

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DİKLOFENAK SODYUM’UN KOLOREKTAL KANSER
HÜCRELERİNDE ADEZYON MOLEKÜLLERİ VE
APOPTOZİSE ETKİSİ**

Çağatay YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DİKLOFENAK SODYUM’UN KOLOREKTAL KANSER
HÜCRELERİNDE ADEZYON MOLEKÜLLERİ VE
APOPİTOZİSE ETKİSİ

Çağatay YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mutay ASLAN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2020-5435 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Tıbbi Biyokimya Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 09/07/2021

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Doç. Dr. Güzin AYKAL
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

.....

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erol GÜRPINAR

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Çağatay YILMAZ

İmza

Prof. Dr. Mutay ASLAN

İmza

TEŞEKKÜR

Bitmez tükenmez enerjisi, gayreti ve güler yüzlülüğü ile bütün laboratuvar çalışmalarına, büyük bir özveri ve titizlikle tezin tüm aşamalarına katkı sağlayan çok değerli tez danışmanı öğretim üyesi hocam Prof. Dr. Mutay ASLAN'a en içten duygularıyla şükranlarımı sunarım.

Bu araştırmanın yapılmasında bilgi ve tecrübesiyle desteğini esirgemeyen ve katkıda bulunan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sadi KÖKSOY'a

Yüksek lisans eğitimim boyunca önümüzde bir ışık gibi durup bize yol gösteren, engin bilgi, beceri ve tecrübelerini bizden esirgemeyip her fırsatta bize aktaran ve bilimsel, etik, anlayışlı ve huzurlu bir çalışma ortamı oluşturan Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyesi hocalarına teşekkür ederim.

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca hiçbir zaman desteklerini eksik etmeyen, bilgi ve tecrübelerini emekle ve özellikle de sabırla benimle paylaşan, bana çoğu zaman katlanan değerli arkadaşım Tuğçe ÇEKER'e çok teşekkür ediyorum.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma;

Sadece yüksek lisans eğitimim değil, yaşamım boyunca sonsuz sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, beni maddi manevi her türlü destekleyerek bugünlere gelmeme sebep olan, canım annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Siklooksijenaz-2 (COX-2), çeşitli insan kolorektal kanser hücrelerinde yapılı ve karsinogeneze katkıda bulunabilir. Bu çalışmada, selektif bir COX-2 inhibitörü olan diklofenak'ın insan kolon adenokarsinom hücrelerinde hücre adezyon molekülleri ve apoptoz üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: CD44, hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1, CD54), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1, CD106) ve epitel hücre adezyon molekülü (EpCAM, CD326) seviyeleri, yüksek seviyede COX-2 ifade eden (HT29) veya COX-2 ifade etmeyen (HCT116) kanser hücrelerinde değerlendirildi. Hücre canlılığı, MTT testi ile belirlendi, COX-2 protein seviyeleri ve aktivitesi, sırasıyla immüno floresan ve florometrik analiz ile değerlendirildi. Endojen çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) seviyeleri sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile ölçülürken hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonu akış sitometrisi ile analiz edildi. Apoptoz seviyelerini belirlemek için Annexin V-FITC/propidyum iyodür etiketleme ve florometrik kaspaz-3 aktivite ölçümleri yapıldı.

Bulgular: Akış sitometrisi analizi, HCT116 hücrelerinde CD44 ve ICAM-1 boyama yüzdesinin HT29 hücrelerine kıyasla önemli ölçüde daha düşük olduğunu ortaya çıkardı. HT29 hücrelerinde COX-2 ekspresyonu ve aktivitesi forbol-12-miristat 13-asetat (PMA) ile indüklendiğinde, CD44 ve ICAM-1 seviyelerinde belirgin bir artış görüldü. HT29 hücrelerinde PMA yoluyla indüklenen COX-2 aktivitesi diklofenak tarafından inhibe edildiğinde CD44 ve ICAM-1 seviyelerinde belirgin bir azalma görüldü. HT29 hücrelerinin diklofenak ile muamele edilmesi sonucunda PUFA seviyelerinde anlamlı bir artış görüldü. HT29 hücrelerinde COX-2 aktivitesi PMA ile uyarıldığında diklofenakla ilişkili PUFA artış anlamlı ölçüde azaldı. Diklofenak ve PMA'nın beraber uygulanması, kontrol gruplarına kıyasla kolon adenokarsinom hücrelerinde apoptotik hücre sayısını ve kaspaz-3 aktivitesini önemli ölçüde artırdı.

Sonuç: Diklofenak'ın koruyucu etkisi, yüksek seviyede COX-2 eksprese eden kolon kanseri hücrelerinde görülmektedir. Bu koruyucu etki, apoptozun indüklenmesi, CD44 ve ICAM-1 ekspresyonunun azalmasıyla meydana gelmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolon, adenokarsinoma, hücre adezyon molekülü, apoptoz.

ABSTRACT

Objective: Cyclooxygenase-2 (COX-2) is expressed in a variety of human colorectal cancer cells and can contribute to carcinogenesis. This study aimed to investigate the effect of diclofenac, a selective COX-2 inhibitor, on cell adhesion molecules and apoptosis in human colon adenocarcinoma cells.

Method: Levels of CD44, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1, CD106) and epithelial cell adhesion molecule (EpCAM, CD326) were evaluated in cancer cells overexpressing (HT29) or not expressing (HCT116) COX-2. Cell viability was determined by MTT assay, COX-2 protein levels and activity were assessed by immunofluorescence and fluorometric analysis, respectively. Endogenous levels of polyunsaturated fatty acids (PUFA) were measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) while expression of cell adhesion molecules were analyzed by flow cytometry. Annexin V–FITC/propidium iodide-labelling and fluorometric caspase-3 activity measurements were carried out to determine apoptosis.

Results: Flow cytometry analysis revealed that the percentage of CD44 and ICAM-1 staining in HCT116 cells were significantly lower compared to HT29 cells. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced COX-2 expression and activity in HT29 cells caused a marked increase in CD44 and ICAM-1 levels which were down regulated by diclofenac. Stimulation of COX-2 activity in HT29 cells via PMA significantly decreased diclofenac associated increase in PUFA levels. Treatment of both diclofenac and PMA significantly increased the number of apoptotic cells and caspase-3 activity in colon adenocarcinoma cells compared to control groups.

Conclusion: In conclusion, chemopreventive effect of diclofenac occurs in COX-2 overexpressing colon cancer cells by increased apoptosis and decreased expression of CD44 and ICAM-1.

Key words: Colon, adenocarcinoma, cell adhesion molecule, apoptosis.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Kolon Anatomisi	4
2.3. Kolorektal Kanser	6
2.4. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi	8
2.5. Kolorektal Kanser Etiyolojisi	9
2.5.1. Kolorektal Polipler	9
2.5.2. Kolorektal Kanserin Genetik Mekanizması	10
2.5.3. Kronik İnflamatuar Bağırsak Hastalığı	14
2.6. Kolorektal Kanserde Evreler	14
2.7. Kolorektal Kanser ve İnflamasyon	16
2.7.1. NF-κB Yolağı	16

2.7.2. COX-2 Yolağı	17
2.8. Hücre Adezyon Molekülleri	20
2.9. Kolorektal Kanser ve Hücre Adezyon Molekülleri	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	24
3.1.1. Hücre Medyumu	24
3.1.2. Hücrelerin Pasajlanması	24
3.1.3. Hücrelerin Dondurulması	25
3.1.4. Hücrelerin Çözülmesi	25
3.2. MTT Sitotoksosite Deneyi	26
3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	27
3.3. İmmünofloresan Boyama	28
3.4. Total Siklooksijenaz Enzim Aktivitesinin Tayini	29
3.5. Kaspaz -3 Aktivitesinin Tayini	30
3.6. Kütle Spektrometrisi Analizi İçin Hücre Örneklerinin Hazırlanması	31
3.7. Çoklu Doymamış Yağ Asitleri Seviyelerinin LC-MS/MS ile Ölçümü	32
3.8. Hücre Yüzeyi Adezyon Molekülleri Miktarının Akış Sitometrisi ile Ölçümü	33
3.9. Annexin-V ile Apoptozun Akış Sitometrisinde Analizi	34
3.10. Protein Miktarı Tayini	35

3.11. İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR	36
4.1. Hücre Canlılığı Analizi	36
4.2. Siklooksijenaz Seviyeleri	40
4.3. Yağ Asidi Seviyeleri	43
4.4. Hücre Adezyon Molekül Seviyeleri	44
4.5. Anneksin V-FITC ve PI Apoptosis Analiz	47
4.6. Kaspaz-3 Aktivitesi	48
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	65

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Dukes evrenlenmesi.	14
Tablo 2.2.	Aster-Coller evrenlenmesi.	14
Tablo 2.3.	TMN sınıflandırması.	15
Tablo 2.4.	TMN evrenlenmesi.	16
Tablo 2.5.	Kolorektal kanser ilerlemesine aracılık eden hücre adezyon molekülleri.	22
Tablo 3.1.	Akış sitometrisinde kullanılan monoklonal antikorlar.	34
Tablo 4.1A.	HCT116 kolorektal kanser hücrelerinde poliunsatüre yağ asidi düzeyleri.	43
Tablo 4.1B.	HT29 kolorektal kanser hücrelerinde poliunsatüre yağ asidi düzeyleri.	44
Tablo 4.2.	Kolorektal kanser hücre hatlarında yüzey antijenleri CD44, CD54, CD106 ve CD326 yüzde ifadesi.	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Kolon bölümleri.	4
Şekil 2.2.	Kolon polipleri.	6
Şekil 2.3.	Kolorektal kanserin anatomik bölgeye göre dağılımı.	7
Şekil 2.4.	Adenomların histolojik görüntüleri.	10
Şekil 2.5.	Adenomadan karsinoma sekansı.	11
Şekil 2.6.	Siklooksijenaz yolağı.	18
Şekil 2.7.	Poliunsatüre yağ asitlerinin biyosentezi.	19
Şekil 4.1.	HCT116 hücrelerinde diklofenak dozuna bağımlı 72 saatlik hücre canlılık analizi.	36
Şekil 4.2.	HT29 hücrelerinde diklofenak dozuna bağımlı 72 saat hücre canlılık analizi.	37
Şekil 4.3.	HT29 hücrelerinde forbol-12-miristat-13-asetat dozuna bağımlı 24 saatlik hücre canlılık analizi.	38
Şekil 4.4.	HT29 hücre gruplarında canlılık analizi.	39
Şekil 4.5.	Diklofenak ve forbol-12-miristat-13-asetat uygulanan kolorektal karsinoma hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü.	40
Şekil 4.6.	Farklı dozlarda 24 saat forbol-12-miristat-13-asetat uygulanan HT29 hücrelerinde temsili COX-2 immüno Floresan boyaması.	40
Şekil 4.7.	Farklı dozlarda 24 saat forbol-12-miristat-13-asetat uygulanan HT29 hücrelerinde temsili COX-2 immüno Floresan boyamasının ImageJ programı ile kantitasyonu.	41

Şekil 4.8.	HT29 hücre gruplarında temsili COX-2 immünofloresan boyaması.	41
Şekil 4.9.	HT29 hücre gruplarında temsili COX-2 immünofloresan boyamasının ImageJ programı ile kantitasyonu.	42
Şekil 4.10.	HT29 hücre gruplarında total COX aktivitesi.	43
Şekil 4.11.	Kolorektal kanser hücre hatlarında hücre CD44, CD54, CD106, CD326 adezyon molekülleri ve izotip kontrollerin akış sitometrisi analizi.	46
Şekil 4.12.	Anneksin V-FITC ve PI etiketli HT29 ve HCT116 hücrelerinin temsili akış sitometrisi analizi.	47
Şekil 4.13.	Anneksin V-FITC ile HT29 hücre gruplarında apoptozunun kantitatif analizi.	48
Şekil 4.14.	Anneksin V-FITC ile HCT116 hücre gruplarında apoptozunun kantitatif analizi.	48
Şekil 4.15.	HT29 hücre gruplarında Kaspaz-3 aktivitesi.	49
Şekil 4.16.	HCT116 hücre gruplarında Kaspaz-3 aktivitesi.	49

SİMGELER ve KISALTMALAR

AA	: Araşidonik asit
ADPH	: Dihidroksifenoksazin
AFC	: 7-amino-4-triflorometil kumarin
ALA	: α -linolenik asit
APC	: Adenomatöz polipozis koli
Bax	: Bcl-2 ile ilişkili X proteininin
BSA	: Bovin serum albümin
CEACAM	: Karsinoembriyonik hücre adezyon molekülü
CK-1	: Kazein kinaz-1
COX-2	: Siklooksijenaz-2
cPLA₂	: Sitozolik fosfolipaz A ₂
CSF	: Hücre floresan değeri
CTCF	: Doğrulanmış total hücre floresanı
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DCF	: Diklofenak
DGLA	: Dihomo- γ -linoleik asit
DHA	: Dokosaheksaenoik asit
DMEM	: Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit

DSCF	: Dwass, Steel, Critchlow-Fligner
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütünün
E-Kaderin	: Epitelyal kaderin
EPA	: Eikozapentoenoik asit
EpCAM	: Epitel hücre adezyon molekülü
E-Selektin	: Endotelyal-Selektin
FAP	: Familyal Adenomatöz Polipozis
FBS	: Fetal bovin serum
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
GSH	: Glutasyon
GSK-3β	: Glikojen sentaz kinaz-3 β
HNPCC	: Kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser
ICAM-1	: Hücreler arası adezyon molekülü-1
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
İBH	: İnflamatuvar bağırsak hastalığı
JAK	: Janus kinaz
K-ras	: Kristen rat sarcoma
L1-CAM	: L1-Hücre adezyon molekülü
LA	: Linoleik asit

LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi
LEF	: Lenfoid arttırıcı bağlanma faktörü
LFA	: Lökosit fonksiyonlu adezyon molekülü
LOX	: Lipoksijenazlar
LPS	: Lipopolisakkarid
L-Selektin	: Lökosit-Selektin
MAP	: MYH-ilişkili Polipozis
MPT	: Mitokondriyal geçirgenlik kompleksi
MRM	: Çoklu reaksiyon izleme metodu
MS/MS	: Kütle spektrometresi
MTT	: 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid
NCAM	: Sinirsel hücre adezyon molekülü
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NGS	: Normal Keçi Serumı
N-Kaderin	: Nöronal kaderin
NSAİD	: Steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar
OPN	: Osteopontin
p53	: Tümör protein 53
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PECAM	: Trombosit endotelial hücre adezyon molekülü

PG	: Prostaglandin
PGH₂	: Prostaglandin H ₂
PI	: Propidyum iyodür
P-Kaderin	: Plasental kaderin
PMA	: Forbol-12-miristat-13-asetat
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florid
P-Selektin	: Trombosit–Selektin
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
RFU	: Bağlı floresan ünite
STAT3	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü
TCF	: T-hücre faktörü
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör- α
TNM	: Tümör, lenf nodu ve metastaz
UFLC	: Ultra hızlı sıvı kromatografisi
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser, dünyadaki en yaygın görülen üçüncü malignitedir (Rawla ve ark., 2019). Kolorektal kanser prognozunu olumsuz etkileyen faktörler, genomik instabiliteye bağlı apoptozun baskılanması ve inflamasyona yanıt olarak metastazdır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Kolorektal kanserde metastaza yönelik tedavilerden birisi de, tümörle ilişkili inflamasyona karşı diklofenak gibi selektif steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçların (NSAİD) kullanılmasıdır (Schack ve ark., 2019). Bu ilaçlar, araşidonik asit kaskadında COX-2'yi inhibe ederek inflamatuvar yanıtı baskılar.

Yüksek COX-2 seviyelerinin kronik inflamasyonu ve karsinogenezi tetiklediği bildirilmiştir (Menter ve ark., 2010). Klinik ve epidemiyolojik çalışmalar, kolorektal kanserde COX-2 inhibisyonunun önemli bir faydası olduğunu göstermektedir (Dubois, 2009). COX-2'nin aşırı ekspresyonu, deneysel sistemlerde tümör hücresi göçünü, hücre adezyonunu ve tümör invazyonunu artırabilir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde yapılan bir çalışma, COX-2 tarafından indüklenen invazyona hyalüronat-CD44'ün aracılık ettiği sonucuna varmıştır (Dohadwala ve ark., 2001).

Tümör dokusunda COX-2 ekspresyonu prognoz ile ilişkilidir (Agrez, 1996). Çalışmalar, kolorektal kanser hücresi COX-2 aktivitesinin inhibisyonunun, intrahepatik tümör hücresi proliferasyonunu ve karaciğer metastaz hızını büyük ölçüde azalttığını göstermektedir (Smakman ve ark., 2005). Benzer şekilde, COX-2 ekspresyonu normal hücrelerden primer tümörlere ve metastazlara upregülasyon gösterir ve proliferatif aktivite, tümör lokasyonu, Dukes evresi ve farklılaşma ile ilişkilidir (H. Zhang ve Sun, 2002). Kolorektal kanser ilerlemesi ve genel sağkalım, primer kolorektal karsinom tarafından değil, esas olarak karaciğer metastazının ilerlemesi ile belirlenir.

Hücre adezyon molekülleri, kolorektal kanser prognozunda lökositlerin aktivasyonu, lökositlerin inflamasyon bölgesine göçü, hücre-hücre etkileşimleri ve metastaz oluşumu gibi birçok olayda rol oynar (Alexiou ve ark., 2001). Hücre adezyon molekülleri sadece primer karsinomdan malign hücre ayrılmasına değil, aynı zamanda uzak dokuya tümör hücresi göçüne de neden olur (Haier ve ark., 2000). Epiteldeki hücre adezyon

moleküllerinin değişen ekspresyonu ve çeşitli kolorektal kanser hücre hatlarında farklı adezyon ligandlarının varlığı da metastazın organ seçiciliğini düzenleyebilir (Paschos ve ark., 2009).

HT29, iyi diferansiye adenokarsinomlara neden olan, yaygın olarak kullanılan bir kolorektal kanser hücre hattıdır. HT29 hücre hattı, COX-2'yi pozitif olarak ifade eder. HT29'dan farklı olarak, HCT116 kolorektal kanser hücre hattı COX-2 genini ifade etmez (Liu ve ark., 2003). Daha önceden belirttiği gibi çalışmalar, selekoksib ve diklofenak gibi spesifik COX-2 inhibitörlerinin kolorektal kanser üzerindeki koruyucu etkilerini göstermektedir (Dubois, 2009; Schack ve ark., 2019). Ayrıca lökositlerle hücre-hücre etkileşimlerinde, apoptozun indüksiyonunda ve kolorektal kanser hücrelerinin metastazında hücre adezyon moleküllerinin önemi vurgulanmaktadır (Paschos ve ark., 2009). Bununla birlikte, insan kolon adenokarsinom hücrelerinde CD44, ICAM-1, VCAM-1 ve EpCAM seviyelerini düzenlemede COX-2 ekspresyonunun rolü kapsamlı bir şekilde değerlendirilmemiştir. Yapılan çalışmada yüksek seviyede COX-2 (HT29) ifade eden kolorektal kanser hücrelerinde veya COX-2 (HCT116) ifade etmeyen kolorektal kanser hücrelerinde diklofenak'ın etkisi değerlendirilmiştir. Deneysel hücre modellerinde endojen araşidonik asit ve apoptoz seviyeleri de belirlendi. Çalışmamızda sunulan veriler, araşidonik asit sinyal yolunun, HT29 kolorektal kanser hücrelerinde CD44 ve ICAM-1 hücre adezyon proteinlerinin ekspresyonunu düzenlediğini göstermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, vücut hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını kontrol eden genlerde görülen mutasyon sonucu, bu genlerin aşırı aktivasyonu veya fonksiyon kaybından dolayı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak komşu dokulara yayılması veya köken aldığı organdan kan veya lenf yolları sayesinde taşınımı ile oluşan genetik bir hastalıktır. Son yıllardaki insidansı ve mortalitesindeki artış nedeni ile önemli bir sağlık sorunu olarak görülmektedir (Bertram, 2000).

Kanser gelişiminde genomik instabiliteden dolayı hücreler; proliferatif sinyalleşmenin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümüne direnme (apoptoz inhibisyonu), anjiyogenezi indükleme, invazyon ve metastazı aktive etme, tümörle ilişkili inflamasyon gibi beceriler kazanırlar. Kazanılan bu beceriler, hücrenin hayatta kalması, çoğalması, yer değiştirmesi, istilası ve komşu hücreler ile etkileşime kadar kontrol mekanizmalarını temsil eder (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Tümörün kaynaklandığı doku türüne bağlı olarak kanser; karsinoma, sarkoma, lenfoma, lösemi ve germinoma gibi birkaç ana türü bulunmaktadır:

Karsinoma, spesifik olarak vücudun iç veya deri gibi dış yüzeylerini kaplayan epitel hücrelerden kaynaklı bir malignitedir. En sık görülen malignite karsinomadır; en sık karşılaşılan türleri meme, kolon, prostat ve akciğer kanserleridir.

Sarkoma, kemik, kıkırdak, vasküler veya hematopoietik dokularda görülen kanser türüdür.

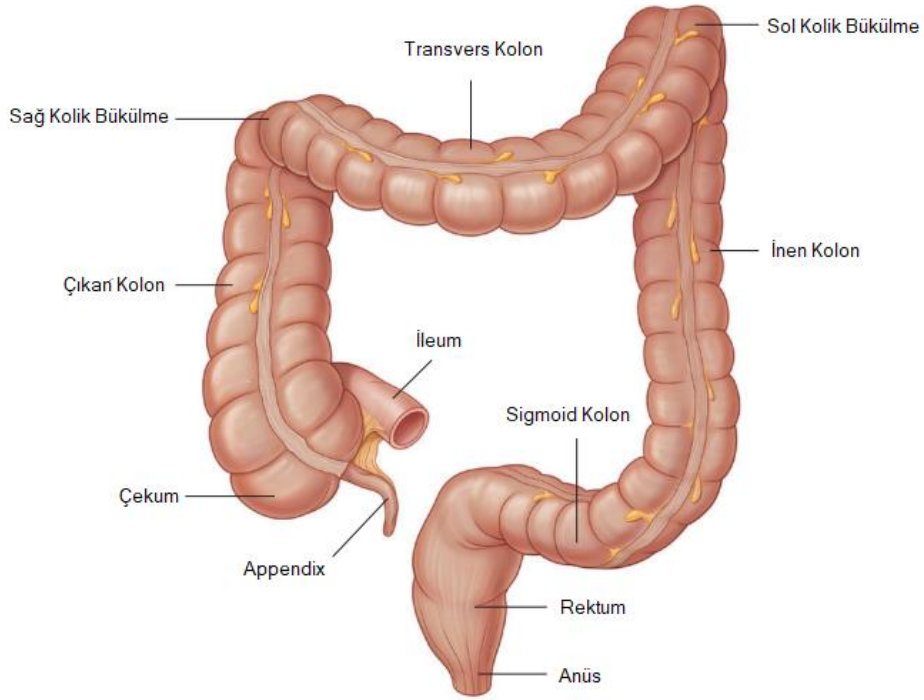
Lenfoma, lenfositlerde görülen kanser türüdür.

Lösemi, kemik iliğinde başlayan ve yüksek sayıda anormal kan hücresi ile sonuçlanan bir grup kan kanseridir.

Germinoma, genellikle beyinde görülen bir kanser türüdür (Berman, 2004).

2.2. Kolon Anatomisi

Kolon yada diğer adıyla kalın bağırsak, ileumun ucundan sigmoid kolon ile rektum arasındaki köşeye kadar, ileoçekal valf ve apendiks dahil olmak üzere, ince bağırsakları bir ark gibi saran tübüler yapıdır (Şekil 2.1). Rektum ve anüs ile birlikte kalın bağırsağın tamamını oluşturur. Kolon, 120–200 cm uzunluğunda, ince bağırsak uzunluğunun yaklaşık dörtte birini ve gastrointestinal sistemin yaklaşık beşte birini temsil eder. Kolonun klasik bölümleri sırasıyla çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolondur. Kolonun en geniş kısmı çekumdur, sigmoid kolona doğru kolon çapı küçülür. (Aggarwal ve ark., 2020).



Şekil 2.1. Kolon bölümleri.

Şekil, (Drake ve ark., 2019)'dan alınarak Türkçeleştirilmiştir.

Çekum, kolonun başlangıç kısmıdır. Ortalama aksiyel uzunluğu yaklaşık 6 cm ve genişliği 7,5 cm olarak kolonun en kalın parçasıdır. Karın sağ alt kadranında (sağ iliak fossa) konumlanmıştır. İleoçekal valf tarafından yönlendirilen terminal ileum ile birleştiği yerde çıkan kolon haline gelir. Neredeyse tamamen peritonla çevrelenmiştir. Çekumun iç yan ve arka yüzüne ileoçekal valfin 2 cm altına apendiks açılmaktadır.

Apendiks 7,6 cm uzunluğundadır ve immünolojik bir işlevi olduğu düşünülmekte fakat, bu organ genellikle körelmiş kabul edilir. (Stedman, 2013).

Çıkan kolon, çekumdan başlayarak yukarı karaciğer sağ lobuna kadar uzanmaktadır, burada hepatik fleksurayı (sağ kolik bükülme) oluşturur ve tranvers kolon ile devam eder. Ortalama uzunluğu 12-20 cm'dir. Ön ve yan yüzeyleri periton ile örtülüdür (Kararli, 1995).

Transvers kolon, kolonun en uzun (yaklaşık 45 cm) ve posterior karın duvarına uzun bir mezenter ile bağlanır, bu da ona hareketlilik sağlar. Karaciğerin sağ lob alt yüzünün hemen altında başlar, hepatik ve splenik fleksuralar (sağ ve sol kolik bükülmeler) arasında konumlanır. Transvers kolonun neredeyse tamamı peritonla kaplıdır. Transvers mezokolon pankreas ve sol böbrek kapsülüne tutunarak karın boşluğunu üst ve alt kolon olmak üzere ikiye ayırmaktadır. Bu yapı bir bölümdeki enfeksiyonun diğerine yayılmasını engelleyen doğal bir bariyer işlevi görmektedir (Nano ve ark., 1998).

İnen kolon yaklaşık 25 cm uzunluğundaki, splenik fleksuradan pelvik bölgesine uzanan kolonik segmenttir. Çıkan kolon gibi inen kolon da tüm yüzeyleri periton ile kaplanmış ve kısa bir mezoklona sahiptir. İnce bağırsağa ve karın duvarını komşudur. Çıkan kolona göre daha derin bir yerleşime sahip olan inen kolon, retroperitoneal olarak yerleşmiştir (Liang ve ark., 1997).

Sigmoid kolon, ortalama 35-40 cm olan uzunluğa sahiptir ve mezenterlidir. İnen kolon ile rektum arasındaki en dar ve en mobil kolonik segmenttir. Tamamen peritonla kaplı sigmoid kolon, genellikle sol iliak fossadan pelvik bölgeye uzanan V şeklinde ve bazen U şeklinde bir mezokolona sahiptir. Üreter, iliak arter, mesane, kadında uterus, piriformis kası ile komşudur (Hull, 2000).

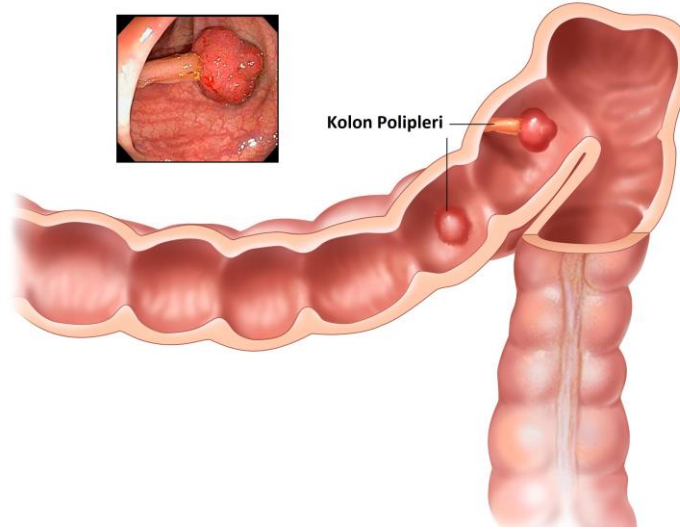
Rektum, sigmoid kolondan sonra başlar ve anüste sonlanır. Yaklaşık 12-14 cm uzunluğundadır ve kolonun son bölümüdür. Rektum içerisinde Houston valfi denilen üç mukozal katlantı (sol üst, sağ orta, sol alt) bulunur. Genel olarak, rektumun üst üçte birinin ön ve yan tarafında periton ile kaplandığını, orta üçte birinin ön yüzünde periton ile kaplandığını ve alt üçte birinin ekstraperitoneal olduğunu bilinmektedir. Rektum

içbükeylik boyunca devam eder ve kuyruk sokumunun ucunda biter. Bu noktada keskin bir açı ile anal kanalı oluşturur. Bu noktada keskin bir açıyla kaldırâçlar arasındaki anal kanalı oluşturur. Kadınlarda rektum rahim ağzına yakındır. Erkeklerde önden mesane, seminal vezikül ve prostata komşudur (Kierner ve ark., 2000).

Anal kanal, rektum ile anüs arasında 4 cm uzunluğundaki son parçasıdır. Kuyruk sokumuna arkadan, kadınlarda arka vajinal duvara ve erkeklerde üretra ile komşudur. Anal kanal, eksternal ve internal sfinkter tarafından çevrilmiştir, eksternal sfinkter çizgili kas, internal sfinkter rektumun iç kasının devamı olan düz kas dokusuna sahiptir (Lazorthes ve ark., 1999).

2.3. Kolorektal Kanser

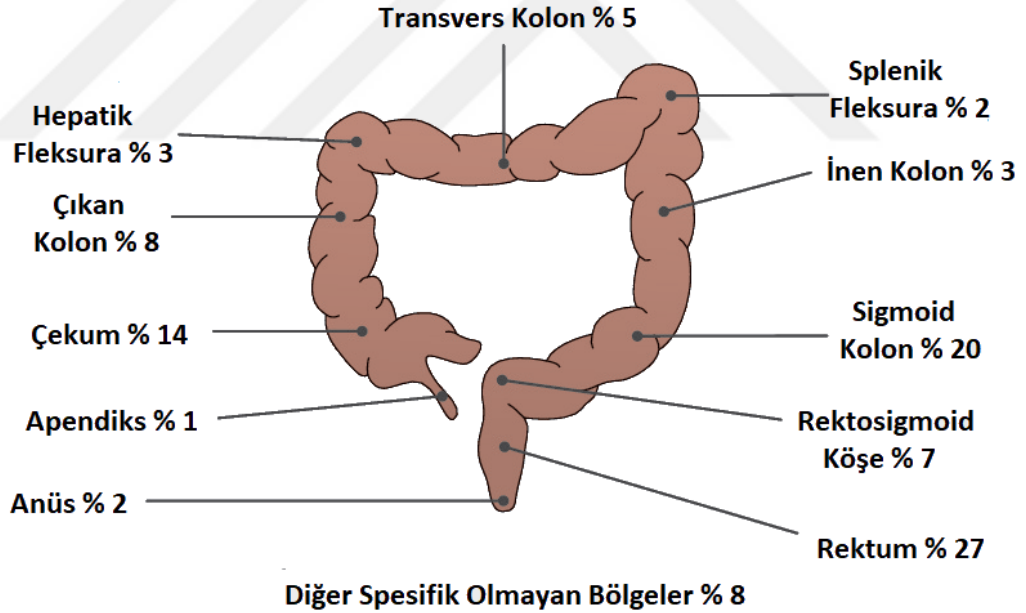
Bağırsak kanseri, kolon kanseri veya rektum kanseri olarak da bilinen kolorektal kanser (KRK), kalın bağırsak kısımları olan kolon veya rektumu kaplayan epitel hücrelerde kanser gelişmesidir. Çoğu kolorektal kanser, kolon veya rektumun iç yüzeyinde bir büyüme (şişlik) olarak başlar ve bu büyümelere polip denir (Şekil 2.2). Kolorektal poliplerinin, normal mukozada hücre çoğalması, farklılaşması veya apoptoz aşamalarındaki herhangi bir kusurun sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (Rahbari ve ark., 2016).



Şekil 2.2. Kolon polipleri.

Şekil, Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) web sayfasından alınarak Türkçeleştirilmiştir (<https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq>, Erişim tarihi: 16 Mayıs 2021).

Bazı polip türleri zamanla (genellikle yıllarca) kansere dönüşebilir, ancak tüm polipler kansere dönüşmez. Bir polipin kansere dönüşmesi, polip türüne bağlıdır. Yakın tarihte popülasyon temelli bir çalışmada, kolonoskopi taramasıyla asemptomatik hastaların % 34,3'ünde en az bir polip bulunduğu bildirilmiştir (Choi ve ark., 2012) Kolon kanserlerinin çoğunun önceden iyi huylu adenomatöz poliplerde ortaya çıktığı düşünülmektedir. Poliplerin belirti ve bulguları büyüklüklerine ve bulundukları yere bağlıdır. Polipler genellikle sigmoid kolon, çekum ve rektum bölgelerinde görülmektedir (Şekil 2.3). Kolonun küçük polipleri genellikle asemptomatiktir ve sıklıkla başka amaçlar için yapılan endoskopik veya radyografik incelemeler sırasında tesadüfen teşhis edilirler. Polipler ülserleşip kanayabilir. Polip belirtilerinde sıklıkla rastlanılan semptomlar rektal kanama, dışkı renginde değişiklik, dışkıda kan, tuvalet alışkanlıklarında değişiklikler ve karın ağrısıdır (John ve ark., 2011).



Şekil 2.3. Kolorektal kanserin anatomik bölgeye göre dağılımı.
Şekil, (Thrumurthy ve ark., 2016)'dan alınarak Türkçeleştirilmiştir.

Polipler genellikle kanser öncüsü oldukları için kanser oluşumundan önce cerrahi yöntemler ile alınması gerekir. Bir polipte çeşitli sebeplerden ötürü kanser oluşursa, zamanla kolon veya rektum duvarında büyür. Duvarda oluşan kanserli hücreler, duvarı işgal ederek anormal büyüme ve çoğalma ile kolonu tıkamaktadırlar. Kontrolsüz çoğalan

bu hücreler kan damarları veya lenf damarlarında da büyüyebilirler. Kan ve lenf yolları arayıcılığıyla ise yakındaki hücrelerle etkileşim veya vücudun uzak kısımlarına metastaz gösterebilirler (Markowitz ve Bertagnoli, 2009).

2.4. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi

Kolorektal kanser gelişmiş ülkelerde özellikle erişkin yaştaki bireyleri etkileyen bir kanser türü olması nedeni ile önemli onkolojik sorunlardan biridir. Son yıllarda dünya çapında görülme sıklığı bakımından tüm kanser türleri arasında, meme ve akciğer kanserinden sonra üçüncü kanser türü olan KRK, ölüm oranı ile akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2020 yılındaki verilerine göre dünya genelinde tahmini yaklaşık 2 milyondan fazla kişi KRK'e yakalanmış ve yaklaşık 1 milyon kişi KRK nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Kolorektal kanserin erkeklerde görülme ve ölüm oralarını kadınlara göre daha fazladır (Sung ve ark., 2021).

Kolorektal kanserin metastatik insidansı oldukça yüksektir: tanı konulan dört kolorektal kanser hastasından birinde metastaz görülürken, yarısında metastaz daha sonra hastalığın seyri sırasında gelişir (Takahashi ve Berber, 2020). Karaciğer en sık metastaz bölgesidir. Kolorektal kanser ilerlemesi ve genel sağkalım, esas olarak primer KRK tarafından değil, karaciğer metastazının ilerlemesi ile belirlenir. Karaciğer metastazları tedavi edilmezse, yaşam beklentisi bir yıldan azdır. Teşhis anında uzak doku metastazı olmayan ve küratif amaçlı cerrahi tedavi uygulanan hastalarda sağ kalım oranı daha yüksektir (McLoughlin ve ark., 2006).

Kanser için mevcut tedaviler arasında cerrahi olarak çıkarılması, kemoterapi ve dayanacak kadar güçlü olan hastalar için adjuvan kemoterapi yer alır. Bugüne kadar, kanser dokusunun cerrahi olarak çıkarılması, KRK için en uygun yol olarak kabul edilmektedir (Wolpin ve ark., 2007). Son yıllardaki teknolojik gelişmelere bağlı olarak kanser tanısında kullanılan yöntemlerin gelişmesi, çeşitli tarama programlarının uygulanmaya başlanması, yeni cerrahi tekniklerin ortaya konulması ve yeni kemoterapötik ajanların adjuvan tedavilerinde yaygınlaşması ile KRK'nın daha erken dönemde teşhis edilmesine, daha efektif olarak tedavi edilmesine ve ölüm oranlarının azalmasına katkıda bulunmaktadır.

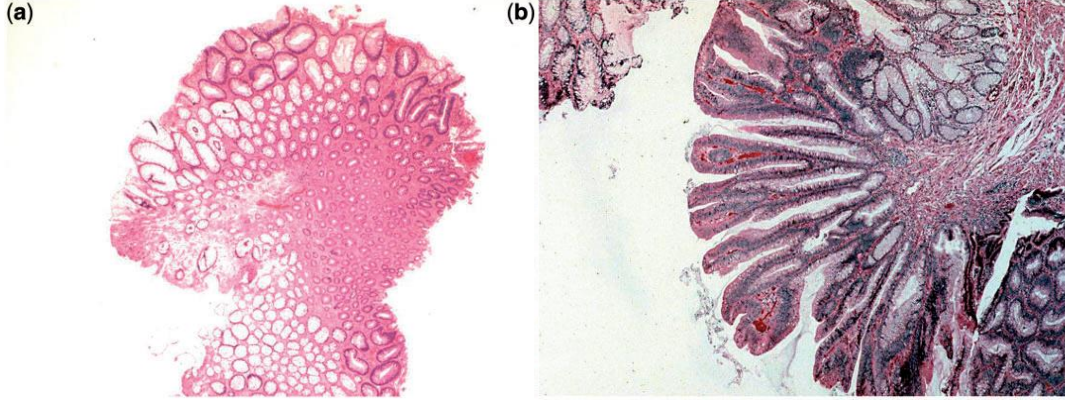
2.5. Kolorektal Kanser Etiyolojisi

Kolorektal kanser gelişimi birden fazla faktöre bağlı olduğu düşünülmekte fakat kesin olarak bilinmemektedir. Bu faktörler; temel olarak adenomlar, genetik ve kronik inflamatuvar bağırsak hastalıklarıdır. Bunun yanı sıra yaş, beslenme ve diğer çevresel etkenler KKK gelişiminde önemli faktörlerdir (Akin ve Tozun, 2014).

2.5.1. Kolorektal Polipler

Polipler, kolon lümenine yükselen anormal büyümelerdir. Çoğu benign tümörlerdir ve hiçbir semptom göstermezler. Polipler; hiperplastik, neoplastik (adenomatöz ve maling), hamartomatöz ve inflamatuvar olarak sınıflandırılmaktadır. Hiperplastik polipler sık görülen ve neoplastik olmayan polip türüdür. Yaygın olarak rektum bölgesinde görülürler ve çapları 5 mm'den küçüktür. Bu yüzden diğer neoplastik adenom poliplerden ayırt edilmeleri önemlidir. Fakat hiperplastik polipler endoskopide her zaman adenomatöz poliplerden ayırt edilemez ve bu nedenle sıklıkla cerrahi işlemle çıkartılırlar (Shussman ve Wexner, 2014).

Adenom, 'adeno' kelimesinden türetilmiş bezzel kökenli veya bezzel bir yapıda meydana gelen benign tümörlere verilen isimdir. Adenomlar kolon, adrenal, hipofiz, tiroid dahil birçok organda ortaya çıkabilirler. Benign tümör olmalarına rağmen çeşitli mutasyonlarla maling tümöre çevrilebilirler, malign tümöre dönüştüklerinde adenokarsinom olarak adlandırılırlar. Özellikle karsinom öncüsü adenomların çapları genellikle 1-2 cm'den büyüktür. Adenomlar genellikle, displazi derecelerine göre düşük, orta, yüksek olarak, makroskopik görünümüne göre sapsız tırtıklı, saplı, düz, ve histolojik yapılarına göre tübüler, villöz (Şekil 2.4) ve tübülovillöz olarak sınıflandırılırlar (Ishii ve ark., 2011). Tübüler adenomlar, adenomatöz poliplerin yaklaşık % 75 ila % 85'ini temsil eder ve bir malignite barındırma şansı % 5'ten azdır. Tübülovillöz adenomlar ise poliplerin % 10 ila % 15'ini temsil eder ve genellikle % 20 ila % 25'i malignite barındırır. Villöz adenomlar, kalan poliplerin % 5 ila % 10'unu oluşturur ve kolorektal poliplerin % 35 ila % 40'ı ile en çok malignite gösteren türüdür. Özellikle villöz adenomların boyutu ve displazi derecesi polipin malign olup olmadığı hakkında önemli bir bulgudur (Alvarez ve ark., 2013).



Şekil 2.4. Adenomların histolojik görüntüleri.

a) tübüler adenom, b) villöz adenom (hematoksilen-eozin boyası ile boyalı, 400x büyütme). Şekiller, (Shussman ve Wexner, 2014)'den alınmıştır.

Diğer adıyla "Juvenil polipler" olarak da bilinen hamartomatöz polipler, esas olarak hipertrofik (büyümeye bağlı) bir epitel ile kaplanmış bağ dokusundan (çoğunlukla düz kas) oluşur. Genellikle çocuklarda ve özellikle rektum bölgesinde görülen neoplastik olmadığı düşünülen bir polip türüdür. Makroskopik olarak, saplı, kiraz kırmızısı, pürüzsüz poliplerdir ve bazen saplı adenomatöz poliplerden den ayırt edilemezler (Mestre, 1986).

İnflamatuvar polipler (psödopolipler) en yaygın olarak inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) olan hastalarda, özellikle ülseratif kolitte görülür. Bu lezyonlar gerçek polipler değildir, hasarlı mukozal yapıda inflamatuvar infiltrasyonların birikmesiyle oluşurlar. Bu lezyonlar malign öncüsü değildir ancak makroskopik görünümüne bağlı olarak adenomatöz poliplerden ayırt edilemezler (Politis ve ark., 2017).

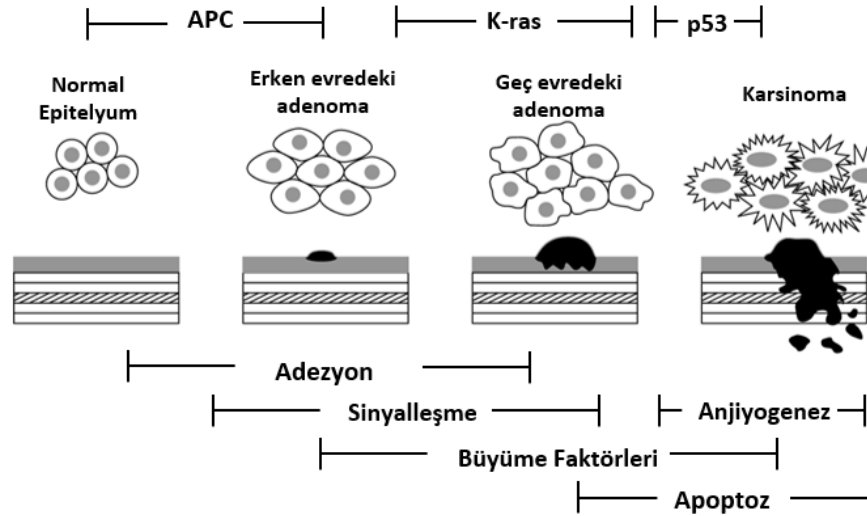
2.5.2. Kolorektal Kanserin Genetik Mekanizması

Kolorektal karsinomların çoğunun adenomatöz poliplerden geliştiği kabul edilmektedir. Adenomdan karsinoma dönüşüme yol açan bu süreç, üç temel mekanizmaya ayrılan çok sayıda kümülatif genetik değişiklik gerektirir.

Proto-onkojenlerin aktif onkojenlere dönüşümlerini indükleyen mutasyonlar, tümör baskılayıcı genlerdeki ve DNA onarımında görev alan genlerdeki mutasyonlar olmak üzere bu üç mekanizma kontrolsüz hücre çoğalmasına, otonom büyümeye ve dolayısıyla tümör oluşumuna katkıda bulunur. Özellikle aktif onkojenlere dönüşümü indükleyen mutasyonlar, hücre içi sinyal iletiminde rol oynayan genlerde görülür ve bunların

aktivasyonu, anormal sinyal iletimine neden olur. (Ahnen, 2011). Neoplastik sürecin başlangıcı, ilk genetik mutasyonların neden olduğu genetik hasarı sürdürmesine dayanmaktadır. ‘Adenomadan karsinoma sekansına’ olarak adlandırılan genetik hasar sürecinde, neoplastik hücrelerin bazal membrana nüfuz etme ve metastaz yapma yeteneği kazanması en kritik noktadır (Vogelstein ve Kinzler, 2004).

Adenomdan kolorektal karsinom gelişiminde birçok genin rol oynadığı kabul edilmiştir. Bu genlere tümör baskılayıcı genler APC ve p53; proto-onkojenler K-ras ve c-myc; ve DNA yanlış eşleşme onarım genleri MLH1, MSH2 ve MSH6 örnek olarak verilebilir. Her bir mutasyonun kritik öneme sahip olduğu ve spesifik bir tümör oluşumu aşamasına etki ettiğine inanılmaktadır (Tariq ve Ghias, 2016). Primer olarak KRK gelişimi (adenomadan karsinoma sekansı, Şekil 2.5) APC geni mutasyonu, bunun devamında kristen rat sarcoma’nın (K-ras) mutasyonel aktivasyonu ve tümör protein 53’ün (p53) inaktivasyonu ile kazanılır (Shin ve ark., 2007).



Şekil 2.5. Adenomadan karsinoma sekansı.

Adenomdan karsinoma oluşumu. APC; Adenomatöz poliposis koli, K-ras; Kristen rat sarcoma, p53; tümör protein 53. Etkilenen fonksiyonel yollar, diyagramın altında gösterilmektedir. (Fearnhead ve ark., 2002)’den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

Kromozom 5q21’de lokalize APC geni, çok işlevli bir tümör baskılayıcı protein olan adenomatöz poliposis koli (APC) ekspresyonundan sorumludur. Bu protein çeşitli fonksiyonlara sahip proteinler ile etkileşime girerek migrasyon, adezyon, kromozom stabilitesi ve proliferasyon gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenlemektedir (L. Zhang ve Shay, 2017). Temel fonksiyonu sitoplazmik β -katenin’in uygun seviyelerde tutmak

amacıyla, ubiquitin aracılı degradasyonu sağlamaktır. β -Katenin degradasyonu Wnt sinyal yolağı aktif değilken hücre sitoplazmasında APC proteini, glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK-3 β), kazein kinaz-1 (CK1) ve aksin proteinleri bulunan degradasyonu kompleksi sayesinde gerçekleştirilir. Degradasyon kompleksine bağlı GSK-3 β , β -katenin'in spesifik serin/treonin rezidülerinden fosforilleyerek degradasyonu sağlamaktadır. Wnt sinyali varlığında β -katenin'in degradasyon kompleksinde ayrılarak sitoplazmada birikmesi sağlanır. Biriken β -katenin, nükleusa translokasyon gösterir ve groucho proteini ismi verilen T-hücre faktörü/lenfoid arttırıcı bağlanma faktörü (TCF/LEF) transkripsiyon faktörleri inhibitörü ile yer değiştirir. Burada β -katenin TCF/LEF etkileşimi ile çeşitli proteinlerin (özellikle kritik proteinlerin c-myc, cyclin D1 gibi) ekspresyonları düzenlenmektedir (Segditsas ve Tomlinson, 2006; Shang ve ark., 2017). APC geninde görülen mutasyonlar KRK için en önemli bulgudur ve görülme sıklığı %85'in üzerindedir (Markowitz ve Bertagnolli, 2009).

Ras gen ailesinden K-ras geni kromozom 12p12'de bulunmaktadır. K-ras geni, 188 amino asitlik bir proteini kodlar. Normal koşullarda, ras proteinleri hücrede inaktif durumda bulunur (Friday ve Adjei, 2005). Ras proteini aktif olduğu zaman onkojenik etkileri olan çok çeşitli efektörlerin regülasyonunu sağlamaktadır. K-ras genindeki değişiklikler sayesinde, protein sürekli aktif durumda kalır ve regülasyon fonksiyonu kaybolur. Bundan dolayı ise hücrelerde kontrolsüz büyüme ve çoğalma görülmektedir (Shields ve ark., 2000). Ras gen ailesinin insanda görülen N-ras, H-ras ve K-ras olmak üzere üç adet izoformu bulunmaktadır ve KRK'de % 30 ila % 40'ında K-ras geni mutasyonuna rastlanılmaktadır (Arrington ve ark., 2012). N-ras mutasyonlarının KRK'de görülme sıklığı % 3 ila % 4'tür. H-ras mutasyonları ise genellikle baş boyun kanserleri ve idrar yolu kanserlerinde görülürken KRK'de nadiren görülmektedir (S. H. Chen ve ark., 2019).

Kolorektal kanser prognozunda etkin diğer önemli mutasyonel değişikliklerden birisi de tümör baskılayıcı gen p53 inaktivasyonudur. P53 geni kromzom 17p13 lokalize bir transkripsiyon faktörüdür. Temel görevi; DNA hasarı, hipoksi, onkojen aktivasyonu gibi hücrel streslerin varlığında hücre döngüsü durmasını, apoptozu veya yaşlanmayı düzenleyici genlerin regülasyonunu sağlamasıdır. Apoptozu mitokondriden sitokrom C

salınımını sağlayarak, kaspaz-9 ve buna bağlı efektör kaspazların (3, 6, 7) aktivasyonuna neden olarak indükleyebilir. p53'te görülen değişiklikler KRK'in geç dönemlerinde ortaya çıkan önemli bir basamaktır (Li ve ark., 2015).

Bu mutasyonlar dışında birkaç kalıtsal sendrom KRK ile ilişkilidir. Bu hastalıklar; hereditör KRK vakalarının % 10'unu oluşturmaktadır. Klasik olarak çok sayıda polip ile karakterize polipozis sendromlar, polip içermeyen ya da çok az sayıda polip içeren nonpolipozis sendromlar şeklinde sınıflara ayrılır. Bu sendromlar ailede kalıtsal bir olgu yokken, daha çok çevresel veya yaş gibi faktörler ile ortaya çıkan sporadik sendromlara oranla daha erken yaşta ortaya çıkmaktadır (Byrne ve Tsikitis, 2018).

Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP) : Kalıtsal bu sendroma sahip bireylerde APC mutasyonu klasik bir bulgudur. Otozomal dominant geçişli FAP sendromu bireylerde genç yaşlarda bile kolon ve rektum bölgesinde benign polipler gelişebilir. Cerrahi işlem yapılmadığı takdirde malign tümörlere dönüşebilen poliplerin sayısı yıllarca artarak binlerce olabilir (Lipton ve Tomlinson, 2006).

MYH-ilişkili Polipozis (MAP) : MYH (ayrıca MutYH olarak da bilinir), DNA hasar onarımında anahtar rol oynayan bir DNA glikozilazdır. Bu gende meydana gelen mutasyonlar da çok sayıda adenomatöz polip geliştirebilir. İlerleyen aşamalarda APC mutasyonuna bağlı FAP sendromuna sebep olabilir. MAP, otozomal resesif yolla geçer. MAP ve FAP arasındaki temel fark, FAP için mutasyona uğramış genin tek kopyasının olması yeterlidir, MAP'te ise genin iki kopyasında da mutasyon olması gerekmektedir (Sampson ve ark., 2005).

Kalıtımsal Non-Polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC) : Lynch sendromu olarakta bilinen HNPCC, otozomal dominant geçiş gösteren, genellikle sağ kolon kanseriyle karakterize ve çok az sayıda (neredeyse hiç) polipozis görülen bir KRK türüdür. Çeşitli DNA yanlış eşleme onarım genleri (MSH6, PMS1, PMS2, MSH3, bu mutasyonlar genellikle MLH1 ve MSH2'de oluşur) mutasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Genç yaşta görülme sıklığı daha yüksektir ve KRK'lerin %3-4'ünü oluşturmaktadır. Bu sendroma sahip bireylerde endometriyum, mide, üriner, pankreas, ince bağırsak, over, ve sinir sistemi maligniteleri görülebilir (Fearnhead ve ark., 2002).

2.5.3. Kronik İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı

İnflamatuvar bağırsak hastalığı, sindirim sistemini kronik inflamasyonunu içeren bozuklukları tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı kronik inflamatuvar bağırsak hastalıklarının en önemli türleridir. Crohn hastalığı gastrointestinal sistemini herhangi bir yerinde, temel olarak ise ince bağırsak daha sonra kolon kısmında oluşur, ülseratif kolit ise sıklıkla kolon ve rektum kısmında oluşur. Ülseratif koliti ve Crohn hastalığı olan hastalarda KRK görülme sıklığı artmaktadır (Shussman ve Wexner, 2014).

2.6. Kolorektal Kanserde Evreler

Kolorektal karsinomlarda patolojik evreleme cerrahi işlem sonrası anatomik inceleme ile belirlenir. Evreleme işlemi uygulanacak tedavi ve sağkalım süresini belirlemektir. Kolorektal karsinom için uygun tedavi seçimi ve prognozların belirlenmesi amacıyla histolojik, makroskopik ve metastaz gibi bulgular dikkate alınarak çeşitli evrelendirmeler yapılmıştır. Bunlardan en önemlileri Dukes evrelenmesi, Aster-Coller evrelenmesi ve TNM (tümör, lenf nodu ve metastaz) sınıflandırmasıdır.

Tablo 2.1. Dukes evrelenmesi.

Evre	Evreleme Açıklaması
Dukes A	Tümör kolon duvarını geçmemiş, mukoza ile sınırlı
Dukes B	Tümör kolon duvarını geçerek kas tabakasına nüfus etmiş ancak lenf düğümlerine tutunum yok
Dukes C	Lenf bezlerine tutunum var, metastaz yok
Dukes D	Uzak dokuya metastaz

Tablo 2.2. Aster-Coller evrelenmesi.

Evre	Evreleme Açıklaması
Evre A	Mukozaya sınırlı
Evre B1	Muskularis Propriaya dayanmış, penetre etmemiş ve lenf düğümlerine tutunum yok
Evre B2	Tüm kolon duvarına tutunmuş lenf düğümlerine tutunum yok
Evre C1	Kolon duvarı ile sınırlı, lenf düğümüne tutunum var
Evre C2	Kolon duvarı tüm katmanlarına ve lenf düğümlerine tutunum var
Evre D	Uzak dokuya metastaz

Kolorektal kanserde ilk patolojik evreleme Cuthbert Dukes tarafından 1936 yılında yapılmıştır (Tablo 2.1) daha sonra iki bilim insanı (Aster ve Coller) tarafından 1954 yılında modifiye edilmiştir (Tablo 2.2). Daha sonra Amerikan Ortak Kanser Komitesi tarafından daha ayrıntılı olan TMN sınıflandırılması (Tablo 2.3) ortaya konulmuş ve daha ileri kanser evrelerinin ayırt edilmesi sağlanmıştır. Bu sistemde dört adet temel evre (Tablo 2.4) çeşitli TMN evrelerine göre sınıflandırılmaktadır (Waage ve ark., 2014).

Tablo 2.3. TMN sınıflandırması.

Tümör evresi (T)	Evreleme Açıklaması
Tx	Kolon ya da rektumda tümörün olup olmadığı bilinmiyor
T0	Kolon ya da rektumda tümörü biliniyor ama tespit edilememiş
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümörün submukozaya invazyonu
T2	Tümörün muskularis propriaya invazyonu
T3	Tümör kolon duvarına tutunmuş
T4	Tümör çevre dokulara tutunmuş
Lenf nodu evresi (N)	Evreleme Açıklaması
Nx	Bölgesel lenf nodu tutunumu bilinmiyor
N0	Lenf nodu metastazı yok
N1	Perirektal ya da perikolik 1-3 lenf nodu metastazı
N2	Perirektal ya da Perikolik 4 ve daha fazla lenf nodu metastazı
N3	Damar boyunca lenf nodlarına metastaz
Metastaz (M)	Evreleme Açıklaması
Mx	Uzak metastaz bilinmiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

Tablo 2.4. TNM evrenlenmesi.

Evre	Evreleme Açıklaması	Tümör Evresi	Lenf Nodu	Metastaz
Evre 0	Karsinoma in situ	Tis	N0	M0
Evre 1	Muskularis propriaya kadar yayılım	T1, T2	N0	M0
Evre 2	Tüm barsak duvarına tutunum	T3, T4	N0	M0
Evre 3	Lenf nodu metastazı	T	N1, N2, N3	M0
Evre 4	Uzak metastaz varlığı	T	N	M1

2.7. Kolorektal Kanser ve İnflamasyon

İnflamasyon, yaralanmış dokuların iyileşmesine neden olan fizyolojik bir tepkidir. İnflamatuvar süreç, biyomoleküllerin hasarlı dokulardan salgılanmasıyla başlar. Daha sonra, beyaz kan hücreleri, dokuyu yeniden oluşturmak ve yarayı onarmaya yardımcı olmak için yaralı dokuya göç eder. İnflamatuvar sinyal kaskadı, yara iyileştikten sonra sona erer. Kronik inflamasyon, yaralanma tarafından uyarılmadan sinyal yollarının aktivasyonundan kaynaklanır (Nowacki ve ark., 2015). Kronik inflamasyon, hücrel transformasyon, hayatta kalma, proliferasyon, invazyon, anjiyogenez ve metastaz dahil olmak üzere tümörögenезle ilgili çeşitli aşamalarda işlev görür. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi kronik İBH olan hastalarda KRK riski artmaktadır (Wang ve Dubois, 2010). Bağırsak epitel hücrelerinin ve organ sistemlerinin tümörle ilişkili genlerindeki mutasyonlar, inflamatuvar sitokinlerden ve reaktif oksijen türlerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Kolorektal kanserle ilişkili inflamatuvar sinyal iletiminde nükleer faktör kappa B (NF- κ B) yolağı, JAK/STAT ve COX/PGE₂ yolaklarının etkili olduğu düşünülmektedir (Hirano ve ark., 2020).

2.7.1. NF- κ B Yolağı

İnflamatuvar yanıtların temel bir düzenleyicisi olan NF- κ B, İBH dahil olmak üzere çok sayıda inflamatuvar hastalığın patogenezinde rol oynar. Bu yol, pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu indükler ve inflamasyonla ilişkili doku hasarına katkıda bulunur. Tümör proliferasyonunda da rol oynayan NF- κ B, anjiyogenez ile ilişkili genlerin indüksiyonunu teşvik ederek tümör ilerlemesini ve metastazı düzenler. Ayrıca kolorektal karsinoma ilişkili mutasyonlar nedeniyle azalan p53 stabilitesi, NF- κ B'yi

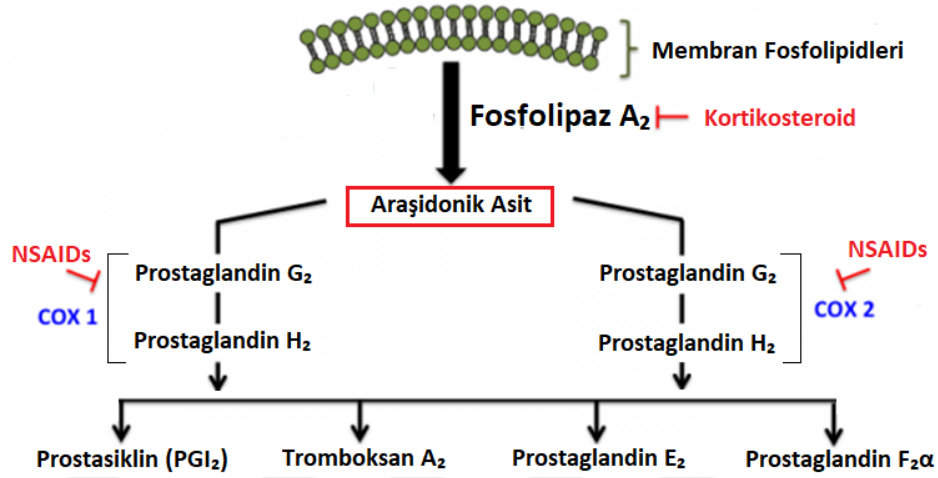
aktive eder ve interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-8 (IL-8) gibi pro-inflamatuar sitokin seviyelerini artırır (Hirano ve ark., 2020). İnterlökin-6'nın, doku homeostazı ve rejenerasyonunda ve İBH dahil, T hücresinin hayatta kalması, farklılaşması gibi fonksiyonları bulunmaktadır. Bu etkilerini membrana bağlı IL-6 reseptörüne bağlanarak membran ilişkili Janus kinaz (JAK)'ların aktivasyonu, fosfoinositol 3-kinaz/AKT, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3) gibi efektörleri aktif hale getirerek gösterir. Bu sayede aktif hale gelen efektörler çeşitli onkojenlerin transkripsiyonunu düzenleyerek KRK gelişimine katkıda bulunur (Johnson ve ark., 2018).

2.7.2. COX-2 Yolağı

Siklooksijenaz (Prostaglandin H Sentaz veya PGHS olarak da adlandırılır) enzimimin COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki adet izoformu bulunmaktadır. Siklooksijenaz-1, organ homeostazında rol oynar ve başta trombositler, gastrointestinal sistem ve böbreklerde olmak üzere her yerde eksprese edilirken, COX-2 yalnızca belirli uyarılara yanıt olarak eksprese edilir.

Siklooksijenazlar hem COX hem de peroksidaz aktiviteleri sergileyen iki fonksiyonlu enzimlerdir. Siklooksijenazların COX aktivesi, sitozolik fosfolipaz A₂ (cPLA₂) tarafından membran fosfolipidlerinden salınan araşidonik asidi (AA) bir hidroperoksi endoperoksit (PGG₂) dönüştürür. Peroksidaz aktivitesi ise, endoperoksiti, Prostaglandin H₂'ye (PGH₂) dönüştürür. Prostaglandin H₂, prostaglandin (PG)'lerin, tromboksanların ve prostasiklinlerin öncüsüdür (Şekil 2.6) (FitzGerald, 2003).

Siklooksijenazlar veya lipoksijenazlar (LOX) tarafından aşağı yönde modifikasyonun ardından, araşidonik asit, eikozanoidler adı verilen aktif bileşiklere dönüştürülür. Eikozanoidler, anti-inflamatuar ve inflammatuar araçlar olarak kategorize edilen prostaglandinleri ve lökotriyenleri içermektedir. Çok çeşitli etkilere sahip PG'ler, dokularda spesifik enzimler ile PGH₂'den oluşturulur. Örneğin PGE₂, bir çok dokuda PGE sentaz enzimi katalizi ile PGH₂'den oluşturulur. Bir çok hücrede COX-2 ve PGE₂, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), IL-1 β , lipopolisakkarid (LPS) ve PMA gibi ajanlarla stimüle edilebilir (Hellweg ve ark., 2006).



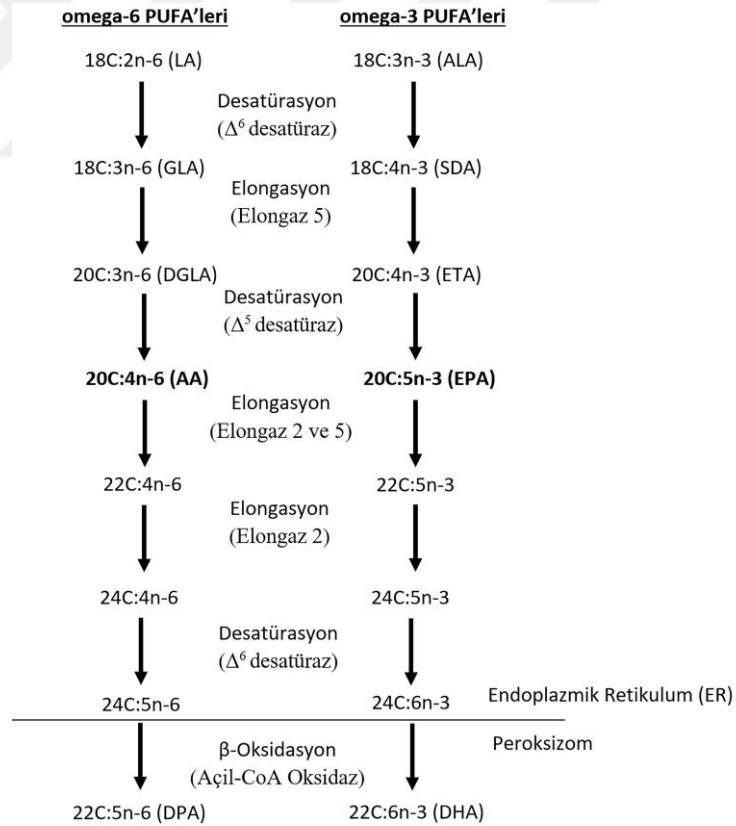
Şekil 2.6. Siklooksijenaz yolağı.

Şekil, Tulane Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji ansiklopedisi web sayfasından alınarak Türkçeleştirilmiştir. (https://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/introduction_to_eicosanoids, Erişim tarihi: 29 Mayıs 2021).

Pro-inflamatuar eikozanoidler, inflamatuvar yanıt regülasyonunda önemli görevleri vardır. Eikozanoidler, araşidonik asit ve eikozapentoenoik asit (EPA) yirmi karbonlu PUFA'lerinden türetilirler. Poliunsatüre yağ asitleri, hidrokarbon zincirindeki son çift bağın, terminal metil grubuna uzaklığına göre omega-6 (ω -6) ve omega-3 (ω -3) yağ asitleri olarak sınıflandırılır. Memelilerin, endojen omega-6 PUFA'ları sentezlemek için linoleik asit (LA, C18:2n-6); omega-3 PUFA'ları sentezlemek için ise α -linolenik asit (ALA, C18:3n-3)'e ihtiyaçları bulunmamaktadır (Wallis ve ark., 2002).

Esansiyel PUFA olarak bilinen ALA ve LA'nın diyetle alınması gerekmektedir. Diyetle alınan ALA ve LA, endoplazmik retikulumda (24C'a kadar) çeşitli desatüraz ve elongazlar ile hem daha uzun zincirli hem de daha çok sayıda çift bağ ihtiva eden PUFA'lara dönüştürülür. Daha sonra peroksizomlarda (≥ 22 C yağ asitleri) β -Oksidasyona uğrayarak iki karbon kısaltılır. Bu reaksiyonlar sayesinde çeşitli metabolik rolleri olan türev PUFA oluşturulur (Şekil 2.7). İnflamatuar yanıt oluşumunda görevli iki prekürsör PUFA olan AA ve EPA, COX, LOX ve sitokrom p450 enzimleri ile bir seri reaksiyonlar sayesinde inflamatuvar yanıtı oluşturur (Ichi ve ark., 2014). Siklooksijenaz yolu, NSAİD ile COX inhibisyonuna bağlı olarak baskılanabilir, bu da özellikle dihomogamma-linolenik asit (DGLA) AA, EPA, dokosaheksaenoik asit (DHA) PUFA seviyelerinin artmasına neden olabilir (Aslan ve ark., 2020).

Diğer bir inflamatuvar belirteç olan COX-2'nin yüksek seviyelerinin kronik inflamasyonu ve karsinogenezi tetiklediği bilinmektedir (Menter ve ark., 2010). COX-2'nin aşırı ekspresyonu, deneysel sistemlerde tümör hücresi göçünü, hücre adezyonunu ve tümör invazyonunu artırabilir. Normal bağırsak dokuları ile karşılaştırıldığında, COX-2 ekspresyonu kolorektal kanserlerde %80-%90 daha yüksektir (Hsu ve ark., 2017). Siklooksijenaz-2 katalizi ile türetilmiş PG'ler, İBH ve KRK dahil olmak üzere çeşitli patolojik süreçlerde yer almaktadır. Bireysel PG'lerden hangisinin doğrudan İBH ve KRK'e dahil olduğunu belirlemek için bir çok çalışma yapılmış ve PGE₂'nin, İBH ve KRK'de COX-2'nin pro-inflamatuvar ve tümör teşvik edici etkilerine aracılık ettiğini düşünülmektedir (Wang ve Dubois, 2010). Klinik ve epidemiyolojik çalışmalar, kolorektal kanserde COX-2 inhibisyonunun önemli bir faydası olduğunu göstermektedir (Dubois, 2009).



Şekil 2.7. Poliunsatüre yağ asitlerinin biyosentezi.

LA: linoleik asit; ALA: α-linolenik asit; GLA: γ-linoleik asit; SDA: stearidonik asit; DGLA: dihomο-γ-linoleik asit; ETA: eikozatetraenoik asit; AA: araşidonik asit; EPA: eikozapentaenoik asit; DPA: dokosapentaenoik asit; DHA: dokosaheksaenoik asit. (Wallis ve ark., 2002)'den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

2.8. Hücre Adezyon Molekülleri

Hücre adezyon molekülleri (HAM), hücre-hücre veya hücre-ekstraselüler matrikse tutunmasını sağlayan yüzey proteinleridir. Tek geçişli transmembran proteinlerdir. Hücre adezyon molekülleri hücre iskeleti ile etkileşime giren, intraselüler alan, transmembran alan ve ekstraselüler alan olmak üzere üç korunmuş bölümden oluşmaktadır. Bu yapılar diğer hücrelerdeki aynı HAM ile (homofilik adezyon), diğer hücrede farklı HAM ile (heterofilik adezyon) veya ekstraselüler matriks ile etkileşime girerek hücre adezyonunu sağlamaktadırlar. Hücre adezyon moleküllerinin, spesifik ligandlarıyla etkileşimleri proliferasyon, immün ve inflamatuvar yanıt oluşumu, sinyalleşme ve kanser metastazında rol oynamaktadırlar (Harjunpaa ve ark., 2019). Hücre adezyon molekülleri kalsiyum bağımlı, bağımsız olmak üzere temel iki gruba veya immünoglobulin süper ailesi, integrinler, selektinler, kaderinler olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Bu gruplar dışında sınıflandırılmayan birkaç adet hücre adezyon molekülü bulunmaktadır.

İmmünoglobülin Süper Ailesi

Bu gruba dahil üyeler ekstraselüler bir veya daha fazla sayıda tekrarlayan immünoglobülin bölümleri içermektedir. Hücre-hücre adezyonunda rol oynamaktadır ve kalsiyumdan bağımsız olarak adezyonu sürdürmektedir. Özellikle endotel hücre-lökosit adezyonunda antijen sunumundan sorumludur (Wong ve ark., 2012). Bu grubun üyeleri: L1-CAM: L1-Hücre adezyon molekülü; NCAM: Sinirsel hücre adezyon molekülü; ICAM: Hücreler arası adezyon molekülü; VCAM: Vasküler hücre adezyon molekülü; PECAM: Trombosit endotelial hücre adezyon molekülü; LFA: Lökosit fonksiyonlu adezyon moleküldür.

İntegrinler

İntegrinler, kovalent olmayan bağlar ile bağlı α ve β zincirler ihtiva eden transmembran glikoproteinlerdir. Adezyon fonksiyonu için bu iki zincire ve kalsiyum, magnezyum gibi iyonlara ihtiyaç duyar. Hücrelerin ekstraselüler matrikse adezyonundan sorumludur. Ekstraselüler matriksten bilgi akışı ve lökositlerin tutunmasından sonra inflamatuvar reaksiyon bölgesine göçü gibi rolleri bulunmaktadır. İntegrinler içerdikleri β zincir alt

ünitelerine göre β -1, β -2 ve β -3 integrinler olarak adlandırılmaktadır (Futosi ve ark., 2013).

Selektinler

Endotel hücreleri ve lökosit yüzeyinde bulunan transmembran glikoproteinlerdir. Selektinler inflamatuvar reaksiyonlarda lökositlerin endotel hücrelere tutunmasında görev almaktadır. Kalsiyum bağımlı, Heterofilik HAM'dir ve lökosit integrinleri olarak adlandırılan β -2 integrinlerin aktivasyonunu sağlamaktadır. Bulundukları hücre çeşidine göre, L-Selektin: Lökosit-Selektin; E-Selektin: Endotelyal-Selektin; P-Selektin: Trombosit-Selektin olarak sınıflandırılmaktadır (Futosi ve ark., 2013).

Kaderinler

Kalsiyuma bağımlı, tekrarlayan ünitelerde oluşmuş transmembran proteinlerdir. Sitoplazmik bölgeleri α , β ve γ - katenin proteinleri ile ilişkilidir. Kaderinler epiteldeki hücre-hücre etkileşimlerde ve sinyal iletiminde rol almaktadır. Üzerinde bulundukları dokulara göre, E-Kaderin: Epitelyal kaderin; P-Kaderin: Plasental kaderin; N-Kaderin: Nöronal kaderin olarak sınıflandırılmaktadır (Christou ve ark., 2017).

2.9. Kolorektal Kanser ve Hücre Adezyon Molekülleri

Hücre adezyon molekülleri KRK'nın metastatik potansiyelinde önemli bir rol oynar ve bu nedenle malignitenin prognozuna katkıda bulunur. Kadherinlerin ve kateninlerin down regülasyonu, tümör hücresinin primer bölgeden ayrılmasını kolaylaştırırken, selektinlerin, integrinlerin ve immünoglobulin süper ailesinin üyelerinin ekspresyonu neoplastik ilerlemeyi, invazyonu ve yabancı dokuya malign hücre bağlanmasını destekleyerek metastazların gelişmesine yol açabilir. Karaciğer, kolorektal metastatik lezyonların ana konak organıdır (Kitagawa ve ark., 1998). Hücre adezyonunun sürdürülmesi, desteklenmesi veya bozulması, KRK ilerlemesi ve metastazında özellikle önemli süreçlerdir. Çoklu HAM yalnızca primer karsinomdan malign hücre ayrılmasında değil, aynı zamanda uzak dokuya tümör hücresinin bağlanmasında da rol oynar. Kolorektal kanser gelişim ve metastaz süreci, değişmiş HAM ekspresyonun çok önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Tablo 2.5.). Bu adezyon moleküllerinin sadece kolon değil çeşitli dokularda (lökosit, endotel vb.) değişmiş ekspresyonu karsinom sürecine ve metastaza katkıda bulunmaktadır (Paschos ve ark., 2009).

Tablo 2.5. Kolorektal kanser ilerlemesine aracılık eden hücre adezyon molekülleri.

İmmünoglobülin Süper Ailesi HAM	ICAM-1	VCAM-1	PECAM	CEACAM
Diğer HAM	CD44	EpCAM	LFA-1	
Kaderinler	E-Kaderin	P-Kaderin		

ICAM-1: Hücreler arası adezyon molekülü-1; VCAM-1: Vasküler hücre adezyon molekülü; PECAM: Trombosit endotel hücre adezyon molekülü; CEACAM: Karsinoembriyonik hücre adezyon molekülleri; EpCAM: Epitel hücre adezyon molekülü; LFA-1: Lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen-1; E-Kaderin: Epitelyal kaderin; P-Kaderin: Plasental kaderin. (Paschos ve ark., 2009; Iseki ve ark., 2017; Boesch ve ark., 2018) kaynak alınarak düzenlenmiştir.

Kaderinler homofilik HAM'dir, plazma membranında “adheren bağlantı” olarak adlandırılan hücre içinde iskelet proteini aktine bağlı bulunmaktadır. Sitoplazmik kuyruğunda β , γ ve α -katenine bağlı bulunur. Kaderin-katenin sistemini KRK ve karaciğer metastazlarıyla ilişkilidir. Kolorektal kanserli hastalarda yüksek E-kaderin ekspresyonu, klinik evre, karaciğer metastazı ve tümör nüksü ile önemli ölçüde korelasyon göstermektedir. E-kaderin ve β -katenin ekspresyonunun immünohistokimyasal analizi, bu moleküllerin her ikisinin de yüksek seviyelerinin, olumsuz prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir (Delektorskaya ve ark., 2005).

İmmünoglobülin süper ailesine üye ICAM-1 ve VCAM-1 inflamatuvar ajanlarla stimüle edilebilir. Hücreler arası adezyon molekülü-1 ligandı lökositlerde bulunan LFA-1 ile etkileşimi endotel hücrelere adezyonu ve doku içine migrasyonu indükler. Vasküler hücre adezyon molekülü-1 ligandları $\alpha_4\beta_1$ ve $\alpha_4\beta_7$ integrinleridir. T-hücrelerinde bulunan $\alpha_4\beta_1$ ligandı ile etkileşimi T-hücresi migrasyonunu indüklediği düşünülmektedir. Bu yüzden KRK'de VCAM-1 yüksek ekspresyonun T-hücreleri göçünü sağlayarak tümör mikro çevresinde birikmesini engeller ve bu sayede neoplastik hücre immün yanıtı kaçabilmektedir (Paschos ve ark., 2009). Diğer bir immünoglobülin süper ailesi üyesi PECAM-1, adezyon ve sinyal molekülü olarak anjiyogenez, tromboz ve lökosit migrasyonunu indükleyerek KRK ilerlemesine katkıda bulunur (Ahmed ve Mohammed, 2010).

Normal insan epitel hücrelerinde eksprese olan EpCAM transmembran bir glikoproteindir. Hücre sinyalleşmesi, proliferasyon, farklılaşma ve metastaz gibi görevleri bulunmaktadır. İlk olarak kolorektal karsinomda tanımlanmıştır ve yüksek seviyelerdeki ekspresyonun prognoz ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Sadece epitel hücrelerde bulunan bu HAM, çeşitli onkojenlerin (c-myc gibi) artışına sebep olmaktadır (Boesch ve ark., 2018).

CD44, bir hücre yüzeyi hyalüronan reseptörü olarak görev yapan, yaygın olarak eksprese edilen bir transmembran glikoproteindir (Yaghobi ve ark., 2021). CD44'ün aşırı ekspresyonu, başta Wnt, fosfoinositol 3-kinaz/AKT sinyal yollarını aktif ederek kolorektal karsinomda kanser ilerlemesi ve kötü prognozla bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Iseki ve ark., 2017).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.1.1. Hücre Medyumu

Çalışmamızda American Type Culture Collection'dan (ATCC, Manassas, VA, USA) kolorektal kanser hücre hatları olan HCT116 (ATCC; #CCL-247) ve HT29 (ATCC; #HTB-38) kullanıldı. Hücreler 25 cm²'lik hücre kültürü flaskları içerisinde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma; #D5648, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) yüksek glikoz besiyeri ile kültüre edildi. Besiyerine ek olarak 3,7 g/L sodyum bikarbonat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), % 10 (v/v) ısı ile inaktive edilmiş fetal bovin serum (FBS), (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), % 1 sodyum pirüvat (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) ve 5 µg/100 mL amfoterisin B (Gibco, Life Technologies, Paisley, United Kingdom) ilave edildi. Hazırlanan besi yeri 0,22 µm bottle-top filtreden vakum yardımıyla filtrelenerek steril hale getirildi ve hücre kültüründe kullanılmak üzere +4°C'de saklandı. Hücreler 37°C'de, % 5 CO₂ ve % 95 nemlendirilmiş hava ile inkübatörde çoğaltıldı.

3.1.2. Hücrelerin Pasajlanması

HCT116 ve HT29 hücreleri % 80 yoğunluğa ulaştığında tripsin-EDTA (% 0,05 Tripsin / % 0,02 EDTA; Gibco, Life Technologies, Paisley, United Kingdom) kullanılarak flask yüzeyinden kaldırıldı ve süspansiyon haline getirilerek yeni flasklara pasajlandı. Pasaj işlemi 25 cm² flask'tan 3 flask elde edilecek şekilde gerçekleştirildi. Tripsinizasyon ile pasajlama yapılırken öncelikle mevcut medyum flaskdan uzaklaştırıldı. Medyumda bulunan artıkları ve ölü hücreleri temizlemek için 3-5 mL steril (37°C) fosfat tamponlu salin (PBS) eklendi ve hafifçe tüm yüzey yıkandı. Bu işlemten sonra PBS uzaklaştırıldı ve 25 cm²'lik flask yüzeyi 3 mL tripsin-EDTA (37°C), 75 cm² için ise 5 mL tripsin-EDTA eklendi. Tripsin-EDTA eklenmesi sonrasında hücreler 5 dakikaya kadar inkübatör içerisinde 37°C'de bekletildi.

Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları mikroskop altında kontrol edildi ve 3-5 mL (1:1) taze medyum (37°C) eklendi bu sayede enzim inhibisyonu sağlanarak hücreler toplandı. Flasklardan toplanan hücreler 15 mL'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı ve 125 x g'de 5 dakika santrifügasyonun ardından süpernatant atıldı. Pellette olan hücrelerin üzerine 5-6 mL taze medyum eklendi, hücreleri homojen olarak dağıtmak için pipetaj yapıldı. 25 cm²'lik flasklara son hacim 5-6 mL, 75 cm²'lik flasklara son hacim 9-10 mL olacak şekilde taze medyum eklendi. Hücreler, 37°C'de, % 5 CO₂ ve % 95 nemlendirilmiş hava içeren inkübatörde tekrar % 80 yoğunluğa ulaşana kadar çoğaltıldı. Pasajlanan hücrelerin yoğunlaşması 2-4 gün arasında gerçekleşmektedir. Çalışmamız boyunca 10'uncu pasaja kadar hücreler kullanıldı.

3.1.3. Hücrelerin Dondurulması

İlerleyen çalışmalarda tekrar kullanılmak için hücreler sıvı azot (-195,79°C'ye kadar) içerisinde saklandı. Bunun için hücreler, filtre edilmiş PBS ile yıkandı, flask yüzeyinden tripsinizasyon işlemiyle kaldırıldı. Tripsin-EDTA'yı ortamdan uzaklaştırmak için medyum eklenerek 125 x g'de 5 dakika santrifügasyon yapıldı ve süpernatantı atıldı. Pellette ki hücreler üzerine % 95 hücre medyumunu ve % 5 (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO; Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) içeren medyum içerisinde tekrar süspanse edildi. Hücre süspanسیونları, kriyo tüplere 1'er mL dağıtıldı ve kademeli dondurma işlemi için izopropil alkol içeren kriyo-dondurma kabı (cyro-freezing container) içinde 4 saat -80°C'de tutuldu, ardından kriyo tüpler buhar fazındaki sıvı nitrojen tankında depolandı.

3.1.4. Hücrelerin Çözülmesi

Dondurulan hücreler deneylerde tekrar kullanılmak için çözülebilir. Hücrenin bulunduğu kriyo tüp 37°C su banyosunda ısıtıldı. Hücre çözeltisi içeren kriyo tüp su banyosundan çıkartıldı ve dış yüzeyi % 70'lik alkolle temizlenerek steril akış kabinine alındı. Kriyo tüpteki hücre çözeltisi pipet yardımıyla çekilerek önceden 15 mL'lik tüpte bulunan 9 mL uygun hücre medyumunu (37°C) üzerine ozmotik şoku engellemek için yavaşça eklendi ve homojen olarak karıştırıldı. 125 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet'te bulunan hücreler medyumla tekrar süspanse edildi ve hücre

kültür flaskına aktarıldı. Hücreler, 37°C’de, % 5 CO₂ ve % 95 nemlendirilmiş hava içeren inkübatörde uygun yoğunluğa ulaşınca kadar inkübe edildi.

3.2. MTT Sitotoksosite Deneyi

Sitotoksosite, canlı hücrelere toksik olduğu düşünülen maddelerin hücre canlılığına ve hücre çoğalmasına etki oranı olarak tanımlanmaktadır. Yaygın olarak kullanılan sitotoksosite testlerinden biriside kolorimetrik MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] testidir. Hücrelerindeki mitokondriyal NADH veya NADPH'ye bağlı olan oksidoredüktaz enzimleri tarafından sarı tetrazolyum boyası olan MTT, mor renkli çözünemeyen formazan kristallerine indirgenir. Aktif oksidoredüktaz enzimlerinin seviyesi, hücresel metabolik aktiviteyi yansıtmaktadır. Oluşan formazan DMSO ile çözüldükten sonra 570 nm’de absorbansı ölçülür. Kontrol grubunda oluşan absorbans % 100 hücre canlılığını temsil edecek şekilde deney gruplarındaki yüzde canlılık ifade edilir. Bu yöntemle MTT, hücre proliferasyonunu veya ilaçların sitotoksitesini değerlendirmek için kullanılabilir.

Diklofenak (DCF) ve PMA’nın sitotoksik etkisinin belirlenmesi için toz MTT (Goldbio, #T-030-1) 5 mg/mL PBS içerisinde çözüldü, hücre kültüründe kullanılmak üzere 0,22 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek stok hazırlandı. Çalışmamızda kullanılan HCT116 ve HT29 hücreleri flask içerisinde % 80 yoğunluğa ulaşınca medyum atıldı ve steril PBS (37°C) ile yıkandı. Ardından % 0,05 tripsin-% 0,02 EDTA ile kaldırıldı ve 15 mL’lik tüpte toplandı. 125 x g’de 5 dakika santrifügasyon sonrası süpernatant atıldı ve hücreler sayıldı. 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 5-10 x 10³ hücre/200 µL ekildi ve uygun koşullarda inkübasyona bırakıldı.

Hücreler tutunduktan sonra yaklaşık % 70-80 yoğunluğa gelince hücre medyumu atıldı, istenilen konsantrasyonda hücre medyumu ile seyreltilmiş diklofenak (0,05-4,22 mM) ve PMA (10-200 nM) uygulanarak 24, 48 ve 72 saate kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda karanlık ortamda medyum aspire edildi ve önceden medyum ile hazırlanmış % 10 (v/v) MTT her kuyucuğa 100 µL kadar ilave edildi. Hücrelerin 2 saat 37°C’de MTT’li medyum ile inkübasyonu sonunda medyum atıldı. Oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için filtre edilmiş 100 µL DMSO (Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) her kuyucuğa eklendi ve orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından

570 nm ve 690 nm’de absorbansları mikroparka okuyucuda (MicroQuant Plate Reader, Bio-Tek Instruments Inc. Vermont, USA) kolorimetrik olarak ölçüldü. 570 nm absorbans değerinden, 690 nm deki DMSO absorbans değerleri çıkartılarak DCF ve PMA ile muamele edilen HCT116 ve HT29 hücrelerinin sitotoksitesisi, kontrol grupları ile karşılaştırılarak belirlendi.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = (A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100$$

3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Diklofenak sodyum (Dikloron, DEVA Holding, İstanbul, Türkiye) stok konsantrasyon 84,4 mM olarak elimizde bulunmaktaydı. Diklofenak sodyum, hücre kültürü medyumunu ile 4,22 mM, 2,11 mM 0,84 mM, 0,42 mM, 0,21 mM, 0,11 mM ve 0,05 mM konsantrasyonlarına kadar seyreltildi ve DCF’nin sitotoksik etkisi, hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saatlik paralel deneylerde değerlendirildi. HCT116 ve HT29 hücrelerini muamele etmek için kullanılan DCF’nin dozu ve süresi, hücre sitotoksitesisi deneylerinin sonuçlarına dayanmaktadır.

Forbol-12-miristat-13-asetat (PMA; LC Laboratories, #P-1680, Canada, US) DMSO ile çözünerek 8,1 mM stok konsantrasyonunda hazırlandı. Hazırlanan ana stok, DMSO ile seyreltilerek 1 mM’lık ara stok oluşturuldu. 1 mM’lık PMA ara stok, hücre kültürü medyumuyla 200, 100, 50, 25 ve 10 nM konsantrasyonlara kadar seyreltildi ve PMA’nın sitotoksik etkisi 24 saatlik paralel deneylerle değerlendirildi. HT29 hücrelerinde kullanılan PMA’nın dozu hücre sitotoksitesisi deney sonuçlarına göre belirlendi.

Çalışmamızda hücre canlılığı analizleri sonucunda; kontrol grupları (sağlıklı HT29 ve HCT116 hücreleri), DCF grupları (24 saat boyunca 0,42 mM DCF uygulanan HT29 hücreleri ve 0,84 mM DCF uygulanan HCT116 hücreleri), DMSO grubu (PMA’nın çözülmesinde kullanılan 0,2 µL/mL DMSO ile 24 saat boyunca inkübe edilen HT29 hücreleri), PMA grubu (24 saat boyunca 100 nM PMA ile inkübe edilen HT29 hücreleri), DCF + PMA grubu (24 saat, 0,42 mM DCF ve 100 nM PMA ile inkübe edilen HT29 hücreleri) olmak üzere yedi farklı deney grubu oluşturuldu.

3.3. İmmünofloresan Boyama

Diklofenak ve PMA'nın HT29 hücre hattında COX-2 protein miktarında neden olduğu değişiklikler immünofloresan boyama ile belirlendi. Bunun için flask içerisinde % 80 yoğunluğa ulaşan hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldı ve sayılarak 10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 8-kuyucuklu Chamber Slide'a (Merck Millipore, Cork, Ireland) ekildi. HT29 hücreleri % 10 FBS, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin içeren DMEM ile 37°C'de, %5 CO₂ ve % 95 nemlendirilmiş hava ile inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılarak hücrelerin morfoloji kazanması sağlandı. Hücresel morfoloji kazanan hücrelere, medyum ile seyreltilmiş, 0,2 µL/mL DMSO, 0,84 mM DCF ve/veya 100 nM PMA uygulandı, 24 saat inkübasyon yapıldı ve ardından COX-2 protein miktarını belirlemek için immünofloresan boyama yöntemi uygulandı.

İmmünofloresan boyama için inkübasyon süresinden sonra medyum uzaklaştırıldı. Kuyucuklar 2 defa soğuk yıkama tamponu (0,01 M PBS, pH 7,4, +4°C) ile yıkandı. Fiksasyon işlemi için taze hazırlanan % 4'lük paraformaldehit kuyucuklara aktarıldı ve 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Fiksasyon çözeltisi inkübasyon sonunda aspire edildi ve 3 defa yıkama tamponu ile yıkandı. Hücre membranı geçirgenliğini sağlamak için fikse edilmiş hücrelerin üzerine permeabilizasyon çözeltisi (% 0,2'lik Triton X-100, PBS içerisinde) 300 µL olarak kuyucuklara eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi. Permeabilizasyon işleminden sonra ortamdan Triton X-100'ü uzaklaştırmak için soğuk PBS ile 5 defa 1 dk. aralıklar ile yıkama yapıldı ve aspire edildi. Spesifik olmayan protein-protein etkileşimlerini azaltmak için bloklama çözeltisi [PBS içerisinde % 5 Normal Keçi Serum (NGS, #S-1000 Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)] kuyucuk yüzeyini kaplaması için 300 µL eklendi, 30 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi ve uzaklaştırıldı. Primer antikor, anti-human rabbit poliklonal COX-2 antikor (1:100 dilüsyon, #sc-7951, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) antikor dilüent çözeltisinde (% 0,2 Tween 20, % 5 NGS, PBS içerisinde) seyreltildi, her kuyucuğa 200 µL eklendi ve gece boyunca +4°C'de inkübe edildi.

Primer antikor inkübasyonu sonunda bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için soğuk PBS ile 5 defa kuyucuklar yıkandı. Ardından kuyucuklara floresan işaretli sekonder antikor (Alexa Fluor-488 conjugated goat anti-rabbit; #A11008, life Technologies, USA)

antikor dilüent çözeltisi ile 1:300 oranında seyreltilerek her kuyucuğa 200 µL uygulandı ve orbital çalkalayıcıda, karanlık ortamda, oda sıcaklığında 45 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 3 defa 5 dk. bekletmeli olarak PBS ile yıkandı. 8 kuyucuklu Chamber slide'dan lam kısmı ayrıldı ve üzerine hücre nükleusunu boyamak için 1 damla 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) damlatıldı ve lamel ile kapatıldı. Lamalar floresan mikroskobu (Olympus IX81, inverted fluorescein microscope, Tokyo, Japan) ile incelendi. Alexa Flour 488 nm eksitasyon ve 505-525 nm emisyon, DAPI 350 nm eksitasyon 440-460 nm emisyon dalga boylarında görüntülendi. HT29 hücrelerinde floresan yoğunluğu NIH ImageJ 1.53e yazılımı ile tayin edildi. Her grup (n=12) için doğrulanmış total hücre floresanı (CTCF) aşağıdaki formülle belirlendi.

$$\text{CTCF} = \text{Entegre Yoğunluk} - (\text{Seçili hücrenin alanı} \times \text{Arka plan ortalama floresanı})$$

3.4. Total Siklooksijenaz Enzim Aktivitesinin Tayini

Total COX aktivitesi tayini florometrik ölçüm kiti (Cayman, #700200, Cat Ann Arbor, MI, USA) kullanılarak belirlendi. Araşidonik asitten hücre lizatında bulunan COX aktivitesi sonucu elde edilen hidroperoksi endoperoksit (PGG₂) ve ortama eklenen 10-asetil-3,7 dihidroksifenoksazin (ADPH) peroksidaz aktivitesi ile sırasıyla PGH₂'ye ve floresan özelliğine sahip olan 7-Hidroksi-3H-fenoksazin-3-on'a (Resorufin) indirgenmektedir. Oluşan Resorufin floresanı, 530-540 nm arasındaki bir eksitasyon dalga boyu ve 585-595 nm arasındaki bir emisyon dalga boyu ile analiz edildi.

Total COX aktivitesi ölçümü için HT29 hücreleri % 10 FBS, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin içeren DMEM ile % 70-80 yoğunluğa ulaşınca kadar 25 cm² flasklarda 37°C'de, % 5 CO₂ ve % 95 nemlendirilmiş hava ile inkübe edildi. İstenilen yoğunluğa ulaşan HT29 hücreleri üzerine, hücre medyumuna ile seyreltilmiş, 0,2 µL/mL DMSO, 0,42 mM DCF ve/veya 100 nM PMA ile 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler uygun yöntemlerle flask yüzeyinden kaldırıldı ve ~5 x 10⁶ hücre/mL olacak şekilde 1000 x g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilerek toplandı üzerine önceden hazırlanmış proteaz inhibitör kokteyli (50 mM K₂HPO₄ 80 µM Leupeptin, 2,1 mM, Pefabloc SC, 1 mM fenilmetilsülfonil florid (PMSF), 1 µg/mL Aprotinin, pH 7,4) içeren 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 tamponu 1 mL eklenerek -80°C'de saklandı.

Hücreler -80°C 'den çıkartılıp oda sıcaklığında çözündükten sonra ve buz üzerinde ultrasonik homojenizatör (Bandelin Sonopuls HD 2070, Bandelin Elec., Germany) ile bir defa 15-20 kHz uniform sonik dalga ile sonike edildi. Elde edilen hücre lizatları $10.000 \times \text{g}$ 'de 15 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi ve süpernatant alınıp buz üzerinde saklandı. Dilüsyon denemesinden sonra hücre lizatları 1:10 oranında seyreltildi. Deney prosedürü kit üreticisinin talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi ve oluşan Resorufin 530 nm eksitasyon, 585 nm emisyon dalga boylarında substrat eklendikten 1 dk. sonra mikropilaka okuyucuda florometrik okundu. Elde edilen floresan miktarı arkaplan floresan değerlerinden çıkartıldı. Resorufin standart grafiğinden bağıl floresan üniteye (RFU) karşılık gelen her bir kuyucukta oluşan Resorufin konsantrasyonu hesaplanarak doğrulanmış hücre floresan değeri (CSF) elde edildi ve dilüsyon faktörü ile çarpıldı. Bir ünite COX aktivitesi 1 dakikada 22°C 'de, substratın 1 nmol Resorufin'e dönüşümüne sebep olan enzim miktarıdır. Total COX aktivitesi her bir örnek için hücre sayısına standardize edilerek nmol/dakika/hücre şeklinde ifade edildi.

3.5. Kaspaz -3 Aktivitesinin Tayini

Kaspaz-3 aktivitesi hücre lizatları kullanılarak florometrik ölçüm kiti (BioVision, #K105-200, Milpitas, CA, USA) ile belirlendi. Deney prensibi, substrat DEVD-AFC'nin (DEVD: açıl-Asp-Glu-Val-Asp, AFC: 7-amino-4-triflorometil kumarin) bölünmesinin analizine dayanmaktadır. DEVD-AFC mavi ışık yayar (λ maks = 400 nm); substratın CPP32 (kaspaz-3) veya ilgili kaspazlar tarafından bölünmesi ile oluşan serbest AFC, sarı-yeşil bir floresan (λ maks = 505 nm) yayar, florometrik emisyon ölçülerek kaspaz-3 aktivitesi tayin edilmektedir. Deney gruplarında oluşan serbest AFC emisyonu, kontrol grubu ile karşılaştırılarak kaspaz-3 aktivitesindeki değişim belirlendi.

Kaspaz-3 aktivitesini değerlendirmek için her bir grubun protein konsantrasyon miktarları belirlendi ve çalışmada $100 \mu\text{g}$ hücre lizatı kullanıldı. Kit prosedürü üreticinin talimatları doğrultusunda uygulandı ve örnekler 400 nm eksitasyon ve 505 nm emisyon dalga boylarında florometrede okunarak kaspaz-3 aktivitesindeki artış, kontrol seviyesindeki artış ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.6. Kütle Spektrometrisi Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması

HT29 ve HCT116 hücreleri % 10 FBS, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin içeren DMEM ile % 70-80 yoğunluğa ulaşınca kadar 25 cm² flasklarda 37°C’de, % 5 CO₂ ve % 95 nemlendirilmiş hava ile inkübe edildi. İstenilen yoğunluğa ulaşan HCT116 hücreleri 0,84 mM DCF, HT29 hücreleri 0,2 µL/mL DMSO, 0,42 mM DCF ve/veya 100 nM PMA ile 24 saat inkübasyonunun ardından toplandı. Otomatik hücre sayım cihazı Micro Counter 1300 (Celeromics Technologies, Grenoble, France) kullanılarak hücre sayımı yapıldı ve hücre grupları PBS içinde $\sim 5 \times 10^6$ hücre/mL olacak şekilde seyreltilerek 1,5 mL’lik eppendorf tüplere alındı ve -80°C’de saklandı. Çoklu doymamış yağ asitleri analizi için hücreler oda sıcaklığında çözüldü ve ultrasonik homojenizatör (Bandelin Sonopuls HD 2070, Bandelin Elec., Germany) ile 20 kez 1 saniye aralıklar ile 15-20 kHz uniform sonik dalgalar ile sonike edildi. Ardından 20.000 x g’de 10 dakika 4°C’de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi.

Çoklu doymamış yağ asitleri ekstraksiyonu için, 12 mL kapaklı cam tüplere 200 µL (1 ppm, metanol ile seyreltilmiş) AA-d8 internal standart ve 200 µL hücre lizatı ilave edildi ve üzerine önceden hazırlanmış 1 mL Asetonitril / % 37 Hidroklorik asit (4:1 v/v) (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) karışımından ilave edilerek tüpler kapatıldı. Tüpler ısıtıcı blok (VLM, Bielefeld, Germany) üzerinde 90°C’de 2 saat boyunca inkübe edildi. Ekstrakte edilen yağ asitleri oda sıcaklığına soğutuldu ve 2 mL hekzan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ilave edilerek 20 saniye vorteksenerek çözüldü. Daha sonra oda ısısında 5 dk. bekletildi ve 3000 rpm’de 1 dk. boyunca santrifügasyon yapıldı. Santrifügasyon sonunda pellet bozulmadan süpernatantın $\sim$ % 75 kadarı çekildi ve kapaksız cam tüplere aktarıldı. Tüp içeriği çeker ocakta oda sıcaklığında ayarlanabilen gaz dağıtım ünitesi (VLM, Bielefeld, Germany) ile sabit azot gazı altında buharlaştırıldı. Uçurma sonrası kurumuş ekstrakt 200 µL metanol/distile su karışımında (10:1, v/v) çözüldü ve 0,2 µm politetrafloroetilen filtreye sahip 4 mm enjeksiyon filtreleri (Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, USA) ile filtrelendi. Hazırlanan örnekler HPLC örnek viallerine (Vertical Chromatography, Nonthaburi, Thailand.) aktarıldı ve çoklu doymamış yağ asit seviyeleri LC-MS/MS analizi ile belirlendi.

3.7. Çoklu Doymamış Yağ Asitleri Seviyelerinin LC-MS/MS ile Ölçümü

Çoklu doymamış yağ asitleri ölçümleri ultra-hızlı sıvı kromatografi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japonya) sistemine bağımlı LC/MSMS (LCMS-8040 Shimadzu Corporation, Japonya) cihazı ile tayin edildi. AA (C20:4n-6), DGLA (C20:3n-6), EPA (C20:5n-3) ve DHA (C22:6n-3) standartları Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA) ve döteryum etiketli AA-d8 internal standart (5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-AA-d8) Santa Cruz Biotechnology (SantaCruz, CA, USA)’dan temin edilmiştir. AA, DGLA, EPA, DHA ve AA-d8 standart çözeltileri analitik-sınıf metanol (Merck, Darmstadt, Germany) içinde çözülerek hazırlandı. Optimize edilmiş çoklu reaksiyon izleme metodu (MRM), tandem kütle spektrometresi (MS/MS) ile bir araya getirilmiş ultra hızlı sıvı kromatografisi (UFLC) kullanılarak geliştirilmiştir.

UFLC sistem (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japan), LCMS-8040 üçlü kuadropol kütle spektrometresi (Shimadzu Corporation, Japan) ile bir araya getirilmiştir. Inertsil HPLC kolonu (ODS-4, 2,1 x 100 mm, 3 µm; GL Sciences Inc. Tokyo, Japan) kullanılarak oluşturulan kromatografik ayırma 40°C’de sürdürüldü. DHA, EPA, AA, DGLA gradient elüsyonu (akış hızı 0,45 mL/dk.) ile ayrılmaktadır. Mobil faz olarak kullanılan mobil faz A, 10 mM Amonyum asetat (Sigma-Aldrich. St. Louis MO, USA) ve mobil faz B, Asetonitril (Sigma-Aldrich. St. Louis MO, USA)’den oluşmaktadır. Gradient programı mobil faz B, % 70 (0 dk.), % 90 (3 dk.), % 100 (3,01, 4 dk.) ve % 70 (4,01, 8 dk.) olarak uygulanmıştır. Negatif elektrosprey iyonizasyon (ESI) içindeki özgün bileşimler için MRM geçiş ve cevapları otomatik olarak optimize edilmiştir. AA, DHA, EPA, DGLA ve AA-d8 için negatif ESI-MS mod prekürsör ve ürün m/z değerleri aşağıdaki gibidir;

- DGLA (C20:3n6), prekürsör m/z: 304,80, ürün m/z: 59,00 ve 260,70
- AA (C20:4n6), prekürsör m/z: 303,10, ürün m/z: 59,00 ve 258,90
- EPA (C20:5n3), prekürsör m/z: 301,10, ürün m/z: 59,10 ve 256,70
- DHA (C22:6n3), prekürsör m/z: 327,10, ürün m/z: 59,10 ve 283,20
- AA-d8, prekürsör m/z: 311,10, ürün m/z: 59,10, 97,90 ve 267,10

AA, DHA, EPA, DGLA 100 ng/mL-30 µg/mL doğrusal kalibrasyon aralığında optimize edildi ve örnek analiz süresi 8 dk. olarak uygulandı.

3.8. Hücre Yüzeyi Adezyon Molekülleri Miktarının Akış Sitometrisi ile Ölçümü

Hücre yüzeyi adezyon molekülleri miktarının akış sitometrisi ile analizi için, kolorektal karsinoma hücre hatları HCT116 ve HT29, % 10 FBS, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin içeren DMEM ile % 70-80 yoğunluğa ulaşınca kadar 25 cm² flasklarda 37°C'de, % 5 CO₂ ve % 95 nemlendirilmiş hava ile inkübe edildi. İstenilen yoğunluğa ulaşan HCT116 hücreleri 0,84 mM DCF, HT29 hücreleri 0,2 µL/mL DMSO, 0,42 mM DCF ve/veya 100 nM PMA ile 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyeri atıldı, 25 cm² flask yüzeyi Dulbecco's PBS (DPBS, Sigma: #D5652, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için Accutase-EDTA (Merck: #SCR005, Merck Millipore, Temecula, CA, USA) çözeltisinden 5 mL eklendi ve 15 dakikaya kadar, ajitasyon yapılmadan 37°C'de inkübe edildi.

Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları mikroskop altında gözlemlendikten sonra hücreler toplandı ve 15 mL santrifüj tüpüne aktarıldı. 125 x g'de 5 dk. +4°C'de santrifüjün ardından süpernatant atıldı. Pelletteki hücreler 5 mL hücre boyama tamponu (Biolegend: #420201, Biolegend, San Diego, CA, USA) ile süspanse edildi ve 125 x g'de 5 dk. +4°C'de santrifügasyonun ardından süpernatant atıldı. Hücrelerin üzerine 1 mL hücre boyama tamponu eklendi ve otomatik hücre sayım cihazı Micro Counter 1300 (Celeromics Technologies, Grenoble, France) kullanılarak hücre sayımı yapıldı. Hücreler akış sitometrisi tüplerine (Corning: #352054, Tamaulipas, Meksika) her tüpte 10⁶ hücre/100 µL olacak şekilde paylaştırıldı (belirtilen hücre konsantrasyonuna ulaşabilmek için gerekli dilüsyon hücre boyama tamponu ile yapıldı).

Hücreler buz üzerine alındı ve üzerlerine florokrom ile konjuge monoklonal antikolar Tablo 3.1 belirtilen konsantrasyonlarda eklendi. Spesifik olmayan arkaplan ışımasını belirlemek için aynı tip immünoglobülin yapısına ve aynı florokroma sahip fare izotip kontroller kullanıldı. Buz üzerinde karanlık ortamda 20 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüpler, bağlanmayan antikoları ve izotip kontrolleri ortamdan uzaklaştırmak için iki defa 2 mL hücre boyama tamponu ile 125 x g'de 5 dakika +4°C'de yıkandı ve 0,5 mL hücre tamponu ile süspanse edildi. Antikor konjugeli hücreler uygun cihaz ayarlarında FACS Canto II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)

akış sitometrisi cihazında okundu. Sonuçlar BD FACSDiva 6.1.3 yazılımı (BD Biosciences) kullanılarak analiz edildi. Değerler yüzde total boyama olarak verildi.

Tablo 3.1. Akış sitometrisi deneylerinde kullanılan monoklonal antikorlar.

Antikor	İnsan Epitopu (Klon)	Final Konsantrasyon	Florokrom	Marka/Katalog
CD44	BJ18	0,2 µg/mL	FITC	Biolegend: #338804
CD54	HA58	0,1 µg/mL	APC	Biolegend: #353112
CD326	9C4	0,02 µg/mL	PE	Biolegend: #324206
CD106	STA	0,02 µg/mL	PE/Cy5	Biolegend: #305808

3.9. Annexin-V ile Apoptozun Akış Sitometrisinde Analizi

Diklofenak'ın ve PMA'nın kolorektal karsinoma hücrelerindeki apoptotik etkileri FITC konjugeli Annexin-V ve propidyum iyodür (PI) Apoptoz kiti (Biolegend: #640914, Biolegend, San Diego, CA, USA) ile değerlendirildi. Hücre deney grupları yukarıda tarif edilen şekilde oluşturuldu. Uygulamalar sonunda besiyerleri atıldı. Yıkama işleminin ardından hücreleri flask yüzeyinde kaldırmak için tripsinizasyon işlemi uygulandı. Hücreleri tripsin içeren çözeltiden uzaklaştırmak için 125 x g'de 5 dk. +4°C santrifügasyonun ardından süpernatant atıldı. Pellette bulunan hücrelerin üzerine 5 mL hücre boyama tamponu eklenerek 125 x g'de 5 dk. +4°C'de santrifügasyonla 2 defa yıkama işlemi yapıldı. Pelletteki hücreler Annexin V bağlama tamponu (Biolegend: #422201, Biolegend, San Diego, CA, USA) ile süspanse edildi, ve hücre sayımı yapıldı. Hücreler akış sitometrisi tüplerine her tüpte 10⁶ hücre/100 µL olacak şekilde paylaştırıldı (belirtilen hücre konsantrasyonuna ulaşabilmek için gerekli dilüsyon hücre boyama tamponu ile yapıldı).

Hücrelerin üzerine 5 µL Annexin V (Biolegend: #640906, Biolegend, San Diego, CA, USA) ve 10 µL PI (Biolegend: #79997, Biolegend, San Diego, CA, USA) ilave edildi. Hücreler nazıkçe vortekslendi ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edildi. Ardından 400 µL Annexin V bağlama tamponu ile süspanse edildi. Floresan konjugeli hücreler uygun cihaz ayarlarında FACS Canto II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) akış sitometrisi cihazında okundu. Sonuçlar BD FACSDiva 6.1.3 yazılımı (BD Biosciences) kullanılarak analiz edildi. Değerler yüzde total boyama olarak verildi.

3.10. Protein Miktarı Tayini

HCT116 ve HT29 hücre lizatlarında protein konsantrasyonları modifiye Bradford yöntemiyle kolorimetrik olarak 595 nm’de tayin edildi. Yöntemde standart olarak bovin serum albümin (BSA) ile Coomassie Plus reaktifi içeren ticari kit kullanıldı (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Hücre lizatlarındaki protein miktarı BSA standart grafiği yardımıyla hesaplandı

3.11. İstatistiksel Analiz

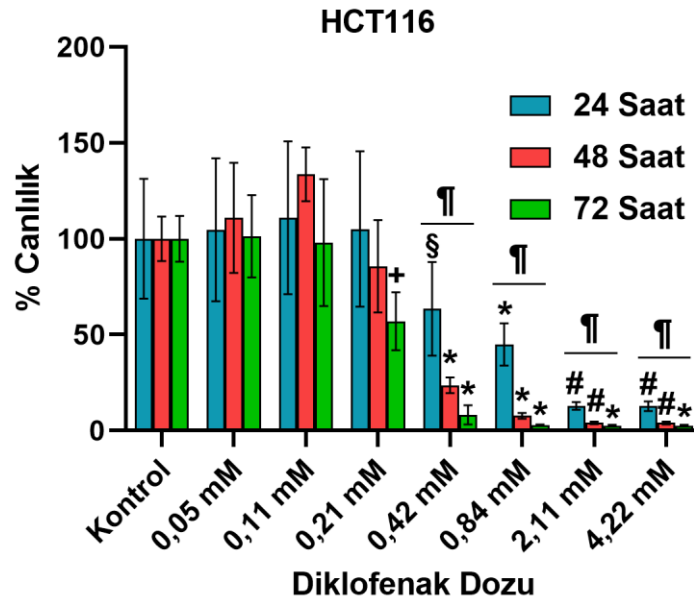
İstatistiksel analizler Jamovi 1.6.23 ve SigmaStat 3.5 istatistiksel analiz yazılımları kullanılarak yapıldı. Her bir ölçüm için uygulanan istatistiksel analizler şekil ve tablo açıklamalarında belirtilmiştir. Grafikler GraphPad Prism 9.0.0 yazılımı kullanılarak çizilmiştir.

Jamovi ve SigmaStat yazılımları ile grup verilerine, normalitenin belirlenmesi için Shapiro-Wilk normalite testi uygulandı. Normal dağılıma uyan çoklu gruplar için parametrik test olan tek yönlü-ANOVA, ikili gruplar için student’s t-test uygulandı. Normal dağılıma uymayan çoklu gruplar için ise non-parametrik Kruskal-Wallis testi uygulandı. Çoklu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olması durumunda, gruplar arasındaki farklılıklar Tukey, Games-Howell veya Dwass, Steel, Critchlow-Fligner (DSCF) gibi uygun post-hoc analizler ile belirlendi. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı Analizi

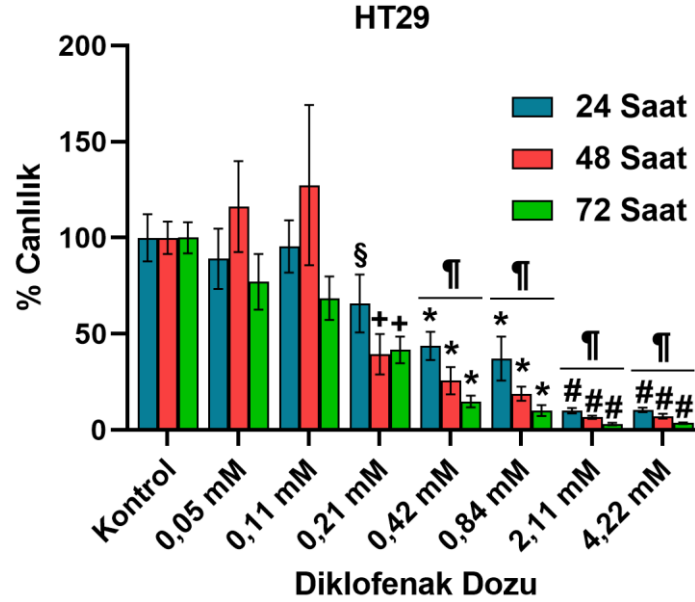
HCT116 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan DCF'nin MTT analizi ile doza ve zamana bağımlı olarak hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Hücrelere 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde 0,05-4,22 mM DCF uygulaması canlılığı önemli ölçüde azaltmıştır. Kontrole göre kıyaslandığında 0,05 mM ve 0,11 mM DCF uygulamasının sitotoksikite göstermediği görülmüştür. Uygulanan 0,21 mM DCF 72 saatlik dönemde, aynı zaman dilimi ile karşılaştırıldığında, kontrol ve 0,05 mM DCF uygulanan gruba göre hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$).



Şekil 4.1. HCT116 hücrelerinde diklofenak dozuna bağımlı 72 saat hücre canlılık analizi.

Veriler 11-12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA veya Kruskal-Wallis analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dwass-Steel-Critchlow-Fligner veya Games-Howell analizi ile belirlendi. *, $p<0,05$, kontrol, 0,05 mM, 0,11 mM ve 0,21 mM grupları ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. #, $p<0,001$, kontrol, 0,05 mM, 0,11 mM, 0,21 mM, 0,42 mM ve 0,84 mM grupları ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. \$, $p<0,05$, kontrol ve 0,11 mM grupları ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. +, $p<0,05$, kontrol ve 0,05 mM grupları ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. †, $p<0,001$, aynı doz aralığında 24 saat, 48 ve 72 saatlik inkübasyon grupları ile karşılaştırıldığında.

Uygulanan 0,42 mM DCF 24 saatlik dönemde, aynı zaman dilimi ile karşılaştırıldığında, kontrol ve 0,11 mM DCF uygulanan gruba göre hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$). Uygulanan 0,42 mM DCF 48 ve 72 saatlik dönemlerde, aynı zaman dilimleri ile karşılaştırıldığında, kontrol, 0,05–0,21 mM doz aralıklarındaki gruplara göre hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$). Uygulanan 0,84–4,22 mM DCF her üç saat diliminde, kontrol, 0,05–0,21 mM doz aralıklarındaki gruplara göre hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$). Uygulanan 2,11 ve 4,22 mM DCF her üç saat diliminde 0,42 mM DCF uygulamasına göre hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$). Aynı doz grupları incelendiğinde 0,21–4,22 mM DCF uygulaması 48 saatten sonraki dönemde hücre canlılığını 24 saatlik uygulamaya göre anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$). Diklofenak uygulanan HCT116 hücrelerinde yapılan canlılık analizleri sonuçlarına göre diğer deneyler için hücrelere 24 saat 0,84 mM DCF uygulanmasına karar verilmiştir.

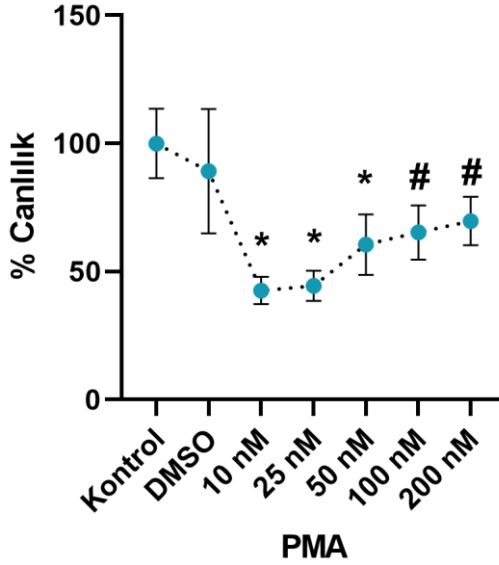


Şekil 4.2. HT29 hücrelerinde diklofenak dozuna bağımlı 72 saat hücre canlılık analizi.

Veriler 12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz, tek yönlü ANOVA veya Kruskal-Wallis analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dwass-Steel-Critchlow-Fligner veya Games-Howell analizi ile belirlendi. *, $p<0,05$, kontrol, 0,05 mM, 0,11 mM ve 0,21 mM grupları ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. #, $p<0,001$, kontrol, 0,05 mM, 0,11 mM, 0,21 mM, 0,42 mM ve 0,84 mM grupları ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. §, $p<0,05$, kontrol ve 0,11 mM grupları ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. +, $p<0,001$, kontrol, 0,05 mM, 0,11 mM grupları ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. ¶, $p<0,001$, aynı doz aralığında 24 saat, 48 ve 72 saatlik inkübasyon grupları ile karşılaştırıldığında.

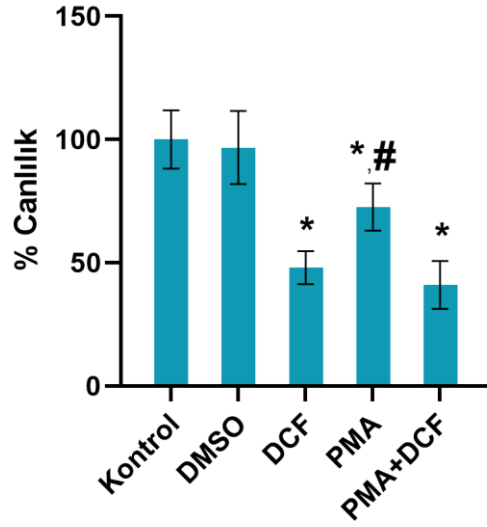
HT29 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan DCF'nin MTT analizi ile doza ve zamana bağımlı olarak hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Kontrole göre kıyaslandığında 0,05 ve 0,11 mM DCF uygulaması bakılan zaman dilimlerinde sitotoksosite göstermemiştir.

Uygulanan 0,21 mM DCF, kontrol ve 0,11 mM doz grupları ile aynı zaman dilimlerinde karşılaştırıldığında hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$). Uygulanan 0,42 ve 0,84 mM DCF, kontrol, 0,05-0,21 mM doz grupları ile aynı zaman dilimleri ile karşılaştırıldığında hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$). Uygulanan 2,11 ve 4,22 mM DCF, kontrol, 0,05-0,84 mM doz grupları ile aynı zaman dilimleri ile karşılaştırıldığında hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$). Aynı doz grupları incelendiğinde 0,42-4,22 mM DCF uygulaması 48 saatten sonraki dönemde hücre canlılığını 24 saatlik uygulamaya göre anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$). Diklofenak uygulanan HT29 hücrelerinde yapılan canlılık analizleri sonuçlarına göre diğer deneyler için hücrelere 24 saat 0,42 mM DCF uygulanmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.3. HT29 hücrelerinde forbol-12-miristat-13-asetat dozuna bağımlı 24 saatlik hücre canlılık analizi. Dimetil Sülfoksit (DMSO); 0,2 µL/mL. Veriler 12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz, Kruskal-Wallis analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dwass-Steel-Critchlow-Fligner analizi ile belirlendi. *, $p<0,05$, kontrol ve DMSO grubu ile karşılaştırıldığında. #, $p<0,001$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

HT29 hücrelerine uygulanan PMA'nın hücre canlılığına etkisinin değerlendirilmesi 24 saatte 10-200 nM PMA doz aralığında yapıldı, sonuçlar Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Ayrıca aynı zaman diliminde PMA'nın çözügeni olarak kullanılan 0,2 µL/mL DMSO grubu da oluşturuldu. 24 saatlik zaman diliminde uygulanan 10-200 nM PMA dozlarının hücreler üzerinde toksik etkiye sahip olduğu görüldü. Çalışmamızda COX-2 aktivitesini stimüle etmek için 100 nM PMA uygulandı. Seçilen doz için HT29 hücrelerinde yapılan PMA çalışması referans olarak alındı (Mohammadi ve ark., 2016).



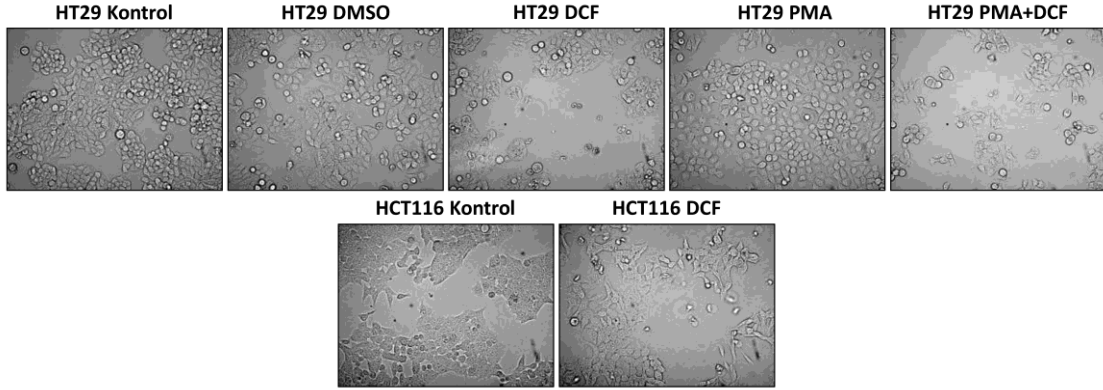
Şekil 4.4. HT29 hücre gruplarında canlılık analizi.

Dimetil Sülfoksit (DMSO) 0,2 µL/mL, 0,42 mM Diklofenak (DCF) ve 100 nM PMA beraber uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 24 saat. Veriler 12 farklı deneyden elde edildi. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verildi. İstatistiksel analiz, Kruskal-Wallis analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dwass-Steel-Critchlow-Fligner analizi ile belirlendi. *, $p < 0,001$, kontrol ve DMSO ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0,001$, DCF ve PMA+DCF grupları ile karşılaştırıldığında.

HT29 hücrelerinde 0,42 mM DCF ve 100 nM PMA'nın hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 4.4'te gösterilmiştir. 24 saatlik zaman diliminde belirtilen dozlarda DCF, PMA ve PMA+DCF hücre canlılığını kontrol ve DMSO gruplarına göre anlamlı olarak azaltmıştır ($p < 0,05$). Tek başına PMA uygulaması DCF ve PMA+DCF uygulaması kadar hücre canlılığı üzerinde toksik etki göstermemiştir.

Şekil 4.5'te, DCF ve PMA uygulanan kolorektal karsinoma hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü yer almaktadır. HCT116 hücrelerine 24 saat 0,84 mM DCF ve HT29 hücrelerine 24 saat 0,42 mM DCF ve/veya 100 nM PMA uygulanmıştır. Yapılan

uygulamalar sonucunda hücrelerde küçülme, ayrılma ve yuvarlaklaşma gibi morfolojik değişiklikler görülmüştür. PMA grubunda bunların dışında hücre çoğalması belirginleşmiştir.

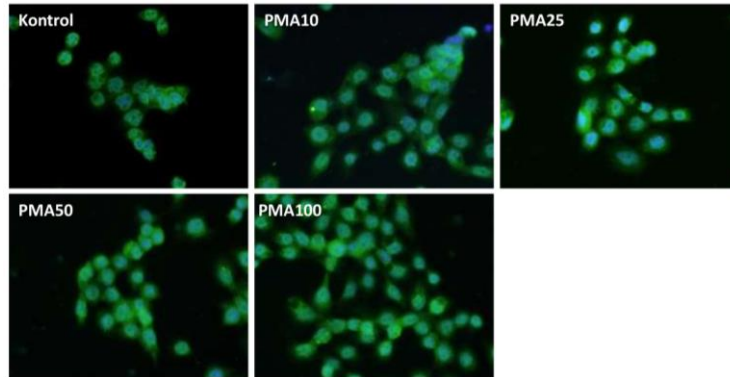


Şekil 4.5. Diklofenak ve forbol-12-miristat-13-asetat uygulanan kolorektal karsinoma hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü.

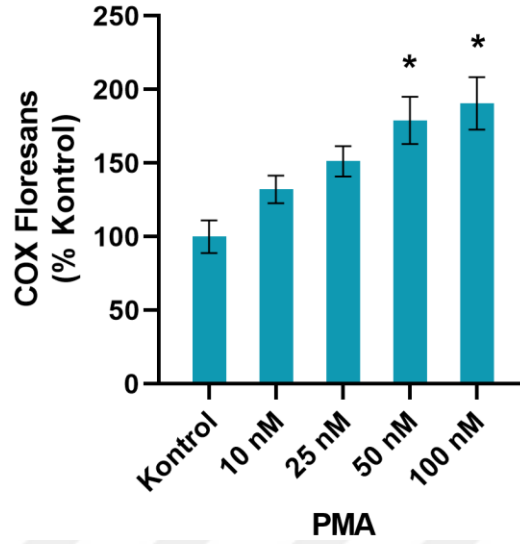
HCT116 hücreleri 24 saat 0,84 mM DCF ve HT29 hücrelerine 24 saat 0,42 mM DCF ve/veya 100 nM PMA uygulandı. Yapılan uygulama sonucunda hücrelerde küçülme, ayrılma ve yuvarlaklaşma gibi morfolojik değişiklikler görüldü (200 X büyütme). PMA grubunda ayrıca hücre popülasyonunda bir artış gözlemlendi. HT29 hücrelerinde 24 saat 0,2 µL/mL DMSO uygulaması anlamlı bir değişiklik göstermedi.

4.2. Siklooksijenaz Seviyeleri

Çalışmamızda HT29 hücrelerinde COX seviyelerini tayin etmek için immüno Floresan boyaması yapıldı ve total COX aktivitesi ölçüldü. Şekil 4.6, 24 saat 10-25-50-100 nM PMA uygulamasının COX-2 miktarına etkisini göstermektedir. İmmüno Floresan boyaması sonucu elde edilen temsili görüntüler verilmiştir. Şekil 4.7, farklı dozlarda PMA uygulaması sonucu elde edilen Floresan ışımının miktarını göstermektedir. Floresan yüzdesinin ImageJ programı ile kantitasyon verileri analiz edilmiştir.

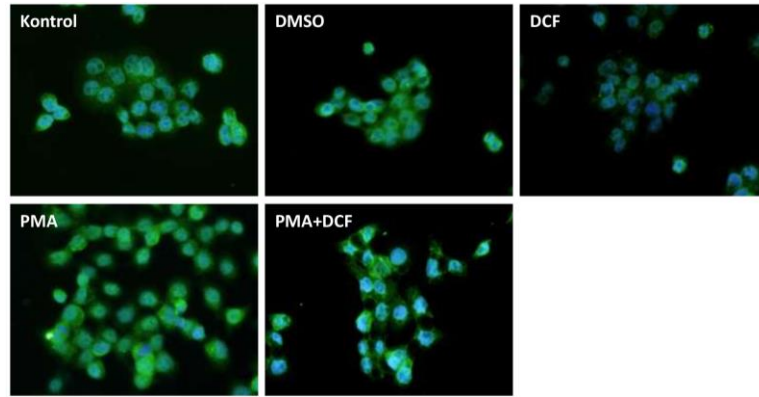


Şekil 4.6. Farklı dozlarda 24 saat forbol-12-miristat-13-asetat uygulanan HT29 hücrelerinde temsili COX-2 immüno Floresan boyaması.

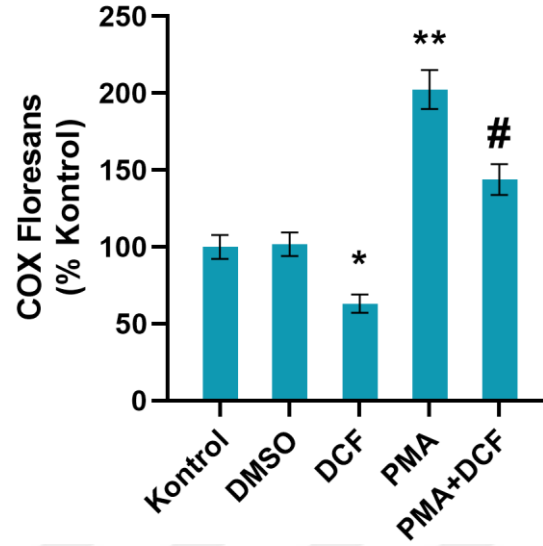


Şekil 4.7. Farklı dozlarda 24 saat forbol-12-miristat-13-asetat uygulanan HT29 hücrelerinde temsili COX-2 immüno Floresan boyamasının ImageJ programı ile kantitasyonu. Veriler 12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Tukey testi ile belirlendi. *, $p < 0,001$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 50 ve 100 nM PMA uygulaması COX-2 protein miktarında anlamlı bir artışa neden olmuştur. HT29 hücrelerinde 24 saat 0,2 μ L/mL DMSO, 0,42 mM DCF ve/veya 100 nM PMA uygulamasının COX-2 miktarı üzerindeki etkileri, immüno Floresan boyama (Şekil 4.8) ve floresan yüzdesinin ImageJ programı ile kantitasyonu ile gösterilmiştir (Şekil 4.9). Tek başına DCF uygulaması diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında COX-2 protein seviyelerinde anlamlı azalmaya neden olmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4.8. HT29 hücre gruplarında temsili COX-2 immüno Floresan boyaması. HT29 hücrelerine 24 saat 0,2 μ L/mL DMSO, 0,42 mM DCF ve/veya 100 nM PMA uygulandı.

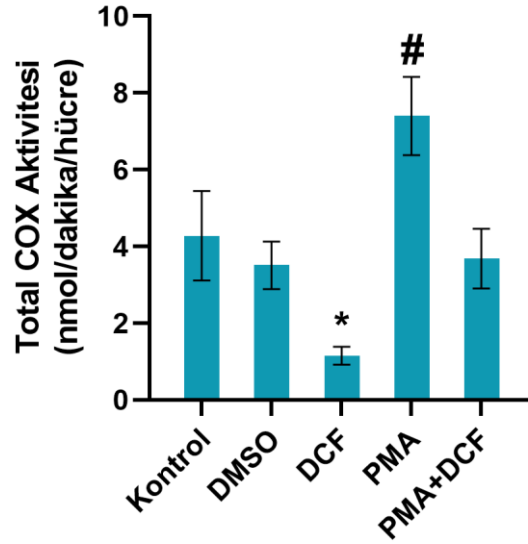


Şekil 4.9. HT29 hücre gruplarında temsili COX-2 immüno Floresan boyamasının ImageJ programı ile kantitasyonu.

Veriler 12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Tukey testi ile belirlendi. *, $p < 0,05$, kontrol, DMSO, PMA ve PMA+DCF grupları ile karşılaştırıldığında. **, $p < 0,001$, kontrol, DMSO, DCF ve PMA+DCF grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0,05$, kontrol, DMSO, DCF ve PMA grupları ile karşılaştırıldığında.

Tek başına PMA uygulaması COX-2 protein seviyesini diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak arttırmıştır ($p < 0,05$). PMA ve DCF'nin birlikte uygulanması kontrol, DMSO ve DCF gruplarına göre COX-2 protein miktarını anlamlı olarak arttırırken, PMA grubuna göre anlamlı olarak azaltmıştır ($p < 0,05$).

HT29 hücre gruplarında total COX aktivitesi Şekil 4.10'da gösterilmiştir. COX aktivitesi (ortalama $\pm$ SD) nmol/dakika/hücre olarak verilmiştir. Elde edilen veriler kontrol grubunda $4,28 \pm 1,17$, DMSO grubunda $3,51 \pm 0,61$, DCF grubunda $1,56 \pm 0,31$, PMA grubunda $7,40 \pm 1,02$ ve PMA+DCF grubunda $3,68 \pm 0,77$ nmol/dakika/hücre olarak rapor edilmiştir. Total COX aktivitesi tek başına DCF uygulanan grupta diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak azalırken ($p < 0,05$), tek başına PMA uygulanan grupta diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak artmıştır ($p < 0,001$). Kontrol, DMSO ve PMA+DCF grupları arasında COX aktivitesinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir.



Şekil 4.10. HT29 hücre gruplarında total COX aktivitesi.

Veriler 4 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Tukey testi ile belirlendi. *, $p<0,05$ kontrol, DMSO, PMA ve PMA+DCF grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p<0,001$, kontrol, DMSO, DCF ve PMA+DCF grupları ile karşılaştırıldığında.

4.3. Yağ Asidi Seviyeleri

HCT116 ve HT29 kolorektal kanser hücrelerinde ölçülen endojen poliunsatüre yağ asidi seviyeleri sırasıyla Tablo 4.1A ve Tablo 4.1B’de verilmiştir. HCT116 hücrelerinde DCF toksisitesine bağlı olarak AA, EPA ve DHA seviyeleri HCT116 kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmıştır ($p<0,001$). HT29 hücrelerinde DCF toksisitesi DGLA, AA, EPA ve DHA düzeylerini kontrol, DMSO ve PMA gruplarına göre anlamlı olarak arttırmıştır. HT29 hücrelerinde COX-2 aktivitesinin PMA ile stimüle edilmesi sonucunda DCF’ye bağlı görülen yağ asitlerindeki artış anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$).

Tablo 4.1A. HCT116 kolorektal kanser hücrelerinde poliunsatüre yağ asidi düzeyleri.

Grup (n=8)	DGLA (C20:3n6)	AA (C20:4n6)	EPA (C20:5n3)	DHA (C22:6n3)
HCT116 Kontrol	8,79 $\pm$ 2,36	5,05 $\pm$ 1,46	0,96 $\pm$ 0,30	3,50 $\pm$ 1,10
HCT116 DCF	7,84 $\pm$ 1,54	8,90 $\pm$ 1,64 ^a	1,71 $\pm$ 0,38 ^a	7,89 $\pm$ 1,53 ^a

Tablo 4.1B. HT29 kolorektal kanser hücrelerinde poliunsatüre yağ asidi düzeyleri.

Grup (n=8)	DGLA (C20:3n6)	AA (C20:4n6)	EPA (C20:5n3)	DHA (C22:6n3)
HT29 Kontrol	6,23 ± 1,46	7,70 ± 1,42	3,07 ± 0,63	3,76 ± 1,12
HT29 DMSO	6,27 ± 2,29	7,54 ± 0,17	2,92 ± 0,68	4,08 ± 0,52
HT29 DCF	14,9 ± 2,37 ^b	11,5 ± 0,89 ^b	5,63 ± 0,32 ^c	10,0 ± 1,50 ^c
HT29 PMA	3,84 ± 0,63	5,02 ± 0,67	0,97 ± 0,27 ^d	1,37 ± 0,78 ^d
HT29 PMA + DCF	12,4 ± 6,08 ^e	8,90 ± 0,56 ^e	1,80 ± 0,64 ^e	6,35 ± 1,34 ^e

Değerler µg yağ asidi/5x10⁶ hücre olarak verilmiştir. Sonuçlar ortalama ± SD olarak rapor edilmiştir. DCF, diklofenak; PMA, forbol-12-miristat-13-asetat; DMSO, dimetil sülfoksit; DGLA, dihomogamalinolenik asit; AA, araşidonik asit; EPA, eikozapentaenoik asit; DHA, dokosaheksaenoik asit. HCT116 hücreleri 24 saat 0,84 mM DCF ve HT29 hücrelerine 24 saat 0,2 µL/mL DMSO veya 0,42 mM DCF ve/veya 100 nM PMA ile muamele edildi. İstatistiksel değerlendirme HCT116 hücrelerinde Student's t-testi, HT29 hücrelerinde tek yönlü ANOVA analizi veya Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizini takiben Tukey testi ile yapılmıştır. a, p<0,001, HCT116 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. b, p<0,05, HT29 kontrol, DMSO ve PMA grupları ile karşılaştırıldığında. c, p<0,001, HT29 kontrol, DMSO, PMA ve PMA+DCF grupları ile karşılaştırıldığında. d, p<0,001, HT29 kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. e, p<0,05, HT29 PMA grubu ile karşılaştırıldığında.

4.4. Hücre Adezyon Molekül Seviyeleri

Kolorektal kanser hücre hatlarında CD44, ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106) ve EpCAM (CD326) hücre adezyon molekülleri ve izotip kontrollerin akış sitometrisi analizi Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Her deney için yalnızca bir temsili histogram gösterilmekle beraber her deney bağımsız olarak üç kez tekrar edilmiş ve hücre adezyon moleküllerinin yüzde ifadesi ortalama ± SD olarak Tablo 4.2'de verilmiştir.

HCT116 kontrol hücrelerinde CD44 ve ICAM-1 hücre adezyon moleküllerinin yüzde boyanması HT29 kontrol hücrelerine göre anlamlı olarak daha düşüktü (p<0,05). Bu düşüklüğün sebebi HCT116 hücrelerinde COX-2 proteinin ifade edilmemesinden kaynaklanabilir. HT29 hücrelerinde COX-2 ekspresyonu ve aktivitesi PMA ile artınca CD44 ve ICAM-1 düzeyleri HT29 kontrol, DMSO, DCF ve PMA+DCF gruplarına göre anlamlı olarak artmıştır (p<0,05). HT29 hücrelerinde COX-2 aktivitesi DCF ile inhibe edildiği zaman CD44 ve ICAM-1 düzeylerinde bir miktar azalma olmuştur. HCT116

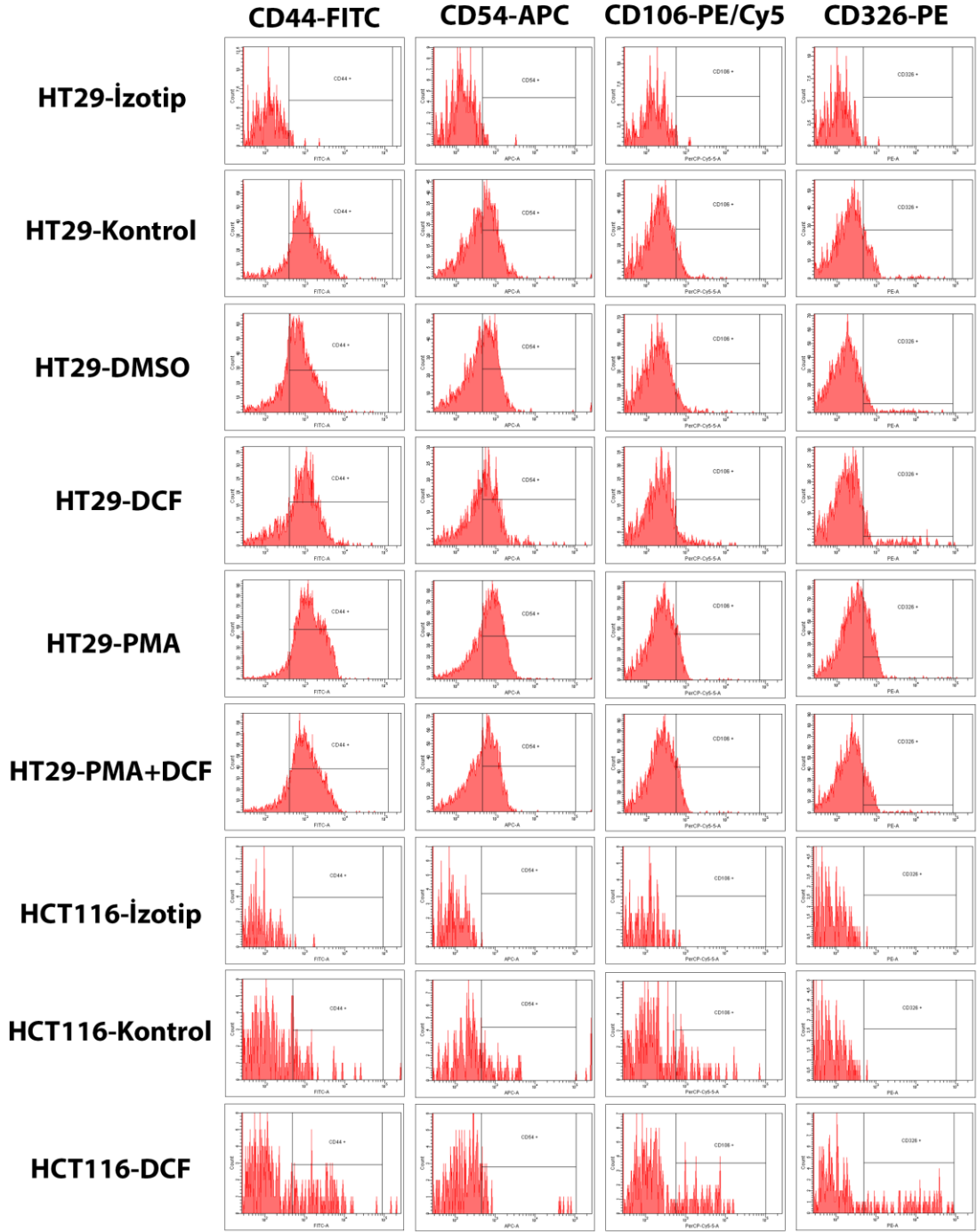
hücrelerinin DCF ile muamele edilmesi sonucunda ICAM-1 seviyelerinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. CD44 seviyelerinde ise anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$).

VCAM-1 ve EpCAM ifadeleri COX-2 yolağına bağımlı bulunmadı. HT29 hücrelerinin COX-2 aktivatörü PMA ile uyarılması veya COX-2 inhibitörü DCF ile muamele edilmesi VCAM-1 ve EpCAM düzeylerinde anlamlı bir değişime sebep olmadı. HCT116 hücrelerinin DCF ile muamele edilmesi VCAM-1 düzeylerini diğer tüm HT29 gruplarına göre arttırdı. Ancak bu artışın COX-2 yolağı üzerinden olmadığı anlaşılmaktadır. EpCAM protein ekspresyonunda HT29 ve HCT116 hücreleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. COX-2 ifade eden HT29 hücrelerinde COX-2 aktivitesinin PMA ile stimülasyonu ve DCF ile inhibisyonu bu adezyon molekülünün ifadesinde anlamlı bir değişim oluşturmadı.

Tablo 4.2. Kolorektal kanser hücre hatlarında yüzey antijenleri CD44, CD54, CD106 ve CD326 yüzde ifadesi.

Grup (n=3)	CD44	ICAM-1	VCAM-1	EpCAM
HCT116 Kontrol	18,2 ± 1,62 ^a	11,6 ± 2,62 ^a	21,0 ± 6,61	17,7 ± 8,87
HT29 Kontrol	77,6 ± 7,81	43,7 ± 5,14	14,7 ± 1,80	26,8 ± 5,23
HT29 PMA	94,9 ± 0,40 ^b	70,9 ± 1,16 ^b	17,7 ± 2,12	36,3 ± 11,6
HT29 DMSO	73,1 ± 5,07	46,1 ± 6,57	10,6 ± 0,79	18,8 ± 7,46
HT29 DCF	66,8 ± 3,72	37,3 ± 7,47	15,0 ± 3,37	22,6 ± 9,30
HT29 PMA + DCF	79,1 ± 9,73	47,9 ± 5,30	18,2 ± 9,07	24,9 ± 3,90
HCT116 DCF	35,5 ± 5,52 ^c	8,50 ± 1,13	34,5 ± 7,52 ^d	33,8 ± 4,62

Değerler yüzde total boyanma olarak verilmiştir. Sonuçlar ortalama ± SD olarak rapor edilmiştir. DCF, diklofenak; PMA, forbol-12-miristat-13-asetat; DMSO, dimetil sülfoksit. HCT116 hücreleri 24 saat 0,84 mM DCF ve HT29 hücrelerine 24 saat 0,2 µL/mL DMSO veya 0,42 mM DCF ve/veya 100 nM PMA ile muamele edildi. İstatistiksel değerlendirme tek yönlü ANOVA analizi tek yönlü varyans analizini takiben Tukey testi ile yapılmıştır. a, $p<0,001$, HT29 kontrol ile karşılaştırıldığında. b, $p<0,05$, HT29 kontrol, HT29 DMSO, HT29 DCF ve HT29 PMA+DCF grupları ile karşılaştırıldığında. c, $p<0,05$, HCT116 kontrol ile karşılaştırıldığında. d, $p<0,05$, tüm HT29 grupları ile karşılaştırıldığında.

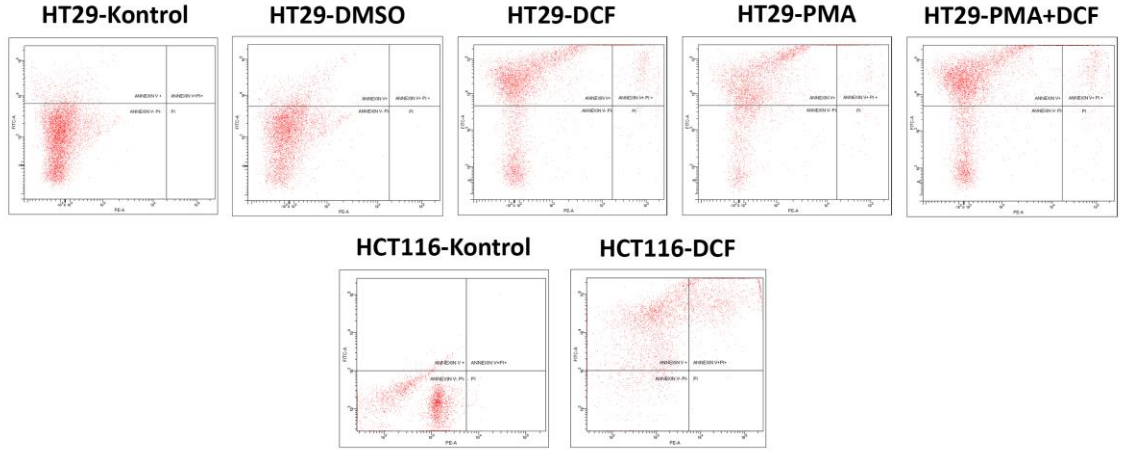


Şekil 4.11. Kolorektal kanser hücre hatlarında CD44, CD54, CD106, CD326 hücre adezyon molekülleri ve izotip kontrollerin akış sitometrisi analizi.

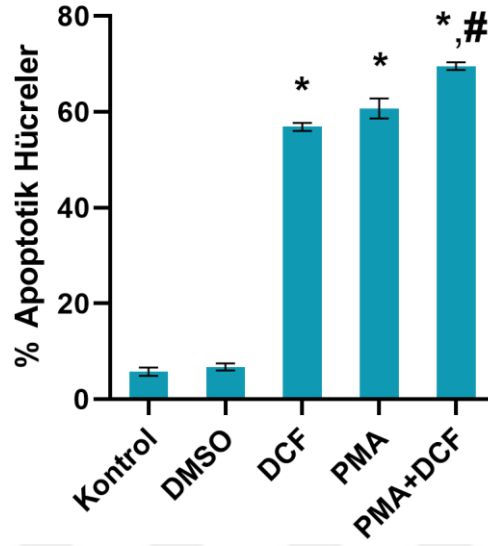
CD44-floresan izotiyosiyanat (FITC), CD54-allofikosiyanın (APC), CD106-fikoeritrin-siyanın 5 (Pe/Cy5), CD326- fikoeritrin (PE). HCT116 hücreleri 24 saat 0,84 mM DCF ve HT29 hücrelerine 24 saat 0,2 μ L/mL DMSO veya 0,42 mM DCF ve/veya 100 nM PMA ile muamele edildi. Her histogramda 10^4 hücre kaplandı. Her deney için yalnızca bir temsili deney (bağımsız olarak üç kez tekrarlandı) gösterilmiştir.

4.5. Anneksin V-FITC ve PI Apoptozis Analizi

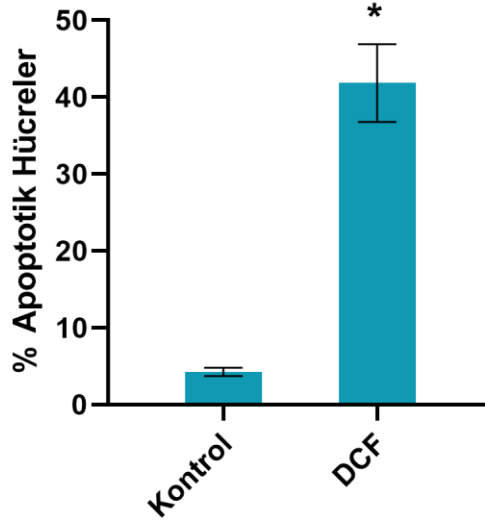
HT29 ve HCT116 kolorektal karsinoma hücrelerinde DCF ve PMA'nın apoptotik etkisi akış sitometrisinde Anneksin V-floresan izotiyosiyanat (FITC) ve propidyum iyodür (PI) test kiti kullanılarak yapıldı. Şekil 4.12'de HT29 ve HCT116 hücrelerine uygulanan toksik DCF ve/veya PMA dozlarının neden olduğu akış sitometrisi temsili analiz sonuçları yer almaktadır. Her panelde sol alt kadran canlı hücreleri, sol üst kadran erken apoptotik hücreleri, sağ üst kadran geç apoptotik hücreleri göstermektedir. HT29 hücreleri Anneksin V akış sitometrisi sonuçlarının kantitasyonu Şekil 4.13'te gösterilmiştir. HT29 hücrelerine DCF, PMA ve PMA+DCF uygulanması, kontrol ve DMSO gruplarına göre apoptotik hücre sayısını anlamlı olarak arttırdı ($p<0,001$). PMA ve DCF dozunun birlikte uygulanması PMA ve DCF gruplarına göre apoptotik hücre sayısının daha da artmasına neden oldu ($p<0,05$). HCT116 hücreleri Anneksin V akış sitometrisi sonuçlarının kantitasyonu Şekil 4.14'te gösterilmiştir. HCT116 hücrelerine DCF uygulanması ile kontrol grubuna göre apoptotik hücrelerde anlamlı olarak artış gözlemlendi ($p<0,05$).



Şekil 4.12. Anneksin V–FITC ve PI etiketli HT29 ve HCT116 hücrelerinin temsili akış sitometrisi analizi. Her panelde sol alt kadran canlı hücreleri, sol üst kadran apoptotik hücreleri, sağ üst kadran geç apoptotik hücreleri gösterir.



Şekil 4.13. Anneksin V-FITC ile HT29 hücre gruplarında apoptozunun kantitatif analizi. Veriler üç ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Tukey testi ile belirlendi. *, $p < 0,001$, kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0,05$, DCF ve PMA grupları ile karşılaştırıldığında.

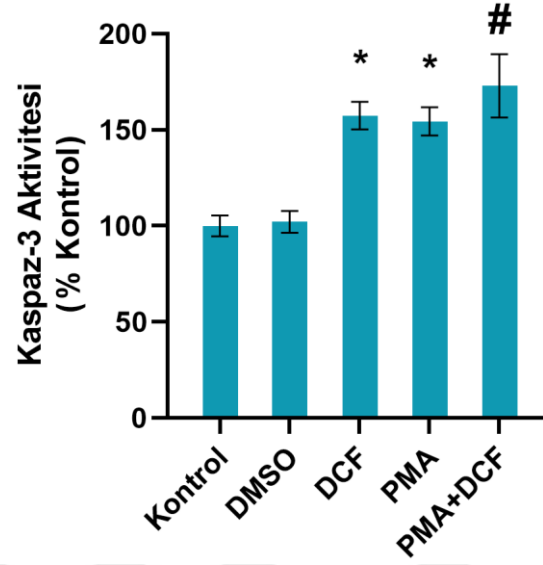


Şekil 4.14. Anneksin V-FITC ile HCT116 hücre gruplarında apoptozunun kantitatif analizi. Veriler üç ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz Student's t-test analizi ile yapıldı. *, $p < 0,05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

4.6. Kaspaz-3 Aktivitesi

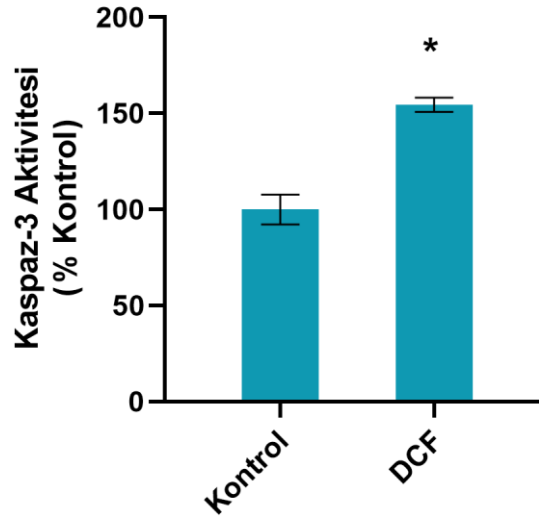
HT29 hücrelerinde apoptoz belirteçlerinden biri olan kaspaz-3 seviyeleri ölçüldü, sonuçlar Şekil 4.15'te gösterilmiştir. HT29 hücrelerine DCF, PMA ve PMA+DCF uygulaması kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı bir artışa neden oldu ($p < 0,05$). HCT116 hücrelerinde kaspaz-3 seviyeleri Şekil

4.16’da gösterilmiştir. HCT116 hücrelerinin DCF ile muamelesi sonucu kaspaz-3 aktivitesi anlamlı olarak artış göstermiştir ($p<0,001$). Kaspaz-3 aktivite sonuçları, anneksin V-FITC ve PI apoptozis analizi sonuçlarıyla genel olarak uyum göstermiştir.



Şekil 4.15. HT29 hücre gruplarında Kaspaz-3 aktivitesi.

Veriler 8 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Tukey testi ile belirlendi. *, $p<0,001$, kontrol ve DMSO grubu karşılaştırıldığında. #, $p<0,05$, kontrol ve DMSO grupları ile karşılatırıldığında.



Şekil 4.16. HCT116 hücre gruplarında Kaspaz-3 aktivitesi.

Veriler 8 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz Student’s t-test analizi ile yapıldı. *, $p<0,001$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, diklofenak'ın in vitro olarak insan kolon kanseri hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bulgularımız, HT29 (Hixson ve ark., 1994) ve HCT116 (Arisan ve ark., 2018) hücre hatlarında diklofenak kaynaklı sitotoksiteyi gösteren önceki çalışmalarla uyumludur. Steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar, kolorektal kanser için koruyucu ajanlar olarak önemli etkilere sahiptir. Düzenli aspirin ilacı alan hastalarda kolorektal kanser gelişme prevalansı ve kolorektal kanser kaynaklı ölüm oranı düşüktür (Chia ve ark., 2012). Bir dizi farklı NSAİD, doğal kanserojenler uygulanan deney hayvanlarında hem kolon adenomatöz poliplerin (Davis ve ark., 2020) hem de kanser gelişimini azalttığı bildirilmiştir (Kohno ve ark., 2005). Non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar, ayrıca hayvan modellerinde tümör büyümesini ve kolon kanserinin metastazını baskılar (Lichtenberger ve ark., 2018). Buna ek olarak radyoterapinin (Kim ve Pyo, 2013), immünoterapinin (Hamada ve ark., 2017) ve sitotoksik ilaç tedavisinin antikanser etkilerini artırmaktadır (Meyerhardt ve ark., 2021).

Diklofenak HT29 ve HCT116 hücrelerinde sitotoksiteye neden olmaktadır. Sitotoksitenin COX inhibisyonuna bağlı olarak gerçekleştiği görülmüştür. HCT116 hücreleri COX-2 ifade etmese de, bu hücrelerin aktif olarak araşidonik asitten prostaglandin oluşumunu kataliz eden COX-1'i ifade ettiği bilinmektedir (Ding ve ark., 2019). HT29 ve HCT116 hücrelerinde diklofenak kaynaklı PUFA düzeylerinde artış görülmüştür. Diklofenak araşidonat havuzlarının birikmesine ve PUFA düzeylerinin artmasına neden olan COX inhibisyonuna neden olmaktadır (Aslan ve ark., 2020). Biriken PUFAlar, mitokondriyal solunum ve β -oksidasyonu bozarak hücre hasara yol açar (Lu ve ark., 2010). Hücrelerin yüksek PUFA konsantrasyonlarına maruz kalması, mitokondriyal membranı etkiler, bu etki daha sonra elektron taşıyıcısı ve aerobik solunum fonksiyonunun işlevsizliğine neden olmaktadır (Lu ve ark., 2010). Artan PUFA seviyeleri, aynı zamanda mitokondriyal fonksiyon kaybında da rol oynayabilecek reaktif oksijen türlerinin üretimini artırır (Das ve Skobe, 2008). Diklofenak ayrıca, glutatyon (GSH) ile konjuge olarak hücre içi GSH depolarının tükenmesine ve oksidatif strese yol açar (Tang, 2003).

HT29 hücrelerinde COX-2 ekspresyonunun ve aktivitesinin uyarılmasıyla, CD44 ve ICAM-1 seviyelerinde önemli ölçüde artış gözlemledik. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, CD44 ve COX-2 ifadesi arasındaki ilişkiyi doğrudan ele alan ilk çalışmadır. Kolorektal kanserlerin gelişmesi ve tedavisinde CD44 ve COX-2'nin rolünü araştıran çok sayıda çalışma vardır. CD44, bir hücre yüzeyi hyalüronan reseptörü olarak görev yapan, yaygın olarak eksprese edilen bir transmembran glikoproteindir (Yaghobi ve ark., 2021). Başlangıçta CD44, hyalüronan için bir reseptör olarak tanımlanmış olsa da, daha sonra osteopontin (OPN), kolajenler ve matriks metaloproteinazlar gibi diğer birkaç ligandın da CD44'ü bağladığı bildirilmiştir (Senbanjo ve Chellaiah, 2017). CD44'ün aşırı ekspresyonunun, kolorektal karsinomda kanser ilerlemesi ve kötü prognozla bağlantılı olduğu bildirilmektedir (Bendardaf ve ark., 2006; Huh ve ark., 2009). Kolon kanseri hücrelerinde hyalüronan-CD44 etkileşimi ile siklooksijenaz-2 arasında güçlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir. CD44'ün ligandı olan hyalüronan, fosfoinositol 3-kinaz/AKT'yi içeren bir sinyal yolu ile HCA7 kolon karsinom hücrelerinde COX-2'nin patolojik indüksiyonunu aktif olarak düzenlemektedir (Misra ve ark., 2008).

Hücreler arası adezyon molekülü-1, HT29 hücrelerinde bulunur ve immünoglobulin süper ailesinin bir üyesidir (Kate ve ark., 2004). Ligandı, kan hücreleri ve mikrovasküler endotel hücreleri üzerinde ifade edilen LFA-1 (α L β 2 kompleksi)'dir (Reina ve Espel, 2017). Periferik kan hücreleri veya mikrovasküler endotel hücreleri yüzeyinde ifade edilen spesifik ligand ve ICAM-1 arasındaki temas, kanser hücrelerinin mikrovasküler endotelyum ve dolaşımdaki kan hücrelerine adezyonuna yardımcı olabilir ve daha sonra metastazlara yol açabilir (Reina ve Espel, 2017). Yüksek düzeyde COX-2 ifadesinin HT29 hücrelerinde ICAM-1 seviyelerini yükselttiğini ve diklofenak uygulamasının ICAM-1 seviyelerindeki artışı tersine çevirdiğini gözlemledik. Bulgularımız, seçici bir COX-2 inhibitörü olan selekoksib'in HT29 hücrelerinde ICAM-1 ekspresyonunu azalttığını bildiren bir çalışma ile uyumludur (Gallicchio ve ark., 2008).

Hem HT29 hem de HCT116 kolorektal kanser hücre hatlarına diklofenak uygulanması, kontrol gruplarına kıyasla apoptotik hücre sayısını ve kaspaz-3 aktivitesini önemli ölçüde artırdı. Daha önceki çalışmalar sıçanlarda diklofenak kaynaklı apoptozun indüklenmesinin deneysel kolon kanserine karşı koruyucu etkisi olduğunu bildirmiştir

(Ghanghas ve ark., 2016). Birkaç deneysel çalışma da COX-2 ekspresyonu ile apoptoz inhibisyonu arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir (W. S. Chen ve ark., 2003). Seçici bir COX-2 inhibitörü ile HT29 hücrelerinin tedavisi, iki pro-apoptotik proteinin, Bcl-2 ile ilişkili X proteininin (Bax) ve BID'nin ekspresyon seviyelerini indüklerken, anti-apoptotik protein Bcl-2'nin ekspresyonu azaltmaktadır (Gallicchio ve ark., 2008). Bcl-2 ve Bax proteinleri, mitokondriyal geçirgenlik kompleksini (MPT) düzenler. Protein Bax, mitokondriyal membran geçirgenliğini artırarak sitokrom c'nin salınmasına ve kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olurken, Bcl-2 mitokondriyal membran geçirgenliğini engelleyebilir ve sitokrom c salınımına karşı koruma sağlayabilir (Kelek ve ark., 2019). Diklofenak tedavisini takiben HT29 ve HCT116 hücrelerinde artan kaspaz-3 aktivitesi, bu yolun deneysel modelimizde de işlevsel olduğunu göstermektedir.

Deneysel hücre modellerimizde kullanılan diklofenak konsantrasyonlarının, normal farmakolojik insan plazma konsantrasyonlarından 50-100 kat daha fazla olduğunu vurgulamak çok önemlidir (Aslan ve ark., 2020). Bununla birlikte, anti-proliferatif etkilere saatler veya günler içinde ulaşılan hücre kültürü deneylerine kıyasla, in vivo anti-tümör etkilerinin gerçekleştirilmesi için gereken sürenin çok daha uzun olduğu (haftalar ila aylar) unutulmamalıdır. Diklofenak aracılı anti-proliferatif, anti-apoptotik etkiler ve ayrıca HT29 hücrelerindeki CD44 ve ICAM-1'in down regülasyonu, bu ilacın kolon kanseri üzerindeki koruyucu etkilerine ilişkin yeni bir bakış açısını aydınlatılabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışma, bir in vitro kolon kanseri modelinde diklofenak'ın etki mekanizması hakkındaki anlayışımıza katkıda bulunmaktadır. Veriler, diklofenak'ın sadece apoptozda değil, aynı zamanda kanser hücrelerinde adezyon molekülü ekspresyonunun düzenlenmesinde de bir rolü olduğunu göstermektedir.



KAYNAKLAR

Aggarwal, H., Sheffield, K. M., Li, L., Lenis, D., Sorg, R., Barzi, A., & Miksad, R. Primary tumor location and survival in colorectal cancer: A retrospective cohort study. *World J Gastrointest Oncol.* 2020; 12 (4): 405-423.

Agrez, M. V. Cell adhesion molecules and colon cancer. *Aust N Z J Surg.* 1996; 66 (12): 791-798.

Ahmed, M. M., & Mohammed, S. H. Significance of intratumoral microvessel density quantification based on immunohistochemical detection of pecam-1 and vwf in colorectal carcinoma from iraqi patients. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010; 53 (3): 439-446.

Ahnen, D. J. The american college of gastroenterology emily couric lecture--the adenoma-carcinoma sequence revisited: Has the era of genetic tailoring finally arrived? *Am J Gastroenterol.* 2011; 106 (2): 190-198.

Akin, H., & Tozun, N. Diet, microbiota, and colorectal cancer. *J Clin Gastroenterol.* 2014; 48 Suppl 1: S67-69.

Alexiou, D., Karayiannakis, A. J., Syrigos, K. N., Zbar, A., Kremmyda, A., Bramis, I., & Tsigris, C. Serum levels of e-selectin, icam-1 and vcam-1 in colorectal cancer patients: Correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer.* 2001; 37 (18): 2392-2397.

Alvarez, C., Andreu, M., Castells, A., Quintero, E., Bujanda, L., Cubiella, J., . . . ColonPrev study, i. Relationship of colonoscopy-detected serrated polyps with synchronous advanced neoplasia in average-risk individuals. *Gastrointest Endosc.* 2013; 78 (2): 333-341 e331.

Arisan, E. D., Ergul, Z., Bozdog, G., Rencuzogullari, O., Coker-Gurkan, A., Obakan-Yerlikaya, P., . . . Palavan-Unsal, N. Diclofenac induced apoptosis via altering

pi3k/akt/mapk signaling axis in hct 116 more efficiently compared to sw480 colon cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2018; 45 (6): 2175-2184.

Arrington, A. K., Heinrich, E. L., Lee, W., Duldulao, M., Patel, S., Sanchez, J., . . . Kim, J. Prognostic and predictive roles of kras mutation in colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 2012; 13 (10): 12153-12168.

Aslan, M., Kırımlıoğlu, E., Afşar, E., Çeker, T., & Yılmaz, Ç. Increased pufa levels in kidney epithelial cells in the course of diclofenac toxicity. *Toxicology in Vitro.* 2020; 66: 104836.

Bendardaf, R., Algars, A., Elzagheid, A., Korkeila, E., Ristamaki, R., Lamlum, H., . . . Pyrhonen, S. Comparison of cd44 expression in primary tumours and metastases of colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2006; 16 (4): 741-746.

Berman, J. J. Tumor taxonomy for the developmental lineage classification of neoplasms. *BMC Cancer.* 2004; 4: 88.

Bertram, J. S. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med.* 2000; 21 (6): 167-223.

Boesch, M., Spizzo, G., & Seeber, A. Concise review: Aggressive colorectal cancer: Role of epithelial cell adhesion molecule in cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *Stem Cells Transl Med.* 2018; 7 (6): 495-501.

Byrne, R. M., & Tsikitis, V. L. Colorectal polyposis and inherited colorectal cancer syndromes. *Ann Gastroenterol.* 2018; 31 (1): 24-34.

Chen, S. H., Tsai, H. L., Jiang, J. K., Sung, Y. C., Huang, C. W., Yeh, Y. M., . . . Wang, J. Y. Emergence of ras mutations in patients with metastatic colorectal cancer receiving cetuximab-based treatment: A study protocol. *BMC Cancer.* 2019; 19 (1): 640.

Chen, W. S., Liu, J. H., Wei, S. J., Liu, J. M., Hong, C. Y., & Yang, W. K. Colon cancer cells with high invasive potential are susceptible to induction of apoptosis by a selective cox-2 inhibitor. *Cancer Sci.* 2003; 94 (3): 253-258.

Chia, W. K., Ali, R., & Toh, H. C. Aspirin as adjuvant therapy for colorectal cancer--reinterpreting paradigms. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012; 9 (10): 561-570.

Choi, Y. S., Suh, J. P., Lee, I. T., Kim, J. K., Lee, S. H., Cho, K. R., . . . Lee, D. H. Regression of giant pseudopolyps in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2012; 6 (2): 240-243.

Christou, N., Perraud, A., Blondy, S., Jauberteau, M. O., Battu, S., & Mathonnet, M. E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncol Lett*. 2017; 13 (6): 4571-4576.

Das, S., & Skobe, M. Lymphatic vessel activation in cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1131: 235-241.

Davis, J. S., Kanikarla-Marie, P., Gagea, M., Yu, P. L., Fang, D., Sebastian, M., . . . Kopetz, S. Sulindac plus a phospholipid is effective for polyp reduction and safer than sulindac alone in a mouse model of colorectal cancer development. *BMC Cancer*. 2020; 20 (1): 871.

Delektorskaya, V. V., Perevoshchikov, A. G., Golovkov, D. A., & Kushlinskii, N. E. Expression of e-cadherin, beta-catenin, and cd-44v6 cell adhesion molecules in primary tumors and metastases of colorectal adenocarcinoma. *Bull Exp Biol Med*. 2005; 139 (6): 706-710.

Ding, L., Gu, H., Lan, Z., Lei, Q., Wang, W., Ruan, J., . . . Cui, Q. Downregulation of cyclooxygenase1 stimulates mitochondrial apoptosis through the nf-kappa-b signaling pathway in colorectal cancer cells. *Oncol Rep*. 2019; 41 (1): 559-569.

Dohadwala, M., Luo, J., Zhu, L., Lin, Y., Dougherty, G. J., Sharma, S., . . . Dubinett, S. M. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by cd44. *J Biol Chem*. 2001; 276 (24): 20809-20812.

Drake, R., Vogl, A. W., & Mitchell, A. Gray's anatomy for students (4th Edition ed.): Elsevier; 2019, p: 307-316.

Dubois, R. N. New, long-term insights from the adenoma prevention with celecoxib trial on a promising but troubled class of drugs. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009; 2 (4): 285-287.

Fearnhead, N. S., Wilding, J. L., & Bodmer, W. F. Genetics of colorectal cancer: Hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull*. 2002; 64: 27-43.

FitzGerald, G. A. Cox-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2 (11): 879-890.

Friday, B. B., & Adjei, A. A. K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1756 (2): 127-144.

Futosi, K., Fodor, S., & Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. 2013; 17 (3): 638-650.

Gallicchio, M., Rosa, A. C., Dianzani, C., Brucato, L., Benetti, E., Collino, M., & Fantozzi, R. Celecoxib decreases expression of the adhesion molecules icam-1 and vcam-1 in a colon cancer cell line (ht29). *Br J Pharmacol*. 2008; 153 (5): 870-878.

Ghanghas, P., Jain, S., Rana, C., & Sanyal, S. N. Chemoprevention of colon cancer through inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2016; 35 (3): 273-289.

Haier, J., Nasralla, M., & Nicolson, G. L. Cell surface molecules and their prognostic values in assessing colorectal carcinomas. *Ann Surg*. 2000; 231 (1): 11-24.

Hamada, T., Cao, Y., Qian, Z. R., Masugi, Y., Nowak, J. A., Yang, J., . . . Ogino, S. Aspirin use and colorectal cancer survival according to tumor cd274 (programmed cell death 1 ligand 1) expression status. *J Clin Oncol*. 2017; 35 (16): 1836-1844.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011; 144 (5): 646-674.

Harjunpaa, H., Lloret Asens, M., Guenther, C., & Fagerholm, S. C. Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2019; 10: 1078.

Hellweg, C. E., Arenz, A., Bogner, S., Schmitz, C., & Baumstark-Khan, C. Activation of nuclear factor kappa b by different agents: Influence of culture conditions in a cell-based assay. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1091: 191-204.

Hirano, T., Hirayama, D., Wagatsuma, K., Yamakawa, T., Yokoyama, Y., & Nakase, H. Immunological mechanisms in inflammation-associated colon carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (9).

Hixson, L. J., Alberts, D. S., Krutzsch, M., Einsphar, J., Brendel, K., Gross, P. H., . . . et al. Antiproliferative effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs against human colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994; 3 (5): 433-438.

Hsu, H. H., Chen, M. C., Day, C. H., Lin, Y. M., Li, S. Y., Tu, C. C., . . . Huang, C. Y. Thymoquinone suppresses migration of lovo human colon cancer cells by reducing prostaglandin e2 induced cox-2 activation. *World J Gastroenterol.* 2017; 23 (7): 1171-1179.

Huh, J. W., Kim, H. R., Kim, Y. J., Lee, J. H., Park, Y. S., Cho, S. H., & Joo, J. K. Expression of standard cd44 in human colorectal carcinoma: Association with prognosis. *Pathol Int.* 2009; 59 (4): 241-246.

Hull, T. L. Surgery of the anus, rectum and colon. *Gastroenterology.* 2000; 119 (4): 1173-1175.

Ichi, I., Kono, N., Arita, Y., Haga, S., Arisawa, K., Yamano, M., . . . Arai, H. Identification of genes and pathways involved in the synthesis of mead acid (20:3n-9), an indicator of essential fatty acid deficiency. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1841 (1): 204-213.

Iseki, Y., Shibutani, M., Maeda, K., Nagahara, H., Ikeya, T., & Hirakawa, K. Significance of e-cadherin and cd44 expression in patients with unresectable metastatic colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2017; 14 (1): 1025-1034.

Ishii, T., Notohara, K., Umapathy, A., Mallitt, K. A., Chikuba, H., Moritani, Y., . . . Whitehall, V. Tubular adenomas with minor villous changes show molecular features characteristic of tubulovillous adenomas. *Am J Surg Pathol.* 2011; 35 (2): 212-220.

John, S. K., George, S., Primrose, J. N., & Fozard, J. B. Symptoms and signs in patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2011; 13 (1): 17-25.

Johnson, D. E., O'Keefe, R. A., & Grandis, J. R. Targeting the il-6/jak/stat3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018; 15 (4): 234-248.

Kararli, T. T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos.* 1995; 16 (5): 351-380.

Kate, M. T., Hofland, L. J., van Grevenstein, W. M., van Koetsveld, P. V., Jeekel, J., & van Eijck, C. H. Influence of proinflammatory cytokines on the adhesion of human colon carcinoma cells to lung microvascular endothelium. *Int J Cancer.* 2004; 112 (6): 943-950.

Kelek, S. E., Afsar, E., Akcay, G., Danisman, B., & Aslan, M. Effect of chronic l-carnitine supplementation on carnitine levels, oxidative stress and apoptotic markers in peripheral organs of adult wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2019; 134: 110851.

Kierner, A. C., Zelenka, I., Heller, S., & Burian, M. Surgical anatomy of the spinal accessory nerve and the trapezius branches of the cervical plexus. *Arch Surg.* 2000; 135 (12): 1428-1431.

Kim, Y. M., & Pyo, H. Different cell cycle modulation by celecoxib at different concentrations. *Cancer Biother Radiopharm.* 2013; 28 (2): 138-145.

Kitagawa, T., Matsumoto, K., & Iriyama, K. Serum cell adhesion molecules in patients with colorectal cancer. *Surg Today*. 1998; 28 (3): 262-267.

Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., & Tanaka, T. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a cox-2 inhibitor and ppar ligands. *BMC Cancer*. 2005; 5: 46.

Lazorthes, F., Liagre, A., & Ghouti, L. [surgery of rectal cancer: Total exeresis of the mesorectum]. *Ann Chir*. 1999; 53 (10): 990-995.

Li, X. L., Zhou, J., Chen, Z. R., & Chng, W. J. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol*. 2015; 21 (1): 84-93.

Liang, J. T., Chang, K. J., & Wang, S. M. Anatomical basis of autonomic nerve-preserving total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg*. 1997; 84 (4): 586-587.

Lichtenberger, L. M., Phan, T., Fang, D., & Dial, E. J. Chemoprevention with phosphatidylcholine non-steroidal anti-inflammatory drugs in vivo and in vitro. *Oncol Lett*. 2018; 15 (5): 6688-6694.

Lipton, L., & Tomlinson, I. The genetics of fap and fap-like syndromes. *Fam Cancer*. 2006; 5 (3): 221-226.

Liu, Q., Chan, S. T., & Mahendran, R. Nitric oxide induces cyclooxygenase expression and inhibits cell growth in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis*. 2003; 24 (4): 637-642.

Lu, X., Yu, H., Ma, Q., Shen, S., & Das, U. N. Linoleic acid suppresses colorectal cancer cell growth by inducing oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Lipids Health Dis*. 2010; 9: 106.

Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361 (25): 2449-2460.

McLoughlin, J. M., Jensen, E. H., & Malafa, M. Resection of colorectal liver metastases: Current perspectives. *Cancer Control*. 2006; 13 (1): 32-41.

Menter, D. G., Schilsky, R. L., & DuBois, R. N. Cyclooxygenase-2 and cancer treatment: Understanding the risk should be worth the reward. *Clin Cancer Res*. 2010; 16 (5): 1384-1390.

Mestre, J. R. The changing pattern of juvenile polyps. *Am J Gastroenterol*. 1986; 81 (5): 312-314.

Meyerhardt, J. A., Shi, Q., Fuchs, C. S., Meyer, J., Niedzwiecki, D., Zemla, T., . . . Shields, A. F. Effect of celecoxib vs placebo added to standard adjuvant therapy on disease-free survival among patients with stage iii colon cancer: The calgb/swog 80702 (alliance) randomized clinical trial. *JAMA*. 2021; 325 (13): 1277-1286.

Misra, S., Obeid, L. M., Hannun, Y. A., Minamisawa, S., Berger, F. G., Markwald, R. R., . . . Ghatak, S. Hyaluronan constitutively regulates activation of cox-2-mediated cell survival activity in intestinal epithelial and colon carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2008; 283 (21): 14335-14344.

Mohammadi, A., Yaghoobi, M. M., Gholamhoseinian Najar, A., Kalantari-Khandani, B., Sharifi, H., & Saravani, M. Hsp90 inhibition suppresses pge2 production via modulating cox-2 and 15-pgdh expression in ht-29 colorectal cancer cells. *Inflammation*. 2016; 39 (3): 1116-1123.

Nano, M., Levi, A. C., Borghi, F., Bellora, P., Bogliatto, F., Garbossa, D., . . . Dorfl, J. Observations on surgical anatomy for rectal cancer surgery. *Hepatogastroenterology*. 1998; 45 (21): 717-726.

Nowacki, T. M., Bruckner, M., Eveslage, M., Tepasse, P., Pott, F., Thoennissen, N. H., . . . Bettenworth, D. The risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 2015; 60 (2): 492-501.

Paschos, K. A., Canovas, D., & Bird, N. C. The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis. *Cell Signal*. 2009; 21 (5): 665-674.

Politis, D. S., Katsanos, K. H., Tsianos, E. V., & Christodoulou, D. K. Pseudopolyps in inflammatory bowel diseases: Have we learned enough? *World J Gastroenterol*. 2017; 23 (9): 1541-1551.

Rahbari, N. N., Bork, U., Scholch, S., Reissfelder, C., Thorlund, K., Betzler, A., . . . Koch, M. Metastatic spread emerging from liver metastases of colorectal cancer: Does the seed leave the soil again? *Ann Surg*. 2016; 263 (2): 345-352.

Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*. 2019; 14 (2): 89-103.

Reina, M., & Espel, E. Role of lfa-1 and icam-1 in cancer. *Cancers (Basel)*. 2017; 9 (11).

Sampson, J. R., Jones, S., Dolwani, S., & Cheadle, J. P. Mutyh (myh) and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans*. 2005; 33 (Pt 4): 679-683.

Schack, A., Fransgaard, T., Klein, M. F., & Gogenur, I. Perioperative use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs decreases the risk of recurrence of cancer after colorectal resection: A cohort study based on prospective data. *Ann Surg Oncol*. 2019; 26 (12): 3826-3837.

Segditsas, S., & Tomlinson, I. Colorectal cancer and genetic alterations in the wnt pathway. *Oncogene*. 2006; 25 (57): 7531-7537.

Senbanjo, L. T., & Chellaiah, M. A. Cd44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front Cell Dev Biol*. 2017; 5: 18.

Shang, S., Hua, F., & Hu, Z. W. The regulation of beta-catenin activity and function in cancer: Therapeutic opportunities. *Oncotarget*. 2017; 8 (20): 33972-33989.

Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., & Der, C. J. Understanding ras: 'It ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol.* 2000; 10 (4): 147-154.

Shin, S. K., Nagasaka, T., Jung, B. H., Matsubara, N., Kim, W. H., Carethers, J. M., . . . Goel, A. Epigenetic and genetic alterations in netrin-1 receptors unc5c and dcc in human colon cancer. *Gastroenterology.* 2007; 133 (6): 1849-1857.

Shussman, N., & Wexner, S. D. Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterol Rep (Oxf).* 2014; 2 (1): 1-15.

Smakman, N., Kranenburg, O., Vogten, J. M., Bloemendaal, A. L., van Diest, P., & Borel Rinkes, I. H. Cyclooxygenase-2 is a target of krasd12, which facilitates the outgrowth of murine c26 colorectal liver metastases. *Clin Cancer Res.* 2005; 11 (1): 41-48.

Stedman, L. T. *Stedman's medical dictionary* (28th Ed. ed.): Lippincott Williams & Wilkins (LWW); 2013, p:

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2021.

Takahashi, H., & Berber, E. Role of thermal ablation in the management of colorectal liver metastasis. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2020; 9 (1): 49-58.

Tang, W. The metabolism of diclofenac--enzymology and toxicology perspectives. *Curr Drug Metab.* 2003; 4 (4): 319-329.

Tariq, K., & Ghias, K. Colorectal cancer carcinogenesis: A review of mechanisms. *Cancer Biol Med.* 2016; 13 (1): 120-135.

Thrumurthy, S. G., Thrumurthy, S. S., Gilbert, C. E., Ross, P., & Haji, A. Colorectal adenocarcinoma: Risks, prevention and diagnosis. *BMJ.* 2016; 354: i3590.

Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004; 10 (8): 789-799.

Waage, J., Taylor, F., Read, J., & Brown, G. Imaging assessment of early rectal cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2014; 203: 3-14.

Wallis, J. G., Watts, J. L., & Browse, J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: What will they think of next? *Trends Biochem Sci.* 2002; 27 (9): 467.

Wang, D., & Dubois, R. N. The role of cox-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene.* 2010; 29 (6): 781-788.

Wolpin, B. M., Meyerhardt, J. A., Mamon, H. J., & Mayer, R. J. Adjuvant treatment of colorectal cancer. *CA Cancer J Clin.* 2007; 57 (3): 168-185.

Wong, C. W., Dye, D. E., & Coombe, D. R. The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *Int J Cell Biol.* 2012; 2012: 340296.

Yaghobi, Z., Movassaghpour, A., Talebi, M., Abdoli Shadbad, M., Hajiasgharzadeh, K., Pourvahdani, S., & Baradaran, B. The role of cd44 in cancer chemoresistance: A concise review. *Eur J Pharmacol.* 2021; 903: 174147.

Zhang, H., & Sun, X. F. Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97 (4): 1037-1041.

Zhang, L., & Shay, J. W. Multiple roles of apc and its therapeutic implications in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017; 109 (8).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Çağatay	Uyruğu	T.C.
Soyadı	YILMAZ	e-posta	-
Doğum tarihi	-		

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Balıkesir Bahçelievler Anadolu Lisesi	2014
Lisans	Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik	2018
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	-

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre(yıl)
Stajyer	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı	2017
Stajyer	Tüpraş İzmit Rafinerisi	2018

Yabancı Dil	Sınav türü	Puan
İngilizce	YÖKDİL	66,25

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Hipertansiyon Modelinde Asperglaucide Uygulamasının Endotelyum Fonksiyonuna Etkileri, Proje No: 219S713	TÜBİTAK	2020-2022
Diklofenak Sodyumun Kolorektal Kansere Hücresinde Adezyon Moleküllerine ve Apoptozise Etkisi, Proje No: TYL-2020-5435	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi	2020-2021
Tip 2 Diyabetik Fazla Kilolu Obez Hastalarda Trigliserid Yüksekliğinin Serum Sfingolipidlerine ve HDL Subfraksiyonlarına Etkisi, Proje No: TTU-2021-5605	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi	2021-2023

Burslar-Ödüller:

TÜBİTAK Proje Bursiyeri, Hipertansiyon Modelinde Asperglauclide Uygulamasının Endotelyum Fonksiyonuna Etkileri, Proje No: 219S713.

Yayınlar ve Bildiriler:

SCI, SSCI, AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

Mutay Aslan, Ebru Afşar, Esma Kırımlıoğlu, Tuğçe Çeker & **Çağatay Yılmaz** (2020): Antiproliferative Effects of Thymoquinone in MCF-7 Breast and HepG2 Liver Cancer Cells: Possible Role of Ceramide and ER Stress. Nutrition and Cancer. DOI: 10.1080/01635581.2020.1751216

Ebru Afşar, Esma Kırımlıoğlu, Tuğçe Çeker, **Çağatay Yılmaz**, Necdet Demir, Mutay Aslan (2020): Effect of ER stress on sphingolipid levels and apoptotic path-ways in retinal pigment epithelial cells, Redox Biology, DOI: 10.1016/j.redox.2020.101430

Mutay Aslan, Esma Kırımlıoğlu, Ebru Afşar, Tuğçe Çeker, **Çağatay Yılmaz** (2020): Increased PUFA levels in kidney epithelial cells in the course of diclofenac toxicity, Toxicology in Vitro, DOI: 10.1016/j.tiv.2020.104836

Hakemli Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar:

Ebru Afşar, Esma Kırımlıoğlu, Tuğçe Çeker, **Çağatay Yılmaz**, Necdet Demir, Mutay Aslan (2020): Effect of ER stress on sphingolipid levels and apoptotic pathways in retinal pigment epithelial cells, XXXI. National Congress of the Turkish Biochemical Society 2020, Sözlü Sunum

Çağatay Yılmaz, Esma Kırımlıoğlu, Ebru Afşar, Tuğçe Çeker, Mutay Aslan (2020): Increased PUFA levels in kidney epithelial cells in the course of diclofenac toxicity, XXXI. National Congress of the Turkish Biochemical Society 2020, Sözlü Sunum