



**METASTATİK KOLOREKTAL KANSER
HÜCRELERİNDE CETUXIMABIN
APOPTOTİK VE OTOFAJİK GENLER ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Fatma Betül ÖZGERİŞ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. M. Sait KELEŞ

Doktora Tezi - 2017

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

**METASTATİK KOLOREKTAL KANSER
HÜCRELERİNDE CETUXİMABIN APOPTOTİK VE
OTOFAJİK GENLER ÜZERİNE ETKİLERİ**

Fatma Betül ÖZGERİŞ

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. M. Sait KELEŞ**

**ERZURUM
2017**

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

**METASTATİK KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNDE
CETUXIMABIN APOPTOTİK VE OTOFAJİK GENLER ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Fatma Betül ÖZGERİŞ

Tez Savunma Tarihi : 14.04.2017

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mevlüt Sait KELEŞ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Fatma Zühal UMUDUM

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mustafa GÜL

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Mehtap TAN
Enstitü Müdürü

**Doktora Tezi
ERZURUM - 2017**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Kanser Nedir?	3
2.1.2. Kanser ve Hücre Siklüsü.....	5
2.1.3. Kanser Hücrelerinin Genel Özellikleri	7
2.1.4. Kanser ve Genetik.....	8
2.1.4.1. Onkogenler.....	9
2.1.4.2. Tümör Baskılayıcı Genler.....	10
2.1.4.3. DNA Tamir Genleri	11
2.1.5. Kanser ve Apoptoz.....	11
2.1.6. Kanser ve p21	13
2.1.7. Kanser ve p27	14
2.1.8. Kanser ve p57	15
2.1.9. Kanser ve Otofaji	16
2.1.10. Otofajinin Düzenlenmesi	19
2.1.11. Otofaji Regülasyonunda Etkili Olan Moleküller	20
2.1.11.1. Akt/PKB ve TOR Yolağı.....	20

2.1.11.2. Bcl-2 ve Bcl-XL.....	20
2.1.11.3. Atg4d, Atg5 ve Beclin	21
2.1.11.4. p53	21
2.1.11.5. Reaktif Oksijen türleri ve Atg4.....	21
2.1.11.6. ARF.....	22
2.1.11.7. FADD, Kaspaz-8, FLIP	22
2.1.11.8. DAPk	22
2.1.11.9. E2F1.....	22
2.2. Kolorektal Kanser	22
2.2.1. Epidemiyoloji.....	22
2.2.2. Patogenez	23
2.2.3. Kolorektal Kanser Evrelemesi	23
2.2.4. Kolorektal Kanser ve RAS İlişkisi.....	25
2.2.4.1. RAS Ailesi	25
2.2.4.2. RAS Aktivasyonu	26
2.2.4.3. Ras Sinyal İletim Yolakları.....	28
2.2.5. KRAS.....	30
2.3. Cetuximab	31
2.3.1. Cetuximab'ın Genel Özellikleri	31
2.3.2. Cetuximab Etki Mekanizması.....	31
3. MATERYAL ve METOT	34
3.1. Materyal	34
3.1.1. Örnekler	34
3.1.2. Kimyasallar, Cihazlar ve Ekipmanlar	34
3.2. Metot.....	35

3.2.1. Hücre Kültürü	35
3.2.1.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı	35
3.2.1.2. Hücre Kültürü İnkübasyon Koşulları.....	35
3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması	36
3.2.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	36
3.2.1.5. Hücre Sayısının Hesaplanması	37
3.2.2. Cetuximab Uygulanması.....	37
3.2.3. Hücre Sitotoksite Analizi	38
3.2.4. TUNEL Boyama Metodu.....	39
3.2.4.1. Hücrelerin Lamda Çoğaltılması.....	39
3.2.4.2. Fiksasyon	39
3.2.4.3. TUNEL Boyama	39
3.2.4.4. Apoptotik Hücre Değerlendirmesi.....	40
3.2.5. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri.....	41
3.2.5.1. RNA İzolasyonu	42
3.2.5.2. Komplementer DNA Sentez Aşaması	42
3.2.5.3. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile p21, p27, p57, KRAS, LC3A, BECN1, EGF ve ATG4A Gen Ekspresyonlarının Ölçülmesi	43
3.2.6. İstatistiksel Analiz.....	43
4. BULGULAR.....	45
4.1. MTT Analizi Sonuçları	45
4.2. TUNEL Boyama Analizi Sonuçları	46
4.3. RT-PCR Analiz Sonuçları	52
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	68

KAYNAKLAR	70
EKLER	88
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	88
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	89
EK-3. İNTİHAL RAPORU BEYAN FORMU	89
EK 4. DOKTORA TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI	92



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve bu tezi hazırlamamda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, benden her türlü desteğini, hoşgörüsünü ve karşılaştığım her türlü sorunda yardımını esirgemeyen tez hocam Prof. Dr. M. Sait KELEŞ'e en derin saygı ve şükranları sunarım.

Eğitimim boyunca her zaman yakın ilgi ve bilimsel desteklerini gördüğüm hocalarım Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ebubekir BAKAN'a, Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN'e, Prof. Dr. Nuri BAKAN'a, Prof. Dr. F. Zuhul UMUDUM'a, Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ'a ve Yrd. Doç. Dr. Nurinnisa ÖZTÜRK'e, değerli arkadaşlarım Dr. Nezahat Kurt, Arş. Gör. Mehmet Ali GÜL'e, Arş. Gör. Özge Nur TÜRKERİ'ye ve Dr. Elif POLAT'a, tez çalışmamda büyük yardımları olan Yrd. Doç. Dr. Eda BALKAN'a ve bu çalışmayı 2013/06 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, bölümümüz sekreteri Keriman ERDEN'e, tüm Anabilim Dalı ve Laboratuvar çalışanlarımıza, her zaman yanımda olan ve desteklerini benden esirgemeyen eşime, aileme, kızıma ve oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fatma Betül ÖZGERİŞ

ÖZET

Metastatik Kolorektal Kanser Hücrelerinde Cetuximabın Apoptotik ve Otofajik Genler Üzerine Etkileri

Amaç: Kolorektal kanser (KRK) dünyada en sık görülen kanser tiplerinden birisidir ve tedavisinde kemoterapi önemli bir yere sahiptir. Son zamanlarda kemoterapötik ajanların apoptozda ve otofajide rol olan genler üzerine etkisini araştıran birçok çalışma yapılmaktadır. Mevcut çalışmada kolorektal kanser tedavisinde kullanılan ve epidermal büyüme faktörü (EGF) antagonisti monoklonal bir antikor olan cetuximab'ın (CTX) kanser hücreleri üzerindeki apoptotik, otofajik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: KRK hücre hatlarına farklı dozlarda cetuximab uygulanarak 10 adet deney grubu oluşturuldu ve tüm gruplar 24 ve 48 saat süreyle inkübasyonlara bırakıldı. Sitotoksiteyi belirlemek amacıyla MTT analizi uygulandı. Histokimyasal olarak apoptozun tespit edilmesinde TUNEL metodu kullanıldı. p21, p27, p57, KRAS, LC3A, BECN1, EGF ve ATG4A gen ekspresyon düzeyleri Real-Time PCR'la ölçüldü.

Bulgular: MTT sitotoksite analizi sonucunda 10 µg/mL cetuximab etkin doz olarak belirlendi. Aynı zamanda p21, p27, p57, LC3A, BECN1 ve ATG4A gen ekspresyonları artış gösterirken KRAS ve EGF gen ekspresyonlarında azalma gözlemlendi. TUNEL boyamada, artan cetuximab dozuyla apoptozda bir yükselme gözlemlendi.

Sonuç: CTX'in HT-29 KRK hücrelerini hem p21, p27 ve p57 gen ekspresyonlarını arttırarak apoptoza hem de ATG4A, LC3A ve BECN1'in gen ekspresyonlarını arttırarak otofajiye yönlendirdiği kanaatine varıldı. Bunun yanı sıra CTX'in EGF ve KRAS gen ekspresyonunu azaltarak kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğide izlendi.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Cetuximab, Kolorektal Kanser, Otofaji.

ABSTRACT

The Effects of Cetuximab on Apoptotic and Autophagic Genes in Metastatic Colorectal Cancer Cells

Purpose: The colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancer type and chemotherapy has an important effect in the treatment. Recently, a number of studies investigating the effect of chemotherapeutic agents on genes involved in apoptosis and autophagy have been carried out. In this thesis, it was aimed to investigate the apoptotic, autophagic and cytotoxic effects of cetuximab (CTX), used for the treatment of colorectal cancer and is a monoclonal antibody that is epidermal growth factor (EGF) antagonist, on the cancer cells.

Material and Method: Cetuximab was administered to colorectal cancer cell lines at different doses to form 10 test groups and all groups were left in incubations for 24 and 48 hours. MTT assay was applied for determine the cytotoxicity. TUNEL assay was used to detect the apoptosis by histochemical. p21, p27, p57, KRAS, LC3A, BECN1, EGF and ATG4A gene expression levels were measured by Real-Time PCR.

Findings: MTT cytotoxicity analysis indicated that 10 µg/mL cetuximab was the effective dose. At the same time, there was a decrease in KRAS and EGF gene expression while p21, p27, p57, LC3A, BECN1 and ATG4A gene expressions were increased. In TUNEL staining, an increase in apoptosis was observed with increasing dose of cetuximab.

Result: We can come to the conclusion that CTX mediates HT-29 KRK cells to apoptosis and autophagy by increasing both p21, p27, p57 gene expressions and ATG4A, LC3A and BECN1 gene expressions. In addition, it can be said that inhibiting the growth of cancer cells by decreasing EGF and KRAS gene expression.

Key Words: Apoptosis, Autophagy, Cetuximab, Colorectal Cancer.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APC	: Adenomatous polyposis coli
Bax	: Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
CDI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
CDK	: Siklin bağımlı kinazlar
cDNA	: Komplementer DNA
CTX	: Cetuximab
CYC-CLN	: Siklin
DMEM	: Hücre kültürü medyum
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA-PK	: DNA bağımlı protein kinaz
ERCC1	: DNA excision repair protein
G2	: Büyüme 2
HDAC	: Histon deasetilaz kompleksinin
HT-29	: Kolorektal kanser hücre hattı
KRK	: Kolorektal kanser
M	: Metafaz
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
FBS	: Fetal sığır serumu
PCNA	: Proliferating cell nuclear antigen
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Rb	: Retinoblastoma
S	: Sentez
TUNEL	: Terminal deoxytransferase mediated Bio-dUTP nick and labeling

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Kanserin p57'ye göre düzenlenmesi.	16
Şekil 2.2. Otofaji mekanizma aşamaları.	18
Şekil 2.3. Ras'ın GTP- ve GDP-bağlı durumdaki konformasyonları.....	26
Şekil 2.4. Aktif GTP-bağlı ve inaktif GDP-bağlı konformasyon arasında Ras döngüsü.....	27
Şekil 2.5. Ras Efektör Yolakları.....	30
Şekil 2.6. Cetuximab etki mekanizması	32
Şekil 3.1. TUNEL analizinin ekran görüntüsü	41
Şekil 4.1. Kolorektal Kanser hücre hattı (HT29); cetuximab uygulamaları sonrası 24 ve 48 saat inkübasyonlu hücre hatları sitotoksisite (MTT) analizi sonuçları.....	46
Şekil 4.2. Kontrol grubu 24 saatlik inkübasyon grubuna ait TUNEL analiz sonucu	47
Şekil 4.3. 24 saatlik inkübasyon 0,1 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL analiz sonucu.....	48
Şekil 4.4. 24 saatlik inkübasyon 1 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL analiz sonucu.....	48
Şekil 4.5. 24 saatlik inkübasyon 10 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL analiz sonucu.....	49
Şekil 4.6. 24 saatlik inkübasyon 25 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL analiz sonucu.....	49
Şekil 4.7. Kontrol grubu 48 saatlik inkübasyon grubuna ait TUNEL analiz sonucu	50
Şekil 4.8. 48 saatlik inkübasyon 0,1 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL analiz sonucu.....	50

Şekil 4.9. 48 saatlik inkübasyon 1 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL

analiz sonucu..... 51

Şekil 4.10. 48 saatlik inkübasyon 10 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba TUNEL analiz

sonucu 51

Şekil 4.11. 48 saatlik inkübasyon 25 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL

analiz sonucu..... 52



TABLÖLER DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Kimyasal ve kitler.....	34
Tablo 3.2. Cihazlar ve ekipmanlar	35
Tablo 4.1. Bütün gruplara ait MTT analiz sonuçları.....	45
Tablo 4.2. Bütün gruplar için 24 ve 48 saatlik inkübasyonda CTX uygulamasından sonra $1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ alana düşen TUNEL sonuçları	47
Tablo 4.3. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli p21 gen ekspresyon düzeyleri.....	53
Tablo 4.4. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli p27 gen ekspresyon düzeyleri.....	53
Tablo 4.5. Bütün gruplardaki 24 ve 48 saatte p57 gen ekspresyon düzeyleri.....	54
Tablo 4.6. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli KRAS gen ekspresyon düzeyleri	55
Tablo 4.7. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli LC3A gen ekspresyon düzeyleri.....	55
Tablo 4.8. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli ATG4A gen ekspresyon düzeyleri..	56
Tablo 4.9. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli EGF gen ekspresyon düzeyleri	56
Tablo 4.10. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli BECN1 gen ekspresyon düzeyleri.....	57

1. GİRİŞ

Kanser, deoksiribonükleik asitin (DNA) normal hücrede hasar görmesi sonucu oluşan ve kalıtsal olarak da nesilden nesile aktarılan bir hastalıktır. Günümüz dünyasında kanser ve kansere bağlı ölümlerin artış göstermesi yaşamın en önemli sorunlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır.¹

2013 yılında yayınlanan Dünya Kanser Raporuna göre kolorektal kanser (KRK) en yaygın 3. tip kanser olup, yılda bir milyon yeni vaka ile kanser olgularının %9,4'ünü oluşturmaktadır.^{2,3} Hem erkek, hem de kadınlarda en sık görülen üçüncü kanserdir ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır.¹

KRK tedavisinde yaygın olarak epidermal büyüme faktörü (EGF) antagonisti monoklonal bir antikor olan cetuximab (CTX) kullanılmaktadır. CTX belli kanser hücrelerinde ilgili resöptöre ligandın bağlanmasını engelleyerek resöptörün aktivasyonunu düşürüp apoptozu aktifleştirebilir. Anti-epidermal growth (büyüme) faktör reseptör (α -EGFR) tedavi ile DNA hasarı oluşturan sitostatiklerin kombinasyonu, hücre siklus ilerleyişini inhibe edip apoptozu aktifleştirerek antitümöral etkiye yol açtığı gösterilmiştir.⁴

Siklin bağımlı kinazlar (CDK) hücre proliferasyonunda görev alırken CDK inhibitörleri CDK'larla siklin kompleksini inhibe ederek hücre döngüsünün durmasına sebep olmaktadır.^{5, 6} p21, p27 ve p57 CDK inhibitör ailesinin üyeleri olup CDK ve siklin komplekslerine (Siklin E-CDK2; Siklin A-CDK 2; ve Siklin D-CDK 4) bağlanarak retinoblastoma (Rb) proteininin fosforilasyonunu engellerler.⁷⁻⁹

Otofaji, organellerin ve hücre içi moleküllerin döngüsü ile homeostaziye koruyan ve artan hücre stresi sırasında hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bir süreçtir.^{10,11} Son çalışmalarda otofajinin metabolizma, morfogenez, farklılaşma, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminde de rol oynadığı görülmüştür.^{12, 13} Öte yandan otofaji

anormalliklerinin kanser, enfeksiyon hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, kas hastalıkları ve immün sistem hastalıklarının patogeneğinde rol oynayabileceği düşünölmektedir.^{10, 14} Kanser tedavisinde kullanılan sitotoksik ilaçlar ve hedefe yönelik ilaçların otofajiyi indüklediği bilinmektedir. Bu nedenle otofajiyi bloke etmek veya indüklemek kanser tedavisinde önemli avantajlar sağlayabilir.¹⁵

Günümüzün önemli sağlık sorunu olan kanserden korunmak, hastalığın seyrini yavaşlatmak veya hastalığın seyrini düzeltmek amacıyla her yıl binlerce çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmada, HT-29 KRK hücre hattına epidermal büyüme faktörü (EGF) antagonisti monoklonal bir antikor olan CTX kullanımının p21, p27, p57, KRAS, LC3A, BECN1, EGF ve ATG4A gibi gen ekspresyonları üzerine etkisini ve apoptotik ve otofajik etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

2.1.1. Kanser Nedir?

Kanser, tüm dünyada önemi giderek artan bir sağlık sorunudur.¹⁶ Kontrolsüz hücre proliferasyonu ile karakterize bir hastalık olup, dünyada kardiyovasküler rahatsızlıklardan sonra ikinci sırada yer alan, son derece ölümcül bir hastalıktır.^{17, 18} M.Ö. 460-370 yılları arasında ilk olarak Hipokrat tarafından ifade edilen ‘cancer’ terimi, M.Ö 130-200 yılları arasında da Galen tarafından şişlik anlamına gelen ‘onkos’ olarak ifade edilmiştir.¹⁹

Kanser hücrelerinin fonksiyonel değişiklikleri genetik materyallerinde oluşan bazı değişikliklerden dolayı oluşur. Kanser oluşumundaki genetik değişiklikler genel olarak; genlerdeki dayanıksızlık, kromozom kaybı, kromozomların yeniden düzenlenmesi veya insan kromozom lokuslarına yabancı DNA dizilerinin (genellikle viral DNA dizileri) girmesi şeklinde özetlenebilir.²⁰

Eski dönemlerde kanser tedavisinde, ülser tedavisinde kullanılan bakır, kurşun, sülfür ve arsenik gibi metalik tuzlar uygulanmış ve daha sonraları dağlama ve bıçakla kesip çıkarma yöntemleri denenmiş fakat başarıya ulaşılamamıştır.¹⁹ Kanser tedavisinde geçmişten günümüze kadar bilim ve teknolojinin ilerlemesi ve kemoterapötiklerin kombine kullanımıyla çok büyük ilerlemeler gösterilmesine rağmen hala Hipokrat’ın tavsiye ettiği yöntemler temel olarak kullanılmaktadır.^{18, 19}

Kanser hücrelerinin otonomi, kontakt inhibisyon, apoptozu baskılaması, anjiyogenez, ölümsüzlük, invazyon ve metastaz gibi temel özellikleri vardır.²¹

Tümörler ihtiyacı olan besinlerini difüzyon yolu ile sağlamaktadır. Fakat difüzyon yolu ile ancak küçük hücre toplulukları halinde yaşamlarını sürdürebilirler. Beslenmenin difüzyonla sağlanması daha büyük boyuttaki tümörlerin gelişimi için

yetersiz kalmaktadır. Tümörün büyüyebilmesi, tümöre yetecek kadar besin, oksijen, proteolitik enzim ve diğer gerekli elementleri sağlayabilmesi için tümör hücrelerinin anjiyogenezle yeni kan damarlarını oluşturması gerekir.²² Bölünebilme özelliğine sahip olan bir hücrenin çevresel ya da kalıtsal sebeplerden dolayı normal ve kontrollü bölünme yeteneğini kaybederek, çoğalması ile ortaya çıkan durumun genel adına tümör denir. Bu olay iki şekilde gerçekleşir; benign (selim-iyi huylu) tümör uzak bölgeye yayılmayan, bölgesel olarak çıkabilen, yaşam süresini etkilemeyen tümördür. Malign (kötü huylu) tümör ise yakın veya uzak organlara metastaz yapan, anjiyogenez yapma yeteneğinde olan, kontrollü hücre ölümünden korunan ve büyümeyi durduran sinyallere hassas olmayan, yaşam süresini düşürerek mortaliteye sebep olan tümördür.^{23, 24}

İyi ve kötü huylu tümörler arasında genel olarak dört farklı özellik bulunur. Bu farklar; diferansiasyon ve anaplazi, büyüme hızı, lokal invazyon ve metastazdır.

a. Diferansiasyon ve anaplazi: Parankimal hücrelerden köken alan tümörün yapısal ve işlevsel açıdan bu hücreye benzerlik göstermesine diferansiasyon, kötü huylu tümörlerin köken aldıkları ana dokuya yapısal ve işlevsel olarak benzerlik göstermemesine (undiferansiye olmalarına) anaplazi denir.

b. Büyüme hızı: Kötü huylu tümörler daha hızlı gelişirken, iyi huylu tümör hücreleri yavaş gelişim gösterirler.

c. Lokal invazyon: İyi huylu tümörlerin çoğu yavaş büyürler ve bu tümörlerin çevresinde fibröz bağ dokusunda kapsüller mevcuttur. Kapsül, tümörlü dokuyu tümör yapısında olmayan dokularından ayırır. Kanseri dokusu çevresindeki komşu dokulara infiltrasyon, invazyon ve destrüksiyon oluşturarak yayılır.

d. Metastaz: Kötü huylu tümörlerin, mevcut konumundan lenfatik ya da hematojen yollar ile ayrılarak ilk tümörle bağlantısı olmayan yeni bir kitle

oluşturmasına metastaz denmektedir. Metastaz, hastanın hayatta kalma süresini düşüren önemli bir belirleyici faktördür ve yayılmayı gösteren en önemli parametredir. Metastaz ve lokal invazyon kötü huylu tümörü iyi huylu tümörden ayırmayı sağlayan özelliklerdir.²³

2.1.2. Kanser ve Hücre Siklüsü

Normal gelişim sürecinin bir parçası olarak hücreler organizmanın ihtiyacına göre hücre bölünmesi ve proliferasyon aracılığı ile üretilirler. Somatik hücreler, belli bir sistemde replikasyon sonrasında iki yeni hücre meydana getirerek oluşurlar. Bu sürece hücre döngüsü denir ve bu olay ökaryotik üremenin temel mekanizmasını oluşturur. Hücre döngüsü iki aşamaya ayrılır; interfaz ve mitoz.^{25, 26}

a. İnterfaz: Hücre büyümesi ve DNA replikasyonu bu aşamada meydana gelir.

Bu süreç sonunda hücresel materyaller kopyalanır. Ayrıca iki yeni yavru hücreye yetecek kadar materyal sağlanmış olur. G₁, S ve G₂ fazlarından oluşur. G₁ aşamasında hücre metabolik olarak aktiftir ve DNA replike olmadan devamlı büyür. G₁ fazını DNA kopyalanmasının olduğu S aşaması izler. G₂ aşamasında hücre büyümesi sürerken, mitoz geçiş için protein sentezi gerçekleşir.^{25, 26}

b. Mitoz: Genetik materyalin bölünmesi hücre döngüsünün bu aşamasında meydana gelir. Mitoz evresi; profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz aşamalarından oluşur. Hücre siklusunun en belirleyici aşaması yavru kromozomların birbirilerinden ayrılıp, hücre bölünmesiyle son bulan mitoz evresidir.^{25, 26}

Hücre siklusunun kontrolünde, siklinler (cyc), siklin-bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) görev alırlar. Bu proteinlerin seviyeleri hücre siklüs fazları arasında değişiklikler gösterir. Memeli hücrelerinde hücre siklus

düzenlenmesi sırasında fonksiyonları en iyi bilinen on bir adet CDK (CDK 1-11) ve 16 siklin [cyc D (D1, D2 ve D3); siklin E (E1, E2), siklin A (A1, A2) ve B (B1, B2)] rol oynamaktadır.^{27, 28} Siklin D ve E, G₁/S fazları arasında geçici olarak sentezlenirler ve hücre S fazına geçince bu iki siklin hızlıca yıkılırlar. Siklin A ve siklin B, S/G₂/M faz geçişlerini sırasında sentez edilirler, siklin A1 mayoz ve embriyogenesiste, siklin A2 ise büyümekte olan hücrelerde bulunmaktadır. Siklin B1 için , siklin B2'nin yapmış olduğu işlevlerini düzenlediği varsayılmaktadır.¹² CDK'lar proteinleri fosfatlayan enzim sınıfıdır. CDK aktive olarak DNA çift sarmalının açılmasını sağlamaktadır. Replikasyon öncesi kompleks'in (PRC) bazı bileşenleri fosforillenir. Yeni replike ürünler mitoz sonucunda CDK aktivitesi düşünceye kadar PRC oluşturması mümkün değildir. Bu yüzden hücrenin her döngüsünde DNA bir defa replike olur. ²⁹ CDK'lar G₁-S-G₂ fazları arasını ve mitoz evresine geçiş kısmını kontrol ederler. Siklinler, görevlerini bitirdikten sonra, ubiquitin-proteazom aracılığı ile yıkılırlar. ^{28, 30}

- G₁'in erken aşamasında sentez edilen cyc D, CDK4 ve CDK6 ile birleşir. G₁'in geç aşamasında ise cyc E sentezlenir ve CDK2'ye bağlanır. Bu kompleksler, diğerleri vasıtası ile hücrelerin S evresine girmesini ve hücrenin bu fazda ilerlemesini sağlarlar.
- Cyc A, CDK2 ve CDK1 ile bağlanır. Oluşan komplekslerle, hücrenin S evresinden çıkıp G₂ evresine girmesi sağlanır. Ayrıca cyc B'nin oluşumu indüklenir.
- Cyc B, CDK1 ile birleşir ve oluşan kompleksle hücre G₂ evresinden çıkıp M evresine geçişi sağlanmış olur.

Hücreler, büyüme boyunca fazlar arasında geçerken kontrol noktaları diye adlandırılan kontrol mekanizmasını kullanırlar. Bu kontrol noktaları, G₁, G₂ ve M evrelerinde aktiflik göstererek, hücrelerin büyümesi, DNA'nın doğru sentezlenmesi,

kromozomların mükemmel ayrılması için önemli proseslerin dikkatli bir şekilde tamamlanmalarına olanak verirler. Hücreler, bunları hücre siklusunda inhibitör ve/veya aktif olan yolların baskılanması ile sağlarlar. Büyüme faktörleri, hücre siklusunun kontrol mekanizmasına sinyaller göndererek hücre siklusu prosesini düzenlerler. Bu düzenlenmeler, bir tür indüklenme transdüksiyonudur. Söz edilen kontrol noktalarında büyüme faktörlerinin salınması durumunda, hücre süklusu devam eder, salınmadığı durumlarda hücre süklusu durur. DNA'da bir hasar oluştuğunda aktif p53, G1 fazında hücre döngüsünü durdurur ve DNA onarımı başlar. Ancak DNA onarımı gerçekleşmezse apoptoz tetiklenir.³¹

Hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında önemli role sahip proto-onkogenler de oluşan mutasyonlar tümörlerin gelişmesine neden olur. Tümör baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonlar ise hücre döngüsünün inhibe olmasını engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olurlar. Çeşitli nedenlerle oluşan DNA hasarı, hücre döngüsünde kontrol mekanizmasının bozulmasına sebep olmaktadır. Yapılan çalışmada, çeşitli kanser türlerinde hücre siklusunun kontrol noktaları üzerinde mutasyonlar belirlenmiştir.²⁷ Gen mutasyonları dolayısıyla G₁-S faz geçişleri arasındaki farklılıklar kansere sebep olabilmektedir. Kanserli hücrelerin karakteristik özelliklerinden biri de büyüme uyarımı olmaksızın G₁ evresine yeniden girebilmesidir. Rb fosforillenme/defosforillenme dengesinin bozulduğu durumlarda, G₁'den S fazına geçişte oluşan farklılıklar hücre çoğalmasını değiştirebilir.³²

2.1.3. Kanser Hücrelerinin Genel Özellikleri

Kanser hücrelerinin normal hücrelerden farklı özellikleri:

- **Otonomi:** Tümör hücrelerinin büyüme faktörlerine olan ihtiyacı normal hücrelere nazaran daha azdır. Bu hücreler çoğalmak için ihtiyaç duyduğu büyüme faktörlerini kendileri sağlayabildikleri için, çevresel etkenlere bağlı

olmadan devamlı çoğalabilirler.

- **İnvazyon:** Kanser hücresinde hücrelerin birbiri ve matriks ile etkileşmesi normal hücreye göre düzensizdir. Aynı zamanda, yüzey adezyon moleküllerinin gen ifadesindeki düşüş nedeni ile kanser hücrelerinin tutunma özelliği normal hücreye göre azdır. Sonuç olarak kanser hücrelerinin diğer hücreler ve doku bileşenleriyle etkileşimi zayıf olduğundan invazyon ve metastaz özelliği yüksektir.^{33, 34}
- **Metastaz:** Normal hücreler vücutta mevcut konumlarını korur ve genellikle yer değiştirmezler. Halbuki kanser hücresi köken aldığı yerden uzak bölgelere yayılım gösterme özelliğine sahiptir. Malign hücreler proteaz enzimlerini salgılama özelliğine sahiptirler. Proteaz enzimler ise malign hücrelerin çevresindeki dokuların ekstraselüler matriks bileşenlerinin parçalanmasına sebep olarak bu hücrelerin komşu dokulara geçişini kolaylaştırmaktadır.^{35, 36}
- **Apoptozdan kaçma:** Genel olarak hücreler DNA hasarında programlı hücre ölümüne yönlendirilirken, kanser hücreleri programlı hücre ölümü sinyallerinden kaçmaktadırlar. Böylece kanser hücresinin yaşam süresi daha uzun olmaktadır.
- **Sınırsız replikasyon:** Kanser hücrelerinde telomeraz enzimi devamlı olarak replike olmaktadır.^{37, 38}
- **Anjiyogenez:** Kanser hücresi normal hücrelerdeki gibi besin ve oksijen alımı ve karbondioksit ile metabolik atıkların uzaklaştırılması için anjiyogeneze ihtiyaç duyarlar. Ancak devamlı anjiyogenez kanser hücresinin karakteristik özelliklerinden biridir.³⁹

2.1.4. Kanser ve Genetik

Tüm hücreler proliferasyon, diferansiasyon, yaşlanma ve ölüm seçeneklerinin

olduğu genetik bir program ile doğar ve ihtiyaç halinde işleme alır. Hücrelerin büyümesi ve çoğalmasını düzenleyen protein sentezlerini kontrol eden genlere protoonkogen denir. Protoonkogenlerde oluşan mutasyonlar sonucunda meydana gelen gene "onkogen" denilmektedir. Kansere hücrelerinin ana sorunu hücre proliferasyonundaki kontrol özelliğinin kaybolmasıdır. Günümüzde bütün kanser türlerinde somatik hücrelerdeki mutasyonlar sonucu meydana geldiği ve mutasyonlarında bazı gen ifadelerini etkilediği bilinmektedir. Kanser oluşumunu etkileyen üç tür gen bilinmektedir. Bu genler onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir.³⁹

2.1.4.1. Onkogenler

Normal hücre büyümesini ve çoğalmasını düzenleyen proteinleri kodlayan genlere protoonkogen denir. Protoonkogen, spontan olarak gen içinde bir mutasyon ya da dışarıdan bir kontrolün değişmesi sonucunda farklılaşabilir. Bunun sonucunda bu genler normalden daha fazla eksprese edilmeye başlarsa bu değişiklikler hücrede kontrolsüz büyüme ve malignensiye neden olmaktadır. Bu protoonkogenlerin mutant şekillerine onkogen denilmektedir.^{33,34} Onkogenler protoonkogenlerden daha fazla miktarda eksprese olurlar. Böylece gen ifadesindeki bu anomaliler normal çalışan bir protoonkogeni hücreyi transformasyona yönlendiren bir onkogen haline dönüştürmek için yeterlidir.⁴⁰ Protoonkogenlerin kodladığı proteinlerin çoğu normal hücre çoğalmasını düzenlerken, onkogenler genetik hasar neticesinde mutasyona uğradıklarından, kontrol edilemeyen genlerdir. Onkoprotein denilen ve onkogenler tarafından kodlanan proteinlerin bir çoğu büyüme faktörlerinden gelen sinyaller ile hücre çoğalmasını ve sağ kalımını düzenleyen sinyal ileti yollarının birer üyesi olarak görev yapmaktadırlar.^{34, 41}

Hücre yüzeyi, sinyal iletim yolağı veya çekirdekte işlevi bulunan onkogenlerin

büyük bir çoğunluğu tirozin kinaz aktivitesi gösteren reseptörleri kodlar. Bu reseptörlerin hücre dışı büyüme faktörleriyle etkileşime giren amino uçlarında oluşan farklılıklar bunların birer onkogen proteinine dönüşmesine sebep olmaktadır. Büyüme faktörlerinin indüklemesiyle aktifleşen hücre içi sinyal iletim yolları hücre siklüsü bileşenlerini düzenlemektedir. Böylece G₁ kontrol noktasından geçiş sağlanır ve büyüme faktörü uyarılmasına cevap olarak hücre siklusu ilerlerler.^{34, 42}

2.1.4.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler hücre siklüsü boyunca düzenlenmiş ilerleyişi kesmek suretiyle hücre bölünmesini yavaşlatan genlerdir. Bu genlerdeki fonksiyon kayıpları yada bozukluklar halinde anormal hücrelerin gelişimini baskılayamayacağından kanser gelişimi söz konusu olur.³⁴

Protogen ve onkogen proteinlerinin aksine tümör baskılayıcı genlerin kodladığı proteinler, hücrenin çoğalmasını ve sağ kalımını baskılar. Bu yüzden tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, negatif düzenleyici olarak görev yapan bu proteinleri ortadan kaldırarak tümör gelişimine neden olur. Protoonkogenler mutasyona uğradıklarında onkogenlere dönüşmek üzere aktive olurken, tümör baskılayıcı genlerdeki işlev kayıpları onkogeneze katkıda bulunur. İlk tümör baskılayıcı gen ender görülen bir çocukluk tümörü olan retinoblastomun (Rb) incelenmesi ile tanımlanmıştır. Normal hücrede Rb loküsü heterozigottur ve Rb geninde heterozigotluğun kaybı kanser gelişmesine sebep olmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerdeki defektler kalıtsal olarak geçtiği için, çocukluk çağında tümör insidansının artışına sebep olabilir. Tümör baskılayıcı gendeki her iki normal allelin kaybı veya aktivasyon kaybı, çocukluk ve erişkin dönemdeki kanserleri oluşturabilir.^{43, 44} İkinci bir tümör baskılayıcı gen değişik insan kanserlerinde sıklıkla işlevini kaybettiği görülen p53'tür. p53 geninin ürünü hem hücre büyümesini hem de apoptozu kontrol eder. DNA hasarı sırasında p53 sentezi

indüklenir. p53, CDK inhibitörü olan p21'in transkripsiyonunu arttırır. Böylece pRb fosforile olur ve hücre G₁ evresinde bekletilerek DNA hasarının onarılabilmesi için hücreye vakit kazandırılır. Eğer hücrede DNA hasarı onarılmazsa hücre apoptoza yönelmektedir. p53'ün kaybı, DNA hasarına bağlı bu duraklamayı ortadan kaldırarak mutasyon sıklığının artmasına ve hücre genomunda kararsızlığa sebep olmaktadır. Genomdaki bu kararsızlık, tümör gelişimi esnasında onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde bazı farklılıkların gözlemlenmesine sebep olur.⁴⁵

2.1.4.3. DNA Tamir Genleri

Normal hücreler DNA hasarını onarabilmektedir. Çevresel etkiyle ya da replikasyon sırasında oluşan DNA hasarları onarılamadığında hücre neoplastik transformasyona uğrar. DNA tamir genleri, organizmada bulunan diğer genlerdeki onarılabilecek hasarları tamir ederek, hücre proliferasyonu üzerine etki göstermektedir. DNA tamir genlerinin her iki alleli birden inaktive olursa gen görevini yerine getiremez. Bu yüzden bu genlerin tümör baskılayıcı gen gibi davranış gösterdiği düşünülmektedir. DNA tamir genlerindeki kalıtsal mutasyona sahip kişilerde kanser olasılığı bulunmaktadır.⁴⁵ Tamir genleri, hasarın onarımı, yanlış-eş tamiri, nükleotit kesme-çıkarma tamiri ve baz kesme-çıkarma tamiri gibi metabolik yolların genlerini kapsamaktadır. OGG1, ERCC1, XRCC1, BRCA2, NBS1 DNA onarım genlerinden bazılarıdır.⁴¹

2.1.5. Kanser ve Apoptoz

Apoptozis (programlanmış hücre ölümü), fonksiyonlarını kaybetmiş, fazla üretilmiş, yaşlanmış, düzensiz gelişmiş ve DNA'sı hasarlı olan hücrelerin güvenli bir şekilde yok edilmesini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen hücre ölümüdür.⁴⁶ Programlanmış hücre ölümü, embriyolojik gelişimde ve erişkin dokunun gelişiminin sürdürülebilmesinde anahtar rol oynar.⁴⁷ Apoptoza yönelen hücrelerin ebatları küçülür

fakat yok olmazlar. Hücre zarları asimetrisini ve bir dokudaki komşu hücelere tutunma kabiliyetlerini kaybetmektedirler. Normal hücelerde membranın iç bölümünde sitozole bakan fosfatidilserinler ters çevrilerek membranın dış yüzeyine bakarlar. Apoptotik hücelerde mitokondriden sitokrom c salınımı gerçekleşir. Sitokrom c ise hücelerde kaspaz aktivasyonunun başlatılmasında önemli bir rol oynaktadır. Kromatin iplikler parçalara ayrılarak yoğunlaşırlar. Fagositik hüceler membran yüzeyindeki fosfatidilserinlere bağlanarak apoptotik hüceleri yutarlar. Bu durumda hücre ölümü nedeniyle oluşabilecek inflamasyon önlenmiş olmaktadır.^{25, 26}

Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları

1. Apoptozisin başlatılması
2. Sitokrom c'nin salıverilmesi
3. Hücre içinde proteaz aktivasyonu
4. Hücrede bazı biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi
5. Fagositoz

Apoptoz, erişkin dokuların korunmasında ve embriyo gelişiminde önemli role sahip olan fizyolojik bir olaydır. Erişkinlerde programlı hücre ölümü, hücre proliferasyonunun düzenlenmesi ve dokulardaki hücre sayısının belirli sayıda tutulmasından görevlidir.

Apoptoz, sistein proteazlar (kaspaz-3, 8 ve 9) ve Bcl-2 (kaspaz aktivasyonunu düzenleyen) gen ailesi olmak üzere iki protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. Apoptozun düzenlenmesinde görev alan genlerde oluşan mutasyonu kanser oluşumuna neden olmaktadır. Hücrenin canlı kalması apoptozun uyarılması ve inhibe edilmesini sağlayan genlerle ilişkilidir. Bu genler; Bcl-2, Bax ve p53 genleridir.⁴³ Hasar görmüş hücrelerin ortadan kaldırılmaları apoptozun önemli bir işlevidir. Bir hücrenin onarılmayacak şekilde hasarlanması, bir virüsle enfekte olması, iyonize radyasyon veya

toksinlere maruz kalması sonucunda p53 proteini hücre döngüsünü durdurur. Böylece apoptoz uyarılmış olur.²⁶

Kanser, hücrenin bölünmesi ile apoptoz arasındaki homeostatik denge bozulduğunda meydana gelmektedir. Kanserle ilişkili programlı hücre ölümü aktivasyonu ve inhibisyonunda fonksiyonu olan genlere proapoptotik ya da antiapoptotik genler adı verilmektedir. Proapoptotik genler Bad, Bax, p53, Bid, Bcl-xs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır. Antiapoptotik genler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir. Bir hücrede programlı hücre ölümüne yönelmesinde hücre içerisindeki Bcl-2/Bax miktarı önemlidir. Bax oranının fazla olması hücreyi apoptoza yönlendirir, hücrede Bcl-2 fazlalığı ise apoptozu inhibisyona uğratar.⁴⁸⁻⁵¹ Kanser hücrelerinde, p53 geni kaspaz 3, 7, 8 ve 9 enzimlerini aktive ederek apoptozu sağlamaktadır. Fakat kanser hücrelerinde mutant p53 geni inaktif olduğundan hücreler apoptoza giremez ve bunun sonucunda malignensi gelişime sebep olur.⁵²⁻⁵⁴

2.1.6. Kanser ve p21

CDKN1A, diğer adıyla p21, lokalizasyonu 6p21.2 olan üç ekzondan meydana gelen bir gen bölgesidir. 2,1 kb büyüklüğünde mRNA'ya sahip olup 18 kd ağırlığında 168 aminoasitten meydana gelen bir protein kodlamaktadır. CDKN1A nükleer ve sitoplazmik bir lokalizasyon göstermektedir.⁵⁵ p21 ilk olarak siklin/CDK komplekslerinin inhibitörü ve tümör baskılayıcı olarak tanımlanmış daha sonraları hücre ölümü, DNA replikasyonu, DNA tamiri ve gen transkripsiyonuna katıldığı bulunmuştur.^{56, 57} p21, bağımsız bir şekilde siklin/CDK bağlayıcı bir protein olarak izole edilmiş olup, ayrıca p53 tarafından büyüme inhibe geni olarak upregüle edilir veya yaşlanmış fibroblastlarda aşırı eksprese edilir.⁵⁸ Hücre siklusü regülasyonunda p21'in ana rolü, proteinin N terminal ucundaki spesifik bölgelerle direkt etkileşimi sayesinde siklin/ CDK kompleksini inhibe ederek gösterir.⁵⁹

p21'in onkogenezdeki rolü tam olarak bilinmemesine rağmen, bir tümör baskılayıcı gen gibi davrandığı düşünülmekte ve hücre döngüsünü inhibisyonunda rol oynadığı bilinmektedir. p21 ekspresyonu, insanlarda çeşitli dokularda farklı neoplaziler açısından pek çok deneysel çalışmada araştırma konusu olmuştur. Normal dokuya bitişik tümörlerde p21 ekspresyonunun sadece farklılaşmasını tamamlamış hücrelerde görülmekte olduğu bildirilmiştir.⁶⁰⁻⁶² p21 gen delesyonları ve mutasyonları tespit edilmiş olmasına rağmen, bunların fonksiyonel olarak önemi yeterli derecede açık değildir.⁶²

Kolon, beyin ve akciğer kanseri hücre kültürlerinde p21 aşırı ekspresyonunun büyümeyi yavaşlattığı gözlemlenmiştir.^{58,63,64} Ayrıca p21'den yoksun farelerde enjeksiyon yoluyla p21 aşırı ekspresyonu sağlandığında kolon kanser hücrelerinde tümör seyrinin yavaşladığı görülmüştür.⁶⁴

Tümör spesifik mutasyonların p21'nin CDK ailesini inhibe etme özelliğini zayıflatmış ve p21 inaktivasyonunun neoplazik oluşumların meydana gelmesine bir miktar katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Fakat p21'in farklı kanser tiplerinde mutasyon analizi sonucu, insan tümörlerinde nadir şekilde görüldüğü belirtilmiştir.^{65, 66} Bu nedenle p21'in fonksiyonlarının azalmasının, kendi yapısındaki genetik değişimlerin sonucundan çok, p53 tümör baskılayıcı genin inaktivasyonu sonucu geliştiği düşünülmektedir.⁶⁷ p53, p21'in transkripsiyonel uyarı yoluyla ekspresyonunu arttırarak, hücre döngüsünün kilitlenmesine ve Bax genini uyararak apoptoza gidilmesini sağlayabilir.⁶⁸

2.1.7. Kanser ve p27

CDKN1B diğer adıyla p27 lokalizasyonu 12p13 olan iki ekzondan meydana gelen bir gen bölgesidir. 2,5 kb büyüklüğünde mRNA'ya sahip olup, 22 kDa ağırlığında 198 aminoasitten meydana gelen bir proteini kodlamaktadır. CDKN1B nükleer bir

lokalizasyon sergilemektedir.⁶⁹

p27, CDK inhibitörüdür. Prolifere hücrelerde p27 CDK ile kompleks halinde, sessiz hücrelerde ise D-CDK4 ile kompleks oluşturmuş halde bulunmaktadır. Hücreler hücre siklusuna girmek için uyarıldıklarında siklin D-CDK4 kompleksinin miktarı zaman geçtikçe artar ve p27'in seviyesini aşarak onun inhibitör etkisine engel olur.⁷⁰

p27 anti mutajenik sinyallere karşı oluşan cevapta, büyümeyi düzenleyen önemli bir moleküldür.⁷¹ p27 ekspresyon düzeyinin artması, hücre farklılaşması ile pozitif yönde etkilendiği düşünülmektedir.⁷² CDK inhibitör ailesinden olan p27 mitojenik ve antiproliferatif dış sinyal yollarını içeren düzenleyici mekanizmalarla ilişkili olduğundan p27 fonksiyonundaki azalmanın tümör gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.⁷³ p27 ekspresyonu sıklıkla mide, prostat, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde azalmakta ve p27 mutasyonu memeli kanserlerinde nadiren rastlanmaktadır.⁷⁴ p27 bir tümör baskılayıcı gen gibi görülmekte ve aşırı ekspresyonunun hücre döngüsünde S fazına geçişi engellediği düşünülmektedir. Genel olarak p27 ekspresyon düzeyindeki azalma, tümör belirleyici nitelikte değildir ve hasta bulguları açısından zayıf karakterdedir. Hayvan modellerinde yapılan sonraki çalışmalar, p27 protein düzeyindeki güç fark edilen, hassas değişimlerin diğer tümör supresör genlerin kaybına bağlı olarak malignite riskini attırdığını göstermiştir.⁷⁵ Kolon, prostat, akciğer, meme, yumurtalığı kapsayan çeşitli kanser türlerinde ayrıca melanom ve gliomların dahil olduğu insan malignitelerinin % 60'ında p27 protein düzeylerinin azalmış olduğu gözlemlenmiştir.⁷⁶

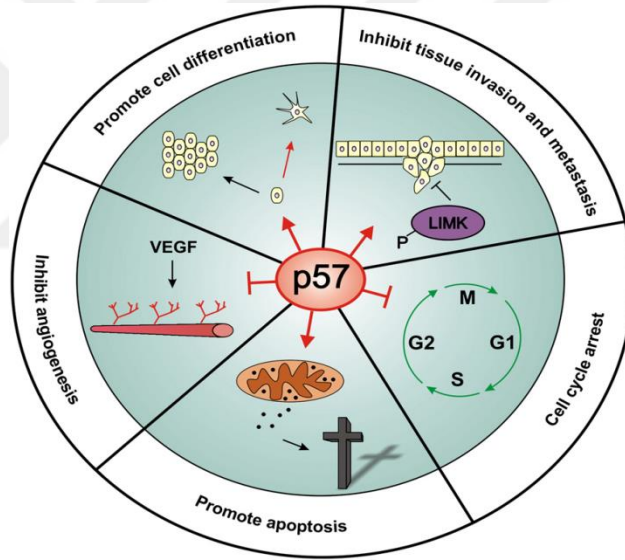
2.1.8. Kanser ve p57

CDKN1C olarak bilinen p57, 11p15.5 kromozonunda bulunan p27 ile %40 oranında benzerliğe sahip ve karboksil terminallerinde birbirine çok benzeyen, QT domain olarak adlandırılan, ancak fonksiyonu bilinmeyen bir domain bulunduran gen

bölgesidir.⁷⁷

p57, siklin D/CDK4, siklin E/CDK2 ya da siklin A/CDK2 komplekslerine bağlanarak onları inhibe eder ve böylece hücrenin G1/S geçişini ve S fazının tamamlanmasını engeller. p57 proliferasyon ve diferansiyasyonda görevlidir.⁷⁸

p57 proteininde allelik kayıplarının akciğer, meme, mesane kanseri ve Wilms tümörü ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bunun yanı sıra over kanseri, pankreas kanseri ve gastrik kanserlerde tümör dokusundaki p57 ekspresyonunun prognozla ilişkisini araştıran bazı immunohistokimyasal çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmında p57 ekspresyonundaki çeşitliliğin prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir.^{77, 79,80}



Şekil 2.1. Kanser p57'ye göre düzenlenmesi.⁸¹

2.1.9. Kanser ve Otofaji

Otofaji kendi kendini (auto) yeme (phagy) anlamına gelir ve hücrelerin fizyolojik şartlarda açlık durumunda besin elde etmek için hücre içindeki yapıları parçalaması anlamında kullanılmaktadır. Otofaji fizyolojik şartlarda organellerin ve hücre içi moleküllerin döngüsü ile homeostaziye korumakta ve artan hücre stresi anında hücrenin hayatta kalmasını sağlamaktadır.^{10,11} Son çalışmalarda ise otofajinin metabolizma, morfogenez, farklılaşma, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminde

de rol oynadığı görülmüştür.^{12, 13} Öte yandan otofaji anormallikleri kanser, enfeksiyon hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, kas hastalıkları ve immün sistem hastalıklarının patogeneğinde rol oynayabilmektedir.^{10, 14} Otofaji ile hücre içinde bulunan atıklar, hasarlanmış orgenellerin ve uzun ömürlü sitoplazmik proteinlerin asit hidrolaz enzimleri içeren lizozomlar tarafından ortamdaki uzaklaştırılması sağlanır.¹⁰ Kanser ve otofaji ilişkisi hala tartışmalı olup, otofaji kanser oluşumu sırasında tümör süpresör etki gösterirken, kanserin progresyonu esnasında kanser hücrelerinin hayatta kalmasına katkı sağlamaktadır. Otofajinin hem karsinogeneğinde hem de kanser hücresinin sağ kalımında önemli rol oynadığı anlaşılmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan sitotoksik ilaçlar ve hedefe yönelik ilaçların otofajiyi indüklediği bilinmektedir. Bu nedenle otofajiyi bloke etmek veya indüklemek kanser tedavisinde önemli avantajlar sağlayabilir.¹⁵

Bilinen 3 farklı otofaji mekanizması bulunmaktadır.

1. Makrotofaji: Protein ve hasarlanmış hücre organellerinin parçalanmasını sağlar. Otofagozom oluşumu ile gerçekleşir.
2. Mikrotofaji: Lizozom membranının invaginasyon, protrüzyon ve septasyonuyla gerçekleşir.
3. Şaperon aracılıklı otofaji: KFERQ işaretli proteinlerin lizozom aracılığıyla taşınmasını sağlar.⁸²

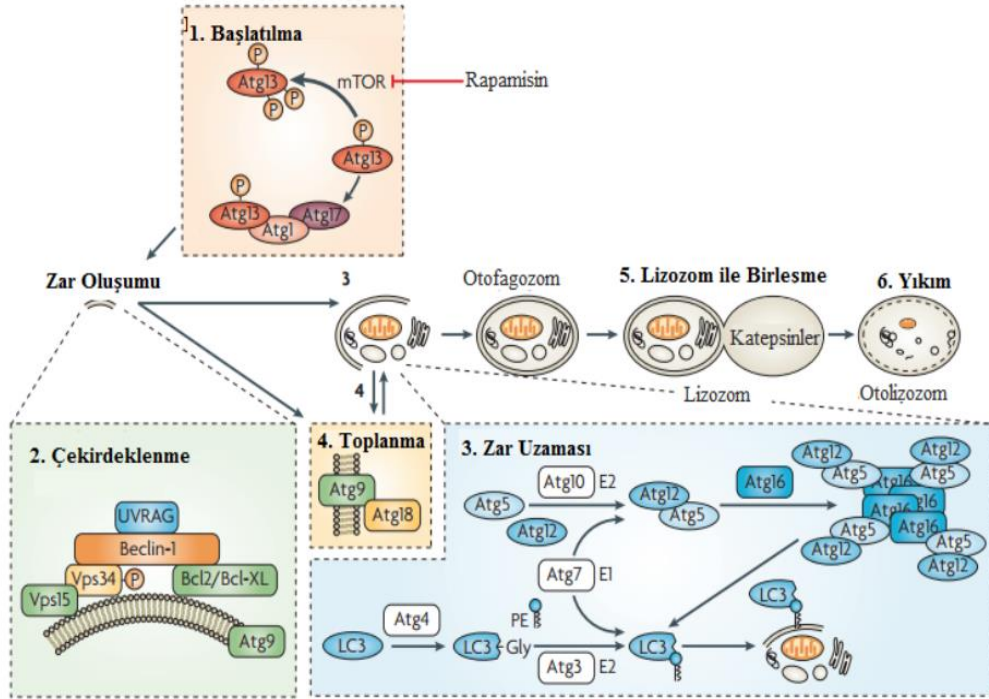
Bilinen 3 farklı otofaji mekanizması bulunmasına rağmen otofaji dendiğinde asıl olarak makrotofaji kastedilmektedir. Otofaji ile bağlantılı proteinler (autophagy related proteins-ATG) proteinleri ilk olarak mayalarda yapılan araştırmalarda saptanmış olup, günümüzde 30'dan fazla ATG geni tanımlanmıştır.⁸³ ATG proteinlerinin bir kısmı izolasyon membranı yani otofajik kesecik ve otofagozom oluşumunda rol alır. Otofagozomlar preautophagosomal structure (PAS) denilen yapılarda ortaya çıkarlar.

Otofaji mekanizmasındaki ATG proteinlerin çoğu ilk olarak mayalarda yapılan

çalışmalar sonucu bulunmuştur ve memeli hücrelerde bu proteinlerin analogları bulunmaktadır. Memelilerdeki ATG proteinleri otofaji basamaklarının düzenli bir şekilde ilerlemesini sağlamaktadır.⁸³

Otofaji mekanizması 5 basamakta toplanabilir:

1. Başlatılma, ATG/ULK (unc5- benzeri kinaz) bileşeni,
2. Çekirdeklenme, Beklin-1/sınıf III PI3K (fosfotidilinositol-3 kinaz) bileşenleri,
3. Zar Uzaması, ATG12 ve ATG8/LC3 iki ubikutin benzeri birleşmiş sistemler,
4. Toplanma, transmembran ATG9 ve fagofor oluşumu için diğer ATG proteinler,
5. Lizozom ile birleşme ve yıkım: otofagozom ve lizozomun birleşmesi, LAMP2 ve RAB7 proteinler, sonuçta lizozomal hidroliz olur ve yıkım gerçekleşir.⁸⁴



Şekil 2.2. Otofaji mekanizma aşamaları.⁸⁵

Otofaji mekanizmasındaki fosfotidilinositol 3-fosfatın görevi keseciğin meydana gelmesinde görev alan protein gruplarını otofaji oluşum merkezine yönlendirmektir. Çekirdeği oluşan otofagozom membran uzaması ve kesecik halini alması için iki ubikitinleme merkezi sistem tarafından kontrol edilir. Bu sistemlerin ilkinde ATG12

proteininin ATG5 proteinine bağlanması sağlanır. Daha sonra birleşmiş ATG12-ATG5 , ATG16 ile birleşerek izolasyon membranının dış kısmına bağlanır. Diğer übikitin benzeri sistemde ATG8 (memelilerde MAP-LC3 kısacası LC3) proteini bir fosfotidiletionalamin (FE) kovalent olarak bağlanır. FE'ye LC3'ün bağlanması için ATG12-ATG5-ATG16 kompleksi gereklidir. LC3'ün FE'ye bağlanması otofaji sırasında zarın taşınması ve burada zarın uzaması için gerekli bir olaydır. Atg4 proteini işlevi biten LC3 proteinlerini FE'den kopararak tekrar kullanılmasına yol açar.⁸⁶

Bu basamaklar sonucunda hücrede otofaji çekirdeklenme, zar uzaması, lizozomla birleşme ve yıkım şeklinde meydana gelir. Otofajik kese oluşuktan sonra uzamaya başlar ve uzama sonrasında lizozomla birleşerek taşıdığı yapıları parçalar ve oluşan aminoasit, lipid gibi bileşenler tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılmış olur.¹³

2.1.10. Otofajinin Düzenlenmesi

Açlık, hipoksi ve çeşitli stres koşulları otofaji aktivitesini uyarmaktadır. Mammalian target of rapamycin (mTOR) protein kompleksinin otofaji düzenlenmesinde önemli rolleri vardır. İlk olarak mayalarda mantara karşı kullanılan bir ilaç olan rafamisinin hedefi olarak ortaya çıkan mTOR'un, asıl görevi hücrede protein sentezini ve hücrenin büyümesini kontrol eden kinaz olmasıdır. TOR baskılanması otofajiyi indükler. Tokluk durumunda TOR ATG13 proteinini fosforiller ve otofaji baskılanır. Aşırı stres ve açlık durumunda TOR aktivitesi düşer ve ATG13 defosforile olur ve ATG1 ile bağlanarak otofajiyi indükler.⁸⁷

Sınıf I PI3K/protein kinaz B (AKT/PKB), mitojenik sinyallere cevap sonucu hücre büyümesini kontrol eden sinyal yollarından biridir. Sınıf I PI3K, PI(3,4)P2 ve PI(3,4,5)P3 oluşmasını sağlayarak AKT/PKB yolağının aktive olmasını sağlar. AKT'nin aktif olması TOR'u aktive eder ve böylece otofaji bloke olur.⁸⁸ Tümör baskılayıcı

proteinlerden PTEN AKT/PKB yolağını tersine çalıştırarak otofajinin artmasında görev yapar.

Yakın zamanlarda yapılan çalışmalara göre, otofagozomal zar oluşumunda LC3 ve Atg18 proteinlerinin PI3'e bağlanıp mTOR yolağı ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Atg18'in otofaji izlenmesinde kullanılabilecek bir protein olduğu söylenmektedir.⁸⁹

HT-29 KRK hücrelerinde Ras/Raf-1/ERK1/2 sinyal yolağı ve heterotrimerik G proteinleri, otofajiyi düzenleyen mekanizmalardan biri olarak tanımlanmıştır.⁹⁰

2.1.11. Otofaji Regülasyonunda Etkili Olan Moleküller

2.1.11.1. Akt/PKB ve TOR Yolağı

Otofaji düzenlenmesinde en önemli molekül olan TOR, GTP-bağlayıcı küçük protein olan Rheb'in GTP bağlı formu tarafından kontrol edilmektedir. TOR yolağının aktive olması hücre büyümesine ve hücrenin hayatta kalmasını sağlarken, yolağın baskılanması otofajiyi tetiklemektedir. mTOR yolağı hücre içi protein, enerji seviyeleri ve büyüme faktörleri ile aktive olurken, AKT/PKB yolağı ile de kontrol edilir. AKT/PKB kontrolünü mTOR inhibitörlerini inaktif hale getirerek yapar. Böylece AKT/PKB aktivasyonu mTOR uyarınımı sağlar ve otofaji baskılanır. Ayrıca AKT apoptoza etki eden yolakları da aktive eder. AKT, Bcl-2 ailesi üyesi Bad'in fosforillenmesine, NF-kappaB yolağının uyarılmasına ve apoptozun inhibe olmasına da yol açmaktadır.⁹¹ Akt/PKB yolağının uyarılması hem apoptozu hemde otofajiyi bloke etmektedir.

2.1.11.2. Bcl-2 ve Bcl-XL

Bcl-2 ve Bcl-XL anti-apoptotik olarak görev yaparken aynı zamanda otofajiyi de inhibe edebilmektedir. Bcl-2 yada Bcl-XL Beclin üzerindeki BH3 bölgesine bağlanıp otofajiyi durdurabilmektedir. Bcl-XL'ın fosforillenmesi, Becline bağlanmayı

zayıflatarak otofajiyi aktive etmektedir.⁹²

2.1.11.3. Atg4d, Atg5 ve Beclin

Otofaji mekanizmasının temel proteinlerinden olan Atg4, Atg5 ve Beclin-1'in proteolitik olarak kesilmesi apoptotik hücre oluşumunu arttırmaktadır. Ayrıca Atg5, otofajik izolasyon zarının oluşumunda rol oynamaktadır.⁹³ Apoptoz sırasında, otofaji proteinleri olan Beclin'in ve Atg4D'nin kaspazlar tarafından yıkıldığı saptanmıştır. Böylece bazı otofaji proteinlerinin apoptoz yolları tarafından kullanılmakta olduğu anlaşılmaktadır.⁹⁴

2.1.11.4. P53

Apoptoz uyarıcı olarak görev yapan p53 apoptoz öncülü genleri transkripsiyonel düzeyde artırır ve Beclin-2 gibi anti-apoptotik protein ifadesinin azalmasından sorumlu bir proteindir. p53'ün aktivasyonu mTOR yolağını inhibe eder ve böylece otofaji aktivasyonu tetiklenir.⁹⁵ p53'ün işlevini yitirmesi otofajinin aktifleşmesine neden olur. P53'ün hücre içindeki yerine göre de işlevi değişmektedir. Çekirdekteki p53'ün otofajiyi indüklediği, sitoplazmada bulunan p53'ün ise otofajiyi baskıladığı gözlemlenmiştir.⁹⁶

2.1.11.5. Reaktif Oksijen Türleri ve ATG4

Reaktif oksijen türleri (ROS) otofajik hücre kesesinin oluşmasında ve otofajinin hücrenin ölmesi ya da hücrenin hayatta kalmasının düzenlenmesinde etkilidir. ROS'un hücre içi yüksek konsantrasyonu apoptozu uyarırken, düşük konsantrasyonu sinyal iletisi yapan molekül gibi davranarak hücrenin hayatta kalmasını ve hücre büyümesini düzenler. ROS'un otofajiyi düzenlemesi ATG4 proteini üzerinden olmaktadır. ATG4, LC3 proteinin olgunlaşmasında ve yağ asitlerinin koparılmasında görevlidir. ROS Atg4'ün katalitik bölgesindeki sistein aminoasitlerini okside eder ve ATG4'ü inaktif yapar, böylece otofagozom oluşumu baskılanır.⁹⁷

2.1.11.6. ARF

ARF bir tümör baskılayıcı gendir ve hem apoptozu hemde otofajiyi etkilemektedir . ARF'nin tümör baskılayıcı özelliğini, p53 inhibitörü olan MDM2 ile ilişkiye girerek ve böylece onu etkisiz hale getirerek gösterir. ARF'nin diğer bir izoformu olan smARF, ARF 'yi çekirdeğe gönderen ve MDM2 ile bağlantısını sağlayan aminoasit ucundan yoksundur. Apoptozla bağlantılı olan ARF den farklı olarak smARF mitokondriye yönlendirilir ve mitokondri depolarizasyonu yaparak otofajik ölüm meydana gelmesine yol açar.⁹⁸

2.1.11.7. FADD, Kaspaz-8, FLIP

FADD ve kaspaz-8 aktivitesi bulunmayan T hücrelerinde otofajinin aşırı olduğu ve hücre ölümünün gerçekleştiği gözlemlenmiştir.⁹⁹ FLIP hem otofajiyi hem de apoptozu durduran bir proteindir.⁹⁴

2.1.11.8. DAPk

Kalsiyum kalmodulin bağlanmasıyla düzenlenen DAPk hem otofajiyi hem de apoptozu aktive etmektedir.¹⁰⁰

2.1.11.9. E2F1

Hücre ölümü ve yaşamı arasında bazı sinyal yollarında görev alan E2F1, DNA hasarı oluşturan çeşitli ajanlar varlığında hem apoptozu hem de otofajiyi aktive etmektedir.¹⁰¹

2.2. Kolorektal Kanser

2.2.1. Epidemiyoloji

2013 yılında yayınlanan Dünya Kanser Raporuna göre kolorektal kanserler (KRK) yılda bir milyon yeni vaka ile kanser olgularının %9,4'ünü oluşturmaktadır.¹⁰² KRK dünyanın en yaygın 3. tip kanser türüdür.³ Hem erkeklerde, hem de kadınlarda en sık görülen üçüncü kanserdir ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında üçüncü

sıradadır.¹ Ulusal Kansere Enstitüsünün (NCI) sörveyans sistemine göre, 2006-2010 yılları için KRK insidansı erkeklerde yüz binde 52,2, kadınlarda yüz binde 39,3 ve her iki cins genelinde yüz binde 45,0'dır¹⁰³. Türkiye için Sağlık Bakanlığı KRK'nın insidansını yüz binde 17 olarak bildirmektedir. KRK insidansı yaşla beraber artmaktadır. Kırk yaşın altında nadirdir.¹

KRK'nın %60'ı dünyanın gelişmiş bölgelerinde gözlemlenmektedir. Bölgeler arasındaki bu farklılıklar çeşitli nedenlere bağlıdır. Bu farklılıkların öncelikle çevresel faktörlere ve diyetle ilişkili olduğu düşünülmektedir. KRK'nın yüksek yağ ve düşük lif içeren diyetle beslenen toplumlarda daha sık görüldüğü belirlenmiştir.¹

2.2.2. Patogenez

KRK gelişimi için bilinen risk faktörleri; herediter faktör, yaş ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarıdır.¹⁰⁴ KRK gelişiminde bireysel tıbbi öykü ve ailesel yatkınlıklar önemli rol oynar. Ayrıca ekzojen faktörler olarak da kırmızı etten zengin beslenme, alkol tüketimi, obezite ve sigara içimi sayılmaktadır.¹⁰⁵ Genel anlamda epidemiyolojik, klinik ve patolojik bulgular birlikte değerlendirildiğinde bütün kolon kanserlerinin poliplerden gelişmiş olduğu sonucuna varmak mümkündür.¹⁰⁶ Kolon poliplerinin doğal seyrini ve kolon kanseri riskini histopatolojik bulguları belirler. Kolon poliplerinin en sık görülen iki histolojik tipi hiperplastik polip ve adenomatöz poliplerdir. Neredeyse tüm kolon kanserleri adenomatöz poliplerden gelişirken, hiperplastik tip poliplerin kanser gelişimi için küçük de olsa bir risk oluşturabildiği düşünülmektedir.^{107, 108} Bu anlamda ailesel polipozisli hastalar özel bir risk grubunu temsil etmektedirler.¹⁰⁷

2.2.3. Kolorektal Kansere Evrelemesi

KRK evrelendirilmesi ilk defa 1930 yılında Dukes tarafından yapılmıştır. 1954 yılında Dukes sınıflaması gözden geçirilerek modifiye edilmiştir. Günümüzde de kullanılmaya devam edilen Dukes sınıflamasına göre hastalık 4 evreye ayrılmaktadır.¹⁰⁹

- Evre A: Kolon duvarının tamamını kapsamayan tümör
- Evre B: Kolon duvarını bütünüyle tutmuş tümör
- Evre C: Lenf düğümlerine yayılmış tümör
- Evre D: Metastazlı kolorektal tümör.

Amerikan Kanser Birliği "American Joint Committee on Cancer (AJCC)" ve Uluslararası Kanser Birliği "Union International Contre Cancer (UICC)" TNM evreleme sistemini geliştirmişlerdir.¹¹⁰

Primer Tümör Boyutu (T)

Tx: Primer tümör hakkında herhangi bir bilgi yok

T0: Primer tümör gösterilemedi

Tis: Karsinoma in-situ

T1: Submukoza tutulmuş

T2: Muskularis propria tutulmuş

T3: Tümör muskularis propriadan perikolorektal dokulara uzanım göstermekte

T4a: Tümör visseral periton yüzeyine kadar uzanmış (seroza tutulmuş)

T4b: Tümör komşu organ ve dokulara invaze

Bölgesel Lenf Nodları (N)

Nx: Bölgesel lenf bezi hakkında herhangi bir bilgi yok

N0: Bölgesel lenf bezi metastazı gösterilemedi

N1: Bir-üç lenf bezi metastazı

N1a: Bölgesel bir lenf bezi metastazı

N1b: Bölgesel iki-üç lenf bezi metastazı

N1c: Bölgesel lenf bezi metastazı olmadan non-peritonize perikolik veya perirektal dokularda veya subserozal, mezenterik tümör depozit(ler)i

N2: Dört veya daha fazla lenf bezi metastazı

N2a: Bölgesel dört-altı lenf bezi metastazı

N2b: Bölgesel yedi veya daha fazla lenf bezi metastazı

Uzak Metastaz (M)

Mx: Uzak metastaz hakkında herhangi bir bilgi yok

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

M1a: Bir organ veya bölgede (örn; bölgesel olmayan lenf nodu) metastaz

M1b: Birden fazla organ veya bölge metastazı

2.2.4. Kolorektal Kanser ve Ras İlişkisi

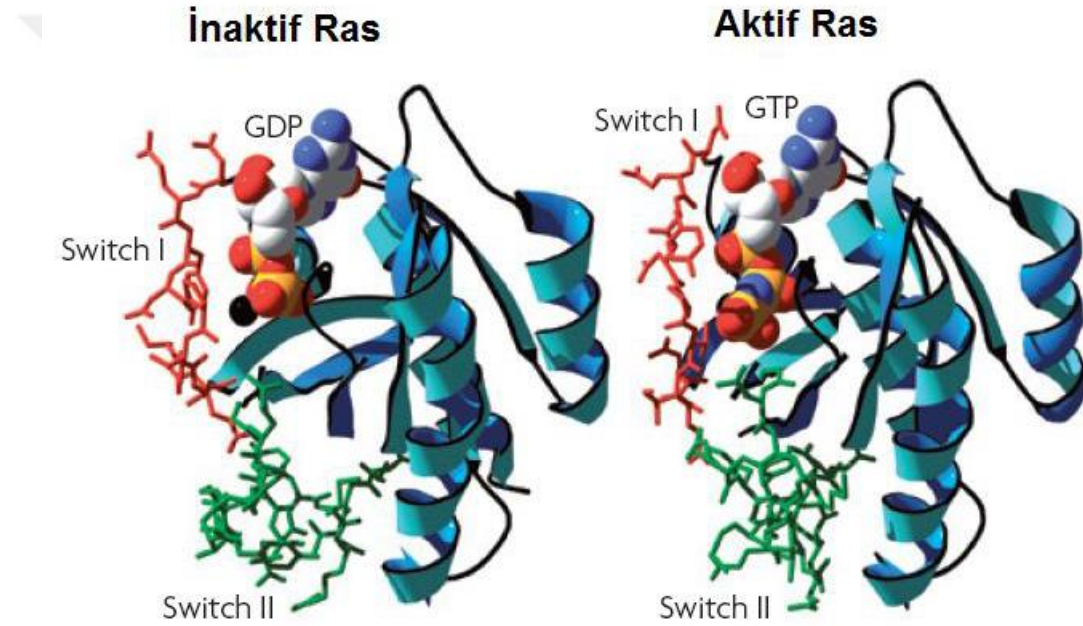
2.2.4.1. Ras Ailesi

Ras ailesi bir protoonkogen ailesi olup başlıca Harvey Rat Sarkoma (Hras), Kirsten Rat Sarkoma (Kras) ve Nras olmak üzere 3 protoonkogenden oluşur. Ras protoonkagenleri normal olarak embriyogenezde, yara iyileşmesinde ve mitoz artışını gerektiren durumlarda eksprese edilir.¹¹¹ Ras proteinlerinin 3 boyutlu yapısı X-ışınları kristallografisi ile tanımlanmış olup, yapısı α -heliks ve β -plaka tabakalarından oluşmaktadır.¹¹² Küçük guanozin trifosfataz (GTPaz) Ras ailesi üyelerinin her biri, proteinin N-terminal ve C-terminal’inde büyük ölçüde korunmuş olan yaklaşık 190 amino asitlik rezidü içermektedir. Proteinin C-terminali, Ras ailesi üyeleri arasında farklılık gösterir. C-terminalin hemen yanında yer alan ve üyelerin farklı fonksiyonlara sahip olmasını sağlayan, yaklaşık 25 amino asitlik “çok değişken bölge” (High Variable Region, HVR) bulunmaktadır.¹¹³ Ras proteinlerinin C-terminalinde bulunan “membran-hedefleyen CAAX” dizisi Ras ailesi üyelerinin membranla ilişki kurmasını sağlamaktadır. CAAX dizisinde “C” sisteini, “A” lösin, izolösin veya valin gibi bir alifatik amino asidi ve “X” ise metiyonin, serin, lösin veya glutamini simgelemektedir.¹¹² Ras proteinlerinin post-translasyonal modifikasyonları, “CAAX”

dizisinde meydana gelmektedir. Post-translasyonel modifikasyon süreci, Ras proteinlerinin doğru subsellüler kompartmanlara lokalize olması açısından önemlidir.¹¹⁴ Ras proteinlerinin post-translasyonel modifikasyonu “izoprenilasyon, proteoliz, karboksimetilasyon ve palmitoilasyon” olmak üzere 4 aşamayı içermektedir.¹¹²

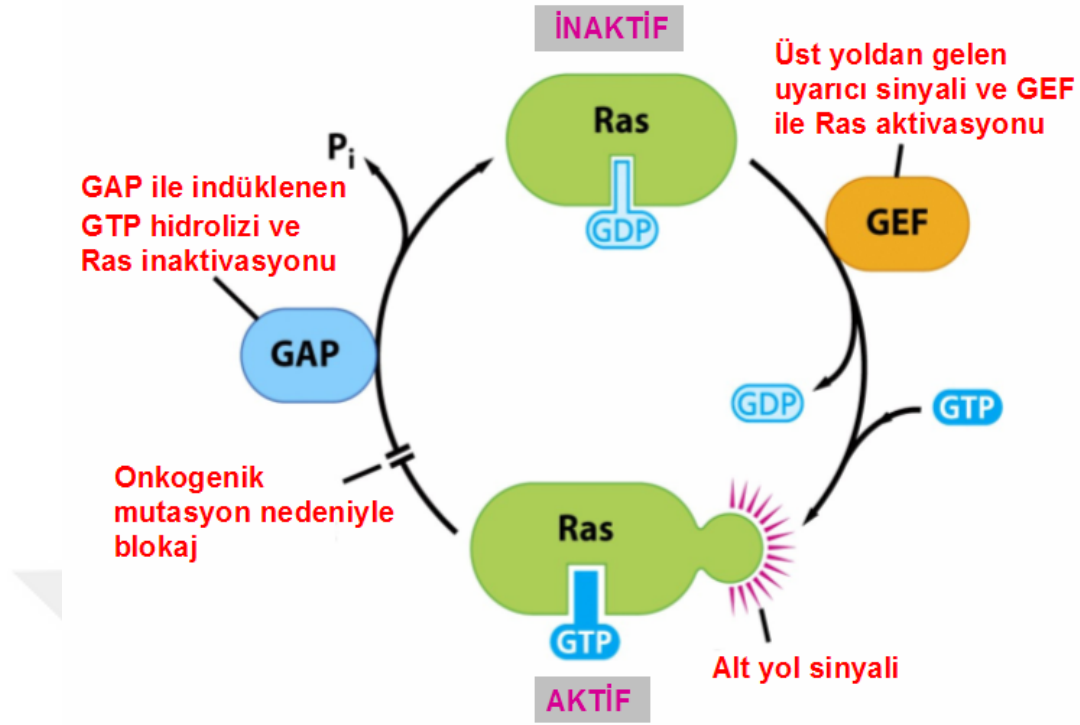
2.2.4.2. RAS Aktivasyonu

Diğer guanozin trifosfat (GTP)-bağlayan proteinler gibi, Ras proteinleri de aktif GTP-bağlı ve inaktif guanozin difosfat (GDP) GDP-bağlı durum arasında döngü yaparak, önemli hücresel olaylarda anahtar moleküller olarak görev yapmaktadırlar.¹¹⁵



Şekil 2.3. Ras'ın GTP- ve GDP-bağlı durumdaki konformasyonları.¹¹³

Ras proteinleri (1) dinlenme halinde yani inaktif durumda bir GDP moleküne bağlanır, (2) sinyal kaskadında uyarıcı sinyalleri aldıktan sonra GDP bağlı durumunu bırakır, (3) serbest kalan GDP yerine bir GTP molekülü elde eder, (4) GTP'ye bağlanarak, aktif sinyal-yayma konfigürasyonuna dönüşür, ve (5) kısa bir süre sonra kendi GTPaz fonksiyonunu kullanarak GTP'den ayrılır, böylece yeniden sinyal-yaymayan konfigürasyona geçer.¹¹²



Şekil 2.4. Aktif GTP-bağlı ve inaktif GDP-bağlı konformasyon arasında Ras döngüsü¹¹²

Büyüme faktörleri tarafından uyarılan büyüme faktörü reseptörleri, Ras'dan guanin nükleotidlerini uzaklaştırmak için guanin nükleotid değiştirme faktörlerini (GEF) aktive eden birtakım adaptör proteinleri toplar. Ardından Ras, GDP'den on kat daha yüksek konsantrasyonda bulunan GTP'ye bağlanarak aktive olur. GTP-bağlı durumda, Ras'ın iki switch bölgesi (switch I ve II) konformasyonlarını değiştirirler. Bu konformasyonel switch ile Ras, Raf-1 gibi Ras efektör proteinlere bağlanır ve bu proteinlerin aktive olmasını sağlar. EGF gibi bir ekstrinsik ligandın reseptörüne bağlanmasıyla, reseptör dimerleşir ve intrinsik reseptör tirozin kinaz aktive edilir. Bu reseptörün intrasellüler kısmındaki spesifik tirozin rezidüleri otofosforilasyonla fosforillenir. Fosforillenen tirozinler daha sonra SH 2- ve SH 3- içeren protein (Grb2) gibi adaptör proteinlerin "Src homoloji 2" (SH2) domainlerine bağlanır. Grb2 proteinleri SH2 domaini yanında SH3 domaini de içerirler ve SOS gibi diğer proteinlerin prolinden zengin motiflerine bağlanırlar. Ras için anahtar adaptör protein

olan Grb2 aktive olan EGF reseptörünü RAS için guanin nükleotid değişim faktörü (SOS)'a bağlar. Bu bağlanma ile SOS plazma membranında yakınlık kuracak şekilde kuvvetlenir. SOS'un Ras'a bağlanması, Ras'ın GTP'ye bağlanmasına izin veren ve aktif hale getiren, GDP'nin ayrılmasına neden olur ve Ras konformasyonunda değişikliğe neden olur. Sonuçta, Ras aktif hale gelmektedir.¹¹⁴

KRAS, GTP/GTPaz aktivitesiyle bağlı GDP ailesine ait bir protoonkogendir. KRAS proteini membrandan nükleusa mitojenik sinyal transdüksiyonuna katılmaktadır. Hücre içinde bir çok metabolik yolda görev yapan RAS proteini, esas olarak proliferasyon, diferansiyasyon, adhezyon, migrasyon ve apoptozda aktif rol oynayan MAPK yolağının ekstrasellüler sinyallerinin nükleusa iletiminde rol oynamaktadır. KRAS mutasyonları başlıca kolorektal kanser, akciğer kanseri ve lösemilerde gözlemlenmiştir.¹¹⁶

Tek bir amino asit yer değiştirmesi ile aktive olan KRAS mutasyonu GTPaz aktivitesinin düşmesine sebep olur.¹¹⁶

2.2.4.3. Ras Sinyal İletim Yolakları

Ras'ın aktif hali GTP ve GDP'ye bağlıdır ve GTP bağlı şekli Ras ailesinin sinyal iletim yolaklarını aktive etmesini sağlar. Bu yolaklardan birincisi Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolağıdır. Büyüme faktörleri, hormonlar ve tümör uyarıcı faktörler bu yolağı kullanır. Bu iletim yolağı Ras aktivasyonu ile başlayıp sırası ile Raf, MEK ve ERK proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler. En son ERK'nın fosforillenip aktif hale geçmesiyle transkripsiyon faktörleri fosforillenir ve aktif hale geçer. Transkripsiyon faktörlerin uyarılması ile hücre döngüsünün G1 fazı boyunca hücrenin gelişmesini sağlayan D tipi siklinler gibi hücre döngüsünün anahtar regülatör proteinleri eksprese edilmektedir.¹¹²

Ras'ın membrana translokasyonu ve konformasyonel değişimi sayesinde, Ras

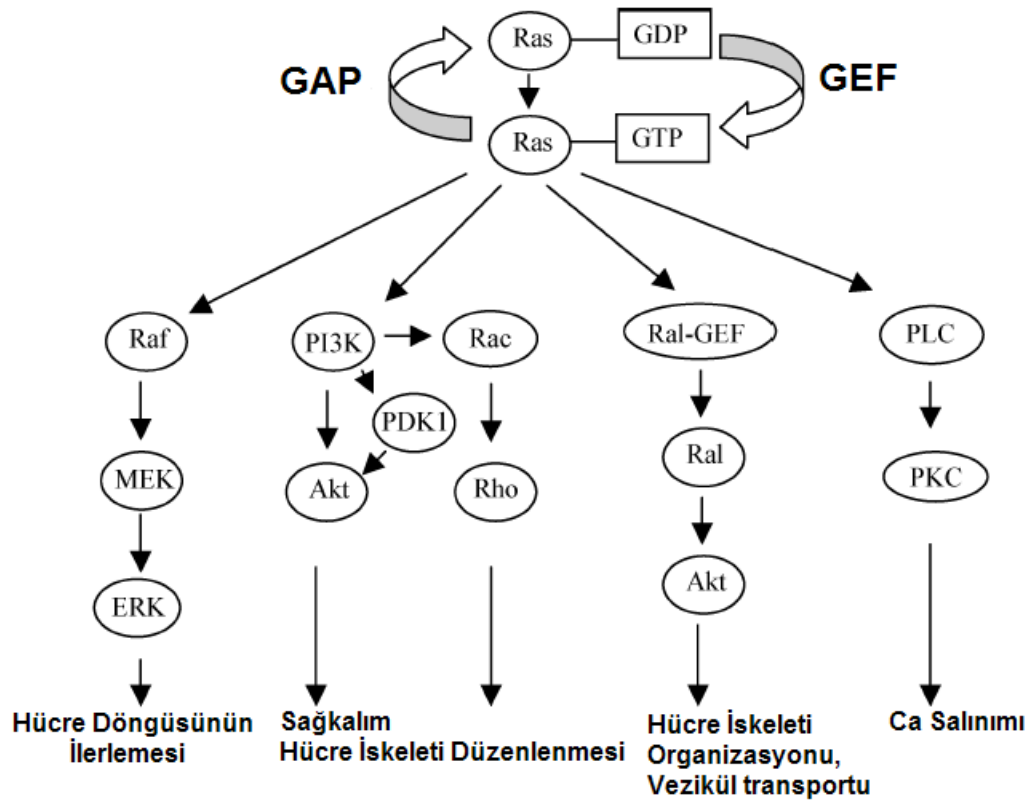
proteini doğrudan PI3K ile etkileşir ve PI3K fosforillenir. Böylece ileri sinyal iletim yolağındaki birçok enzim aktivitesini kontrol eder. Bu yolaktaki kinaz 3 fosfotidilinositid-bağımlı protein kinaz-1 (PDK-1) ve AKT kinazın aktivitesi de oldukça önemlidir. AKT değişik hedefleri fosforilleyerek güçlü apoptotik etkiye sahiptir ve Ras tarafından gerçekleştirilen sağkalım sinyalinin önemli bir parçasıdır.

Ras-GTP ayrıca, hücre morfolojisinde değişimlere neden olan yolda Rac ve Rho G proteinlerini aktive etmektedir. Rho proteini, membran büzülmesi gibi süreçleri etkileyen aktin hücre iskeletinin regülasyonunda, fokal adhezyon bölgelerinin ve filopodların oluşturulmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bunun yanında Rho proteini, transforme hücrelerin invaziv özelliklerini arttıran morfolojik değişikliklere de neden olabilmektedir. Böylece, Ras'ın sürekli aktivasyonu, yoğun aktin polimerizasyonuna ve artan sayıda fokal adhezyona neden olmaktadır.

Diğer bir taraftan Ras, Ras ilişkili proteini uyarak fosfolipaz D1 ve CDC42 aktive olur. Bu yolak da siklin bağımlı kinaz inhibitörü CDKİ veya p27'yi uyarak hücre döngüsünün durdurulmasında ve Fas-Fas ligandın ekspresyonuyla apoptozda rol oynar.

Aktif olan Ras doğrudan fosfolipaz C'ye bağlanarak kalsiyum salımına ve aktif olmayan protein kinaz C'nin aktifleşmesine sebep olur.

Son olarak Ras, farklı insan kanserlerinde mutasyonlar sonucu aktif olan veya overeksprese EGFR'nin alt yolağında yer alan önemli efektör bir moleküldür. Ras ve EGFR arasındaki diğer bir bağlantı ise Ras'ın alt yolağında yer alan hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazların (ERK) aktivasyonu ile tümör gelişimi için kritik olan transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α)'yı uyarır ve EGFR ligandında artışa neden olur.¹¹⁷



Şekil 2.5. Ras Efektör Yolakları¹¹⁷

2.2.5. KRAS

Kirsten Rat Sarkoma (Ki- veya K-Ras) viral onkogen homologu olan Kras geni Ras gen ailesinin bir üyesidir.¹¹⁴ Kras geni, 12. kromozomun 12p12.1 bölgesinde lokalizedir ve 6 ekzondan oluşmaktadır. Kras geninde meydana gelen alternatif splicing sonucu iki mRNA izoformu meydana gelmektedir (Kras4A ve Kras4B). Kras4B, embriyonik ve yetişkin dokularında her zaman eksprese olurken, Kras4A ekspresyonu kısıtlıdır ve yetişkin bireylerin kalp dokularında eksprese oldukları bildirilmiştir¹¹⁸. Küçük bir GTPaz olan Kras proteini, 189 amino asitten oluşmaktadır ve proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi birçok yolda yer alan Ras/Raf/MAPK sinyal iletiminde anahtar rol oynamaktadır.¹¹⁴

2.3. Cetuximab

2.3.1. Cetuximab'ın Genel Özellikleri

Cetuximab (IMC-C225, Erbitux ImClone Systems Inc., New York) kimerik, insan murin kökenli EGFR'nin ekstrasellüler kısmına bağlanan IgG1 monoklonal bir antikordur.¹¹⁹ Her bir çift zincir, sırasıyla 449 ve 214 amino asitten oluşan iki ağır ve iki hafif zincir olmak üzere toplam 152 kDa ağırlığında olup, birbirlerine kovalent ve nonkovalent bağlarla bağlanırlar. Cetuximab'ın EGFR'ye bağlanma afinitesi, EGF ve Transforming Growth Faktör- α (TGF- α) gibi endojen ligandlardan 10 kat daha yüksektir. Bu bağlanma ile birlikte reseptör tirozin kinaz ve bununla ilişkili olan MAPK, PI3K/Akt ve Jak/Stat yolağını inhibe eder.¹²⁰

2.3.2. Cetuximab Etki Mekanizması

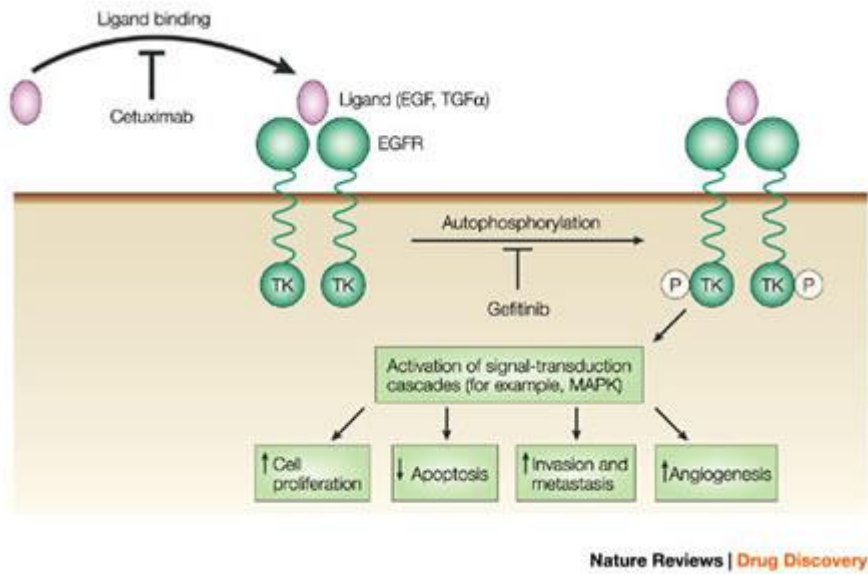
EGFR hücre içi, hücre dışı ve α -heliks transmembran bölümlerine sahip bir tirozin kinaz reseptörüdür. EGFR sinyali proliferasyon ve metastazı artırır. Diğer bir yandan apoptozu azaltır. EGFR'nin aktivitesi, ATP ile yarışan küçük bir ligandın bağlanması ya da reseptörün dış kısmına monoklonal antikorun direkt olarak bağlanması ile düşürülebilir.¹¹³

Anti-EGFR monoklonal antikorlar, ilgili reseptöre ligand bağlanmasını engelleyerek reseptör aktivitesini düşürür böylece bazı kanser hücre hatlarında apoptozu arttırabilir. Anti-EGFR tedavi ile DNA hasarı yapan sitostatiklerin kombinasyonunun, hücre siklusunun progresyonunu inhibe edip apoptozu arttırarak sinerjistik antitümöral etkiye sebep olduğu gösterilmiştir. Örneğin cetuximab ile irinotekan kombinasyonunun EGFR blokajında ve apoptozda önemli oranda artış gözlemlenmiştir.⁴

EGFR'ye yönelik terapiler tutarlılık göstermektedir fakat tümör tiplerine karşı klinik aktivitesinin düşük seviyeleri ve onların etkinliğini belirleyen faktörler tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca EGFR hedefli ajanların etkinliği hakkında, bu ajanların hücre

mekanizmasını aydınlatan cevap ve bu cevabın doğal ve kendiliğinden elde edilmiş dirençle ilgili olup olmadığı hakkında az şey bilinmektedir.¹²¹

Kolorektal kanserli olguların patoloji örneklerinde EGFR aşırı ekspresyonu değişik oranlarda olup, vakaların yaklaşık % 25–82' sinde saptanmaktadır.¹²² EGFR'nin ligand bağlayıcı bölgesine karşı bir immunglobulin G1 (IgG1) tipinde monoklonal antikor olan cetuximab, uyarıcı ligandların bağlanmasını engelleyerek reseptör aktivasyonunu baskılar. Cetuximab, aşağı yönde (downstream) sinyal oluşumunu bloke ederek hücre proliferasyonunu, anjiyogenezi ve metastazı baskımlarken, apoptozu artırır. IgG1 yapısında olması nedeniyle, aynı zamanda antikor-bağımlı hücrel sitotoksisteyi sağlayan immün efektör hücreleri devreye sokar.¹²³



Şekil 2.6. Cetuximab etki mekanizması.¹²⁴

Metastatik KRK'lerde primer ve metastatik odakla uyumlu olarak vakaların %40'ında aktifleyici KRAS mutasyonları saptanmaktadır. Bu KRAS mutasyonları EGFR hedefli ajanlara karşı dirençlilikle ilişkilidir.¹²⁵ Cetuximab'ın KRK tedavisinde yaygın olarak kullanılmasını sağlayan ilk klinik çalışma 2004 yılında Cunningham ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Yapmış oldukları çalışmada irinotekan'a dirençli hastalarda Cetuximab'ı hem tek başına hemde irinotekan+Cetuximab kombinasyonu ile

karşılaştırmış ve Cetuximab'ın sadece tek başına etkili değil aynı zamanda irinotekanla birlikte verildiğinde irinotekan direncini kısmen düşürebildiğini görmüşlerdir.¹²⁶ Mutasyonu bulunmayan hastalarda EGFR hedefli tedavilerin faydalı olacağına dair garanti yoktur ve bu hastalarda tedavi yanıt yaklaşık olarak %30'lardadır.¹²⁵ Böyle durumlarda BRAF, PIK3CA veya p53 gibi genlerdeki mutasyonları gözden geçirmek yararlı olabilir.¹²⁷



3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Örnekler

KRK hücre hattı (HT-29), -195°C’de 5. pasaj olarak Erzurum Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji bölümünden alındı.

3.1.2. Kimyasallar, Cihazlar ve Ekipmanlar

Çalışmada gerekli kimyasallar, kitler ve alındığı firmalar Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Çalışmada gerekli olan cihaz ve aletler bilgisi Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kimyasal ve kitler

Kimyasallar ve Kitler	Firma
Cetuximab	Sanofi-Aventis
Medyum	Bio-ANF-1
FBS	Sigma®
L-glutamin	Sigma®
Trypsin	Sigma®
PBS (Steril fosfat tamponu)	Sigma®
MTT	Roche
TUNEL	Roche
p21	Roche
p27	Roche
p57	Roche
KRAS	Roche
LC3A	Roche
BECN1	Roche
EGF	Roche
ATG4A	Roche
Transcriptor First Starand cDNA synthesis	Roche

Tablo 3.2. Cihazlar ve ekipmanlar

Cihaz/Alet	Firma
Etüv	Esco
Santrifüj	Beckman
Derin dondurucu (-80°C)	Sanyo
Işık mikroskobu	Leica
Real-Time PCR	Roche
Poly-L-lysine kaplı lamalar	Thermo
Mikroplak okuyucu spektrofotometre	BioTek
25 cm ² 'lik flask	Isolab
96 kuyucuklu mikroplak	Termo
Falkon tüp	Isolab
Pipetler (2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	Ependorf
DNA-RNA izolasyon cihazı	Roche
Petri kabı	Termo
Laminair Flow kabin	

3.2. Metot

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı

Hücre kültür besi yeri;

- 87 mL hücre kültür medyumunu
- 10 mL FBS
- 1 mL antibiyotik karışımı
- 2 mL L-Glutamin

karıştırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.1.2. Hücre Kültürü İnkübasyon Koşulları

Parental HT-29 monolayer hücre kültürü medyumunu içerisinde %5 CO₂ 37°C'e sıcaklıktaki etüvde 25 cm²'lik flasklarda steril şartlarda inkübe edilerek hücrelerin

çoğalması sağlandı.

3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Çoğalan hücreler flask zeminini %80-90 oranında sardığında hücreler pasajlandı.

Bu amaçla üremeye devam eden hücreler yeterli oranda çoğaldığı zaman;

- Üzerlerindeki medyum dikkatli bir şekilde pipet yardımı ile alındıktan sonra PBS ile yıkandı.
- Yıkama işleminden sonra PBS alındı ve zemine tutunan hücrelerizeminden kaldırmak için 3 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi ve etüvde 15 dk. süre ile bırakıldı.
- Flask hafif hafif çalkalandı ve içerik süspansiyon haline getirildi. Süspanse içerik 15 mL lik bir falkon tüp içine alındı. Süspanse karışım üstüne tripsin inkübasyonunda kullandığımız karışımın iki kat fazlası medyum ilave edildi.
- Süspansiyon 1300 rpm'de 9 dakika süre ile santrifüj edildi ve süpernatant kısmında mevcut olan tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı.
- Tüpün dip kısmında bulunan pellet halindeki hücrelerin üstüne taze hazırlanmış hücre kültür besi yerinden 3 mL eklendi ve süspanse hale getirilen hücreler 5 tane 25 cm²'lik flaslara ayrılarak tekrar pasajlandı.
- Tekrar pasaj yapılan hücreler 37°C'de %5'lik CO₂ şartlı etüvde inkübe edildi.

3.2.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

- Tripsin - EDTA çözeltisi yardımıyla yüzeye yapışık halde bulunan hücreler kaldırıldı ve santrifüj işlemi uygulandı.
- Hücrelerin üzerlerindeki solüsyon uzaklaştırılıp pellet şeklinde bulunan hücrelerin üzerlerine 1mL medyum eklendi. Daha sonra hücre sayımı yapıldı.
- Hücreler tripsin hacminin iki katı serum bulunan medyumla inkübasyona bırakıldı.

- Hücreler pipetaj yapılarak tek hücreli süspansiyon halde falkon tüpe aktarılıp üzerine 3 mL daha medyum eklendi.
- Süspanse halinde bulunan hücreler 10 dk süre ile 1300 rpm’de santrifüj işlemi yapıldı ve üst kısımda kalanlar uzaklaştırıldı.
- Dip kısımdaki pelet üstüne 0,9 mL medyum koyularak hücre sayımı yapıldı.
- Dondurma işlemi yapılacak olan tüplere 0,1 mL dimetil sülfoksit (DMSO) ve 0,9 mL medyum ile süspanse olan hücreler eklendi.
- Hazırlanmış olan tüpler saklama kabına yerleştirilerek -80°C sıcaklıktaki derin dondurucuya gerektiğinde tekrar kullanılmak için kaldırıldı.

3.2.1.5. Hücre Sayısı Hesaplanması

Kapaklı mikro hacimli ependorf tüplere 1 mL medyum ile sulandırılmış hücrelerden 0,1 mL, tripan blue boyasından 0,9 mL eklenip karışımı sağlandı. Neubauer lam üzerine elde edilen karışım konularak 5 bölmedeki hücre sayımları yapıldı. Çıkan sonuç, dilüsyon faktörü olan 50×10^3 ile çarpıldı. Elde edilen sonuçla 1 mL medyumda kaç milyon hücre bulunduğu gösterildi. Petri kaplarına ekim yapılırken hesaplanmış olduğumuz bu değerleri göz önünde bulundurarak her 100 mm^2 lik kültür petri kaplarına 5×10^6 ve 96 kuyucuklu kültür plağın her bir kuyusuna 5×10^3 hücre transferi sağlandı. Hücre ekimi yapılırken, hesaplanan bu değer dikkate alındı ve petri kabına ekimleri yapıldı.

3.2.2. Cetuximab Uygulanması

CTX uygulamasında 24 ve 48 saat süreli inkübasyonlar iki adet 96’lık plak hazırlandı. Plağın her bir kuyucuğuna 5000 hücre gelecek şekilde 200µL medyumlu hücre ekimi yapıldı. Aynı oranda hücre bulunan kuyucuklardan her birine sırasıyla 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL ve 25 µg/mL konsantrasyonlarda 10µL CTX eklendi ve inkübasyona bırakıldı.

3.2.3. Hücre Sitotoksosite Analizi

Hücre çoğalmasının saptanmasında tetrazolium tabanlı kolorimetrik bir yöntem olan MTT yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle teröpatik ajanlara maruz bırakılan hücreler MTT ile muamele edilince formazon kristallerini oluştururlar ve oluşan bu kristaller çözücü yardımıyla çözülerek spektrofotometrede absorbanları okunur.

CTX kullanımının HT-29 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi, MTT kit prospektüsünde bulunan talimata göre yapıldı. MTT uygulanması yapılmadan 24 saat önce 96'lık plağın her bir kuyusuna 5×10^3 hücre olacak biçimde 0,1 mL kültür medyumlu hücrelerin ekimi yapıldı. 96'lık plak 1 gün süre ile 37°C'lik ve %5'lik CO₂ ayarlı etüvde bırakılarak hücrelerin mikropalak yüzeyine yapışmaları sağlandı.

CTX uygulamasından ardından hücre hatları 24 ve 48 saat süreli inkübasyona bırakıldı, MTT yöntemi uygulandı. MTT analizi yapılmadan önce 96'lık plak da her bir kuyucukda var olan 100 µL medyum alındı.

MTT analizi;

1. 96'lık plağın her bir kuyusundaki 100 µL medyumlu hücre karışımı üstüne, MTT solüsyonundan 10 µL eklenerek plaklar 3 saat süre ile inkübatöre konuldu.
2. Üç saatlik inkübasyon sonunda plakların üzerine yapışan hücrelerin üzerinde bulunan medyum bir pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Uzaklaştırma işleminden sonra üzerlerine 100'er µL MTT çözücü solüsyon eklenerek 20 dk inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyonun ardından hücrelerin absorban değerleri 570 nm'de, spektrofotometrede ölçüldü.

Microsoft Excel programı yardımıyla uyguladığımız doza karşı % hücre sitotoksosite eğrisi çizildi ve hücrelerin %50'sinin öldüğü konsantrasyon (IC₅₀) değeri

hesaplandı.

3.2.4. TUNEL Boyama Metodu

3.2.4.1. Hücrelerin Lamda Çoğaltılması

- Poly-L-lizin'le kaplı halde olan lamalar, 100 mm çapı bulunan petrilere hücre ekimi yapılmaya başlanmadan koyularak class II tip biyogüvenlik kabin içinde 4 saat süre ile UV ışınla sterilizesi sağlandı.
- 25 cm²'lik flaskta çoğaltılmış hücreler, steril edilen petri içerisindeki lamaların üst yüzeylerine eşit sayıda (0,1 mL medyum içinde süspansiyon halde bulunan 5x10³) hücre olacak biçimde ekim yapıldı.
- Lamaların üzerlerine hücrelerin yapışması sonrası (yaklaşık olarak 24 saat sonra) CTX uygulaması gerçekleştirildi.
- Kontrol grubunda bulunan hücrelere de eşit miktarda kültür medyumunu ilave edildi.
- 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda petri içerisinde bulunana kültür medyumunu bir pipet vasıtasıyla alındı ve üzerine PBS ilave edilerek hücrelerin yıkanması sağlandı.

3.2.4.2. Fiksasyon

Lam üzerine yapışık şekildeki hücreler -20°C'de soğutma işlemi yapılmış metanolün içine 10 dk süre ile bırakılıp lamaların tespit işlemi yapıldı. Tespit işlemi yapılan lamalar PBS ile yıkandıktan sonra kurutularak, Boyama işlemi yapılana kadar kadar derin dondurucuda tutuldu.

3.2.4.3. TUNEL Boyama

TUNEL (Terminal Deoxytransferase Mediated Bio-dUTP Nick and Labeling) boyama işlemi hücrelerde meydana gelen apoptoz olayının saptanmasını sağlayan histokimyasal yöntemdir. DNA'da meydana gelen kırıkların insitu olarak saptanmasını

sağlar. Mevcut çalışmamızda, TUNEL boyama kiti kullanılarak boyama işlemi yapıldı.

- Boyama işlemi yapılacak lamalar derin dondurucudan çıkarılarak 25°C'ye gelmesi beklenildi (yaklaşık 30 dk) ve 100 µL PBS ile yıkama işlemi yapıldı.
- Lam üzerine 100 µL Proteinaz K damlatıldı ve 10 dakika süre ile nemlendirici kap içinde bırakıldı.
- Beş dakika aralıklarla üç defa 100 µL PBS ile yıkama işlemi yapıldı.
- Endojen peroksitlerin bloklama bilmesini sağlamak için yüzde üçlük hidrojen peroksit çözeltisinde on dakika süre ile nemlendirici kap içinde bırakıldı.
- Tekrar beş dakika aralıklarla üç defa 100 µL PBS ile yıkama işlemi yapıldı.
- 100 µL TUNEL solüsyonu eklendi ve 1 saat nemlendirici kab içinde 37°C'de bırakıldı.
- 5 dakika aralıklarla iki defa 100 µL PBS ile yıkama işlemi yapıldı.
- 100 µL Converter-POD solüsyonunda yarım saat nemlendirici kab içinde 37°C'de bırakıldı.
- 100 µL DAB kromojen de yedi dakika bekletildi.
- Ardından 5 dk'lık aralıklarla 3 defa 100 µL PBS yıkama işlemi yapılarak çekirdek boyama işlemi yapılmasında kullanılan Harris'in Hematoksilen çözeltisinde beş dakika bekletilip daha sonra dereceli alkol ve ksilol serilerinden geçirildi ve üzeri iki damla entellan ile örtüldü.

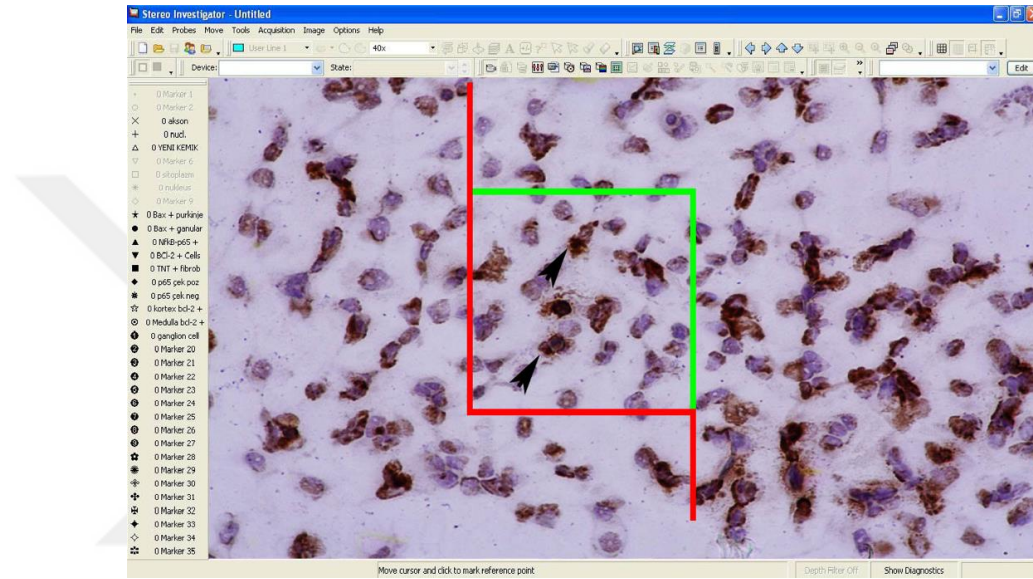
3.2.4.4. Apoptotik Hücre Değerlendirmesi

TUNEL boyaması sonuçlarına göre gruplar arasında karşılaştırmaların yapılmasında, “Stereolojik Optic Fractionator Frame” yöntemi ile yapılmıştır. Analizlerde stereoloji workstation sistemi (BioPrecision MAC 5000 controller system) ve stereoloji software (Stereo Investigator version 9.0, Microbrightfield, Rochester, VT) bulunan ışık mikroskobu kullanıldı. Mevcut çalışmada, HT-29 hücre preparatlarının

üzerindeki apoptotik hücrelere, “Unbiased Counting Frame and Fractionator” metodu kullanılarak her bir preparattaki TUNEL pozitif hücre yoğunluğu hesaplandı:

TUNEL pozitif hücre sayısının çerçevelerin alanına bölünmesi ile milimetre kareye düşen TUNEL pozitif hücre yoğunluğu hesaplandı.

Hesaplanan değerler her bir grup için 2 tekrarlı şekildedir ve her grup için paralel olarak 3 preparat boyandı.



Şekil 3.1. TUNEL analizinin ekran görüntüsü

3.2.5. Ters Trankriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) istenilen genlerin ya da DNA dizilerinin jenerasyonlara bağlı replikasyonu, hızlı bir şekilde gerçekleşir. Doğal hücre büyümesinde olduğu gibi, PCR replikasyon sürecini taklit ederek yaklaşık 30 jenerasyon sonra seçilmiş olan DNA dizisinin milyar katını kopyalar.

PCR'da çoğaltılacak bölgeyi çevreleyen dizilerin bilinmesi gerekmektedir. Bu dizilere komplementer sentetik oligonükleotidler, yüksek ısılarda yaşayan bir bakteri türünden izole edilen özel bir termostabil DNA polimerazın kullanıldığı bir dizi reaksiyonda primer olarak kullanılmaktadır.

Reaksiyonlar ilk önce DNA'nın yüksek ısılarda denatüre olması daha sonra az bir

ısıda oligonükleotidlerin bağlanıp uzamanın gerçekleştiği basamaklar döngüsünden oluşmaktadır. Her döngüde oligonükleotid ile bağlı dubleks DNA miktarı artar ve böylece tek bir hücrenin çekirdeğinden mikrogram oranlarında DNA izole edilebilir. Geleneksel klonlama sayesinde aylarca ya da haftalarca süren bu işlem PCR ile saatler içinde sonlanır.

RNA molekülü RNA ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi ile cDNA'ya çevrilerek polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılabilir. Böyle gerçekleşen senteze Ters Transkriptaz PCR (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) denmektedir.

3.2.5.1. RNA İzolasyonu

Hücre kültürü örneklerinden RNA izolasyonu için Roche MagNA Pure Compact RNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Kit içerisindeki deney protokolü kullanılmıştır.

1. Hücre kültürleri 3000 g'de 10 dk süre ile santrifüj edilerek üst kısımda bulunan hücre medyumunu uzaklaştırıldı.
2. Oluşan hücre peleti üzerine 100 µL PBS ilave edildi ve hücre süspansiyonu sağlandı.
3. Süspanse halde bulunan hücrelerin üzerine 100 µL lizis buffer eklendi.
4. Oluşan lizattan 200 µL numune tüpüne alındı.

Hazırlanmış olan numune tüpü ROCHE MagNA-Pure-Compact DNA - RNA izolasyon cihazına yüklendi. Ardından Roche MagNA RNA izolasyon kit ile RNA izolasyonu yapılarak 50 µl örnek elde edildi. İzole edilen RNA miktarı ve saflığı NanoDrop cihazında spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.2.5.2. Komplementer DNA Sentez Aşaması

Elde edilen mRNA'ların konsantrasyonu ölçüldü ve mRNA konsantrasyonuna göre cDNA yapım aşamasında tüm mRNA'ların 15 ng olacak şekilde sulandırıldı. Konsantrasyonu ayarlanan örneklerden 10 µL alınarak üzerine Transcriptor First Strand

cDNA Synthesis kitinden çıkan Random Primerden 2 µl, 1 µl distile su (her bir örnek için) 0.2 ml'lik PCR tüplerine konuldu. Daha sonra Reverse Transcriptor PCR cihazında 65°C'de 10 dk denatürasyon yapıldı. PCR'de bu işlem devam ederken denatüre olan RNA'ların üzerine cDNA'yı oluşturması için içerisine koyulan karışım hazırlandı.

3.2.5.3. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile p21, p27, p57, KRAS, LC3A, BECN1, EGF ve ATG4A Gen Ekspresyonlarının Ölçülmesi

Her bir örneğin cDNA'ları kullanılarak gen ekspresyonları (p21, p27, p57, KRAS, LC3A, BECN1, EGF, ATG4A) Roche LightCycler 480 Real-Time PCR cihazında saptandı. 96'lık plağa her bir örnek için yedi kuyu kullanılarak yükleme yapılmıştır. Her örnek için 5µL cDNA, 8µL deiyonize su, 5µL Probe Master karışımı, 2 µL primerler (p21, p27, p57, KRAS, LC3A, BECN1, EGF, ATG4A) konulmuştur. Standart olarak, konsantrasyonları 10 µM, 100 µM, 1000 µM ve 10000 µM G6PD standardı kullanılmıştır. Hazırlanan her bir karışım mikropiplardaki her bir kuyucuğa toplam hacim 20 µL olacak şekilde yüklendi ve Real time PCR'de program seçildi.

Denatürasyon : 10 dk, 95 °C

Amplifikasyon : $\left. \begin{array}{l} 10 \text{ sn, } 95^{\circ}\text{C} \\ 30 \text{ sn, } 60^{\circ}\text{C} \\ 60 \text{ sn, } 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right\} 45 \text{ döngü}$

Soğuma : 30 sn, 40 °C

Real Time PCR'da Absolute kuantifikasyonda analizi yapıldı. Standartlar G6PD baz alarak cihazın p21, p27, p57, KRAS, LC3A, BECN1, EGF ve ATG4A'ye verdiği sonuçlar kaydedildi.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistik analizler Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows

20.0 programında yapıldı. Çalışmanın MTT verilerinin değerlendirilmesi için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonrası Duncan Post hoc testi kullanıldı. Anlamlılık değeri (P) 0.05 olarak kabul edildi. p21, p27, p57, KRAS, LC3A, BECN1, EGF ve ATG4A hedef Gen/referans gen oranı alınarak normalize edildi.



4. BULGULAR

4.1. MTT Analizi Sonuçları

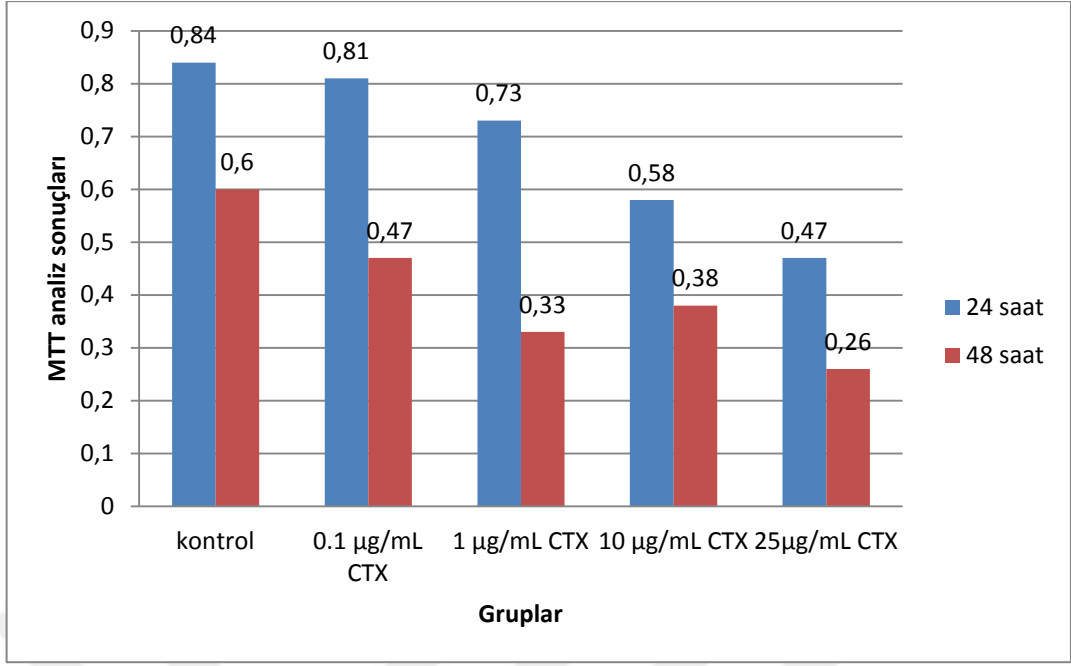
Kontrol ve CTX uygulanan grupların hücre canlılığı analizi sonuçlarında; 24 saat süreli inkübasyon gruplarında en yüksek hücre canlılığı oranının kontrol grubunda olduğu görülürken CTX uygulanan gruplarda hücre canlılığı miktarının doza bağımlı olarak azaldığı görüldü. İstatistiksel değerlendirme de ise Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10 µg/ml ve 25 µg/ml konsantrasyonlarda CTX uygulanan gruplarda anlamlı bir azalmanın olduğu belirlenmiştir. ($P<0.05$).

48 saat süreli inkübasyon gruplarının hücre canlılığı (MTT) analizinde ise benzer olarak kontrol grubunda en yüksek değer bulunurken, bu değer CTX konsantrasyonundaki artışla beraber azaldığı görüldü. Tüm gruplara ait istatistiksel analiz ve MTT sonuçları Tablo 4.1 ile Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de görülmektedir.

Tablo 4.1. Bütün gruplara ait MTT analiz sonuçları

Gruplar	24saat	48saat
Kontrol	0,865±0,21 ^a	0,601±0,28 ^a
0,1 µg/ml CTX	0,809±0,25 ^a	0,475±0,12 ^a
1 µg/ml CTX	0,734±0,21 ^a	0,333±0,08 ^b
10 µg/ml CTX	0,580±0,19 ^b	0,380±0,17 ^b
25 µg/ml CTX	0,477±0,16 ^b	0,260±0,08 ^b

Harflendirmeler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.
Tüm veriler ortalama ± standart deviation (SD) olarak ifade edilmiştir.
İstatistiksel değerlendirme Tek yönlü varyans analizi Duncan Testi ile yapılmıştır.
İstatistiksel önem $P<0.05$ olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.1. Kolorektal Kanser hücre hattı (HT29); cetuximab uygulamaları sonrası 24 ve 48 saat inkübasyonlu hücre hatları sitotoksosite (MTT) analizi sonuçları.

4.2. TUNEL Boyama Analizi sonuçları

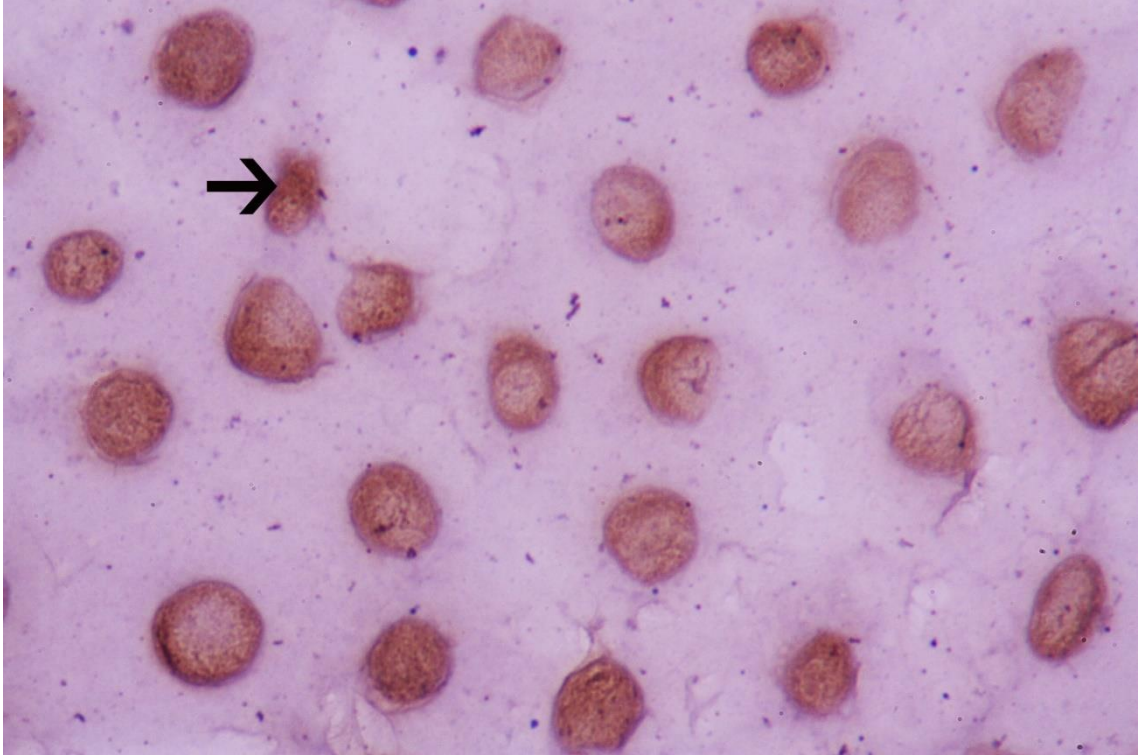
Stereolojik tünel pozitif hücre yoğunluklarının hesaplanmasında 24 saatlik inkübasyona bırakılan gruplarda en düşük tünel pozitif hücre yoğunluğunun kontrol grubunda olduğu görülürken, bu değerin artan miktarlarda CTX uygulanan gruplarda anlamlı oranda arttığı belirlenmiştir ($P<0.05$). Özellikle 25 µg/ml CTX uygulanan grupta tünel pozitif hücre yoğunluğunun önemli oranda arttığı tespit edilmiştir.

48 saat süreyle CTX uygulanan gruplarda ise yine en düşük değerin kontrol grubunda olduğu ve dereceli olarak CTX uygulamasının yapıldığı gruplarda bu değerin önemli oranda arttığı görüldü ($P<0.05$). Tüm kontrol ve CTX uygulama gruplarına ait tünel pozitif hücre yoğunluğu ve istatistiksel analizi Tablo 4.2’de verilmiştir.

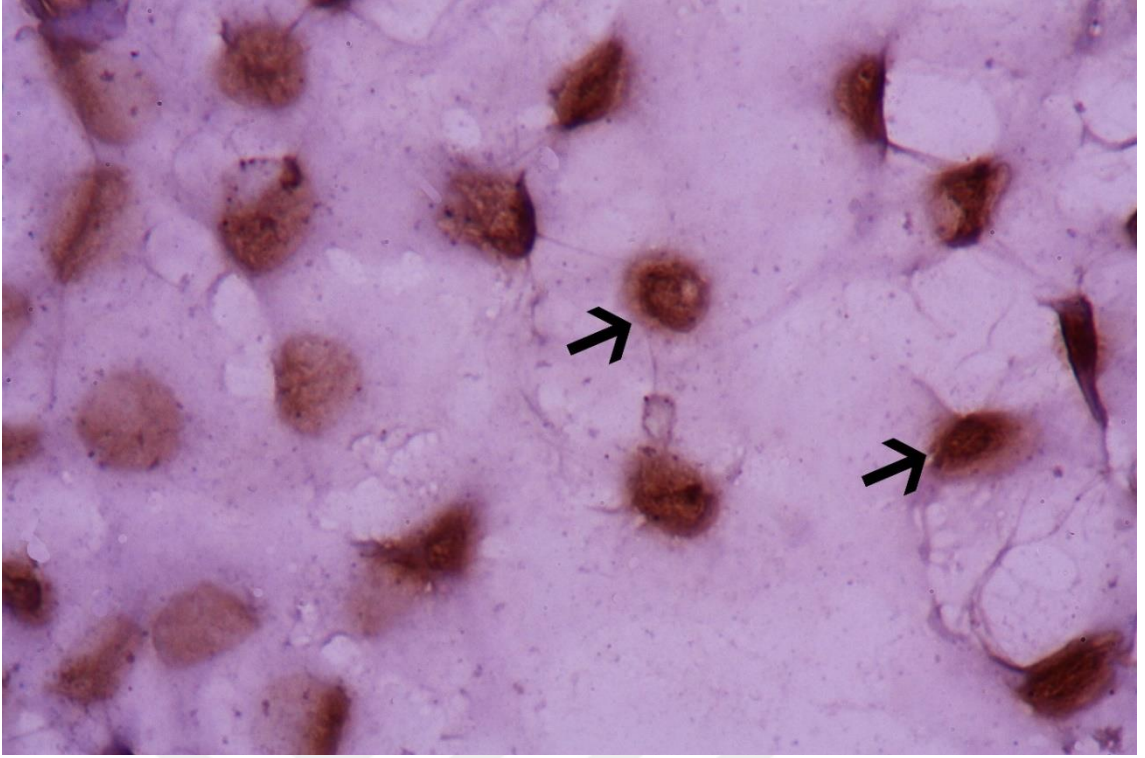
Tablo 4.2. Bütün gruplar için 24 ve 48 saatlik inkübasyonda CTX uygulamasından sonra $1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ alana düşen TUNEL sonuçları

Gruplar	24s	48s
Knt	$1,14 \pm 0,32^a$	$1,15 \pm 0,42^a$
0,1 $\mu\text{g/ml}$ Grubu	$2,32 \pm 0,34^b$	$2,91 \pm 0,32^b$
1 $\mu\text{g/ml}$ Grubu	$2,52 \pm 0,45^b$	$2,99 \pm 0,25^b$
10 $\mu\text{g/ml}$ Grubu	$3,16 \pm 0,24^c$	$3,44 \pm 0,29^c$
25 $\mu\text{g/ml}$ Grubu	$3,46 \pm 0,27^c$	$3,61 \pm 0,34^c$

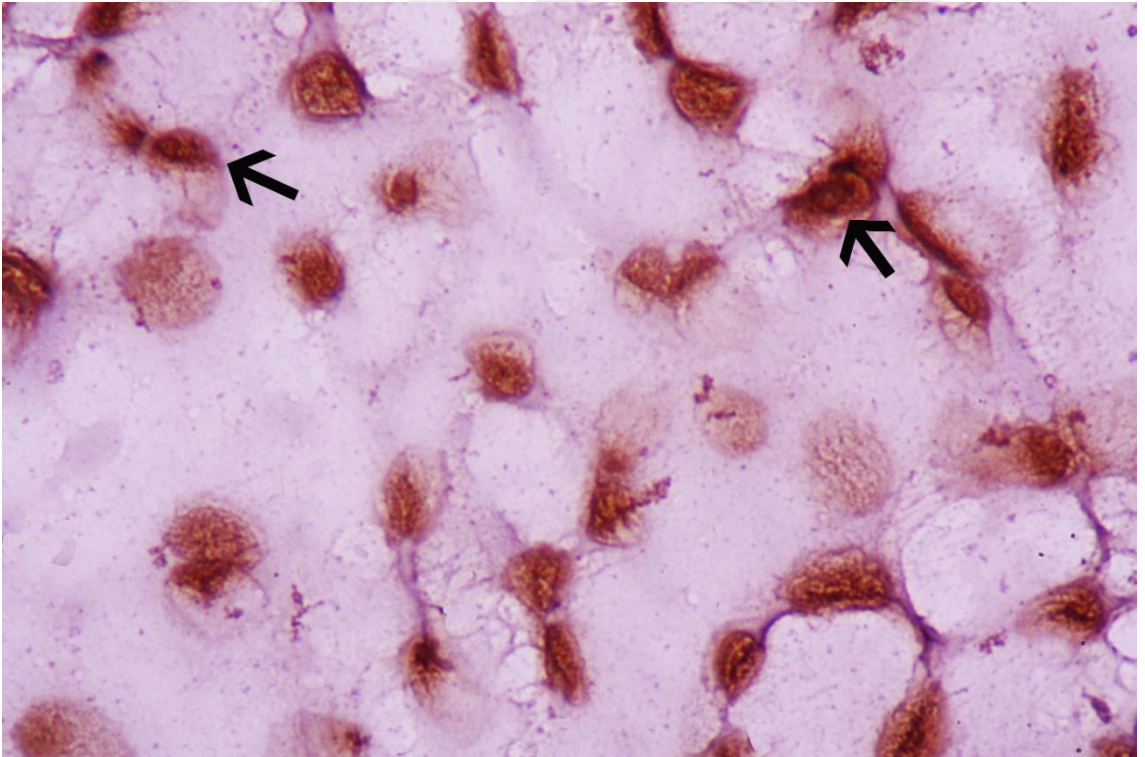
Harflendirmeler (a,b,c) aynı sütundaki gruplar arası istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$)



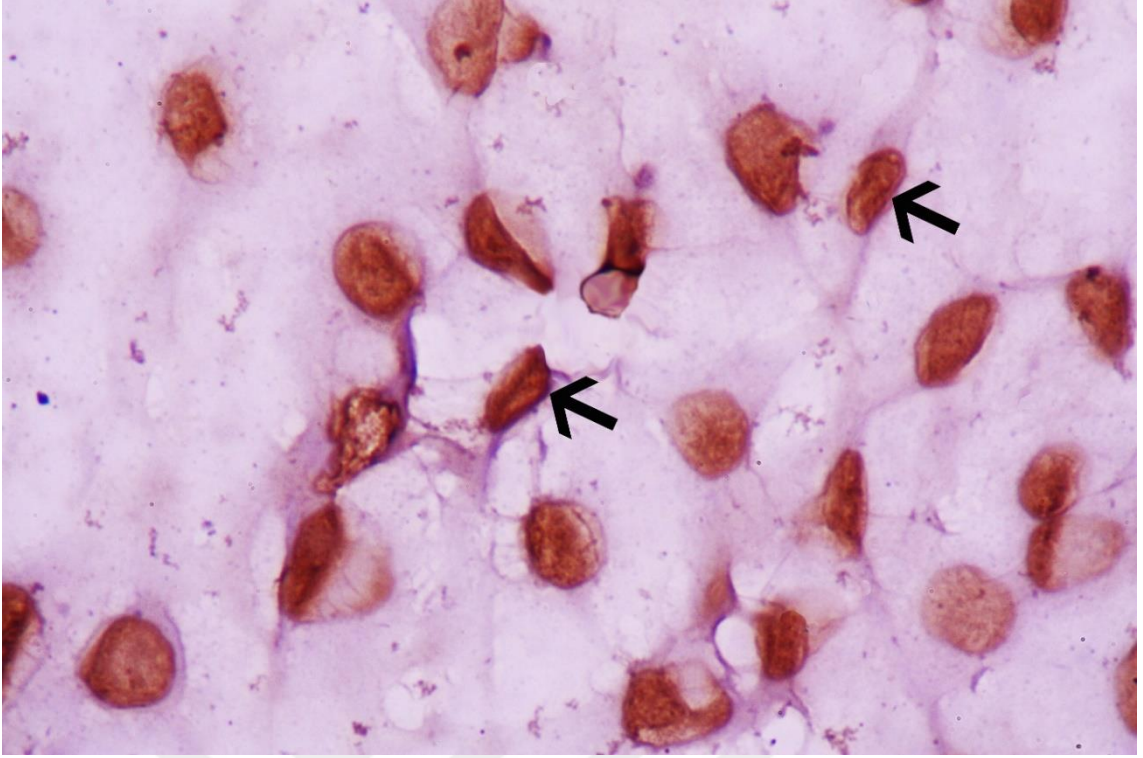
Şekil 4.2. Kontrol grubu 24 saatlik inkübasyon grubuna ait TUNEL analiz sonucu



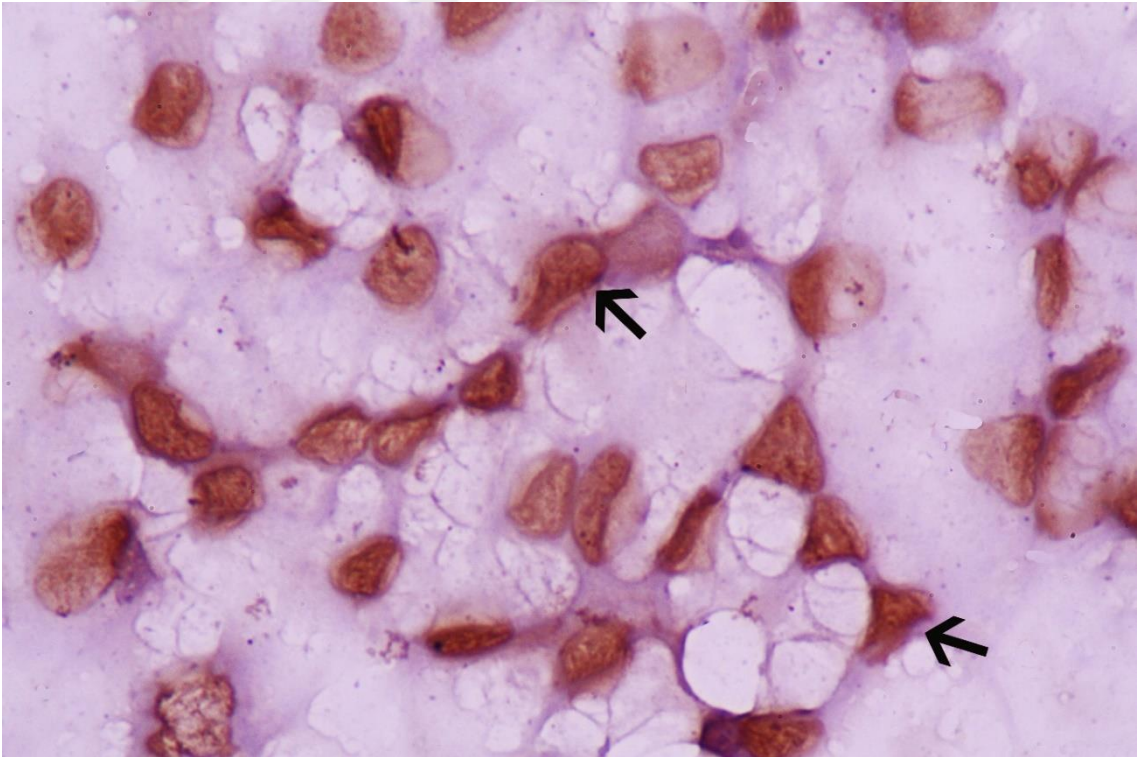
Şekil 4.3. 24 saatlik inkübasyon 0,1 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL analiz sonucu



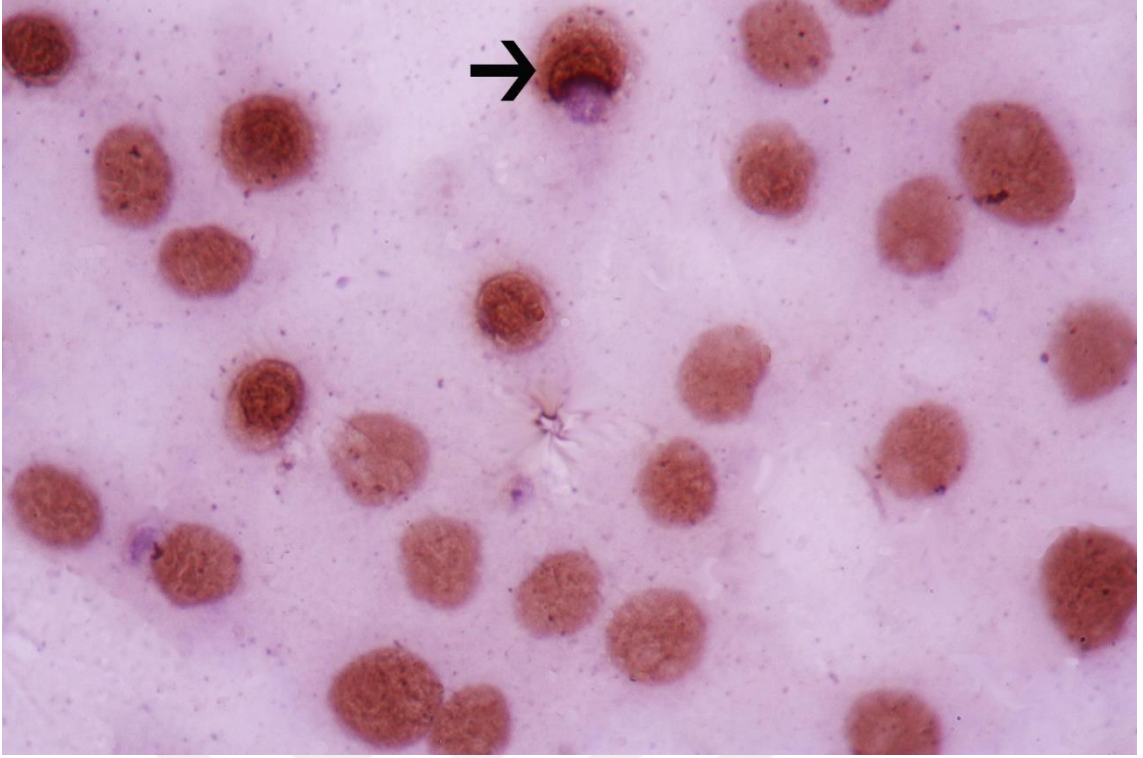
Şekil 4.4. 24 saatlik inkübasyon 1 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL analiz sonucu



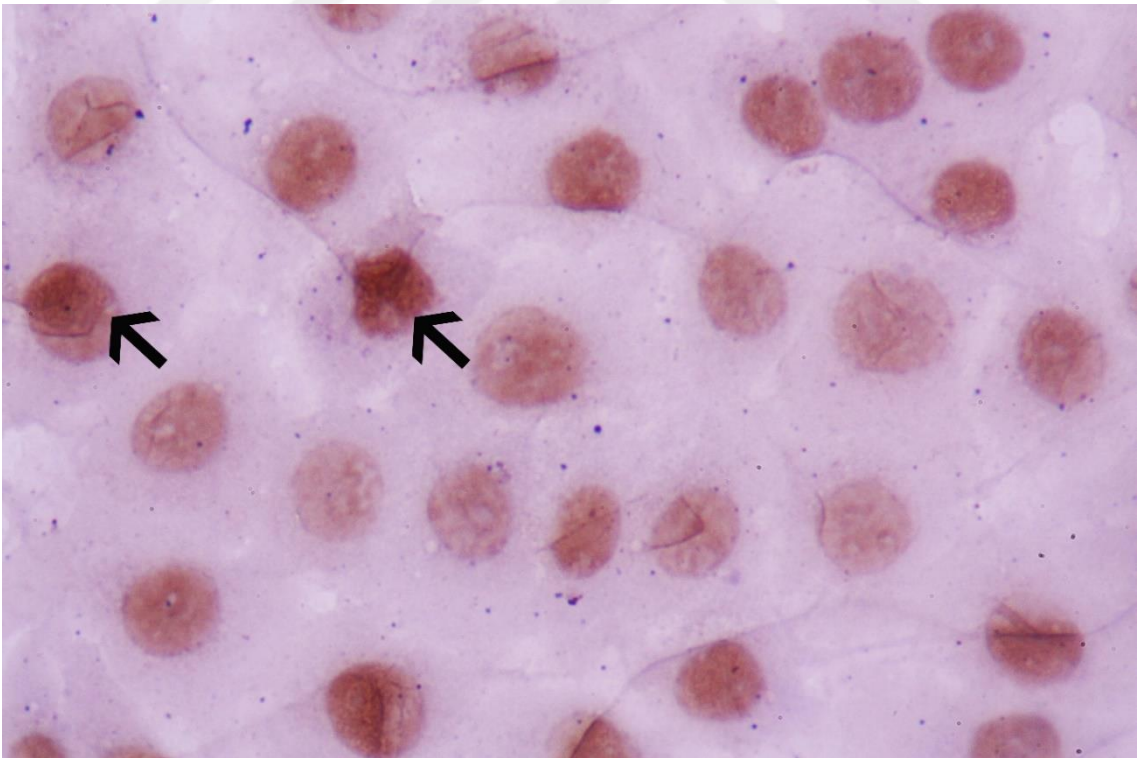
Şekil 4.5. 24 saatlik inkübasyon 10 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL analiz sonucu



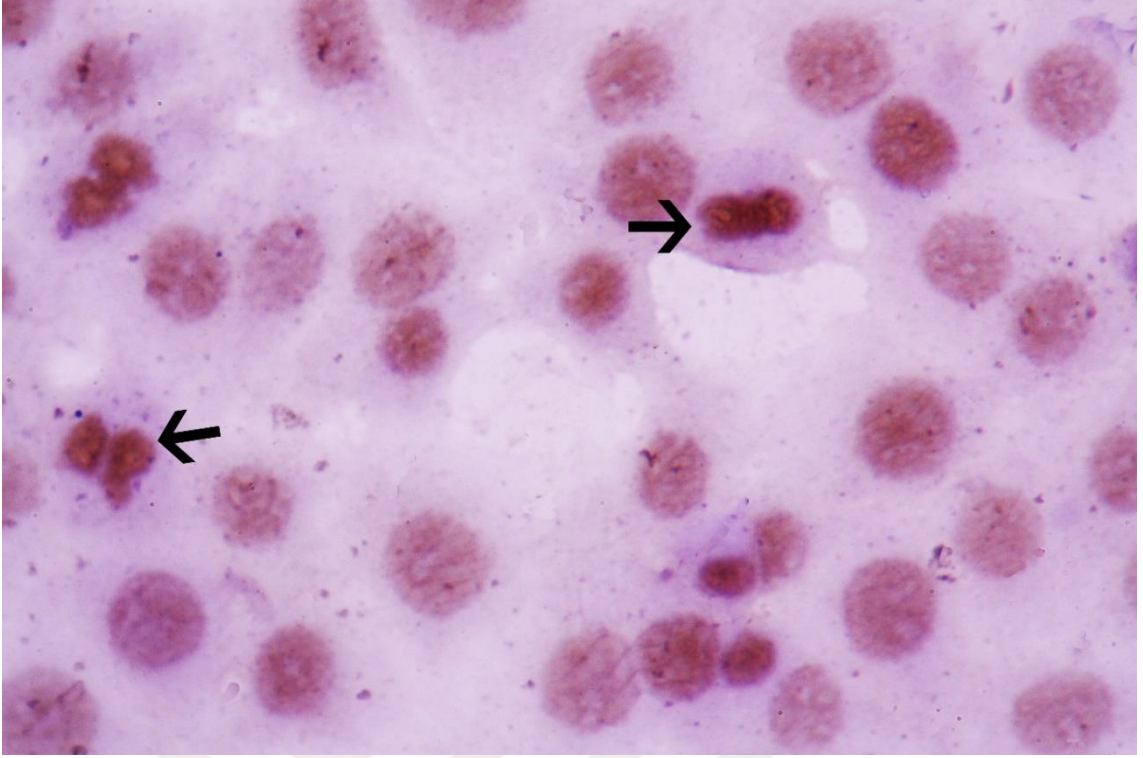
Şekil 4.6. 24 saatlik inkübasyon 25 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL analiz sonucu



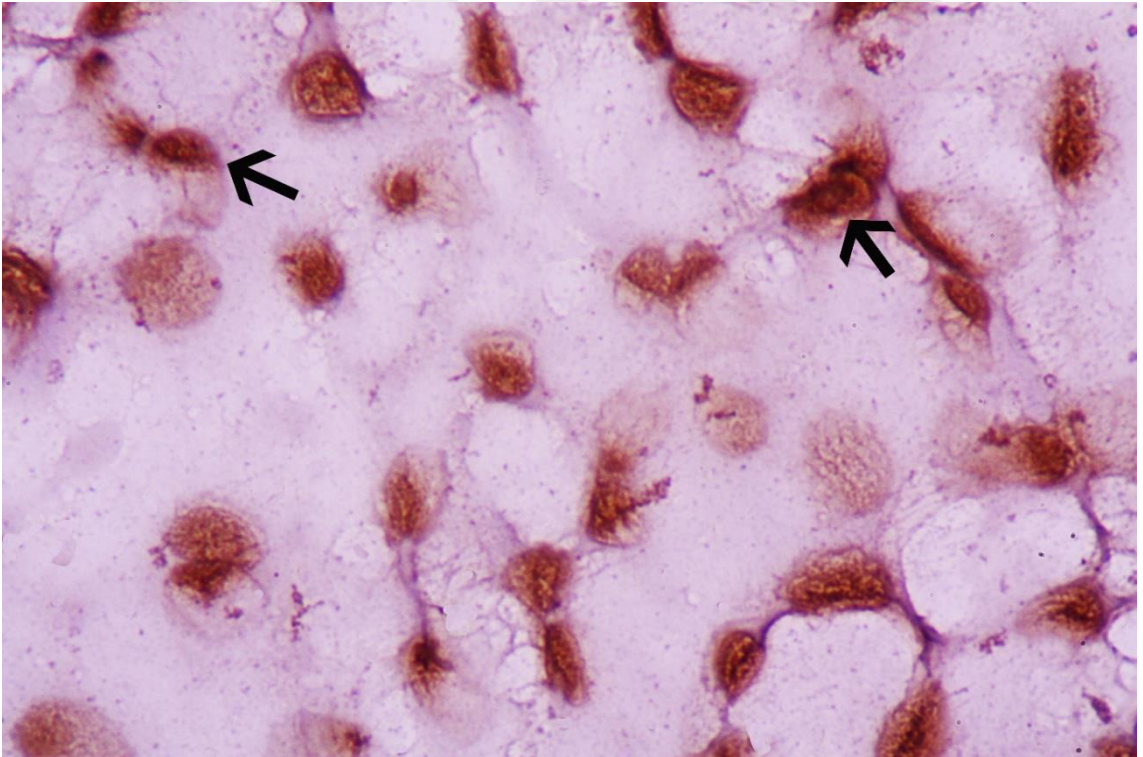
Şekil 4.7. Kontrol grubu 48 saatlik inkübasyon grubuna ait TUNEL analiz sonucu



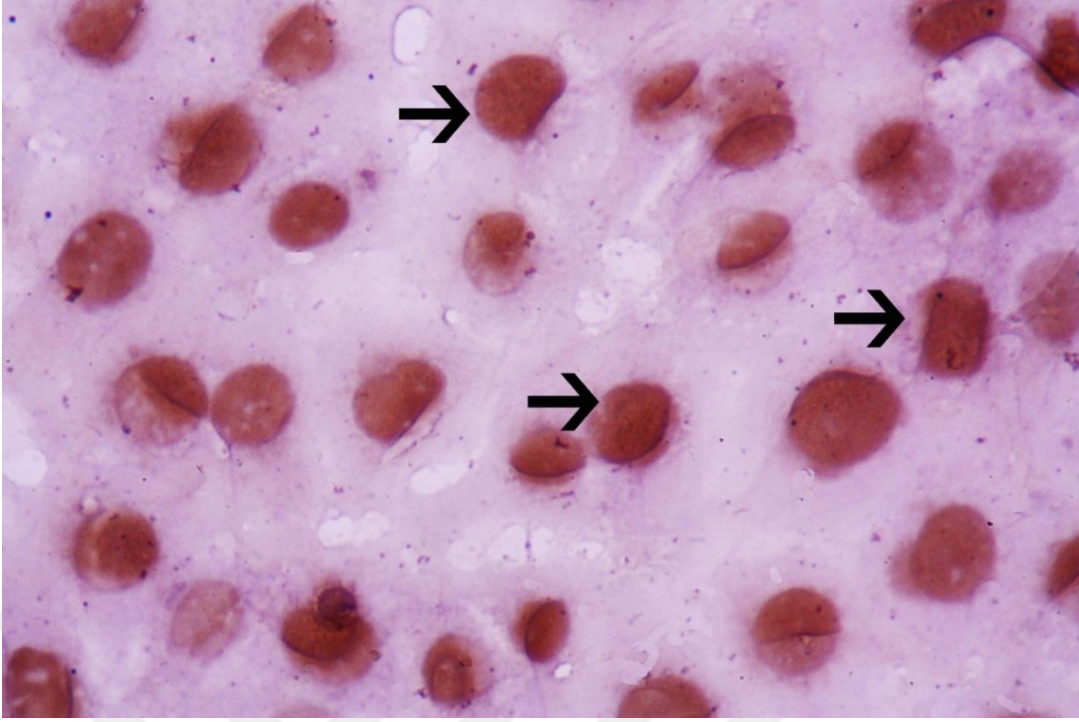
Şekil 4.8. 48 saatlik inkübasyon 0,1 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL analiz sonucu



Şekil 4.9. 48 saatlik inkübasyon 1 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL analiz sonucu



Şekil 4.10. 48 saatlik inkübasyon 10 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba TUNEL analiz sonucu



Şekil 4.11. 48 saatlik inkübasyon 25 µg/ml grubu CTX uygulanan gruba ait TUNEL analiz sonucu

4.3. RT-PCR Analiz Sonuçları

Aynı şartlarda bütün gruplara belirli konsantrasyonlarda CTX uygulamasından sonra 24 saat süreli inkübasyonu ardından Real Time-PCR analiz sonuçlarına göre kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). En fazla p21 ekspresyonu, 1 µg/mL uygulanan grupta gözlenmiştir. 48 saatlik inkübasyonlar sonucu ise en yüksek ekspresyon 10 µg/mL CTX uygulanan grupta gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre 10µg/mL ve 25µg/mL CTX uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). 24 ve 48 saat süreli inkübasyonların sonucu ise Kontrol ve CTX uygulanan gruplara ait p21 gen ekspresyonları Tablo 4.3’de gösterilmektedir.

Tablo 4.3. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli p21 gen ekspresyon düzeyleri

Gruplar	p21/G6PD	
	24saat	48saat
Kontrol	0,010±0,0041	0,017±0,0051
0,1µg/mL CTX	0,023±0,0052*	0,019±0,0015
1 µg/mL CTX	0,031±0,0032*	0,021±0,0010
10 µg/mL CTX	0,023±0,0021*	0,033±0,0031*
25 µg/mL CTX	0,022±0,0029*	0,027±0,0006*

"*" Aynı sütündeki grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasının istatistiksel anlamlılığını göstermektedir (p<0,05).

24 saatlik inkübasyonda 0,1 µg/mL CTX uygulanan grupta p27 ekspresyonu kontrol grubuna göre çok az bir azalış gösterirken, diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0,05). 48 saatlikte ise kontrol grubuna göre en yüksek artışı 1 µg/mL CTX uygulanan grupta olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı artış gözlemlenmiştir (p<0,05). 24 ve 48 saat süreli inkübasyonlar sonucunda Kontrol ve CTX uygulanan gruplara ait p27 gen ekspresyonları Tablo 4.4’de gösterilmektedir.

Tablo 4.4. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli p27 gen ekspresyon düzeyleri

Gruplar	p27/G6PD	
	24saat	48saat
Kontrol	0,22±0,336	0,251±0,002
0,1µg/mL CTX	0,23±0,160	0,270±0,004*
1 µg/mL CTX	0,27±0,007*	0,295±0,003*
10 µg/mL CTX	0,28±0,006*	0,270±0,004*
25 µg/mL CTX	0,27±0,007*	0,261±0,002*

"*" Aynı sütündeki grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasının istatistiksel anlamlılığını göstermektedir (p<0,05).

24 ve 48 saatlik CTX uygulaması sonucu kontrol grubuna göre tüm gruplardaki p57 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0,05). 24

saatlik CTX uygulamalarında en yüksek artışın 1 µg/mL CTX grubunda, 48 saatlikte ise 0,1 – 25 µg/mL CTX gruplarında olduğu görülmüştür. 48 saatlik grupta kontrol grubuna göre tüm CTX uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). 24 ve 48 saat süreli inkübasyon sonucu Kontrol ve CTX uygulanan gruplara ait p57 gen ekspresyonları Tablo 4.5'te gösterilmektedir.

Tablo 4.5. Bütün gruplardaki 24 ve 48 saatte p57 gen ekspresyon düzeyleri

Gruplar	p57/G6PD	
	24saat	48saat
Kontrol	0,0210±0,0004	0,0299±0,0005
0,1µg/mL CTX	0,0279±0,0005*	0,0520±0,0002*
1 µg/mL CTX	0,0321±0,0003*	0,0330±0,0004*
10 µg/mL CTX	0,0290±0,0004*	0,0410±0,0007*
25 µg/mL CTX	0,0270±0,0073*	0,0520±0,0008*

"*" Aynı sütündeki grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasının istatistiksel anlamlılığını göstermektedir ($p<0,05$).

24 saatlik CTX uygulaması sonrası KRAS gen ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre tüm gruplar da istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiş olup en yüksek artış 10 µg/mL CTX uygulanan grupta gözlenmiştir ($p<0,05$). 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise kontrol grubuna göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). En yüksek azalma 10 µg/mL CTX uygulanan grupta görülmüştür. 24 ve 48 saat süreli inkübasyonlar sonucunda Kontrol ve CTX uygulanan gruplara ait KRAS gen ekspresyonları Tablo 4.6'da gösterilmektedir.

Tablo 4.6. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli KRAS gen ekspresyon düzeyleri

Gruplar	KRAS/ G6PD	
	24saat	48saat
Kontrol	$0,21.10^{-3} \pm 0,17.10^{-3}$	$2,01.10^{-3} \pm 0,10.10^{-3}$
0,1µg/mL CTX	$0,85.10^{-3} \pm 0,57.10^{-3*}$	$1,61.10^{-3} \pm 0,88.10^{-3*}$
1 µg/mL CTX	$1,10.10^{-3} \pm 0,58.10^{-3*}$	$0,68.10^{-3} \pm 0,09.10^{-3*}$
10 µg/mL CTX	$1,43.10^{-3} \pm 1,34.10^{-3*}$	$1,26.10^{-3} \pm 0,08.10^{-3}$
25 µg/mL CTX	$1,10.10^{-3} \pm 0,41.10^{-3*}$	$0,40.10^{-3} \pm 0,21.10^{-3*}$

"" Aynı sütündaki grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasının istatistiksel anlamlılığını göstermektedir ($p < 0,05$).

24 saat süreli inkübasyonda LC3A gen ekspresyonları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). En fazla artış 10µg/mL CTX uygulanan grupta olmuştur. 48 saat süreli inkübasyonlarda ise kontrol grubuna göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olup, en yüksek artış 10µg/mL- 25µg/mL CTX uygulanan gruplarda görülmüştür ($p < 0,05$). 24 ve 48 saat süreli inkübasyon sonucunda Kontrol ve CTX uygulanan gruplara ait LC3A gen ekspresyonları Tablo 4.7' de gösterilmektedir.

Tablo 4.7. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli LC3A gen ekspresyon düzeyleri

Gruplar	LC3A/G6PD	
	24saat	48saat
Kontrol	$0,044 \pm 0,006$	$0,047 \pm 0,001$
0,1µg/mL CTX	$0,082 \pm 0,001^*$	$0,091 \pm 0,005^*$
1 µg/mL CTX	$0,106 \pm 0,003^*$	$0,067 \pm 0,007^*$
10 µg/mL CTX	$0,116 \pm 0,006^*$	$0,105 \pm 0,008^*$
25 µg/mL CTX	$0,067 \pm 0,004^*$	$0,104 \pm 0,004^*$

"" Aynı sütündaki grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasının istatistiksel anlamlılığını göstermektedir ($p < 0,05$).

24 saat süreli inkübasyonda ATG4A gen ekspresyonları karşılaştırıldığı zaman kontrol grubuna göre diğer bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken, en yüksek ekspresyon 1µg/mL ve 10µg/mL CTX uygulanan gruplarda

görülmüştür ($p<0,05$). 48 saat süreli inkübasyonda ise kontrol grubuna göre en fazla artış 25 $\mu\text{g/mL}$ CTX uygulanan grupta gözlenirken, en düşük ekspresyon 1 $\mu\text{g/mL}$ CTX grubunda belirlenmiştir. 24 ve 48 saat süreli inkübasyon sonucunda Kontrol ve CTX uygulanan gruplara ait ATG4A gen ekspresyonları Tablo 4.8’de gösterilmektedir.

Tablo 4.8. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli ATG4A gen ekspresyon düzeyleri

Gruplar	ATG4A/G6PD	
	24saat	48saat
Kontrol	0,0145 $\pm$ 0,0026	0,0230 $\pm$ 0,0008
0,1$\mu\text{g/mL}$ CTX	0,0330 $\pm$ 0,0011*	0,0570 $\pm$ 0,0007*
1 $\mu\text{g/mL}$ CTX	0,0420 $\pm$ 0,0007*	0,0500 $\pm$ 0,0002*
10 $\mu\text{g/mL}$ CTX	0,0420 $\pm$ 0,0006*	0,0660 $\pm$ 0,0003*
25 $\mu\text{g/mL}$ CTX	0,0400 $\pm$ 0,0007*	0,0720 $\pm$ 0,0011*

"*" Aynı sütündeki grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasının istatistiksel anlamlılığını göstermektedir ($p<0,05$).

24 saat süreli inkübasyonda EGF gen ekspresyonları karşılaştırıldığı zaman kontrol grubuna göre diğer bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$). En yüksek artış ise 10 $\mu\text{g/mL}$ CTX uygulanan grupta olduğu tespit edilmiştir. 48 saatlik inkübasyonlarda ise Kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı bir azalış gözlenirken ($p<0,05$), en çok azalış 0,1 $\mu\text{g/mL}$ CTX uygulanan grupta saptanmıştır. 24 ve 48 saat süreli inkübasyon sonucunda Kontrol ve CTX uygulanan gruplara ait EGF gen ekspresyonları Tablo 4.9’da gösterilmektedir.

Tablo 4.9. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli EGF gen ekspresyon düzeyleri

Gruplar	EGF/G6PD	
	24saat	48saat
Kontrol	1,8.10 ⁻³ $\pm$ 0,8.10 ⁻³	8,35.10 ⁻³ $\pm$ 0,63.10 ⁻³
0,1$\mu\text{g/mL}$ CTX	3,32. 10 ⁻³ $\pm$ 0,7.10 ⁻³ *	6,43. 10 ⁻³ $\pm$ 0,49.10 ⁻³ *
1 $\mu\text{g/mL}$ CTX	3,97. 10 ⁻³ $\pm$ 0,6.10 ⁻³ *	6,52. 10 ⁻³ $\pm$ 0,35.10 ⁻³ *
10 $\mu\text{g/mL}$ CTX	4,74. 10 ⁻³ $\pm$ 0,5.10 ⁻³ *	8,34. 10 ⁻³ $\pm$ 0,64.10 ⁻³
25 $\mu\text{g/mL}$ CTX	3,36. 10 ⁻³ $\pm$ 0,6.10 ⁻³ *	7,16. 10 ⁻³ $\pm$ 0,71.10 ⁻³ *

"*" Aynı sütündeki grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasının istatistiksel anlamlılığını göstermektedir ($p<0,05$).

24 saat süreli inkübasyonda BECN1 gen ekspresyonları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre diğer bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken, en yüksek ekspresyon 10 µg/mL CTX uygulanan grupta görülmüştür. 48 saat süreli inkübasyon için ise Kontrol grubuna göre 0,1 µg/mL ve 1 µg/mL CTX uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. En düşük ekspresyon 1 µg/mL CTX grubunda belirlenmiştir. 24 ve 48 saat süreli inkübasyon sonucunda Kontrol ve CTX uygulan gruplara ait BECN1 gen ekspresyonları Tablo 4.10'da gösterilmektedir.

Tablo 4.10. Bütün gruplara ait 24 ve 48 saat süreli BECN1 gen ekspresyon düzeyleri

Gruplar	BECN1/G6PD	
	24saat	48saat
Kontrol	0,110±0,005	0,160±0,008
0,1µg/mL CTX	0,140±0,002*	0,140±0,008*
1 µg/mL CTX	0,141±0,006*	0,120±0,007*
10 µg/mL CTX	0,150±0,005*	0,150±0,008
25 µg/mL CTX	0,131±0,003*	0,160±0,004

"*" Aynı sütündeki grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasının istatistiksel anlamlılığını göstermektedir (p<0,05).

5. TARTIŞMA

Kanser türleri arasında üçüncü sırada ve mortalite yönünden ise akciğer kanserlerinden sonra ikinci sırada yer alan kolorektal kanser 100.000 kadında 37.5 insidans ile ve 14.1 mortalite oranıyla seyrederken, erkeklerde bu oran 100.000’de 52.2 insidans ve 20.5 mortalite oranı ile görülmektedir.¹²⁸ KKK tedavisinde kemoterapi süresince, hastaların tedaviye cevap vermemesi veya tedavi sonrası kanserin tekrarlanması söz konusudur. KKK’da sağkalımı sağlayan en önemli faktör kanserin evresi olup, ilk saptamada ileri evre olan hasta oranı fazladır. Ancak hangi hastaların hangi tedaviye daha iyi cevap vereceğini belirlemek önem arz etmektedir. Epidermal büyüme faktörüne karşı geliştirilmiş monoklonal antikor olan CTX’ın kullanımıyla tedaviye cevabın nasıl olacağı daha da açıklık kazanacaktır. Kanser hücresi apoptotik yollarında bulunan, tümör mikro çevresinde rol alan, büyüme faktörlerini ve reseptörlerini kodlayan ve hücre siklusunda rol olan bazı genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin kemoterapik ajanlarla sağlanabildiği bilinmektedir.

EGFR’ye yönelik terapiler tutarlılık göstermekle beraber, tümör tiplerine karşı klinik aktivitesinin düşük seviyeleri ve onların etkinliğini belirleyen faktörler tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca EGFR hedefli ajanların etkinliği hakkında, bu ajanların hücredeki etki mekanizmasını aydınlatan cevap ve bu cevabın doğal ve kendiliğinden elde edilmiş dirençle ilgili olup olmadığı hakkında az şey bilinmektedir.¹²¹ CTX’in KKK tedavisinde yaygın kullanılmaya başlanmasını sağlayan ilk klinik çalışma Bond tarafından yapılmıştır ve Cunningham ve ark. tarafından 2004 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmada Irinotekan’a dirençli hastalarda CTX monoterapisi ve irinotekan+CTX kombinasyonu karşılaştırılmış ve CTX’ın hem tek başına etkili olduğu hem de irinotekanla birlikte verildiğinde irinotekan direncini kısmen azalttığı görülmüştür.¹²⁶

Mevcut çalışmada *in vitro* şartlarda, insan KKK hücre hattında (HT-29) CTX

uygulamalarının hücre sitotoksitesi, apoptotik hücre ölümü ve otofaji ile ilgili gen bölgelerinin ekspresyon düzeyleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla KRK hücrelerine sırasıyla 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL ve 25 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda CTX uygulandı. 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilen hücre hatlarında TUNEL yöntemi ile apoptotik hücre yoğunluğu belirlenirken p21, p27, p57, KRAS, LC3A, BECN1, EGF ve ATG4A gen ekspresyon düzeyleri kantitatif real-time PCR yöntemiyle analiz edildi.

Yapmış olduğumuz çalışmada, CTX'in doza ve zamana bağlı sitotoksik etkisi araştırıldı. CTX uygulamasında HT-29 hücre hattındaki MTT analizinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonucu doza bağımlı sitotoksik etki görüldü. İstatistiksel değerlendirme de ise 24 saatlik inkübasyon da Kontrol grubu ile 10 µM ve 25 µM konsantrasyonlarda CTX uygulanan gruplarda anlamlı bir azalmanın olduğu belirlenmiştir. Hem 24 saat hem de 48 saatlik inkübasyonlarda en az hücre canlılığı 25µM'lık CTX uygulaması yapılan grupta görülmüştür. Aynı dozun 24 ve 48 saat süreli inkübasyonda HT-29 KRK hücre hattı için toksik olduğu belirlenmiştir.

Mevcut çalışmamıza benzer olarak, Farias ve ark¹²⁹ yapmış oldukları çalışmada HT-29 hücrelerine CTX uygulanmış ve MTT değerlendirilmesi sonucu en uygun dozun 10 nM CTX grubunda olduğu bildirmişlerdir. Bu dozda HT-29 hücrelerinin proliferasyonunda önemli bir azalma kaydedilirken 0,1 ve 1 nM CTX uygulanan gruplarda dikkate değer bir düşüş gözlenmemiştir. Başka bir çalışmada değişik türdeki KRK hücre hatlarına uygulanan 100 µg/mL CTX ile LIM1215, GEO ve SW403 KRK hücre hatlarında %70'den fazlasında proliferasyonunda azalma gözlenmiştir. Ayrıca aynı dozda Caco-2 ve SW948 KRK hücre hatlarında ise proliferasyonda %50 azalama olduğu bildirilmiştir.¹³⁰

Monoklonal antikorlar tümör hücrelerinin membranındaki hedef antijenlere

bağlanırlar. Bu bağlanma ile çeşitli mekanizmalarla tümör hücresinin ölümüne neden olurlar. Birinci mekanizmada bağlanan antikorun sabit Fc fragmenti efektör hücrelerde bulunan Fc gamma reseptörler tarafından tanınır. Bu efektör hücreler başlıca doğal katil hücreler ve monositlerdir. Efektör hücreler, bağlanma sonrası tümör hücrelerinde antikora bağlı sitotoksisiteyi uyararak hücreyi apoptoza yöneltmektedir. İkinci mekanizmada monoklonal antikorun bağlandığı membran antijeni önemli bir büyüme faktörü reseptörü veya büyüme faktörü olduğundan, bağlanma sonucu büyüme faktörü reseptörünün uyardığı tümör gelişiminde önemli olan sinyal yolları engellenmektedir. Böylece tümör gelişimi inhibe edilmekte veya tümör hücresinde apoptoz uyarılmaktadır.¹³¹ Yaptığımız çalışmada CTX'in HT-29 KKK hücreleri üzerine apoptotik etkisi TUNEL metodu ile belirlendi. Buna göre TUNEL pozitif hücre yoğunluklarının hesaplanmasında 24 saatlik inkübasyona bırakılan gruplarda en düşük TUNEL pozitif hücre yoğunluğunun kontrol grubunda olduğu görülürken, bu değerin artan miktarlarda CTX uygulanan gruplarda anlamlı oranda apoptozun arttığı belirlenmiştir. Özellikle 10 ve 25 µg/mL CTX uygulanan grupta TUNEL pozitif hücre yoğunluğunun önemli oranda arttığı tespit edilmiştir. 48 saat süreyle CTX uygulanan gruplarda ise yine en düşük değerin kontrol grubunda olduğu ve dereceli olarak CTX uygulamasının yapıldığı gruplarda bu değerin önemli oranda arttığı gözlenmiştir. Buna göre en yüksek TUNEL pozitif hücre yoğunluğu yine 10 ve 25 µg/mL CTX uygulanan gruplarda olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre HT-29 KKK hücrelerinde CTX'in bu konsantrasyonlarda apoptozu arttırdığı söylenebilir. Litaratürlere göre CTX ile yapılan çalışmalarda apoptozun arttığına yönelik raporlar sunulmuştur. Bu raporlara göre CTX ya da benzer anti-EGFR antikorların Bax ve Bcl-2 ekspresyon dengesini değiştirebileceği öne sürülmüştür. Yüksek EGFR ekspresyonlu DiFi insan KKK hücrelerinde CTX tedavisi ile programlı hücre ölümünün arttığı belirtilmiştir.¹³² KKK

hücre hatlarında yapılan başka bir çalışmada anti EGFR antikorların Bax ekspresyonlarında bir artışa sebep olduğu bildirilmiştir¹³³ ve diğer bir çalışmada ise çok yönlü apoptotik kaspazın aktive edildiği rapor edilmiştir¹³⁴. Benzer olarak SSC hücre hatlarının CTX ile muamelesi sonucu Bax ekspresyonunda yükselişe ve Bcl-2 ekspresyonunda düşüşe sebep olduğu ve apoptotik hücre frekansında bir artış gözlemlendiği Huang ve ark¹³⁵ tarafından bildirilmiştir. Ancak bazı çalışmalarda tümör hücre hatlarının çoğunda tek başına CTX kullanımının apoptozu indüklemek için yeterli olmadığı ve genellikle hücre büyümesi üzerine sitostatik etkiye sahip olduğunu öne sürmüşlerdir.¹³⁶ CTX'in bazı kemoterapotik ajanlarla kombinasyonunun hem *in vivo* hem de *in vitro* birçok modelde insan tümör hücre apoptozunun insidansını arttırdığı yönünde çalışmalar mevcuttur.¹³⁷⁻¹³⁹

CDK'lar siklinlerle beraber hücre proliferasyonunda görev alırken CDK inhibitörleri CDK'larla siklin kompleksini inhibe ederek hücre döngüsünün durmasına sebep olmaktadır.^{5, 6} Kanselerde G1 kontrol noktasının düzenlenmesinde görev alan genler sıklıkla mutasyona uğramıştır. Ayrıca bu genlerin aktivitelerindeki değişiklik ve aksaklıklar sadece hücre döngüsünün kontrolünü olumsuz yönde etkilemez aynı zamanda DNA tamir genlerini ve özellikle p53'ün DNA hasarına karşı verdiği cevabı da etkilerler.¹⁴⁰ İnsan kanserlerinde G1'den S fazına geçiş yolağı sıklıkla bozulmuştur ve Rb proteini bu yolağın merkezinde bulunmaktadır.^{7, 141} p21, p27 ve p57 CDK inhibitör ailesinin üyeleri olup CDK ve siklin komplekslerine (Siklin E-CDK2; Siklin A- CDK 2; ve Siklin D- CDK 4) bağlanarak Rb proteininin fosforilasyonunu engellerler⁷⁻⁹. Mevcut çalışmamızda CTX 'in apoptotik genlerden p21, p27 ve p57 üzerine etkisi araştırılmıştır. Real-time PCR analiz sonuçlarına göre 24 saatlik farklı dozlarda CTX uygulamasına göre en yüksek p21 ekspresyonu, 1 µg/mL uygulanan grupta, 48 saatlik inkübasyonlar sonucu ise en yüksek ekspresyon 10 µg/mL CTX

uygulanan grupta gözlenmiştir. p27 gen ekspresyonu için 24 saatlik inkübasyonda 0,1 µg/mL CTX uygulanan grupta kontrol grubuna göre çok az bir azalış gösterirken, diğer gruplarda artış gözlenmiştir. 48 saatlikte ise kontrol grubuna göre en yüksek artışı 1 µg/mL CTX uygulanan grupta olduğu tespit edilmiştir. p57 gen ekspresyonunda ise 24 ve 48 saatlik CTX uygulaması sonucu kontrol grubuna göre tüm gruplarda artış tespit edilmiştir. 24 saatlik CTX uygulamalarında en yüksek artışın 1 µg/mL CTX grubunda, 48 saatlikte ise 0,1 – 25 µg/mL CTX gruplarında olduğu görülmüştür. Bu analiz sonuçlarına göre çalışmamızda CTX'in apoptoz gen ekspresyonları üzerine bir artışa sebep olduğu görülmektedir.

Solmi ve ark¹⁴² HT-29 ve Caco-2 KRK hücre hatlarında CTX'in bazı genler üzerine etkisini araştırmışlardır ve bu araştırmalar sonucu her iki hücre hattında da CTX'in P53'ü arttırdığını bildirmişlerdir. Buna ek olarak Caco-2 KRK hücrelerinde p21 ve p57'nin CTX ile down regülasyona neden olduğunu öne sürmüşlerdir. Başka çalışmalarda baş ve boyun kanser hücre hatlarına uygulanan CTX'in hücre siklusü inhibitörü olan p27'nin ekspresyonunu arttırarak hücre siklusü ilerleyişini inhibe ettiği, Bax/Bcl-2 ekspresyon oranını değiştirerek ve apoptotik kaspaz 7, 8 ve 9'un ekspresyonunu arttırarak hücrelerin apoptozise gitmesini sağladığı gösterilmiştir.^{135, 143} Lim ve ark¹⁴⁴ yapmış olduğu bir çalışmada ise HT-29 KRK hücre hatlarına uygulanan luteolinin p21 ve p27 protein seviyelerini düşürdüğü gözlenmiştir. HT-29 KRK'lı hücre hatlarının artan konsantrasyonlu luteolin ile tedavisinde konsantrasyona bağlı p21 'nin mRNA seviyelerinin düştüğünü gözlemlemişlerdir. Yapılan diğer bir literatür çalışmasında ise HepG2 hepatoselüler kanser hücre hattına CTX uygulanmış olup, doza ve zamana bağlı olarak CTX'in HepG2 hücre hattının büyümesini inhibe ettiğini, ayrıca CDKN inhibitörleri olan p21 ve p27 gen ekspresyonlarını arttırdığını bulmuşlardır.¹⁴⁵ Fan ve ark¹⁴⁶ yapmış olduğu bir çalışmada ise A431 hücre hattına CTX yapısına

benzeyen EGF reseptörünü inhibe edici bir ajan olan Ab225 uygulayarak p27 ve p21'in gen ekspresyonları konsantrasyona bağlı olarak arttığını göstermişlerdir. Peng ve ark¹⁴⁷ DU145 insan prostat kanser hücre hatlarına CTX uygulayarak, CTX'in hücreleri G1 fazında durdurduğunu ve CDK2-, siklin A- ve siklin E ile ilişkili histon H1 kinaz aktivitelerinde belirgin bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda CDNK inhibitörü olan p27 hem protein hem de gen seviyelerinde artış gözlemlemişlerdir. p27 seviyesindeki artış ile EGF/EGFR sinyal iletim yolağını bloke edip hücre siklusünün durduğunu vurgulamışlardır.

GTP/GTPaz aktivitesiyle bağımlı GDP ailesine ait bir proto-onkogen olan KRAS proteini, membrandan nükleusa mitojenik sinyal transdüksiyonuna katılmaktadır. Hücre içinde bir çok metabolik yolda görev yapan RAS proteinlerinden olan KRAS, esas olarak proliferasyon, diferansiyasyon, adhezyon, migrasyon ve apoptoziste aktif rol oynayan MAPK yolağının ekstrasellüler sinyallerinin nükleusa iletiminde rol oynamaktadır. Az sayıda KRAS mutasyonlu KKK'lı hasta ile yapılan retrospektif incelemeler sonucu KKK'lı hastaların CTX ve panitumumab tedavisinden fayda sağlanmadığı gözlemlenmiştir.¹⁴⁸ Yapmış olduğumuz çalışmada, 24 saatlik CTX uygulaması sonrası KRAS gen ekspresyonuyla karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre tüm gruplar da artış göstermiş olup en yüksek artış 10 µg/mL CTX uygulanan grupta gözlenmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise kontrol grubuna göre tüm gruplarda azalma gözlenmiştir. En yüksek azalma 10 µg/mL CTX uygulanan grupta gözlenmiştir.

Otofaji ve apoptoz birbiri ile ilişkili olup moleküler düzeyde birbirlerini etkileyebilirler. Bu nedenle biz EGFR'nin CTX ile inhibisyonunda HT-29 KKK hücre hatlarında otofajik genleri de inceledik. Bu çalışmalar sonucunda HT-29 KKK hücrelerine farklı konsantrasyonlarda CTX uygulanmasında 24 saat süreli inkübasyonlarda LC3A gen ekspresyonları karşılaştırıldığı zaman kontrol grubuna göre

bütün gruplarda artış gözlenmiştir. En fazla artış 10µg/mL CTX uygulanan grupta olmuştur. 48 saat süreli inkübasyonlarda ise kontrol grubuna göre tüm gruplarda artış olup, en yüksek artış 10µg/mL- 25µg/mL CTX uygulanan gruplarda gözlenmiştir. CTX'in diğer bir otofajik gen olan BECN1 üzerine etkisini araştırdığımız da ise 24 saat süreli inkübasyonda BECN1 gen ekspresyonları karşılaştırıldığı zaman kontrol grubuna göre diğer bütün gruplarda artış gözlenmiş ve en fazla ekspresyon 10 µg/mL CTX uygulanan grupta görülmüştür. 48 saat süreli inkübasyonda ise kontrol grubuna göre tüm gruplarda azalış gözlenmiştir. En düşük ekspresyon 1 µg/mL CTX grubunda belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre CTX'in otofajik genlerden LC3A ve BECN1'in ekspresyonunda bir artışa sebep olduğu söylenebilir. Feng ve ark¹⁴⁹ HT-29 KRK hücre hatlarında CTX ve 5-Florourasil (FU) ile kombine yapmış olduğu çalışmada, 5FU'nun apoptotik etkileri ile otofajinin indüklemesine karşı CTX'in hücreleri duyarlı hale getirdiği öne sürülmüştür. Western blot analiz sonuçlarına göre otofaji için altın standart olan belirteçlerden LCI ve LCII de artış gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada CTX'in tek başına kullanımının hücre ölümü üzerine önemli etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir.

Chen ve ark¹⁵⁰ HT-29 ve SW480 KRK hücre hatları ile yapmış oldukları çalışmada farklı konsantrasyonlarda anti EGFR uygulanmasında doza bağımlı olarak bu hücrelerde Beclin-1'in aktive olduğunu öne sürülmüştür. Başka bir çalışmada CTX'in apoptoz ve otofaji arasındaki ilişkiyi nasıl etkilediği araştırılmıştır. Bu çalışmada A437, DiFi ve HN5 hücre hatları kullanılmış ve bu hücre hatlarına CTX uygulanmıştır. DiFi hücre hattına CTX uygulanması ile apoptotik hücre ölümünün meydana geldiği bildirilmiş ve otofajinin kanser hücrelerini ölümden korumak için indüklendiği söylenmiştir. Tüm hücre hatlarında CTX uygulaması sonrası LC3 gen ekspresyonu bakılmış ve en yüksek artış DiFi hücre hattında olduğu bildirilmiştir.¹⁵¹ Li ve ark¹⁵² yapmış olduğu başka bir çalışmada ise A437, DiFi ve HCC827 hücre hatlarına CTX

uygulanmış olup tüm hücre hatlarında otofajik belirteç olan LC3-I ve LC3-II'nin arttığını saptamışlardır ve yine bu çalışmada CTX ile indüklenen otofajinin daha iyi anlaşılması için BECN1'i hücre hatlarından çıkarmışlar ve kontrol gurubu siRNA ile BECN1'siz siRNA'larla karşılaştırıldığında CTX'in LC3-II'nin artmasını engellendiği görülmüştür. Başka bir çalışmada DLD1 ve HT-29 KRK hücre hatlarına panitumumab uygulanması ile BECN1 protein seviyelerine bakılmış ve her iki hücre hattında da BECN1 protein seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Böylece panitumumab'ın otofajiyi indüklediğini söylemişlerdir¹⁵³.

Otofaji ve apoptozun moleküler düzeyde birbiri ile ilişkili olduğunu gösteren diğer bir protein ise ATG protein ailesidir. Bazı ATG proteinleri otofajinin düzenlenmesi ve ATG proteinlerinden türeyen yeni fragmanlar, kaspazların hedefidir. ATG4 ailesi üyeleri kaspaz 3'ün hedefi olduğundan otofaji ve apoptozun birbiri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. ATG4 ailesi hem otofajinin düzenlenmesinde hem de apoptozun indüklenmesinde işlev gördüğünden bizde çalışmamızda diğer bir otofajik gen olan ATG4 ekspresyonuna baktık. HT-29 KRK hücre hattına farklı konsantrasyonlarda CTX uygulayarak 24 saatlik inkübasyon sonrası ATG4A gen ekspresyonları karşılaştırıldığı zaman kontrol grubuna göre diğer bütün gruplarda artış görülürken, en fazla ekspresyon 1µg/mL ve 10µg/mL CTX uygulanan gruplarda gözlenmiştir. 48 saat süreli inkübasyonda kontrol grubuna göre en fazla artış 25 µg/mL CTX uygulanan grupta gözlenirken, en düşük ekspresyon 1 µg/mL CTX grubunda belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada HT-29 KRK hücre hattına farklı konsantrasyonlarda cisplatin ve melatoninin kombine uygulaması yapılarak otofajik genler olan BECN1, ATG4A ve LC3A gen ekspresyonlarına bakılmış ve kombine uygulama sonrası tüm bu genlerde ekspresyon artışı gözlemlenmiştir.¹⁵⁴ Guo ve ark¹⁵⁵ 85 KRK'lı ve 29 normal kişiden alınan kolorektal dokunun karşılaştırılması sonucu

KRK'lı dokularda LC3'ün ekspresyonun normal dokulara göre daha yüksek olduğunu, fakat BECNİ ekspresyonunda ise anlamlı bir fark bulunmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada 85 hastadan 45'inin CTX ile tedavi edildiği diğer 40 hastanın ise CTX'siz tedavi edildiği belirtilmiştir. Bunun sonucunda LC3A'nın CTX ile tedavi edilen grupta daha çok artmış olduğunu ve bu verilerle düşük otofaji düzeylerinin, CTX'in iyi etkinliği ile güçlü bir korelasyona sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Epidermal büyüme faktörü (EGF), hücre büyümesi, proliferasyonu ve farklılaşmasında önemli rol oynayan bir büyüme faktörüdür. Etkisini, kendi reseptörü olan EGFR'ye bağlanarak gösterir. EGF ve TNF- α gibi faktörler EGFR'ye bağlanmak için CTX ile yarışır. Bu amaçla mevcut çalışmada HT-29 KRK hücre hattına farklı konsantrasyonda CTX uygulanarak, EGF gen ekspresyonlarının seviyeleri değerlendirilmiştir. Buna göre CTX uygulanan gruplarda hem 24 saatlik inkübasyonu sonucu hücre hatlarında kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir. 48 saat inkübasyon sonucu ise kontrol grubuna göre tüm gruplarda azalma gözlenmiştir. Tabernero ve ark¹⁵⁶ KRKlı hastalara CTX ile monoterapi tedavisi sırasında TGF- α protein düzeylerinde güçlü bir artış olduğunu öne sürmüş ve bu eğilimin EGF'de de olduğunu göstermişlerdir.

Günümüzde KRK üzerine, kanser riskleri veya gelişimiyle ilgili ve ayrıca anti-kanser ajanların toksisitesi ve tedavideki etkinliği üzerine pek çok önemli çalışma yapılmıştır. Kanser tedavisinde kemoterapi önemli bir role sahiptir, fakat iyi bir tedaviyi önleyen bazı genlerdeki mutasyonlardır. Sonuç olarak anti-kanser ilaçlara hücresel cevabın ne olacağı üzerinde çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Çalışmamızda HT-29 KRK hücre hattı üzerine bir EGFR inhibitörü antikanser ajanı olan CTX'in, apoptozisde öneme sahip olan p21, p27 ve p57 genleri ile otofajik BECNİ, ATG4A, LC3A genleri ve hücre proliferasyonunda öneme sahip olan KRAS ve EGF

ekspresyonları üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmadaki MTT sonucuna göre CTX'in etkisini en iyi 24 saatlik inkübasyonda gösterdiği gözlenmiştir. Mevcut çalışmada, literatürle paralel bir şekilde CTX'in HT-29 KKK hücrelerinde p21, p27 ve p57 gen ekspresyonunu arttırmasıyla ve ayrıca TUNEL pozitif hücre yoğunluğundaki artış sebebiyle kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiği söylenebilir. Aynı zamanda yine bu veriler ışığında CTX'in HT-29 KKK hücrelerinde BECN1, ATG4A, LC3A gen ekspresyonlarını arttırarak hücreleri otofajiye yönlendirdiği düşünülmektedir. Diğer taraftan CTX'in hücre proliferasyonunda görev alan EGF ve KRAS gen ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldığında ise CTX 48 saatte EGF ve KRAS gen ekspresyonlarını azalttığı, dolayısıyla hücre büyümesini önlediği düşünülmektedir. Yapılan literatür araştırmalarında KRAS gen mutasyonu ile ilgili bir çok çalışma mevcut iken, CTX veya diğer kemoterapotik ajanların KRAS gen ekspresyonu üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda elde edilen veriler özetlendiğinde:

1. HT-29 KRK hücre hattında epidermal büyüme faktörü (EGF) antagonisti monoklonal bir antikor olan CTX'in zaman ve doz bağımlı sitotoksosite analiz sonuçlarına göre etkin dozu 24 saatte 10µg/mL ve 48 saatte 1µg/mL olarak belirlenmiştir.
2. CTX'in uygulanmasıyla apoptotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla TUNEL boyama yapılmış ve buna göre artan CTX dozuyla beraber TUNEL-pozitif hücre sayısının arttığı gözlenmiştir.
3. CTX'in, hücre döngüsünde ve apoptozu başlatmasında anahtar rol oynayan p21, p27 ve p57'nin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir.
4. CTX'in otofajinin başlaması ve ilerlemesi üzerine etkili olan ATG4A, LC3A ve BECN1'in ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir.
5. CTX'in hücre proliferasyonu üzerine etkisi incelenmiş olup EGF ve KRAS gen ekspresyonlarının azaldığı gözlemlenmiştir.

Bu veriler doğrultusunda mevcut çalışmada, CTX'in HT-29 KRK hücrelerini hem p21, p27 ve p57 gen ekspresyonlarını artırarak apoptoza hem de ATG4A, LC3A ve BECN1'in gen ekspresyonlarını artırarak otofajiye yönlendirdiği sonucuna varabiliriz. Bunun yanı sıra EGF ve KRAS gen ekspresyonunu azaltarak kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği söylenebilir.

Kemoterapotik ajanların apoptozis üzerine etkisini araştıran bir çok çalışma mevcut iken otofaji ve hücre proliferasyonunda yer alan genler üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Mevcut çalışmanın bu konuda öncülük edebilir nitelikte olacağı varsayılmaktadır. Kemoterapotik ilaçlar değerlendirilirken sadece apoptotik genler üzerine etkisi göz önüne alınmaması ve aynı zamanda otofajik ve hücre proliferasyonu

zerine etkisi bulunan diğer etkenlerin de göz önünde bulundurulup değerlendirilmesi önerilmektedir.



KAYNAKLAR

1. Okyay P. Kolorektal kanser epidemiyolojisi. *Turkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics*, 2013, 6: 1-5.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Organization World Healthy. GLOBOCAN 2012. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2013.[Eriřim Tarihi: 22 Kasım 2014].
3. Akkad J, Bochum S, Martens UM. Personalized treatment for colorectal cancer: novel developments and putative therapeutic strategies. *Langenbecks Arch Surg*, 2015, 400: 129-143.
4. Shao Z, Wu J, Shen Z, Barsky S. Genistein inhibits both constitutive and EGF-stimulated invasion in ER-negative human carcinoma cell lines. *Anticancer Res*, 1998, 18: 435-439.
5. Cordon-Cardo C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol*, 1995, 147: 545.
6. MacLachlan TK, Sang N, Giordano A. Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukar Gene*, 1995, 5: 125-156
7. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*, 1996, 274: 1672.
8. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Ried*, 1991, 49: 370.
9. Polyak K, Lee M-H, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 1994, 78: 59-66.

10. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008, 132: 27-42.
11. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2001, 2: 211-216.
12. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004, 306: 990-995.
13. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451: 1069-1075.
14. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, 2010, 12: 814-822.
15. Rouschop K, Wouters BG. Regulation of autophagy through multiple independent hypoxic signaling pathways. *Curr Mol Med*, 2009, 9: 417-424.
16. Kılıçkap S, Aksoy S, Çelik İ. Kanserde birincil korunma. *Dahili Tıp Bilim Derg*, 2006, 13(2): 57-71
17. Nikitovic D, Kouvidi K, Karamanos NK, Tzanakakis GN. The roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidious pathways of fibrosarcoma progression. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 929531.
18. Tozkoparan B, Aytaç SP. Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak glutatyon s-transferazlar. *Hacettepe Uni Ecz Faklt Dergi*, 2007, 27: 139-164.
19. Sigerist HE. The historical development of the pathology and therapy of cancer. *Bull N Y Acad Med*, 1932, 8: 642-653.
20. Fışkın K. *Genetik Kavramlar*. 6. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2002: 635-651.
21. Akbulut Hakan. *Tıbbi Onkoloji Kitabı*. 3. Baskı. Ankara. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, 2005: 23

22. Tobelem G. VEGF: a key therapeutic target for the treatment of cancer-insights into its role and pharmacological inhibition. *Target Oncol*, 2007, 2: 153-164.
23. Şahin D. *Referans Patoloji*. 4. Baskı. İstanbul. İstanbul Tıp Kitabevi, 2009: 134-136
24. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell Metabolism*, 2011, 144: 646-674.
25. Cooper GM, RE. H. *The Cell*. Çeviri: Sakızlı M. *Hücre, Moleküler Yaklaşım*, 2. Baskı. İzmir, İzmir Tıp Kitabevi, 631- 668.
26. Harvey R, Ferrier D. *Lippincott's Illustrated Reviews*. Çeviri: Ulukay E. *Hücre ve Moleküler Biyoloji*. 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2012: 215-225.
27. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 2003, 36: 131-149.
28. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*, 2003, 36: 165-175.
29. Kelly TJ, Brown GW. Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 829-880.
30. Foster I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 2008, 14: 144-149.
31. Kumar V, Abbas AK, Aster J. *Robbins basic pathology*. 9th ed. USA, WB Saunders Company, 2012: 208-320.
32. Kearns WG, Liu JM . Cell cycle checkpoint genes and aneuploidy: A short review. *Curr Genomics*, 2001, 2: 171-180.
33. Kissane WAD. *Anderson patoloji*. Çeviri: Kazancıgil AA. 1. Baskı. Ankara, Güven Yayıncılık, 1982: 743-744.
34. Geoffrey M. Cooper REH. *The Cell A Molecular Approach*. 4th ed. 2007: 720-721.

35. Keleg S, Buchler P, Ludwig R, Buchler MW, Friess H. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer*, 2003, 2: 14.
36. Bozzuto G, Ruggieri P, Molinari A. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Ann Ist Super Sanita*, 46: 66-80.
37. Geoffrey M. Cooper REH. *The Cell A Molecular Approach*. 4th ed. Boston, Courier Companies, 2007:512-513
38. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 2000, 21: 485-495.
39. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.
40. Geoffrey M. Cooper REH. *The Cell: A Molecular Approach*. 4th ed. 2006. Boston, Courier Companies, 2007: 516-519
41. Ekmekçi PDA. *Gen, Genetik değişim ve hastalıklar*. 2. Baskı. Gazi Kitabevi, 2006:178-190.
42. Cotran SR, Kumar V, Robbins SL. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 8th. ed. Philadelphia, Saunders, 2006: 239-306.
43. Kopnin BP. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, 2000, 65: 2-27.
44. Almasan A, Yin Y, Kelly RE, Lee EY, Bradley A, Li W, Bertino JR, Wahl GM. Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 5436-5440.
45. Yokuş B, DÜ Ç. Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 2012, 1; 7-18.
46. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of primary breast cancer. *Ann Oncol*, 2001, 12: 1047-1048.
47. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997, 88: 355-365.

48. Moll UM, Zaika A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *Fed of Eur Biochem Soc Lett*, 2001, 493: 65-69.
49. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 2000, 5: 415-418.
50. Ersöz M. İnsan Meme kanseri (MCF 7) ve fibroblast (L-929) hücre kültürlerinde poliakrilik asidin toksisitesinin incelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, Yıldız Teknik Üniversitesi, 2007.
51. Dalay N. Kanser. İçinde: *Hücre: Moleküler Yaklaşım*, Sakızlı M, Atabey N (editörler). *The Cell: A Molecular Approach*, Cooper GM, Hausman RE. 3. Baskı. İzmir, İzmir Tıp Kitabevi, 2006: 631-671.
52. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 Mutations in Human Cancers. *Science*, 1991, 253: 49-53.
53. Roemer K. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem*, 1999, 380: 879-887.
54. Solakoğlu Z. Apoptoz varlığı ya da yokluğu Bir hastalık nedeni. *Klin Gelişim Derg*, 2009, 22: 20-25.
55. Staalesen V, Knappskog S, Chrisanthar R, Nordgard SH, Lokkevik E, Anker G, Ostenstad B, Lundgren S, Risberg T, Mjaaland I, Gram IT, Kristensen VN, Borresen-Dale AL, Lillehaug JR, Lonning PE. The novel p21 polymorphism p21G251A is associated with locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 6000-6004.
56. Dutto I, Tillhon M, Cazzalini O, Stivala LA, Prosperi E. Biology of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Arch Toxikol*, 2015, 89: 155-178.

57. Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21 CDKN1A in the DNA damage response. *Mutat Res-Rev Mutat*, 2010, 704: 12-20.
58. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 1993, 75: 817-825.
59. Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature*, 1995, 374: 6520-386.
60. Doglioni C, Pelosio P, Laurino L, Macri E, Meggiolaro E, Favretti F, Barbareschi M. p21/WAF1/CIP1 expression in normal mucosa and in adenomas and adenocarcinomas of the colon: its relationship with differentiation. *J Pathol*, 1996, 179: 248-253.
61. Shi Y, Zou M, Farid NR, al-Sedairy ST. Evidence of gene deletion of p21 (WAF1/CIP1), a cyclin-dependent protein kinase inhibitor, in thyroid carcinomas. *Br J Cancer*, 1996, 74: 1336-1341.
62. Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, Yokozaki H, Semba S, Shimamoto F, Tahara E. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach: relationship with p53 status and proliferative activity. *J Pathol*, 1996, 180: 122-128.
63. Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis 1 supported in part by NIH grant R01 DK56283 (to ALT) for the p21 research and Campus Research Board and Illinois Department of Public Health Penny Severns Breast and Cervical Cancer grants (to ALG). *Mol Cancer Ther*, 2002, 1: 639-649.

64. Chen YQ, Cipriano SC, Arenkiel JM, Miller FR. Tumor suppression by p21WAF1. *Cancer Res*, 1995, 55: 4536-4539.
65. Chedid M, Michieli P, Lengel C, Huppi K, Givol D. A single nucleotide substitution at codon 31 (Ser/Arg) defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53-inducible gene WAF1/CIP1. *Oncogene*, 1994, 9: 3021-3024.
66. Shiohara M, El-Deiry W, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, Chen D, Vogelstein B, Koeffler H. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood*, 1994, 84: 3781-3784.
67. Cox LS, Lane DP. Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *Bioessays*, 1995, 17: 501-508.
68. Toshiyuki M, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 1995, 80: 293-299.
69. Staalesen V, Knappskog S, Chrisanthar R, Nordgard SH, Løkkevik E, Anker G, Østenstad B, Lundgren S, Risberg T, Mjaaland I. The novel p21 polymorphism p21G251A is associated with locally advanced breast cancer. *Clinic Cancer Res*, 2006, 12: 6000-6004.
70. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Gene Dev*, 1999, 13: 1501-1512.
71. Ay ME, Terzioğlu O, Terzi C, Özlem İ. Kolorektal kanserlerde, p21, p27, p57 siklin bağımlı kinaz inhibitör geni (CDKI) ekspresyonlarının değerlendirilmesi. *Akademik Gastroenterol Derg*, 2006, 5: 20-25.
72. Choi H-R, Tucker SA, Huang Z, Gillenwater AM, Luna MA, Batsakis JG, El-Naggar AK. Differential expressions of cyclin-dependent kinase inhibitors (p27 and p21) and their relation to p53 and Ki-67 in oral squamous tumorigenesis. *Int J Oncol*, 2003, 22: 409-414.

73. Koufos A, Grundy P, Morgan K, Aleck K, Hadro T, Lampkin B, Kalbakji A, Cavenee W. Familial Wiedemann-Beckwith syndrome and a second Wilms tumor locus both map to 11p15. 5. *American J Hum Genet*, 1989, 44: 711.
74. Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, Park D, Spirin KS, Nakamaki T, Takeuchi S, Hatta Y, Simpson J, Wilczynski S. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies. *Cancer Res*, 1995, 55: 2266-2269.
75. Di Cristofano A, De Acetis M, Koff A, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. PTEN and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nature Genet*, 2001, 27: 222-224.
76. Slingerland J, Pagano M. Regulation of the CDK inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol*, 2000, 183: 10-17.
77. Nijjar T, Wigington D, Garbe JC, Waha A, Stampfer MR, Yaswen P. p57KIP2 expression and loss of heterozygosity during immortal conversion of cultured human mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 1999, 59: 5112-5118.
78. Zieske JD. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors during corneal wound repair. *Prog Retin Res*, 2000, 19: 257-270.
79. Sebire N, Rees H, Peston D, Seckl M, Newlands E, Fisher R. p57KIP2 immunohistochemical staining of gestational trophoblastic tumours does not identify the type of the causative pregnancy. *Histopathology*, 2004, 45: 135-141.
80. Khouja MH, Baekelandt M, Nesland JM, Holm R. The clinical importance of Ki-67, p16, p14, and p57 expression in patients with advanced ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*, 2007, 26: 418-425.
81. Kavanagh E, Joseph B. The hallmarks of CDKN1C (p57, KIP2) in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1816: 50-56.

82. Ravikumar B, Futter M, Jahreiss L, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Narayanan U, Renna M. Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Science*, 2009, 122: 1707-1711.
83. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 2007, 9: 1102-1109.
84. Türei D, Földvári-Nagy L, Fazekas D, Módos D, Kubisch J, Kadlecsek T, Demeter A, Lenti K, Csermely P, Vellai T. Autophagy Regulatory Network—A systems-level bioinformatics resource for studying the mechanism and regulation of autophagy. *Autophagy*, 2015, 11: 155-165.
85. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Med*, 2007, 13: 1050-1059.
86. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res*, 2010, 20: 748-762.
87. Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell*, 2004, 7: 167-178.
88. Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *The Int J Biochem & Cell Biology*, 2004, 36: 2445-2462.
89. Pfisterer SG, Mauthe M, Codogno P, Proikas-Cezanne T. Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase (CaMK) signaling via CaMKI and AMP-activated protein kinase contributes to the regulation of WIPI-1 at the onset of autophagy. *Mol Pharmacol*, 2011, 80: 1066-1075.
90. Ogier-Denis E, Couvineau A, Maoret JJ, Houri JJ, Bauvy C, De Stefanis D, Isidoro C, Laburthe M, Codogno P. A heterotrimeric G-protein controls

- autophagic sequestration in the human colon cancer cell line HT-29. *J Biol Chem*, 1995, 270: 13-16.
91. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, 2005, 9: 59-71.
 92. Levine B, Sinha SC, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 2008, 4: 600-606.
 93. Bell BD, Leverrier S, Weist BM, Newton RH, Arechiga AF, Luhrs KA, Morrisette NS, Walsh CM. FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 16677-16682.
 94. Öz Arslan D, Korkmaz G, Gözüaık D. Autophagy: a cellular stres and a cell death mechanism (Otofaji: bir hücresel stres yanıtı ve ölüm mekanizması). *Acıbadem Üni Sağlık Bilim Derg*, 2011, 2: 184-194.
 95. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 8204-8209.
 96. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature Cell Biol*, 2008, 10: 676-687.
 97. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO J*, 2007, 26: 1749-1760.
 98. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nature reviews Mol Cell Biol*, 2001, 2: 731-737.

99. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, 2004, 304: 1500-1502.
100. Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, DePinho RA, Kimchi A. DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nature Cell Biol*, 2001, 3: 1-7.
101. Iaquinta PJ, Lees JA. Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19: 649-657.
102. World Cancer Report 2008 Eriřim adresi: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/index.php> Eriřim tarihi: 3 Haziran 2013.
103. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62: 10-29.
104. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*, 2009, 22: 191-197.
105. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *Bmj*, 2000, 321: 805-808.
106. Cappell MS. The pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis of colon cancer and adenomatous polyps. *Med Clin North Am*, 2005, 89: 1-42.
107. Morimoto LM, Newcomb PA, Ulrich CM, Bostick RM, Lais CJ, Potter JD. Risk factors for hyperplastic and adenomatous polyps: evidence for malignant potential? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, 11: 1012-1018.
108. Liljegren A, Lindblom A, Rotstein S, Nilsson B, Rubio C, Jaramillo E. Prevalence and incidence of hyperplastic polyps and adenomas in familial colorectal cancer: correlation between the two types of colon polyps. *Gut*, 2003, 52: 1140-1147.

109. Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg*, 1954; 139- 846.
110. Compton CC, Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA: A Cancer J Clinic*, 2004, 54: 295-308.
111. Spivack SD, Fasco MJ, Walker VE, Kaminsky LS. The molecular epidemiology of lung cancer. *Crc Cr Rev Toxicol*, 1997, 27: 319-365.
112. Elmas L. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinde Kras Gen Mutasyonlarının Real-Time Pcr Yöntemi İle Tespiti Ve Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkilerinin Belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Denizli: Pamukkale Üniversitesi, 2011.
113. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews Mol Cell Biol*, 2008, 9: 517-531.
114. Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Nat Cancer Inst*, 2001, 93: 1062-1074.
115. Kratz CP, Niemeyer CM, Zenker M. An unexpected new role of mutant Ras: perturbation of human embryonic development. *J Mol Med*, 2007, 85: 227-235.
116. Ines C, Donia O, Rahma B, Ammar AB, Sameh A, Khalfallah T, hmida Abdelmajid B, Sabeh M, Saadia B. Implication of K-ras and p53 in colorectal cancer carcinogenesis in Tunisian population cohort. *Tumor Biol*, 2014, 35: 7163-7175.
117. Saxena N, Lahiri SS, Hambarde S, Tripathi RP. RAS: target for cancer therapy. *Cancer Invest*, 2008, 26: 948-955.

118. Plowman S, Hancock J. Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mol Cell Res*, 2005, 1746: 274-283.
119. Gill GN, Kawamoto T, Cochet C, Le A, Sato J, Masui H, McLeod C, Mendelsohn J. Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem*, 1984, 259: 7755-7760.
120. Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors. *Cancer*, 2002, 94: 1593-1611.
121. Jimeno A, Rubio-Viqueira B, Amador ML, Oppenheimer D, Bouraoud N, Kulesza P, Sebastiani V, Maitra A, Hidalgo M. Epidermal growth factor receptor dynamics influences response to epidermal growth factor receptor targeted agents. *Cancer Res*, 2005, 65: 3003-3010.
122. McKay J, Murray L, Curran S, Ross V, Clark C, Murray G, Cassidy J, McLeod H. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer*, 2002, 38: 2258-2264.
123. Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol*, 2003, 21: 2787-2799.
124. Kirkpatrick P, Graham J, Muhsin M. Cetuximab. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3: 549-550.
125. Soulières D, Greer W, Magliocco AM, Huntsman D, Young S, Tsao M-S, Kamel-Reid S. KRAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies. *Curr Oncol*, 2010, 17: 31-40

126. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *New Engl J Med*, 2004, 351: 337-345.
127. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*, 2011, 12: 594-603.
128. Menteş Bb, Leventoğlu S. Kolorektal Kanserlerin Klinik Özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Surgery*, 2004, 9: 36-38.
129. de Farias CB, Heinen TE, dos Santos RP, Abujamra AL, Schwartzmann G, Roesler R. BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425: 328-332.
130. Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling Y-H, Byun D-S, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res*, 2008, 68: 1953-1961.
131. Şakalar Ç, İzgi K, Canatan H. Kanser immün terapi ve monoklonal antikorlar. *FÜ Sağ. Bil. Tıp Derg*, 2013, 27: 105-111.
132. Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest*, 1995, 95: 1897.
133. Mandal M, Adam L, Mendelsohn J, Kumar R. Nuclear targeting of Bax during apoptosis in human colorectal cancer cells. *Oncogene*, 1998, 17: 999-1007.
134. Liu B, Fang M, Schmidt M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z. Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies

- in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity. *Br J Cancer*, 2000, 82: 1991.
135. Huang S-M, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res*, 1999, 59: 1935-1940.
136. Mendelsohn J. Jeremiah Metzger Lecture. Targeted cancer therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2000, 111: 95.
137. Bruns CJ, Harbison MT, Davis DW, Portera CA, Tsan R, McConkey DJ, Evans DB, Abbruzzese JL, Hicklin DJ, Radinsky R. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 1936-1948.
138. Tortora G, Caputo R, Pomatico G, Pepe S, Bianco AR, Agrawal S, Mendelsohn J, Ciardiello F. Cooperative inhibitory effect of novel mixed backbone oligonucleotide targeting protein kinase A in combination with docetaxel and anti-epidermal growth factor-receptor antibody on human breast cancer cell growth. *Clin Cancer Res*, 1999, 5: 875-881.
139. Inoue K, Shuin T, Hicklin D. In Paclitaxel enhances the effect of treatment of metastatic human transitional cell carcinoma with the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225, *Proc Am Assoc Cancer Res*, 2000, 41: 529-530.
140. Li G, Liu Z, Sturgis EM, Shi Q, Chamberlain RM, Spitz MR, Wei Q. Genetic polymorphisms of p21 are associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, 2005, 26: 1596-1602.

141. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995, 81: 323-330.
142. Solmi R, Lauriola M, Francesconi M, Martini D, Voltattorni M, Ceccarelli C, Ugolini G, Rosati G, Zanotti S, Montroni I. Displayed correlation between gene expression profiles and submicroscopic alterations in response to cetuximab, gefitinib and EGF in human colon cancer cell lines. *BMC cancer*, 2008, 8: 227.
143. Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy—focus on cetuximab. *Eur J Cancer*, 2001, 37: 16-22.
144. Lim DY, Jeong Y, Tyner AL, Park JH. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292: G66-G75.
145. Huether A, Höpfner M, Baradari V, Schuppan D, Scherübl H. EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70: 1568-1578.
146. Fan Z, Shang BY, Lu Y, Chou J-L, Mendelsohn J. Reciprocal changes in p27 (Kip1) and p21 (Cip1) in growth inhibition mediated by blockade or overstimulation of epidermal growth factor receptors. *Clin Cancer Res*, 1997, 3: 1943-1948.
147. Peng D, Fan Z, Lu Y, DeBlasio T, Scher H, Mendelsohn J. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. *Cancer Res*, 1996, 56: 3666-3669.
148. Lievre A, Bachet J-B, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile J-F, Côté J-F, Tomasic G, Penna C, Ducreux M. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*, 2006, 66: 3992-3995.

149. Feng Y, Gao S, Gao Y, Wang X, Chen Z. Anti-EGFR antibody sensitizes colorectal cancer stem-like cells to Fluorouracil-induced apoptosis by affecting autophagy. *Oncotarget*, 2016, 7: 81402-81409.
150. Chen Z, Gao S, Wang D, Song D, Feng Y. Colorectal cancer cells are resistant to anti-EGFR monoclonal antibody through adapted autophagy. *Am J Transl Res*, 2016, 8: 1190-1196.
151. Li X, Lu Y, Pan T, Fan Z. Roles of autophagy in cetuximab-mediated cancer therapy against EGFR. *Autophagy*, 2010, 6: 1066-1077.
152. Li X, Fan Z. The epidermal growth factor receptor antibody cetuximab induces autophagy in cancer cells by downregulating HIF-1alpha and Bcl-2 and activating the beclin 1/hVps34 complex. *Cancer Res*, 2010, 70: 5942-5952.
153. Giannopoulou E, Antonacopoulou A, Matsouka P, Kalofonos HP. Autophagy: novel action of panitumumab in colon cancer. *Anticancer Res*, 2009, 29: 5077-5082.
154. Polat S, Kara A. Kolorektal Kanser Hücrelerinde Melatonin Ve Cisplatin Uygulamasinin Otofaji Ve Apoptoz Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı. Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2015.
155. Guo GF, Jiang WQ, Zhang B, Cai YC, Xu RH, Chen XX, Wang F, Xia LP. Autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3 predict cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2011, 17: 4779-4786.
156. Tabernero J, Cervantes A, Rivera F, Martinelli E, Rojo F, Heydebreck Av, Macarulla T, Rodriguez-Braun E, Vega-Villegas ME, Senger S, Ramos FJ, Roselló S, Celik I, Stroh C, Baselga J, Ciardiello F. Pharmacogenomic and Pharmacoproteomic Studies of Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer:

Biomarker Analysis of a Phase I Dose-Escalation Study. *J Clin Oncol*, 2010, 28: 1181-1189.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Fatma Betül ÖZGERİŞ
Doğum tarihi: 17.01.1984
Doğum Yeri: Erzurum
Medeni Hali: Evli/ 2 Çocuk
Uyruğu: T.C
Adres: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, 25240 ERZURUM
Tel: 0442 234 6612
Faks: 0442 234 6611
E-mail: b_betulkocak@hotmail.com
Eğitim
Lise: Erzurum Anadolu Lisesi (2002)
Lisans: Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi (2008)
Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (2009/2011)
Doktora: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (2011/2017)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: İyi derecede 70 (YDS Mart-2016)
Almanca: -
Rusça: -
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Bölümü : Dekanlık
Servisi : Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/160
Konu : Etik Kurul Kararı

28.11.2014

Sayın: Arş.Gör.Fatma Betül ÖZGERİŞ
Tibbi Biyokimya Anabilim Dalı
Araştırma Görevlisi

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 27.11.2014 tarih ve 9 nolu toplantısında, hazırlamış olduğunuz **“Metastatik Kolorektal Kanseri Hücrelerinde Cetuximab Uygulamasının Apoptotik ve Otofajik Etkinliklerinin Araştırılması”** isimli bilimsel tez çalışması protokolü ve ekli belgeleri gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler ile gönüllü bilgilendirme metni dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın Etik Kurallara uygun olduğuna mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Hülya AKSOY
Etik Kurul Başkanı

Eki :
1 Adet Etik Kurul Kararı

GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLE N BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	Bilimsel Araştırma Projesi	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:Toplantı No:9 Karar No:16	Tarih: 27.11.2014		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr. Hülya AKSOY

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Hülya AKSOY	Biyokimya	Atatürk Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Zekeriya AKTÜRK	Aile Hekimliği	Atatürk Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Mustafa GÜL	Fizyoloji	Atatürk Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Hamit ACEMOĞLU	Tıp Eğitimi / Halk Sağlığı	Atatürk Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Zekai HALICI	Farmakoloji	Atatürk Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☒	H ☐	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Zeynep ÇAKIR	Acil Tıp	Atatürk Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. M. Hamidullah UYANIK	Tıbbi Mikrobiyoloji	Atatürk Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç.Dr. M. Erdem SAĞSÖZ	Biyofizik	Atatürk Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Uz. Dr. Fuat LALOĞLU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Sağlık Bakanlığı	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Av. Aslıhan ÖNAL	Hukuk	Sağlık Bakanlığı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Şef Necla TILKIDÖĞEN	Serbest	Sağlık Bakanlığı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	

*:Toplantıda Bulunma

EK-3. İNTİHAL RAPORU BEYAN FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



İNTİHAL RAPORU BEYAN FORMU (FORM: 32)

Prof. Dr. M. Sait KELEŞ danışmanlığında yürütülen doktora öğrencisi Fatma Betül ÖZGERİŞ'e ait "Metastatik Kolorektal Kanser Hücrelerinde Cetuximabın Apoptotik Ve Otofajik Etkileri" başlıklı tez için Turnitin programında yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdadır.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 31 / 03/ 2017

Öğrenci Adı-Soyadı

İmza

Fatma Betül ÖZGERİŞ

Danışman Adı-Soyadı

İmza

Prof. Dr. Mevlüt Sait KELEŞ

BENZERLİK ORANLARI:

GİRİŞ BÖLÜMÜ: % 0

GENEL BİLGİLER BÖLÜMÜ: % 9

MATERYAL VE METOT BÖLÜMÜ: % 7

BULGULAR BÖLÜMÜ: % 5

TARTIŞMA BÖLÜMÜ: % 6

EK 4. DOKTORA TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI (Tez başlığı değişikliği önerisi olanlar için) (FORM: 22)

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

Adı ve Soyadı : **Fatma Betül ÖZGERİŞ**
Programı (Fakülte/Y.Okul) : Tıp Fakültesi
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya

Danışmanı : Prof. Dr. Mevlüt Sait KELEŞ
Ortak Danışman :

Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 03.04.2017 ve 16710634-03-500.03.04.02-E.17002944 sayılı kararıyla oluşturulan tez savunma sınavı jürisi, **Metastatik Kolorektal Kanseri Hücrelerinde Cetuximab Uygulamasının Apoptotik ve Otofajik Etkinliklerinin Araştırılması** Metin girmek için burayı tıklayın. başlıklı doktora tezini incelemiş ve aday 14.04.2017 tarihinde, saat 10 : 00'da tez savunma sınavına tabi tutmuştur.

DEĞERLENDİRME VE SONUÇ:

- ☒ Jüri raporlarının tartışılması sonucunda **başarıyla** savunulan tezin **KABUL EDİLMESİNE**,
- ☐ Jüri raporlarının tartışılması sonucunda, ay ek süre verilerek tezin **DÜZELTİLMESİNE**,
- ☐ Jüri raporlarının tartışılması sonucunda tezin **REDDEDİLMESİNE**,
- ☒ ancak konu ve içeriği değişmeksizin tez başlığının **METASTATİK KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNDE CETUXIMABIN APOPTOTİK VE OTOFAJİK GENLER ÜZERİNE ETKİLERİ**

Metin girmek için burayı tıklayın. Metin girmek için burayı tıklayın. olarak düzenlenmesine,

☒ **OY BİRLİĞİ**

☐ **OY ÇOKLUĞU** ile karar verilmiştir.

Tez Sınav Jürisi	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	:Prof. Dr. Mevlüt Sait KELEŞ	
Üye	:Prof. Dr. Fatma Zühal UMUDUM	
Üye	:Prof. Dr. Mustafa GÜL	
Üye	:Prof Dr. Süleyman Caner KARAHAN	
Üye	:Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU	
Üye	:.....	