMT sürecini ele alarak ROS ile ilişkisini aydınlatılması üzerine çalıştık. Aynı zamanda bu çalışmanın yenilikçi yönünü ortaya koyan C3G antosiyaninin ilaç direncine neden olan EMT sürecine nasıl bir etki yapabileceğini araştırdık.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kolorektal kanser dünyada en yaygın olarak görülen üçüncü, öldürücülüğü en yüksek dördüncü kanser türüdür. Ayrıca KRK genetik, çevresel ve yaşam tarzı gibi risk faktörlerini içeren çok faktörlü bir hastalıktır. Bu kadar fazla risk faktörüne sahip hastalığın tanı ve tedavisinde önemli ilerlemelere yol açan, hatalığın ilerlemesini sağlayan genetik ve moleküler mekanizmaları aydınlatmak için büyük çabalar sarf edilmiştir. Fakat hala KRK kansere bağlı ölümlerin başında gelmektedir. Bu nedenle klinisyenlerin ve temel bilimcilerin ortak amacı bu ölümcül hastalığı tedavi etmek için mevcut tedavi yöntemlerini iyileştirmek ya da yeni terapötik hedefler bulmaktır. Bizde bu çalışmada *in vitro* koşullar altında KRK tedavisinde birinci basamak tedavi olarak kullanılan oksaliplatin ilacına karşı gelişen ilaç direncinin altında yatan ROS-EMT yolağının ilişkili olup olmadığı aydınlatmak ve mevcut tedaviye ek olarak C3G molekülünün kullanılabilirliğini araştırdık.

Literatürde HCT-116 hücre hattına oksaliplatin ilaç direnci yaklaşık olarak 9-12 ay arasında geliştirildiği belirtilmiştir. Bu çalışmada HCT-116 hücre hattına yaklaşık 7 içerisinde oksaliplatin ilaç direnci geliştirildi. Yukarıda hücre fotoğraflarına bakıldığı üzere HCT-116 ile HCT-116-ROx arasında artan iğsi yapıdaki hücre formları, artan hücreler arası mesafe ve artan psödopodia yapıları gibi morfolojik değişimler gözlenmektedir. Bu değişimler ile HCT-116 hücre hattında oksaliplatine karşı gelişmiş ilaç direnci olduğunu düşündürmektedir. Sitotoksisite analizleri ile parent hücre ile dirençli hücrenin oksaliplatine karşı hassasiyeti analizlenmiş ve dirençli hücrelerde oksaliplatin hassasiyeti azalmıştır.

Oluşan direnç mekanizmasının ROS-EMT yolağı üzerinden olup olmadığını göstermek için hücre içi ROS miktarına ve qRT-PCR ve immünfloresans boyamalar ile EMT biyobelirteçleri olan E-kaderin, vimentin ve N-kaderin'nin sırasıyla mRNA ekspresyon seviyelerine ve floresans yoğunluk aracılığıyla protein ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre E-kaderin mRNA ekspresyon seviyesi dirençli hücrede parent ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bir şekilde azalmıştır. Aynı zamanda vimentin mRNA ekspresyon seviyesinde de parent hücre ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,002$) artış gözlemlenmiştir. İmmünfloresans boyamalardaki sonuçlara

bakıldığında ise E-kaderin ekspresyon seviyesi parent ile dirençli hücre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunamamıştır. Fakat vimentin ve N-kaderin ekspresyonlarındaki değişim dirençli hücrelerde istatistiksel olarak ($p<0,001$) anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.

Bitkisel sekonder metabolit olan C3G 48 saat boyunca dirençli hücreler ile muamele edilmiş ve EMT biyobelirteçlerindeki ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. E-kaderin ve vimentin mRNA ekspresyon seviyeleri, C3G ile muamele edilmeyen dirençli hücreler ile karşılaştırılmıştır. E-kaderin mRNA ekspresyon seviyesin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,004$) olarak artmıştır. Vimentin mRNA ekspresyonundaki değişim ise istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,011$) bir şekilde azalmıştır.

İmmünofloresans boyamalarındaki sonuçlara göre de E-kaderin ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak ($p<0,001$) anlamlı bir şekilde artmıştır. N-kaderin ve vimentin ekspresyon seviyelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bir azalış gözlemlenmiştir.

Hücre içi ROS miktarları kıyaslandığında dirençli hücredeki azalan ROS miktarı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Aynı şekilde C3G ile 48 saat boyunca muamele edilen dirençli hücrelerde de hücre içi ROS miktarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Ayrıca *in silico* analiz yöntemleriyle farklı antosiyanin türlerinin ilaç benzerliği çalışmaları yapılmış ve EMT yolağındaki etkin ALK5 reseptörü ile moleküler yerleştirme çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre antosiyaninlerin ALK5 reseptörü aday inhibitör olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, kolorektal kanser tedavisinde kullanılan birinci basamak oksaliptatin ilacına karşı gelişen ilaç direnci ROS ile doğru orantılı olmadan EMT yolağı üzerinden gelişebileceğini gösterdik. Aynı zamanda bu çalışmanın yenilikçi yönü olarak bir bitkisel sekonder metabolit olan C3G'nin EMT sürecini tersine çevirerek ilaç direnci oluşmasını engelleyebilecek bir molekül olarak kullanılabilirliğini gösterdik.

6. KAYNAKLAR

1. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *The Lancet*. 2019; 394(10207):1467-1480
2. Medema JP. Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nature Cell Biology*. 2013; 15(4):338-44
3. Brenner, H., Kloor, M. , Pox C. Colorectal cancer Hermann. *Lancet* (London, England). 2006; 383(9927):1490-1502.
4. Longley DB, Allen WL, Johnston PG. Drug resistance, predictive markers and pharmacogenomics in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2006; 1766(2):184-96
5. Ferraro G, Massai L, Messori L, Merlino A. Cisplatin binding to human serum albumin: A structural study. *Chem Commun*. 2015; 51(46):9436-9
6. Timothy CJ, Kogularamanan S, Stephen JL. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem Rev*. 2016; 116(5):3436-86.
7. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalton Transactions*. 2018. 47(19):6645-6653
8. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalt Trans*. 2010; 39(35):8113-27.
9. Zhou J, Kang Y, Chen L, Wang H, Liu J, Zeng S, et al. The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Frontiers in Pharmacology*. 2020; 11:343.
10. Martinez-Balibrea E, Martínez-Cardus A, Gines A, Ruiz De Porras V, Moutinho C, Layos L, et al. Tumor-related molecular mechanisms of oxaliplatin resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2015; 14(8):1767-76.
11. Alian OM, Azmi AS, Mohammad RM. Network insights on oxaliplatin anti-cancer mechanisms. *Clin Transl Med*. 2012; 1(1):26.
12. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: A critical review. *Clinical Cancer Research*. 2000; 6(4):1205-18.
13. Kesharwani SS, Kaur S, Tummala H, Sangamwar AT. Overcoming multiple drug resistance in cancer using polymeric micelles. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2018; 15(11):1127-1142.
14. Joyce H, McCann A, Clynes M, Larkin A. Influence of multidrug resistance and drug transport proteins on chemotherapy drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 2015; 11(5):795-809.
15. Du B, Shim JS. Targeting epithelial-mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer. *Molecules*. 2016; 21(7):965.

16. Choi Y, Yu A-M. ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development. *Curr Pharm Des.* 2014; 20(5):793-807.
17. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2005; 45:51-88.
18. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* 2003; 22(47):7369-75.
19. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers.* 2014; 6(3):1769-92.
20. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer.* 2013; 13(10):714-26.
21. Cree IA, Charlton P. Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer.* 2017; 17(1):10.
22. Zahreddine H, Borden KLB. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology.* 2013; 4:28.
23. Senthebane DA, Rowe A, Thomford NE, Shipanga H, Munro D, Al Mazeedi MAM, et al. The role of tumor microenvironment in chemoresistance: To survive, keep your enemies closer. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017; 18(7):1586.
24. Kharraishvili G, Simkova D, Bouchalova K, Gachechiladze M, Narsia N, Bouchal J. The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. *Cancer Cell International.* 2014; 14:41.
25. Alfarouk KO, Stock CM, Taylor S, Walsh M, Muddathir AK, Verduzco D, et al. Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell International.* 2015; 15:71.
26. Majidinia M, Yousefi B. Breast tumor stroma: A driving force in the development of resistance to therapies. *Chemical Biology and Drug Design.* 2017; 89(3):309-318.
27. Jiang ZS, Sun YZ, Wang SM, Ruan JS. Epithelial-mesenchymal transition: Potential regulator of ABC transporters in tumor progression. *Journal of Cancer.* 2017; ;8(12):2319-2327.
28. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current Opinion in Cell Biology.* 2005; 17(5):548-58.
29. Zhou F, Zhu L, Wang K, Murray M. Recent advance in the pharmacogenomics of human Solute Carrier Transporters (SLCs) in drug disposition. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2017; 116:21-36.

30. Gao H, Zhang S, Hu T, Qu X, Zhai J, Zhang Y, et al. Omeprazole protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by alleviating oxidative stress, inflammation, and transporter-mediated cisplatin accumulation in rats and HK-2 cells. *Chem Biol Interact.* 2019;297:130-140.
31. Song IS, Savaraj N, Siddik ZH, Liu P, Wei Y, Wu CJ, et al. Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(12):1543-9.
32. Yaneff A, Sahores A, Gómez N, Carozzo A, Shayo C, Davio C. MRP4/ABCC4 As a New Therapeutic Target: Meta-Analysis to Determine cAMP Binding Sites as a Tool for Drug Design. *Curr Med Chem.* 2017; 26(7):1270-1307.
33. Zhang YH, Wu Q, Xiao XY, Li DW, Wang XP. Silencing MRP4 by small interfering RNA reverses acquired DDP resistance of gastric cancer cell. *Cancer Lett.* 2010; 291(1):76-82.
34. Van Der Jeught K, Xu HC, Li YJ, Lu X Bin, Ji G. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology.* 2018; 24(34):3834-3848.
35. Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology and Medicine.* 2017; 104:144-164.
36. Kim EK, Jang M, Song MJ, Kim D, Kim Y, Jang HH. Redox-mediated mechanism of chemoresistance in cancer cells. *Antioxidants.* 2019; 8(10):471.
37. Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang XF. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology and Oncology.* 2013; 6:19.
38. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters.* 2008; 266(1):6-11.
39. Abreu IA, Cabelli DE. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics.* 2010; 1804(2):263-74.
40. Lim SO, Gu JM, Kim MS, Kim HS, Park YN, Park CK, et al. Epigenetic Changes Induced by Reactive Oxygen Species in Hepatocellular Carcinoma: Methylation of the E-cadherin Promoter. *Gastroenterology.* 2008; 135(6):2128-40.
41. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hoyer BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic Pathology.* 2010; 38(1):96-109.
42. Aggarwal V, Tuli HS, Varol A, Thakral F, Yerer MB, Sak K, et al. Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. *Biomolecules.* 2019; 9(11):735.

43. Meng Q, Shi S, Liang C, Liang D, Hua J, Zhang B, et al. Abrogation of glutathione peroxidase-1 drives EMT and chemoresistance in pancreatic cancer by activating ROS-mediated Akt/GSK3 β /snail signaling. *Oncogene*. 2018; 37(44):5843-5857.
44. Liao Z, Chua D, Tan NS. Reactive oxygen species: A volatile driver of field cancerization and metastasis. *Molecular Cancer*. 2019; 18(1):65.
45. Afrin S, Giampieri F, Gasparrini M, Forbes-Hernández TY, Cianciosi D, Reboledo-Rodriguez P, et al. Dietary phytochemicals in colorectal cancer prevention and treatment: A focus on the molecular mechanisms involved. *Biotechnology Advances*. 2020; 38:107322.
46. Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman MR, Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2020; 148:80-89.
47. Zaffino C, Russo B, Bruni S. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of anthocyanidins. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2015; 149:41-7.
48. Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2012; 56(1):159-70.
49. Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 2003; 64(5):923-33.
50. Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL, Exon JH. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2006; 46(2):161-83.
51. de Sousa Moraes LF, Sun X, Peluzio M do CG, Zhu MJ. Anthocyanins/anthocyanidins and colorectal cancer: What is behind the scenes? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019; 59(1):59-71.
52. Lin BW, Gong CC, Song HF, Cui YY. Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *British Journal of Pharmacology*. 2017; 174(11):1226-1243.
53. Dreiseitel A, Oosterhuis B, Vukman K V., Schreier P, Oehme A, Locher S, et al. Berry anthocyanins and anthocyanidins exhibit distinct affinities for the efflux transporters BCRP and MDR1. *Br J Pharmacol*. 2009; 158(8):1942-50.
54. Esselen M, Boettler U, Teller N, Bächler S, Hutter M, Rüfer CE, et al. Anthocyanin-rich blackberry extract suppresses the DNA-damaging properties of topoisomerase I and II poisons in colon carcinoma cells. *J Agric Food Chem*. 2011; 59(13):6966-73.
55. Mazewski C, Liang K, Gonzalez de Mejia E. Comparison of the effect of chemical composition of anthocyanin-rich plant extracts on colon cancer cell proliferation and their potential mechanism of action using in vitro, in silico, and biochemical assays. *Food Chem*. 2018; 242:378-388.
56. Huang CC, Hung CH, Hung TW, Lin YC, Wang CJ, Kao SH. Dietary delphinidin inhibits human colorectal cancer metastasis associating with

- upregulation of miR-204-3p and suppression of the integrin/FAK axis. *Sci Rep*. 2019; 9(1):18954.
57. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004; 22(2):229-37.
 58. Noordhuis P, Laan AC, van de Born K, Honeywell RJ, Peters GJ. Coexisting molecular determinants of acquired oxaliplatin resistance in human colorectal and ovarian cancer cell lines. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(15):3619.
 59. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*. 2015; 527(7579):525-530.
 60. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong STC, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*. 2015; 527(7579):472-6.
 61. Liang H, Xu Y, Zhang Q, Yang Y, Mou Y, Gao Y, et al. MiR-483-3p regulates oxaliplatin resistance by targeting FAM171B in human colorectal cancer cells. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol*. 2019; 47(1):725-736.
 62. Li C, Ding H, Tian J, Wu L, Wang Y, Xing Y, et al. Forkhead Box Protein C2 (FOXC2) Promotes the Resistance of Human Ovarian Cancer Cells to Cisplatin in Vitro and in Vivo. *Cell Physiol Biochem*. 2016; 39(1):242-52.
 63. Yang C, Cui X, Dai X, Liao W. Downregulation of Foxc2 enhances apoptosis induced by 5-fluorouracil through activation of MAPK and AKT pathways in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2016; 11(2):1549-1554.
 64. Jiao L, Li DD, Yang CL, Peng RQ, Guo YQ, Zhang XS, et al. Reactive oxygen species mediate oxaliplatin-induced epithelial-mesenchymal transition and invasive potential in colon cancer. *Tumor Biol*. 2016; 37(6):8413-23.

7. EKLER

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Doç.Dr.Gizem Çalıbaşı Koçal

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4932-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Mikrofluidik Sistemde Oluşturulan 3-Boyutlu Dinamik Kolorektal Kanser Hücre Kültüründe Oksaliplatinin ve Antosiyanin'in Epitelyal-Mezenkimal Geçiş Sürecine Etkisi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Gizem Çalıbaşı Koçal Onkoloji Enstitüsü
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐ ÇOK MERKEZLİ ☒

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	Araştırmacı dilekçesi	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2020/29-55	Tarih:07.12.2020				
	Doç.Dr.Gizem Çalıbaşı Koçal'ın sorumlusu olduğu "Mikrofluidik Sistemde Oluşturulan 3-Boyutlu Dinamik Kolorektal Kanser Hücre Kültüründe Oksaliptinin ve Antosiyanin'in Epitelyal-Mezenkimal Geçiş Sürecine Etkisi" isimli klinik araştırmaya ait araştırmacı dilekçesine ilişkin; -Çalışma başlığının "Antosiyaninin Kolorektal Kanserinin Biyolojik Davranışı Üzerine Etkisi" olarak değiştirilmesi. ile ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılamadı
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL (Başkan Yardımcısı)	Tıbbi Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	Katılamadı
Doç.Dr.Nil Hocaoglu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılamadı
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	Katılamadı
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐	H ☒	Katılamadı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	



HASAN KURTER

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası



Öğrenim Bilgileri

27 Ağustos 2018 - Şu Anda (2 yıl 11 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TRANSLASYONEL ONKOLOJİ (YL) (TEZLİ)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.94 / 4.0

03 Eylül 2013 - 28 Mayıs 2018 (4 yıl 9 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
BİYOKİMYA BÖLÜMÜ, BİYOKİMYA PR.
Diploma Numarası: 2017/04/0175
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.04 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: Orta, Yazma: Orta, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Anahtar Kelimeler

Kanser Biyolojisi
Kolorektal Kanser
Çoklu İlaç Direnci
Epitelial-Mezenkimal Geçiş
Fitokimyasal Maddeler

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

H. KURTER, J. YEŞİL, E. DAŞKIN, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, H. ELLİDOKUZ & Y. BAŞBINAR, Drug Resistance Mechanisms on Colorectal Cancer, JBACHS, 2021, 2564-7288, 5, 1, 88-93.

Bildiriler

A. KARADAĞ, H. KURTER, G. ÇALIBAŞI KOÇAL & Y. BAŞBINAR, Drug-Like Molecule Prediction Targeting Inhibition of Hedgehog Signaling Pathwa, Özet Bildiri,

Sağlıkta Yapay Zeka, 16 Nisan 2021, 18 Nisan 2021, 2757-9778, 1, 2, 164 - 164.

H. KURTER, N. MERT ÖZÜPEK, A. KARADAĞ, Y. BAŞBINAR & G. ÇALIBAŞI KOÇAL, Drug-Likeness Analysis of An, Özet Bildiri, Sağlıkta Yapay Zeka, 16 Nisan 2021, 18 Nisan 2021, 2757-9778, 1, 2, 75 - 75.

N. ARTUNÇ, H. KURTER & Y. BAŞBINAR, Changing Graduate Exam Processes with the COVID-19 Pandemic, Tam Metin Bildiri, COVID-19 Pandemisinde Araştırma-Yayın ve Eğitim Süreçlerine Bakış Kongresi, 15 Ocak 2021, 16 Ocak 2021, 5, 51, 698 - 702.

H. KURTER, F. TOKSÖZ, N. MERT ÖZÜPEK, H. ELLİDOKUZ, Y. BAŞBINAR & G. ÇALIBAŞI KOÇAL, Drug Resistance Mechanisms of Colorectal Cancer, Tam Metin Bildiri, 5 th International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences, 18 Aralık 2020, 19 Aralık 2020, 6 - 9.

A. KARADAĞ, H. KURTER, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, G. GENÇOĞLAN, H. ELLİDOKUZ & Y. BAŞBINAR, The Effect of Inhibitors and Antagonists on The Hedgehog Signaling Pathway, Tam Metin Bildiri, International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences, 18 Aralık 2020, 19 Aralık 2020, 1 - 5.

F. TOKSÖZ, T. SEVER, Ş. İNANÇ SÜRER, H. E. MEÇO, H. KURTER, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, Y. BAŞBINAR & H. N. OLGUN, Nöroblastomda Normoksik/hipoksik Mikroçevrenin Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1 Mekanizmasına Etkisi, Sözlü Sunum, Hippocrates Congress, 01 Mart 2019, 03 Mart 2019, 101 - 111.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

3185276, Kanserde İmmünoterapi Etkinliğinin İyileştirilmesine Yönelik Makine Öğrenmesine Dayalı Yeni Gen Keşfi ve İlaç Yeniden Konumlandırma Platformunun Geliştirilmesi, 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama), BİDEB Burslusu, Yürürlükte, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.03.2021 - 14.07.2021, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.01.2020 - 01.01.2023.

3185276, Kanserde İmmünoterapi Etkinliğinin İyileştirilmesine Yönelik Makine Öğrenmesine Dayalı Yeni Gen Keşfi ve İlaç Yeniden Konumlandırma Platformunun Geliştirilmesi, 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama), Burslu, Yürürlükte, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.03.2020 - 17.03.2021, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.01.2020 - 01.01.2023.

BİDEB Destekleri

HASAN KURTER, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı, Başvurusu Reddedildi, 2017 - 2.

HASAN KURTER, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2019 - 2, 01.10.2019 - 30.09.2020.

HASAN KURTER, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Destekleniyor, 2020 - 2, 01.03.2021 - 28.02.2022.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

