



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

**KLİNİKTE KULLANILAN KEMOTERAPİ
KOMBİNASYONLARININ HT29 KOLON KANSERİ HÜCRELERİ
VE KANSER KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İKİ
VE ÜÇ BOYUTLU KÜLTÜR KOŞULLARINDA ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

ASLI YILDIRIM KOCAMAN

Dr. Öğr. Üyesi Seçil Erden Tayhan

TOKAT- 2024



Bu tez çalışması;

**Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
2024/67 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.**

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, DR. ÖĞR. ÜYESİ SEÇİL ERDEN TAYHAN danışmanlığında hazırlamış olduğum “KLİNİKTE KULLANILAN KEMOTERAPİ KOMBİNASYONLARININ HT29 KOLON KANSERİ HÜCRELERİ VE KANSER KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İKİ VE ÜÇ BOYUTLU KÜLTÜR KOŞULLARINDA ARAŞTIRILMASI” adlı Doktora Tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

17/12/24

Aslı YILDIRIM KOCAMAN

JÜRİ KABUL VE ONAY



ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca ve bu tezin hazırlık sürecinde bana yol gösteren, bilgi ve tecrübeleriyle beni daima destekleyen değerli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN'a en derin teşekkürlerimi sunarım. Bilimsel gelişimimde sağladığı rehberlik, sabırla paylaştığı bilgi ve yanımda hissettiğim güven sayesinde bu yolculuğu başarıyla tamamlayabildim.

Akademik ilerleme sürecime ve tez çalışmalarına değerli katkılarda bulunan, güvenini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Esra KOÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarına kattığı değerli görüşleriyle yoluma ışık tutan, sorumluluk duygumu pekiştirerek içimdeki potansiyeli ortaya çıkarmamı sağlayan sevgili hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sema BİLGİN'e sonsuz teşekkür ederim.

Tez sürecimde maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, akademik gelişimimde önemli bir rol oynayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ramazan ERENLER'e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bu yolculukta maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini bana aktaran kıymetli hocam Sayın Dr. Yahya TAYHAN'a tüm yardımları için teşekkür ederim.

Bu süreçte karşılaştığım her zorlukta yanımda olarak bana güç veren, desteğini, sabrını ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili dostum Derya ATASOY'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında bana güvenen, maddi ve manevi destekleriyle akademik yolculuğumda en büyük motivasyon kaynağım olan sevgili annem Şerife YILDIRIM, babam Arslan YILDIRIM, abilerim Alparslan YILDIRIM ve Ertuğrul YILDIRIM ile kardeşim Onur YILDIRIM'a gönülden teşekkür ederim; onların inancı ve desteği sayesinde bu yolu güçlü adımlarla yürüyebildim.

Eğitim sürecimde her adımda bana olan inancını ve güvenini hissettiren, sevgisi ve desteğiyle her zorluğu aşmamda yanımda olan sevgili eşim Emre Özgür KOCAMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Onun varlığı, yalnızca bu yolculuğu değil, tüm akademik serüvenimi daha anlamlı ve dayanılır kılmıştır. Ayrıca, tüm bu süreçte destekleriyle yanımda olan değerli ailesine de yürekten minnettarım ve çok teşekkür ederim.

Aslı YILDIRIM KOCAMAN

17 Aralık 2024

ÖZET

KLİNİKTE KULLANILAN KEMOTERAPİ KOMBİNASYONLARININ HT29 KOLON KANSERİ HÜCRELERİ VE KANSER KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İKİ VE ÜÇ BOYUTLU KÜLTÜR KOŞULLARINDA ARAŞTIRILMASI

Kocaman Yıldırım, Aslı
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

Tez Danışmanı: DR. ÖĞR. ÜYESİ SEÇİL ERDEN TAYHAN
Aralık 2024, X + 123 Sayfa

Kanser tedavisindeki ilerlemeler, çeşitli maligniteler için yaşam süresini ve yaşam kalitesini artırmış olsa da kolorektal kanser günümüzde hala önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bu sorunun en büyük etkenlerinden biri olan kanser kök hücreleri, tümörün büyümesi, metastazı ve ilaç direncinde önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, KKH'lere yönelik etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, kanser tedavisinde başarıyı artırmak için oldukça önemlidir. Tez çalışması kapsamında, HT29 kolon kanseri hücreleri ve HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücreleri üzerinde, klinikte kullanılan kemoterapi ilaç kombinasyonlarının etkileri iki ve üç boyutlu kültür koşullarında araştırılarak detaylı bir şekilde incelenmiştir. Sonuçlar, 5-Fluorourasil, oxaliplatin, irinotekan ve bunların kombinasyonlarının kolon kanseri hücreleri ve kolon kanseri kök hücreleri üzerinde farklı etkiler oluşturduğunu göstermiştir. 2B ve 3B kültür koşullarının hücrelerin tedaviye verdiği cevabı doğrudan etkilediği belirlenmiştir. HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinin 3B kültürde yüksek migrasyon ve invazyon kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, kolon kanserinde kemoterapiye direnç geliştiren kanser kök hücrelerinin davranışlarının anlaşılmasına ve bu hücrelere özgü hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

ANAHTAR KELİMELE: İlaç Kombinasyon Terapisi, Kolon Kanseri, Kolon Kanseri Kök Hücresi, Üç Boyutlu Hücre Kültürü, Migrasyon, İnvazyon, Metastaz

ABSTRACT
**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CLINICALLY USED CHEMOTHERAPY
COMBINATIONS ON HT29 COLON CANCER CELLS AND CANCER STEM CELLS IN
TWO AND THREE DIMENSIONAL CULTURE CONDITIONS**

Kocaman Yıldırım, Aslı
Tokat Gaziosmanpaşa University
Postgraduate Education Institute
DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Seçil Erden Tayhan
December 2024, X + 123 Page

Although advances in cancer treatment have increased the life expectancy and quality of life for various malignancies, colorectal cancer continues to be a major health problem today. Cancer stem cells, one of the biggest factors of this problem, play an important role in tumor growth, metastasis and drug resistance. Therefore, developing effective treatment strategies for CSCs is very important to increase the success of cancer treatment. Within the scope of the thesis study, the effects of chemotherapy drug combinations used in the clinic on HT29 colon cancer cells and HT29 CD133⁺/CD44⁺ colon cancer stem cells were investigated in two- and three-dimensional culture conditions and examined in detail. The results showed that 5-Fluorouracil, oxaliplatin, irinotecan and their combinations had different effects on colon cancer cells and colon cancer stem cells. It was determined that 2D and 3D culture conditions directly affected the response of the cells to treatment. It was determined that HT29 CD133⁺/CD44⁺ colon cancer stem cells had high migration and invasion capacity in 3D culture. These results contribute to the understanding of the behavior of cancer stem cells that develop resistance to chemotherapy in colon cancer and to the development of targeted treatment strategies specific to these cells.

KEYWORDS: Drug Combination Therapy, Colon Cancer, Colon Cancer Stem Cell, Three-Dimensional Cell Culture, Migration, Invasion, Metastasis

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1 GİRİŞ.....	1
2 KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Kolorektal Kanser.....	4
2.2 Kolorektal Kanser Kök Hücreleri.....	5
2.3 Kolorektal Kanserlerin Üç Boyutlu Kültürlerde Modellenmesi	6
2.4 Kolorektal Kanser Tedavisinde Hücresel, Moleküler ve Kemoterapötik Yaklaşımlar	7
3 MATERYAL ve YÖNTEM	11
3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler	11
3.1.1 Kullanılan Cihazlar ve Aletler	11
3.1.2 Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler.....	12
3.2 Yöntem	13
3.2.1 Hücre Hatlarının Kültüre Edilmesi, Stoklanması	13
3.2.2 Kanser Hücre Hatlarından Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültivasyonu	15
3.2.3 MACS Tekniği ile Elde Edilen CD44 ⁺ ve CD133 ⁺ Hücrelerin Karakterizasyonu.....	20
3.2.4 Kemoterapötik İlaçların Kanser Hücre ve Kanser Kök Hücre Hatları Üzerindeki Kombine Etkilerinin Belirlenmesi.....	25
3.2.5 Kombinasyon İndeksinin Hesaplanması.....	27
3.2.6 Kemoterapötik Ajanların ve Kombinasyonlarının Kanser Kök Hücresi Temelli Üç Boyutlu Mikro Dokular Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	28

3.2.7	<i>In vitro</i> Çizik Analizi (Strach Assay) ile Migrasyon Tayini.....	31
3.2.8	Gen Ekspresyon Profillerinin Kantitatif Real-Time PCR Analizi	32
3.2.9	Metastaz ve İnvazyon Analizi.....	34
5	BULGULAR VE TARTIŞMA	37
5.1	Kolon Kanseri Kök Hücrelerinin (HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺) Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu.....	37
5.2	Kemoterapötik İlaç Kombinasyonlarının Kansere Hücre ve Kansere Kök Hücre Hatları Üzerindeki Potansiyel Etkilerinin İncelenmesi	39
5.2.1	Kombinasyon İndeksi Analizi.....	50
5.3	Kemoterapötik Ajanların ve Kombinasyonlarının Kansere Hücre ve Kansere Kök Hücre Temelli Üç Boyutlu Mikro Dokular Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	55
5.4	<i>In Vitro</i> Çizik (Scratch) Testi ile Migrasyon Yeteneğinin Değerlendirilmesi	61
5.5	Gen Ekspresyon Profillerinin Kantitatif Real-Time PCR ile Değerlendirilmesi.....	70
5.6	Transwell Sistemi Kullanılarak Yapılan İnvazyon ve Migrasyon Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	89
6	SONUÇ VE ÖNERİLER	105
7	KAYNAKÇA.....	108
8	ÖZGEÇMİŞ.....	123

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Kolorektal kanser oluşumu (<i>Biorender.com ile oluşturulmuştur</i>).....	5
Şekil 3.1 Hücrelerin çözdürülmesi ve kültüre alınması (<i>Biorender.com ile oluşturulmuştur</i>).....	14
Şekil 3.2 Kanser hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (a:24h, b:48h, 10X büyütme)	14
Şekil 3.3 Sağlıklı hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (a: 24h, b: 48h, 10X büyütme)	14
Şekil 3.4 Hücrelerin pasajlanması ve dondurulması/stoklanması (<i>Biorender.com ile oluşturulmuştur</i>).....	15
Şekil 3.5 MACS seperasyon ünitesi (a- Midi MACS, b- Mini MACS)	16
Şekil 3.6 MACS seperasyon ünitesi ile kanser kök hücresi ayrımı	16
Şekil 3.7 TRIzol ile RNA izolasyonu şeması (<i>Biorender.com ile oluşturulmuştur</i>)	21
Şekil 3.8 MTT uygulama basamakları (<i>Biorender.com ile oluşturulmuştur</i>).....	27
Şekil 3.9 3D Petri Dish® tekniği kullanılarak agaroz matriks kalıpların hazırlanması..	29
Şekil 3.10 Agar jellerde oluşan kuyucukların mikroskopik görünümü	29
Şekil 3.11 Hücre göçü tayini için yara alanın oluşturulması (<i>Biorender.com ile oluşturulmuştur</i>).....	32
Şekil 3.12 qRT-PCR deney basamakları (<i>Biorender.com ile oluşturulmuştur</i>)	33
Şekil 3.13 Transwell kalıpların invazyon ve migrasyon analizi için hazırlanması	35
Şekil 4.1 HT29 (CD133 ⁺ /CD44 ⁺) kanser kök hücrelerinin mRNA düzeyinde gen ifade seviyesi.....	38
Şekil 4.2 İlaç Doz-Tepki Eğrileri ve Folinik Asit ve 5-Florourasil Kombinasyonunun Optimizasyonu	41
Şekil 4.3 HT29 kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri	42
Şekil 4.4 HT29 kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri	44
Şekil 4.5 HT29 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri	45

Şekil 4.6 HT29 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri	46
Şekil 4.7 CCD-18Co sağlıklı kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri	48
Şekil 4.8 CCD-18Co sağlıklı kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri	49
Şekil 4.9 FOLFOX kombinasyonunun HT29 kanser hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik ilaç uygulamalarına ilişkin Combination Index (CI) grafikleri	51
Şekil 4.10 FOLFIRI kombinasyonunun HT29 kanser hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik ilaç uygulamalarına ilişkin Combination Index (CI) grafikleri	52
Şekil 4.11 FOLFOX kombinasyonunun HT29 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ kanser kök hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik ilaç uygulamalarına ilişkin Combination Index (CI) grafikleri	53
Şekil 4.12 FOLFIRI kombinasyonunun HT29 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ kanser kök hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik ilaç uygulamalarına ilişkin Combination Index (CI) grafikleri	54
Şekil 4.13 HT29 hücrelerinin kemoterapötik ilaçlar ve kombinasyonları (FF, OX, FOLFOX) ile etkileşiminden sonraki mikro-doku değişimleri	56
Şekil 4.14 HT29 mikro dokuların kemoterapötik ilaçlar ve kombinasyonları (FF, IRI, FOLFIRI) ile etkileşiminden sonraki mikro-doku değişimleri	57
Şekil 4.15 HT29 KKH CD133 ⁺ /CD44 ⁺ mikro dokuların kemoterapötik ilaçlar ve kombinasyonları (FF, OX, FOLFOX) ile etkileşiminden sonraki mikro-doku değişimleri	59
Şekil 4.16 HT29 KKH CD133 ⁺ /CD44 ⁺ mikro dokuların kemoterapötik ilaçlar ve kombinasyonları (FF, IRI, FOLFIRI) ile etkileşiminden sonraki mikro-doku değişimleri	60
Şekil 4.17 HT29 kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının çizik testi (scratch assay) ile migrasyon üzerine etkileri	63
Şekil 4.18 HT29 kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının çizik testi (scratch assay) ile migrasyon üzerine etkileri	65
Şekil 4.19 HT29 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının çizik testi (scratch assay) ile migrasyon üzerine etkileri	67
Şekil 4.20 HT29 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının çizik testi (scratch assay) ile migrasyon üzerine etkileri	69

Şekil 4.21 HT29 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerine etkileri	71
Şekil 4.22 HT29 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerine etkileri	73
Şekil 4.23 HT29 KKH CS133 ⁺ /CD44 ⁺ 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerine etkileri	74
Şekil 4.24 HT29 KKH CS133 ⁺ /CD44 ⁺ 3B hücre kültüründe kemoterapi farklı ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerine etkileri	75
Şekil 4.25 HT29 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) migrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri	76
Şekil 4.26 HT29 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) migrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri	78
Şekil 4.27 HT29 KKH CS133 ⁺ /CD44 ⁺ 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) migrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri.....	79
Şekil 4.28 HT29 KKH CS133 ⁺ /CD44 ⁺ 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) migrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri.....	80
Şekil 4.29 HT29 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) invazyon ve anjiyogenezle ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri	81
Şekil 4.30 HT29 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) invazyon ve anjiyogenezle ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri	82
Şekil 4.31 HT29 KKH CS133 ⁺ /CD44 ⁺ 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) invazyon ve anjiyogenezle ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri.....	83

Şekil 4.32 HT29 KKH CS133 ⁺ /CD44 ⁺ 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) invazyon ve anjiyogenezle ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri.....	84
Şekil 4.33 HT29 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri	85
Şekil 4.34 HT29 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri	86
Şekil 4.35 HT29 KKH CS133 ⁺ /CD44 ⁺ 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) EMT ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri	87
Şekil 4.36 HT29 KKH CS133 ⁺ /CD44 ⁺ 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) EMT ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri	88
Şekil 4.37 HT29 kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının migrasyon üzerindeki etkileri	91
Şekil 4.38 HT29 kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının invazyon üzerindeki etkileri	93
Şekil 4.39 HT29 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının migrasyon üzerindeki etkileri	95
Şekil 4.40 HT29 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının invazyon üzerindeki etkileri	97

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1 Kullanılan cihaz ve aletler	11
Çizelge 3.2 Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	12
Çizelge 3.3 cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri.....	22
Çizelge 3.4 Kök hücre karakterizasyonu için qRT-PCR'da kullanılan primer dizileri...	23
Çizelge 3.5 qRT-PCR bileşenleri.....	23
Çizelge 3.6 qRT-PCR’da kullanılan primer dizileri	33
Çizelge 4.1 Kemoterapi ilaçları ve bunların kombinasyonlarının kolon kanseri (HT29), kolon kanseri kök hücreleri (HT29 CD133 ⁺ /44 ⁺) ve sağlıklı kolon hücreleri (CCD- 18Co) ile etkileşimlerinden elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simge

°C

%

CO₂

gr

mg

µM

M

ml

mM

nm

rpm

Açıklama

Santigrat derece

Yüzde

Karbondioksit

Gram

Miligram

Mikromolar

Molar

Mililitre

Milimolar

Nanometre

Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar

2B

3B

5-FU

APC

Bax

Bcl-2

BSA

CD24

CD44

CD133

cDNA

CCD-18Co

dNTP

DMEM

DMSO

Açıklama

İki boyutlu

Üç boyutlu

5-Fluorourasil

Adenomatöz Poliposis Kolon

apoptoz uyarıcı bcl-2 aile üyesi protein

pro-veya anti-apoptotik etkili gen ailesi

Sığır serum albümin

Küçük Hücre Yüzeyi Proteini

Hücre Yüzeyi Adezyon Molekülü

Prominin-1

Komplementer deoksiribonükleik asit

Sağlıklı insan kolon fibroblast hücre

Deoksiribonükleotid trifosfat

Dulbecco's Modified Eagle Medium

Dimetil sülfoksit

DNA	Deoksiribonükleik asit
DPBS	Dulbecco's Tuzlu fosfat tamponu (Dulbecco's phosphate buffered saline)
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EtOH	Etonol
FBS	Fötal sıgır serum
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FOLFIRI	5-Fluorourasil, folinik asit ve irinotekan
FOLFOX	5-Fluorourasil, folinik asit ve oxaliplatin
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
HIF-1α	Hipoksi ile indüklenen faktör-1
HT-29	İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı
IC₅₀	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
ICAD	İnaktif kaspaz aktive DNaz
IL-6	İnterlökin-6
IRI	İrinotekan
KKH	Kanser kök hücresi
KRAS	Kirsten ras onkogen homologu
KRK	Kolorektal kanser
MMP-2	Matriks metalloproteinaz-2
MMP-9	Matriks metalloproteinaz-9
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium
NANOG	NANOG Homeobox
Nestin	Sinir hücresi ara filament proteini
OCT3/4	Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 3/4
OX	Oxaliplatin
P53	Tümör baskılayıcı protein 53
PBS	Fosfat tamponu
PFA	Paraformaldehit
qRT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı (Real-time) polimeraz zincir reaksiyonu

RNA	Ribonükleik asit
RNase	Ribonükleik asit parçalayan enzim
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Enstitüsü'nde geliştirilen bir hücre besisi ortamı
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOX2	SRX (Sex Determining Region Y)-Box 2
TGFβ1	Transforme edici büyüme faktör-beta-1
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü



1 GİRİŞ

Dünya genelinde ölümlerle sonuçlanan hastalıkların başında gelen kanser, hücresel düzeydeki anormal büyüme ve yayılma ile karakterize bir hastalıktır. Genetik mutasyonlar, çevresel faktörler ve yaşam tarzı alışkanlıkları gibi çeşitli faktörlerin etkileşimiyle meydana gelmektedir (Hyndman, 2016). Uzun yıllardır, kanserin biyolojik mekanizmalarını anlamak ve etkili tedavi yöntemleri geliştirmek için araştırmalar yapılmaktadır. Kolon kanseri, gastrointestinal sistemde malign tümörlerin en sık görülen türlerinden birisi olarak öne çıkmaktadır ve tüm kanser türlerinin yaklaşık %10-15'ini oluşturmaktadır (Sung ve ark., 2021). Kolorektal kanser (KRK), her yıl hem hastalık hem de ölüm oranlarında artış eğilimi göstermektedir (Gach-Janczak ve ark., 2024). Kolorektal kanserli hastaların çoğunda hastalık ileri evrelerde teşhis edilebilmektedir (McQuade ve ark., 2017). Geniş dağılım gösteren ve metastatik kolon kanseri hücreleri olarak adlandırılan hücrelerin sebep olduğu etkiyi en aza indirebilmek ve hastanın sağkalım süresini artırabilmek için çeşitli tedavi yaklaşımları tercih edilmektedir (Billler ve Schrag, 2021). Kanser hücrelerinde bölünme ve çoğalmayı artırarak hastalığın yayılmasında önemli rol oynayan metastaz süreci, tedaviye karşı geliştirilen direnci de güçlendirmektedir (Arnold ve ark., 2017). Kansere yönelik tedavi yöntemlerinin son yıllarda önemli derecede ilerlemesine rağmen, geleneksel yöntemler olan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi rezeksiyonun bazı sınırlamaları hala aşamamıştır. Bu sınırlamalar arasında, hastaların tedaviye uyumunun düşük olması, tedavinin hedeflenen dokuları iyi seçememesi, yüksek toksisite ve ilaca karşı direnç oluşması gibi durumlar bulunmaktadır (Xie ve ark., 2020). Bu nedenle tek bir tip tedaviye dayalı konvansiyonel yöntemler yetersiz kalmaktadır. Tedavi etkinliğini artırmak ve yan etkileri en aza indirmek amacıyla geleneksel kemoterapötik ilaçların bir araya getirilmesiyle oluşturulan kombinasyonlar, umut verici bir strateji olarak değerlendirilmektedir (Sánchez-Gundín ve ark., 2018). İlaç kombinasyonları, hastalığın heterojen yapısı ve ilaç direnci gibi sorunlarla başa çıkmada önemli bir potansiyele sahiptir. Bu nedenle, kullanılan kombinasyonların etkinliği ve aralarındaki farklılıkların ayrıntılı bir biçimde anlaşılabilmesi, kolon kanseri tedavisi sürecinde kritik bir rol oynamaktadır (Mohelnikova-Duchonova ve ark., 2014). Kolon kanserinin biyolojik özelliklerinin

daha iyi anlaşılması da hedefe yönelik geliştirilecek yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük öneme sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kanser hücrelerinin heterojen yapısının yalnızca genetik ve epigenetik farklılıklardan değil, “kanser kök hücreleri (KKH)” olarak adlandırılan özel bir hücre alt popülasyonundan oluştuğunu göstermektedir (Batlle ve Clevers, 2017). Kanser kök hücreleri, tümörde sınırlı hücre popülasyonunu temsil etmelerine rağmen, tümörün büyümesi, metastazı ve nüks etmesi sürecinde kritik öneme sahiptirler (Reddivari ve ark., 2016). Kolon kanserinde özellikle CD133 ve CD44 gibi yüzey belirteçlerine sahip olan kanser kök hücreleri, metastatik potansiyelleri ve tedaviye direnç özellikleri nedeniyle kanserin kötü prognozu ile doğrudan ilişkilendirilmiştir (Angius ve ark., 2021). Kanser hücrelerinin ve kanser kök hücrelerinin biyolojik özelliklerinin doğru anlaşılması kadar, bu hücrelerin davranışlarını doğru bir şekilde analiz edebilmek için uygun hücre kültür modellerinin kullanılması da büyük önem taşımaktadır. Kanser araştırmalarında yaygın bir şekilde kullanılan, hücrelerin tek katmanlı yüzeylerde büyütüldüğü iki boyutlu (2B) kültür sistemleri, kolay uygulanabilirliği ve ucuz olması dolayısıyla tercih edilmektedir (Breslin ve O’Driscoll, 2016). Ancak 2B kültür sistemleri, hücreler *in vivo* ortamdaki gibi kompleks üç boyutlu şekilde büyümediği için biyolojik süreçlerin yansıtılmasında sınırlı kalmaktadır. Bu durum, özellikle hücrelerin invazyon, migrasyon ve ilaç direnci gibi önemli özelliklerinin *in vivo* ortamı yansıtacak düzeyde incelenmesine engel oluşturmaktadır (Thoma ve ark., 2014). Özellikle kanser araştırmalarında, 2B kültürlerde çalışılan hücrelerin biyolojik tepkileri, salgıladığı moleküller ve eksprese ettiği genler değişiklik gösterebilmekte ve bu da *in vivo* mikro-çevreyi modellemede engel oluşturmaktadır. Yapılan çalışma ve amaca göre farklılık gösterse de üç boyutlu (3B) kültür sistemi 2B kültür sistemine göre *in vivo* sisteme daha yakın olabilmektedir (Amelian ve ark., 2017). Kanser hücrelerinin ve özellikle kanser kök hücrelerinin invazyon, migrasyon ve ilaç direnci gibi biyolojik özellikleri üç boyutlu (3B) kültür sistemleri ile daha doğru bir şekilde analiz edilebilmektedir (Negrei ve ark., 2016).

Günümüzde, ameliyat ve kemoterapi, KRK tedavisinde önemli bir rol oynasa da etkili çözüm sunmada yetersiz kalmaktadır. Kanser tedavisi için yeni ilaçların geliştirilmesi bu nedenle aciliyet arz etmektedir. Ama bu süreç zaman alıcı, maliyetli ve düşük onay

oranlarına sahiptir. Ayrıca, yeni kemoterapötiklerin çoğunun da yan etkilere yol açan toksisite ile ilgili sorunları bulunmaktadır (Ma ve ark., 2023). Söz konusu sorunların üstesinden gelmek üzere geliştirilen stratejilerden biri olan ilaç kombinasyonlarının kullanımı, iki veya daha fazla kemoterapötikten oluşan bir kokteylin hastaya uygulanmasından ibarettir. Bu metodoloji özellikle tümör içi (intertümöral) ve tümörler arası (intratümöral) heterojenliğin üstesinden gelmeye katkı sunmaktadır (Vasan ve ark., 2019). İntratümöral heterojenlik, aynı tümörün farklı hücreleri arasındaki farklı ilaç tepkisinden kaynaklanmaktadır ve hastalığın ilerlemesine, ilaç direncinin ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır. İntertümöral heterojenlik ise aynı kanser tipine sahip hastalar arasındaki heterojenliğe karşılık gelmektedir ve farklı hastaların aynı tedaviye yanıtını tahmin etmeyi zorlaştırmaktadır. Kombinasyon tedavileri bu sorunların üstesinden gelmeye yardımcı olmaktadır ve birçok çalışma, bunların gerçekten monoterapiden daha etkili olduğunu göstermiştir (Jaaks ve ark., 2022).

Bu tez çalışmasında, HT29 kolon kanseri hücreleri ve HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücreleri kullanılarak, kolon kanseri tedavisinde temel tedavi ajanı olan 5-Fu, oxaliplatin, irinotekan, folinik asit ve bu tedavi ajanlarının kombinasyonları FOLFOX ve FOLFIRI'nin etkileri 2B ve 3B kültür koşulları altında incelenmiştir. Kullanılan mevcut kemoterapi ilaçlarının ve bunların kombinasyonlarının etki mekanizmalarının ve kemoterapi direncine sebep olan faktörlerin aydınlatılması, hedefe yönelik geliştirilecek yeni tedavi stratejileri için büyük bir avantaj sağlamaktadır (Gu ve ark., 2019). Kanser kök hücrelerinin direnci ve metastatik potansiyeli göz önüne alındığında, klasik kemoterapi yaklaşımlarının sınırlılıklarını aşacak yeni kombinasyonların belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, geleneksel 2B ve 3B kültür sistemleri kullanılarak, hücrelerin metastatik özelliklerinin anlaşılması için invazyon, migrasyon kapasitelerinin incelenmesinin yanı sıra epitel-mezenkimel geçiş (EMT) ile ilişkili gen ekspresyonları da detaylı olarak analiz edilmiştir. Çalışma kapsamında, hücrelerin migrasyon ve invazyon yetenekleri, *in vitro* çizik testi ve transwell sistemi gibi deneysel yöntemlerle değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, kolon kanseri ve kolon kanseri kök hücrelerinin biyolojik özelliklerini anlamaya yönelik kapsamlı bir yaklaşım sunulmuştur. Çalışmanın sonuçları, kansere yönelik geliştirilecek hedefe yönelik tedavi stratejilerine katkı sağlamaktadır.

2 KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Kolorektal Kanser

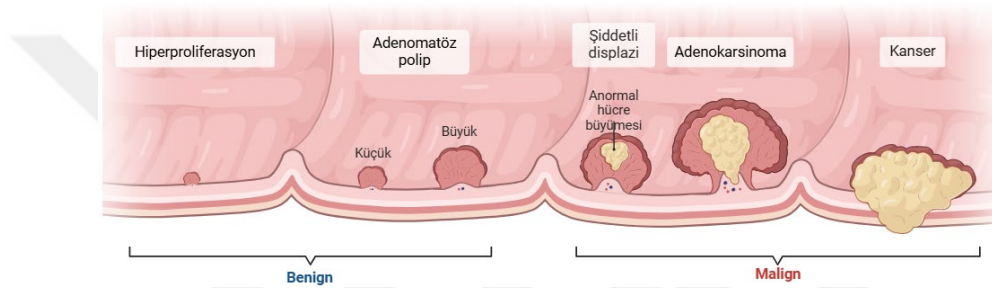
Kanser, çevresel ve genetik faktörlerin etkisiyle meydana gelen bir dizi nükleik asit hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalması olarak bilinen, mortalitesi yüksek, karmaşık bir hastalıktır (Pogribny, 2010). Kanser biyolojisinde sorulması gereken en önemli soru, kansere neden olan hücresel değişiklere neyin sebep olduğudur. Bu sorunun cevabının verilmesi, kullanılacak olan tedavi yönteminin geliştirilmesinde belirleyici faktördür. Kanserın oluşumu ve progresyonu üzerine yapılan çalışmalarda; kanserin, çeşitli faktörlerin etkisiyle hücre içerisinde biriken genetik hasar sonucu oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu durum, hücrelerin DNA onarım mekanizmalarının zayıflaması veya hücresel proliferasyonun düzenlenememesi gibi çeşitli sebeplerle ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşüm mekanizmasını belirleyebilmek, kanseri anlamak açısından oldukça önemlidir (Gmeiner, 2024).

Gastrointestinal sistemde kötü huylu (malign) tümörlerin en sık görünen bir türü olan kolorektal kanser, tüm kanser türlerinin yaklaşık %10-15'ini oluşturmaktadır. KRK hem morbidite hem de mortalite açısından her sene artan bir eğilim göstermektedir ve görülme sıklığı özellikle gelişmiş ülkelerde oldukça yüksektir (Bray ve ark., 2024). Bunun başlıca nedenleri arasında, hareketsiz yaşam tarzı ve dengesiz beslenme alışkanlıkları gösterilmektedir (Siegel ve ark., 2022). Yapılan çalışmalar sonucunda 2035 yılına gelindiğinde kolon kanserinden toplam ölüm sayısının %71,5 oranında artacağı tahmin edilmektedir. Bu artış, özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki yaşlanan nüfus, obezite, diyabet ve sigara kullanımı gibi risk faktörlerinin yaygınlığı ile ilişkilendirilmiştir (Douaiher ve ark., 2017).

Kolorektal kanser, kolon olarak adlandırılan kalın bağırsakta veya anüs ile bağırsak arasındaki son kısım olan rektumda epitel hücrelerinin tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen bir dizi mutasyonun birikmesi sonucu hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasıyla oluşmaktadır (Marbun ve ark., 2022). Kanserın evriminde birden fazla mekanizma yer almakla birlikte, kolorektal kanser oluşumunda özellikle *APC*

(Adenomatöz polipozis kolon), *KRAS* (Kirsten ras onkogen homologu) ve *TP53* (Tümör protein 55) gibi tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar önemli rol oynamaktadır. *APC* genindeki mutasyonlar, adenomların oluşumunda başlangıç adımı olarak tanımlanırken (Huang ve ark., 2018), *KRAS* mutasyonları ise bu süreci ilerleten değişimlerdir (Chiu ve ark., 2018). Ek olarak *TP53* gen mutasyonları, tümör hücrelerinin metastatik özellikler kazanmasında ve malign progresyonda önemli bir faktör olarak tanımlanmıştır (Dow ve ark., 2015; Nakayama ve Oshima, 2019).

Benign ve Malign Kolorektal Kanser



Şekil 2.1 Kolorektal kanser oluşumu (Biorender.com ile oluşturulmuştur)

Kolon kanserine karşı geliştirilen tedavi yaklaşımları, cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immün terapiler gibi çeşitli yöntemleri içermektedir. Ancak, bu tedaviler çoğunlukla ileri evre hastalarda istenilen başarıyı sağlayamamaktadır (Modest ve ark., 2019).

2.2 Kolorektal Kanser Kök Hücreleri

Kolorektal kanser, normal kolon epitelini bir adenoma ve daha sonra adenokarsinoma dönüştüren bir dizi genetik/sitolojik modifikasyon yoluyla gelişmektedir (Sawicki ve ark., 2021). Sayıları giderek artan çalışmalar, kolon kanserinin de içerisinde yer aldığı insan kanserlerinin bir kök hücre hastalığı olarak kabul edilebileceği, söz konusu modifikasyonların kanser kök hücrelerini (KKH) meydana getirdiği fikrini desteklemektedir. Kanser kök hücre modeline göre maligniteler, kendini yenileme ve pluripotensi gösteren, tümör büyümesini başlatma ve sürdürme yeteneğine sahip kanser hücrelerinin küçük bir kısmından kaynaklanmaktadır (Angius ve ark., 2021). KKH, ilk olarak hematolojik malignitelerde ve son zamanlarda kolon kanseri dahil olmak üzere birçok solid tümörde tanımlanmıştır. KKH'leri, CD44, CD133 ve ALDH gibi hücre yüzey belirteçleriyle ayırt edilebilmekte ve bu hücrelerin yoğun olduğu tümörler yüksek

metastatik özellik sergilemektedir (De Angelis ve ark., 2021). Erken tanı ve çeşitli etkili tedavi yöntemlerine rağmen kanser kök hücrelerinin ilaca direnç, metastaz ve nüksetmeye neden olan ana faktörler arasında yer aldığı bilinmektedir (Treviño ve ark., 2023). Ayrıca, bu hücreler epitel-mezenkimal geçiş (EMT) gibi süreçler aracılığıyla ilaç tedavisine karşı direnç geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Gonzalez-Villarreal ve ark., 2020). Bu zorluklara neden olduğu düşünülen KKH'leri hedef almak ve etkisiz hale getirmek kolay gibi görünse de birçok sinyal yolu üzerinden aktive edilebilmeleri ciddi bir handikap oluşturmaktadır. Bu nedenle her kanser türünde olduğu gibi kolon kanserinde de bu güçlü hücrelerin etkisiz hale getirilmesi ve kanser tedavisinde kalıcı başarının sağlanması amacıyla günümüzde birçok çalışma yapılmaktadır (Byus ve Biochemistry, 2023; Muduli ve ark., 2024).

2.3 Kolorektal Kanserlerin Üç Boyutlu Kültürlerde Modellenmesi

Kolon kanseri alanında çalışan araştırmacılar, metastatik yayılmayı ve kanser nüksünü yönlendiren olayları aydınlatmak için tamamlayıcı metodolojilerden yararlanmaktadırlar ki bunların başında *in vitro* yapılar gelmektedir. *In vivo* modeller, kanser araştırmalarında tartışılmaz avantajlar sunmasına rağmen türler arasındaki farklılıklar nedeniyle biyolojik mekanizmalarda önemli sınırlamalar göstermişlerdir. Ek olarak etik değerler göz önünde bulundurulduğunda tekrar sayısının kısıtlılığı da önemli bir dezavantajdır. Öte yandan kanserin basitleştirilmiş bir temsili olan *in vitro* modeller, *in vivo* çalışmaları tamamlamak için güçlü aracı sistemlerdir (Arrigoni ve ark., 2016).

İki boyutlu (2B) kültür sistemi, geleneksel olarak iyi bilinen ve pek çok araştırmacı tarafından kullanılan bir sistem olmakla birlikte *in vivo* ortamı iyi bir şekilde yansıtamamaktadır. 2B sistemlerde tutunduğu yüzeye bağlı olarak hücrenin tepkileri, salgılanan maddeler ve eksprese ettiği genler farklılık göstermektedir (Katt ve ark., 2016). Kolon kanserinde tedavi etkinliğini artırmaya yönelik yapılan klinik öncesi çalışmalar incelendiğinde, kanser kök hücre yaklaşımlarının yanı sıra son zamanlarda 3B tümör modelleme uygulamalarına sıklıkla rastlanmaktadır. 3B yaklaşım, laboratuvar ortamından kliniğe geçişe önemli katkılar sağlamakta ve tümör fizyolojisinin *in vivo* ya en yakın şekilde incelenmesine olanak sağlamaktadır (Imamura ve ark., 2015). *In vitro* kanser araştırmalarında geleneksel yöntem olarak kullanılan 2B monolayer

kültürlerde elde edilen sonuçlarla ilerleyen klinik öncesi testlerin, klinik aşamayı yüksek güvenilirlikle yönlendiremediği bilinmektedir (Reidy ve ark., 2021). Bu nedenle kolon kanserine yönelik çalışmalarda 3B modellere ilgi giderek artmaktadır. *In vitro* kanser modellerinin amacı genel olarak tümör fizyolojisinin daha iyi anlaşılması, ilaca direnç mekanizmalarının karakterizasyonu ve tedavi için etkili ilaçların seçimi için kolon karsinomunu taklit etmektir. Bu bağlamda pek çok farklı üç boyutlu model geliştirilmiş olup, bu modeller arasında en yaygın kullanılanlardan biri de çok hücreli tümör sferoidleridir (Galateanu ve ark., 2016). Bu küremsi yapılar genellikle zayıf veya yapışkan olmayan koşullar altında aynı tip hücrelerden oluşmaktadır (Okuyama ve ark., 2023).

2.4 Kolorektal Kanser Tedavisinde Hücresel, Moleküler ve Kemoterapötik Yaklaşımlar

Kanser tedavisinde karşılaşılan en büyük zorluklardan biri, kanser hücrelerinin metastaz yeteneğidir. Malign hücrenin hareketliliği literatürde sıklıkla metastatik sürecin bir parçası olarak tanımlanmaktadır. Metastaz, kanser hücrelerinin ortaya çıktıkları yerden farklı bir yerde çoğalması anlamına gelmektedir. İlgili süreç, mikro ortamdaki hücre dışı matrisin parçalanması ve çok çeşitli moleküler mekanizmaların aktivitesi yoluyla birincil tümör hücresinin farklı dokulara yayılmasını içermektedir. Bu kadar geniş bir sistematik süreci kapsayan metastaz, tedaviyi zorlaştırmakta, hatta bazen imkansız hale getirmektedir (Qin ve ark., 2024). Bu nedenle, metastatik süreçlerin ve ilişkili hücresel değişikliklerin anlaşılması, kolorektal kanser tedavisinde etkili stratejiler geliştirmek için oldukça kritiktir. Metastazın anlaşılmasında önemli bir süreç olan EMT, kanser sürecinin yönetiminde oldukça büyük önem arz etmektedir. Epitelyum bir yapıdan hareketli mezenkimal bir yapıya geçiş, kanser progresyonunda olmazsa olmazlar arasında kabul edilmektedir (Fedele ve ark., 2022). Epitel hücreler, polarize tabakalar halinde bulunan, sıkı bağlantılar tarafından oluşturulan hücre yüzey bariyerleri olarak tanımlanmaktadırlar. Bu hücre-hücre sıkı bağlantılarının çözülmesi ve polaritenin kaybı sonucunda istilacı özelliklere sahip mezenkimal hücreler haline gelebilmektedir (Singh ve Settleman, 2010). Bu değişiklikler, hücrelerin mikro-çevredeki doku bariyerlerini aşarak uzak bölgelere yayılmasını kolaylaştırmakta ve böylece kanserin agresif

özellikler kazanmasını sağlamaktadır (Diepenbruck ve Christofori, 2016). Yapılan çalışmalarda, EMT mekanizması indüklenen hücrelerin kök hücre benzeri özellikler gösterdiği, invaziv ve metastatik nitelik kazandığı, tümör oluşturma ve proliferasyon potansiyelinin arttığı belirtilmiştir. Mezenkimal forma dönüşen hücrelerin kemoterapi ve radyoterapi gibi konvansiyonel kanser tedavi yöntemlerine ve apoptozise karşı direnç geliştirdiği bilinmektedir (Mani ve ark., 2008).

Kolon kanserinin erken evrelerindeki hastalar için cerrahi birincil tedavi seçeneği iken, ileri evrelerdeki hastalarda ameliyat öncesi ve sonrası radyoterapi ve kemoterapi, tedavi sürecine eklenmektedir. FOLFOX (folinik asit (FA), 5-Fluorourasil (5-FU), oxaliplatin (OX)) ve FOLFIRI (folinik asit, 5-Fluorourasil, irinotekan (IRI)) kolorektal kanserin tedavisinde en çok tercih edilen kombinasyonel kemoterapi seçenekleri olarak bilinmektedir (Matos ve ark., 2019). Kullanılan mevcut kemoterapi ilaçlarının ve bunların kombinasyonlarının etki mekanizmalarının ve kemoterapi direncine sebep olan faktörlerin aydınlatılması seçilecek tedavi yöntemi için büyük bir avantaj sağlamaktadır (Gu ve ark., 2019). Kansere yönelik tedavi etkinliklerinin son yıllarda önemli derecede artmasına rağmen hastalığın ilerlemesiyle birlikte konvansiyonel tedavilerde (kemoterapi, radyoterapi, cerrahi rezeksiyon, v.b.) hasta ile uyumunun zayıf olması, kötü doku seçiciliği, ciddi toksisite ve ilaç direnci gibi büyük sınırlamalar aşılabilmiş değildir. Bu nedenle tek bir tip stratejiye dayanan konvansiyonel yöntemler yetersiz kalmaktadır. Terapötik etkiyi artırmak ve yan etkileri en aza indirmek için çeşitli kemoterapötiklerin birlikte kullanıldığı kombinasyon terapisi, umut verici bir strateji olarak kabul edilmektedir (Biller ve Schrag, 2021).

Günümüzde, kolon kanseri tedavisi için sıkça tercih edilen FOLFOX ve FOLFIRI gibi protokoller, kanser hücrelerinin farklı mekanizmalarını hedef alarak büyüme ve çoğalma süreçlerini durdurmayı amaçlar. Bu ilaç kombinasyonları, içerdikleri bileşenlerin etkileşimiyle kanser hücrelerini hedef almakta ve bu hücrelerin direnç geliştirmesini engellemeye yardımcı olmaktadır (Ashique ve ark., 2024). 5-Fluorouracil/folinik asit ile oxaliplatin veya irinotekanın birlikte kullanımı, kolorektal karsinom hastaları için en etkili kemoterapi stratejisi haline gelmiştir (Amniouel ve Jafri, 2023). 5-FU, kolorektal kanser dahil çeşitli kanser türlerinin birinci basamak

tedavisinde kullanılmaktadır. 1950'lerden bugüne, kolorektal kanser tedavisinde 5-FU kullanımı, temel kemoterapi tedavisini oluşturmuştur. Ancak, yüksek toksisite, düşük seçicilik, zayıf emilim, kısa biyolojik yarı ömür ve kolon kanseri hücrelerinde direnç gelişimi gibi sınırlamaları vardır (Machover ve ark., 2024). Bu sebepten dolayı, kolorektal kanser tedavisinde genellikle 5-FU'nun tek başına kullanılması yerine, diğer ilaçlarla kombine halde kullanımı tercih edilmektedir (Gustavsson ve ark., 2015).

Kolon kanseri hücrelerine karşı en yaygın kullanılan FOLFOX, folinik asit (lökovorin), 5-Fu ve oxaliplatin kombinasyonunu içeren bir tedavi protokolüdür. Bu kombinasyon, hücresel düzeyde birbirini tamamlayan mekanizmalarla etki göstermektedir. Platin bazlı bir bileşik olan oxaliplatin, DNA'ya çapraz bağlanarak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu inhibe eder. Bunun sonucunda hücresel apoptoz tetiklenmiş olur (Martinez-Balibrea ve ark., 2015). Primidin analogu olarak 5-FU, hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında kritik roller oynayan nükleik asit metabolizmasına müdahale ederek kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir (Sethy ve Kundu, 2021). 5-FU özellikle hızlı bölünen kanser hücrelerini hedeflemeye oldukça etkilidir. Folinik asit ise 5-FU'nun etkinliğini artırarak, tedavinin sitotoksik etkilerini optimize etmektedir (Mini ve ark., 1990; Vodenkova ve ark., 2020). Yapılan çalışmalar, FOLFOX protokolünün, özellikle metastatik kolorektal kanser hastalarında sağkalımı artırdığını ve hastalık progresyonunu yavaşlattığını göstermiştir (Amniouel ve Jafri, 2023; Azwar ve ark., 2021; Liu ve ark., 2022). Kolon kanserinde ikinci en yaygın tercih edilen tedavi stratejisi ise, FOLFIRI olarak adlandırılan kemoterapötik tedavi protokolüdür (Dai ve ark., 2019). Irinotekan, DNA replikasyonu sırasında DNA sarmalının açılmasında kritik bir rol oynayan topoizomeraza I α inhibe eden bir ilaçtır ve DNA kırılmaları ile birlikte hücre ölümüne neden olmaktadır (Chai ve ark., 2024; Cortés ve ark., 1993). Bu üç ilacın bir araya gelmesi sinerjik bir etki yaratır ve kanser hücrelerinin birden fazla mekanizma ile hedef alınmasını sağlamaktadır. Böylece tedavinin etkinliği artmakta ve hastaların yaşam süresi uzamaktadır (Budithi ve ark., 2021). FOLFOX ve FOLFIRI ilaç kombinasyonları, kolon kanseri tedavisinde etkinliği kanıtlanmış, bilimsel temellere dayanan tedavi stratejileri olarak kabul edilmektedir (Bekaii-Saab ve Wu, 2014). Her iki tedavi protokolü de tümör büyümesini engelleyen ve hücre ölümünü tetikleyen mekanizmaları hedef almaktadır. Bu tedavi kombinasyonları hücre düzeyinde farklı

hedeflere yönelik etkileri sayesinde ilaç direncini minimize etmeyi amaçlamaktadır (Vera ve ark., 2015).



3 MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1 Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Çalışmada kullanılan cihaz/alet Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan cihaz ve aletler

Cihaz/Alet Adı	Firma-Model
-80 Dondurucu	Hettich
Otoklav	HMC-Hirayama
Çalkalayıcı İnkübatör	Biosan-ES20
Buzdolabı	Vestel-GTP 455A
CO ₂ ’li inkübatör	Esco
Laminar akışlı steril kabin	Esco Airstream
Sirkülatörlü su banyosu	Nüve
Soğutmalı santrifüj cihazı	Nüve
Ters-faz mikroskop	Olympus CKX41
UV/VIS Spektrofotometresi	Denovix DS-11 FX+
Hassas Terazı	Radwag
Otomatik pipetler	Ependorf
Pipet tabancası	Greiner
Spin vortex	Biosan-Combi Spin FVL 2400N
Mikroplaka Elisa Okuyucu	Tecan
Buz makinası	Vision
Gerçek Zamanlı PCR Cihazı	Bio-Rad
Otomatik Mikropipet	Ependorf
Mikro santrifüj	Hettich
PCR cihazı	Bio-Rad
Nanodrop	DeNovix

3.1.2 Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler **Çizelge 3.2**'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kimyasal / Sarf Adı	Marka-Firma
DMSO	Sigma-Aldrich
EMEM	Gibco
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, ABD
RPMI 1640	Biochrom, Germany
MTT	Sigma-Aldrich, ABD
DPBS	Sigma Aldrich, ABD
5 Fluorourasil (5-FU)	Sigma Aldrich, ABD
İrinotekan	LC Laboratories, Woburn, MA, ABD
Lökovorin (Folinik asit)	Sigma Aldrich
Oxaliptatin	LC Laboratories, Woburn, MA, ABD
Tripan blue boyası	Sigma-Aldrich, ABD
Tripsin-EDTA çözeltisi	Sigma-Aldrich, ABD
Kloroform	Merck
Etanol	Merck
Metanol	Merck
Revers Transkriptaz	Takara
TRIzol	İnvitrogen, ABD
Oligo-dt	Macrogen
PFu	Laboratuvarımızda Üretildi
Evagreen	Biotium
dNTPs	Macrogen
L-Glutamin	Gibco
Gentamisin	Sigma Aldrich, ABD
Matrigel	Corning, ABD
%4'lük Paraformaldehit	USB, ABD
Hücre kültürü flaskları (25 ve 75 cm ²)	Greiner

Kriyotüp (Hücre dondurma ampülü)	Greiner
Mikrosantrifüj tüpleri	Isolab
0,2 ml'lik PCR tüpleri	Isılab
15 ve 50 ml'lik Eppendorf tüpleri	Isolab
96 kuyucuklu mikrolakalar	Corning
Manyetik izolasyon kiti	MACS- Miltenyi Biotec
3D Petri Dish®	Sigma Aldrich, ABD

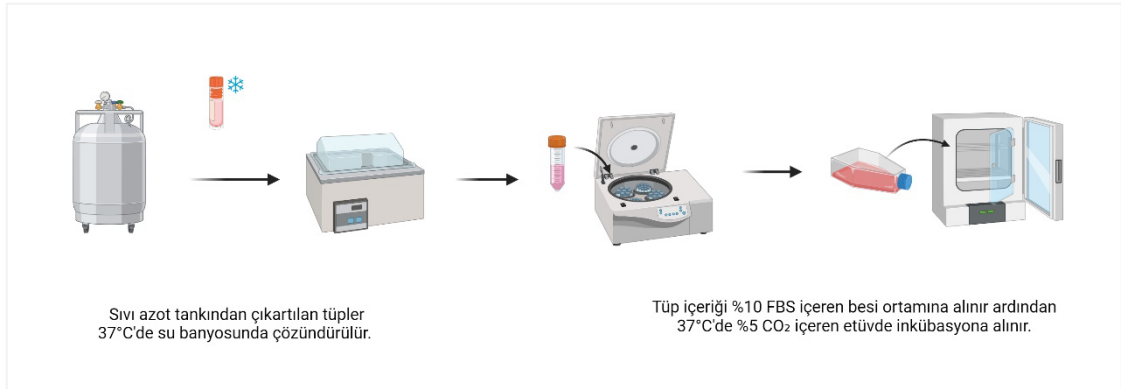
3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre Hatlarının Kültüre Edilmesi, Stoklanması

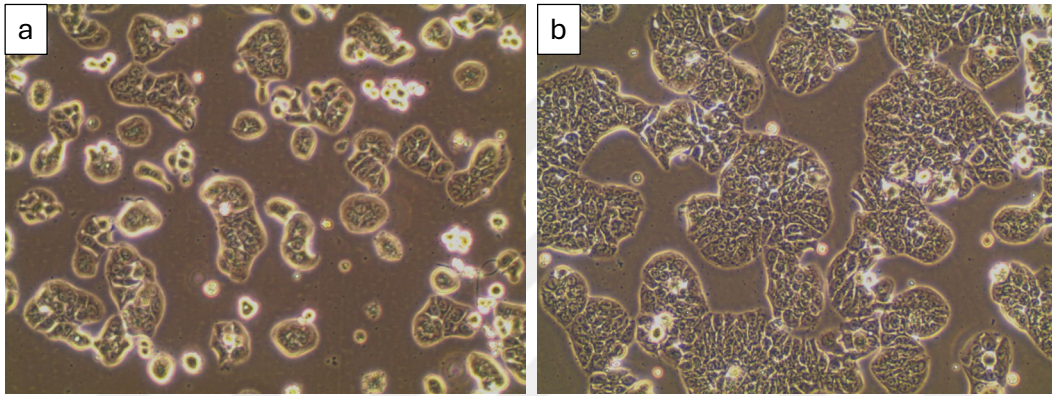
Bu tez çalışmasında kullanılan kolon kanseri hücre hattı HT29 ve sağlıklı kolon hücre hattı CCD-18Co, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Hayvan Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarı'nın stoklarından alınmıştır. Hücrelerin kültürlenmesi ve stoklanması aşağıdaki adımlar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin Çözdürülmesi ve Kültüre Edilmesi

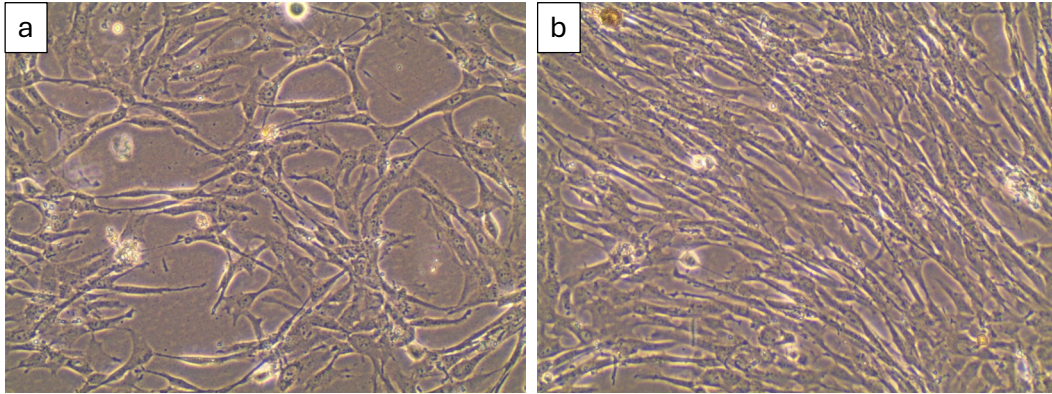
Sıvı azotta (-196°C) kriyoprezervasyon yöntemiyle muhafaza edilen hücreler, 37°C sıcaklıktaki su banyosuna alınarak hızlı bir şekilde çözdürülmüştür. Çözünen hücrelerin bulunduğu kryotüp %70 etanol ile steril edildikten sonra işlem yapmak üzere biyogüvenlik kabini içerisine alınmıştır. Hücreler, %10 inaktif fetal sıgır serumu (F0926, Sigma-Aldrich, ABD), %1 L-glutamin (25030024, Gibco, ABD) ve %0,1 Gentamisin (G1337, Sigma Aldrich) içeren besi ortamında (HT29 için RPMI (F1215, Biochrom, Germany), CCD-18Co için EMEM (12492013, Gibco), kültüre alınmışlardır. Hücre morfolojileri ters-faz ışık mikroskobu ile düzenli olarak gözlemlenmiş, besi ortamı her iki günde bir yenilenmiştir. Hücreler %80-90 konfluens düzeyine ulaştığında pasajlama işlemi yapılmıştır.



Şekil 3.1 Hücrelerin çözündürülmesi ve kültüre alınması (Biorender.com ile oluşturulmuştur)



Şekil 3.2 Kanser hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (a:24h, b:48h, 10X büyütme)

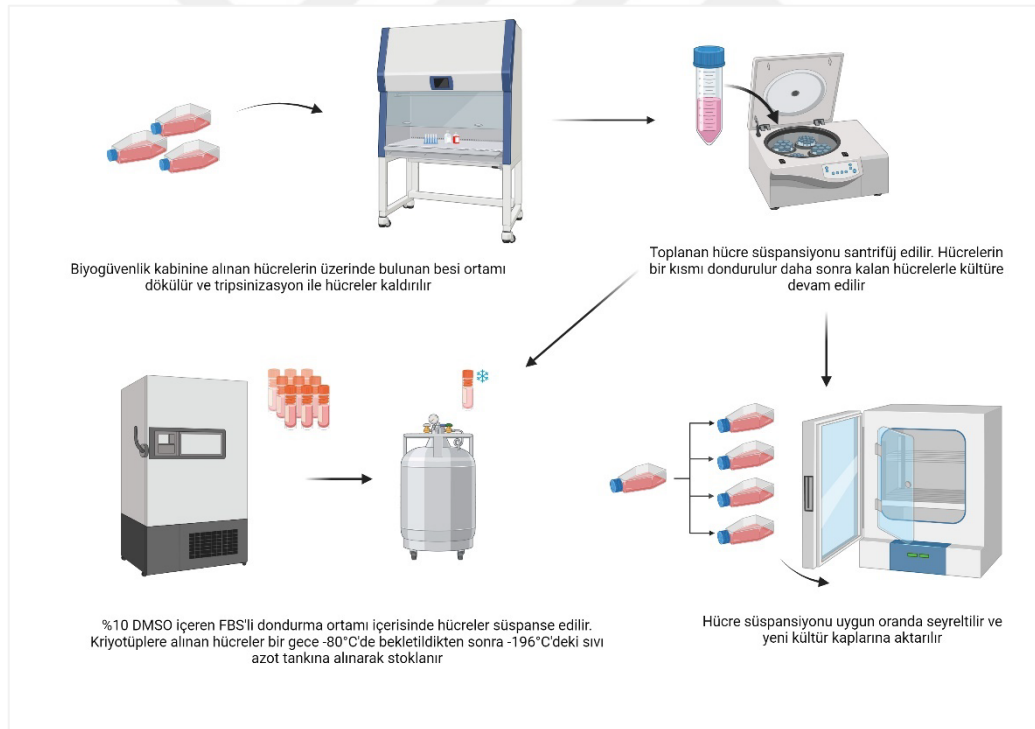


Şekil 3.3 Sağlıklı hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (a: 24h, b: 48h, 10X büyütme)

Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması/Stoklanması

%80-90 oranında konfluensi gösteren hücrelerden eski besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler 37°C'de ısıtılmış Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen steril DPBS (Dulbecco's Modified Phosphate-Buffered Saline, D8537 Sigma Aldrich, ABD) ile yıkanmıştır.

Ardından, 37°C’de ısıtılmış tripsin-EDTA (T4949, Sigma Aldrich) çözeltisi hücrelerin yüzeyden ayrılması için eklenmiş ve 2-3 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin ayrışmasını takiben, serum içeren besi ortamı eklenerek süspansiyon homojenize edilmiş ve santrifüj tüpüne alınmıştır. Hücreler, 800 rpm hızında, 4°C’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pellet taze besi ortamı ile resüspanse edilmiştir. Pasaj işlemi için, hücre süspansiyonu uygun şekilde seyreltilerek yeni kültür kaplarına aktarılmış ve 37°C’de, %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin stoklanması amacıyla, tripsin ile ayrıştırılan hücreler santrifüj edilmiş ve pellete dondurma ortamı (%90 FBS, %10 DMSO) eklenmiştir. Kriyotüplere 1 ml’lik hacimlerle paylaştırılan hücreler, -86°C’de köpük kutu içerisinde gece boyunca ön dondurulmuş, ardından sıvı azot tankında (-196°C) uzun süreli saklama koşulları için depolanmıştır.



Şekil 3.4 Hücrelerin pasajlanması ve dondurulması/stoklanması (Biorender.com ile oluşturulmuştur)

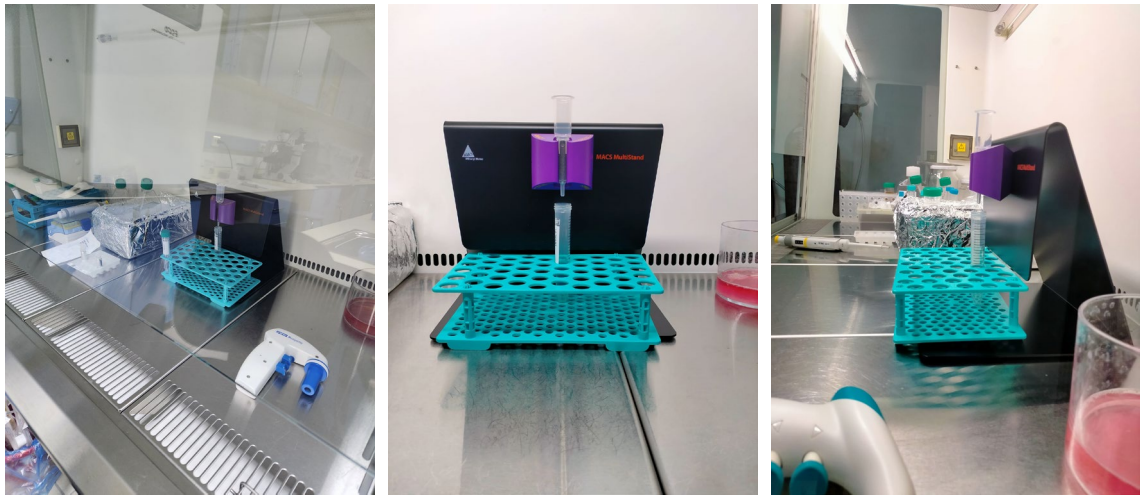
3.2.2 Kanser Hücre Hatlarından Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültivasyonu

Tez çalışması kapsamında HT29 hücrelerinden kanser kök hücresi izolasyon çalışması yapılmıştır. İzolasyon çalışması Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,

Farmasötik Biyoteknoloji Bölümü, Hayvan Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarı'ndan tedarik edilen manyetik izolasyon kiti (MACS- Miltenyi Biotec) aracılığıyla, üretici firmanın uygulama protokolüne göre kanser kök hücresi ayrımı gerçekleştirilmiştir. Bu ayırım sırasında kit içerisinde bulunan CD133 ve CD44 yüklü manyetik nanopartiküllerden faydalanılmıştır. Kanser kök hücre izolasyonu sırasında çekilen fotoğraflar Şekil 3.5 ve 3.6'da görülmektedir.



Şekil 3.5 MACS seperasyon ünitesi (a- Midi MACS, b- Mini MACS)



Şekil 3.6 MACS seperasyon ünitesi ile kanser kök hücresi ayrımı

MACS tekniği 1990 yıllarında Miltenyi ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Kısaca bu teknik hedef yüzey proteinine bağlanmak üzere işaretlenmiş manyetik mikro partikülleri kullanarak manyetik alan varlığında istenilen hücrelerin ayrılmasını sağlar. Kullanılan

manyetik mikro partiküllerin büyüklüğü yaklaşık 100 nm olup hücrelerde herhangi bir toksik etki oluşturmadıkları vurgulanmıştır (Miltenyi ve ark., 1990).

Kanser hücrelerinden MACS tekniği kullanarak kanser kök hücrelerinin izolasyonu için aşağıda verilen adımlar izlenmiştir.

MACS Tampon Hazırlanma Protokolü

Üretici firmadan temin edilen tampon çözelti izolasyon aşamasından önce firmanın belirtmiş olduğu talimatlara göre hazırlanmıştır. Tampon, deney boyunca tüm manyetik işaretlemelemlerde, yıkamalarda ve ayırma işlemlerinde kullanılmıştır. 1450 ml hacimdeki yıkama solüsyonu içerisine 75 ml BSA (sığır serum albümin) solüsyonu eklenmiştir. BSA'dan dolayı herhangi bir köpürme olmaması için bu işlemin yavaş bir şekilde yapılması gerekmektedir. Finalde %0,5 BSA içeren tampon çözelti hazırlanmıştır.

Manyetik Ayırma Protokolü

1. Hücreler yeterli sayıda çoğaldıktan sonra tripsinizasyon ile kaldırılıp süspanse hale getirilmiştir ve hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayısına göre çalışılacak kolon belirlenmiştir.
2. İstenen hücre miktarı tampon ile süspanse edilerek 10 dakika 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir.
3. Üretici firmanın önermiş olduğu protokole göre 2×10^7 hücreye kadar MS kolonu ile (miniMACS separatör) ayırım yapılabilir. Bu sayının üzerinde ise LS kolonu (midiMACS separatör) ile ayırım yapılması önerilmiştir.
4. Santrifüj sonunda süpernatant dökülmüştür ve üretici firma 10^7 hücreye kadar 60 µl tampon eklenerek homojenize edilmesini, hücre sayısı 10^7 'i geçtiğinde kullanılacak tampon ve diğer solüsyonların miktarının doğru orantılı olarak artırılmasını önermiştir.
5. Ayırım yapılacak kök hücrelerin yüzey belirteçlerine uygun manyetik işaretleyici solüsyonlar eklenerek hücre süspansiyonu homojenize edilmiştir.
6. 15 dakika çalkalamalı inkübatörde 4° C'de inkübasyona bırakılmıştır.

7. İnkübasyon sonunda alınan hücre süspansiyonuna 1-2 ml tampon eklenerek 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkama yapılmıştır.
8. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmıştır ve 500 µl (10^7 hücre sayısı için) tampon eklenerek hücre süspansiyonu homojenize hale getirilmiştir.
9. Hücre süspansiyonu kolona köpük oluşturmamaya dikkat edilerek boşaltılmıştır.
10. Damlama bitene kadar beklendikten sonra, kolona tutunmayan hücrelerin uzaklaştırılması için kolon tipine göre tampon eklenmiştir (MS kolon için 3x500 µl, LS kolon için 3x3 ml). Böylece manyetik işaretleyici antikorlar ile işaretlenmeyen hücreler kolonun altındaki tüpte toplanmıştır.
11. Son aşamada kolon separatörden ayrılmıştır ve kolonun tipine uygun tampon miktarı eklenerek yeni bir santrifüj tüpü içerisine steril piston yardımıyla manyetik işaretli hücreler aktarılmıştır.
12. Hücre sayımı yapılarak izolasyon işlemi tamamlanan kanser kök hücreleri uygun besi ortamları içerisinde yukarıda bahsedilen yöntemlerle kültüre alınarak çoğaltılmıştır ve stoklanmıştır.

Kolon Hazırlanma Protokolü

- MiniMACS ya da MidiMACS seçimine göre separatör standa yerleştirilmiştir.
- Uygun kolon tipi kolonun üzerindeki çıkıntılar dışı bakacak şekilde separatörün içine doğru itirilmiştir.
- Yerleştirilen kolonun altına uygun boyutta santrifüj tüpü (15ml) sabit bir şekilde yerleştirilmiştir.
- Kolonun çeperlerinden yavaşça köpük oluşturmayacak şekilde tampon çözelti geçirilmiştir. (MS kolon için 500 µl, LS kolon için 3 ml olmalıdır).
- Tamponun kolondan tamamen akması beklenerek kolonu yıkama işlemi tamamlanmıştır. Kolon yıkandıktan sonra kolon altındaki santrifüj tüpü değiştirilmiştir.
- Kolonun yıkama işleminin hemen ardından kolon kurumadan hücre süspansiyonunun kolondan geçirilmesine dikkat edilmiştir.

Protokolde yapılan değişiklikler manyetik işaretleyci nanopartiküllerin tipine göre (CD133⁺ ve CD44⁺) ve kullanılan hücre miktarına göre düzenlenmiştir. Hücre sayısı 2x10⁷'nin altında olduğunda MiniMACS separatörü, 2x10⁷'i geçtiğinde MidiMACS separatörü kullanılmıştır. Ayrıca separatör değişiminin yanı sıra yukarıda da belirtildiği gibi kullanılacak olan tampon, micro-bead ve FcR bloklama solüsyonlarının miktarı da doğru orantılı olarak artırılmıştır.

Bu tez çalışmasında CD133⁺/44⁺ yüzey belirteçlerinin ikisini birden içeren kültürlerin oluşturulması amaçlanmıştır. Bunun için ilk olarak CD44⁺'ya göre daha genel belirteç olan CD133⁺ kök hücreleri izole edilmiştir. Daha sonra elde edilen hücrelerin sayısı belirlemek için hücre sayımı yapılmış ve hücre sayısına göre CD44⁺ izolasyon aşamasına geçilmiştir. Bu yöntemle HT29 CD133⁺/44⁺ kanser kök hücresi bakımından zengin olduğu düşünölen hücreler kültür kabına alınarak çoğaltılmıştır.

Üretici firmanın önermiş olduğu protokole göre yukarıda verilen MACS ile ayırım yöntemi, tez çalışması kapsamındaki kök hücre izolasyonu gerektiren tüm çalışmalarda kullanılmıştır. Bu yöntemle izole edilen hücrelerin kök hücre karakterizasyonunu belirlemek için kantitatif Real-Time PCR yöntemi kullanılmıştır.

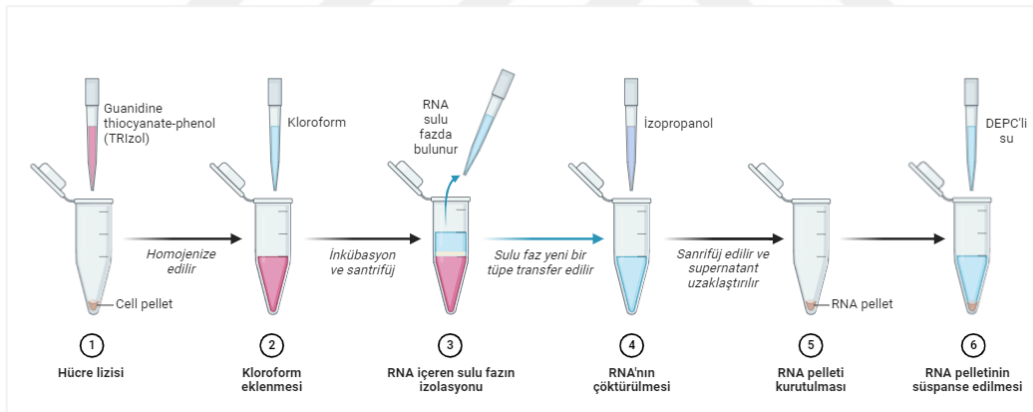
3.2.3 MACS Tekniği ile Elde Edilen CD44⁺ ve CD133⁺ Hücreslerin Karakterizasyonu

MACS yöntemi ile HT29 kolon kanser hücrelerinden izole edilen CD133⁺/44⁺ hücrelerinde KKH belirtci olan *CD133 (Prominin-1)*, *CD44 (Hücre yüzeyi adezyon molekülü)* proteinleri ve köklük genleri olarak tanımlanan *OCT3/4 (Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 3/4)*, *Sox2 (SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2)*, *Nestin (Sinir hücreleri ara filament proteini)* ve *Nanog (NANOG Homeobox)* proteinlerinin ifadelerinin belirlenmesi amacıyla kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizi yapılmıştır. Bu analiz için aşağıda verilen deney basamakları uygulanmıştır.

Kanser Kök Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu

HT29 CD133⁺/44⁺ hücre hatları çoğaltıldıktan sonra, 25 cm²'lik kültür kaplarında kültüre alınmıştır. Hücreler yeterli sayıya ulaştığında tripsinizasyon işlemi ile hücreler flasklardan kaldırılarak 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınmıştır. 800 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti 1 ml besi ortamı ile toplanarak 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. RNA izolasyonu aşamasına geçmeden önce besi ortamını uzaklaştırmak için hücreler 4 °C'de 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra, TRIzol (Invitrogen, ABD) ile RNA izolasyon protokolü uygulanmıştır. Santrifüj sonunda hücre peleti üzerindeki besi ortamı dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Hücre sayısına göre 10⁶ hücre için 1 ml TRIzol eklenerek 15 saniye güçlü vorteks yapılmıştır. Bu sayede hücrelerin homojen bir hale gelmesi sağlanmıştır ve tüpler oda sıcaklığında TRIzol ile 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinden sonra tüplere 200 µl kloroform eklenmiştir ve 15 saniye boyunca vorteks yapılmıştır. Bu aşamadan sonra oda sıcaklığında 3 dakika tekrar inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda 12.000 g'de 4 °C'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucunda 3 faz oluştuğu gözlenmiştir: (1. faz (sulu faz): RNA içeren renksiz faz, 2. faz: DNA içeren beyaz faz, 3. faz (organik faz): protein içeren pembe faz). RNA izolasyonu için en üstteki renksiz faz yeni bir tüpe aktarılmıştır. Yeni tüpe 500 µl izopropanol eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe

edilmiştir (İzopropanol, RNA'yı DNA ve diğer safsızlıklardan arındırmak amacıyla kullanılmıştır). İnkübasyon sonunda tüpler 12.000 g'de, 4 °C'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet, %75'lik 1 ml etanol eklenerek 7.500 g'de, 4 °C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda, süpernatant pipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve alkol tamamen buharlaşana dek tüpler kapak açık şekilde oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Kalan pellet, 20-50 µl RNaz-free su ile süspanse hale getirilmiştir. Total RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu, Denovix DS-11 nanodrop cihazı kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbans ölçümü ile belirlenmiştir. İdeal saflıktaki kaliteli RNA'nın A_{260}/A_{280} absorbans oranının 1,8-2,0 aralığında olması beklenmiştir. Genel olarak, reaksiyon başına 5 ng total RNA'nın ortalama düzeyde ifade edilen mRNA tespitinde yeterli olacağı kabul edilmiştir. Bu doğrultuda, gen ifadesi için kullanılan materyale göre RNA miktarı reaksiyon başına 5 ng ile 5 µg arasında alınmıştır. Bu aşamada elde edilen RNA örneklerinin bozulmaması için örnekler derin dondurucuda (-80°C) saklanmıştır (Hummon ve ark., 2007).



Total RNA'dan Ters Transkripsiyon ile Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi

Tez çalışmasında cDNA sentezi için “RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, ABD)” kullanılmıştır. Her bir örnekten izole edilen total RNA’dan tek zincirli cDNA, aşağıda verilen protokol doğrultusunda elde edilmiştir. **Çizelge 3.3**’te verilen tüm PCR bileşenleri, steril nükleaz içermeyen PCR tüpüne konulmuştur ve reaksiyon, 42 °C’de 60 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1.3 cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri

Total RNA	0.1 ng – 5 µg
Primer (Oligo(dT)₁₈)	0.5 µg (100 pmol)
DEPC’li su	12.5 µl
5x Reaksiyon Buffer	4 µl
dNTPmix (10 mM)	2 µl (1 mM)
Revers Transcriptase	1 µl
Toplam Hacim 20 µl	

Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time-PCR, qRT-PCR)

PCR işlemleri, Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir (Wojciechowska-Durczyńska ve ark., 2010). Bu çalışmada, qRT-PCR analizlerinde çift iplikli DNA’ya bağlanarak ışıma yapan EvaGreen boyası kullanılmıştır. EvaGreen, PCR için daha az inhibe edici ve SYBR Green ile kıyaslandığında daha az toksik olan, çift sarmallı DNA bağlayıcı bir boyadır. Serbest halde sulu çözelti içerisinde zayıf bir floresan olan bu boya çift sarmallı DNA ile bağlandığında oldukça floresan hale gelmektedir. Ek olarak bu çalışmada, miktar tayini için göreceli kantifikasyon (relative quantification) yapılmıştır. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, gen ekspresyon seviyesini ölçmek için göreceli bir miktar tayini olarak kullanılır. Primer olarak **Çizelge 3.4**’te verilen köklük genleri (*Nestin*, *OKT3/4*, *SOX2*, *NANOG*), kök hücre izolasyonunda kullanılan yüzey markör (*CD133*, *CD44*) genleri ve referans (housekeeping) gen olarak Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (*GAPDH*) kullanılmıştır.

GAPDH, glikolizin altıncı aşamasını katalize eden ve böylece hücrenin enerji sağlaması için glikozu parçalamaya yarayan bir enzimdir (Tayhan ve ark., 2022).

Çizelge 3.4 Kök hücre karakterizasyonu için qRT-PCR'da kullanılan primer dizileri

GAPDH sens	GAPDH revers
5'-GGATTTGGTCGTATTGGG-3'	5'-GGAAGATGGTGATGGGATT-3'
CD133 sens	CD133 revers
5'-GCATTGGCATCTTCTATGGTT-3'	5'-CGCCTTGTCCCTGGTAGTGT-3'
Nestin sens	Nestin revers
5'-ATCGCTCAGGTCCTGGAA-3'	5'-AAGCTGAGGGAAGTCTTGGA-3'
OKT3/OKT4 sens	OKT3/OKT4 revers
5'-CCTGAAGCAGAAGAGGATCA-3'	5'-CCGCAGCTTACACATGTTCT-3'
CD44 sens	CD44 revers
5'-CTGCAGGTATGGGTTCATAG-3'	5'-ATATGTGTCATACTGGGAGGTG-3'
SOX2 sens	SOX2 revers
5'-TACAGCATGTCCTACTCGCAG-3'	5'-GAGGAAGAGGTAACCACAGGG-3'
NANOG sens	NANOG revers
5'-AATAACCTTGCTGCCGTCT-3'	5'-AGCCTCCCAATCCCAAACAAT-3'

Çizelge 3.5 qRT-PCR bileşenleri

Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
dNTP mix	0.2 µl
PFu	0.5 µl
10X Buffer	1 µl
20X EvaGreen	0.5 µl
cDNA	1.2 µl
Su	4.6 µl
Toplam Hacim 10 µl	

PCR reaksiyonu için **Çizelge 3.5**'te belirtilen bileşenler Real-Time PCR cihazında kullanılan özel şeffaf düz kapaklı PCR tüpleri içerisinde kabarcık olmamasına dikkat edilerek karıştırılmış ve cihaza yerleştirilmiştir. Başlangıç denatürasyonu 94°C'de 3 dakika ve bunu takiben toplam 40 döngü; 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 56 °C'de

30 saniye bağlanma ve 72 °C’de 1 dakika zincir uzaması gerçekleşecek şekilde PCR programı Bio-Rad CFX96 cihazında oluşturulmuştur. Uzama DNA polimeraz enziminin en yüksek aktiviteye sahip olduğu 72 °C’de gerçekleşmektedir. Pfu enzimi 1 dakikada 600 baz ekleme kapasitesine sahiptir. Erime eğrisi analizi için 40. döngünün sonuna melting curve analizi eklenmiş ve PCR ürünlerinin varlığı ve saflık kontrolleri erime eğrisi analizleriyle yapılmıştır.

mRNA Ekspresyon Düzeylerinin 2^{-ΔΔCT} Analiz Yöntemine Göre Hesaplanması

Real-time PCR ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin kantifikasyonu için “Komperatif (karşılaştırmalı) ΔΔCT” yöntemi kullanılmıştır. ΔΔCT değeri; PCR ürünlerinin miktarındaki önemli artışın olduğu ilk döngüyü ifade etmektedir. Kalibratör olarak referans genden ve karşılaştırma yapabilmek için kontrol grubundan yararlanılmıştır. Hedef genin bir kontrol gene (*GAPDH*) göre relatif (göreceli) ekspresyonuna bakılmıştır. Bu yöntem düşük yoğunlukta sentezlenen genlerin ekspresyon çalışmaları için çok uygun bir yöntemdir. Hesaplama yaparken aşağıdaki denklemler kullanılmıştır:

$$\text{Kontrol } \Delta C_T = \text{Kontrol } C_{T(\text{gen})} - \text{Kontrol } C_{T(\text{GAPDH})}$$

$$\text{Örnek } \Delta C_T = \text{Örnek } C_{T(\text{gen})} - \text{Örnek } C_{T(\text{GAPDH})}$$

$$\Delta \Delta C_T = [(\text{Örnek } \Delta C_T)_{\text{ORTALAMA.}} - (\text{Kontrol } \Delta C_T)_{\text{ORTALAMA.}}]$$

$$\text{Hedef gen mRNA miktarı} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

PCR eksponansiyel bir süreç olduğundan değişim 2’nin üstel fonksiyonu şeklinde ifade edilmektedir. Kontrol için elde edilen ΔΔCT değerleri yaklaşık olarak “0” olduğu 2^{-ΔΔCT} için değerleri “1” dir. Elde ettiğimiz sonuç ilgilendiğimiz hedef genin örnek grubundaki ekspresyonunun kontrole göre relatif miktarıdır. Bir orantı ifadesi olduğundan birim içermez. Kontrole göre örnekteki hedef genin ekspresyonunun kaç kat arttığını veya azaldığını göstermektedir (Reddy ve ark., 2016).

3.2.4 Kemoterapötik İlaçların Kansere Hücre ve Kansere Kök Hücre Hatları Üzerindeki Kombine Etkilerinin Belirlenmesi

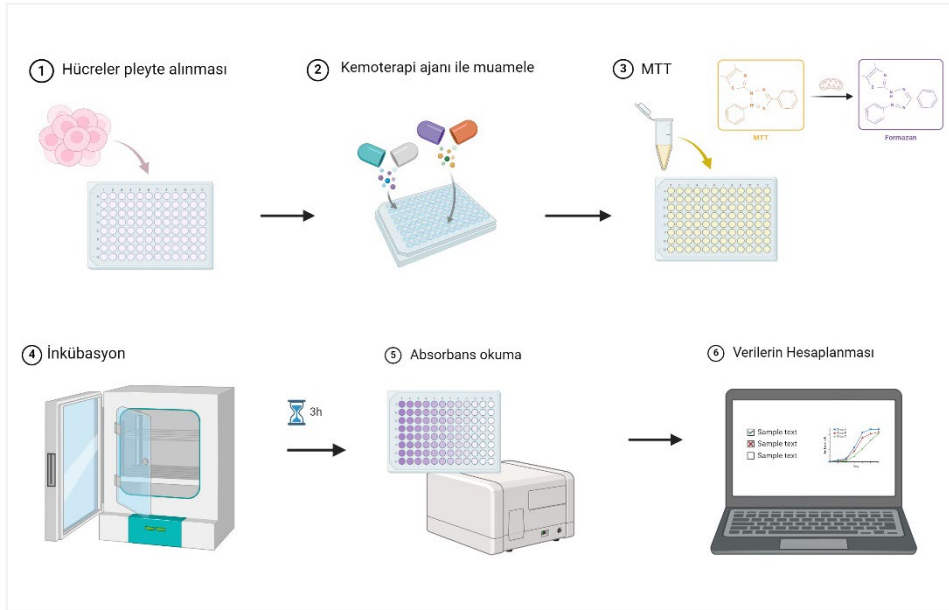
Çalışma süresinde test maddesi olarak kullanılan kimyasallar, 5-Fluorourasil (F6627, Sigma Aldrich, ABD) ve İrinotekan (I-4122, LC Laboratories, Woburn, MA, ABD) DMSO (Sigma Aldrich, ABD) ile çözündürülmüş ve alikotlanarak sonraki çalışmalarda kullanmak için -80°C’de stoklanmıştır. DMSO’nun toksik etkisinden dolayı kültür ortamında DMSO %0,1’den az olacak şekilde hesaplama yapılmıştır. Lökovorin (PHR1541, Sigma Aldrich) ve oxaliptatin (O-7111, LC Laboratories, Woburn, MA, ABD) saf su ile çözündürülmüştür ve -80°C’de stoklanmıştır. Lökovorinin ışığa karşı hassasiyeti ve stabilitesinin bozulabilir olmasından dolayı her çalışma öncesi taze hazırlanmıştır.

Kültür yüzeyini %80-90 oranında kaplamış hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra 37 °C’de ısıtılmış olan steril DPBS ile hücrelerin yüzeyi yıkanmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerine 37 °C’de tripsin–EDTA çözeltisi eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan hücrelerin üzerine serumlu besi ortamı ilave edilerek süspansiyon homojenize hale getirilmiş ve santrifüj tüpüne alınmıştır. Santrifüj tüpünde bulunan hücre süspansiyonu +4 °C’ 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılarak hücre peletinin besi ortamı içinde homojenizasyonu sağlanmıştır. Oluşturulan hücre peletinden sayım örneği alınmış ve Tripan Mavisi ile hücreler boyanarak, Neubauer Lamı aracılığıyla hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayım sonucunda belirlenen canlı hücre konsantrasyonu aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre konsantrasyonu (h/ml)} = \frac{\text{canlı hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4}{\text{sayılan kare sayısı}}$$

Her hücre hattında gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra hücre konsantrasyonu 5×10^4 hücre/ml olacak şekilde 4 tekrarlı (n=4) olarak 96 gözlü kültür kaplarına kuyucuk başına 100 µl hücre süspansiyonu dağıtılmıştır. Kültür kapları karanlıkta 37 °C’deki %5 CO₂’li inkübatörde 24 saat hücrelerin yüzeye yapışması için inkübasyona bırakılmıştır. Kemoterapi ajanları toz halinde ticari olarak temin edilmiştir ve çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. Hesaplama yapılırken ana stokta bulunan maksimum DMSO miktarının

%0,1 olmasına dikkat edilmiştir. Böylelikle DMSO'dan gelecek herhangi bir sitotoksik etkinin önüne geçmek amaçlanmıştır. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücreler üzerine kemoterapi ajanları (irinotekan, 5-fluourasil, folinik asit ve oxaliptatin) ve bunların kombinasyonları (FOLFOX ve FOLFIRI) 8 farklı konsantrasyonda (0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 μ M) hücrelere verilmiştir. Bütün ilaçlar için başlangıç dozu 50 μ M olarak belirlenmiştir ve geniş bir doz aralığı (0.39-50 μ M) kullanılmıştır. Bu çalışma, ilaçların hem tek başına hem de kombinasyon halinde en etkili olduğu konsantrasyonları belirlemek amacıyla tasarlanmıştır. Hücreler kemoterapi ajanlarıyla birlikte 24-72 saat inkübe edilmiştir. Bu sürelerin sonunda MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid, sarı tetrazolyum tuzu, Sigma Aldrich, ABD) ile canlılık testi uygulanmıştır. MTT canlılık analizi çalışma prensibine göre mitokondri faaliyetini incelemektedir. Dolaylı olarak canlı hücre miktarını belirlemek için kullanılmaktadır (Bilgin ve ark., 2023). İnkübasyon süresi sonunda pleytlerdeki besi ortamı çekilerek hücrelerin üzerine %10 MTT (5mg/mL konsantrasyonda, PBS içerisinde hazırlanmış) içeren serumsuz besi ortamı eklenmiştir. 3 saat inkübasyon sonunda MTT içeren besi ortamı çekilmiştir. Hücrelerin üzerine DMSO (Sigma Aldrich, ABD) eklenerek oluşan farmozan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. UV pleyt okuyucu spektrofotometrede 570nm dalga boyunda pleytler okutularak absorbans değerleri kaydedilmiştir. Elde edilen veriler, kontrol grubu ile karşılaştırılarak hücrelerin %50'sinin büyümesinin engellendiği IC₅₀ konsantrasyonu Graphpad Prism 9.0.0 yazılımı ile belirlenmiştir (bkz. **Şekil 3.8**).



Şekil 3.8 MTT uygulama basamakları (Biorender.com ile oluşturulmuştur)

Her bir örneğin absorbans değeri, o deney setine ait hücre kontrolün absorbans değerine oranlanmış; böylece, % canlılık oranları belirlenerek grafiğe aktarılmıştır. Grafiklerde tekrarların ortalaması $\pm$ standart sapmaları (SD) sütun grafik olarak verilmiştir. Uygulanan testten elde edilen verilerin anlamlılık derecelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için GraphPad Prism programı (versiyon 9, GraphPad Software, Inc., San Diego Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır.

3.2.5 Kombinasyon İndeksinin Hesaplanması

Mevcut kemoterapi ajanları ve bunların kombinasyonun kolon kanseri hücreleri ve kolon kanseri kök hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla MTT analizi sonuçları kullanılmıştır. İlaç kombinasyonlarının etkileşim derecesini hesaplamak için CompuSyn (ComboSyn Inc., NewYork) yazılımı kullanılmıştır. Bu yazılım, Chou-Talalay yöntemi temel alınarak geliştirilmiş olup, ilaç kombinasyonlarının etki mekanizmalarını nicel olarak analiz etmeye olanak tanımaktadır (Chou, 2010). CompuSyn yazılımı, ilaç etkileşim derecesinin dozlara bağlı olarak değerlendirilmesi için doz-etki analizi ve bunun yanı sıra kombinasyon indeksini (KI) hesaplamaktadır. Kombinasyon indeksi, etkili doz seviyelerinde ilaçların bağımsız ve kombine etkilerinin karşılaştırılmasını mümkün kılar (Liu ve ark., 2022). Verilen her son nokta için KI değeri: $KI=1$ ise aditif etki, $KI<1$ ise sinerjik etki ve $KI>1$ ise antagonistik etki olarak

değerlendirilmektedir. Additif etki, her iki veya üç ilacın birlikte kullanıldıklarında, bağımsız olarak alınan etkinin bir araya getirildiğinde beklenen sonucu, sinerjik etki, ilaçların birlikte kullanılması ile beklenenden daha büyük bir etkinin ortaya çıkmasını ve antagonistik etki ise ilaçlar birlikte kullanıldığında beklenenden daha küçük bir etki meydana geldiğini ifade etmektedir (H. Wu ve ark., 2017).

3.2.6 Kemoterapötik Ajanların ve Kombinasyonlarının Kansere Kök Hücreleri Temelli Üç Boyutlu Mikro Dokular Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

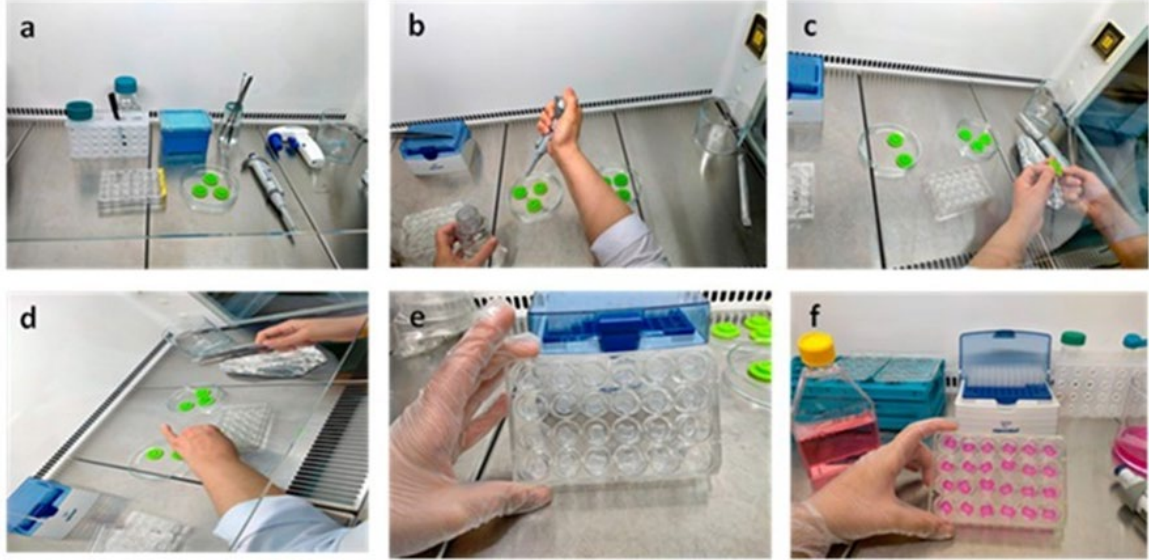
3D Petri Dish® Tekniği Kullanılarak Agaroza Jellerin Hazırlanması

3D Petri Dish® tekniği Morgan ve ark. tarafından mikro-doku oluşturmak amacıyla geliştirilmiştir. Kısaca, bu teknikte “3D Petri Dish (Sigma Aldrich, ABD)” olarak adlandırılan kalıplar kullanılarak agaroz jel üzerinde derinlik ve çap boyutu bakımından homojen olan kuyucuklar oluşturulmaktadır. Oluşturulan bu kuyucuklarda hücreler kültüre edildiğinde zamanla kendiliğinden bir araya gelme ve tutunma süreci sonunda mikro dokular oluşmaktadır (Achilli ve ark., 2014).

Agaroz Solüsyonunun ve Jellerin Hazırlanması

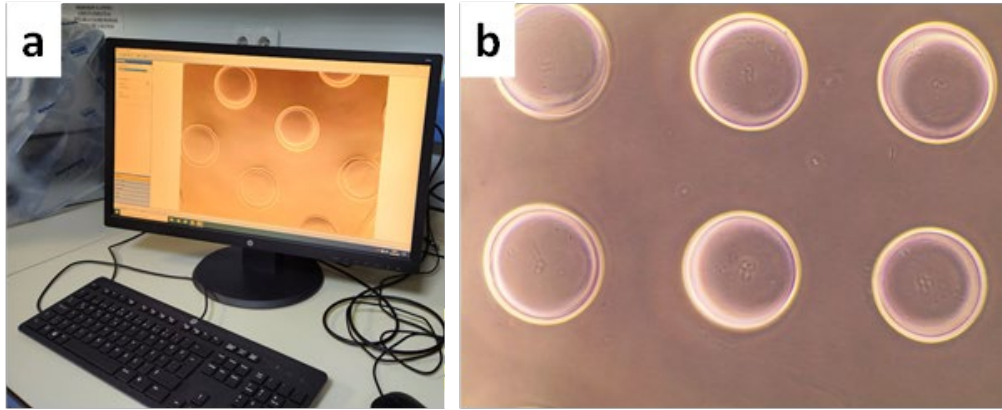
0,45 gram NaCl hassas terazi kullanılarak tartılmış ve 50 ml distile suda çözündürülmüştür. 1 gram agaroz tartılarak 50 ml tuzlu suyun içine eklenmiştir. Böylece %2 agaroz, %0,95 NaCl içeren agaroz solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan agaroz solüsyonu, 121 °C’de 1,02 atm. basınçta 20 dakika otoklavda steril edilmiştir. Otoklavda sterilizasyonu yapılan agaroz solüsyonu, kalıplar ve küt uçlu pens %70 etil alkol ile dezenfekte edilerek laminar akışlı biyogüvenlik kabinine alınmıştır. Agaroz solüsyonundan 330 µl alınıp 3D Petri Dish® kalıbının içine konulmuştur. Agaroz jelleştikten sonra kalıp ters çevrilerek oluşan jelin, küt uçlu pens yardımıyla 24 gözlü kültür kabına düşmesi sağlanmıştır. Küt uçlu pens kullanarak agaroz jellerin kuyucuklarının çalışana bakacak şekilde konumlandırılmasına dikkat edilmiştir. Jeller hazırlandıktan sonra %70 etil alkol ile 2 defa yıkama işlemi yapılmıştır. Alkol iyice uzaklaştırıldıktan sonra jeller serumsuz besi ortamı ile 2 defa daha yıkanmıştır. Agaroz jeller, üzerine hücre ekimi yapmadan önce 1 ml serum içeren besi ortamı içerisinde 1

gece şartlandırma yapmak üzere 37°C'de, %5 CO₂ içeren %95 nem oranına sahip inkübatöre kaldırılmıştır (bkz. Şekil 3.9).



Şekil 3.9 3D Petri Dish® tekniği kullanılarak agaroz matriks kalıpların hazırlanması

(a,b) Agaroz solüsyonundan kalıplara konulması, (c) Agarozun kalıplarda jelleşmesi, (d) Kalıpların ters çevrilmesi ile oluşan agaroz jellerin kültür kabına düşmesi, (e) Oluşan agaroz jeller ve (f) Agaroz jellerin üzerine besi ortamı eklenmesi.



Şekil 3.10 Agar jellerde oluşan kuyucukların mikroskopik görünümü

(a) bilgisayar kamerasından görüntü alma (b) 400 µm çapına sahip oluşturulan boş kuyucuk (Olympus, CK-40-SL, Japonya, 10X büyütme).

Üç Boyutlu Agaroz Matrikslere Hücre İnokülasyonu

Bir gün önceden yukarıda belirtilen yönteme göre hazırlanmış olan agaroz jellerin bulunduğu 24 gözlü kültür kabı laminar akışlı kabin içerisine alınarak jellerin

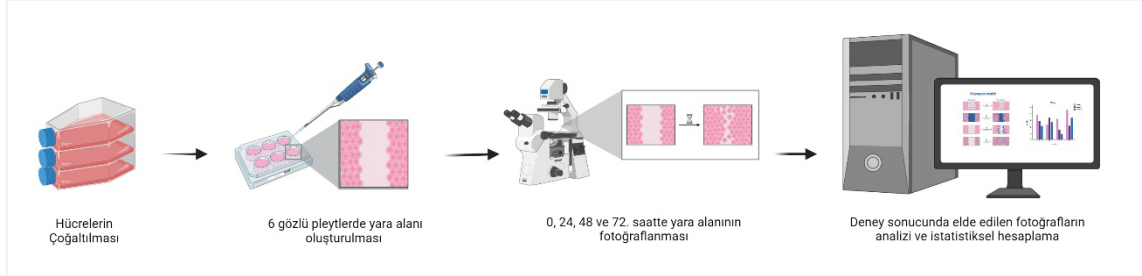
üzerindeki şartlandırma ortamı çekilmiştir. HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücrelerinin tez çalışması kapsamında belirtilen yöntemle göre izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir ve ileri denemeler için hücreler kültüre alınarak çoğaltılmıştır. Agaroz matrikslere alınacak olan hücreler, tripsinizasyon yöntemi ile kaldırılarak sayılmıştır. Hücreler elde edildikten sonra her hücre tipi için 3 tekrarlı olacak şekilde jel başına 5x10⁵ hücre/60 µl hücre jellere inoküle edilmiştir. Aynı işlem kolon kanseri hücreleri için de tekrar edilmiştir. İnokülasyonun ardından, hücreli matriksler 37°C’de ve %5 CO₂’li ortamda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda jellerin üzerine serum, L-glutamin ve gentamisin içeriğine sahip besi ortamından 600 µl eklenmiştir. Daha sonra jeller standart kültür koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında oluşması beklenen mikro-dokular her 24 saatte bir fotoğraflanarak Image J programında analiz edilmiştir ve doku çapları hesaplanmıştır. Mikro-dokular yaklaşık 400 µm’ye ulaştıkça, ilaçlar tekli ve kombinasyon şeklinde 48.saat IC₅₀ konsantrasyonunda 3B mikro-dokulara uygulanmıştır ve her 24 saatte bir fotoğraflanarak mikro-dokuların çaplarındaki değişim kaydedilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler, 4 gün boyunca çekilen fotoğrafların “Image J” programında boyut analizi yapılmıştır. 2B ve 3B hücre kültürü modelleri, ilaç etkinliğine karşı hücresel cevabı değerlendirebilmek için kullanılan önemli *in vitro* araçlardır. 2B hücre kültüründe çoğalan hücrelerin monolayer yapısı, hücrelerin kültür kabının yüzeyine homojen bir şekilde yayılmasını ve ilaç uygulamalarında hücrelerin daha duyarlı olmasını sağlayan önemli bir faktördür. 3B hücre kültüründe çoğalan hücreler ise *in vivo* tümör modelini daha iyi taklit etme yeteneğine sahip heterojen bir yapı oluştururlar ve bu yapı genellikle ilaca karşı daha dirençli olma eğilimindedir (Breslin ve O’Driscoll, 2013). Bu çalışmada, literatürde de vurgulanan 2B ve 3B kültür koşullarında çoğaltılan hücrelerin göstermiş oldukları bu farklılıklardan dolayı, 2B kültürde yapılan MTT analizi sonucunda belirlenen 48.saat IC₅₀ dozları 3B kültürdeki hücrelere daha uzun inkübasyon süresi ile uygulanmıştır (Vinci ve ark., 2012). 3B mikro-doku kültürlerin besi ortamı 48 saatte bir değiştirilmiş ve aynı ilaç dozlarının taze bir şekilde kültür ortamında kalması sağlanmıştır.

3.2.7 *In vitro* Çizik Analizi (Strach Assay) ile Migrasyon Tayini

Yukarıdaki basamaklarda ayrıntılı olarak açıklanan MTT analizi sonucunda elde edilen verilerinden hesaplanan 48.saat IC₅₀ konsantrasyon değerleri ile hücre göçü/migrasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz hücrelerin test maddesi ile muamele edildikten sonra hücre göçünü inceleyebilmek için kullanılan kolay ve düşük maliyetli bir yöntemdir (Liang ve ark., 2007). Çizik veya migrasyon tahlili olarak da adlandırılan bu yöntem, test maddelerinin migrasyon, anjiyogenez ve proliferasyon oranlarının *in vitro* araştırmaları için yaygın olarak tercih edilmektedir. *In vitro* çizik analizi, özellikle hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimlerinin hücre göçü üzerindeki etkilerini incelemek için diğer yöntemlere kıyasla avantajlıdır. Bu doğrultuda, *in vitro* çizik (yara iyileştirme) deneyi, hücrelerin şartlandırılmış ortamda çeşitli metabolitlerle etkileşimini gözlemleyerek hücre çoğalması ve göçü süreçlerini değerlendirmede etkili bir yaklaşımdır. Bu yöntemin temel avantajı, hücre göçünü simüle eden bir ortam sunarak, ilgili bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki potansiyel anti-metastatik rollerini modelleme olanağı tanınmasıdır (Bouchalova ve Bouchal, 2022).

HT29 ve HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺ hücreleri 6 gözlü kültür kaplarına ekildikten sonra hücrelerin %80-90 konfluensiye gelmesi beklenmiştir. Bu yoğunluğa ulaşan hücreler inkübatörden alındıktan sonra inverted mikroskopta incelenmiştir. Daha sonra 6 gözlü kültür kapları %70 etanol ile steril edilerek biyogüvenlik kabini içerisine alınmıştır. Hücrelerin üzerindeki besi ortamı kuyucukların tabanında bulunan hücelere zarar vermeyecek şekilde serolojik pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Bu aşamadan sonra yara modeli oluşturmak için steril P200 pipet ucu ile bir ‘çizik’ kuyucuğun tam ortasından olacak şekilde çizilmiştir. Bu işlem sonucunda hücrelerin kalkmış olabileceğinden ve görüntü almada sorun olacağından hücre yüzeyi DPBS ile dikkatli şekilde yıkanmıştır. Kemoterapi ajanları ve bunların kombinasyonları (FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI) hesaplanan IC₅₀ dozunda hazırlanan besi ortamları ile hücrelerin bulunduğu kuyucuklara eklenmiştir. Hücreler 37°C %5 CO₂ ve %95 nem oranına sahip inkübatöre kaldırılmışlardır. Hücreler kemoterapi ajanları ile 72 saat inkübe edilmiştir ve her 24 saatte inverted mikroskopta çizik alanı fotoğraflanmıştır. 72 saat sonunda görüntüler, Image J yazılımı aracılığıyla analiz edilmiştir ve boş alan

hesabı yapılmıştır. Elde edilen kantitatif değerler negatif kontrol ile kıyaslanarak GraphPad Prism 9.0.0 programı ile istatistiksel analiz yapılarak migrasyon grafikleri oluşturulmuştur (bkz. Şekil 3.11).



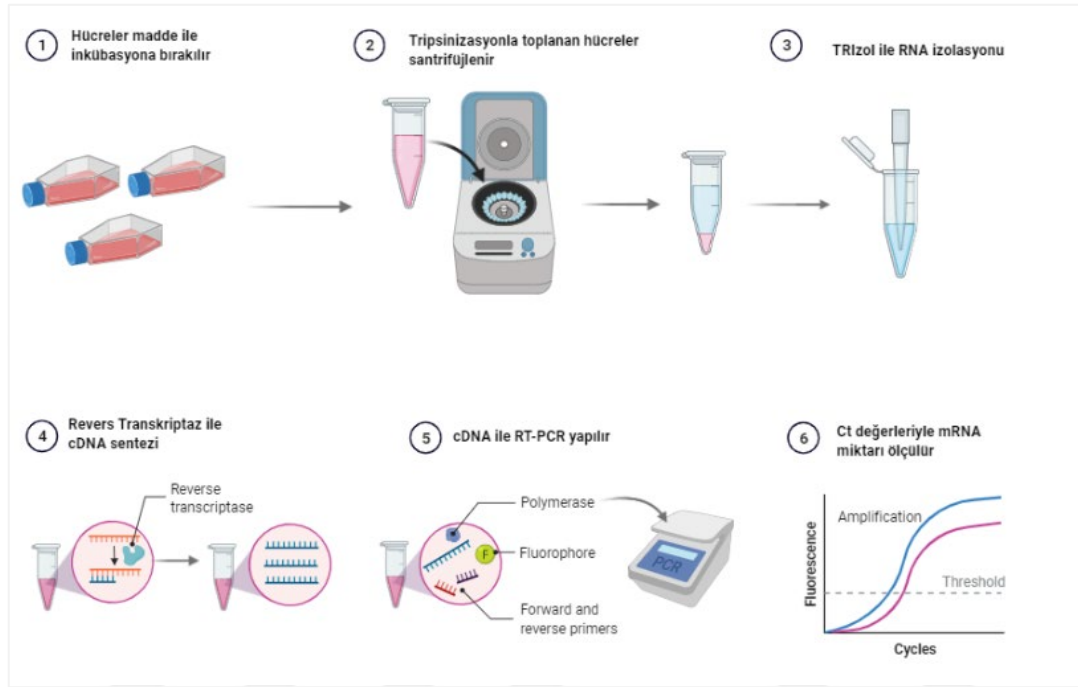
Şekil 3.11 Hücre göçü tayini için yara alanının oluşturulması (*Biorender.com ile oluşturulmuştur*)

3.2.8 Gen Ekspresyon Profillerinin Kantitatif Real-Time PCR Analizi

Çalışmada kullanılan HT29 ve HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺ hücreleri, kemoterapi ajanları ve bunların kombinasyonları ile tedavi edilmiştir. 2B hücre kültüründe yapılan MTT analizi sonucunda her bir kemoterapi ajanı ve kombinasyonu için ayrı ayrı belirlenen 48.saat IC₅₀ dozu, gen ekspresyon ifadelerinin değerlendirilmesi için ilaç uygulama dozu olarak belirlenmiştir. İlaçlarla muamele edilen hücreler, yukarıda anlatılan TRIzol yöntemi kullanılarak RNA izolasyonu yapılmak üzere toplanmıştır. İzole edilen RNA örneklerinden Revers Transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır.

Kemoterapi ajanları ve bunların kombinasyonlarının gen düzeyindeki etki mekanizmalarının incelenmesi amacıyla, Çizelge 3.6'da belirtilen spesifik primerler kullanılarak qRT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sırasında *GAPDH*, housekeeping gen olarak kullanılmıştır. Spesifik primerlere ait relatif ifade seviyeleri, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi ile hesaplanmıştır (M. Zhou ve ark., 2018). Elde edilen veriler GraphPad Prism 9.0.0 yazılımı ile değerlendirilmiştir. Ek olarak, kanser hücrelerinden ve kanser kök hücrelerinden ayrı ayrı RNA izolasyonu yapılmıştır. Hem 2B hem de 3B kültürlerden elde edilen RNA örnekleri kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyon analizi için, 3B hücre kültüründe ilaç uygulaması, mikro-doku boyutundaki küçülmelerin olduğu 120 saate kadar sürdürülmüştür ve bu süre sonunda mikro-dokular toplanarak RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu sayede ilaçların 3B

kültürdeki fiziksel etkilerinin moleküler seviyede hangi genleri eklediği analiz edilmiştir. Ardından, qRT-PCR yöntemiyle kantitatif olarak metastaz, invazyon, EMT ve apoptozla ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir (bkz. Şekil 3.12).



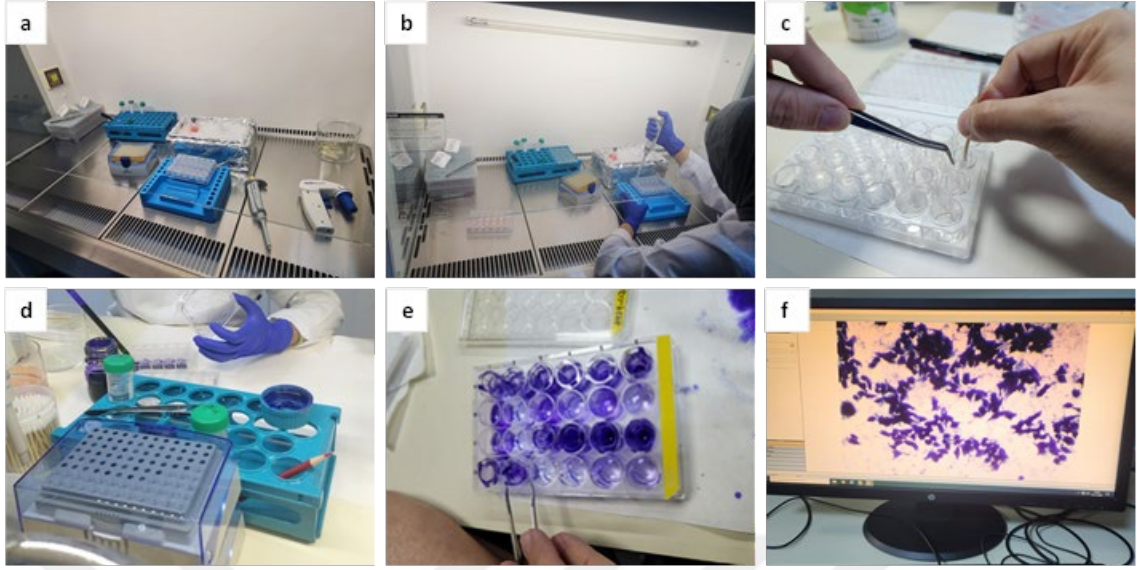
Çizelge 3.6 qRT-PCR’da kullanılan primer dizileri

Primer	Forward	Reverse
Migrasyon ile ilişkili primer dizileri		
<i>HIF1-α</i>	5'-CCTATGTAGTTGTGGAAGTTTATGC-3'	5'-ACTAGGCAATTTTGCTAAGAATG-3'
<i>VEGF</i>	5'-CGGGAACCAGATCTCTCACC-3'	5'-AAAATGGCGAATCCAATTCC-3'
<i>MMP-2</i>	5'-CCAAGTCAAAAAAGCCTCC-3'	5'-GTTTCTCGCTCCCATTCT-3'
<i>MMP-9</i>	5'-CCCTGGAGACCTGAGAACCA-3'	5'-CATCTCTGCCACCCCACTGTA-3'
İnvazyon ile ilişkili primer dizileri		
<i>IL-6</i>	5'-AGACAGCCACTCACCTCTTCAG-3'	5'-TTCTGCCAGTGCCCTTTGCTG-3'
<i>FGF3</i>	5'-AAGCTCTACTGCGCCACGAAGT-3'	5'-CCACCTCCACTGCCGTTATCTC-3'
<i>FGF9</i>	5'-CCAGGAAAGACCACAGCCGATT-3'	5'-CCATACAGCTCCCCCTTCTCAT-3'
<i>FGF10</i>	5'-TGAGAAGAACGGGAAGGTCAGC-3'	5'-TGGCTTTGACGGCAACAACCTCC-3'
EMT ile ilişkili primer dizileri		
<i>TGFβ1</i>	5'-TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC-3'	5'-GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA-3'
<i>E-cadherin</i>	5'-GCCTCTGAAAAGAGAGTGGAAG-3'	5'-TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG-3'
<i>N-cadherin</i>	5'-CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC-3'	5'-GTAGGATCTCCGCCACTGATTC-3'
<i>Vimentin</i>	5'-AGGCAAAGCAGGAGTCCACTGA-3'	5'-ATCTGGCGTTCCAGGGACTCAT-3'
Apoptoz ile ilişkili primer dizileri		
<i>P53</i>	5'-GCCCCAACACCAGCTCCT-3'	5'-CCTGGGCATCCTTGAGTTCC-3'
<i>Bcl-2</i>	5'-ATCGCCCTGTGGATGACTGAG-3'	5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3'
<i>Bax</i>	5'-GGACGAACTGGACAGTAACATGG-3'	5'-GCAAAGTAGAAAAGGCGACAAC-3'

<i>Caspase 3</i>	5'-ACATGGAAGCGAATCAATGGACTC-3'	5-AAGGACTCAAATTCTGTTGCCACC-3'
<i>Caspase 7</i>	5'-CGGAACAGACAAAGATGCCGAG-3	5'-AGGCGGCATTTGTATGGTCCTC-3'
<i>Caspase 8</i>	5'-AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA-3	5'-TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC-3'
<i>Caspase 9</i>	5'-GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT-3'	5'-CAACGTACCAGGAGCCACTCTT-3'
<i>GAPDH</i>	5'-GGATTTGGTCGTATTGGG-3'	5'-GGAAGATGGTGATGGGATT-3'

3.2.9 Metastaz ve İnvazyon Analizi

Hücre invazyon analizi, hücre davranışlarının incelendiği ve tümör hücresinin metastatik potansiyelinin değerlendirildiği çalışmalarda önemli bir rol oynamaktadır. Hücre invazyonunu araştırmak için birçok metot bulunmaktadır. Tüm bu metotlar arasında, transwell invazyon analizi en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Pijuan ve ark., 2019). Porlu bir membran ile ayrılmış ve medyum içeren iki bölmeden oluşan transwell invazyon analizi basit, çok yönlü ve uygun maliyetli bir yöntemdir. Membrandaki porlar, *in vivo* invazyon sürecindeki tipik matriksleri taklit etmesi amacıyla, hücre dışı matriksten oluşan bir jel tarafından kaplanır ve porlar kapatılır. Kemoatraktan madde membranın alt bölümünde bulunur. Uygulama sırasında hücreler membranın üst bölümüne ekilir. İnvaziv hücreler matriksi degrade edip ekstrasellüler matriks tabakasından geçebilir, ama invaziv olmayan hücreler tabakayı aşamaz. Porlardan geçen invaziv hücreler filtrenin tabanına yapışır ve boyanıp sayılır. Kullanılan hücre hatları ve ekstrasellüler matriksin çeşitleri mevcuttur. Kullanılan membran ve por boyutlarının da birçok seçeneği mevcuttur. Bu nedenle bu yöntem insan trofoblast, melanom veya kolon kanseri invazyonunun incelenmesi gibi birçok alanda kullanılabilir (Marshall, 2011).



Şekil 3.13 Transwell kalıpların invazyon ve migrasyon analizi için hazırlanması

(a) Transwell deneyi için uygun steril ortamın hazırlanması, (b) Hücrelerin transwell insörtlere inokülasyonu, (c) İnsörtlere alt yüzeyine geçmeyen hücrelerin uzaklaştırılması, (d) İnvazyon ve migrasyon yapan hücrelerin kristal viyole ile boyanması, (e) Boyama sonrası PBS ile yıkama (f) Boyanan hücrelerin fotoğraflanması

HT29 kolon kanseri hücreleri ve HT29 CD133⁺/44⁺ kolon kanseri kök hücreleri laboratuvar koşullarında çoğaltılmıştır. İnvazyon deneyi için kullanılan Matrigel (354234, Corning, USA), deneyden bir gece önce saklama koşulu olan -20°C'den alınmış ve çözünmesi için 24 saat boyunca +4°C'de bekletilmiştir. Deney boyunca Matrigel'in jelleşmesini önlemek amacıyla, buz üzerinde çalışılmasına özen gösterilmiştir. Matrigel, serumsuz besi ortamı ile 1:5 oranında seyreltilmiştir ve 24-well pleytlere yerleştirilen insörtlere her biri için 50 µl Matrigel eklenmiştir. Bu aşamada kabarcık oluşmaması sağlanmış ve Matrigel eklendikten sonra jelleşmesi için pleytler 37°C'de 60 dakika inkübatörde bırakılmıştır. Matrigelin jelleşmesi sırasında, hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Deney kapsamında kullanılan kemoterapi ilaçları ve bunların kombinasyonları, önceki çalışmalarda belirtilen 48.saat IC₅₀ konsantrasyon değerlerine göre hazırlanmış ve hücrelere uygulanmıştır. Hücreler, kültür kaplarından tripsin-EDTA ile ayrılmış ve hücre sayımı yapılarak 4x10⁵ hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. IC₅₀ dozunda kemoterapi ajanları ile muamele edilen hücreler, her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Hücreler ekildikten sonra, steril pens yardımıyla insörtler, besi ortamı içeren kuyucuklara dikkatlice yerleştirilmiştir. Migrasyon deneyi, invazyon deneyinden farklı olarak Matrigel tabakası kullanılmadan gerçekleştirilmiştir. Deney, aynı prosedür izlenerek yapılmış; hücrelerin

8 µm çapındaki porlardan geçişi, 24-well pleytlerde bulunan insörtler kullanılarak incelenmiştir. Matrigel tabakası kullanılmadığı için hücrelerin yalnızca migrasyon yetenekleri değeriendirilmiştir. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, insörtlerin alt kısmına geçen hücreleri tespit etmek amacıyla fiksasyon ve boyama işlemleri yapılmıştır.

Hücreler, öncelikle PBS ile iki kez yıkanmıştır. Hücrelerin fiksasyonu için kuyucuklara %4'lük paraformaldehit (PFA, 19943, USB, USA) eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda, PFA çözelti ortamdan uzaklaştırılmış, insörtlerin üst kısmındaki hücreler pamuklu çubuk yardımıyla nazikçe temizlenerek çıkarılmıştır. Fiksasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, PBS ile iki kez yıkama yapılarak formaldehit kalıntıları ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra %0,5'lik kristal viyole boyası hazırlanmış ve hem insörtlerin üst kısmına hem de kuyucuklara eklenmiştir. Hücreler oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Boyama işlemleri tamamlandıktan sonra, kuyucuklardaki fazla boya uzaklaştırılmış ve insertler, kalan boya kalıntılarını temizlemek için 2-3 kez PBS ile yıkanmıştır. Son olarak, kurumaya bırakılan insörtler, mikroskop altında incelenmiştir. Insörtlerin alt kısmına geçen hücreler fotoğraflanmış ve elde edilen görüntüler Image J yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir (bkz. **Şekil 3.13**).

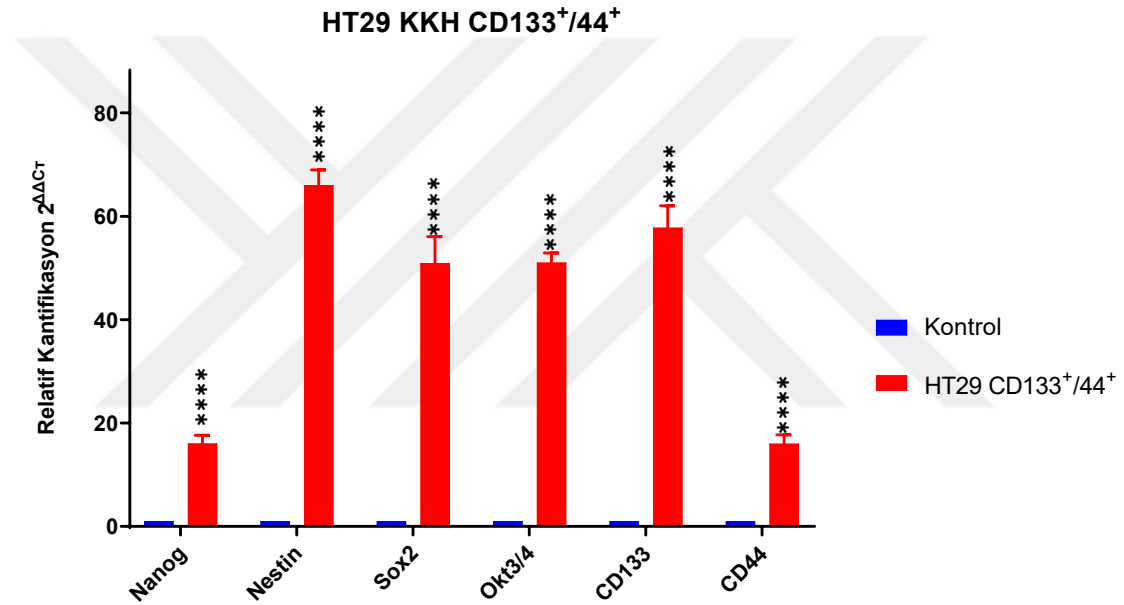
5 BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1 Kolon Kanseri Kök Hücrelerinin (HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺) Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu

Kolon kanseri kök hücreleri, tümör oluşumu, büyümesi, metastazı ve tedaviye direnç süreçlerinde etkili olmaktadır. Bu hücreler, kendini yenileme, sınırsız bölünme ve çok yönlü farklılaşma gibi özellikleriyle diğer tümör hücrelerinden ayrılmaktadır (Hervieu ve ark., 2021). Bu hücrelerin tanımlanması ve izole edilmesi, kanser biyolojisinin anlaşılması ve tedavi hedeflerinin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir (L. Yang ve ark., 2020). Kanser kök hücrelerinin tanımlanmasında CD44, CD133 ve ALDH gibi yüzey belirteçleri önemli araçlar olarak kullanılmaktadır. CD133, kolorektal kanser hücrelerinin en iyi bilinen yüzey belirteçlerinden biridir. CD133'ün yüksek ekspresyon seviyesi tedavi direnci ile ilişkilendirilmiştir (Ren ve ark., 2013). Kanser kök hücrelerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan diğer yüzey belirteci CD44, tümör hücrelerinin migrasyon yeteneği ve kendini yenileme özellikleri ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle bu iki yüzey belirtecinin kombinasyonu birlikte kullanıldığında kanser kök hücre popülasyonunun daha doğru şekilde izole edilmesi sağlanır (De Angelis ve ark., 2021).

Tez çalışması kapsamında, HT29 kolon kanseri kök hücrelerinin izole edilmesinde kullanılan MACS tekniği, yüzey belirteçlerini hedefleyen manyetik mikro partiküllerin kullanımına dayalı hassas ve etkili bir yöntemdir. İlk olarak CD133 ve CD44 yüzey belirteçlerine özgü antikorlarla kaplı manyetik mikro partiküller hücrelere eklenmiştir. Daha sonra bu mikro partiküllerle işaretlenmiş hücre süspansiyonu manyetik alanda hücre sayısına uygun bir manyetik kolondan geçirilmiştir. Son aşamada manyetik alandan alınan kolon içindeki CD133⁺ ve CD44⁺ hücreler toplanmıştır. İzolasyon sonrası hücreler kültüre alınarak çoğaltılmıştır. Hücreler %80-90 konfluensiye ulaştığında TRIzol ile RNA izolasyonu yapılmıştır ve ardından RNA'lar cDNA'ya çevrilmiştir. Elde edilen cDNA'larla kök hücre karakterizasyonunda kullanılan köklük genlerinin (*CD133*, *CD44*, *Nanog*, *Nestin*, *Okt3/4*, ve *Sox2*) mRNA seviyesindeki ekspresyon oranları qRT-PCR (gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu) ile belirlenmiştir. Bu çalışmalarda housekeeping gen bölgesi olan ve tüm hücreler için

geçerli hücre içi protein olduğundan *GAPDH* kullanılmıştır. *GAPDH* gen ekspresyon seviyesi değerini elde ettikten sonra, çalışmada kullanılan diğer genlerin ekspresyon değerleriyle oranlayarak hedef genin ekspresyon değeri hesaplanmıştır. Kanser kök hücrelerinin ekspresyon seviyelerinin hesaplanmasında sağlıklı hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen veriler *GAPDH* ile normalize edilerek grafiğe geçirilmiştir. Ayrıca hücre grupları arasında gen ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı Two-way ANOVA testi uygulanarak belirlenmiştir (bkz. Şekil 4.1).



Şekil 4.14 HT29 (CD133⁺/CD44⁺) kanser kök hücrelerinin mRNA düzeyinde gen ifade seviyesi

Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (****P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.01, *P≤0.05 vs Kontrol).

Bu çalışma kapsamında, CD133⁺ ve CD44⁺ yüzey belirteçlerini birlikte içeren bir kültür izole etmek amaçlanmıştır. Şekil 4.1’de köklük genlerinin ekspresyonu bakımından, kontrol grubu sağlıklı kolon hücreleri (CCD-18Co) ile MACs ayrımı ile elde edilen HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücrelerinin karşılaştırılması sonucu oluşturulan grafik verilmiştir. Kolon kanseri kök hücrelerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan CD133 ve CD44 yüzey belirteçlerinin, tümör metastazı, kendi kendini yenileyebilme ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Lei ve ark., 2021). Ek olarak, CD133⁺ ve CD44⁺ yüzey belirteçlerini birlikte ifade eden hücre popülasyonlarının, tek başına CD133⁺ veya CD44⁺ ifade eden hücre popülasyonlarına

göre tümör oluşturma potansiyelinin daha yüksek olduğu da kolon kanseri hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada belirtilmiştir (Sahlberg ve ark., 2014). Elde edilen bulgular, CD133⁺ ve CD44⁺ yüzey belirteçlerini birlikte ifade eden kanser kök hücrelerinin başarılı bir şekilde izole edildiğini ve bu hücrelerin gen ekspresyon profillerinin sağlıklı kolon hücrelerinden anlamlı derecede farklı olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında sonraki deneylerde HT29 kolon kanseri hücreleri ile 2B ve 3B kültürlerde karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücrelerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

5.2 Kemoterapötik İlaç Kombinasyonlarının Kanser Hücre ve Kanser Kök Hücre Hatları Üzerindeki Potansiyel Etkilerinin İncelenmesi

Tez çalışması kapsamında, insan kolorektal karsinom hücre hattı (HT29) ve hücre hattından izole edilen kolon kanseri kök hücrelerinde (HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺) folinik asit (FA), 5-Fluorourasil (5-FU), oxaliptatin (OX) ve irinotekan (IRI) kemoterapi ilaçlarını ve bu ilaçların kolorektal kanser tedavisinde en yaygın kullanılan kombinasyonları FOLFOX ve FOLFIRI'nin *in vitro* seviyede etkileri değerlendirilmiştir. Kemoterapi ilaçları ve kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki potansiyel etkileri, doz ve zamana bağlı olarak incelenmiş ve MTT canlılık analizi uygulanmıştır. Bu analiz sonucunda elde edilen absorbans değerlerine göre, GraphPad Prism 9.0.0 yazılımı kullanılarak IC₅₀ konsantrasyonları hesaplanmıştır (bkz. **Çizelge 4.1**). Ek olarak ilaçların ve kombinasyonlarının hücreler üzerindeki doza ve zamana bağlı etkileri oluşturulan % canlılık grafikleri ile görselleştirilmiştir (bkz. **Şekil 4.2-4.8**). Çalışmada ayrıca, kontrol grubu olarak sağlıklı kolon hücresi (CCD-18Co) kullanılarak, kemoterapi ilaçlarının sağlıklı hücreler üzerindeki etkisi de incelenmiş ve elde edilen sonuçların karşılaştırılması sağlanmıştır.

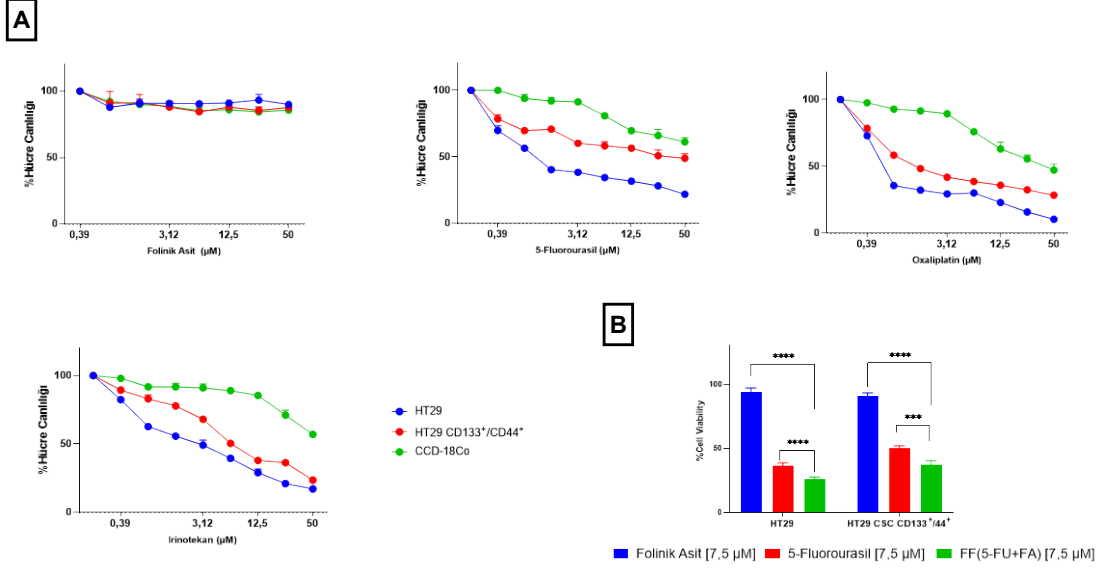
Çizelge 4.1 Kemoterapi ilaçları ve bunların kombinasyonlarının kolon kanseri (HT29), kolon kanseri kök hücreleri (HT29 KKH CD133⁺/44⁺) ve sağlıklı kolon hücreleri (CCD-18Co) ile etkileşimlerinden elde edilen IC₅₀ değerleri

(* ile gösterilen değerlere ait hücre canlılıkları negatif kontroldeki hücrelerin canlılığından yüksek olduğu için herhangi bir inhibisyon değeri hesaplanamamıştır.)

İlaç (μM)	HT29			HT29 KKH CD133 ⁺ /CD44 ⁺			CCD-18Co		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
5-Fluorourasil (5-FU)	*	50,25	12,35	*	51,49	23,12	*	48,2	43,9

Folinik Asit (FA)	*	*	*	*	*	*	*	*	*
5-FU+FA (FF)	*	21,75	9,49	*	27,59	12,36	*	49,63	47,46
Oxaliplatin (OX)	45,46	14,32	7,05	58,86	21,14	9,45	*	38,24	35,31
İrinotekan (IRI)	63,71	17,88	8,97	*	23,41	11,15	*	35,6	33,05
FOLFIRI (FF+IRI)	36,66	9,40	3,49	43,06	12,60	5,68	*	29,25	22,8
FOLFOX (FF+OX)	25,42	7,45	2,35	27,44	9,26	5,25	*	32,8	25,25

Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere, zamana bağlı olarak hem HT29 hem de HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücrelerinde IC₅₀ değerinin azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, kullandığımız ilaçların zamanla artan bir etkinlik gösterdiğini ve hücre canlılığını daha düşük dozlarda inhibe edebildiğini ortaya koymaktadır. Özellikle 72. saatteki IC₅₀ değerleri 24. saate kıyaslandığında belirgin bir düşüş görülmektedir. Bu durum, hücre hasara yol açan mekanizmalara etki eden ilaçların zaman içinde hücrede birikmesi ve antiproliferatif etkisini bu sayede artırmasıyla açıklanmaktadır (Whiteside ve ark., 2016). HT29 hücrelerinde hesaplanan IC₅₀ değerlerinin, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları için daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum HT29 hücrelerinin kemoterapi ilaçlarına karşı daha duyarlı olduğunu göstermektedir. HT29 kolon kanseri hücre hattı hızlı bölünme yeteneğine sahip hücrelerdir. Bu nedenle bu hücreler, çalışma mekanizması hızlı bölünen hücreleri hedeflemek olan kemoterapi ilaçlarına karşı daha duyarlıdır (Pathak ve ark., 2024). Çalışmada, kontrol grubu olarak kullanılan CCD-18Co sağlıklı kolon hücrelerinde IC₅₀ değerlerinin genellikle yüksek olduğu görülmektedir ve bu durum ilaçların seçici etkilerini desteklemektedir. HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücrelerinde ise IC₅₀ değerlerinin daha yüksek olduğu ve kemoterapi ilaçlarına karşı daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Kanser kök hücreleri ve diferansiye kanser hücrelerinin ilaçlara vermiş oldukları yanıtların literatürle uyumlu olduğu görülmektedir (Chow ve ark., 2015; Dean ve ark., 2005; Phi ve ark., 2018). Ek olarak çizelgede folinik asidin IC₅₀ değerinin hesaplanamadığı görülmektedir. Folinik asit, kemoterapide 5-Fluorourasil ile birlikte kullanılan ve 5-FU'nun etkinliğini artıran bir ajandır ve kendisi tek başına antiproliferatif etki göstermemektedir. Bu nedenle, folinik asidin IC₅₀ değerinin hesaplanamaması literatürle uyumlu beklenen bir durumdur (Romano ve ark., 2021).

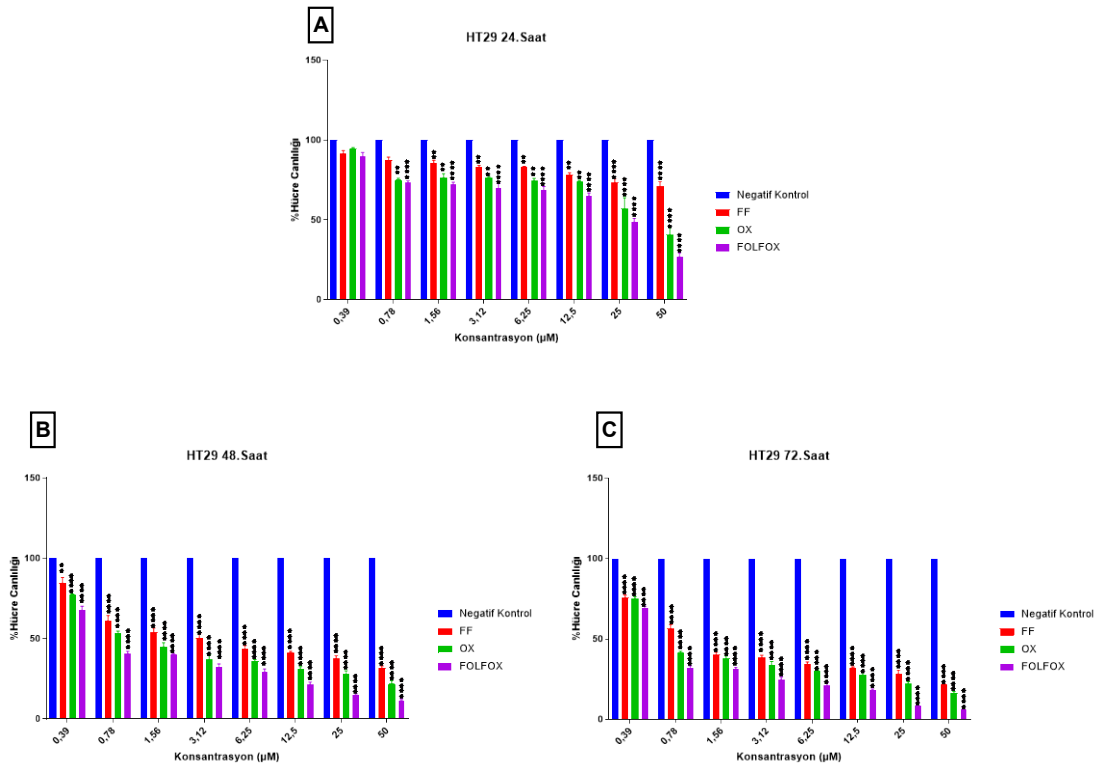


Şekil 4.15 İlaç Doz-Tepki Eğrileri ve Folinik Asit ve 5-Fluorourasil Kombinasyonunun Optimizasyonu

(A) Çeşitli kolon kanseri hücre hatlarında folinik asit (FA), 5-fluorourasil (5-FU), irinotekan (IRI) ve oxaliplatinin (OX) ilaç tepki eğrileri. Hücrelere 72 saat kemoterapi ilaçları ile inkübe edildi. (B) Folinik asit (FA) ve 5-fluorourasil'in (5-FU) optimize edilmiş dozlarının (IC_{50}) 72 saatlik uygulamadan sonra hücre canlılığı üzerindeki etkisini gösteren grafik. Tüm değerler ilaca maruz bırakılmamış kontrol hücrelerine göre normalize edildi ve ortalama $\pm$ SD ($n \geq 3$) olarak sunuldu. Sonuçlar iki yönlü ANOVA testi kullanılarak analiz edildi; **** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,0005$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$.

Çalışmanın ilk basamağında, kolon kanseri hücre hattı (HT29), kolon kanseri kök hücre hattı (HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺), ve sağlıklı kolon hücreleri (CCD-18Co) üzerinde her bir kemoterapötik ilaç için doz-yanıt eğrileri oluşturulmuştur. Hücreler biyolojik özellikler bakımından birbirinde farklı olduğu için Şekil 4.2 (A)'da görüldüğü üzere kemoterapötik ilaçlara karşı hassasiyetleri farklılık göstermektedir. Kemoterapi, bir veya daha fazla antikanser ilaç kullanarak sürekli bölünebilme yeteneğine sahip kanser hücrelerini hedef alan yaygın bir tedavi stratejisidir. Kemoterapi ile uygulanan ilaçlar tüm vücudu dolaşarak kanserli hücrelere ulaşırlar. Kanser hücreleri tipik bir sağlıklı doku hücresine göre daha hızlı bölünür, bu nedenle hücre bölünmesini etkileyen antikanserojen bileşikler tümörler üzerinde sağlıklı hücrelerden daha fazla etkiye sahiptir (Ashique ve ark., 2024). IC_{50} değerleri ve doz-yanıt eğrisi birlikte değerlendirildiğinde, kanserli hücrelerde kemoterapi ilaçlarının göstermiş oldukları sitotoksik etkinin, sağlıklı hücrelerle karşılaştırıldığında daha belirgin olduğu görülmektedir. Negatif kontrol ile kıyaslandığında sağlıklı hücrelerde de antiproliferatif

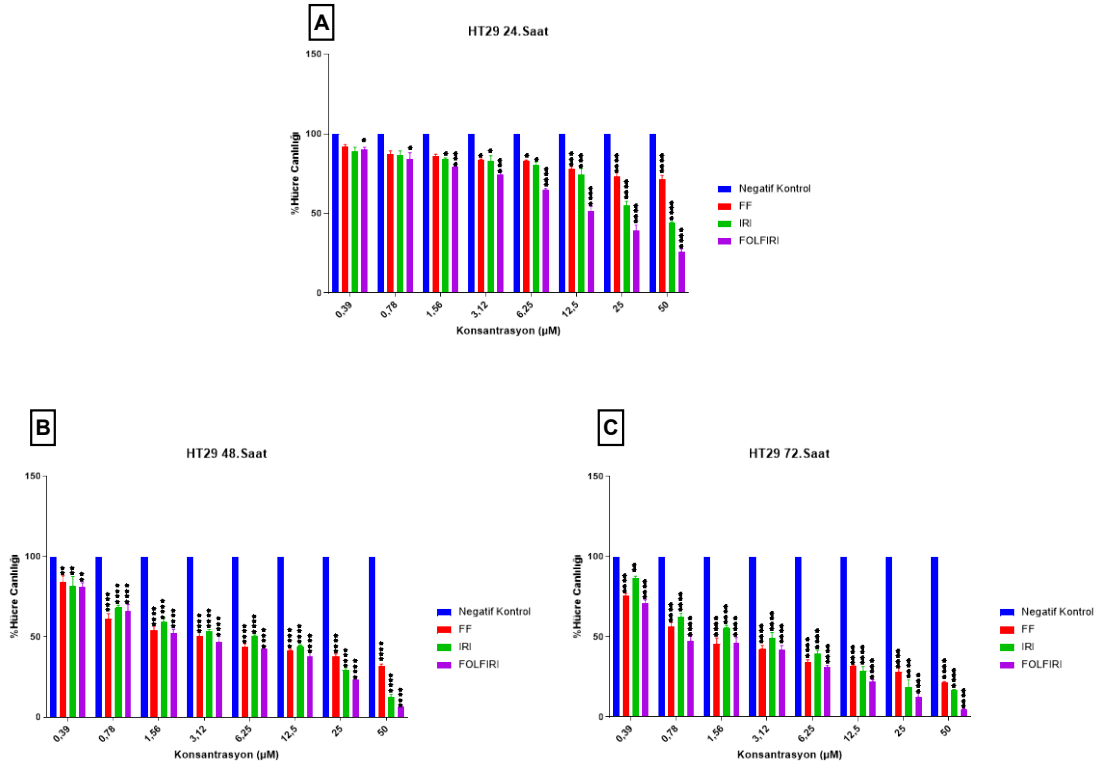
etki gösterdiği görülen kemoterapi ilaçlarının bu toksik etkisinin yüksek dozlara çıkıldıkça arttığı belirlenmiştir. Folinik asit, 5-FU ile kullanıldığında, 5-FU'nun hedef enzimi timidilat sentazı stabilize ederek 5-FU'nun etkinliğini artırdığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Bu nedenle, FA ve 5-FU klinik olarak istisnasız aynı anda uygulanmaktadır (Glimelius ve ark., 2021). **Şekil 4.2 (B)**'de HT29 ve HT29 CD133⁺/CD44⁺ hücre hatlarında 72.saat IC₅₀ konsantrasyonunda FA ve 5-FU'nun hücre canlılığı üzerindeki etkisi verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere literatür çalışmalarına benzer şekilde 5-FU'nun folinik asit ile birlikte kullanılması 5-FU'nun kemoterapötik etkisini artırmıştır (Machover ve ark., 2022). Bu nedenle bu çalışmada kombinasyon içerisinde folinik asit ve 5-fluorourasil FF şeklinde bir monokemoterapi ajanı olarak değerlendirilmiştir. Polikemoterapötik reçetelere FF şeklinde dahil edilmiştir.



Şekil 4.16 HT29 kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri

Hücreler, çeşitli konsantrasyonlarda FF, OX ve FOLFOX ajanları ile muamele edilmiş ve hücre canlılığı 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) sonunda değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırılan ilaç uygulama gruplarının % hücre canlılık değerleri gösterilmiştir. Sonuçlar two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edildi; **** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,0005$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$.

Şekil 4.3'te FOLFOX kombinasyonu ve kombinasyonu oluşturan kemoterapi ajanlarıyla muamele edilen HT29 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat sonra elde edilen verilerle oluşturulan yüzde canlılık grafikleri verilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan ilaçların, doza ve zamana bağlı olarak artan antiproliferatif etki göstermiş olduğu belirlenmiştir. FOLFOX kombinasyonun bütün çalışma periyotlarında ve kullanın bütün dozlarda kemoterapi ajanlarının tek tek kullanılmasına kıyasla daha yüksek antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. FOLFOX kombinasyonu, folinik asidin 5-FU'nun etkinliğini artırması ile oxaliptatin'in hücre bölünmesini hedef alan etki mekanizmalarını bir araya getirerek, DNA hasarını artırırken tümör hücrelerinin büyüme döngüsünü inhibe etmektedir. Bu sayede kombinasyon, kemoterapi ajanlarının tekli kullanımına kıyasla daha yüksek antiproliferatif etki göstermektedir (Amniouel ve Jafri, 2023; Liu ve ark., 2022). Literatürle uyumlu şekilde, kombinasyon uygulaması ile ilaçların çok daha düşük dozlarda daha etkili sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Bu sayede yüksek doza bağlı toksisitenin engellenmesi mümkün olabilmektedir (Hammond ve ark., 2016). **Şekil 4.3 (C)**' de görüldüğü üzere, özellikle yüksek dozlarda (50 μ M) ve uzun süreli inkübasyonda (72 saat) kombinasyona maruz bırakmanın hücre canlılığını %10'un altına düşürmüş olduğu belirlenmiştir.



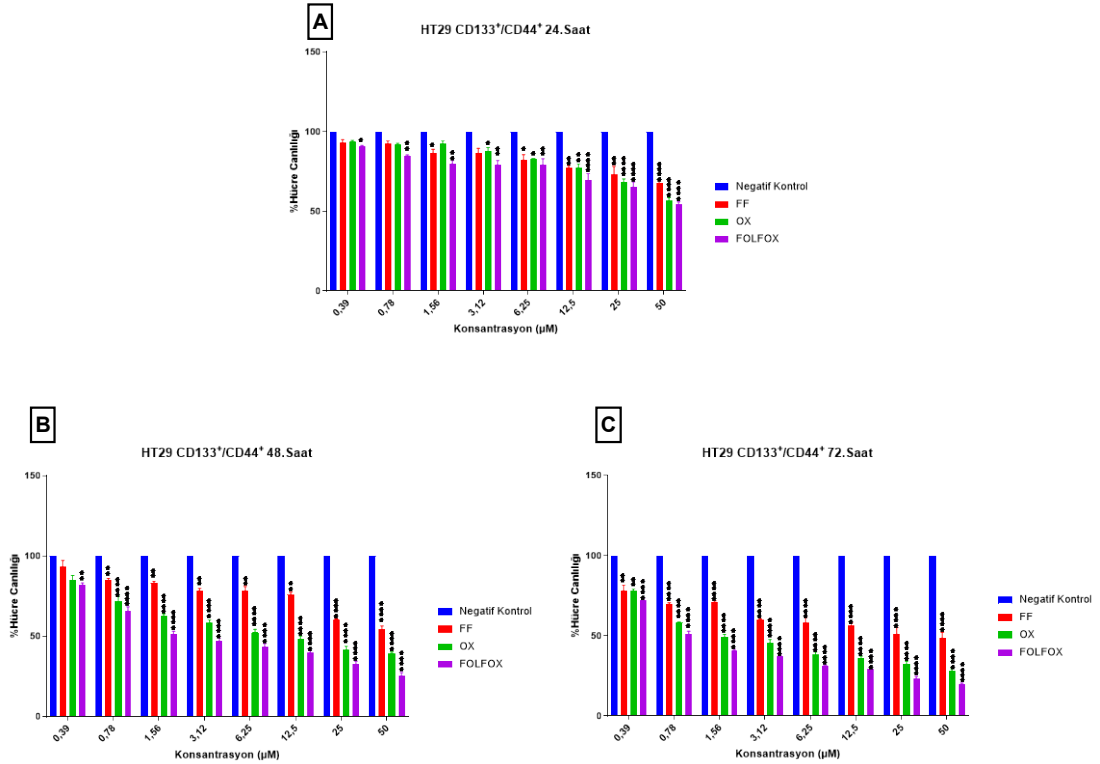
Şekil 4.17 HT29 kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri

Hücreler, çeşitli konsantrasyonlarda FF, IRI ve FOLFIRI ajanları ile muamele edilmiş ve hücre canlılığı 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) sonunda değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırılan ilaç uygulama gruplarının % hücre canlılık değerleri gösterilmiştir. Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.0005$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ vs Kontrol)

Şekil 4.4'te görüldüğü üzere, HT29 kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının (FF, IRI ve FOLFIRI) hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri verilmiştir. Şekil 4.4'te verilen üç grafik (A, B, C) birlikte değerlendirildiğinde, ilaç uygulamalarının artan dozlarında zamana bağlı olarak hücre canlılığında belirgin bir azalma gözlenmektedir. FF ve IRI kolon kanseri hücreleri üzerinde FOLFIRI ile kıyaslandığında daha az antiproliferatif etki göstermiştir. Özellikle 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından FOLFIRI'nin antiproliferatif etkisinin daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. FOLFIRI kombinasyonu, DNA replikasyon sürecinde kritik rol oynayan topoizomeras I enzimini inhibe ederek hücre ölümüne sebep olan irinotekan ile özellikle hızlı bölünen kanser hücrelerini hedeflemede oldukça etkili olan FF'in birlikte kullanılması sayesinde kanser hücrelerine karşı yüksek antiproliferatif etki

göstermektedir. Elde edilen bulguların, literatürde bulunan benzer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir (Advani ve Kopetz, 2019; Chai ve ark., 2024).

FOLFOX ve FOLFIRI ilaç kombinasyonları, kolon kanseri tedavisinde etkinliği kanıtlanmış, bilimsel temellere dayanan tedavi stratejileri olarak kabul edilmektedir (Bekaii-Saab ve Wu, 2014). Her iki tedavi protokolü de tümör büyümesini engelleyen ve hücre ölümünü tetikleyen mekanizmaları hedef almaktadır. Bu tedavi kombinasyonları hücre düzeyinde farklı hedeflere yönelik etkileri sayesinde ilaç direncini minimize etmeyi amaçlamaktadır (Vera ve ark., 2015).

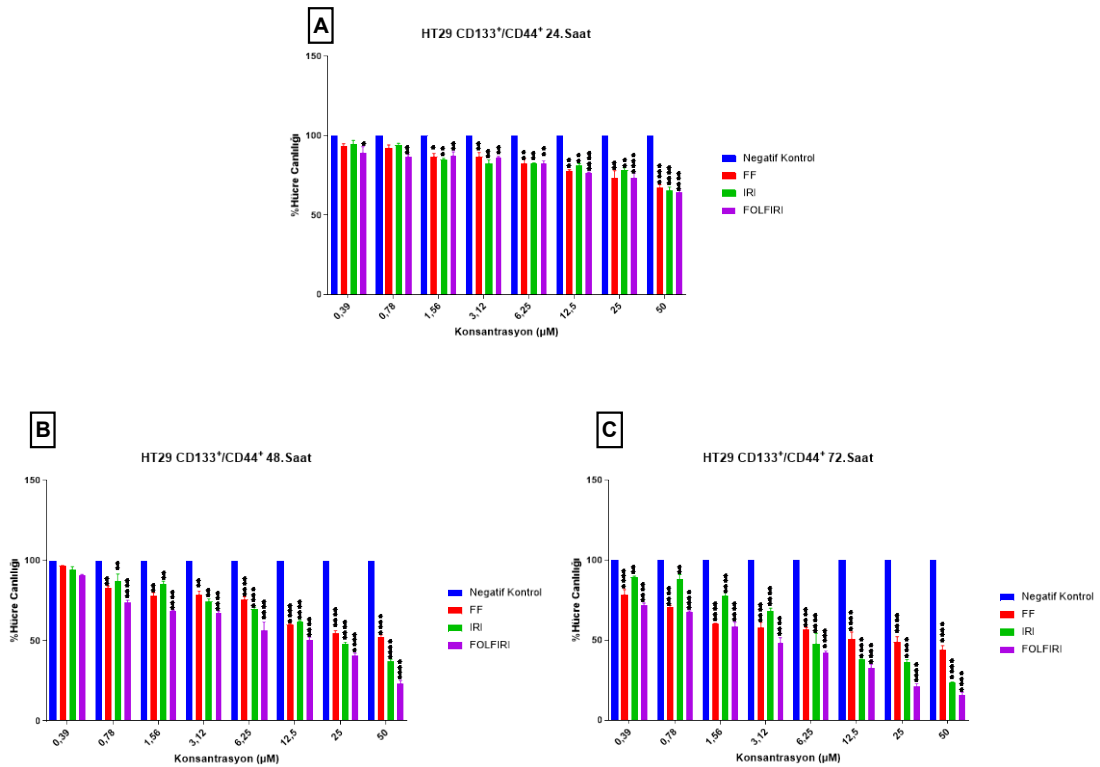


Şekil 4.18 HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri

Hücreler, çeşitli konsantrasyonlarda FF, OX ve FOLFOX ajanları ile muamele edilmiş ve hücre canlılığı 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) sonunda değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırılan ilaç uygulama gruplarının % hücre canlılık değerleri gösterilmiştir. Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. (***P≤0.0001, **P≤0.0005, *P≤0.01, P≤0.05 vs Kontrol)

Şekil 4.5, HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX ve FOLFOX) hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkilerini göstermektedir. Farklı konsantrasyonlarda yapılan ilaç uygulamasının, doza ve

zamana bağılı olarak artan antiproliferatif etki göstermiş olduğu belirlenmiştir. Ancak, kolon kanseri kök hücrelerinin, farklı konsantrasyon ve sürelerdeki kemoterapi ajanlarına karşı daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Özellikle 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, yüksek dozlarda (50 μ M) bile hücre canlılığının tamamen kaybolmadığı belirlenmiştir. **Şekil 4.3** ve **4.5** birlikte değerlendirildiğinde, HT29 diferansiye kanser hücrelerinde kemoterapi ajanlarının daha düşük dozlarda daha güçlü bir etki gösterdiği belirlenmiştir. FOLFOX kombinasyonu her iki hücre hattında da (HT29 ve HT29 CD133⁺/CD44⁺) tek başına kullanılan kemoterapi ajanlarına kıyasla en güçlü antiproliferatif etkiyi göstermektedir. Ancak, HT29 hücre hatlarında kombinasyonun etkisi HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücrelerine kıyasla daha belirgin ve hızlıdır. Literatürde de oldukça fazla çalışmayla vurgulanan bu durum, kanser kök hücrelerinin dirençli yapısıyla açıklanmaktadır (Kemper ve ark., 2010; Lei ve ark., 2021; Sahlberg ve ark., 2014).

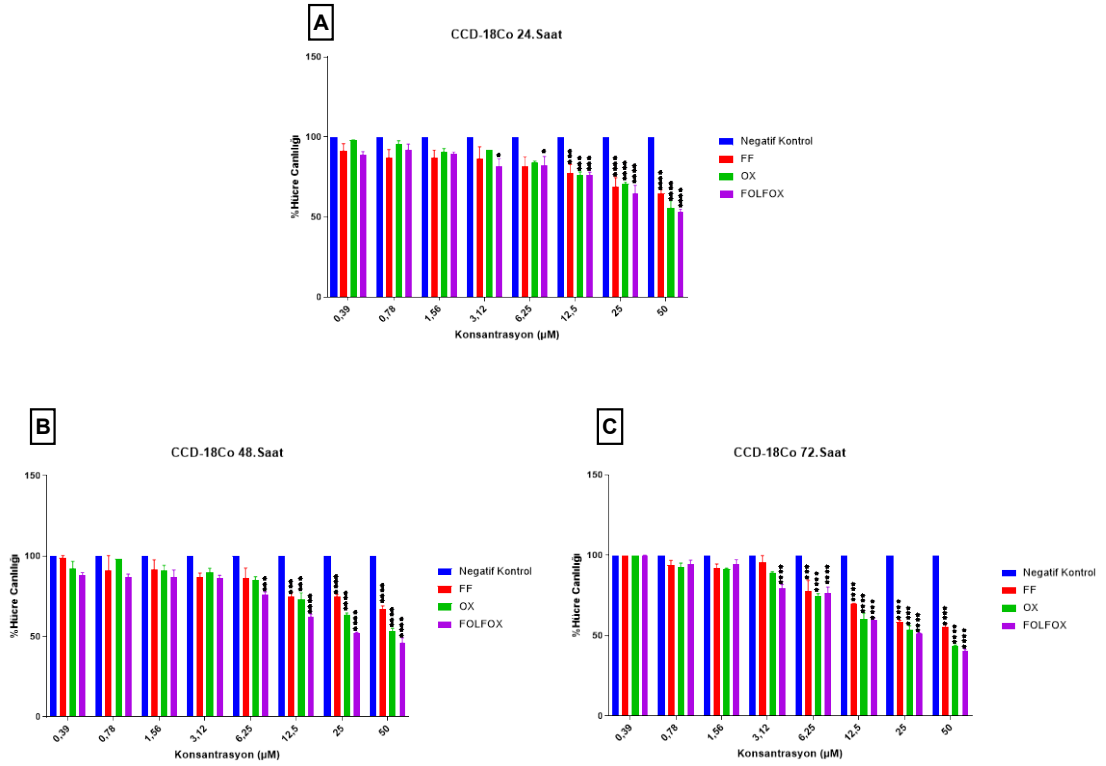


Şekil 4.19 HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağılı etkileri

Hücreler, çeşitli konsantrasyonlarda FF, IRI ve FOLFIRI ajanları ile muamele edilmiş ve hücre canlılığı 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) sonunda değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırılan ilaç

uygulama gruplarının % hücre canlılık değerleri gösterilmiştir. Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.0005$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ vs Kontrol)

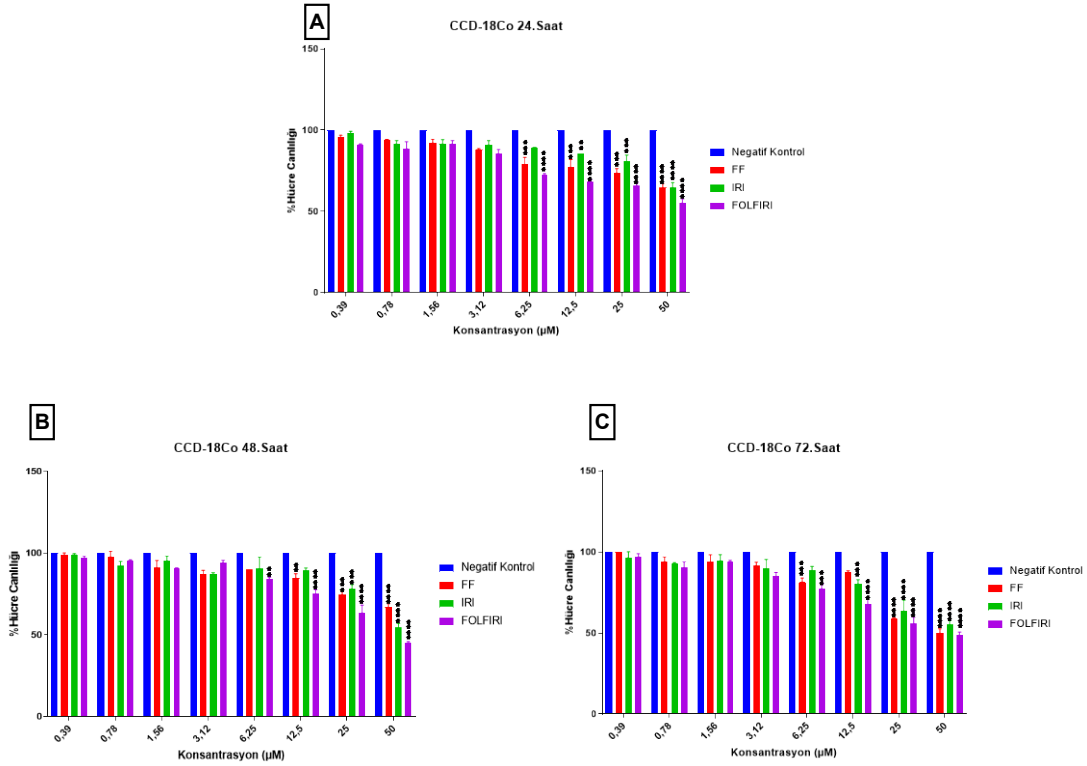
Şekil 4.6, HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde FF, IRI ve FOLFIRI kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkilerini göstermektedir. **Şekil 4.6 (A)**'da görüldüğü üzere, kanser kök hücrelerinde kemoterapi ajanlarının ve kombinasyonun belirgin bir etkisi olmadığı, yalnızca en yüksek dozlarda negatif kontrol ile kıyaslandığında hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. **Şekil 4.6 (B)** ve **(C)** incelendiğinde ise, kombinasyon uygulamasının (FOLFIRI) kanser kök hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisini zamana ve doza bağlı olarak artırmış olduğu görülmektedir. **Şekil 4.4** ve **4.6** birlikte değerlendirildiğinde, HT29 hücrelerinin aynı kemoterapi ajanlarına daha duyarlı olduğu ve 24 saatlik inkübasyon sonunda bile hücre canlılığının baskılandığı görülmektedir. Kanser kök hücrelerinde antiproliferatif etkinin belirgin hale gelebilmesi için daha yüksek dozlara (25-50 μM) ve daha uzun inkübasyon sürelerine (48 ve 72 saat) ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir. Örneğin **Şekil 4.6 (B)**'de 48 saatlik FOLFIRI uygulamasında bile 6.25 μM gibi orta dozlarda hücre canlılığı hala %60-80 aralığında kaldığı görülmektedir. Veriler, kanser kök hücrelerinin, diferansiye HT29 hücrelerine kıyasla kemoterapi ajanlarına karşı daha dirençli olduğunu ortaya koymaktadır. Literatürde FOLFIRI kombinasyonunu oluşturan IRI ve 5-FU'nun DNA sentezine etki ederek hücre ölümüne yol açtığı bildirilmiştir (Chai ve ark., 2024). Ancak kanser kök hücrelerde bulunan direnç mekanizması nedeniyle, ilaçların bu hücrelere sınırlı etki gösterebileceği belirtilmiştir (Q. Wu ve ark., 2014). Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, KKH'lerin FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarına karşı oluşturduğu cevabın literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.



Şekil 4.20 CCD-18Co sağlıklı kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri

Hücreler, çeşitli konsantrasyonlarda FF, OX ve FOLFOX ajanları ile muamele edilmiş ve hücre canlılığı 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) sonunda değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırılan ilaç uygulama gruplarının % hücre canlılık değerleri gösterilmiştir. Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (*** $P \leq 0.0001$, ** $P \leq 0.0005$, * $P \leq 0.01$, $P \leq 0.05$ vs Kontrol).

Şekil 4.7’de, CCD-18Co sağlıklı kolon fibroblast hücre hattında FF, OX ve FOLFOX kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri gösterilmektedir. **Şekil 4.7** incelendiğinde, ilaçların uygulama dozuna ve zamana bağlı olarak kemoterapi ilaçlarının sağlıklı hücreler üzerinde toksik etki sergilediği görülmektedir. Ancak, bu karşılaştırıldığında, kanserli hücrelerde etkili olan düşük dozların sağlıklı hücrelerde tolere edilebilir olduğu tespit edilmiştir. Kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinin kemoterapiye daha hızlı yanıt verdiği ve daha düşük dozlarda hücrelerin %50 canlılık seviyesinin altına düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.21 CCD-18Co sağlıklı kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri

Hücreler, çeşitli konsantrasyonlarda FF, IRI ve FOLFIRI ajanları ile muamele edilmiş ve hücre canlılığı 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) sonunda değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırılan ilaç uygulama gruplarının % hücre canlılık değerleri gösterilmiştir. Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (***P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.01, *P≤0.05 vs Kontrol).

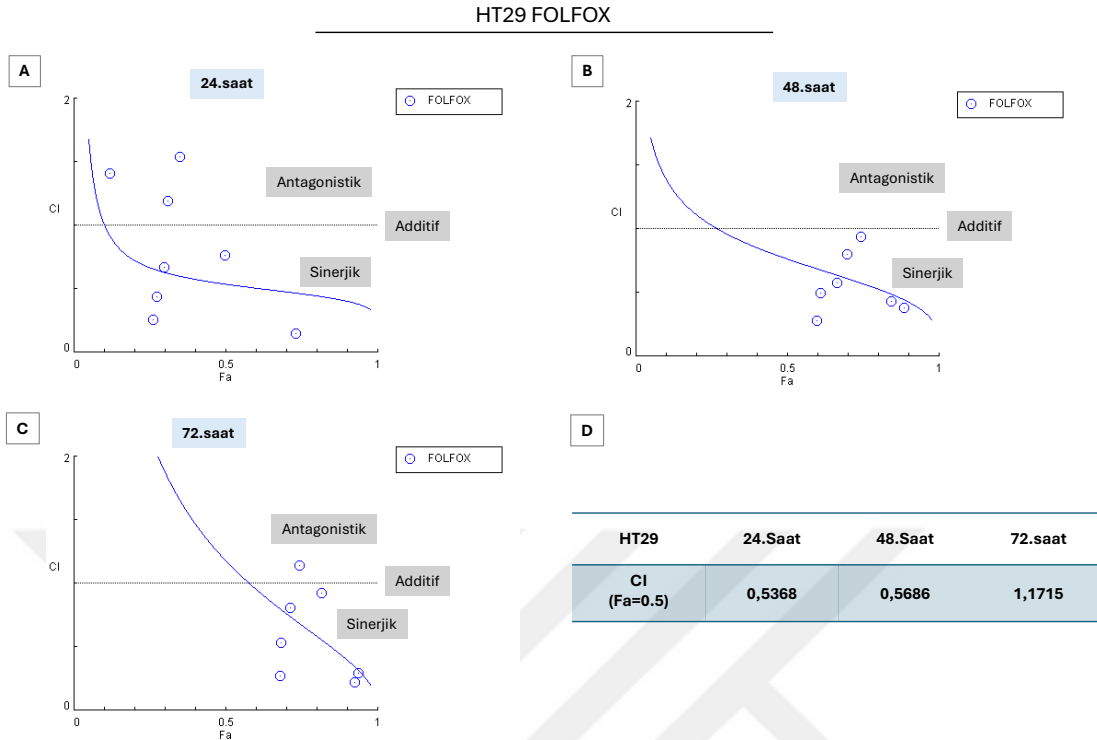
Şekil 4.8’de, CCD-18Co sağlıklı kolon fibroblast hücre hattında FF, IRI ve FOLFIRI kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı üzerindeki doz ve süreye bağlı etkileri verilmiştir. Şekil 4.8 incelendiğinde, yüksek dozlarda (25-50 µM) FOLFIRI’nin sağlıklı hücrelerde belirgin toksik etkiler gösterdiğini, ancak düşük dozlara doğru gidildikçe bu etkinin azaldığını ortaya koymaktadır. Kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinin kemoterapiye daha hızlı yanıt verdiği ve daha düşük dozlarda hücrelerin %50 canlılık seviyesinin altına düştüğü belirlenmiştir. Bu, kullanılan ilaçların kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere kıyasla daha güçlü bir etki mekanizması olduğunu göstermektedir.

Kanser hücreleri tipik bir sağlıklı doku hücresine göre daha hızlı bölünmektedir, bu nedenle hücre bölünmesini etkileyen antineoplastik bileşikler tümörler üzerinde sağlıklı hücrelerden daha fazla etkiye sahiptir. Ancak vücutta hızlı çoğalma özelliğine sahip

kemik iliği dokusu hücreleri, saç folikül hücreleri gibi önemli istisnalar vardır ve bu hücreler antikanser ilaçlara karşı oldukça hassastır. Bu nedenle kemoterapi alan hastalarda kırmızı kan hücrelerinin sayısında düşüş, saç dökülmesi gibi yaygın yan etkiler görülmektedir (Croce ve Reed, 2016). Bilim insanları uzun yıllardır, kemoterapide kullanılan ilaçların yan etkilerini ortadan kaldırmak ve oluşan ilaç direncinin üstesinden gelebilmek için, daha etkili ve tolere edilir antikanser ilaç keşfine odaklanmıştır. Kombinasyonlar, yan etkilerin en aza indirilebilmesi ve ilaç direnci ile mücadele edebilmek için umut verici bir tedavi yaklaşımı olmuştur (Biller ve Schrag, 2021). Bu çalışmada FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının, diferansiye kanser hücrelerine kıyasla dirençli bir profil sergileyen KKH'lerde etkili olan dozlarının, sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkisinin sınırlı olması da literatürde belirtilen, kombinasyon tedavilerinin avantajlarını ortaya koymaktadır. Kombinasyon tedavilerinin doğru doz optimizasyonu, kanser hücrelerini etkili bir şekilde hedeflerken sağlıklı hücreleri koruma konusunda kritik öneme sahiptir (Glimelius ve ark., 2021).

5.2.1 Kombinasyon İndeksi Analizi

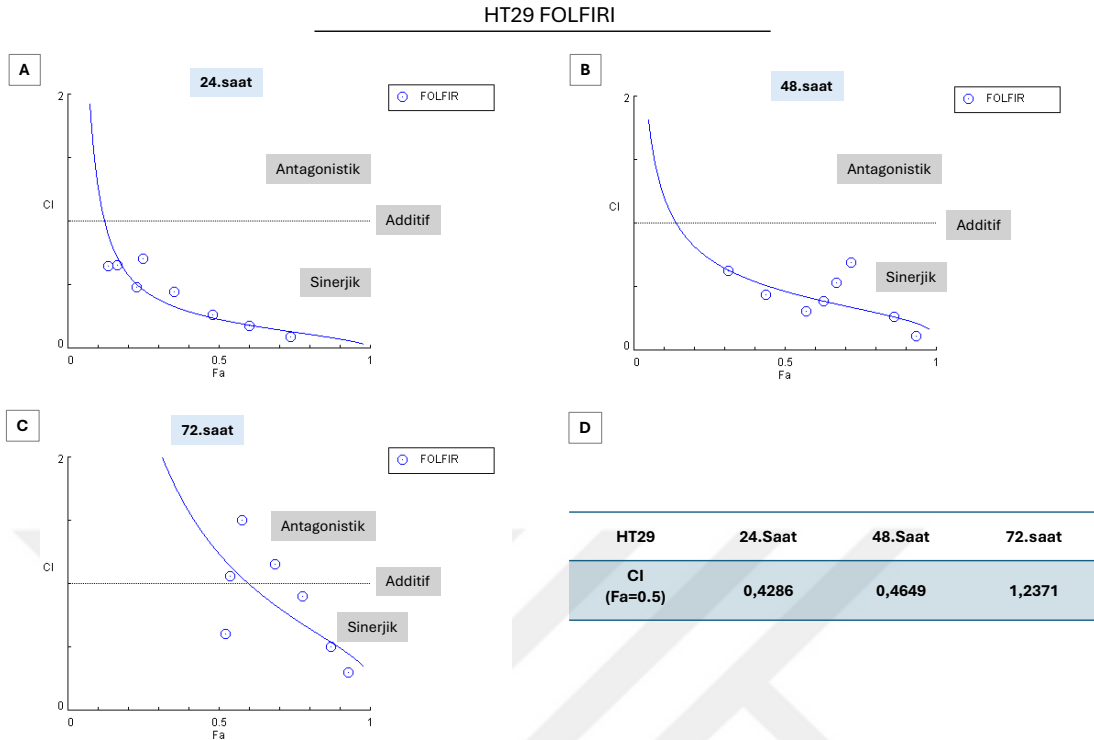
Bu bölümde, HT29 hücreleri ve kanser kök hücrelerinde ilaç kombinasyonlarının etkileşimlerini değerlendirmek amacıyla yapılan Kİ hesaplamalarına dayalı grafikler verilmiştir (Şekil 4.9-4.12). FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının etkinliği, farklı inhibisyon oranları (Fa) göz önüne alınarak karşılaştırılmıştır. Değerlendirme sırasında, ilaç kombinasyonlarının düşük, orta ve yüksek inhibisyon seviyelerinde (Fa = 0.1, 0.5 ve 0.9) sergiledikleri etkinlik profili incelenmiştir. İlaçların hücresel etkileri, uygulanan dozlara bağlı olarak farklı mekanizmalar gösterebilmekte, bu mekanizmalar Kİ değerleriyle görsel olarak ifade edilmektedir (Chou, 2010). Düşük inhibisyon seviyelerinde antagonistik veya additif etkiler görülürken, yüksek inhibisyon seviyelerinde sinerjik etkilerin baskın hale geldiği tespit edilmiştir. Bu durum, literatürde de belirtildiği gibi kombinasyonların etkinliğinin zaman ve doza bağlı olarak optimize edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Zoetemelk ve ark., 2020).



Şekil 4.9 FOLFOX kombinasyonunun HT29 kanser hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik ilaç uygulamalarına ilişkin Kombinasyon İndeks (Kİ) grafikleri

Y eksen, Kombinasyon İndeks (Kİ) değerlerini; X eksen, etkilenmiş hücre fraksiyonunu (Fa) göstermektedir. $KI = 1$, additif etkiyi; $KI < 1$, sinerjik etkiyi; $KI > 1$, antagonistik etkiyi ifade etmektedir. Her bir zaman noktasında, kombinasyonun sinerji, additif etki veya antagonizma profili incelenmiştir.

Şekil 4.9'da FOLFOX kombinasyonunun HT29 kanser hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saat etkileri Kombinasyon İndeks (Kİ) analizi kullanılarak grafikler halinde verilmiştir. Kİ grafikleri, kombinasyonun farklı zaman noktalarındaki etkinliğini sinerjik ($KI < 1$), additif ($KI = 0$) ve antagonistik ($KI > 1$) olarak üç kategoride incelenmiştir. Şekil 4.9 (A)'da 24. saatte kombinasyonun sinerjik etki gösterdiği ancak bazı dozlarda dalgalanmalar olduğu görülmektedir. Bu durum, bazı dozların düzenlenmesi gerektiğini göstermektedir. Şekil 4.9 (B) incelendiğinde, orta ve yüksek inhibisyon seviyelerinde kombinasyonun sinerjik etki gösterdiği görülmektedir. Kombinasyonun 48 saat sonunda güçlü bir sinerjik profil sergilediği tespit edilmiştir. Şekil 4.9 (C)'de kombinasyonun düşük dozlarda ($Fa \leq 0.3$) antagonistik bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda ilaçlar arasında sinerjik etki olduğu tespit edilmiştir.

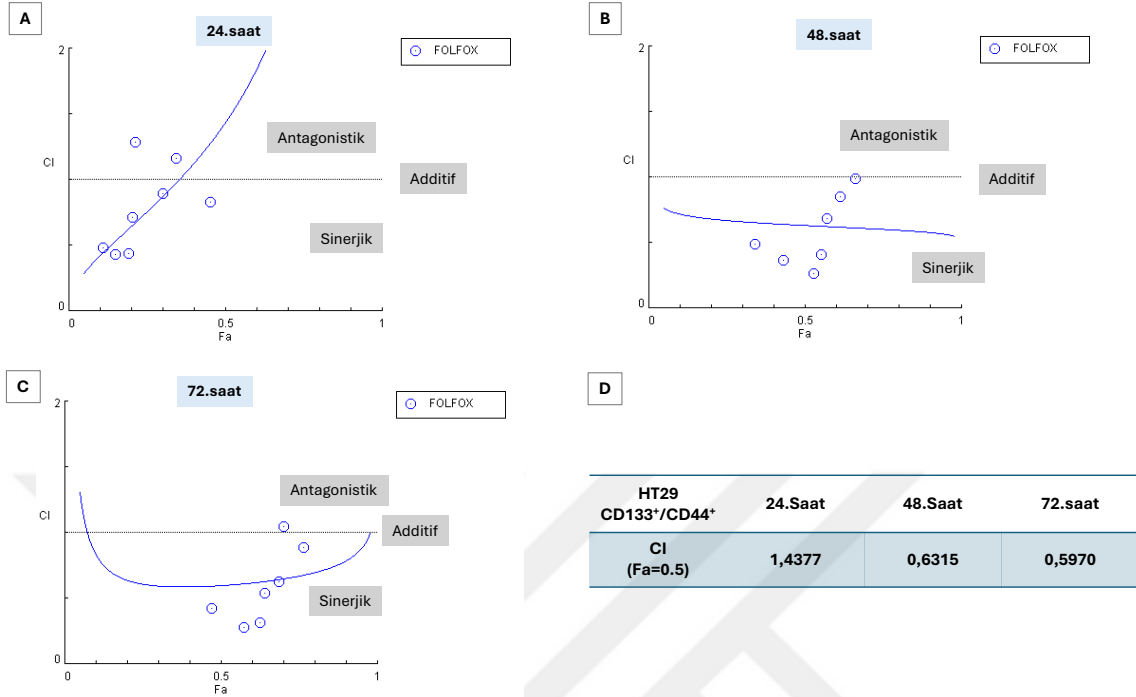


Şekil 4.10 FOLFIRI kombinasyonunun HT29 kanser hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik ilaç uygulamalarına ilişkin Kombinasyon İndeks (Kİ) grafikleri

Y eksen, Kombinasyon İndeks (Kİ) değerlerini; X eksen, etkilenmiş hücre fraksiyonunu (Fa) göstermektedir. $KI=1$, additif etkiyi; $KI<1$, sinerjik etkiyi; $KI>1$, antagonistik etkiyi ifade etmektedir. Her bir zaman noktasında, kombinasyonun sinerji, additif etki veya antagonizma profili incelenmiştir.

Şekil 4.10'da FOLFIRI kombinasyonunun HT29 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik uygulama süreleri boyunca Kİ grafikleri incelendiğinde, tedavi süresinin kombinasyonun etkinliğinde belirleyici bir rol oynadığı görülmektedir. **Şekil 4.10 (A)**'da 24 saatlik ilaç muamelesinden sonra kombinasyon düşük inhibisyon seviyelerinde ($Fa \leq 0.3$) sınırlı sinerji gösterirken, orta ve yüksek ($0.3 < Fa \leq 0.9$) inhibisyon seviyelerinde sinerjik etki gösterdiği tespit edilmiştir. **Şekil 4.10 (B)** incelendiğinde, 48 saatlik sürenin sonunda geniş inhibisyon aralığında ve düşük dozlarda dahi kombinasyonun sinerjik etkisi görülmektedir. **Şekil 4.10 (C)**'de 72 saatte kombinasyon düşük inhibisyon seviyelerinde ($Fa \leq 0.3$) antagonistik bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak yüksek inhibisyon seviyelerinde sinerjik etkinin arttığı görülmektedir.

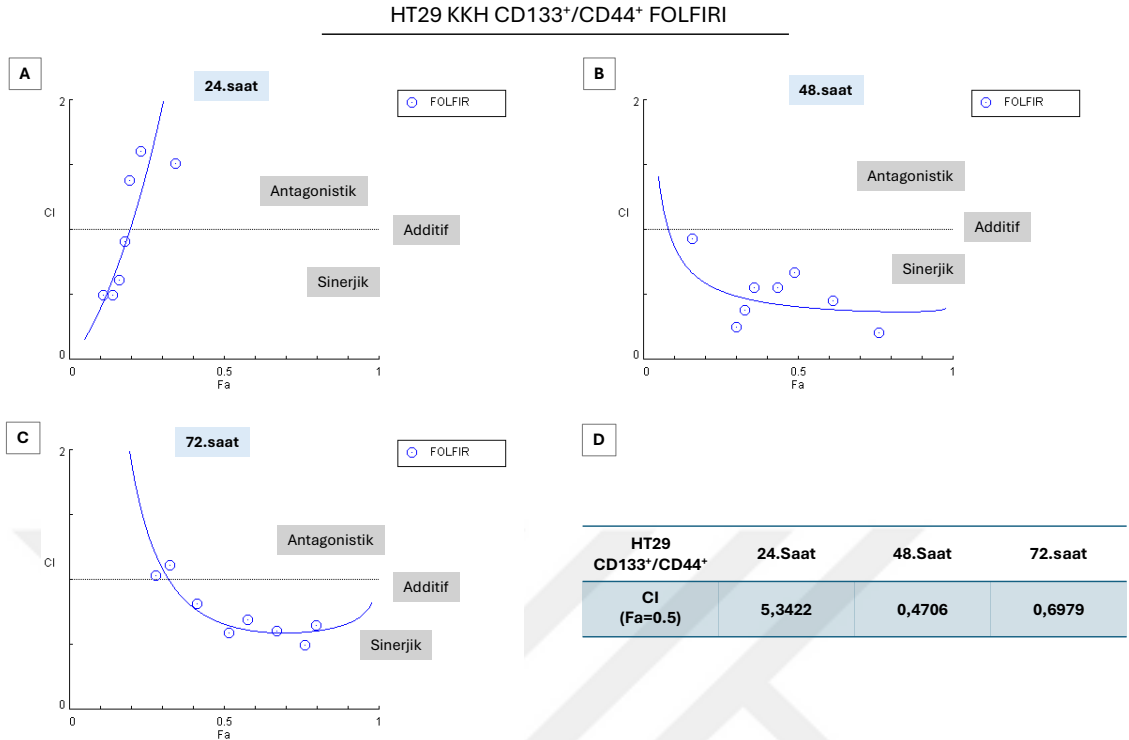
HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺ FOLFOX



Şekil 4.11 FOLFOX kombinasyonunun HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik ilaç uygulamalarına ilişkin Kombinasyon İndeks (Kİ) grafikleri

Y eksen, Kombinasyon İndeks (Kİ) değerlerini; X eksen, etkilenmiş hücre fraksiyonunu (Fa) göstermektedir. Kİ = 1, additif etkiyi; Kİ < 1, sinerjik etkiyi; Kİ > 1, antagonistik etkiyi ifade etmektedir. Her bir zaman noktasında, kombinasyonun sinerji, additif etki veya antagonizma profili incelenmiştir.

Şekil 4.11’de FOLFOX kombinasyonunun HT29 kanser kök hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saat etkileri Kombinasyon İndeks (Kİ) analizi kullanılarak grafikler halinde verilmiştir. Kİ grafikleri, kombinasyonun farklı zaman noktalarındaki etkinliğini sinerjik (Kİ<1), additif (Kİ=1) ve antagonistik (Kİ>1) olarak üç kategoride incelenmiştir. Şekil 4.11 (A)’da Kİ değerlerinin düşük inhibisyon noktalarında (Fa≤0.3) 1’in altında olduğu ve sinerjik etki gösterdiği görülmektedir. Ancak inhibisyon seviyesi yükseldikçe (Fa>0.5) 24 saat sürenin kombinasyonun sinerjik etkisi açısından sınırlı olduğu belirlenmiştir. Bu durum, kombinasyonun etkinliğinin tedavi süresi veya doz ayarlamalarıyla optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir. Şekil 4.11 (B) incelendiğinde, 48 saat sonucunda FOLFOX kombinasyonunun, düşük (Fa≤0.3), orta (Fa=0.4-0.6) ve yüksek (Fa>0.6) inhibisyon seviyelerinde sinerjik bir profil sergilediği belirlenmiştir. Şekil 4.11 (C)’de FOLFOX kombinasyonunun, 72 saatlik sürede hem düşük hem de yüksek inhibisyon seviyelerinde etkili olduğu ve güçlü bir sinerjik etki sergilediği görülmektedir.



Şekil 4.12 FOLFIRI kombinasyonunun HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik ilaç uygulamalarına ilişkin Kombinasyon İndeksi (Kİ) grafikleri

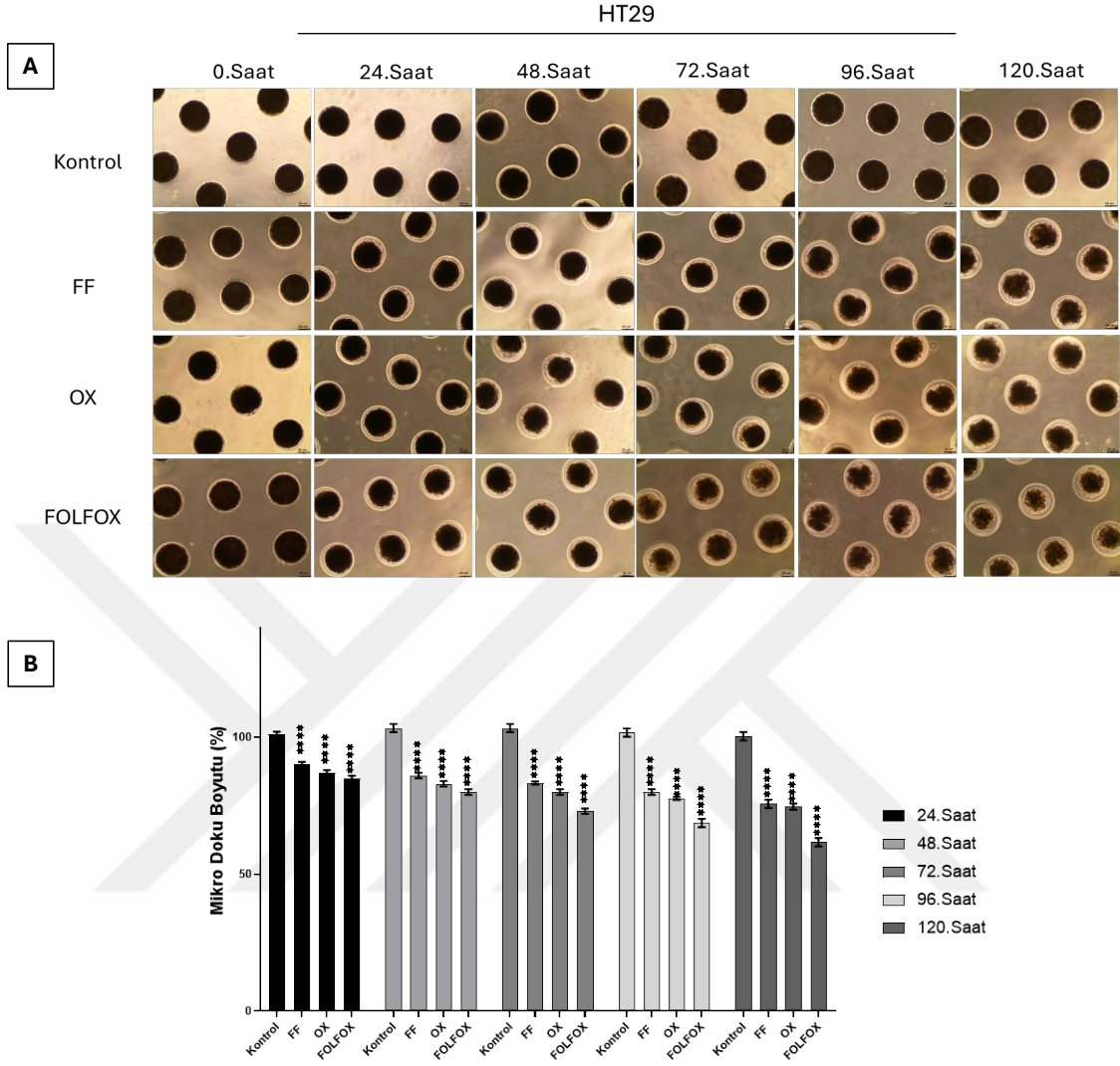
Y eksen, Kombinasyon İndeksi (Kİ) değerlerini; X eksen, etkilenmiş hücre fraksiyonunu (Fa) göstermektedir. Kİ=1, additif etkiyi; Kİ<1, sinerjik etkiyi; Kİ>1, antagonistik etkiyi ifade etmektedir. Her bir zaman noktasında, kombinasyonun sinerji, additif etki veya antagonizma profili incelenmiştir.

Şekil 4.12'de FOLFIRI kombinasyonunun HT29 kanser kök hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saat etkileri Kombinasyon İndeksi (Kİ) analizi kullanılarak grafikler halinde verilmiştir. Kİ grafikleri, kombinasyonun farklı zaman noktalarındaki etkinliğini sinerjik (Kİ<1), additif (Kİ=0) ve antagonistik (Kİ>1) olarak üç kategoride incelenmiştir. **Şekil 4.12 (A)** incelendiğinde, ilk 24 saatlik süre boyunca Kİ değerinin 1'in üzerinde olduğu ve bu durumun kombinasyon içerisindeki bileşiklerin bu süre içinde antagonist bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. 24 saatlik sürenin kombinasyonun etkisi için sınırlı kaldığı belirlenmiştir. **Şekil 4.12 (B)**'de 48 saatlik muamelenin ardından kombinasyonu oluşturan kemoterapi ilaçları FF ve IRI'nin düşük seviyelerde ($Fa \leq 0.4$) dahi Kİ değerinin 1'in altında olduğu görülmektedir. Orta ($0.4 \leq Fa \leq 0.6$) ve yüksek inhibisyon değerlerine ($Fa > 0.6$) bakıldığında Kİ değerinin daha da düşmüş olduğu ve sinerjik etkinin artmış olduğu görülmektedir. **Şekil 4.12 (C)**'de 72 saat sonucu oluşturulan grafik incelendiğinde, düşük inhibisyon noktalarında ilaçların additif

etki göstermeye yakın olduğu ancak inhibisyon seviyesi arttıkça sinerjik etki göstermeye başladığı gör÷lmektedir.

5.3 Kemoterapötik Ajanların ve Kombinasyonlarının Kanseri Hücreleri ve Kanseri Kök Hücreleri Temelli Üç Boyutlu Mikro Dokular Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Bu bölümde, farklı kemoterapötik ajanlar ve kombinasyonlarının kanseri hücreleri ve kanseri kök hücrelerinden oluşturulan üç boyutlu (3B) mikro-dokular üzerindeki etkileri incelenmiştir. 3B hücre kültüründe, organize bir sferoid doku oluşturan hücreler, kompleks bir yapı oluşturarak *in vivo* tümör mikro-çevresini daha gerçekçi bir şekilde taklit etmektedir. Özellikle kanseri kök hücreleri temelli sferoidlerin, kemoterapiye diferansiye hücrelerden daha dirençli bir fenotip sergilemeleri, ilaçların antikanser aktivitelerinin değerlendirildiği çalışmalarda tercih edilmelerindeki en önemli etkidir (Galateanu ve ark., 2016). Çalışma, kanseri hücreleri temelli ve kanseri kök hücreleri temelli mikro-dokuların kemoterapötik ajanlara karşı gösterdiği yanıtları karşılaştırmak amacıyla tasarlanmıştır. Kemoterapi ilaçları ve kombinasyonlarının mikro-dokular üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Sonuçlar, kanseri hücreleri ve kanseri kök hücreleri temelli mikro-dokuların ilaçlara yanıtını ortaya koyarak, kemoterapi kombinasyonlarının potansiyel etkinliğine dair önemli bilgiler sağlamaktadır. Analiz kapsamında oluşturulan mikro-dokuların zamana bağlı çap değişimlerini belirlemek için her gün düzenli olarak mikroskopik görüntüler alınmış ve mikro-doku çapları Image J yazılımı kullanılarak ölç÷lm÷ştür. Elde edilen kantitatif veriler, süreye bağlı ölç÷msel değişimleri değerlendirmek amacıyla GraphPad Prism 9.0.0 yazılımında analiz edilerek grafiksel olarak aşağıda sunulmuştur.

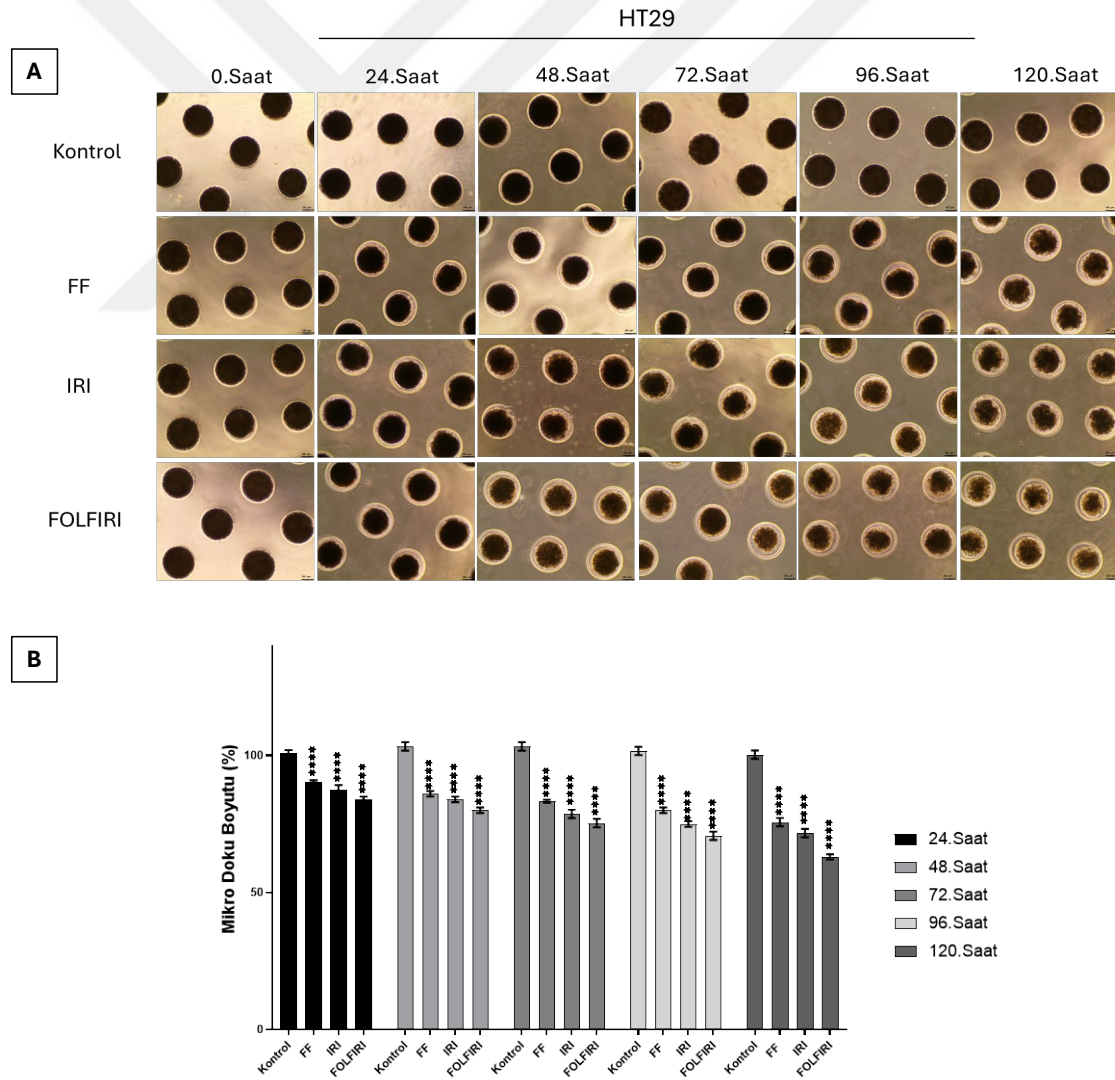


Şekil 4.13 HT29 hücrelerinin kemoterapötik ilaçlar ve kombinasyonları (FF, OX, FOLFOX) ile etkileşiminden sonraki mikro-doku değişimleri

(A) Olympus CK-40-SL inverted mikroskobu ile elde edilen görüntülerde, farklı koşulların HT29 mikro-doku morfolojisi üzerindeki etkileri yapısal değişiklikler üzerinden değerlendirilmiştir. (B) 120 saatlik FOLFOX uygulaması sonrası HT29 mikro-doku boyutundaki küçülmenin yüzdesel analizi. Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.0005$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ vs Kontrol).

Şekil 4.13 (A) ve Şekil 4.13 (B)'de HT29 kanser hücrelerinden oluşturulan üç boyutlu mikro dokuların farklı kemoterapötik ajanlar ve kombinasyonları (FF, OX, FOLFOX) ile 120 saatlik muamele edilme süresinin sonunda mikro-doku küçülme oranlarını gösteren mikroskop görüntüleri ve yüzdesel küçülme grafiği verilmiştir. **Şekil 4.13 (A)**'da mikro dokuların yapısı incelendiğinde, 120 saatlik süre boyunca negatif kontrol grubunda mikro-doku yapısında çok küçük ve ihmal edilebilir değişiklik gözlenmiştir ve kemoterapi ajanları uygulanmadığında mikro-dokuların yapısal bütünlüğünü

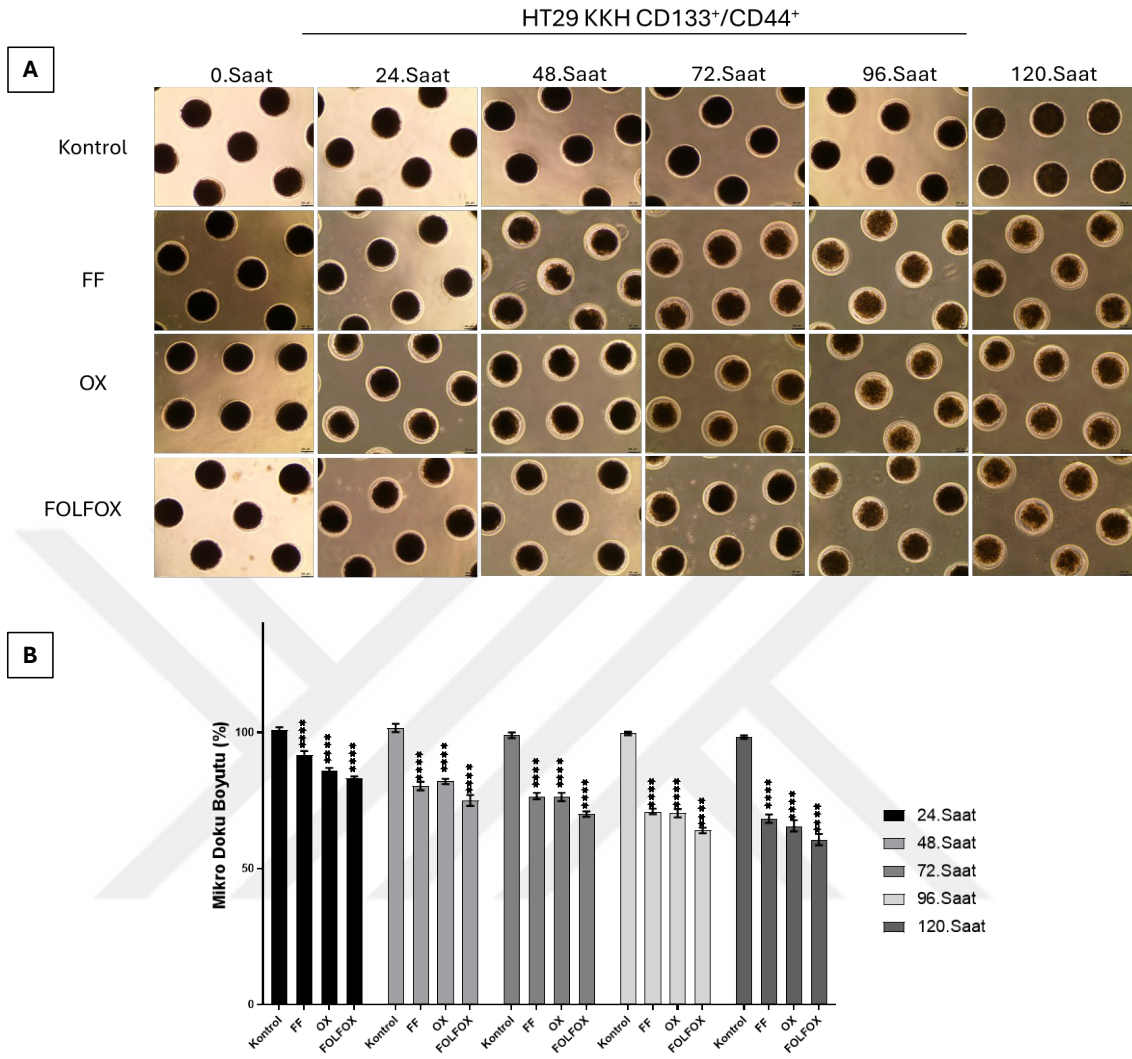
koruduğu ve çaplarında belirgin bir küçülme olmadığı tespit edilmiştir. FF ve OX tekli kemoterapi ilaçları ile muamele edilen mikro-dokulara bakıldığında, zamana bağlı olarak küçülme gözlenmiştir, ancak bu küçülmelerin hücre bütünlüğüne belirgin bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. FOLFOX kombinasyonu ile muamele edilen mikro-dokularda çap küçülmesinin daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. 120 saat FOLFOX ile tedavi edilen mikro-dokularda yapısal bütünlüğün de bozulmaya başladığı görülmektedir. **Şekil 4.13 (B)**'de görüldüğü üzere, 120 saatlik FOLFOX uygulamasının negatif kontrol ile kıyaslandığında çap küçülmesinde en etkili uygulama olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç kolon kanseri hücrelerinde iki boyutlu kültürde olduğu gibi üç boyutlu kültürde de kombinasyon tedavisinin daha etkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.14 HT29 mikro dokuların kemoterapötik ilaçlar ve kombinasyonları (FF, IRI, FOLFIRI) ile etkileşiminden sonraki mikro-doku değişimleri

(A) Olympus CK-40-SL inverted mikroskobu ile elde edilen görüntülerde, farklı koşulların HT29 mikro-doku morfolojisi üzerindeki etkileri yapısal değişiklikler üzerinden değerlendirilmiştir. (B) 120 saatlik FOLFIRI uygulaması sonrası HT29 mikro-doku boyutundaki küçülmenin yüzdesel analizi. Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.0005$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ vs Kontrol).

Şekil 4.14 (A) ve (B)'de HT29 kanser hücrelerinden oluşturulan üç boyutlu mikro-dokuların FF, IRI ve FOLFIRI kemoterapi ajanları ve kombinasyonları ile 120 saatlik inkübasyon sonrası mikro-doku küçülme oranlarını gösteren mikroskop görüntüleri ve yüzdesel küçülme grafiği verilmiştir. **Şekil 4.14 (A) ve (B)** birlikte değerlendirildiğinde, FF ve IRI ile muamele edilen grupların negatif kontrol ile kıyaslandığında mikro-doku boyutunda bir değişikliğe neden olduğu ancak bu değişikliğin mikro-dokunun yapısal bütünlüğünü bozmadığı görülmektedir. FOLFIRI kombinasyonu ile muamele edilen hücreler incelendiğinde en belirgin mikro-doku küçülmesinin kombinasyon uygulaması sonucunda olduğu belirlenmiştir. Literatürde de bildirildiği gibi bu bulgular, kombinasyon uygulamasının tek ajanlara kıyasla daha güçlü bir etki oluşturduğunu göstermektedir (Hammond ve ark., 2016).

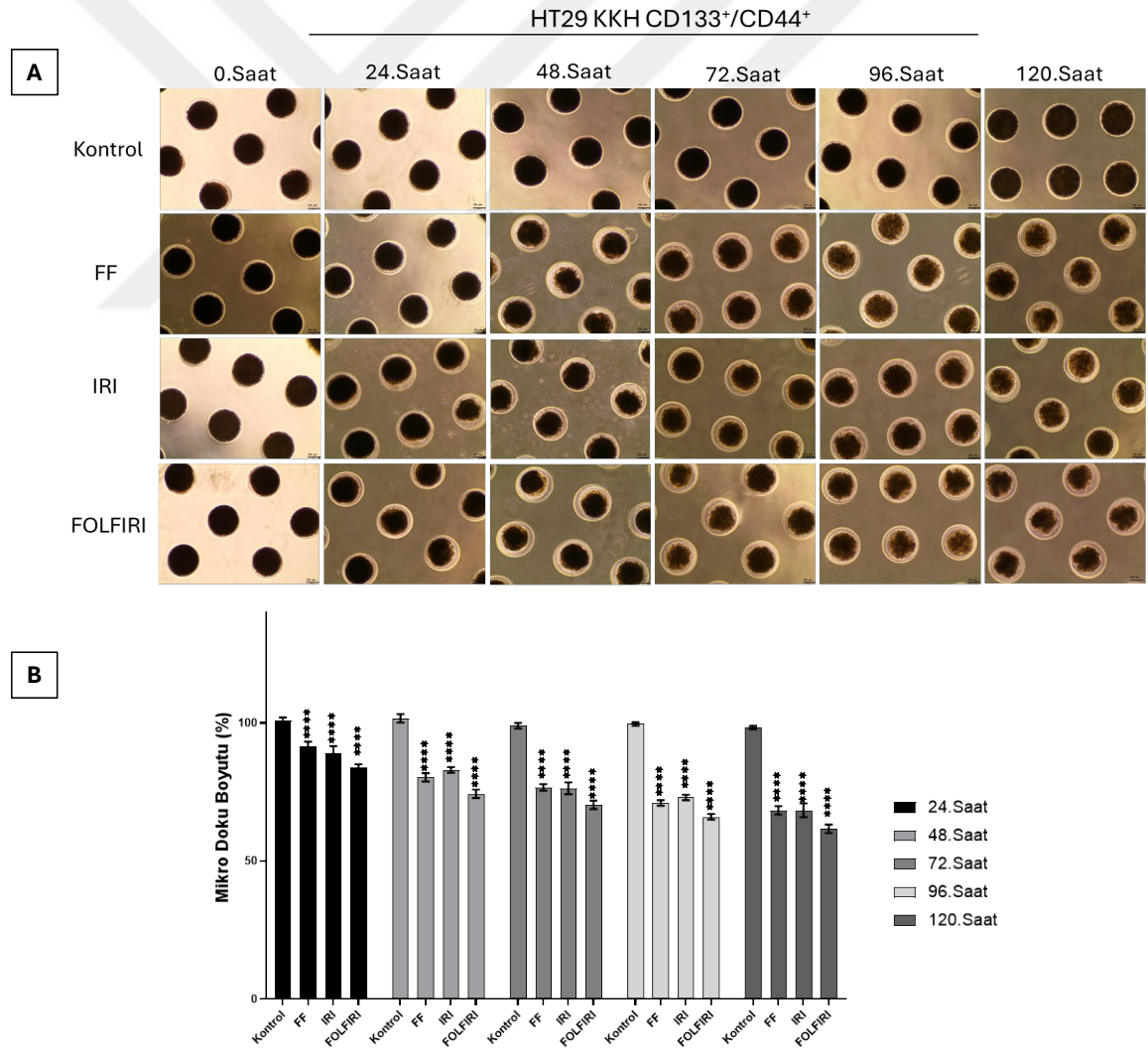


Şekil 4.15 HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺ mikro dokuların kemoterapötik ilaçlar ve kombinasyonları (FF, OX, FOLFOX) ile etkileşiminden sonraki mikro-doku değişimleri

(A) Olympus CK-40-SL inverted mikroskobu ile elde edilen görüntülerde, farklı koşulların HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺ mikro-doku morfolojisi üzerindeki etkileri yapısal değişiklikler üzerinden değerlendirilmiştir. (B) 120 saatlik FOLFOX uygulaması sonrası HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺ mikro-doku boyutundaki küçülmenin yüzdesel analizi. Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (****P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.01, *P≤0.05 vs Kontrol).

Şekil 4.15 (A) ve (B), HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücrelerinden oluşturulan üç boyutlu mikro-dokuların FF, OX ve FOLFOX kemoterapi ajanları ve kombinasyonları ile 120 saatlik inkübasyon sonrası mikro-doku küçülme oranlarını gösteren mikroskop görüntüleri ve yüzdesel küçülme grafiği verilmiştir. **Şekil 4.15 (A) ve (B)** birlikte değerlendirildiğinde, kontrol grubu mikro-dokuların inkübasyon süreci boyunca mikro-doku boyutunda bir değişiklik olmadığı ve mikro-dokular kemoterapi ajanları veya kombinasyonları ile muamele edilmediğinde yapısal olarak etkilenmediği belirlenmiştir.

FF ve OX ile inkübe edilen mikro-dokular incelendiğinde, bu kemoterapi ajanlarının mikro-doku boyutunda bir küçülmeye neden olduğu görülmüştür. Ancak bu etki sınırlı kalmıştır ve mikro-doku çapında önemli bir değişiklik oluşmadığı tespit edilmiştir. FOLFOX kombinasyona maruz bırakılan kök hücre temelli mikro dokularda çap küçülmesi daha belirgin bir şekilde görülmektedir. 120 saatlik süre sonunda, kök hücre temelli mikro-dokuların çapında belirgin bir azalma ve yapısal bütünlükte bozulma vardır, ancak bu etki kanser hücre temelli dokulara kıyasla daha sınırlıdır. FOLFOX kombinasyonunun kanser kök hücreleri üzerinde etkili olmakla birlikte, kanser hücreleri üzerindeki kadar güçlü bir etki göstermemesi kök hücrelerin daha dirençli yapısını ortaya koymaktadır (Dean ve ark., 2005).



Şekil 4.22 HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺ mikro dokuların kemoterapötik ilaçlar ve kombinasyonları (FF, IRI, FOLFIRI) ile etkileşiminden sonraki mikro-doku değişimleri

(A) Olympus CK-40-SL inverted mikroskobu ile elde edilen görüntülerde, farklı koşulların HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺ mikro-doku morfolojisi üzerindeki etkileri yapısal değişiklikler üzerinden değerlendirilmiştir. (B) 120 saatlik FOLFIRI uygulaması sonrası HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺ mikro-doku boyutundaki küçülmenin yüzdesel analizi. Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (****P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.01, *P≤0.05 vs Kontrol).

Şekil 4.16 (A) ve (B)'de HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücrelerinden oluşturulan üç boyutlu mikro dokuların FF, IRI ve FOLFIRI kemoterapi ajanları ve kombinasyonları ile 120 saatlik inkübasyon sonrası mikro-doku çapı küçülmelerini gösteren mikroskop görüntüleri ve yüzdesel küçülme grafiği verilmiştir. **Şekil 4.16 (A) ve (B)** birlikte değerlendirildiğinde, FF ve IRI ile muamele edilen gruplarda, çapta belirli düzeyde bir küçülme olduğu belirlenmiştir. Ancak tekli kemoterapi ajanlarının bu etkisinin sınırlı olduğu görülmektedir. Bu durum, tek ajanların kök hücre temelli üç boyutlu mikro-dokularda güçlü bir sitotoksik etki yaratmadığını göstermektedir. FOLFIRI ile muamele edilen grupta, özellikle 96 ve 120 saat aralıklarında mikro-dokularda belirgin bir küçülme gözlenmektedir. Bununla birlikte, FOLFIRI ilaç kombinasyonunun tekli ajanlara göre daha yüksek bir etki gösterdiği, ancak yine de kök hücre temelli mikro-dokularda yapısal bozulmanın sınırlı kaldığı görülmektedir.

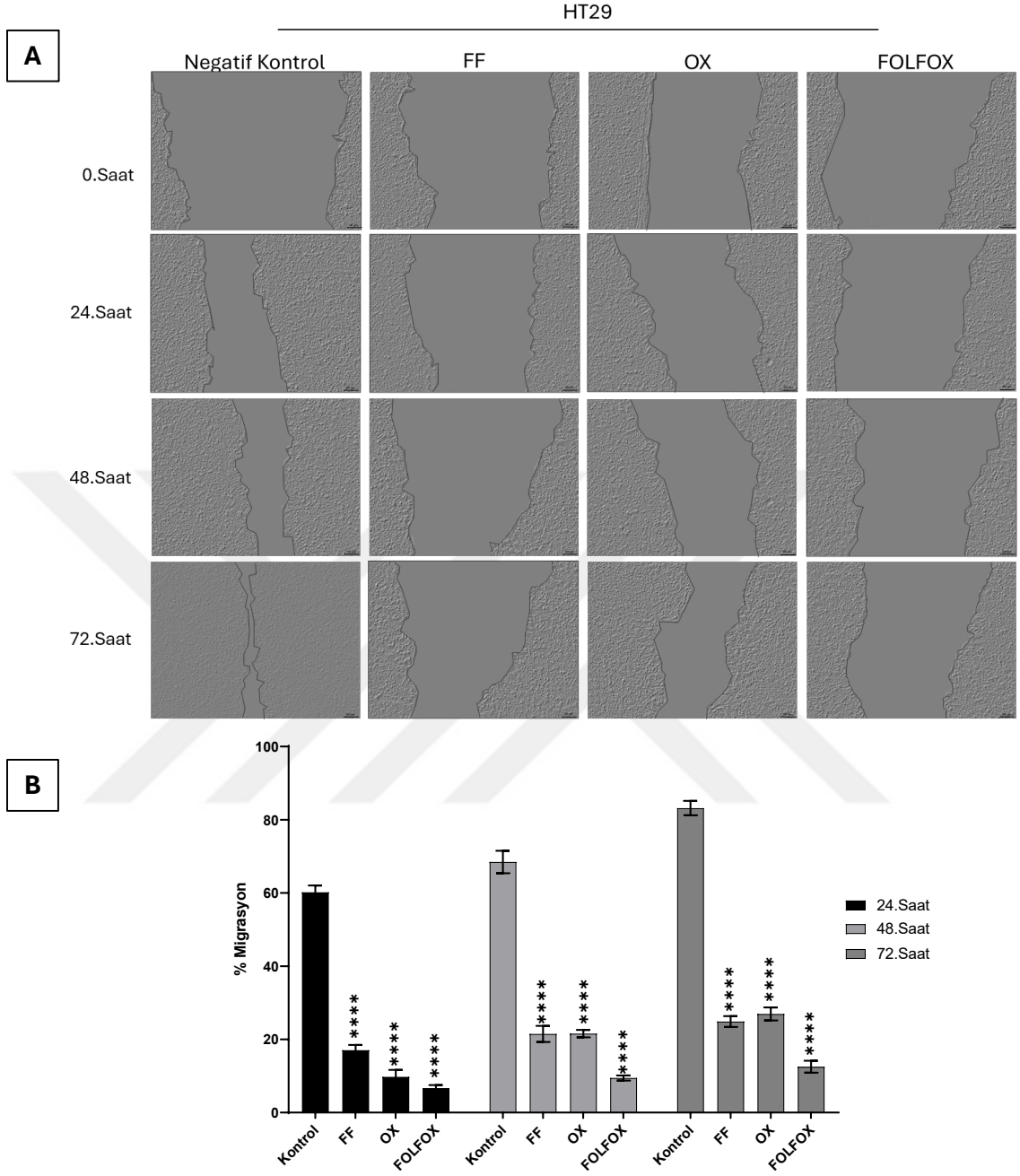
FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonları, kanser hücrelerinde DNA replikasyonunu engelleyerek hücre ölümüne sebep olmaktadır. Ancak kombinasyon içindeki ilaçların etkinlik mekanizması, tümör dokusunun heterojen yapısına ve mikro-çevreyle olan ilişkisine bağlı olarak farklılık göstermektedirler. 3B kültürlerde yapılan bu çalışmada FOLFOX kombinasyonun daha etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak hem diferansiye hücre temelli hem de kanser kök hücre temelli mikro-dokuların tamamen inhibisyonu söz konusu değildir. Bu durum literatürde bildirildiği gibi 3B tümör dokusunun heterojen yapısından, bu hücrelerin yavaş hücre döngüsü ve güçlü DNA onarım kapasitelerinden kaynaklanmaktadır (Iyer ve ark., 2019).

5.4 *In Vitro* Çizik (Scratch) Testi ile Migrasyon Yeteneğinin Değerlendirilmesi

Tez çalışmasının bu aşamasında, *in vitro* çizik testi ile HT29 kolon kanseri hücreleri ve HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde, kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları ile muamele edilmesi sonucunda hücrelerin migrasyon yetenekleri değerlendirilmiştir. MTT canlılık analizi sonucunda her bir kemoterapi ilacı ve

kombinasyonu için hesaplanan 48. saat IC_{50} konsantrasyonu kullanılarak hücreler 72 saat kemoterapi ajanlarına maruz bırakılmıştır. Tez çalışması kapsamında 48. saat IC_{50} dozu ile ilerlememizin temel nedeni, kemoterapi ajanları ve kombinasyonlarının toksik etkilerden bağımsız olarak hücre göçü üzerindeki spesifik etkilerinin değerlendirilmesini sağlamaktır. Çizik testinde, hücreler %90-95 konfluensiye ulaştıklarında steril bir pipet ucuyla yara alanı oluşturulmuştur. Daha sonra hücrelere hesaplanan dozlarda kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları eklenmiştir. İnkübasyon süresi boyunca, hücrelerin göç etme yetenekleri 24 saatlik periyotlarda mikroskopik görüntüleme ile takip edilmiştir. 72 saat sonunda elde edilen görüntüler Image J yazılımı ile analiz edilerek, hücrelerin farklı uygulama gruplarındaki migrasyon hızları yara alanının genişliğinin ölçülmesiyle kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen veriler, kemoterapi ajanlarının ve kombinasyonlarının hücre göçünü sınırlama potansiyelini analiz etmek amacıyla incelenmiş ve ilaç uygulaması yapılan hücrelerdeki migrasyon hızları, kontrol grubuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bu analizler, kemoterapötik ajanların kanser ve kanser kök hücrelerinde migrasyon üzerindeki etkilerini ortaya koyarak, metastatik sürecin inhibisyonu açısından önemli bilgiler sağlamıştır.

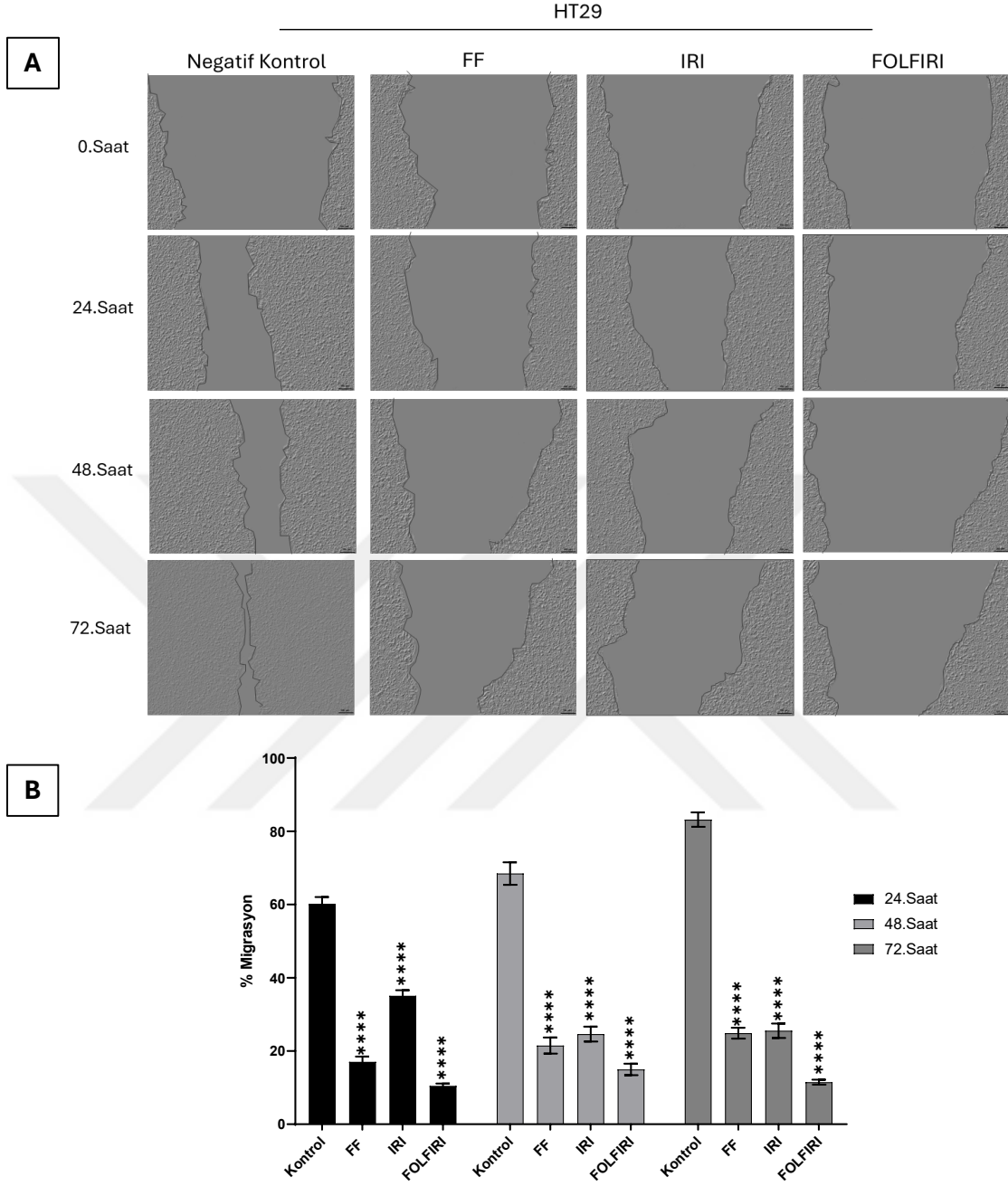


Şekil 4.17 HT29 kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının çizik testi (scratch assay) ile migrasyon üzerine etkileri

(A) Negatif kontrol, FF, OX ve FOLFOX ile muamele edilen hücrelerin, 0, 24, 48 ve 72 saatlik zaman noktalarındaki çizik alanının mikroskop görüntüleri. (B) 72 saat sonunda çizik kapanma yüzdelерinin kantitatif analizi. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). İstatistiksel analizler, negatif kontrol grubuna kıyasla yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

Şekil 4.17, HT29 kolon kanseri hücrelerinin farklı kemoterapi ajanlarına (FF, OX ve FOLFOX) maruz bırakıldıktan sonra migrasyon yeteneklerinin *in vitro* çizik testi ile değerlendirilmesini göstermektedir. **Şekil 4.17 (A)**'da kemoterapi ajanları ve

kombinasyonları ile muamele edilen hücrelerin zaman içindeki yara alanı kapanma oranları incelenmiş ve 72 saat sonunda hücrelerin migrasyon yüzdesi kantitatif olarak analiz edilmiştir. Negatif kontrol grubu incelendiğinde, 72 saat sonunda yara alanında belirgin bir kapanma görülmektedir. Elde edilen bu sonuç, kemoterapi ilaçları ile muamele edilmeyen kanser hücrelerinin migrasyon yeteneklerini koruyarak zaman içinde hızla boşlukları kapattığını göstermektedir. FF ve OX tekli kemoterapi ilaçlarının uygulandığı hücre görüntülerine bakıldığında, negatif kontrol ile kıyasla, kapanma oranında belirgin bir azalma olduğu belirlenmiştir. Kemoterapi ajanlarının kolon kanseri hücrelerinde negatif kontrol ile kıyaslandığında, hücre migrasyonunu engellediği tespit edilmiştir. FOLFOX kombinasyonu uygulanan hücrelere bakıldığında, yara alanının kapanmasının oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Bu bulgular, FOLFOX ile muamele edilen kolon kanseri hücrelerinde hücre göçünün baskılandığını göstermektedir. **Şekil 4.17 (B)**'de verilen grafik değerlendirildiğinde, yüzde migrasyon değerinin en düşük FOLFOX ile muamele edilen hücrelerde olduğu görülmektedir. FOLFOX kombinasyonunun 72 saat sonunda neredeyse migrasyonu tamamen engellediğinin belirlenmesiyle, kombinasyonun tekli ajanlara kıyasla kanser hücrelerinin yayılma kapasitesini engellemede daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Kemoterapi ajanlarının sadece hücre canlılığını değil, aynı zamanda hücre göç yeteneğini de baskılayabilmesi, kemoterapötik etkinliğini artıran önemli bir faktördür.

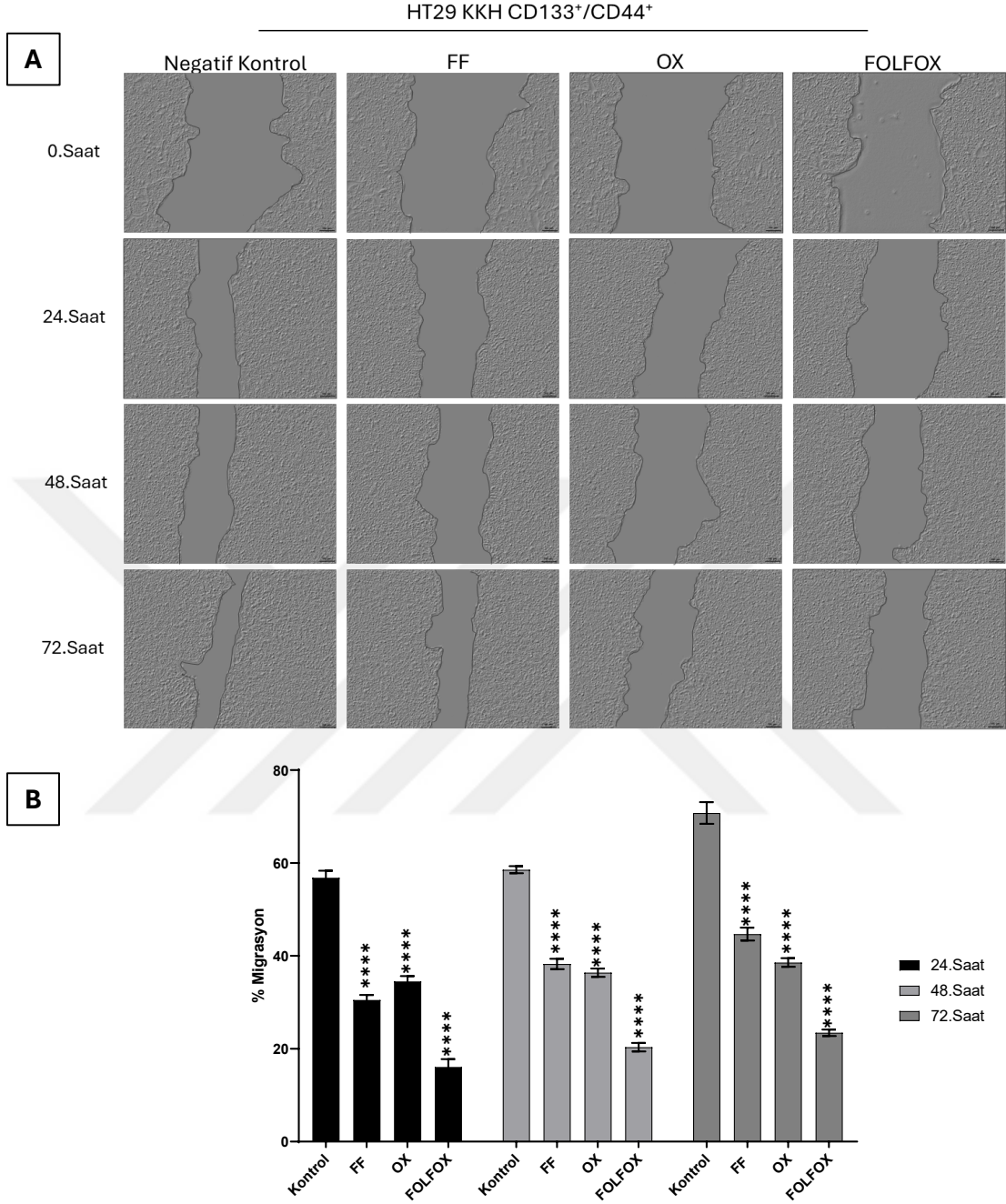


Şekil 4.18 HT29 kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının çizik testi (scratch assay) ile migrasyon üzerine etkileri

(A) Negatif kontrol, FF, IRI ve FOLFIRI ile muamele edilen hücrelerin 0, 24, 48 ve 72 saatlik zaman noktalarındaki çizik alanının mikroskop görüntüleri. (B) 72 saat sonunda çizik kapanma yüzdelерinin kantitatif analizi. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). İstatistiksel analizler, negatif kontrol grubuna kıyasla yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

Şekil 4.18'de, HT29 kolon kanseri hücrelerinin farklı kemoterapi ajanlarına (FF, IRI ve FOLFIRI) maruz bırakıldıktan sonra migrasyon yeteneklerinin *in vitro* çizik testi ile değerlendirilmesinin sonuçları verilmiştir. **Şekil 4.18 (A)**'da görüldüğü üzere, negatif

kontrol grubunda, 72 saat sonunda çizik alanının büyük ölçüde kapandığı gözlenmiştir. Bu sonuç, kemoterapi ajanı ile muamele edilmeyen kanser hücrelerinin doğal migrasyon yeteneklerini koruduğunu ve yara alanını hızla doldurabildiğini göstermektedir. FF ve IRI ile muamele edilen hücre gruplarında yara alanının kapanma oranında bir azalma görülmektedir. Kemoterapi ajanlarının tekli kullanımı hücrelerin migrasyonunu kısmen engellemiş olsa da yara alanının kapanması tamamen engellenememiştir ve migrasyon yeteneği bir ölçüde korunmuştur. Özellikle 48 ve 72 saat sonrasında yara alanında kapanmalar tespit edilmiştir. FOLFIRI kombinasyon muamelesi, yara alanının kapanmasını en etkin şekilde engelleyen uygulama olarak öne çıkmaktadır. 48 ve 72 saatlik zaman noktalarında yara alanında çok az kapanma gerçekleşmiştir, bu da FOLFIRI kombinasyonunun kanser hücrelerinin migrasyon yeteneğini belirgin bir şekilde baskıladığını göstermektedir. **Şekil 4.18 (B)**'de kantitatif analiz sonuçlarına göre, FOLFIRI grubunun çizik kapanma yüzdesi en düşük değere ulaşmıştır ve bu azalış istatistiksel olarak oldukça anlamlıdır (**** $p<0.0001$). FOLFIRI kombinasyonunun migrasyonu neredeyse tamamen durdurması, metastatik potansiyeli yüksek olan kanser hücrelerinin yayılımını engelleme açısından önemlidir. FF ve IRI ajanları tek başına bu derece etkili değilken, FOLFIRI kombinasyonunun sinerjik etkisi, hücre göçünü en düşük seviyeye indirmektedir.

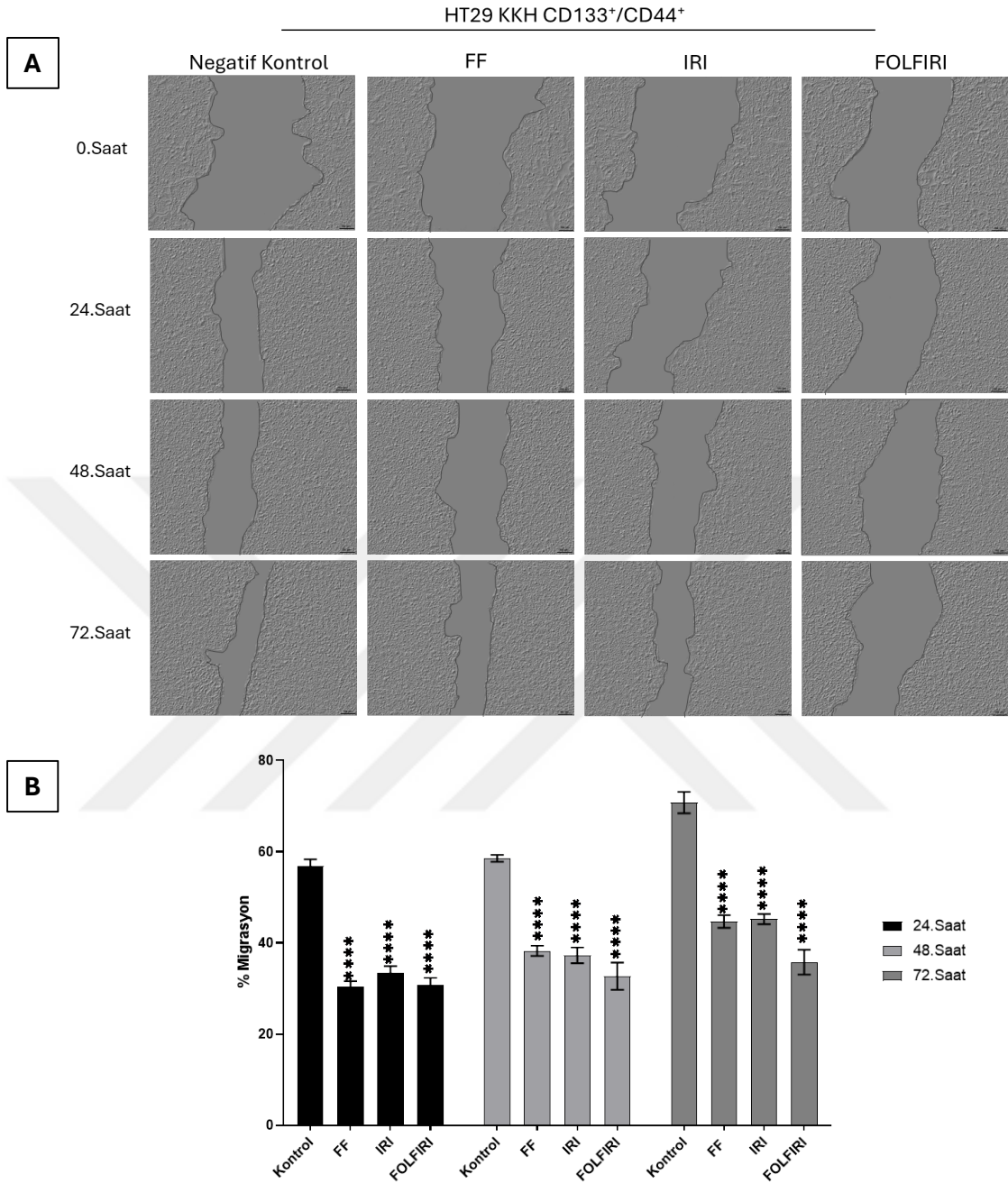


Şekil 4.19 HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının çizik testi (scratch assay) ile migrasyon üzerine etkileri

(A) Negatif kontrol, FF, OX ve FOLFOX ile muamele edilen hücrelerin, 0, 24, 48 ve 72 saatlik zaman noktalarındaki çizik alanının mikroskop görüntüleri. (B) 72 saat sonunda çizik kapanma yüzdelерinin kantitatif analizi. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). İstatistiksel analizler, negatif kontrol grubuna kıyasla yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

Şekil 4.19'da HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücreleri üzerinde FF, OX ve FOLFOX kemoterapi ajanlarının çizik testi (scratch assay) ile migrasyon yeteneklerine etkisini verilmiştir. Çizik testi, kök hücrelerin göç yeteneğini değerlendirmekte olup, farklı

kemoterapi ajanlarıyla muamele edilen hücre gruplarının 0, 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde yara alanının kapanma oranlarını incelemektedir. Ayrıca **Şekil 4.19 (B)**'de, 72 saat inkübasyon sonunda çizik kapanma yüzdesinin kantitatif analiz verileriyle oluşturulan grafik sunulmuştur. **Şekil 4.19 (A)**'da görüldüğü üzere, kontrol grubunda 72 saat sonunda yara alanı önemli ölçüde kapanmıştır, bu da kök hücrelerin ilaçla muamele edilmediğinde yüksek bir migrasyon yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. FF ve OX ile muamele edilen hücre gruplarında yara alanının kapanma oranında bir azalma görülmektedir. Ancak, hücrelerin migrasyon yeteneğinin tamamen baskılanamadığı tespit edilmiştir. FOLFOX kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerde ise, yara alanının kapanma oranı belirgin şekilde azaldığı görülmektedir. FOLFOX kombinasyonunun kök hücrelerde göç yeteneğini baskılama açısından FF ve OX'e göre daha etkili olduğu ve hücrelerin migrasyon kapasitesini sınırladığı belirlenmiştir. Kök hücrelerin kanser hücrelerine kıyasla genel olarak kemoterapötik ajanlara daha dirençli olduğu göz önünde bulundurulduğunda, FOLFOX kombinasyonunun kök hücrelerin migrasyon yeteneğini baskılamada etkili olması önemli bir bulgu olarak öne çıkmaktadır (Loret ve ark., 2019).



Şekil 4.20 HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının çizik testi (scratch assay) ile migrasyon üzerine etkileri

(A) Negatif kontrol, FF, IRI ve FOLFIRI ile muamele edilen hücrelerin 0, 24, 48 ve 72 saatlik zaman noktalarındaki çizik alanının mikroskop görüntüleri. Hücre migrasyonunun zaman içerisindeki değişimi değerlendirilmiştir. (B) 72 saat sonunda çizik kapanma yüzdelere kantitatif analizi. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (****P $\leq$ 0.0001, ***P $\leq$ 0.0005, **P $\leq$ 0.01, *P $\leq$ 0.05 vs Kontrol).

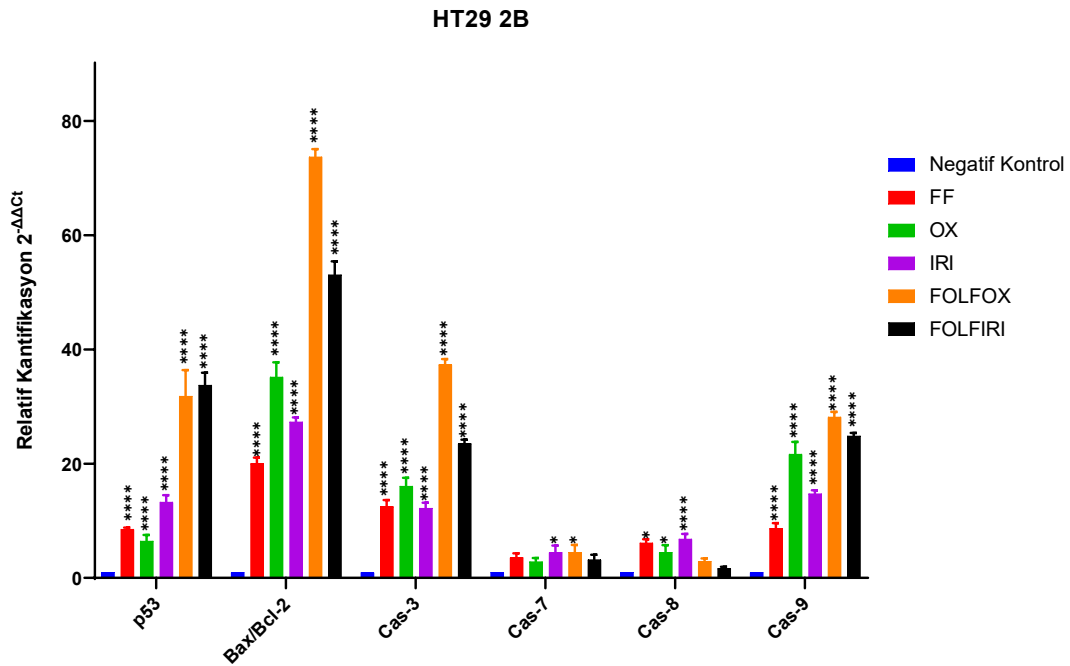
Şekil 4.20'de, HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücrelerinde FF, IRI ve FOLFIRI kemoterapi ajanlarının çizik testi (scratch assay) ile migrasyon yetenekleri üzerindeki etkisi verilmiştir. **Şekil 4.20 (A)** incelendiğinde, kontrol grubunda 72 saat sonunda yara

alanının büyük ölçüde kapanmış olduğu görülmektedir, bu durum kök hücrelerin kemoterapi ajanları ile muamele edilmediğinde güçlü bir migrasyon yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. FF ve IRI ile tedavi edilen gruplarda çizik kapanma oranında belirgin bir azalma olduğu belirlenmiştir; ancak hücrelerin migrasyon yetenekleri devam etmektedir. FOLFIRI kombinasyonuna maruz bırakılan hücrelerde ise, yara alanının kapanma oranı en düşük seviyede kalmış olduğu tespit edilmiştir. 72 saat sonunda çizik alanında gözlenen sınırlı kapanma, FOLFIRI'nin kök hücrelerin migrasyonunu etkili bir şekilde engellediğini ve hücrelerin göç kapasitesini ciddi şekilde sınırladığını göstermektedir. **Şekil 4.20 (B)**'de FOLFIRI kombinasyon uygulamasının hücreler üzerinde kapanma yüzdesi en düşük değeri gösterdiği görülmektedir ve migrasyonu baskılama oranının istatistiksel olarak da anlamlı olduğu tespit edilmiştir (**** $p < 0.0001$). Bu durum literatürle uyumlu olarak, FOLFIRI kombinasyon uygulamasının metastatik hücrelerin yayılımını sınırlamada yüksek etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir (Guichard ve ark., 1998; Mans ve ark., 1999).

5.5 Gen Ekspresyon Profillerinin Kantitatif Real-Time PCR ile Değerlendirilmesi

Tez çalışmasının bu basamağında, HT29 kolon kanseri hücreleri ve CD133⁺/CD44⁺ yüzey belirteçlerine sahip HT29 kanser kök hücrelerinin, tekli kemoterapi ajanları (FF, OX, IRI) ve bu ajanların kombinasyonları (FOLFOX ve FOLFIRI) ile muamele edilmesinin ardından gen ekspresyon profilleri kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu amaçla, her bir kemoterapi ajanı ve kombinasyonları için MTT analizinden elde edilen 48. saat IC₅₀ dozları uygulanmıştır. IC₅₀, bir ilacın hücre proliferasyonunu %50 oranında inhibe ettiği konsantrasyonu ifade eder ve hücrelerin ilaçlara karşı duyarlılığını değerlendirmede standart bir ölçüt olarak kullanılmaktadır (Tayhan ve ark., 2022). 48 saat ise, hücrelerin ilaca karşı belirgin bir biyolojik yanıt geliştirmesi için yeterli bir süre sunmaktadır. Bu süre zarfında, ilacın etkisiyle hücrelerdeki gen ekspresyon düzeyleri değişmeye başlamakta ve bu değişimler gözlemlenebilir hale gelmektedir. Daha kısa sürelerde genetik yanıt yetersiz olabilirken, daha uzun süreler ilaç etkisinin aşırıya kaçmasına veya hücresel stresin baskın hale gelmesine yol açabilmektedir (Evans ve ark., 2019). Bu çalışmada, **Yöntem 3.2.6**'da da

belirtildiği gibi, literatürde vurgulanan 2B ve 3B kültür koşullarında çoğaltılan hücrelerin göstermiş oldukları farklılıklardan dolayı, 2B kültürde yapılan MTT analizi sonucunda belirlenen 48.saat IC₅₀ dozları 3B kültürdeki hücrelere 120 saat inkübasyon süresi ile uygulanmıştır (Vinci ve ark., 2012). Hücrelerden TRIzol yöntemiyle izole edilen RNA örnekleri, Revers Transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. Metastaz, invazyon, epitel-mezenkimal geçiş (EMT) ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri, *GAPDH* referans geni aracılığıyla normalize edilmiş ve 2^{-ΔΔCt} yöntemi ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, gen ekspresyon profillerindeki değişimlerin ilaç uygulamalarına yanıt olarak gösterdiği farklılıkları ortaya koymak amacıyla GraphPad Prism 9.0.0 yazılımında analiz edilerek sunulmuştur.

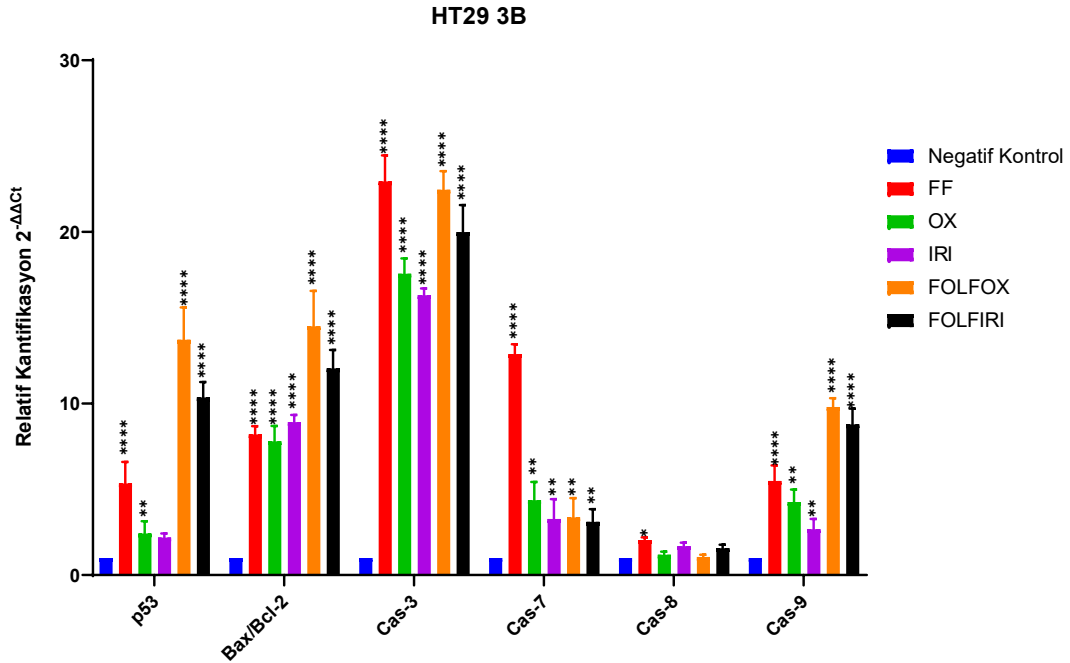


Şekil 4.21 HT29 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerine etkileri

Grafik, *p53*, *Bax/Bcl-2*, *Cas-3*, *Cas-7*, *Cas-8* ve *Cas-9* genlerinin relatif kantifikasyonunu (2^{-ΔΔCt}) göstermektedir. Çalışma grupları (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI), negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla analiz edilmiştir. Veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (****P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.01, *P≤0.05 vs Kontrol).

Şekil 4.21’de insan kolon kanseri HT29 hücreleri ile oluşturulan iki boyutlu (2B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI’nin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda apoptozla ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir.

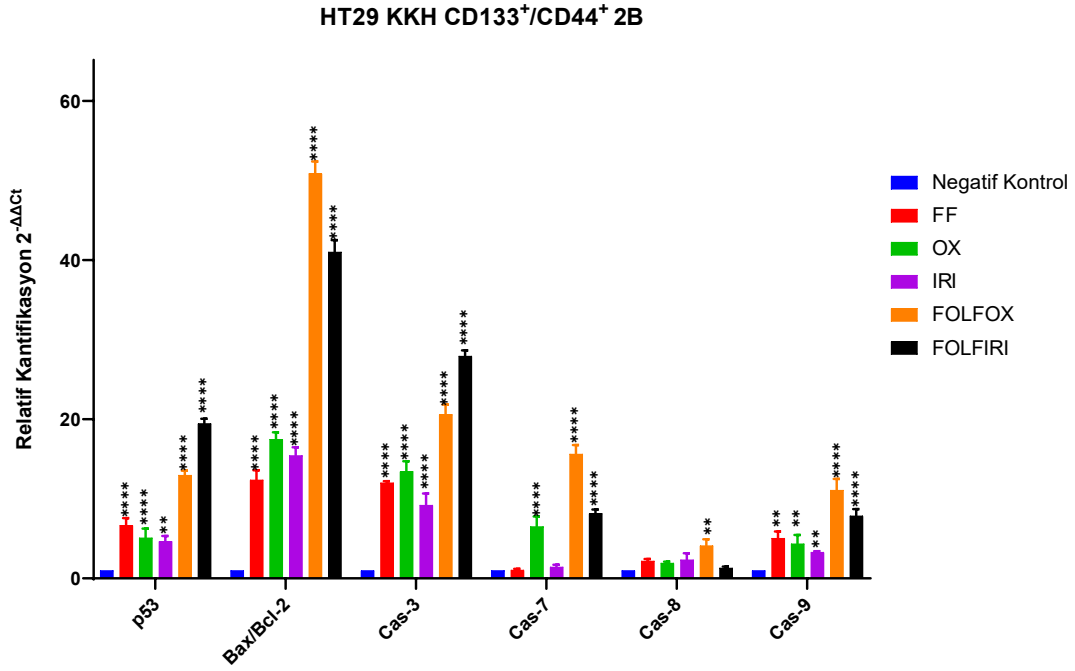
Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında kemoterapi ajanlarının ve kombinasyonlarının hücre ölümüne yol açan genetik mekanizmalar üzerindeki etkileri görülmektedir. *p53*, DNA’da meydana gelen hasar sonucunda veya hücrel strese yanıt olarak programlı hücre ölümü olan apoptozu indükleyen, tümör baskılayıcı bir gendir (Mohd Faheem ve ark., 2022). **Şekil 4.21** incelendiğinde, kemoterapi kombinasyonları ile muamele edilmesi sonucunda HT29 hücrelerinde hem FOLFOX hem de FOLFIRI *p53*’ün ekspresyon seviyesini belirgin bir şekilde artırmıştır. Negatif kontrol ile kıyaslandığında kombinasyon ajanlarının tek tek kullanılmasının da *p53* seviyesini artırmış olduğu görülmektedir. Ancak bu artışın kombinasyon sonuçları ile kıyaslandığında sınırlı olduğu belirlenmiştir. *Bax/Bcl-2* oranı, hücrelerin apoptoz sürecine girmesinde kritik bir öneme sahiptir. Bu oranın düşük olması, hücrede apoptoz sürecinin baskılandığını gösterirken yüksek olması da apoptozun indüklendiğini göstermektedir (An ve ark., 2019). HT29 hücrelerinin iki boyutlu kültürde kombinasyonlar ile 48 saat muamele edilmesinin (FOLFOX ve FOLFIRI) *Bax/Bcl-2* oranını ciddi şekilde artırmış olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, literatürle uyumlu olarak, ilaçların tek tek kullanılmasına kıyasla, kombinasyon şeklinde kullanılmasının hücre ölümüne yol açma potansiyellerini güçlü bir şekilde artırdıklarını göstermektedir (Lan ve ark., 2021). Benzer şekilde hücre ölümünde önemli enzimler olan kaspazların ekspresyon seviyelerinin de kombinasyona maruz bırakılan hücre gruplarında daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca **Şekil 4.21**’de görüldüğü üzere, kemoterapi ajanlarının *Cas-9* enziminin ekspresyon seviyesini daha çok artırdığı belirlenmiştir. FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının, hücredeki apoptotik yolları çok yönlü bir şekilde aktive ederek 2B kültürde hücrelerin ölümünü sağladığı belirlenmiştir.



Şekil 4.22 HT29 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerine etkileri

Grafik, *p53*, *Bax/Bcl-2*, *Cas-3*, *Cas-7*, *Cas-8* ve *Cas-9* genlerinin relatif kantifikasyonunu ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma grupları (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI), negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.0005$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ vs Kontrol).

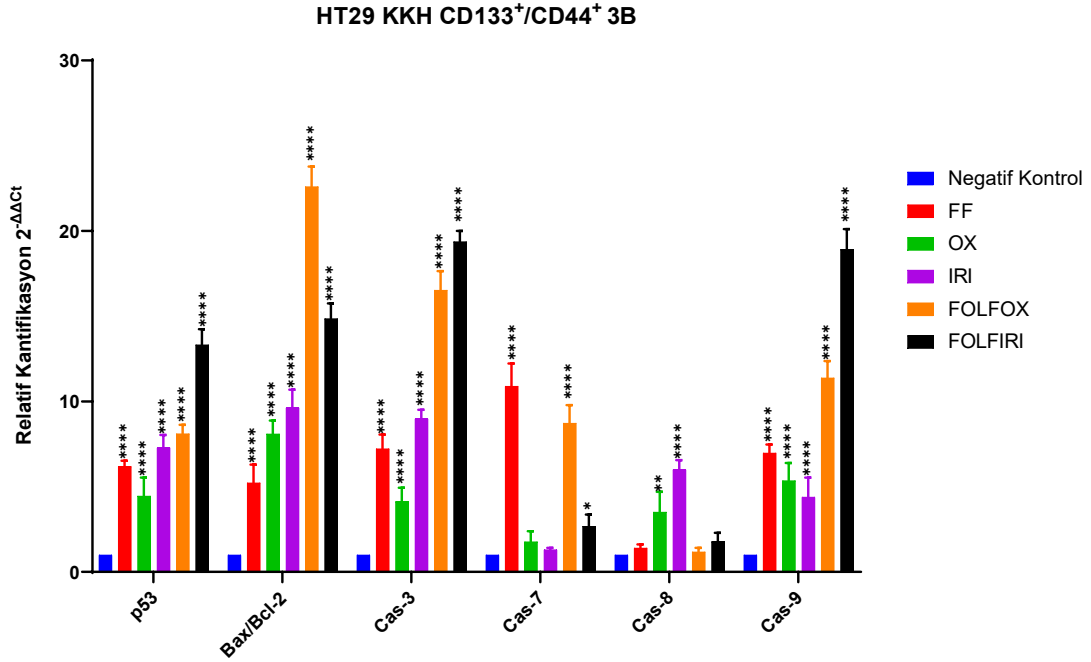
Şekil 4.22'de kolon kanseri hücre hattı HT29 hücreleri ile oluşturulan üç boyutlu (3B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda apoptozla ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. **Şekil 4.21** ve **4.22** birlikte incelendiğinde, bazı benzerlikler ve farklılıklar olduğu görülmektedir. Üç boyutlu kültür koşullarında 2B kültürle benzer şekilde HT29 hücrelerinin FOLFOX ve FOLFIRI ile muamelesi sonucunda *p53*'ün ekspresyon seviyesi FF, OX ve IRI'nin tekli uygulanmasına kıyasla en yüksek seviyeye çıktığı belirlenmiştir, ancak 2B kültürde tespit edilen kadar belirgin değildir. *Bax/Bcl-2* oranına bakıldığında, FOLFOX uygulamasının HT29 hücrelerinde bu oranı önemli ölçüde artırmış olduğu tespit edilmiştir. FOLFIRI kombinasyonu da tekli kullanılan kemoterapi ajanlarına kıyasla kayda değer bir artış göstermiştir, ancak FOLFOX'un apoptotik yanıtı tetikleme kapasitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 4.23 HT29 KKH CS133⁺/CD44⁺ 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerine etkileri

Grafik, *p53*, *Bax/Bcl-2*, *Cas-3*, *Cas-7*, *Cas-8* ve *Cas-9* genlerinin relatif kantifikasyonunu ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma grupları (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI), negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (****P $\leq$ 0.0001, ***P $\leq$ 0.0005, **P $\leq$ 0.01, *P $\leq$ 0.05 vs Kontrol).

Şekil 4.23'te HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücreleri ile oluşturulan iki boyutlu (2B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda apoptozla ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. Bu bulgular, diferansiye kanser hücresi (HT29) ile kıyaslandığında kök hücrelerin dirençli yapıları hakkında analiz yapmamızı sağlamıştır. **Şekil 4.23** incelendiğinde, hücrelerin apoptoza eğiliminin önemli göstergesi kabul edilen *Bax/Bcl-2* oranının, FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyon uygulamasında oldukça yüksek seviyelere çıktığı görülmektedir. Kanser kök hücrelerinin kemoterapi tedavilerinde direnç gösterdiği bilinmektedir (Vasan ve ark., 2019). Şekilde de görüldüğü üzere, tekli kemoterapötik ajanlara yanıt oldukça sınırlı seviyede kalmıştır.

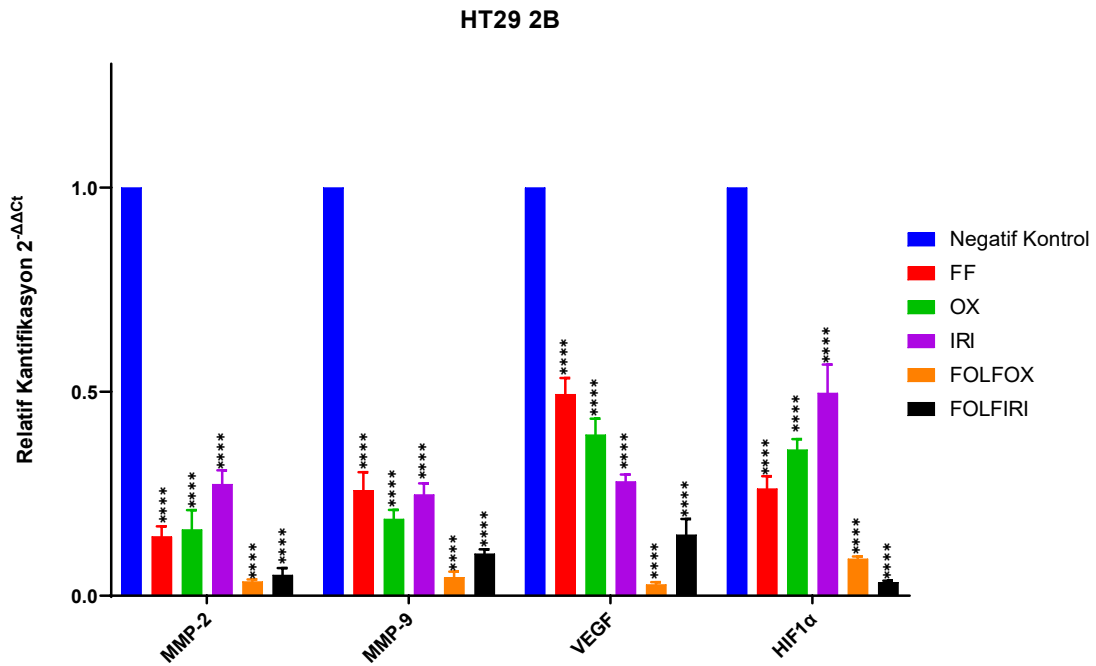


Şekil 4.24 HT29 KKH CS133⁺/CD44⁺ 3B hücre kültüründe kemoterapi farklı ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerine etkileri

Grafik, *p53*, *Bax/Bcl-2*, *Cas-3*, *Cas-7*, *Cas-8* ve *Cas-9* genlerinin relatif kantifikasyonunu ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma grupları (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI), negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.0005$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ vs Kontrol).

Şekil 4.24'te HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücreleri ile oluşturulan üç boyutlu (3B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda apoptozla ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. Bu bulgular, kök hücrelerin üç boyutlu kültürde ilaç muamelesine vermiş oldukları yanıtı sunmaktadır. **Şekil 4.24** incelendiğinde, apoptotik genlerdeki en yüksek artışın kemoterapi kombinasyonları FOLFOX ve FOLFIRI'de olduğu tespit edilmiştir. FF, OX ve IRI'nin tek tek uygulanması sonrasında da apoptotik gen seviyelerinde artış olmuştur, ancak bu artış kombinasyonlarla muamele edilen hücre grupları kadar belirgin değildir. Elde edilen bu bulgular, kanser kök hücrelerinde kemoterapi ajanlarının kombinasyon halinde uygulanmasının daha güçlü bir etki oluşturduğunu göstermektedir. FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının kök hücre direncini aşarak apoptotik yolağı aktive ettiği görülmektedir (Gong ve ark., 2024). Kültür koşullarına bağlı olarak kemoterapi ajanlarının etkinliği değerlendirildiğinde, 2B ortamda elde edilen gen ekspresyon verileri, apoptotik yolağın daha güçlü bir şekilde

aktive edildiğini göstermektedir. Bu durum hücrelerin iki boyutlu ortamda ilaç etkisine daha kolay maruz kalmasıyla açıklanmaktadır. 3B kültürde kanser hücreleri ve özellikle kanser kök hücreleri daha fazla direnç göstermişlerdir (Edmondson ve ark., 2014). Hücrelerin üç boyutlu yapısı, ilaçların hücelere erişimi kısıtlar ve oluşan mikro-çevre direnç geliştirme mekanizmalarını tetikler. Grafikler birlikte değerlendirildiğinde, tekli ilaç kullanımının etkisinin üç boyutlu kültürde belirgin şekilde azaldığı belirlenmiştir. Ancak, kombinasyon uygulamasının etkisi iki boyutlu kültürdeki kadar dramatik seviyede olmasa da apoptotik genlerin seviyesinde üç boyutlu kültürlerde de artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Literatürde bulgularımızla uyumlu olarak, ilaç kombinasyonlarının sinerjik etki oluşturduğunda ilaç direncini aşabileceği vurgulanmaktadır (Imamura ve ark., 2015).

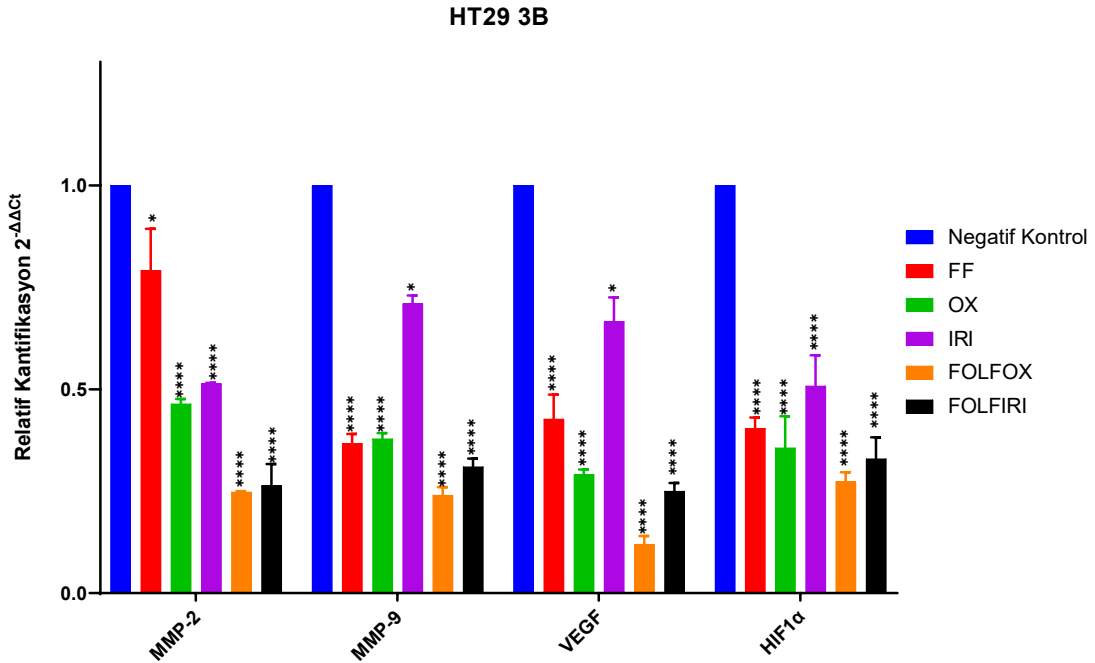


Şekil 4.25 HT29 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) migrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri

Grafik, *MMP-2*, *MMP-9*, *VEGF* ve *HIF-1α* genlerinin negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla relatif ekspresyon seviyelerini ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma grupları (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI) karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (****P $\leq$ 0.0001, ***P $\leq$ 0.0005, **P $\leq$ 0.01, *P $\leq$ 0.05 vs Kontrol).

Şekil 4.25'te kolon kanseri hücre hattı HT29 hücreleri ile oluşturulan iki boyutlu (2B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda migrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri

verilmiştir. **Şekil 4.25**'te görüldüğü üzere, *MMP-2*, *MMP-9*, *VEGF* ve *HIF-1α* genlerinin ekspresyon profilleri negatif kontrol ile kıyaslayarak analiz edilmiştir. Bu genler, tümör hücrelerinin migrasyonu, hücre göçü gibi metastazla ilgili süreçlerde önemli rol oynamaktadırlar (Said ve ark., 2014). *MMP-2* ve *MMP-9*, tümör hücrelerinin migrasyon yeteneğinden sorumlu matriks metalloproteazlardır. Aşırı eksprese olmaları tümör metastazı ile ilişkilendirilir. **Şekil 4.25** incelendiğinde, kolon kanseri HT29 hücrelerinin iki boyutlu kültürünün kemoterapi ajanları ve kombinasyonları ile etkileşiminin bu genleri baskılamada oldukça başarılı olduğu belirlenmiştir. Kombinasyon terapötikleri olan FOLFOX ve FOLFIRI, *MMP-2* ve *MMP-9* ekspresyon seviyelerini tekli ajanlara göre daha güçlü bir şekilde baskılamıştır. Bu bulgular sonucunda, kombinasyon uygulamalarının kanserli hücrelerde migrasyon yeteneğini daha fazla azalttığı tespit edilmiştir. Vasküler endotelial büyüme faktörü olan *VEGF*, tümör hücrelerinde yeni kan damarlarının oluşumunu sağlar ve bu da tümör büyümesi ve metastaz için kritik bir faktördür (Baker ve ark., 2019). FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyon uygulamasının *VEGF* ekspresyonunu belirgin bir şekilde baskıladığı görülmektedir. *VEGF* baskılanmasıyla tümör hücrelerinin besin ve oksijen kaynağı sınırlandırılır ve bu sayede metastaz potansiyelleri önemli ölçüde azalmaktadır. *HIF-1α* (hipoksi indüklenbilir faktör 1-alfa), hücrelerin hipoksik ortama adaptasyonunu sağlayan ve tümör büyümesi ile metastazda kritik rol oynayan bir faktördür (Ioannou ve ark., 2015). **Şekil** incelendiğinde özellikle hücrelerin FOLFIRI ile etkileşiminin *HIF-1α*'ı baskılamada oldukça etkili olduğu görülmektedir. FOLFIRI kadar belirgin olmasa da FOLFOX kombinasyon muamelesi de ekspresyon seviyesini baskılamıştır. Ek olarak, kemoterapi ajanlarının tekli uygulamaları bu genlerin baskılanmasında etkili olmuştur, ancak kombinasyonlar kadar başarılı değildir. Ayrıca kombinasyon içerisindeki kemoterapötik ilaç konsantrasyonlarının daha az olduğu buna rağmen kombinasyonların daha etkili olduğu göz ardı edilmemelidir. Kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesinin, metastazı baskılamak için önemli bir strateji olabileceği ortaya konulmuştur (Kumar ve Malhotra, 2009).

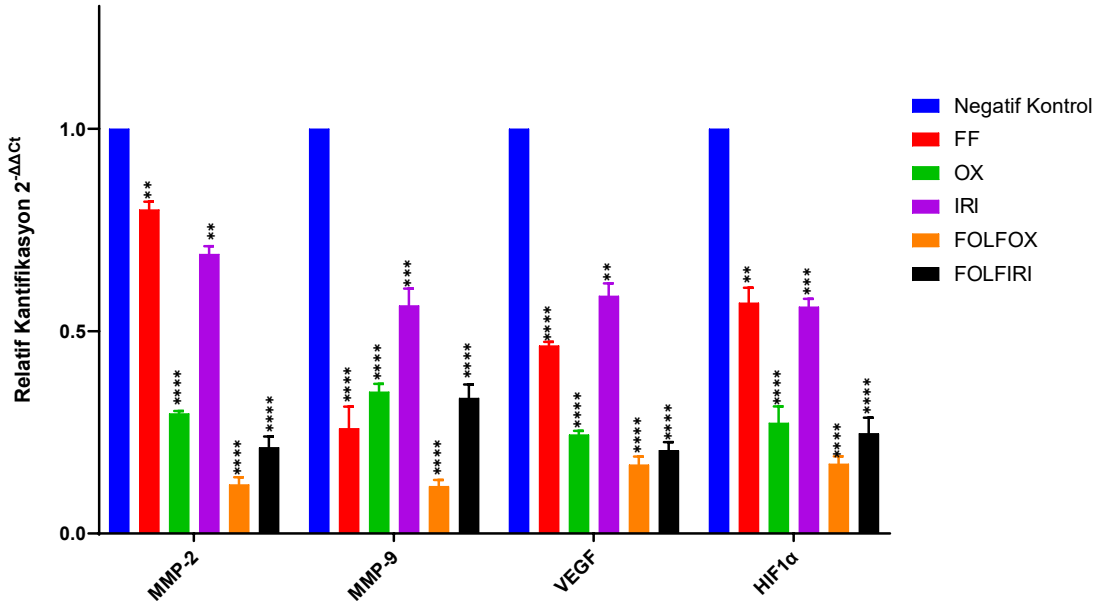


Şekil 4.26 HT29 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) migrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri

Grafik, *MMP-2*, *MMP-9*, *VEGF* ve *HIF-1α* genlerinin negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla relatif ekspresyon seviyelerini ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma grupları (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI) karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.0005$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ vs Kontrol).

Şekil 4.26’da HT29 kolon kanseri hücreleri ile oluşturulan üç boyutlu (3B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI’nin 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda migrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. Şekil 4.26’da görüldüğü üzere, *MMP-2*, *MMP-9*, *VEGF* ve *HIF-1α* genlerinin relatif ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna göre karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan genler *MMP-2* ve *MMP-9*, kombinasyon grupları FOLFOX ve FOLFIRI’nin etkisiyle üç boyutlu kültürde HT29 hücrelerinde baskılanmıştır. Kombinasyonların her ikisi de benzer etki göstermiştir ve aralarında belirgin bir fark görülmemektedir. FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyon maruziyetinin, *VEGF* ve *HIF-1α* ekspresyonunu anlamlı şekilde baskıladığı belirlenmiştir. Bu bulgular, iki boyutlu kültür ile birlikte değerlendirildiğinde, 3B kültürde gen ekspresyon düzeylerinin baskılanmasında hücrelerin daha dirençli bir profil sergilediği tespit edilmiştir.

HT29 KKH CD133⁺/CD44⁺ 2B

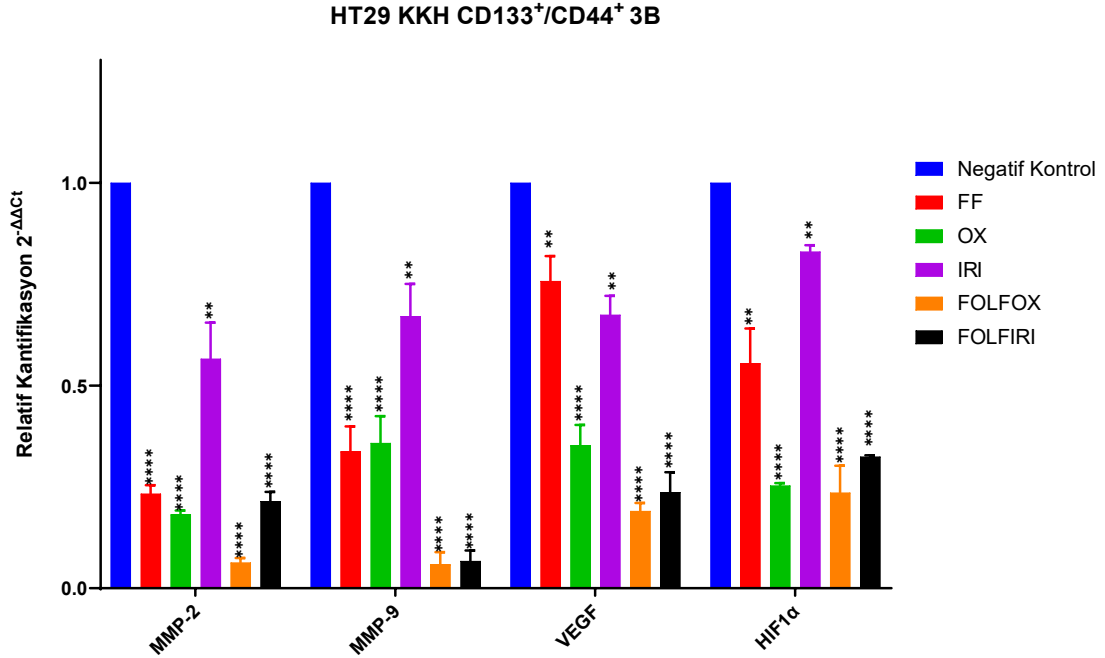


Şekil 4.27 HT29 KKH CS133⁺/CD44⁺ 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) migrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri

Grafik, *MMP-2*, *MMP-9*, *VEGF* ve *HIF-1α* genlerinin negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla relatif ekspresyon seviyelerini ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma grupları (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI) karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (****P $\leq$ 0.0001, ***P $\leq$ 0.0005, **P $\leq$ 0.01, *P $\leq$ 0.05 vs Kontrol).

Şekil 4.27’de HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücreleri ile oluşturulan iki boyutlu (2B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI’nin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda migrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. Şekil 4.27’de, *MMP-2*, *MMP-9*, *VEGF* ve *HIF-1α* gibi metastaz ve tümör ilerlemesi ile ilişkili genlerin relatif ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla incelenmiştir. Kanser kök hücrelerinin iki boyutlu kültüründe, FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının *MMP-2*, *MMP-9*, *VEGF* ve *HIF-1α* genlerinin ekspresyon seviyelerini tekli kemoterapi ilaçlarına göre daha yüksek seviyede baskıladıkları görülmektedir. Bu iki kombinasyonun, kanser kök hücrelerinin invazyon, anjiyogenez ve hipoksi adaptasyon yeteneklerini sınırlayarak metastatik potansiyeli azaltmada etkili olduğu belirlenmiştir. Literatürde metastatik kolon kanseri tedavisi için hedefe yönelik ilaçların geleneksel kemoterapi ile kombine tedavisinin sağ kalımı önemli ölçüde iyileştirme etkisi olduğuna değinilmiştir (Sánchez-Gundín ve ark.,

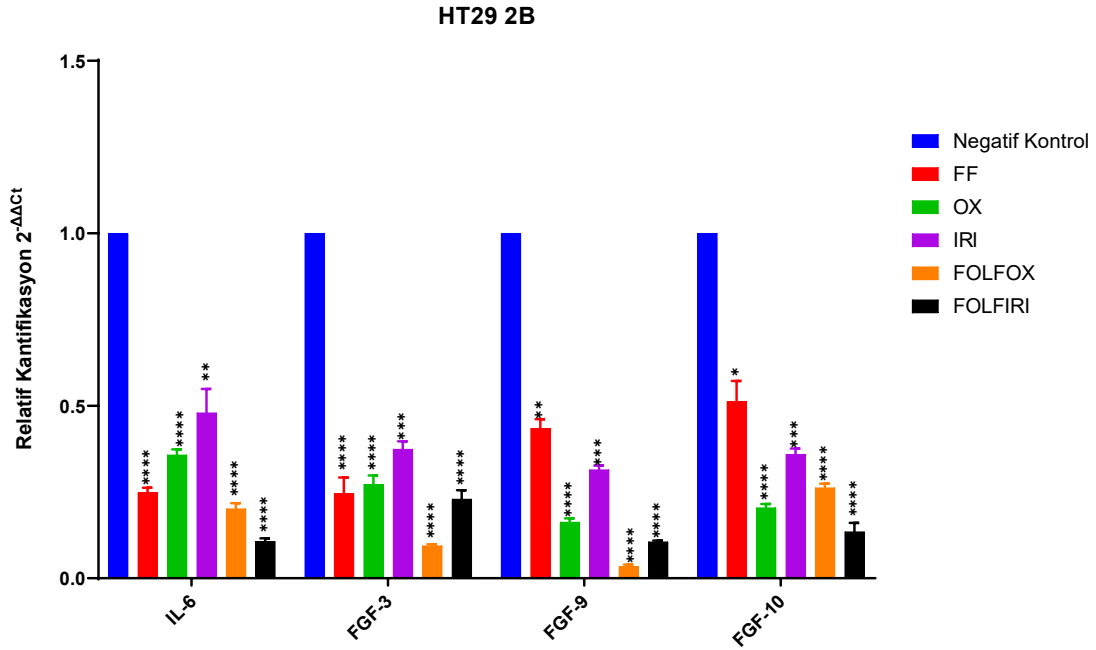
2018). Sonuçlarımız hedefe yönelik geliştirilecek tedavi stratejileri için temel analizler sunmaktadır.



Şekil 4.28 HT29 KKH CS133⁺/CD44⁺ 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) migrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri

Grafik, *MMP-2*, *MMP-9*, *VEGF* ve *HIF-1α* genlerinin negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla relatif ekspresyon seviyelerini ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma grupları (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI) karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (****P $\leq$ 0.0001, ***P $\leq$ 0.0005, **P $\leq$ 0.01, *P $\leq$ 0.05 vs Kontrol).

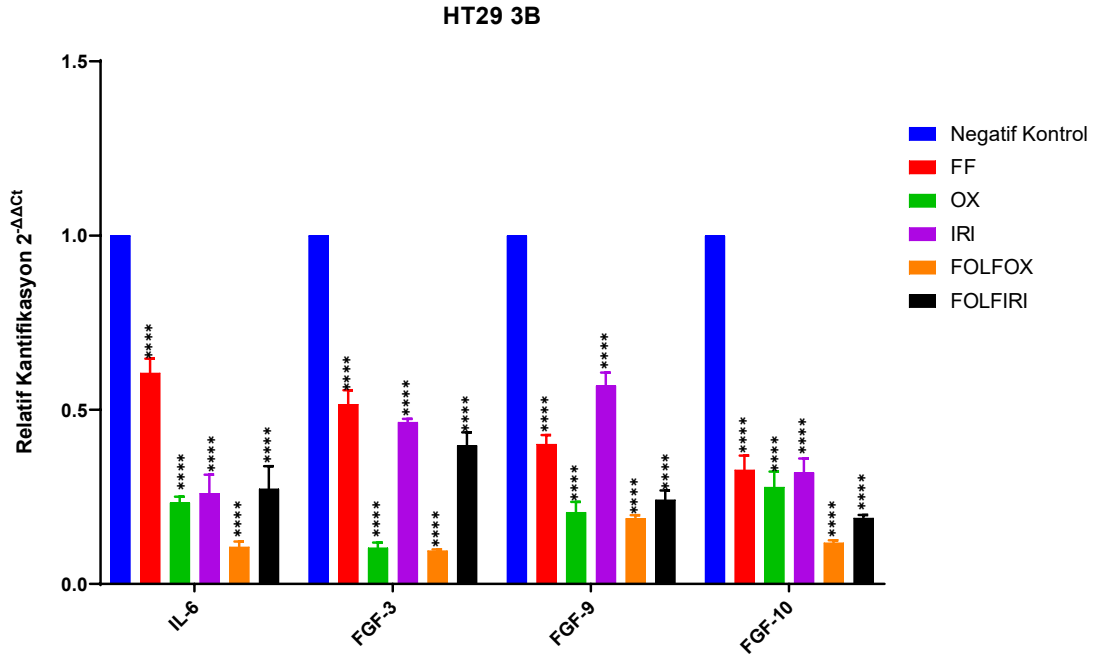
Şekil 4.28'de HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücreleri ile oluşturulan üç boyutlu (3B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda migrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. Şekil 4.27 ve 4.28 birlikte değerlendirildiğinde, kemoterapi kombinasyonlarının (FOLFOX ve FOLFIRI) *MMP-2* ve *MMP-9* üzerindeki baskılayıcı etkisinin daha belirgin olduğu görülmektedir. 3B kültür ortamından elde edilen veriler incelendiğinde, tek tek uygulanan kemoterapi ajanlarına kıyasla kombinasyonların metastazı baskılamada daha başarılı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.29 HT29 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) invazyon ve anjiyogeneze ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri

Grafik, *IL-6*, *FGF-3*, *FGF-9* ve *FGF-10* genlerinin relatif ekspresyon seviyelerini ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma gruplarının (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI) gen ekspresyon seviyeleri, negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla değerlendirilmiştir. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (*** $P \leq 0.0001$, ** $P \leq 0.0005$, * $P \leq 0.01$, $P \leq 0.05$ vs Kontrol).

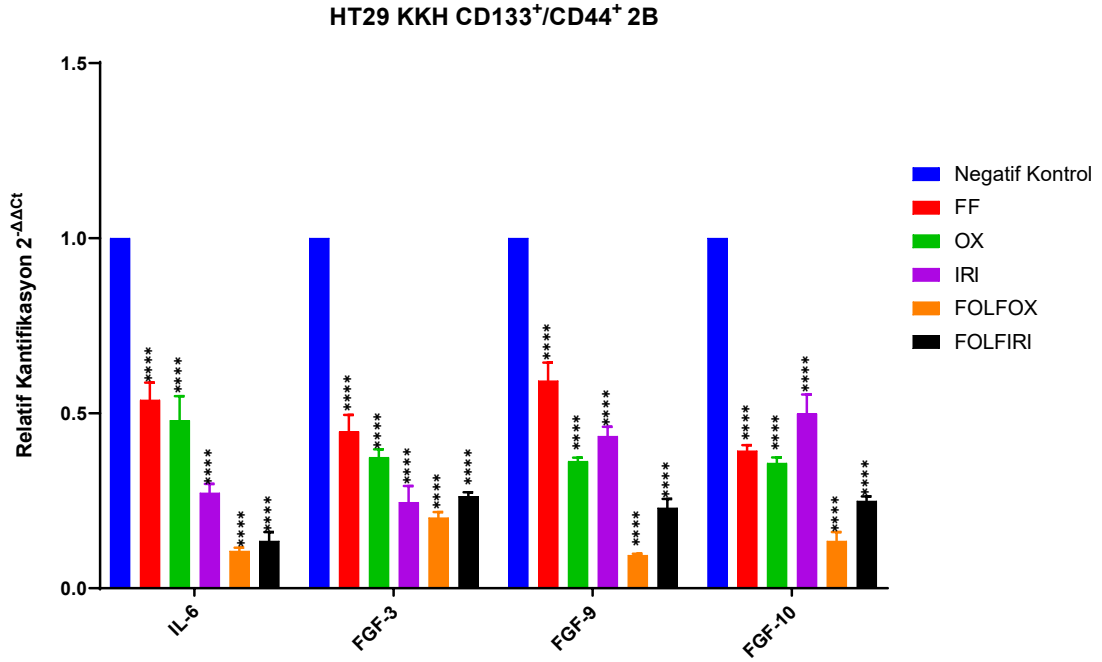
Şekil 4.29'da HT29 kolon kanseri hücreleri ile oluşturulan iki boyutlu (2B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda invazyon ve anjiyogeneze ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. *İnterlökin-6 (IL-6)*, tümör büyümesini ve invazyonunu destekleyen inflamatuvar sitokin olarak bilinir (T. Wang ve ark., 2019). **Şekil 4.29** incelendiğinde, özellikle FOLFIRI kombinasyonunun *IL-6* ekspresyon seviyesini azaltmada oldukça etkili olduğu görülmektedir. FOLFOX kombinasyonunda baskılama FOLFIRI kadar belirgin olmasa da *IL-6* baskılamasında etkili olmuştur. *Fibroblast büyüme faktörü (FGF)* ailesi, özellikle hücre proliferasyonunu ve invazyonu destekleyen büyüme faktörleri olarak tanımlanmaktadır ve yüksek ekspresyon seviyeleri tümörün kötü progresyonu ile ilişkilendirilmektedir (Otte ve ark., 2019). (**Şekil 4.29'**da görüldüğü üzere kemoterapi ajanları ve kombinasyonları *FGF-3*, *FGF-9* ve *FGF-10* ekspresyonlarını baskılamada etkili görülmektedir. Ancak, kombinasyon ile muamele edilen hücrelerde genel olarak daha yüksek baskılama etkisi görülmüştür.



Şekil 4.30 HT29 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) invazyon ve anjiyogeneze ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri

Grafik, *IL-6*, *FGF-3*, *FGF-9* ve *FGF-10* genlerinin relatif ekspresyon seviyelerini ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma gruplarının (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI) gen ekspresyon seviyeleri, negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla değerlendirilmiştir. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.0005$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ vs Kontrol).

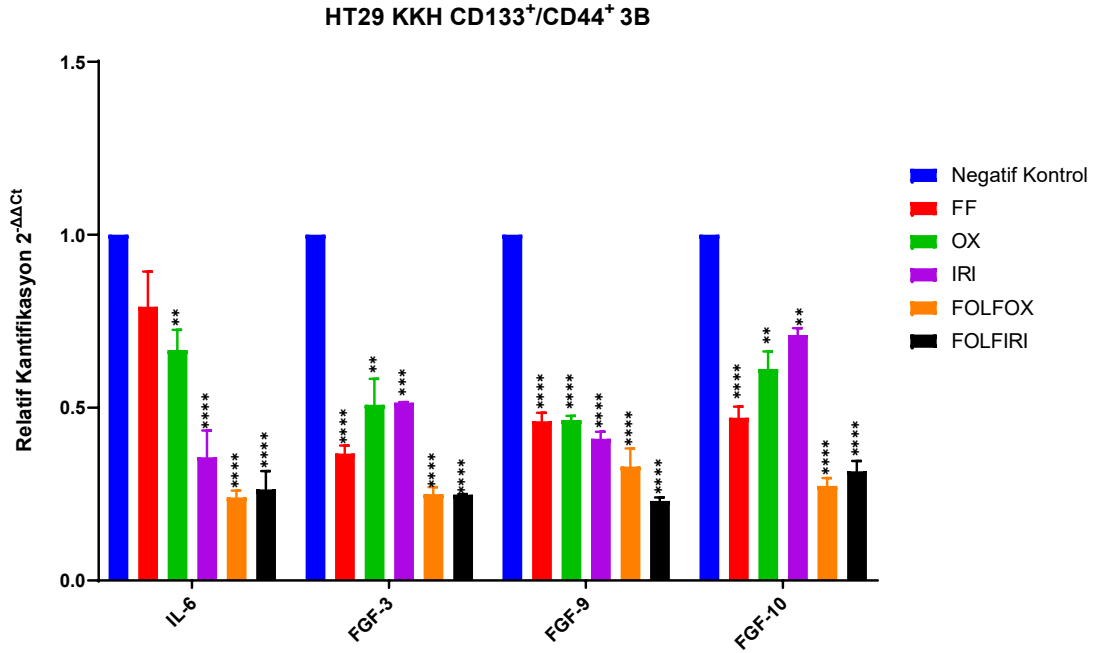
Şekil 4.30'da HT29 kolon kanseri hücreleri ile oluşturulan üç boyutlu (3B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda invazyon ve anjiyogeneze ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. **Şekil 4.30'**da görüldüğü üzere, kemoterapi ajanları ve kombinasyonları *IL-6*, *FGF-3*, *FGF-9* ve *FGF-10* genlerinin ekspresyon seviyelerini negatif kontrol ile kıyaslandığında önemli ölçüde baskılamaktadır. 3B kültürde özellikle FOLFOX kombinasyonunun daha etkili olduğu gözlenmiştir. İnvazyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerindeki baskılanma iki boyutlu kültürle kıyaslandığında daha belirgin olduğu görülmektedir. Üç boyutlu kültürde mikro-çevrenin daha doğru yansıtılabileceği için elde edilen bu veriler ilaç etkisini optimize edebilmek açısından oldukça önemlidir (Thoma ve ark., 2014).



Şekil 4.31 HT29 KKH CS133⁺/CD44⁺ 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) invazyon ve anjiyogenezle ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri

Grafik, *IL-6*, *FGF-3*, *FGF-9* ve *FGF-10* genlerinin relatif ekspresyon seviyelerini ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma gruplarının (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI) gen ekspresyon seviyeleri, negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla değerlendirilmiştir. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (****P $\leq$ 0.0001, ***P $\leq$ 0.0005, **P $\leq$ 0.01, *P $\leq$ 0.05 vs Kontrol).

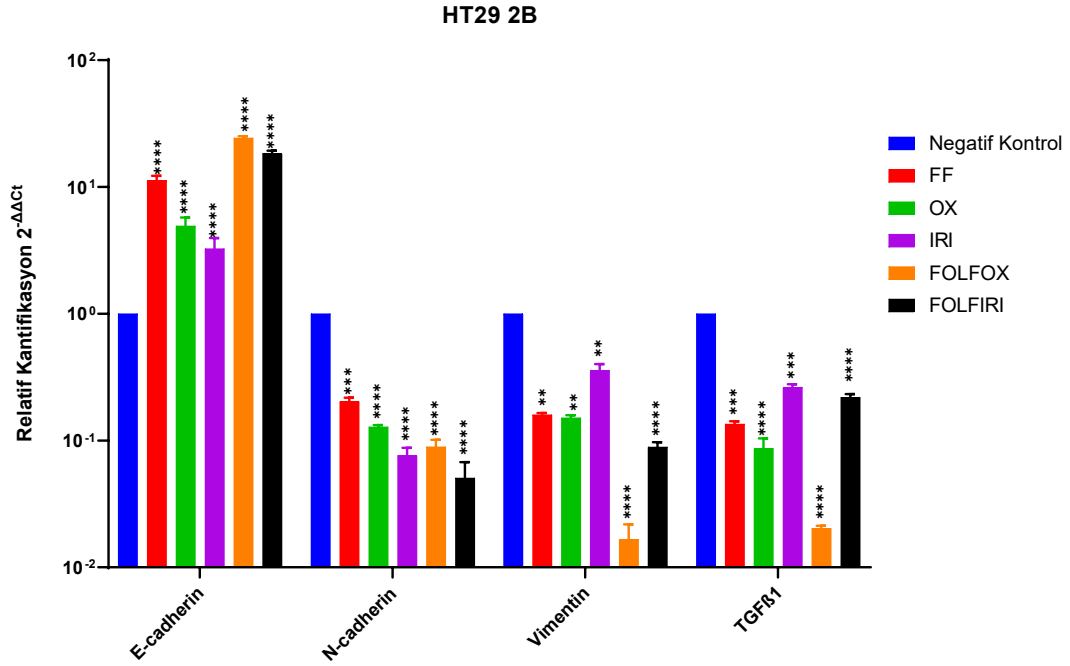
Şekil 4.31'de HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücreleri ile oluşturulan iki boyutlu (2B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda invazyon ve anjiyogenez ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. **Şekil 4.31** incelendiğinde, *IL-6*, *FGF-3*, *FGF-9* ve *FGF-10* genleri ekspresyon seviyelerinin kemoterapi ilaçlarının tek tek ve kombinasyon şeklinde muamele edilmesi sonucunda baskılandığı görülmektedir. Özellikle kombinasyonların *IL-6* ekspresyon seviyesini en fazla baskılayan ilaç uygulamaları olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, kanser kök hücrelerine yönelik çalışmalar için FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının hedefe yönelik geliştirilecek tedavi stratejilerindeki önemini vurgulamaktadır (Yu ve ark., 2009).



Şekil 4.32 HT29 KKH CS133⁺/CD44⁺ 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) invazyon ve anjiyogenezle ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri

Grafik, *IL-6*, *FGF-3*, *FGF-9* ve *FGF-10* genlerinin relatif ekspresyon seviyelerini ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma gruplarının (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI) gen ekspresyon seviyeleri, negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla değerlendirilmiştir. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (****P $\leq$ 0.0001, ***P $\leq$ 0.0005, **P $\leq$ 0.01, *P $\leq$ 0.05 vs Kontrol).

Şekil 4.32'de HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücreleri ile oluşturulan üç boyutlu (3B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda invazyon ve anjiyogenez ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. **Şekil 4.32** incelendiğinde, FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyon muamelesinin, *IL-6*, *FGF-3*, *FGF-9* ve *FGF-10* genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerindeki baskılayıcı etkisi görülmektedir. 3B kültür koşulları altında kanser kök hücrelerinden elde edilen bu sonuçlar, kombinasyon uygulamasının tekli ajanlara göre daha etkin bir şekilde tümör invazyonundan ve anjiyogenezinden sorumlu genleri baskıladığını göstermektedir (Gong ve ark., 2024).

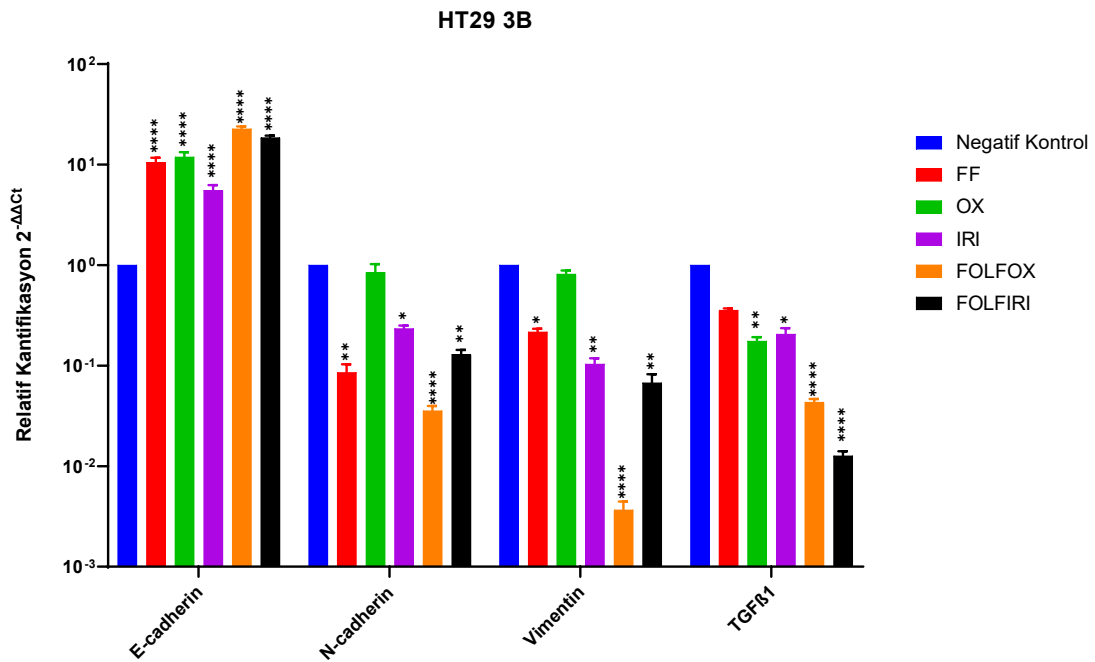


Şekil 4.33 HT29 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri

Grafik, *E-cadherin*, *N-cadherin*, *Vimentin* ve *TGFβ1* genlerinin relatif kantifikasyonunu ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma grupları (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI), negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla analiz edilmiştir. Y eksenini logaritmik ölçek kullanılarak sunulmuştur. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.0005$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ vs Kontrol).

Şekil 4.33'te HT29 kolon kanseri hücreleri ile oluşturulan iki boyutlu (2B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. *E-cadherin*, hücre-hücre yapışmasında rol oynayan ve epitelyal marker olarak bilinmektedir. EMT sürecinde, hücrelerin epitelyal yapıdan mezenkimal yapıya geçmesiyle *E-cadherin* ekspresyonunun baskılandığı bilinmektedir (Kalluri ve Weinberg, 2009). Ekspresyon seviyesinin düşük olması EMT sürecinin başlamış olduğunu göstermektedir. **Şekil 4.33** incelendiğinde, FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonları ile muamele edilen hücrelerde *E-cadherin* ekspresyonu, negatif kontrol ile kıyaslandığında oldukça yüksek seviyede arttığı görülmektedir. Ek olarak ilaçları tek tek uygulamanın da 2B hücrelerde *E-cadherin* seviyesini artırdığı görülmektedir, ancak FOLFOX ve FOLFIRI'nin daha fazla etkili olduğu tespit edilmiştir. *E-cadherin* seviyesinin artması yoluyla EMT sürecinin kemoterapi ajanları ve kombinasyonları ile baskılandığı görülmektedir. *E-cadherin* ile tam tersi çalışma prensibine sahip olan *N-cadherin*,

mezenkimal süreçte yol almaktadır ve artmış *N-kaderin* ekspresyonu, hücre hareketliliğindeki artış ile ilişkilidir. **Şekil 4.33**'te kemoterapi ajanları ve kombinasyon muamelesinin, *N-kaderin* ekspresyonunu negatif kontrole kıyasla anlamlı ölçüde baskıladığı görülmektedir. Özellikle FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının muamelesi ile belirgin bir azalma göstermiştir. *Vimentin* ve *TGFβ1*, EMT sürecinde rol oynayan önemli markörlerdir. Özellikle FOLFOX kombinasyonu ile maruz bırakma sonrasında ekspresyon seviyelerinde önemli baskılanma görülmektedir.

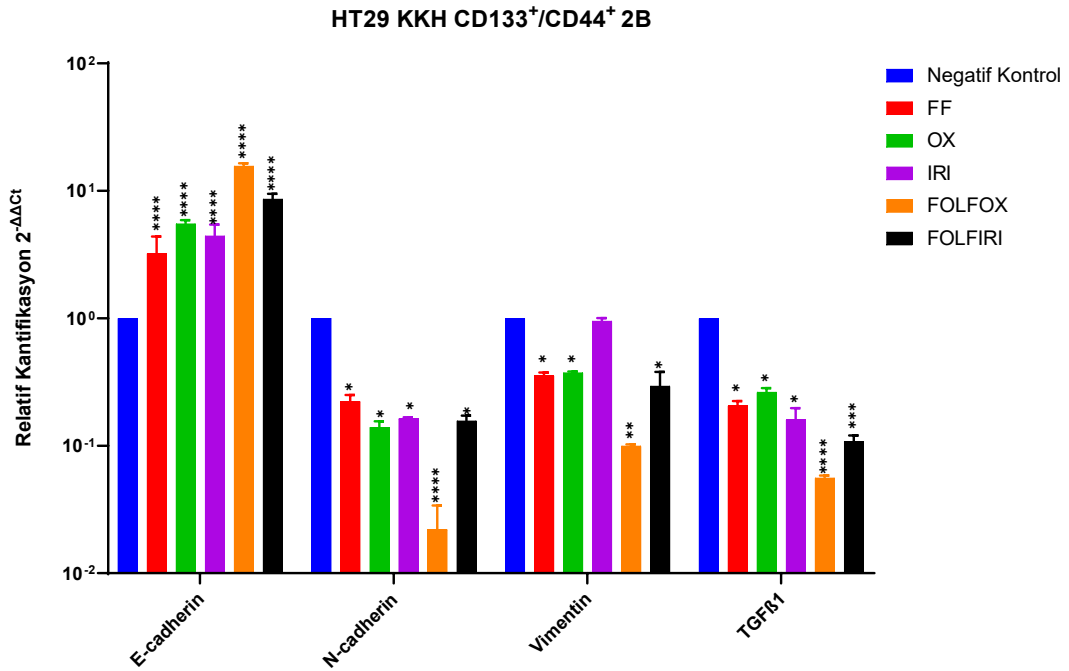


Şekil 4.34 HT29 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri

Grafik, *E-cadherin*, *N-cadherin*, *Vimentin* ve *TGFβ1* genlerinin relatif kantifikasyonunu ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma grupları (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI), negatif kontrol grubuna (mavi) kıyasla analiz edilmiştir. Y eksenini logaritmik ölçek kullanılarak sunulmuştur. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.0005$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ vs Kontrol).

Şekil 4.34'te HT29 kolon kanseri hücreleri ile oluşturulan üç boyutlu (3B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. 3B kültür modelinde bu genlerin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi, *in vivo* mikro-çevreye daha hücresel cevapların alınmasına olanak sağlamaktadır. **Şekil 4.34**'te görüldüğü üzere, tüm çalışma gruplarında *E-kaderin* ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının *E-kaderin*

ekspresyonunu artırmada daha başarılı olduğu gösterilmiştir. EMT sırasında artması beklenen mezenkimal bir marker olan *N-kaderin* ekspresyonu, FOLFOX ve FOLFIRI gruplarında belirgin bir şekilde baskılandığı görülmektedir. **Şekil 4.34** genel olarak değerlendirildiğinde, 3B kültür ortamında FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının, EMT sürecini baskılamada kemoterapi ajanlarının tekli uygulanmasına kıyasla daha başarılı olduğu gösterilmiştir.

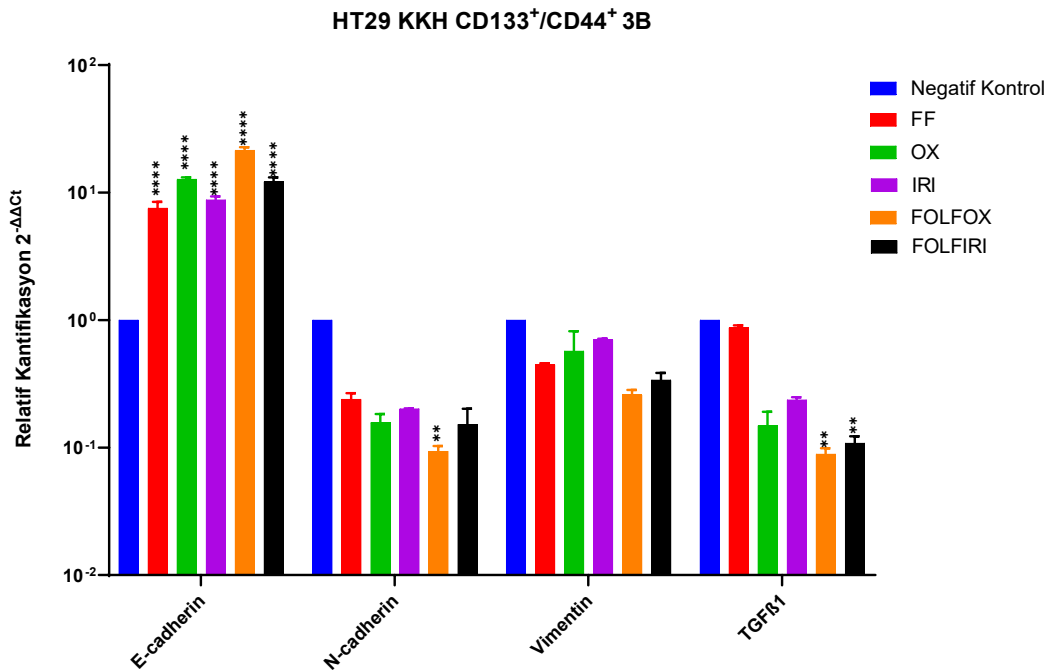


Şekil 4.35 HT29 KKH CS133⁺/CD44⁺ 2B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) EMT ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri

Grafik, *E-cadherin*, *N-cadherin*, *Vimentin* ve *TGFβ1* genlerinin relatif ekspresyon seviyelerini ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma grupları (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI) ile negatif kontrol grubu (mavi) kıyaslanmıştır. Y eksenı logaritmik ölçek kullanılarak sunulmuştur. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (****P $\leq$ 0.0001, ***P $\leq$ 0.0005, **P $\leq$ 0.01, *P $\leq$ 0.05 vs Kontrol).

Şekil 4.35'te HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücreleri ile oluşturulan iki boyutlu (2B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. EMT süreci, kanser kök hücrelerinde, invazyon ve metastaz yeteneklerini artırmaktadır. Bu nedenle EMT ile ilişkili genlerdeki değişiklikler, kemoterapötik ajanların tek tek veya kombinasyon şeklinde uygulanmasının etkinliği açısından önemli çıkarımlarda bulunmamızı sağlamaktadır. **Şekil 4.35'**te görüldüğü üzere, tüm uygulama gruplarında *E-kaderin* ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğu

belirlenmiştir. Özellikle bu artışın FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyon uygulamalarında daha fazla olması, kombinasyonların EMT sürecini baskılayarak kök hücrelerin daha invaziv hale gelmesini engelleyebildiğini göstermektedir. **Şekil 4.35**, HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücrelerinde FOLFOX ve FOLFIRI'nin diğer kemoterapi ajanlarına göre EMT sürecini daha etkin bir şekilde baskıladığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.36 HT29 KKH CS133⁺/CD44⁺ 3B hücre kültüründe farklı kemoterapi ajanlarının (FF, OX, IRI, FOLFOX, FOLFIRI) EMT ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri

Grafik, *E-cadherin*, *N-cadherin*, *Vimentin* ve *TGFβ1* genlerinin relatif ekspresyon seviyelerini ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göstermektedir. Çalışma grupları (kırmızı: FF, yeşil: OX, mor: IRI, turuncu: FOLFOX, siyah: FOLFIRI) ile negatif kontrol grubu (mavi) kıyaslanmıştır. Y eksenı logaritmik ölçek kullanılarak sunulmuştur. Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir (****P $\leq$ 0.0001, ***P $\leq$ 0.0005, **P $\leq$ 0.01, *P $\leq$ 0.05 vs Kontrol).

Şekil 4.36'da HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücreleri ile oluşturulan üç boyutlu (3B) hücre kültüründe FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri verilmiştir. **Şekil 4.36** incelendiğinde, kemoterapi ajanları ve kombinasyonlarının üç boyutlu kültürde, kanser kök hücrelerinde *E-cadherin* seviyesinde önemli bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu artışın yine FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyon etkileşimlerinde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *N-cadherin* ekspresyon seviyesine bakıldığında, negatif kontrol ile kıyaslandığında, anlamlı bir baskılamaya

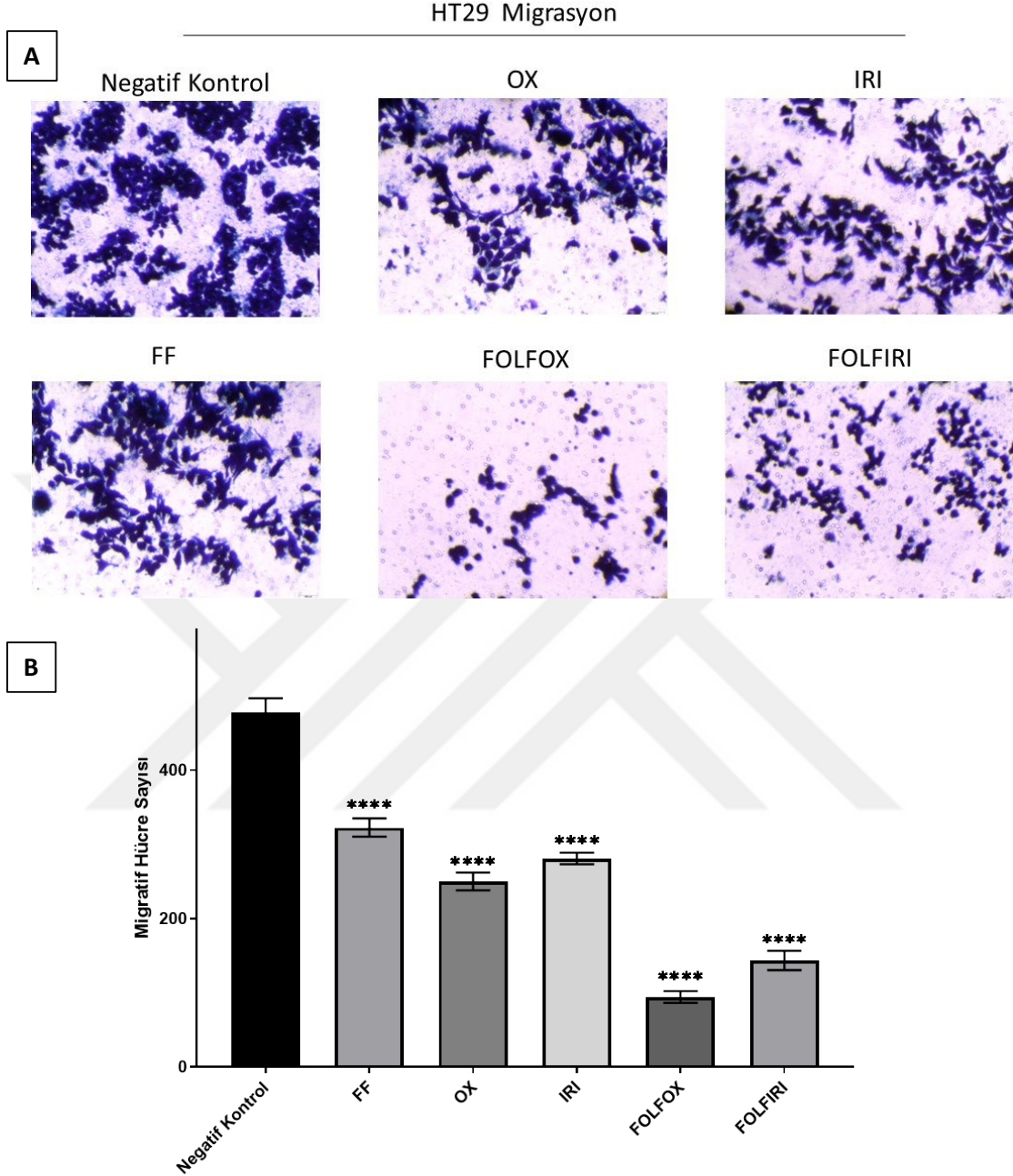
yalnızca FOLFOX kombinasyon uygulamasında görülmüştür. *Vimentin* ekspresyon seviyesi üç boyutlu kültürde yapılan bu çalışmada anlamlı bir azalma göstermemiştir. Özellikle OX ve IRI kemoterapi ajanları ile muamele edilen hücrelere bakıldığında *Vimentin* ekspresyon seviyesinin negatif kontrol grubuna yakın olduğu görülmektedir. *TGFβ1* ekspresyonu, FOLFOX ve FOLFIRI gruplarında anlamlı şekilde azalmıştır, ancak tekli kullanılan kemoterapi ajanlarında sınırlı bir baskılama olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, diferansiye hücrelerde FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonları, *E-kaderin* ekspresyonunu artırarak EMT sürecini baskılamıştır. Ancak kanser kök hücrelerinde EMT ile ilişkili *N-kaderin*, *Vimentin* ve *TGF-β1* gen ekspresyon seviyelerinin yüksek olması, bu hücrelerin invazyon ve metastaz potansiyelini koruduğunu göstermiştir. Özellikle KKH temelli oluşturulan 3B mikro-dokularda EMT genlerinin baskılanmasına karşı oluşan direnç daha fazladır. 3B mikro-dokularda oluşan heterojen tümör dokusu, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerine sahiptir. 3B mikro-dokuda KKH'lerin mikro-çevre ile ilişkisi EMT mekanizmasını aktifleştirebilmektedir. EMT sürecinin ve anjiyogenezin aktifleşmesinde 3B mikro-dokunun heterojen yapısından kaynaklı hipoksik durum oldukça önemlidir (M. H. Yang ve ark., 2008). EMT sürecini hedefleyen tedavi stratejileri geliştirilirken direnç mekanizmalarının aşılmasına yönelik çalışmalar yapmak oldukça önemlidir (Escalante ve ark., 2021; Zoetemelk ve ark., 2019). Ek olarak, yeni tedavi stratejileri geliştirirken bu tedaviyi geleneksel kemoterapi ajanları ile kombinasyon halinde kullanmanın, tedavide karşılaşılan pek çok direnç mekanizmasının üstesinden gelebileceği vurgulanmıştır (Iyer ve ark., 2019; McQuade ve ark., 2017).

5.6 Transwell Sistemi Kullanılarak Yapılan İnvazyon ve Migrasyon Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tez çalışmasının bu basamağında, HT29 kolon kanseri hücreleri ve HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinin invazyon ve migrasyon yetenekleri Transwell sistemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, invazyon analizi için ticari olarak temin edilen Matrigel ile yapay bir bazal membran oluşturularak hücrelerin Matrigel üzerinden geçiş yetenekleri incelenmiştir. Migrasyon analizi için ise Matrigel olmayan sistem kullanılmıştır ve hücrelerin insört yüzeyinde bulunan porlardan geçiş

yetenekleri incelenmiştir. Çalışmanın amacı, farklı kemoterapi ajanlarının ve kombinasyonlarının hücre invazyon ve migrasyon süreçleri üzerindeki etkilerini gözlemlemek ve bu süreçlerdeki farklılıkları ortaya koymaktır. Hem migrasyon hem de invazyon analizinde, hücreler için önceki çalışmalarda belirlenmiş olan 48. saat IC_{50} dozları kullanılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, ilaç uygulama gruplarında bulunan hücreler %4'lük PFA ile fikse edilmiş ve kristal viyole boyası ile boyanarak mikroskop altında incelenmiştir. Görüntülerin analizi Image J yazılımı kullanılarak kantitatif olarak yapılmıştır. Negatif kontrol grubuna kıyasla invazyon ve migrasyon yeteneklerindeki değişiklikler GraphPad Prism 9.0.0 yazılımı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

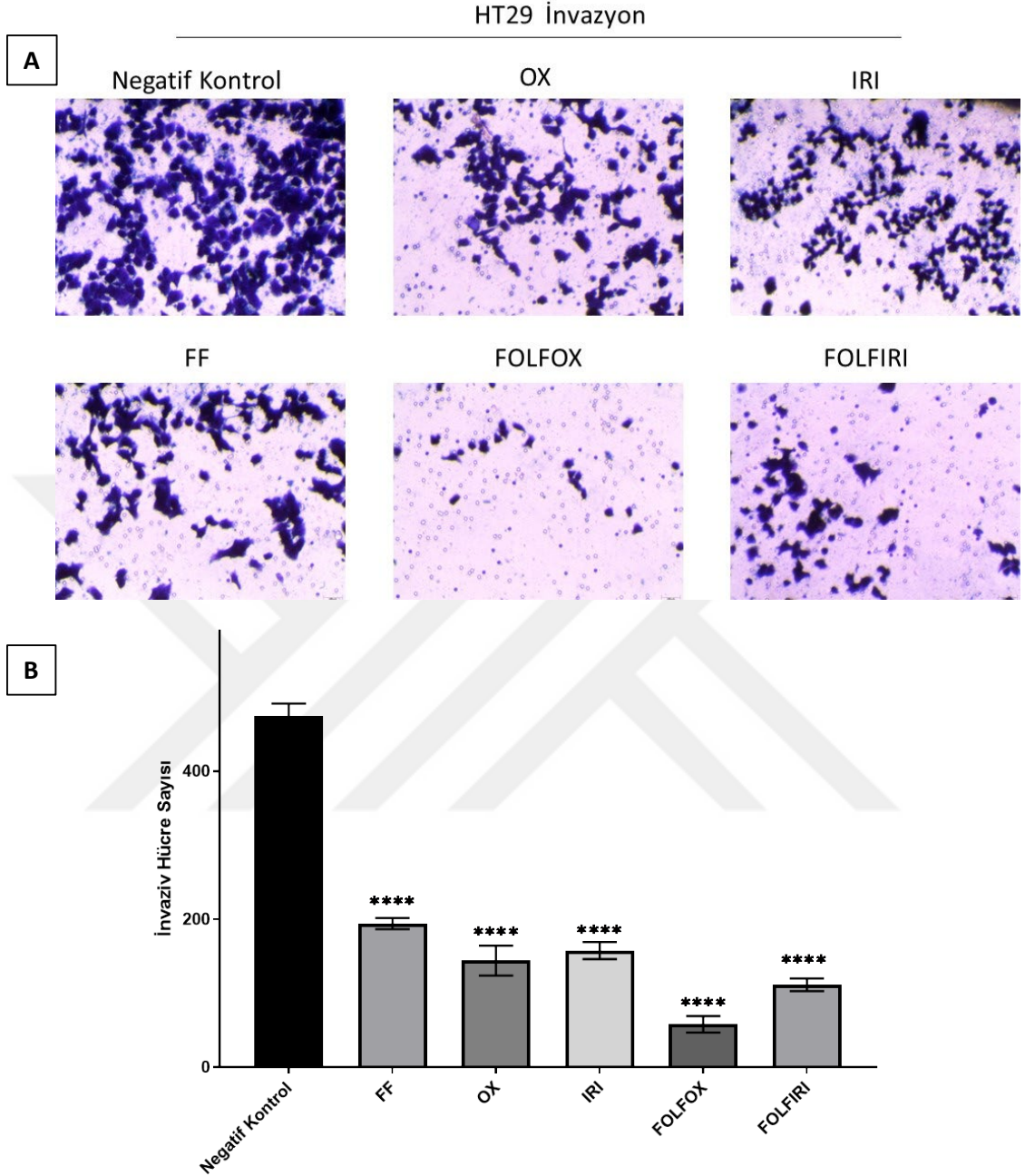


Şekil 4.37 HT29 kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının migrasyon üzerindeki etkileri

(A) Farklı ilaç etkileşimlerine (Negatif Kontrol, OX, IRI, FF, FOLFOX, FOLFIRI) maruz bırakılan HT29 hücrelerinin transwell migrasyon deneyi sonucunda kristal viyolele boyanmış hücrelerinin mikroskop görüntüleri (10X büyütme). (B) Her bir çalışma grubunda migrasyon gerçekleştiren hücre sayılarının kantitatif analizi. Değerler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). İstatistiksel analizler, negatif kontrol grubuna kıyasla yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

Şekil 4.37'de HT29 kolon kanseri hücrelerinin migrasyon yeteneği üzerindeki farklı kemoterapi ajanlarının etkisi transwell migrasyon testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin hücre göçü üzerindeki inhibe edici etkilerini karşılaştırmak için deney sonucunda elde edilen mikroskop görüntüleri ve kantitatif analiz grafikleri oluşturulmuştur. **Şekil 4.37 (A)**'da kristal viyole ile boyanmış hücre görüntülerinde görüldüğü üzere, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, kemoterapi ajanlarının hücre migrasyonunu belirgin bir şekilde azalttığı belirlenmiştir. Özellikle FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonları ile muamele edilen hücrelerin, migrasyon kapasitesinde anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Tekli kemoterapi ajanı olarak kullanılan OX, IRI ve FF'in FOLFOX ve FOLFIRI kadar belirgin inhibisyon sağlamadıkları görülmektedir. **Şekil 4.37 (B)**'deki kantitatif analiz sonucu oluşturulan grafik bu gözlemleri desteklemektedir. FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonları ile muamele edilen hücrelerin negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. Bu bulgular, FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının HT29 hücrelerinde metastatik potansiyeli azaltmada etkili olabileceğini göstermektedir.

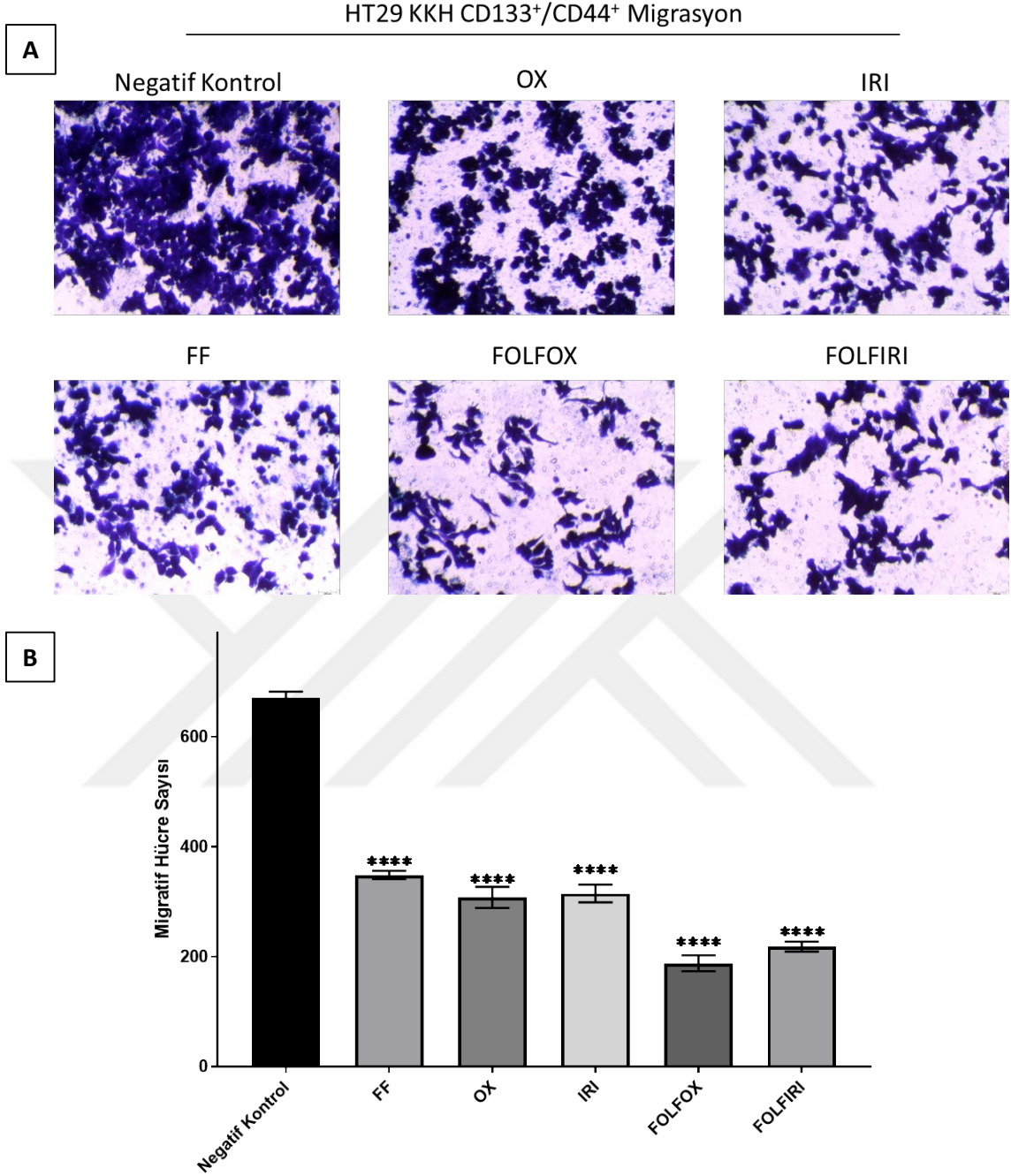


Şekil 4.38 HT29 kolon kanseri hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının invazyon üzerindeki etkileri

(A) Farklı ilaç etkileşimlerine (Negatif Kontrol, OX, IRI, FF, FOLFOX, FOLFIRI) maruz bırakılan HT29 hücrelerinin transwell invazyon deneyi sonucunda kristal viyole ile boyanmış hücrelerinin mikroskop görüntüleri (10X büyütme). (B) Her bir çalışma grubunda invaze olan hücre sayılarının kantitatif analizi. Değerler, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n=3). İstatistiksel analizler, negatif kontrol grubuna kıyasla yapılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

Şekil 4.38’de HT29 kolon kanseri hücrelerinin invazyon yeteneği üzerindeki farklı kemoterapi ajanlarının etkisi transwell invazyon testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Şekil 4.38 (A) incelendiğinde, negatif kontrol grubundaki hücrelerin yoğun hücre invazyonu gözlemlenmiş ve kemoterapi ajanlarının HT29 kolon kanseri hücrelerinde hücre invazyonunu azalttığı belirlenmiştir. Özellikle FOLFOX ve FOLFIRI gruplarında invazyonun en az olduğu ve hücrelerin Matrigel tabakasını geçme yeteneklerinin ciddi şekilde baskılandığı gözlemlenmiştir. **Şekil 4.38 (B)**'deki kantitatif analiz grafiğinde, negatif kontrol ile kıyaslandığında FOLFOX ve FOLFIRI kemoterapi kombinasyonlarının invazyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaltmış olduğu tespit edilmiştir. Tek başına kullanılan kemoterapi ajanları OX, IRI ve FF, negatif kontrol ile kıyaslandığında HT29 kolon kanseri hücrelerinin Matrigel tabakayı aşarak invazyon yapma yeteneğini baskılamış olduğu tespit edilmiştir. Ancak bütün uygulama grupları içerisinde özellikle FOLFOX kombinasyonunun daha etkili olduğu görülmektedir. Yüksek invaziv potansiyele sahip kolon kanseri gibi hücrelerde, metastatik yayılım sürecinden sorumlu invazyon yeteneğinin baskılanması kanser tedavisi açısından oldukça önemli bir konudur (Lim ve ark., 2014). Kemoterapi tedavilerinde FOLFOX ve FOLFIRI gibi çoklu ilaç kombinasyonlarının kullanılması tümör hücrelerinin daha ileri aşamalara yayılmasını önleyebilmektedir (Gu ve ark., 2019).

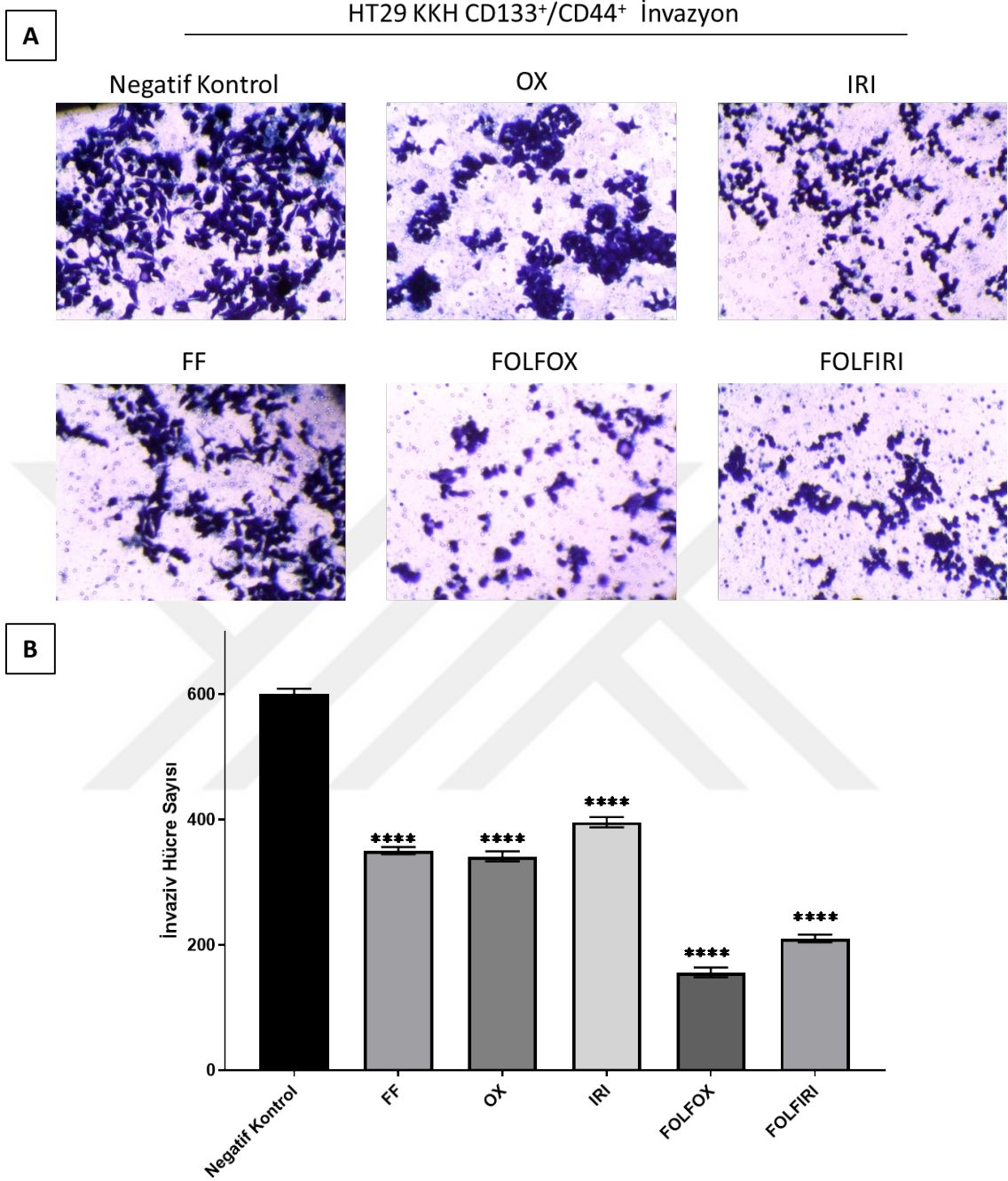


Şekil 4.39 HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının migrasyon üzerindeki etkileri

(A) Farklı ilaç etkileşimlerine (Negatif Kontrol, OX, IRI, FF, FOLFOX, FOLFIRI) maruz bırakılan HT29 CD133⁺/CD44⁺ hücrelerinin transwell migrasyon deneyi sonucunda kristal viyole ile boyanmış hücrelerinin mikroskop görüntüleri (10X büyütme). (B) Her bir çalışma grubunda migrasyon gerçekleştiren hücre sayılarının kantitatif analizi. Değerler, ortalama ± SEM olarak sunulmuştur (n=3). İstatistiksel analizler, negatif kontrol grubuna kıyasla yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

Şekil 4.39’da HT29 CS133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinin migrasyon yeteneği üzerindeki farklı kemoterapi ajanlarının etkisi transwell migrasyon testi kullanılarak

değerlendirilmiştir. FF, OX, IRI, FOLFOX ve FOLFIRI'nin hücre göçü üzerindeki inhibe edici etkilerini karşılaştırabilmek için deney sonucunda elde edilen mikroskop görüntüleri ve kantitatif analiz grafikleri oluşturulmuştur. **Şekil 4.39 (A)**'da verilen görüntülerde negatif kontrol ile kıyaslandığında FOLFOX ve FOLFIRI çoklu ilaç kombinasyonlarının hücre migrasyonunu tekli ilaç etkileşimlerine göre daha fazla baskıladığı görülmektedir. **Şekil 4.39 (B)**'de verilen kantitatif analiz grafiğinde kemoterapi ilaçlarının negatif kontrole göre migrasyonu baskılama seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. HT29 kolon kanseri ve HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinin migrasyon oranları kıyaslandığında, HT29 hücrelerinde kemoterapi ajanları ile muamele edildikten sonra migrasyonun daha belirgin bir şekilde azaldığı görülmüştür. HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinin ise genel olarak daha yüksek migrasyon kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Özellikle HT29 hücrelerinin ve HT29 CD133⁺/CD44⁺ kök hücrelerin negatif kontrol grupları incelendiğinde kolon kanseri kök hücrelerinde yüksek migrasyon oranı dikkat çekmektedir. Bu durum kök hücrelerin daha agresif bir fenotip sergilediğini ve metastatik potansiyelinin kolon kanseri hücrelerine göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. FOLFOX çoklu ilaç kombinasyonu uygulaması hem kök hücrelere hem de diferansiye hücrelerde migrasyonu diğer uygulamalara kıyasla daha fazla baskıladığı belirlenmiştir. Ancak yine de kök hücrelerde baskılanma HT29 diferansiye hücrelere göre daha sınırlı kalmıştır. Bu durum, kök hücrelerin kemoterapötik ajanlara daha dirençli bir yapı oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil 4.40 HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının invazyon üzerindeki etkileri

(A) Farklı ilaç etkileşimlerine (Negatif Kontrol, OX, IRI, FF, FOLFOX, FOLFIRI) maruz bırakılan HT29 CD133⁺/CD44⁺ hücrelerinin transwell invazyon deneyi sonucunda kristal viyole ile boyanmış hücrelerinin mikroskop görüntüleri (10X büyütme). (B) Her bir çalışma grubunda invaze olan hücre sayılarının kantitatif analizi. Değerler, ortalama ± SEM olarak sunulmuştur (n=3). İstatistiksel analizler, negatif kontrol grubuna kıyasla yapılmıştır. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

Şekil 4.40'ta görüldüğü üzere, HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücrelerinde farklı kemoterapi ajanlarının invazyon kapasitesi üzerindeki etkileri verilmiştir. Şekil

4.40 (A) incelendiğinde, HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücreleri negatif kontrol grubundaki hücrelerin Matrigel ile oluşturulan yapay bazal membranı geçerek yüksek invazyon yeteneği gösterdiği görülmektedir. Kemoterapi ajanları ile muamele edilen kök hücrelerin negatif kontrol ile kıyaslandığında, invazyon yeteneklerinin baskılandığı belirlenmiştir. Özellikle FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonları, invazyonu tekli ilaç uygulama gruplarına göre daha fazla azaltmıştır. OX, IRI ve FF gruplarında, negatif kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma görülse de bu azalma kombinasyonlardaki kadar belirgin değildir. Kolon kanserinin mevcut tedavisinde yaygın olarak kullanılan OX, IRI, FF ve bunların kombinasyonları FOLFOX ve FOLFIRI, kolon kanseri kök hücrelerinin invazyon yeteneğini baskılamış olsa da diferansiye HT29 hücreleri ile kıyaslandığında, kanser kök hücrelerinin daha dirençli bir yapı sergilediği tespit edilmiştir (Dalerba ve ark., 2007). Bu tez çalışmasında literatürle uyumlu olarak, kanser kök hücrelerinin ilaçların kombinasyon şeklinde uygulanmasına rağmen invazyon yeteneklerini büyük oranda koruduğu görülmektedir.

Kolorektal kanserlerin teşhisi birçok hastada ileri evrede yapılmaktadır. Bu nedenle metastatik kolon kanser hücrelerinin neden olduğu etkiyi azaltmak ve hastanın sağkalımını artırmak amacıyla çeşitli tedavi yöntemleri uygulanmaktadır (Gustavsson ve ark., 2015). Tez çalışması kapsamında, HT29 kolon kanseri ve HT29 CD133⁺/CD44⁺ kolon kanseri kök hücreleri üzerinde geleneksel kemoterapide kolon kanseri tedavisi için en fazla tercih edilen kemoterapi ajanları (FA, 5-FU, IRI ve OX) ve kombinasyonlarının (FOLFOX ve FOLFIRI) etkisi, oluşturulan 2B ve 3B hücre koşullarında incelenmiştir. Çalışmada, klinikte kullanılan geleneksel ilaç kombinasyonlarının, EMT, metastaz, invazyon ve migrasyon süreçlerindeki etkinliği hem diferansiye kolon kanseri hücrelerinde hem de kanser kök hücrelerinde araştırılmıştır. Hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarına entegre edilebilmeleri için önemli bilgiler sunulmuştur. Elde edilen bulgular, FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının kolon kanseri kök hücreleri (HT29 CD133⁺/CD44⁺) üzerindeki etkisinin farklılaşmış kolon kanseri hücrelerine kıyasla daha sınırlı olduğunu göstermiştir. Kanser kök hücreleri, kanserin progresyonunda ve nüksetmesinden sorumlu, kendi kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeline sahip tümör alt popülasyonu olarak tanımlanırlar (Chen ve ark., 2016; Y. Yang et al., 2022). KKH'lerin

çoklu ilaç direnci (MDR) gibi koruyucu mekanizmaları daha etkin kullanması, kemoterapi direnci oluşumunda ve tedaviden sonra hastalığın nüksünde önemli bir rol oynamaktadır. MDR, kemoterapötik ajanların hücre içerisine girmesini engeller ve hücre içindeki ilaçları da dışarı pompalayarak tedavide kullanılan ilaçların etkinliğini azaltır (Ashique ve ark., 2024). Bunun yanı sıra, KKH'lerde hücre döngüsünün yavaş olması, DNA hasar onarım mekanizmalarının etkin çalışması ve apoptozu baskılayan *Bcl-2* gibi anti-apoptotik proteinlerin aşırı eksprese edilmesi, hücrelerin antikanser ilaçlara karşı direnç geliştirmesini sağlamaktadır (Chen ve ark., 2022). Literatürde kolon karsinom hücreleri ile yapılan bir çalışmada kemoterapi ajanlarının kolon kanser kök hücresi ve diferansiye kolon kanser hücreleri üzerindeki etkisi apoptotik genlerin varlığına göre analiz edilerek değerlendirilmiştir. Anti-apoptotik genlerin aşırı eksprese olduğu KKH'lerin daha dirençli olduğu gösterilmiştir (Colak ve ark., 2014). Yapılan birçok çalışmada, KKH'leri hedef almanın tümör hücrelerinde apoptozu artırabileceği öne sürülmüştür (Cai ve ark., 2018; Tian ve ark., 2017). Bu çalışmada elde edilen bulgulara, literatürle uyumlu olarak, kemoterapi tedavilerinde ilaca karşı geliştirilen dirençte kanser kök hücrelerini hedeflemenin önemine dikkat çekmektedir.

Hücre kültürü teknikleri, farklı test koşulları altında belirli bir biyolojik mekanizmayı veya süreci araştırmak için laboratuvar koşullarında hücrelerin büyümesini mümkün kılan modellerdir. Geleneksel olarak kullanılan, 2B kültürde, hücreler tipik olarak düz bir tek tabaka halinde kaplanır (Katt ve ark., 2016). Tek taraflı bağlanma, birçok hücre için doğal olmayan bir polariteye neden olur. Bu durum, tümör dokusunun heterojen yapısını ve hücre-hücre etkileşimini yeterince yansıtamamasına neden olmaktadır (Białkowska ve ark., 2020). Yapılan MTT analizleri sonucunda, tek ajanların ve kombinasyonlarının 2B kültürdeki hücreler üzerindeki etkisini değerlendirildiğinde, hücre canlılığının belirgin şekilde azalması uygulanan ilaçların hücrelere homojen etki etmesinin sitotoksitesi artırmış olabileceği ile ilişkilendirilmiştir (Andersen ve ark., 2015). 3B hücre kültürü, hücrelerin büyümesine ve çevreleyen hücre dışı çerçeve ile üç boyutta etkileşime girmesine izin veren bir kültür ortamıdır. 3B sistemde kültürlen hücreler, *in vivo*'ya benzer bir mikro-ortamda bulunur, bu nedenle daha temsili bir morfoloji ve davranışa sahiptirler (Anton ve ark., 2015; Weiswald ve ark., 2015). Bu bağlamda, 3B kültür koşullarında mikro-dokular kullanılarak hücrelerin *in vivo* benzeri

tümör dokusu oluşturulması sağlanmıştır. Çalışma sonunda, 2B hücre kültüründe hem ajanlarının tekli kullanımı hem de FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonları hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azaltırken, 3B kültürde hücrelerin daha dirençli bir fenotip sergilediğini belirlenmiştir. Özellikle, 3B kültürde KKH'lerin daha dirençli bir yapı sergilediği ve uzun inkübasyon süresine gereksinim olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, literatürdeki bulgularla uyumlu olarak, 3B hücre kültürünün kanser kök hücrelerinin biyolojik özelliklerini daha iyi yansıttığı görülmektedir (Białkowska ve ark., 2020; Vitale ve ark., 2024). İnsan kolon kanseri hücre hattı HCT-116 ile yapılan bir çalışmada, U tabanlı mikro plakalar ile 3B tümör sferoidleri oluşturulmuş ve 5-FU, irinotekan ve oxaliptatin dahil olmak üzere kolon kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlar test edilmiştir. 2B ve 3B hücre kültürü sonuçları değerlendirildiğinde 2B kültürdeki hücrelerin ilaçlara benzer seviyede yüksek duyarlılık gösterdiği rapor edilmiştir. 3B kültürdeki hücrelerin ise ilaçlara daha dirençli olduğu vurgulanmıştır (Karlsson ve ark., 2012). Literatürde yapılan benzer çalışmalarda, 3B mikro-dokularda hücrelerin genetik ve fenotipik adaptasyonlar gösterdiği ve bu nedenle ilaçlara karşı daha dirençli olduğu belirtilmektedir (Imamura ve ark., 2015; Lv ve ark., 2017; Perut ve ark., 2018). 3B kültürlerde ilaca karşı oluşan bu direncin üstesinden gelebilmek için, sekiz farklı kolorektal kanser hücre hattı ile yapılan bir çalışmada, kombinasyon tedavisi sonucu oluşan sinerjik etkinin 3B mikro-doku büyümesini engellediği bildirilmiştir (Gong ve ark., 2024; Zoetemelk ve ark., 2019). Çalışmamız, 3B hücre modellerinde, kombinasyon uygulamasının ilaçların tekli uygulamasına göre daha etkili olduğunu göstermiştir.

Çalışmada kullanılan kemoterapi ajanlarının (OX, IRI, FF) ve kombinasyonlarının (FOLFOX, FOLFIRI) diferansiye ve kök hücrelere gösterdiği etkiler, bu ajanların moleküler hedeflerinin çeşitliliğini ortaya koymuştur. FOLFOX ve FOLFIRI, HT29 hücrelerinde apoptotik genlerin (*p53*, *Bax/Bcl-2 oranı*, *Caspase-3/7*) ekspresyonunu artırarak hücre ölümünü indüklerken, HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücrelerinde bu genlerin daha düşük seviyelerde ifade edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, *MMP-2*, *MMP-9* gibi invazyon ve metastazda kritik rol oynayan genlerin kök hücrelerde daha yüksek ekspresyon gösterdiği, bu hücrelerin metastatik özelliklerini kemoterapiye rağmen koruduğunu göstermektedir (Treviño ve ark., 2023). Literatürdeki çalışmalar CD133 ve

CD44 yüzey belirteçlerinin kanser kök hücrelerinde ilaç direnci ile ilişkisini bildirmiştir (Lei ve ark., 2021). Kemoterapi stresi altında, kolon kanseri kök hücrelerinde direnç mekanizmalarının aktive olduğu ve bu süreçte anti-apoptotik *Bcl-2* proteininin yanı sıra ABC ilaç taşıyıcılarının ekspresyonunun arttığı, böylece kemoterapi direncinin olduğu gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2017). HCT166 hücrelerinde CD44 yüzey belirteçlerinin susturulmasıyla hücrede apoptotik genlerin yukarı regülasyonuna neden olmuş ve hücre ölümü gerçekleşmiştir (Lee ve ark., 2017). Literatürdeki birçok çalışma kanser tedavisi için KKH'lerin potansiyel terapötik hedefler olduğunu bildirmiştir (Andrade ve ark., 2021; Kazama ve ark., 2018; Treviño ve ark., 2023; L. Yang ve ark., 2020). Ancak, KKH'lerin yüzey belirteçlerinin işlevsel rolü hala tam olarak aydınlatılamamıştır, bundan dolayı yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri ve KKH'ler arasında bir bağlantı kurmanın doğruluğu tartışma konusu olmaya devam etmektedir (De Angelis ve ark., 2021). Yapılan bir çalışmada CD133 ekspresyonunun inhibisyonu, kanserin seyri üzerinde hiçbir etkiye neden olmamıştır (Horst ve ark., 2009). Kanser kök hücre popülasyonunu belirlemek için daha güçlü belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (Ghuwalewala ve ark., 2016). Bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan CD133 ve CD44 yüzey belirteçlerini kullanılmıştır. Ancak KKH'lerin daha iyi ayrıştırılabilmesi ve ilaç araştırmalarında verilen cevabın doğru şekilde yorumlanabilmesi için literatürde bahsi geçen bu eksikliğin giderilmesine ihtiyaç vardır.

Hücrelerin metastatik özelliklerini artıran EMT (epitel-mezenkimal geçiş), epitel fenotipten hareketli mezenkimal fenotipe geçişin olduğu biyolojik bir süreçtir. Bu sürecin kanser hücrelerinin invazyon ve migrasyon yeteneğini artırdığı ve ilaç direncinin gelişmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Escalante ve ark., 2021). EMT'nin moleküler mekanizmasını *E-kaderin*, *N-kaderin*, *Vimentin* ve *TGFβ* gibi genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler belirlemektedir (Buyuk ve ark., 2022). EMT sürecinde gerçekleşen *E-kaderin* ekspresyon seviyesinin azalması ve *Vimentinin* aşırı ekspresyonu hücrelerin apoptozu inhibe ederek hayatta kalma seviyesinin artırır ve ilaç direncinin gelişmesine olanak tanımaktadır (Vu ve Datta, 2017). Bu çalışmada, diferansiye kanser hücrelerinde FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının *E-kaderin* ekspresyon seviyesini artırarak hücre göçünü engellemekte etkili olduğunu belirledik. Kanser kök hücrelerinde yapılan *in vitro* çizik testi ve transwell ile yapılan migrasyon

ve invazyon analizlerinde bu hücrelerin diferansiye hücrelerden daha agresif bir fenotip sergilediği görülmüştür. FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının KKH'lerde migrasyon, invazyon ve EMT ile ilgili genlerin baskılanmasında etkili olduğu ancak bu etkinin metastatik özellikleri tamamen baskılamada yetersiz olduğu bulgusu literatürdeki benzer çalışmalarla uyum göstermektedir (Iyer ve ark., 2019).

Kanser kök hücrelerinin, tümör dokusu içerisinde bir alt popülasyon olduğundan ve kendi kendini yenileyebilme, hastalığın tekrar etmesinden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Magee ve ark., 2012). KKH'lerin bu özellikleri mikro-çevre olarak adlandırılan ortam tarafından desteklendiği ve bu mikro-ortamların KKH'leri desteklediği bildirilmiştir. KKH'ler mikro-çevreyi etkileyerek, EMT, hipoksi ve anjiyogenez gibi süreçlerin hücrel sinyal yollarını aktif hale getirebilmektedir (Brozovic, 2016; Plaks ve ark., 2015). Tümör mikro-çevresinin yapısı ve işleyişi, tedavilere verilen yanıt ve tümör progresyonuna bağlı olarak değişmektedir. Bu mikro-çevre, EMT'yi oluşturan sürecin aktifleşmesiyle diferansiye kanser hücrelerinin KKH özellikleri kazanmasını indükleyebilmektedir. Bu durum invazyon, metastaz ve tedavi direncini artırabilmektedir (Borovski ve ark., 2011; Iliopoulos ve ark., 2011; Plaks ve ark., 2015; Visvader ve Lindeman, 2008). Mikro-çevre ve EMT sinyallerinin etkisiyle oluşan diferansiye kanser hücrelerinin kanser kök hücreleri özellikleri kazandığı bu dönüşüm, tedavilerde yalnızca KKH'leri hedeflemenin uzun vadede yeterli olamayacağını göstermektedir. Geride kalan farklılaşmış kanser hücrelerinin zamanla KKH benzeri özellikler kazanarak tedaviye dirence ve tümör nüksüne neden olabileceği vurgulanmaktadır (Tanabe ve ark., 2020). EMT geçiren hücrelerin mezenkimal özellik kazanarak dolaşıma girdiği ve daha sonra dolaşımdaki hücrelerin de MET süreciyle yeniden epitel özellik kazandığı bilinmektedir. Kanser kök hücrelerini hedef alabilmek ve tedaviye daha duyarlı hale getirmek için kullanılan ilaçlar, KKH'lerin diferansiye hücreye dönüşmesini veya mezenkimal-epitel geçiş (MET) sürecini aktifleştirerek etkinliğini göstermektedir (Pattabiraman ve ark., 2016). Ancak laboratuvar çalışmalarında etkinliği kanıtlanan bu hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının, klinik çalışmalarda beklenen etkinliği sağlayamadığı bildirilmiştir (Mokhtari ve ark., 2017). Hedefe yönelik tedavilerin, geleneksel kemoterapi ajanlarıyla kombinasyonu terapötik etkiyi artırabilmektedir. Bu tedavilerin eş zamanlı olarak uygulanması dirençli kanser

hücrelerinin tamamen yok edilebilmesi için umut verici bir tedavi stratejisi olarak görülmektedir (Garg ve ark., 2024). Literatürde, EMT'yi baskılayan küçük moleküller veya immünoterapiler ile geleneksel kemoterapötik ajanların kombine edilmesinin, metastazı önlemede ve tedaviye direnç mekanizmalarını aşmada etkili olabileceği bildirilmektedir (Pereyra ve ark., 2019; Tanabe ve Ono, 2018).

Geleneksel kemoterapötik kombinasyonlar, hastalığın ilerlemesini engellemek ve hastanın sağkalım süresini iyileştirmek için önemli rol oynamaktadır. Özellikle bu çalışmada da kullanılan FOLFOX (folinik asit + 5-FU + oxaliplatin), FOLFIRI (folinik asit + 5-FU + irinotekan) ve FOLFOXIRI (folinik asit + 5-FU + oxaliplatin + irinotekan) gibi kombinasyonlar metastatik kolorektal kanser için klinikte birinci basamak tedavi stratejileri olarak kullanılmaktadır. Bu ilaç kombinasyonları, içerdikleri bileşenlerin etkileşimiyle kanser hücrelerini hedef almakta ve bu hücrelerin direnç geliştirmesini engellemeye yardımcı olmaktadır (Ashique ve ark., 2024). Kombinasyonları oluşturan kemoterapi ajanlarının etkinliği literatürde yapılan birçok çalışmayla kanıtlanmıştır (Bailly, 2019; Chai ve ark., 2024; Chalabi-Dchar ve ark., 2021; Glimelius ve ark., 2021; Stintzing, 2014). Onlarca yıldır 5-FU, kolorektal kanserin kemoterapötik tedavisinin omurgasını oluşturmuştur. Hücrede RNA ve DNA metabolizmasını bozmak için reaksiyonu düzenleyen timidilat sentaz enzimini inhibe ederek antiproliferatif etkinliğini göstermektedir (Longley ve ark., 2003). Ancak, tedaviye karşı gelişen direnç ve hasta sağkalımının iyileştirilmesi için 5-FU'nun tek başına kullanılması yerine, diğer ilaçlarla kombine halinde kullanımı tercih edilmektedir (Glynne-Jones ve Harrison, 2020; Gustavsson ve ark., 2015; Modest ve ark., 2019). 5-FU ile yapılan bir çalışmada uzun süreli kullanımın, anti-apoptotik mekanizmaları ve hayatta kalma sinyallerini tetiklediği gözlemlenmiştir (Shi ve ark., 2002). Geleneksel kemoterapi tedavilerine karşı oluşan direnç, kanser hücrelerinde ilaç alımını etkileyen metabolik değişiklikler nedeniyle ortaya çıkmaktadır (X. Wang ve ark., 2019). Kombinasyon stratejisi, sinerjistik etkisinden ve her ajanın tek başına kullanılan dozunu azaltabilecek etki mekanizmalarına sahip olduğundan dolayı daha fazla ilgi görmektedir (Anselmino ve ark., 2024). Örneğin, irinotekan ve 5-FU kombinasyonu, doz ve zamana bağlı olarak sinerjik etkiler göstererek antikanser yanıtlar sağlamıştır (Guichard ve ark., 1998; Miyaki ve ark., 2012). 5-FU'nun folinik asit ile kombinasyonunun timidilat

sentaz inhibisyonunu güçlendirerek tedavi etkinliğini artırmaktadır (Vodenkova ve ark., 2020). Ancak, kemoterapötik kombinasyonlarda da yüksek toksisite ve düşük yanıt süreleri gibi problemler görülmekte ve bu durum kanser tedavisinde sınırlamalara sebep olmaktadır. Kombinasyonda kullanılan OX ve IRI gibi kemoterapi ajanları tedavi etkinliğini artırırken ilaca bağlı gelişen yan etkiler ve zamanla oluşan ilaç direnci gibi sınırlamalara yol açabilmektedirler (Sunakawa ve ark., 2016). Örneğin, bir çalışmada topoizomeraaz I'yi inhibe ederek DNA sentezinin bozulmasına ve apoptozun indüklenmesine yol açan irinotekan, tedaviye bağlı yan etkilerin oluşmasına ve terapötik etkilerin sınırlı kalmasına neden olmuştur (Dai ve ark., 2019). Benzer şekilde oxaliplatinin de sıklıkla nörotoksisiteye ve ilaç direnci gelişimine neden olduğu bildirilmiştir (Martinez-Balibrea ve ark., 2015). Ek olarak üç ilacın birlikte kullanılmasıyla oluşturulan FOLFOXIRI kombinasyonunun metastatik kolorektal kanser tedavisinde hastaların sağkalımını belli bir süre artırmış olsa da ciddi yan etkiler oluşturduğu için kemoterapide kullanımının uygun bir seçenek olmadığı bildirilmiştir (Glimelius ve ark., 2021; Glynne-Jones ve Harrison, 2020; Ramzy ve ark., 2022; Zoetemelk ve ark., 2020). Kolon kanserinde kombinasyon tedavilerinin yan etkisini azaltmak ve antiproliferatif etkinliğini artırmak için yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, yeni tedavi stratejileri geliştirebilmek için önemli veriler sunmaktadır (McQuade ve ark., 2017). Örneğin düşük doz optimize edilmiş ilaç kombinasyonlarının daha az toksik etki oluşturarak hasta sağkalımını iyileştirebileceği bildirilmiştir (Zoetemelk ve ark., 2020). Çalışmamızda kullanılan FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonları, özellikle diferansiye kanser hücrelerinde invazyon ve metastazı baskılamada oldukça etkilidir. Bu bağlamda bu ajanların daha düşük dozlarda hedefe yönelik ajanlarla kombine olarak kullanımının, kanser kök hücreleri gibi tedavi direncinde önemli rolü olan alt popülasyonları etkili bir şekilde ortadan kaldırarak tedavi sonuçlarını iyileştirebileceği vurgulanmaktadır (Shibue ve ark., 2017).

Moleküler mekanizmaları hedefleyen antikanser tedavi stratejilerinin artmasıyla, geleneksel sitotoksik kemoterapi ilaçlarının geliştirilmesine yönelik ilgi azalmış gibi görünmektedir, ancak hedefe yönelik yaklaşımların tek başına monoterapi olarak kullanılmasının iyileştirici gücünün sınırlı olduğu bildirilmiştir (Ashique ve ark., 2024). Kansere yönelik geliştirilecek yeni tedavi stratejilerin, farklı mekanizmalar üzerinde

etki gösteren yöntemlerin birleştirilmesi yoluyla daha güçlü terapötik etkinlik sağlayabileceği ileri sürülmektedir. Bu nedenle, geleneksel kemoterapide kullanılan ilaçların yeniden değerlendirilmesi ve hedefe yönelik tedavilerle birlikte kullanıldıklarında terapötik potansiyeli nasıl etkileyeceğinin incelenmesi, yeni tedavi stratejilerinin optimize etmek için kritik bir adımdır (Anselmino ve ark., 2024).

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, kolorektal kanserin mevcut kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan folinik asit (FA), 5-Fluorourasil (5-FU), oxaliplatin (OX) ve irinotekan (IRI) kemoterapi ilaçlarının tekli ve kombinasyon (FOLFOX, FOLFIRI) etkileri iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürü modelleri kullanılarak detaylı bir şekilde incelenmiştir. Çalışmada, kemoterapi ajanlarının diferansiye kanser hücreleri ve kanser kök hücreleri üzerindeki etkilerini anlamak ve hücrelerin invazyon, migrasyon ve EMT süreçlerini ilaç uygulamasına bağlı olarak nasıl etkilendiğini *in vitro* deneylerle açıklamak amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular farklılaşmış kanser hücreleri ile KKH'ler arasındaki yanıt oluşturma farklılıklarını ve mevcut kemoterapi ajanlarının sınırlamalarını göstermiş ve yeni bir terapötik yaklaşım geliştirilebilmesi için önemli bir temel oluşturmuştur. İlgili amaçlar doğrultusunda yürütülen deneysel süreç sonunda, aşağıda özetlenen bulgulara ulaşılmıştır.

- Kanser kemoterapisinde ilaç direnci ve hastalığın yeniden başlama sürecinden sorumlu tutulan KKH'lerin geleneksel kemoterapi ilaçlarına oluşturduğu yanıtı 2B ve 3B kültür sistemlerinde inceleyebilmek ve diferansiye kanser hücreleri ile farklılıklarını anlamak adına, kolon kanser kök hücre yüzey belirteçleri CD133 ve CD44 kullanılarak HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücreleri MACS tekniği ile izole edilmiştir ve qRT-PCR ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.
- Kemoterapi ajanlarının tekli (FF, OX, IRI) uygulanmasına kıyasla kombinasyon (FOLFOX, FOLFIRI) olarak uygulanmasının hem farklılaşmış kanser hücrelerinde hem de KKH'lerde daha etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak KKH'lerdeki etki daha sınırlı kalmış ve bu hücrelerin dirençli bir fenotip sergilediği tespit edilmiştir. Bu kombinasyonların düşük dozlarda, hedefe

yönelik tedavi stratejilerine eklenmesi, terapötik etkinliklerini artırırken yüksek dozdan kaynaklı toksisiteyi azaltabilir.

- CompuSyn programı kullanılarak FOLFOX (FF+OX) ve FOLFIRI (FF+IRI) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saat kombinasyon indeksi hesaplanmıştır. Kombinasyonların kullandığımız dozlarda özellikle 48.saatte sinerjik ($KI < 1$) etkilerinin daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Sonraki deneysel aşamalarda kombinasyonların 48.saate IC_{50} dozları ile devam edilmiştir.
- *In vivo* tümör dokusunu daha iyi taklit edebilme yeteneklerinden dolayı oluşturulan 3B kültürdeki hücrelerin, FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarına karşı daha dirençli olduğu belirlenmiştir. 3B hücre kültürü modelleri, hücre-hücre ve hücre-mikroçevre etkileşimlerini içermesi nedeniyle *in vivo* koşullara daha yakın sonuçlar sunmaktadır. Bu bağlamda, ilaç geliştirme süreçlerinde 3B hücre kültürü modellerinin kullanılması, klinik öncesi çalışmaların başarı oranını yükseltmektedir.
- FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının, *E-kaderin* ekspresyonunu koruyarak HT29 hücrelerinde EMT'yi baskılamada etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak özellikle 3B kültürde, HT29 $CD133^+/CD44^+$ kanser kök hücrelerinin *N-kaderin*, *Vimentin* ve *TGF- β 1* gibi EMT ile ilişkili genleri yüksek seviyelerde ifade etmesinden kaynaklı, bu hücrelerin invaziv ve metastatik potansiyelinin devam ettiğini göstermiştir. EMT sürecinin inhibisyonu metastatik kolorektal kanserin tedavisi için oldukça önemli bir konudur. Çalışmada, FOLFOX ve FOLFIRI gibi kombinasyonların hedefe yönelik terapilere entegre edilmesinin metastatik kolorektal kanser tedavisindeki önemi literatürdeki bilgiler ışığında sunulmuştur.
- FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonları, monoterapilere kıyasla diferansiye kanser hücrelerinin 2B ve 3B kültürlerinde apoptotik genlerin ekspresyonunu artırmış, migrasyon ve invazyondan sorumlu olan genlerin ekspresyonunu baskılamıştır. Buna karşın, KKH'lerde, deneysel sürecin diğer aşamalarıyla benzer şekilde kemoterapi kombinasyonlarına karşı daha dirençli bir fenotip olduğu belirlenmiştir.
- Transwell deneyi ile FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının invazyon ve migrasyon üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Diferansiye kanser hücrelerinde

invazyon ve migrasyon süreçlerinin kombinasyonların oluşturduğu sinerjik etki sayesinde baskılandığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, KKH'lerde FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyon etkilerinin sınırlı olduğu ve kök hücrelerin invazyon potansiyelini koruduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma, kolorektal kanserin geleneksel kemoterapötik kombinasyonlarla tedavisinde karşılaşılan zorlukları ve bu tedavilerin HT29 kanser hücreleri ile HT29 CD133⁺/CD44⁺ kanser kök hücreleri üzerindeki etkilerini, 2B ve 3B hücre kültür koşullarında ayrıntılı bir şekilde karşılaştırmaktadır. Sonuç olarak, FOLFOX ve FOLFIRI kemoterapi kombinasyonlarının diferansiye kanser hücrelerinde antiproliferatif etkilerinin başarılı olduğu, ancak kanser kök hücrelerinde sınırlı bir etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu bulgular, FOLFOX ve FOLFIRI kombinasyonlarının EMT süreçlerini baskılayan ve KKH'leri hedefleyen tedavilerle birleştirilmesinin, kolorektal kanser tedavisinde daha etkili ve uzun süreli sonuçlar sağlayabileceğini göstermektedir. Gelecekteki araştırmalar, metastaz ve tedaviye direnç mekanizmalarını hedefleyen daha spesifik ve kombine tedavi stratejilerinin geliştirilmesine odaklanmalıdır. Bu çabalar, kolorektal kanser tedavisinde daha yüksek başarı oranları elde edilmesini sağlayabilir.

7 KAYNAKÇA

- Achilli, T. M., McCalla, S., Meyer, J., Tripathi, A., ve Morgan, J. R. (2014). Multilayer spheroids to quantify drug uptake and diffusion in 3D. *Molecular Pharmaceutics*, 11(7), 2071–2081. <https://doi.org/10.1021/MP500002Y>
- Advani, S., ve Kopetz, S. (2019). Ongoing and future directions in the management of metastatic colorectal cancer: Update on clinical trials. *Journal of Surgical Oncology*, 119(5), 642–652. <https://doi.org/10.1002/JSO.25441>
- Amelian, A., Wasilewska, K., Megias, D., ve Winnicka, K. (2017). Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development. *Pharmacological Reports : PR*, 69(5), 861–870. <https://doi.org/10.1016/J.PHAREP.2017.03.014>
- Amniouel, S., ve Jafri, M. S. (2023). High-accuracy prediction of colorectal cancer chemotherapy efficacy using machine learning applied to gene expression data. *Frontiers in Physiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2023.1272206>
- An, W., Lai, H., Zhang, Y., Liu, M., Lin, X., ve Cao, S. (2019). Apoptotic pathway as the therapeutic target for anticancer traditional Chinese medicines. In *Frontiers in Pharmacology (Vol. 10)*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00758>
- Andersen, T., Auk-Emblem, P., ve Dornish, M. (2015). 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays (Basel, Switzerland)*, 4(2), 133–161. <https://doi.org/10.3390/MICROARRAYS4020133>
- Andrade, F., Rafael, D., Vilar-Hernández, M., Montero, S., Martínez-Trucharte, F., Seras-Franzoso, J., Díaz-Riascos, Z. V., Boullosa, A., García-Aranda, N., Cámara-Sánchez, P., Arango, D., Nestor, M., Abasolo, I., Sarmiento, B., ve Schwartz, S. (2021). Polymeric micelles targeted against CD44v6 receptor increase niclosamide efficacy against colorectal cancer stem cells and reduce circulating tumor cells in vivo. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 331, 198–212. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2021.01.022>
- Angius, A., Scanu, A. M., Arru, C., Muroi, M. R., Rallo, V., Deiana, G., Ninniri, M. C., Carru, C., Porcu, A., Pira, G., Uva, P., Cossu-Rocca, P., ve De Miglio, M. R. (2021). Portrait of Cancer Stem Cells on Colorectal Cancer: Molecular Biomarkers, Signaling Pathways and miRNAome. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–35. <https://doi.org/10.3390/IJMS22041603>
- Anselmino, L. E., Malizia, F., Avila, A., Cesatti Lalue, N., Mamberto, M., Zanotti, L. C., Farré, C., Sauzeau, V., ve Menacho Márquez, M. (2024). Overcoming Therapy Resistance in Colorectal Cancer: Targeting the Rac1 Signaling Pathway as a Potential Therapeutic Approach. *Cells*, 13(21). <https://doi.org/10.3390/CELLS13211776>
- Anton, D., Burckel, H., Josset, E., ve Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5517–5527. <https://doi.org/10.3390/IJMS16035517>
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., ve Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683–691. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2015-310912>

- Arrigoni, C., Bersini, S., Gilardi, M., ve Moretti, M. (2016). In vitro co-culture models of breast cancer metastatic progression towards bone. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/ijms17091405>
- Ashique, S., Bhowmick, M., Pal, R., Khatoon, H., Kumar, P., Sharma, H., Garg, A., Kumar, S., ve Das, U. (2024). Multi drug resistance in Colorectal Cancer-approaches to overcome, advancements and future success. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, 10, 100114. <https://doi.org/10.1016/J.ADCANC.2024.100114>
- Azwar, S., Seow, H. F., Abdullah, M., Jabar, M. F., ve Mohtarrudin, N. (2021). Recent Updates on Mechanisms of Resistance to 5-Fluorouracil and Reversal Strategies in Colon Cancer Treatment. *Biology*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10090854>
- Bailly, C. (2019). Irinotecan: 25 years of cancer treatment. *Pharmacological Research*, 148. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2019.104398>
- Baker, L., Robinson, N., Wilson, D., Tabaqchali, M., ve Leaper, D. (2019). Vascular endothelial growth factor in colorectal cancer pathology, survival and treatment. *Annals of Oncology*, 30, v12. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz238.039>
- Battle, E., ve Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine* 2017 23:10, 23(10), 1124–1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>
- Bekaii-Saab, T., ve Wu, C. (2014). Seeing the forest through the trees: a systematic review of the safety and efficacy of combination chemotherapies used in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 91(1), 9–34. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVNOC.2014.01.001>
- Białkowska, K., Komorowski, P., Bryszewska, M., ve Miłowska, K. (2020). Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 6225, 21(17), 6225. <https://doi.org/10.3390/IJMS21176225>
- Bilgin, S., Erden Tayhan, S., Yıldırım, A., ve Koç, E. (2023). Investigation of the effects of isoeugenol-based phenolic compounds on migration and proliferation of HT29 colon cancer cells at cellular and molecular level. *Bioorganic Chemistry*, 130, 106230. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2022.106230>
- Biller, L. H., ve Schrag, D. (2021). Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review. *JAMA*, 325(7), 669–685. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2021.0106>
- Borovski, T., De Sousa E Melo, F., Vermeulen, L., ve Medema, J. P. (2011). Cancer stem cell niche: The place to be. *Cancer Research*, 71(3), 634–639. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3220/656795/P/CANCER-STEM-CELL-NICHE-THE-PLACE-TO-BETHE-CANCER>
- Bouchalova, P., ve Bouchal, P. (2022). Current methods for studying metastatic potential of tumor cells. *Cancer Cell International*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S12935-022-02801-W>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., ve Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of

- incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Breslin, S., ve O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(5–6), 240–249. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2012.10.003>
- Breslin, S., ve O'Driscoll, L. (2016). The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget*, 7(29), 45745–45756. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9935>
- Brozovic, A. (2016). The relationship between platinum drug resistance and epithelial–mesenchymal transition. *Archives of Toxicology* 2016 91:2, 91(2), 605–619. <https://doi.org/10.1007/S00204-016-1912-7>
- Budithi, A., Su, S., Kirshtein, A., ve Shahriyari, L. (2021). Data Driven Mathematical Model of FOLFIRI Treatment for Colon Cancer. *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 2632, 13(11), 2632. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13112632>
- Buyuk, B., Jin, S., ve Ye, K. (2022). Epithelial-to-Mesenchymal Transition Signaling Pathways Responsible for Breast Cancer Metastasis. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S12195-021-00694-9/FIGURES/2>
- Byus, G., ve Biochemistry, M. : (2023). Breast Cancer Stem Cells ve Cancer Stem Cells and Their Treatments. *Microreviews in Cell and Molecular Biology*, 4(0). <https://undergradsciencejournals.okstate.edu/index.php/MRCMB/article/view/17673>
- Cai, P., Xiao, Z., Pan, T., Wen, X., Cao, J., ve Ouyang, B. (2018). Lx2-32c inhibits the formation of mammosphere from MDA-MB-231 cells and induces apoptosis involving in down-regulating FoxM1. *Biomedicine ve Pharmacotherapy = Biomedecine ve Pharmacotherapie*, 102, 1176–1181. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.03.143>
- Chai, Y., Liu, J. L., Zhang, S., Li, N., Xu, D. Q., Liu, W. J., Fu, R. J., ve Tang, Y. P. (2024). The effective combination therapies with irinotecan for colorectal cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1356708. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2024.1356708/BIBTEX>
- Chalabi-Dchar, M., Fenouil, T., Machon, C., Vincent, A., Catez, F., Marcel, V., Mertani, H. C., Saurin, J. C., Bouvet, P., Guitton, J., Venezia, N. D., ve Diaz, J. J. (2021). A novel view on an old drug, 5-fluorouracil: an unexpected RNA modifier with intriguing impact on cancer cell fate. *NAR Cancer*, 3(3). <https://doi.org/10.1093/NARCAN/ZCAB032>
- Chen, L., Yang, F., Chen, S., ve Tai, J. (2022). Mechanisms on chemotherapy resistance of colorectal cancer stem cells and research progress of reverse transformation: A mini-review. *Frontiers in Medicine*, 9, 995882. <https://doi.org/10.3389/FMED.2022.995882>
- Chen, W., Dong, J., Haiech, J., Kilhoffer, M. C., ve Zeniou, M. (2016). Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major Challenges in Cancer Therapy. *Stem Cells International*, 2016, 1740936. <https://doi.org/10.1155/2016/1740936>

- Chiu, J. W., Krzyzanowska, M. K., Serra, S., Knox, J. J., Dhani, N. C., Mackay, H., Hedley, D., Moore, M., Liu, G., Burkes, R. L., Brezden-Masley, C., Roehrl, M. H., Craddock, K. J., Tsao, M. S., Zhang, T., Yu, C., Kamel-Reid, S., Siu, L. L., Bedard, P. L., ve Chen, E. X. (2018). Molecular Profiling of Patients With Advanced Colorectal Cancer: Princess Margaret Cancer Centre Experience. *Clinical Colorectal Cancer*, 17(1), 73–79. <https://doi.org/10.1016/J.CLCC.2017.10.010>
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research*, 70(2), 440–446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
- Chow, A. K. M., Cheng, N. S. M., Lam, C. S. C., Ng, L., Wong, S. K. M., Wan, T. M. H., Man, J. H. W., Cheung, A. H. K., Yau, T. C. C., Poon, J. T. C., Law, W. L., ve Pang, R. W. C. (2015). Preclinical analysis of the anti-tumor and anti-metastatic effects of Raf265 on colon cancer cells and CD26(+) cancer stem cells in colorectal carcinoma. *Molecular Cancer*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-015-0352-Y>
- Colak, S., Zimmerlin, C. D., Fessler, E., Hogdal, L., Prasetyanti, P. R., Grandela, C. M., Letai, A., ve Medema, J. P. (2014). Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 21(7), 1170. <https://doi.org/10.1038/CDD.2014.37>
- Cortés, F., Piñero, J., ve Ortiz, T. (1993). Importance of replication fork progression for the induction of chromosome damage and SCE by inhibitors of DNA topoisomerases. *Mutation Research Letters*, 303(2), 71–76. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(93\)90097-F](https://doi.org/10.1016/0165-7992(93)90097-F)
- Croce, C. M., ve Reed, J. C. (2016). Finally, an apoptosis-targeting therapeutic for cancer. In *Cancer Research* (Vol. 76, Issue 20, pp. 5914–5920). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1248>
- Dai, J., Chen, Y., Gong, Y., Wei, J., Cui, X., Yu, H., Zhao, W., Gu, D., ve Chen, J. (2019). The efficacy and safety of irinotecan±bevacizumab compared with oxaliplatin±bevacizumab for metastatic colorectal cancer: A meta-analysis. *Medicine*, 98(39). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017384>
- Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E. H., Simeone, D. M., Shelton, A. A., Parmiani, G., Castelli, C., ve Clarke, M. F. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24), 10158–10163. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0703478104>
- De Angelis, M. L., Francescangeli, F., Zeuner, A., ve Baiocchi, M. (2021). Colorectal cancer stem cells: An overview of evolving methods and concepts. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 23). *Cancers* (Basel). <https://doi.org/10.3390/cancers13235910>
- Dean, M., Fojo, T., ve Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews. Cancer*, 5(4), 275–284. <https://doi.org/10.1038/NRC1590>
- Diepenbruck, M., ve Christofori, G. (2016). Epithelial–mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? *Current Opinion in Cell Biology*, 43, 7–13. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2016.06.002>

- Douaiher, J., Ravipati, A., Grams, B., Chowdhury, S., Alatis, O., ve Are, C. (2017). Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. *Journal of Surgical Oncology*, 115(5), 619–630. <https://doi.org/10.1002/JSO.24578>
- Dow, L. E., O'Rourke, K. P., Simon, J., Tschaharganeh, D. F., Van Es, J. H., Clevers, H., ve Lowe, S. W. (2015). Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. *Cell*, 161(7), 1539–1552. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.05.033>
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., ve Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*, 12(4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/ADT.2014.573>
- Escalante, P. I., Quiñones, L. A., ve Contreras, H. R. (2021). Epithelial-Mesenchymal Transition and MicroRNAs in Colorectal Cancer Chemoresistance to FOLFOX. *Pharmaceutics*, 13(1), 1–19. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13010075>
- Evans, D. M., Fang, J., Silvers, T., Delosh, R., Laudeman, J., Ogle, C., Reinhart, R., Selby, M., Bowles, L., Connelly, J., Harris, E., Krushkal, J., Rubinstein, L., Doroshow, J. H., ve Teicher, B. A. (2019). Exposure time versus cytotoxicity for anticancer agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 84(2), 359–371. <https://doi.org/10.1007/S00280-019-03863-W/FIGURES/5>
- Fedele, M., Sgarra, R., Battista, S., Cerchia, L., ve Manfioletti, G. (2022). The Epithelial-Mesenchymal Transition at the Crossroads between Metabolism and Tumor Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/IJMS23020800>
- Gach-Janczak, K., Drogosz-Stachowicz, J., Janecka, A., Wtorek, K., ve Mirowski, M. (2024). Historical Perspective and Current Trends in Anticancer Drug Development. *Cancers*, 16(10), 1878. <https://doi.org/10.3390/CANCERS16101878>
- Galateanu, B., Hudita, A., Negrei, C., Ion, R. M., Costache, M., Stan, M., Nikitovic, D., Hayes, A. W., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., ve Gingham, O. (2016). Impact of multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model on anticancer drug response. *International Journal of Oncology*, 48(6), 2295. <https://doi.org/10.3892/IJO.2016.3467>
- Garg, P., Malhotra, J., Kulkarni, P., Horne, D., Salgia, R., ve Singhal, S. S. (2024). Emerging Therapeutic Strategies to Overcome Drug Resistance in Cancer Cells. *Cancers* 2024, Vol. 16, Page 2478, 16(13), 2478. <https://doi.org/10.3390/CANCERS16132478>
- Ghuwalewala, S., Ghatak, D., Das, P., Dey, S., Sarkar, S., Alam, N., Panda, C. K., ve Roychoudhury, S. (2016). CD44^{high}CD24^{low} molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cell Research*, 16(2), 405–417. <https://doi.org/10.1016/J.SCR.2016.02.028>
- Glimelius, B., Stintzing, S., Marshall, J., Yoshino, T., ve de Gramont, A. (2021). Metastatic colorectal cancer: Advances in the folate-fluoropyrimidine chemotherapy backbone. *Cancer Treatment Reviews*, 98, 102218. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2021.102218>

- Glynn-Jones, R., ve Harrison, M. (2020). FOLFOXIRI reintroduction in metastatic colorectal cancer. *The Lancet. Oncology*, 21(4), 468–469. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30087-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30087-5)
- Gmeiner, W. H. (2024). Recent Advances in Therapeutic Strategies to Improve Colorectal Cancer Treatment. *Cancers*, 16(5). <https://doi.org/10.3390/CANCERS16051029>
- Gong, R. H., Chen, M., Huang, C., Wong, H. L. X., Chen, S., Bian, Z., ve Chen, G. Q. (2024). Synergistic anti-colorectal cancer effects of WNT974 combined with artesunate via cooperative regulation of p21, p27, and AKT. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 12, 100498. <https://doi.org/10.1016/J.PRMCM.2024.100498>
- Gonzalez-Villarreal, C. A., Quiroz-Reyes, A. G., Islas, J. F., ve Garza-Treviño, E. N. (2020). Colorectal Cancer Stem Cells in the Progression to Liver Metastasis. *Frontiers in Oncology*, 10, 542827. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.01511/BIBTEX>
- Gu, J., Li, Z., Zhou, J., Sun, Z., ve Bai, C. (2019). Response prediction to oxaliplatin plus 5-fluorouracil chemotherapy in patients with colorectal cancer using a four-protein immunohistochemical model. *Oncology Letters*, 18(2), 2091. <https://doi.org/10.3892/OL.2019.10474>
- Guichard, S., Hennebelle, I., Bugat, R., ve Canal, P. (1998). Cellular interactions of 5-fluorouracil and the camptothecin analogue CPT-11 (irinotecan) in a human colorectal carcinoma cell line. *Biochemical Pharmacology*, 55(5), 667–676. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00541-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00541-8)
- Gustavsson, B., Carlsson, G., MacHover, D., Petrelli, N., Roth, A., Schmoll, H. J., Tveit, K. M., ve Gibson, F. (2015). A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2014.11.002>
- Hammond, W. A., Swaika, A., ve Mody, K. (2016). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 8(1), 57. <https://doi.org/10.1177/1758834015614530>
- Hervieu, C., Christou, N., Battu, S., ve Mathonnet, M. (2021). The Role of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: From the Basics to Novel Clinical Trials. *Cancers*, 13(5), 1–26. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13051092>
- Horst, D., Scheel, S. K., Liebmann, S., Neumann, J., Maatz, S., Kirchner, T., ve Jung, A. (2009). The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *The Journal of Pathology*, 219(4), 427–434. <https://doi.org/10.1002/PATH.2597>
- Huang, D., Sun, W., Zhou, Y., Li, P., Chen, F., Chen, H., Xia, D., Xu, E., Lai, M., Wu, Y., ve Zhang, H. (2018). Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 37(1), 173–187. <https://doi.org/10.1007/S10555-017-9726-5>
- Hummon, A. B., Lim, S. R., Difilippantonio, M. J., ve Ried, T. (2007). Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques*, 42(4), 467–472. <https://doi.org/10.2144/000112401>

- Hyndman, I. J. (2016). Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. *Cancer Microenvironment*, 9(1), 63. <https://doi.org/10.1007/S12307-016-0183-4>
- Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., Wang, G., ve Struhl, K. (2011). Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1397–1402. https://doi.org/10.1073/PNAS.1018898108/SUPPL_FILE/PNAS.201018898S.L.PDF
- Imamura, Y., Mukohara, T., Shimono, Y., Funakoshi, Y., Chayahara, N., Toyoda, M., Kiyota, N., Takao, S., Kono, S., Nakatsura, T., ve Minami, H. (2015). Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology Reports*, 33(4), 1837–1843. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3767>
- Ioannou, M., Paraskeva, E., Baxevanidou, K., Simos, G., Papamichali, R., Papacharalambous, C., Samara, M., ve Koukoulis, G. (2015). HIF-1 α in colorectal carcinoma: Review of the literature. *Journal of B.U.ON.*, 20(3), 680–689.
- Iyer, D. N., Sin, W. Y., ve Ng, L. (2019). Linking stemness with colorectal cancer initiation, progression, and therapy. *World Journal of Stem Cells*, 11(8), 519. <https://doi.org/10.4252/WJSC.V11.I8.519>
- Jaaks, P., Coker, E. A., Vis, D. J., Edwards, O., Carpenter, E. F., Leto, S. M., Dwane, L., Sassi, F., Lightfoot, H., Barthorpe, S., van der Meer, D., Yang, W., Beck, A., Mironenko, T., Hall, C., Hall, J., Mali, I., Richardson, L., Tolley, C., ... Garnett, M. J. (2022). Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells. *Nature*, 603(7899), 166–173. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04437-2>
- Kalluri, R., ve Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Karlsson, H., Fryknäs, M., Larsson, R., ve Nygren, P. (2012). Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. *Experimental Cell Research*, 318(13), 1577–1585. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2012.03.026>
- Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., ve Searson, P. C. (2016). In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4(FEB). <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2016.00012>
- Kazama, S., Kishikawa, J., Kiyomatsu, T., Kawai, K., Nozawa, H., Ishihara, S., ve Watanabe, T. (2018). Expression of the stem cell marker CD133 is related to tumor development in colorectal carcinogenesis. *Asian Journal of Surgery*, 41(3), 274–278. <https://doi.org/10.1016/J.ASJSUR.2016.12.002>
- Kemper, K., Grandela, C., ve Medema, J. P. (2010). Molecular identification and targeting of colorectal cancer stem cells. *Oncotarget*, 1(6), 387–395. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.173>
- Kumar, V., ve Malhotra, S. V. (2009). Study on the potential anti-cancer activity of phosphonium and ammonium-based ionic liquids. *Bioorganic and Medicinal*

- Chemistry Letters, 19(16), 4643–4646.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.06.086>
- Lan, W., Zhao, J., Chen, W., Shang, H., Peng, J., ve Lin, J. (2021). Anlotinib Overcomes Multiple Drug Resistant Colorectal Cancer Cells via Inactivating PI3K/AKT Pathway. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 21(15), 1987–1995. <https://doi.org/10.2174/1871520621666210112113852>
- Lee, S. Y., Kim, K. A., Kim, C. H., Kim, Y. J., Lee, J. H., ve Kim, H. R. (2017). CD44-shRNA recombinant adenovirus inhibits cell proliferation, invasion, and migration, and promotes apoptosis in HCT116 colon cancer cells. *International Journal of Oncology*, 50(1), 329–336. <https://doi.org/10.3892/IJO.2016.3801>
- Lei, X., He, Q., Li, Z., Zou, Q., Xu, P., Yu, H., Ding, Y., ve Zhu, W. (2021). Cancer stem cells in colorectal cancer and the association with chemotherapy resistance. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 38(4). <https://doi.org/10.1007/S12032-021-01488-9>
- Liang, C. C., Park, A. Y., ve Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2:2, 2(2), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Lim, S. H. S., Becker, T. M., Chua, W., Ng, W. L., De Souza, P., ve Spring, K. J. (2014). Circulating tumour cells and the epithelial mesenchymal transition in colorectal cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 67(10), 848–853. <https://doi.org/10.1136/JCLINPATH-2014-202499>
- Liu, X., Ou, K., Ma, X., Gao, L., Wang, Q., Zhang, H., ve Yang, L. (2022). Safety and efficacy of irinotecan, oxaliplatin, and capecitabine (XELOXIRI) regimen with or without targeted drugs in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09889-3>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., ve Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews. Cancer*, 3(5), 330–338. <https://doi.org/10.1038/NRC1074>
- Loret, N., Denys, H., Tummers, P., ve Berx, G. (2019). The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cancers* 2019, Vol. 11, Page 838, 11(6), 838. <https://doi.org/10.3390/CANCERS11060838>
- Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H., ve Xu, X. (2017). Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncology Letters*, 14(6), 6999–7010. <https://doi.org/10.3892/OL.2017.7134>
- Ma, S. C., Zhang, J. Q., Yan, T. H., Miao, M. X., Cao, Y. M., Cao, Y. B., Zhang, L. C., ve Li, L. (2023). Novel strategies to reverse chemoresistance in colorectal cancer. *Cancer Medicine*, 12(10), 11073–11096. <https://doi.org/10.1002/CAM4.5594>
- Machover, D., Almohamad, W., Castagné, V., Desterke, C., Gomez, L., ve Goldschmidt, E. (2024). Treatment of patients with carcinomas in advanced stages with 5-fluorouracil, folinic acid and pyridoxine in tandem. *Scientific Reports*, 14(1), 12054. <https://doi.org/10.1038/S41598-024-62860-Z>
- Machover, D., Goldschmidt, E., Almohamad, W., Castagné, V., Dairou, J., Desterke, C., Gomez, L., Gaston-Mathé, Y., ve Boucheix, C. (2022). Pharmacologic

- modulation of 5-fluorouracil by folinic acid and pyridoxine for treatment of patients with advanced breast carcinoma. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-022-12998-5>
- Magee, J. A., Piskounova, E., ve Morrison, S. J. (2012). Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell*, 21(3), 283–296. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2012.03.003/ASSET/05EE550A-A5E5-4634-A5D2-428B411C0530/MAIN.ASSETS/GR5.JPG>
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J., ve Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.03.027>
- Mans, D. R. A., Grivicich, I., Peters, G. J., ve Schwartzmann, G. (1999). Sequence-dependent growth inhibition and DNA damage formation by the irinotecan-5-fluorouracil combination in human colon carcinoma cell lines. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 35(13), 1851–1861. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(99\)00222-1](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(99)00222-1)
- Marbun, V. M. G., Erlina, L., ve Lalisang, T. J. M. (2022). Genomic landscape of pathogenic mutation of APC, KRAS, TP53, PIK3CA, and MLH1 in Indonesian colorectal cancer. *PLoS ONE*, 17(6), e0267090. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0267090>
- Marshall, J. (2011). Transwell® invasion assays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 769, 97–110. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6_8
- Martinez-Balibrea, E., Martínez-Cardus, A., Gines, A., Ruiz De Porras, V., Moutinho, C., Layos, L., Manzano, J. L., Buges, C., Bystrup, S., Esteller, M., ve Abad, A. (2015). Tumor-Related Molecular Mechanisms of Oxaliplatin Resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(8), 1767–1776. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0636>
- Matos, A. I., Carreira, B., Peres, C., Moura, L. I. F., Conniot, J., Fourniols, T., Scomparin, A., Martínez-Barriocanal, Á., Arango, D., Conde, J. P., Prêat, V., Satchi-Fainaro, R., ve Florindo, H. F. (2019). Nanotechnology is an important strategy for combinational innovative chemo-immunotherapies against colorectal cancer. *Journal of Controlled Release*, 307, 108–138. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2019.06.017>
- McQuade, R. M., Stojanovska, V., Bornstein, J. C., ve Nurgali, K. (2017). Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches. *Current Medicinal Chemistry*, 24(15). <https://doi.org/10.2174/0929867324666170111152436>
- Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., ve Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11(2), 231–238. <https://doi.org/10.1002/CYTO.990110203>
- Mini, E., Trave, F., Rustum, Y. M., ve Bertino, J. R. (1990). Enhancement of the antitumor effects of 5-fluorouracil by folinic acid. *Pharmacology ve Therapeutics*, 47(1), 1–19. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90042-Z](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90042-Z)
- Miyaki, Y., Suzuki, K., Koizumi, K., Kato, T., Saito, M., Kamiyama, H., Maeda, T., Shibata, K., Shiya, N., ve Konishi, F. (2012). Identification of a potent epigenetic biomarker for resistance to camptothecin and poor outcome to

- irinotecan-based chemotherapy in colon cancer. *International Journal of Oncology*, 40(1), 217–226. <https://doi.org/10.3892/IJO.2011.1189>
- Modest, D. P., Pant, S., ve Sartore-Bianchi, A. (2019). Treatment sequencing in metastatic colorectal cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 109, 70–83. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2018.12.019>
- Mohd Faheem, M., Bhagat, M., Sharma, P., ve Anand, R. (2022). Induction of p53 mediated mitochondrial apoptosis and cell cycle arrest in human breast cancer cells by plant mediated synthesis of silver nanoparticles from *Bergenia ligulata* (Whole plant). *International Journal of Pharmaceutics*, 619. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2022.121710>
- Mohelnikova-Duchonova, B., Melichar, B., ve Soucek, P. (2014). FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: The call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(30), 10316. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I30.10316>
- Mokhtari, R. B., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., ve Yeger, H. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 8(23), 38022. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.16723>
- Muduli, K., Pradhan, J., Prusty, M., Samal, A. P., Reddy, K. S., ve Elangovan, S. (2024). Estrogen-related receptor alpha (ERR α) promotes the migration, invasion and angiogenesis of breast cancer stem cell-like cells. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 41(3). <https://doi.org/10.1007/S12032-024-02329-1>
- Nakayama, M., ve Oshima, M. (2019). Mutant p53 in colon cancer. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(4), 267–276. <https://doi.org/10.1093/JMCB/MJY075>
- Negrei, C., Hudita, A., Ginghina, O., Galateanu, B., Voicu, S. N., Stan, M., Costache, M., Fenga, C., Drakoulis, N., ve Tsatsakis, A. M. (2016). Colon cancer cells gene expression signature as response to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and folinic acid treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 7(JUN), 210110. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00172>
- Okuyama, N. C. M., Ribeiro, D. L., da Rocha, C. Q., Pereira, É. R., Cólus, I. M. de S., ve Serpeloni, J. M. (2023). Three-dimensional cell cultures as preclinical models to assess the biological activity of phytochemicals in breast cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 460. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2023.116376>
- Otte, J., Dizdar, L., Behrens, B., Goering, W., Knoefel, W. T., Wruck, W., Stoecklein, N. H., ve Adjaye, J. (2019). FGF Signalling in the Self-Renewal of Colon Cancer Organoids. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53907-7>
- Pereyra, C. E., Dantas, R. F., Ferreira, S. B., Gomes, L. P., ve Silva, F. P. (2019). The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. *Cancer Cell International*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12935-019-0925-8>
- Pathak, P. S., Chan, G., Deming, D. A., ve Chee, C. E. (2024). State-of-the-Art Management of Colorectal Cancer: Treatment Advances and Innovation. https://doi.org/10.1200/EDBK_438466, 44(3). https://doi.org/10.1200/EDBK_438466

- Pattabiraman, D. R., Bierie, B., Kober, K. I., Thiru, P., Krall, J. A., Zill, C., Reinhardt, F., Tam, W. L., ve Weinberg, R. A. (2016). Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability. *Science*, 351(6277). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD3680/SUPPL_FILE/TABLES9.XLS
- Perut, F., Sbrana, F. V., Avnet, S., De Milioto, A., ve Baldini, N. (2018). Spheroid-based 3D cell cultures identify salinomycin as a promising drug for the treatment of chondrosarcoma. *Journal of Orthopaedic Research*, 36(8), 2305–2312. <https://doi.org/10.1002/JOR.23880>
- Phi, L. T. H., Sari, I. N., Yang, Y. G., Lee, S. H., Jun, N., Kim, K. S., Lee, Y. K., ve Kwon, H. Y. (2018). Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells International*, 2018, 5416923. <https://doi.org/10.1155/2018/5416923>
- Pijuan, J., Barceló, C., Moreno, D. F., Maiques, O., Sisó, P., Marti, R. M., Macià, A., ve Panosa, A. (2019). In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(JUN). <https://doi.org/10.3389/FCELL.2019.00107>
- Plaks, V., Kong, N., ve Werb, Z. (2015). The cancer stem cell niche: How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*, 16(3), 225–238. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2015.02.015/ASSET/BB73693D-E15C-4D15-8E02-9F2A5820356E/MAIN.ASSETS/GR3.JPG>
- Pogribny, I. P. (2010). Epigenetic events in tumorigenesis: Putting the pieces together. *Experimental Oncology*, 32(3), 132–136.
- Qin, R., Fan, X., Huang, Y., Chen, S., Ding, R., Yao, Y., Wu, R., Duan, Y., Li, X., Khan, H. U., Hu, J., ve Wang, H. (2024). Role of glucose metabolic reprogramming in colorectal cancer progression and drug resistance. *Translational Oncology*, 50. <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2024.102156>
- Ramzy, G. M., Boschung, L., Koessler, T., Delucinge-Vivier, C., Docquier, M., McKee, T. A., Rubbia-Brandt, L., ve Nowak-Sliwinska, P. (2022). FOLFOXIRI Resistance Induction and Characterization in Human Colorectal Cancer Cells. *Cancers*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14194812>
- Reddivari, L., Charepalli, V., Radhakrishnan, S., Vadde, R., Elias, R. J., Lambert, J. D., ve Vanamala, J. K. P. (2016). Grape compounds suppress colon cancer stem cells in vitro and in a rodent model of colon carcinogenesis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1254-2>
- Reddy, T. L., Garikapati, K. R., Reddy, S. G., Reddy, B. V. S., Yadav, J. S., Bhadra, U., ve Bhadra, M. P. (2016). Simultaneous delivery of Paclitaxel and Bcl-2 siRNA via pH-Sensitive liposomal nanocarrier for the synergistic treatment of melanoma. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep35223>
- Reidy, E., Leonard, N. A., Treacy, O., ve Ryan, A. E. (2021). A 3D View of Colorectal Cancer Models in Predicting Therapeutic Responses and Resistance. *Cancers*, 13(2), 1–22. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13020227>

- Ren, F., Sheng, W. Q., ve Du, X. (2013). CD133: A cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World Journal of Gastroenterology*: WJG, 19(17), 2603. <https://doi.org/10.3748/WJG.V19.I17.2603>
- Romano, F. J., Barbato, C., Biglietto, M., Di Lauro, V., Arundine, D., Fiorentino, R., Ambrosio, F., Cammarota, M., Chiurazzi, B., Puglia, L., Scagliarini, S., Ruocco, R., Mocerino, C., Cerillo, I., Brangi, M. F., ve Riccardi, F. (2021). Folinic acid in colorectal cancer: esquire or fellow knight? Real-world results from a mono institutional, retrospective study. *Oncotarget*, 12(3), 221. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.27872>
- Sahlberg, S. H., Spiegelberg, D., Glimelius, B., Stenerl  w, B., ve Nestor, M. (2014). Evaluation of Cancer Stem Cell Markers CD133, CD44, CD24: Association with AKT Isoforms and Radiation Resistance in Colon Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(4), e94621. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0094621>
- Said, A. H., Raufman, J. P., ve Xie, G. (2014). The Role of Matrix Metalloproteinases in Colorectal Cancer. *Cancers* 2014, Vol. 6, Pages 366–375, 6(1), 366–375. <https://doi.org/10.3390/CANCERS6010366>
- Sánchez-Gundín, J., Fernández-Carballido, A. M., Martínez-Valdivieso, L., Barreda-Hernández, D., ve Torres-Suárez, A. I. (2018). New Trends in the Therapeutic Approach to Metastatic Colorectal Cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 15(7), 659–665. <https://doi.org/10.7150/IJMS.24453>
- Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Nied  zwiedzka, E., Ar  lukowicz, T., ve Przyby  łowicz, K. E. (2021). A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13092025>
- Sethy, C., ve Kundu, C. N. (2021). 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. *Biomedicine ve Pharmacotherapy = Biomedecine ve Pharmacotherapie*, 137. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111285>
- Shi, X., Liu, S., Kleeff, J., Friess, H., ve B  chler, M. W. (2002). Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes. *Oncology*, 62(4), 354–362. <https://doi.org/10.1159/000065068>
- Shibue, T., Oncology, R. W.-N. reviews C., ve 2017, U. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature.ComT Shibue, RA WeinbergNature Reviews Clinical Oncology*, 2017 nature.com.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., ve Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21708>
- Singh, A., ve Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34), 4741. <https://doi.org/10.1038/ONC.2010.215>
- Stintzing, S. (2014). Management of colorectal cancer. *F1000Prime Reports*, 6. <https://doi.org/10.12703/P6-108>
- Sunakawa, Y., Schirripa, M., ve Lenz, H. J. (2016). Understanding the FOLFOXIRI-regimen to optimize treatment for metastatic colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 100, 117. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2016.01.020>

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., ve Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Tanabe, S., ve Ono, R. (2018). The gene and microRNA networks of stem cells and reprogramming. *AIMS Cell and Tissue Engineering*, 2(4), 238–245. <https://doi.org/10.3934/CELLTISSE.2018.4.238>
- Tanabe, S., Quader, S., Cabral, H., ve Ono, R. (2020). Interplay of EMT and CSC in Cancer and the Potential Therapeutic Strategies. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 495811. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00904/BIBTEX>
- Tayhan, S. E., Bilgin, S., Yıldırım, A., Koc, E., ve Ceylan, M. (2022). Antiproliferative and Antimigratory Effects of Isoeugenol-Based Polyphenolic Compounds. *Chemistry ve Biodiversity*, 19(4). <https://doi.org/10.1002/CBDV.202100854>
- Thoma, C. R., Zimmermann, M., Agarkova, I., Kelm, J. M., ve Krek, W. (2014). 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 69–70, 29–41. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2014.03.001>
- Tian, Y., Song, Y., Bai, W., Ma, X., ve Ren, Z. (2017). CXCR4 knockdown inhibits the growth and invasion of nasopharyngeal cancer stem cells. *Oncology Letters*, 13(4), 2253–2259. <https://doi.org/10.3892/OL.2017.5694>
- Treviño, G., Reyes, Q., Murillo, R., la Garza Kalife, de, Gonzalez, D., Rodriguez, E., Villarreal, G., Garza Treviño, E. N., Quiroz Reyes, A. G., Antonio Rojas Murillo, J., de la Garza Kalife, D. A., Delgado Gonzalez, P., Islas, J. F., Esther Estrada Rodriguez, A., Gonzalez Villarreal, C. A., Prieto, M., Garza, J. M., Pedro Garza García, S., ve León, N. (2023). Cell Therapy as Target Therapy against Colon Cancer Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 8163, 24(9), 8163. <https://doi.org/10.3390/IJMS24098163>
- Vasan, N., Baselga, J., ve Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature* 2019 575:7782, 575(7782), 299–309. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>
- Vera, R., Alonso, V., Gállego, J., González, E., Guillén-Ponce, C., Pericay, C., Rivera, F., Safont, M. J., ve Valladares-Ayerbes, M. (2015). Current controversies in the management of metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 76(4), 659–677. <https://doi.org/10.1007/S00280-015-2808-6>
- Vinci, M., Gowan, S., Boxall, F., Patterson, L., Zimmermann, M., Court, W., Lomas, C., Mendiola, M., Hardisson, D., ve Eccles, S. A. (2012). Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biology*, 10(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-29/FIGURES/8>
- Visvader, J. E., ve Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer* 2008 8:10, 8(10), 755–768. <https://doi.org/10.1038/nrc2499>

- Vitale, S., Calapà, F., Colonna, F., Luongo, F., Biffoni, M., De Maria, R., ve Fiori, M. E. (2024). Advancements in 3D In Vitro Models for Colorectal Cancer. *Advanced Science*, 11(32), 2405084. <https://doi.org/10.1002/ADVS.202405084>
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., ve Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology ve Therapeutics*, 206. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2019.107447>
- Vu, T., ve Datta, P. K. (2017). Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers*, 9(12), 171. <https://doi.org/10.3390/CANCERS9120171>
- Wang, T., Song, P., Zhong, T., Wang, X., Xiang, X., Liu, Q., Chen, H., Xia, T., Liu, H., Niu, Y., Hu, Y., Xu, L., Shao, Y., Zhu, L., Qi, H., Shen, J., Hou, T., Fodde, R., ve Shao, J. (2019). The inflammatory cytokine IL-6 induces FRA1 deacetylation promoting colorectal cancer stem-like properties. *Oncogene* 2019 38:25, 38(25), 4932–4947. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0763-0>
- Wang, X., Zhang, H., ve Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2(2), 141. <https://doi.org/10.20517/CDR.2019.10>
- Weiswald, L. B., Bellet, D., ve Dangles-Marie, V. (2015). Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 17(1), 1. <https://doi.org/10.1016/J.NEO.2014.12.004>
- Whiteside, T. L., Demaria, S., Rodriguez-Ruiz, M. E., Zarour, H. M., ve Melero, I. (2016). Emerging Opportunities and Challenges in Cancer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 22(8), 1845–1855. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0049>
- Wojciechowska-Durczyńska, K., Krawczyk-Rusiecka, K., Cyniak-Magierska, A., Zygmunt, A., Gałęcka, E., ve Lewiński, A. (2010). Relative quantification of PIK3CA gene expression level in fine-needle aspiration biopsy thyroid specimens collected from patients with papillary thyroid carcinoma and non-toxic goitre by real-time RT-PCR. *Thyroid Research*, 3(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1756-6614-3-5>
- Wu, H., Jin, H., Wang, C., Zhang, Z., Ruan, H., Sun, L., Yang, C., Li, Y., Qin, W., ve Wang, C. (2017). Synergistic Cisplatin/Doxorubicin Combination Chemotherapy for Multidrug-Resistant Cancer via Polymeric Nanogels Targeting Delivery. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(11), 9426–9436. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.6B16844/SUPPL_FILE/AM6B16844_SI_001.PDF
- Wu, Q., Yang, Z., Nie, Y., Shi, Y., ve Fan, D. (2014). Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches. *Cancer Letters*, 347(2), 159–166. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2014.03.013>
- Xie, Y. H., Chen, Y. X., ve Fang, J. Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1, 5(1), 1–30. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
- Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J., Zhang, G., Wang, X., Dong, Z., Chen, F., ve Cui, H. (2020). Targeting cancer stem cell pathways for

- cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1, 5(1), 1–35. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0110-5>
- Yang, M. H., Wu, M. Z., Chiou, S. H., Chen, P. M., Chang, S. Y., Liu, C. J., Teng, S. C., ve Wu, K. J. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nature Cell Biology* 2008 10:3, 10(3), 295–305. <https://doi.org/10.1038/ncb1691>
- Yang, Y., Meng, W. J., ve Wang, Z. Q. (2022). Cancer Stem Cells in Therapy Resistance of Colorectal Cancer. *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Therapeutic Aspects: Volume 1*, 1, 2101–2116. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5422-0_102
- Yu, Y., Kanwar, S. S., Patel, B. B., Nautiyal, J., Sarkar, F. H., ve Majumdar, A. P. N. (2009). Elimination of Colon Cancer Stem-Like Cells by the Combination of Curcumin and FOLFOX. *Translational Oncology*, 2(4), 321–328. <https://doi.org/10.1593/TLO.09193>
- Zhou, M., Liu, X., Li, Z., Huang, Q., Li, F., ve Li, C. Y. (2018). Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *International Journal of Cancer*, 143(4), 921–930. <https://doi.org/10.1002/IJC.31374>
- Zhou, Y., Xia, L., Wang, H., Oyang, L., Su, M., Liu, Q., Lin, J., Tan, S., Tian, Y., Liao, Q., ve Cao, D. (2017). Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(70), 33403. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.23607>
- Zoetemelk, M., Ramzy, G. M., Rausch, M., ve Nowak-Sliwinska, P. (2020). Drug-Drug Interactions of Irinotecan, 5-Fluorouracil, Folinic Acid and Oxaliplatin and Its Activity in Colorectal Carcinoma Treatment. *Molecules*, 25(11). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25112614>
- Zoetemelk, M., Rausch, M., Colin, D. J., Dormond, O., ve Nowak-Sliwinska, P. (2019). Short-term 3D culture systems of various complexity for treatment optimization of colorectal carcinoma. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42836-0>

8 ÖZGEÇMİŞ

