



T.C.

ALANYA ALAADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER TIP ANA BİLİM DALI

**SAPİENİK ASİDİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE EPİDERMAL
BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (EGFR) YOLAĞINA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Ebru Büşra UĞUR

Danışman

Doç. Dr. Ertan KÜÇÜKSAYAN

**ALANYA
2025**

T.C.
ALANYA ALAADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**SAPİENİK ASİDİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE EPİDERMAL
BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (EGFR) YOLAĞINA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Ebru Büşra UĞUR

Anabilim Dalı: Moleküler Tıp Ana Bilim Dalı

Program Adı: Moleküler Tıp

Danışman
Doç. Dr. Ertan KÜÇÜKSAYAN

Bu tez çalışması TÜSEB tarafından kabul edilen (No.43060) proje kapsamında desteklenmiştir.

ALANYA
(2025)

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

.....

Ebru Büşra UĞUR

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Akademik yolculuğumun en başında bana inanan, bilgi birikimi, anlayışı ve sabrıyla yolumu aydınlatan; motivasyonumu kaybettiğim anlarda beni cesaretlendiren, tez çalışmamda her zaman desteğini hissettiren danışman hocam Ertan KÜÇÜKSAYAN’a

Yüksek lisans sürecim boyunca, bilgi ve deneyimini içtenlikle paylaşan; içinden geçtiğim zor dönemlerde yol göstericiliğiyle ışık olan, değerli hocam Aslınur SIRCAN KÜÇÜKSAYAN’a

Bu süreçte bilgilerini ve tecrübelerini özveriyle paylaşan kıymetli bölüm hocalarıma,

Tebessümleriyle içimi ısıtan ve sözleriyle moral veren, yalnız hissettiğimde bir telefon uzağımda olan, varlıklarıyla en güzel yoldaşlar olan Melis BULUT TUNCAY’a ve Aybüke BOYACI ’ya,

Her başarımda en çok gururlanan, varlıklarıyla güç bulduğum, fedakarlıklarını ömrüm boyunca taşıyacağım en değerli miras olarak bırakan ve dualarını hiç eksik etmeyen kıymetli ailem, annem Birgün GÜLKARA UĞUR’a ve babam Erdal Salih UĞUR’a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

SAPIENİK ASİDİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (EGFR) YOLAĞINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ebru Büşra UĞUR

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü,

Ekim, 2025 (98 Sayfa)

Membran lipitlerinin yapısı ve düzgün konfigürasyonun değişimi, hücre yüzey reseptörleri ve ilişkili hücre içi yolaklarda rol alan proteinlerin aktivasyonunu etkileyebilir. Bu nedenle, bir doymamış yağ asidi ve aynı zamanda da bir omega 10 yağ asidi olan sapienik asidin membranda bulunan EGFR proteinine ve alt yolaklarına etkisini incelenmeyi amaçladık. Kolon kanseri hücre hattı olan HCT116 üzerinde sapienik asidin farklı konsantrasyonlarının sitotoksik etkisi MTT deneyi kullanılarak hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonu (IC_{50} değeri) belirlendi. Sapienik asidin oluşturduğu oksidatif stresin büyüklüğü spektrofotometrik TAS ve TOS yöntemi kullanılarak araştırıldı. İnkübasyon süreleri sonrasında total protein ölçümü bradford yöntemiyle yapılarak EGFR aktivasyonun özgül protein bantlarının kantitatif sonuçları western blot analizi kullanılarak elde edildi. Ayrıca, sapienik asidin uzun süreli etkileri koloni formasyon deneyi ile analiz edildi. Çalışmamızda, HCT116 üzerinde sapienik asidin 50 μM 'lık dozunun hücrelerdeki etkileri zamana bağlı incelendi. Western blot analizleri, SA'nın EGFR, AKT ve mTOR sinyal yolaklarında zamana bağlı çift fazlı bir yanıt oluşturarak, erken dönemde baskılayıcı, geç dönemde ise kısmi yeniden aktive edici etki gösterdi. Oksidatif stres analizlerinde ise, SA'nın erken dönemde belirgin fakat geçici, geç dönemde ise azalan bir oksidatif stres yanıtı gözlemlendi. Koloni formasyon analizleri ise SA'nın uzun dönem hücresel yaşama ve çoğalma kapasitesini anlamlı biçimde azalttığını ortaya koydu. Araştırmanın sonuçları, sapienik asidin kolon kanseri hücrelerinde proliferasyon dinamiklerini ve EGFR aracılı sinyal yollarını modüle edebildiğini; ayrıca antikanser özelliklere sahip potansiyel bir ajan olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sapienik Asit; Kolon Kanseri; EGFR Sinyal İletimi; Oksidatif Stres; Proliferasyon ve Koloni Formasyonu.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SAPIENIC ACID ON THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) PATHWAY IN COLON CANCER CELLS

Ebru Büşra UĞUR

Department of Molecular Medicine

Graduate School of , Alanya Alaaddin Keykubat University,

October, 2025

Recent studies have focused increasingly on the influence of lipids on cancer development and apoptosis. Sapienic acid (SA), a monounsaturated fatty acid and a member of the ω -10 fatty acid family, has gained attention due to its potential regulatory effects on intracellular signaling pathways in cancer cells. Although alterations in lipid composition are known to modulate membrane receptor activation and downstream pathways, the impact of SA on the EGFR axis in colon cancer has not yet been systematically investigated. Therefore, this study aimed to examine the effects of SA on membrane-associated EGFR and its downstream signaling components. The cytotoxic effects of different SA concentrations were evaluated in the HCT116 colon cancer cell line using the MTT assay, and the IC₅₀ value was determined. The magnitude of SA-induced oxidative stress was assessed spectrophotometrically through TAS and TOS measurements. Following incubation, total protein levels were quantified via the Bradford assay, and quantitative changes in EGFR activation were analyzed by Western blotting. Additionally, the long-term effects of SA on proliferative capacity were examined using a colony formation assay. In our experiments, the time-dependent effects of 50 μ M SA on HCT116 cells were evaluated. Western blot results demonstrated that SA induced a biphasic response in the EGFR, AKT, and mTOR signaling pathways, characterized by early suppression followed by partial reactivation at later time points. Oxidative stress analyses revealed a strong yet transient oxidative response in the early phase, which diminished with prolonged incubation. Colony formation assays further showed that SA significantly reduced long-term cell survival and proliferative potential. Overall, these findings suggest that sapienic acid modulates proliferation dynamics and EGFR-mediated signaling in colon cancer cells and may represent a lipid-derived compound with potential anticancer properties.

Keywords: Sapienic Acid; Colon cancer; EGFR Signaling Pathway; Oxidative Stress; Cell proliferation and colony formation.

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR	3
2.1. Kolon Kanseri	3
2.2. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi.....	3
2.3. Risk faktörleri.....	6
2.3.1. Etnik Köken.....	8
2.3.2. Coğrafya	9
2.3.3. Yaş ve Cinsiyet.....	10
2.4. Tanı ve Tedavi.....	14
2.5. Yağ Asitleri	19
2.6. Hücre Zarındaki Yağ Asitlerinin Rolü.....	20
2.7. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	21
2.8. ROS ve Kanser İlişkisi	22
2.9. Lipit Peroksidasyonu.....	24
2.10. Kanser ile Lipit Peroksidasyon İlişkisi	25
2.11. Sapienik Asidin Biyolojik Önemi	26
2.12. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Yolağı	28
2.13. Sitoplazmik EGFR Yolunun PI3K-AKT-mTOR Yolağı Bağlantısı.....	32
3. YÖNTEM	36
3.1 Hücre Kültürü Çalışmaları ve İlaçlar	36
3.1.1. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Deneylere Hazırlanması İçin Gerekli Çözeltiler	36
3.1.2. Hücrelerin Çoğaltılması	37

3.1.3. Hücrelerin Dondurulması	38
3.1.4. Hücrelerin Çözülmesi.....	38
3.2. Sapienik Asidin Sitotoksosite Çalışması	39
3.2.1. Hücrelerin %50'sini İnhibe eden Konsantrasyonun (IC ₅₀) MTT Kiti ile Belirlenmesi.....	39
3.2.2. Reaktifler	39
3.2.3. Deneyin Yapılışı.....	40
3.3. Sapienik Asidin HCT116 Hücreleri ile İnkübasyonu ve Hücrelerin Toplanması	41
3.3.1. Gruplandırma.....	41
3.3.2. Deneyin Yapılışı.....	41
3.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini	42
3.4.1. Prensip	42
3.4.2. Reaktifler	42
3.4.3. Gruplandırma.....	42
3.4.4. Deneyin Yapılışı.....	43
3.5. Western Blot Protein Tayin Yöntemi.....	43
3.5.1 Prensip	43
3.5.2. Reaktifler	44
3.5.3. Gruplandırma.....	44
3.5.4. SDS-PAGE için jelin dökülmesi, örneklerin yürütülmesi ve transferi	45
3.6. Toplam Oksidan Durumunun (TOS) Belirlenmesi	46
3.6.1. Prensip	46
3.6.2. Gruplandırma.....	46
3.6.3. Reaktifler	47
3.6.4. Deneyin Yapılışı.....	47
3.7. Toplam Antioksidan Durumunun (TAS) Belirlenmesi.....	48
3.7.1 Prensip	48
3.7.2 Gruplandırma.....	48
3.7.3 Reaktifler	49
3.7.4 Deney Yapılışı.....	49
3.8. Koloni Formasyon Deneyi	50
3.8.1 Prensip	50
3.8.2 Gruplandırma.....	51

3.8.3. Reaktifler	51
3.8.4. Deney Yapılışı	51
3.9. İstatistiksel Analiz	52
4. BULGULAR	53
4.1. Sitotoksosite Bulguları	53
4.1.1. HCT-116 Hücrelerinde Sapienik Asidin Sitotoksitesisi	53
4.1.2. HCT-116 Hücrelerinde Sapienik Asidin Etkisinin Mikroskopla Gözlenmesi	53
4.2. Bradford Protein Tayin Yöntemi ile Total Protein Ölçümü	55
4.3. Western Blot Bulguları	56
4.5 Toplam Oksidan Durumunun (TOS) Bulguları	65
4.6 Toplam Antioksidan Durumunun (TAS) Bulguları	67
4.7 Oksidatif Stres Endeksinin (OSI) Bulguları	70
4.8 Koloni Formasyon Bulguları	71
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	82
KAYNAKÇA	84
ÖZGEÇMİŞ	99

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 Dünyadaki 2022'den 2045'e kadar her iki cinsiyeti kapsayan [0-39] yaş aralığı tahmini yeni kolon kanseri vaka sayısı.....	11
Tablo 2.2 Dünyadaki 2022'den 2045'e kadar her iki cinsiyeti kapsayan [0-39] yaş aralığı tahmini kolon kanserinden ölüm sayısı.....	11
Tablo 2.3 Dünyadaki 2022'den 2045'e kadar her iki cinsiyeti kapsayan [40-85+] yaş aralığı tahmini yeni kolon kanseri vaka sayısı.....	12
Tablo 2.4 Dünyadaki 2022'den 2045'e kadar her iki cinsiyeti kapsayan [40-85+] yaş aralığı tahmini kolon kanserinden ölüm sayısı.....	13
Tablo 2.5 Kolon Kanseri Tedavisi için FDA Onaylı Kişiselleştirilmiş Hedefli İlaçlar...	18
Tablo 3.1 Protein Standart çözeltisi hazırlama tablosu.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 2022 Yılında dünyada her iki cinsiyette de sık görülen ilk 15 kanser türüne ait yaşa göre standardize edilmiş (ASR) dünya 100.000'de vaka ve ölüm sayılarının oranları.....	4
Şekil 2.2 2022 yılında Türkiye'de her iki cinsiyette de sık görülen ilk 15 kanser türüne ait standardize edilmiş (dünya) 100.000'de görülme oranları.....	5
Şekil 2.3 2022 Yılı küresel kolon kanseri görülme sıklığı: yaşa göre standardize edilmiş vaka oranlarının coğrafi dağılımı (her iki cinsiyet için, 100.000 kişide)	10
Şekil 2.4 2022 Yılı küresel kolon kanseri görülme sıklığı: yaşa göre standardize edilmiş ölüm oranlarının coğrafi dağılımı (her iki cinsiyet için, 100.000 kişide)	10
Şekil 2.5 Kolorektal kanserde moleküler profillemeye dayalı tedavi seçenekleri	16
Şekil 2.6 Kolorektal kanser metastazında yağ asidi metabolizmasıyla ilişkisi.....	21
Şekil 2.7 Metabolik bozulma ve onkogenik mutasyonlar arasındaki geri besleme mekanizması.....	23
Şekil 2.8 Lipit peroksidasyon şematik gösterimi.....	24
Şekil 2.9 Kanserde Lipit Peroksidasyonun İkili Rolü.....	25
Şekil 2.10 Tirozin Kinaz Ailesi.....	28
Şekil 2.11 ErbB Reseptör Ailesi Üyeleri ve Ligand Bağlanması Sonrası Dimerizasyon Mekanizması	29
Şekil 2.12 Epidermal büyüme faktörü reseptörünün yapısı.....	30
Şekil 2.13 EGFR Aktivasyonu Sonrası Başlatılan Hücre İçi Sinyal Yolakları ve Hücreyel Sonuçları	31
Şekil 2.14 Hücredeki PI3K/AKT aktivasyonu.....	33
Şekil 2.15 Hücredeki PI3K/AKT/PTEN/mTOR sinyal yolunu gösteren şematik diyagram.....	34

Şekil 3.1 MTT reaksiyon görseli.....	39
Şekil 4.1 Farklı dozlardaki sapienik asidin HCT-116 hücrelerinde 24 saat için % canlılık üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.2 Farklı dozlardaki Sapienik asidin HCT116 hücrelerinde 48 saat için % canlılık üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.3 Farklı dozlardaki Sapienik asidin HCT-116 hücrelerinde 24 saat sonunda 20X mikroskop görüntüleri.....	54
Şekil 4.4 Farklı dozlardaki Sapienik asidin HCT-116 hücrelerinde 48 saat sonunda 20X mikroskop görüntüleri.....	55
Şekil 4.5 Bradford yöntemi kullanılarak oluşturulan ve absorbans değerlerine karşılık protein konsantrasyonlarını gösteren standart eğri grafiği.....	56
Şekil 4.6 Sapienik asidin 50 μ M dozu ile HCT116 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol, 0., 0.5., 1., 2., 3., ve 6. saat inkübasyonları ile β -Actin, p-EGFR, EGFR, p-mTOR, mTOR p-Akt ve Akt proteinlerinin western blot görüntüleri.....	57
Şekil 4.7 Sapienik asidin 50 μ M dozu ile HCT116 hücreleri üzerinde uzun vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol, 24., 48., ve 72. saat inkübasyonları ile β -Actin, p-EGFR, EGFR, p-mTOR, mTOR p-Akt ve Akt proteinlerinin western blot görüntüleri.....	58
Şekil 4.8 Sapienik asidin 50 μ M dozu ile HCT116 hücrelerinde β -Actin proteini üzerine kısa vade etkisi.....	59
Şekil 4.9 Sapienik asidin 50 μ M dozunun HCT116 hücrelerinde β -Actin proteini üzerine uzun vade etkisi.	59
Şekil 4.10 Sapienik asidin 50 μ M dozunun HCT116 hücrelerinde p-EGFR ve EGFR proteinlerinin aktivasyonu üzerine kısa vade etkisi.	60
Şekil 4.11 Sapienik asidin 50 μ M dozunun HCT116 hücrelerinde p-EGFR ve EGFR proteinlerinin aktivasyonu üzerine uzun vade etkisi.	61

Şekil 4.12 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerinde p-AKT ve AKT proteinlerinin üzerine kısa vade etkisi.....	62
Şekil 4.13 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerinde p-AKT ve AKT proteinlerinin üzerine uzun vade etkisi.....	63
Şekil 4.14 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerinde p-mTOR ve mTOR proteinlerinin aktivasyonu üzerine kısa vade etkisi.....	64
Şekil 4.15 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerinde p-mTOR ve mTOR proteinlerinin üzerine aktivasyonu uzun vade etkisi.....	65
Şekil 4.16 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerinde TOS standart eğrisi...	66
Şekil 4.17 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerinde TOS üzerine kısa zaman aralıklı (0–6 Saat) etkileri.....	66
Şekil 4.18 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerinde TOS üzerine uzun zaman aralıklı (24–72 Saat) etkileri.....	67
Şekil 4.19 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerinde TAS standart eğrisi...	68
Şekil 4.20 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerinde TAS üzerine kısa zaman aralıklı (0–6 Saat) etkileri.....	69
Şekil 4.21 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerinde TAS üzerine uzun zaman aralıklı (24–72 Saat) etkileri.....	70
Şekil 4.22 5 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerine uygulamasından sonra kısa dönem OSİ (TOS/TAS) Değişimi.....	71
Şekil 4.23 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerine uygulamasından sonra uzun dönem OSİ (TOS/TAS) Değişimi.....	71
Şekil 4.24 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerinde 24., 48., 72. saatte hücre canlılığı ve koloni oluşum kapasitesi üzerindeki zamana bağlı değişen etkileri.....	71
Şekil 5.1 Doymamış yağ asidi biyosentezi.....	73
Şekil 5.2 Yağ asitlerinin hücre içi metabolik akışı ve biyosentezi.....	74

Şekil 5.3 FADS2 Aktivasyonu ve ER stresinin SCD1 inhibitör direncindeki rolü.....	75
Şekil 5.4 Hücre tipine göre sapienatın mTOR–SREBP–FADS2 sinyal ağı üzerindeki düzenleyici rolü.....	76
Şekil 5.5 Sapienik Asidin Sudaki Hidroksil Radikaliyle Reaksiyonu: Kinetik ve Ürün Çalışması.....	79



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
μ	Mikro
n	Nano
g	Yerçekimi kuvveti
L	Litre
U	Ünite
kDa	Kilodalton
M	Molarite
p	Fosfo
C	Karbon
O	Oksijen
$^{\circ}\text{C}$	Celsius

Kısaltmalar

SA	Sapienik asit
KRK	Kolorektal kanser
mKRK	Metastatik kolorektal kanser
IARC	Uluslararası kanser araştırma ajansı
HNPCC	Kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser
FAP	Ailesel adenomatöz polipozis
MMR	DNA uyumsuzluk onarımı
dMMR	Bozuk DNA uyumsuzluk onarımı
MLH1	MutL homolog 1
MSH2	MutS homolog 2
PMS2	Mayoz sonrası segregasyon artışı 2
EPCAM	Epitel hücre adezyon molekülü
APC	Adenomatöz polipozis coli
MUTYH	MutY DNA glikozilaz homologu
MAP	MUTYH ile ilişkili polipozis
MCFA	Orta zincirli yağ asitleri
IL-1 β	İnterlökin-1 beta
IL-8	İnterlökin-8
IL-6	İnterlökin-6
IL-12	İnterlökin-12
IL-23	İnterlökin-23
BT	Bilgisayarlı tomografi
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
PET	Pozitron emisyon tomografisi
ctDNA	Dolaşımdaki tümör DNA'sı
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
MSI	Mikrosatellit instabilite
IHK	İmmünohistokimyasal
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
NRAS	Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
HGF	Hepatosit büyüme faktörü

c-MET	Mezenkimal-epitelyal geçiş faktörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGF-1R	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
CEA	Serum karsinoembriyonik antijen
FDA	Amerikan gıda ve ilaç Dairesi
FAO	Yağ asidi oksidasyonu
NADPH oksidaz,	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
mtROS	Mitokondriyal ROS
MDR	Çoklu ilaç direnci
4-HNE	4-hidroksinonenal
DAMP	Hasar ilişkili moleküler modeller
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
mTOR	Rapamisin hedefi mekanizması / Memeli TOR hedefi
SREBP-1	Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein 1
AFA	Antimikrobiyal yağ asitleri
FAME	Yağ asidi modifiye edici enzim
RTK	Reseptör tirozin kinaz
AREG	Amphiregulin
BTC	Betacellulin
EREG	Epiregulin
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-Kinaz
AKT	Protein Kinaz B
RAS	Rat Sarkomu virüsüne benzer onkogen homologu
RAF	Hızlı artan fibrosarkom
MEK	Mitojenle aktive olan protein kinaz kinazı
ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
PLCγ	Fosfolipaz C gama
PKC	Protein Kinaz C
JAK	Janus Kinaz
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü

CSC	Kanser kök hücreleri
TM	Transmembran bölge
JM	Juxta membrane
TKD	Tirozin kinaz domaini
SH2	Src homolog 2 alanı
PTB	Fosfotirosin bağlayıcı alan
KHDAK	Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde
mAb'lar	Monoklonal antikorlar
TKI	Tirozin kinaz inhibitörleridir
GPCR	G-protein bağlantılı reseptörler
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfatı
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfata
PDK1	3-fosfoinozotid bağımlı kinaz-1
mTORC1	mTOR kompleksi 1
mTORC2	mTOR kompleksi 2
GSK-3 β	Glikojen sentaz kinaz-3 Beta
FOXO	Forkhead Box O
BAD	Bcl-2 ile ilişkili ölüm uyarıcısı protein
TSC2	Tüberöz skleroz kompleksi 2
S6K	Protein S6 kinaz
4EBP1	eIF4E bağlayıcı protein 1'dir
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
IC ₅₀	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
DNA	Deoksiribonükleik asit
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
FFA	Serbest Yağ Asidi
SFA	Doymuş Yağ Asidi
MUFA	Tekli doymamış yağ asitleri
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
6-HA	Cis-6-heksadekenoik asit

POA	Palmitoleik asit
FADS2	Yağ asidi desatüraz 2
PA	Palmitik Asit
SCD	Stearoil-CoA desatüraz
EPA	Eikozopentaenoik asit
DHA	Dokozahexaenoik asit
IL-1	İnterlökin-1
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
EMT	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
AMPK	Adenosin Monofosfat ile Aktive Olan Protein Kinaz
STAT	Sinyal İleticisi ve Bir Transkripsiyon Aktivatörü
HER/ v-ErbB	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
FBS	Fetal Sığır Serum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
RIPA	Radyoimmünopresipitasyon tahlil tamponu
PIC	Proteaz İnhibitör Kokteyli
BSA	Sığır Serum Albumin
CPPA	Commassie Plus Protein Assay
UPS	Ultra Saf su
SDS	Sodyum dodesil sülfat
APS	Amonyum persülfat
TBS	Tris Baz Çözeltisi
T	Tween 20
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
ECL	Gelişmiş Kemilüminesans
HRP	Horseradish Peroksidaz

1. GİRİŞ

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre, kolon kanserinin 2022 yılında dünya genelinde toplam yeni vaka sayısı 1.142.286 olarak kaydedilmiştir. Ancak 2045 yılına gelindiğinde bu sayının yaklaşık %73,9 oranında artarak 1.986.735 vakaya ulaşması öngörülmektedir. Bu artış, öncelikli olarak küresel nüfustaki büyümeyle ilişkilidir. 2022’de 7,89 milyar olan dünya nüfusunun, 2045’te yaklaşık 9,47 milyara yükselmesi beklenmektedir. 2022 yılından 2045 yılına kadar olan dönemde, dünya genelinde kolon kanserine bağlı ölüm sayısı 538.167’den 1.005.333’e çıkarak %86,8 oranında bir artış gösterecektir (1). Bu projeksiyon, kolon kanserinde küresel sağlık yükünü giderek arttırmakta bu yüzden erken tanıyı önemli kılmaktadır.

Kolorektal kanserin (KRK) gelişiminde genetik mutasyonlar, epigenetik değişiklikler ve çevresel etkenler birlikte rol oynamaktadır. Obezite, sigara, alkol, kırmızı/işlenmiş et tüketimi, düşük fiziksel aktivite, diyabet ve bazı mikro besin eksiklikleri gibi çeşitli etmenler her yaş grubunda KRK riskiyle ilişkilendirilmiştir. Özellikle genç yetişkinlerde beslenme ve yaşam tarzındaki değişimler bu riski artırmaktadır (2). Son yıllarda yapılan çalışmalar, diyet ve yaşam tarzı tercihleri ile KRK gelişimi arasındaki ilişkiyi daha güçlü biçimde ortaya koymaktadır. Bu ilişkiler genetik, epigenetik, hücre sinyal yolları, bağışıklık yanıtı, reaktif oksijen türleri (ROS) ve metabolik ürünler üzerinden açıklanmaktadır (3). Kolorektal kanser, genetik yatkınlıkla birlikte diyet ve yaşam tarzı gibi çevresel etkenlerin şekillendirdiği çok faktörlü bir hastalıktır. Batı tipi diyet, özellikle yüksek yağ ve işlenmiş et tüketimiyle KRK riskini artırırken, lif açısından zengin beslenme koruyucu etkiler göstermektedir (4).

Yağ asitleri yapısal olarak doymuş yağ asidi (Saturated fatty acids; SFA) ve tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) ve çoklu doymamış yağ asitlerini (polyunsaturated fatty acid; PUFA) olarak sınıflandırılır. SFA’lar çift bağ içermezken, MUFA’lar bir, PUFA’lar ise birden fazla çift bağa sahiptir (5). Son yapılan çalışmalarda; MUFA’lar hem endojen sentez hem de diyet yoluyla elde edilir ve kanser biyolojisinde çeşitli süreçleri etkileyebilir. Tekli doymamış yağ asitlerinin sentezinde görev alan stearoyl-CoA desaturazların (SCD’ler) birçok kanserde yüksek ekspresyon gösterdiği bildirilmiş; ayrıca MUFA açısından zengin diyetlerin bazı karsinomlarla ilişkili olabileceği gözlemlenmiştir (6). Çoklu doymamış yağ asitler membran fosfolipitlerinin temel bileşenleri iken, MUFA’lar da hem membran yapısına katılır hem de lipid oksidasyonunu azaltarak hücresel yaşlanma süreçlerine katkıda bulunur (7, 8). Ayrıca MUFA’lar,

membran özelliklerini ve lipit metabolizmasını etkileyerek hücresel işlevler üzerinde belirleyici rol oynar (9). Lipitlerdeki özellikle MUFA/SFA oranındaki değişiklikler ve lipit metabolizmasındaki düzensizlikler, kanser progresyonunda etkili olabilir (10). MUFA'lar hem diyetle alınabilir hem de SCD'ler aracılığıyla sentezlenebilir. Bu enzimlerin çeşitli kanserlerde artmış aktivitesi gözlemlenmiştir (11). Ancak, MUFA'ların KRK üzerindeki etkileri tüketilen MUFA türüne ve kaynağına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Özellikle sızma zeytinyağı gibi bitkisel kaynaklı MUFA'ların koruyucu etkileri olduğu bildirilmektedir (6). Lipitlerin bu çok yönlü biyolojik rolleri, mikrobiyota ile etkileşim de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlere katkı sunar. Bu bağlamda, bir MUFA ve aynı zamanda da nadir bir omega-10 yağ asidi olan sapienik asidinde bu süreçlere dahil olabileceğini düşünmekteyiz. Yalnızca insan sebumunda ve kara gözlü suzan asmasının tohum yağında doğal olarak bulunan sapienik asit ile yapılan son çalışmalarda meme kanseri üzerinde birçok etkinin olduğu bulunmuştur (12). Ancak, sağlık üzerindeki etkileriyle ilgili literatür eksikliği daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç olduğunun açık bir göstergesidir. Öte yandan, hücre zarındaki reseptörlerin aktivitesi de kanser gelişiminde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR); insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (The Human Epidermal Growth Factor Receptor; HER) ailesinin bir üyesi olup, hücre çoğalması, farklılaşması, hayatta kalması ve göçü gibi süreçleri düzenleyen çeşitli sinyal yollarını aktive eder (13). Bu reseptör ailesinin aşırı ekspresyonu, apoptozun baskılanması ve tümör ilerlemesinin desteklenmesiyle ilişkilendirilmiştir (14). İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü, bu nedenle birçok kanser türünde olduğu gibi metastatik kolorektal kanserde (mKRK) de etkili bir terapötik hedef olarak kullanılmaktadır (15, 16). Tekli doymamış yağ asitleri, özellikle oleik asit, hücre zarında yapısal değişiklikler oluşturarak EGFR sinyal iletimini etkileyebilir. Tekli doymamış yağ asitleri açısından zengin Akdeniz diyetinin, EGFR/(Mitojenle aktive olan protein kinaz) MAPK yolunu baskılayarak hücre çoğalmasını azaltabileceği ve böylece kolorektal kanser gibi malignitelerde koruyucu etki gösterebileceği düşünülmektedir (17). Epidermal büyüme faktörü reseptörü, birçok kanser türünde onkojenik bir yöneticisi olarak rol oynar. EGFR'nin kanserde sık görülen anormal lipit metabolizması ve MUFA üretimiyle ilişkisi bilinmesine rağmen, MUFA sentezini nasıl düzenlediği net değildir ve araştırılmaya muhtaçtır (6, 18).

2. LİTERATÜR

2.1. Kolon Kanseri

Kolon kanseri, genellikle adenomatöz poliplerden gelişen ve zamanla çevre dokulara yayılabilen, kalın bağırsağın iç yüzeyinde ortaya çıkan malign bir hastalıktır (19). Son yıllarda 50 yaş altı bireylerde kolorektal kanser sıklığında artış gözlenmekte olup, bu durumun nedenleri arasında batı tipi beslenme, obezite ve hareketsizlik gibi yaşam tarzı faktörleri yer almaktadır (20). Bununla birlikte, aile öyküsü, genetik sendromlar (örneğin Lynch sendromu), enflamatuvar bağırsak hastalıkları ve çevresel etkenler gibi genetik ve biyolojik risk faktörleri de hastalık gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bu bağlamda genetik analizler, erken tanı ve kişiye özel tedavi stratejileri açısından kritik öneme sahiptir (21). Hastalık çoğunlukla geç dönemde belirti vermekte olup; dışkıda kan, kilo kaybı, karın ağrısı ve bağırsak alışkanlıklarında değişiklik gibi semptomlarla kendini göstermektedir. Tümörün bulunduğu kolona göre klinik belirtiler farklılık gösterebilir (22). Erken teşhis için kolonoskopi en etkili yöntemdir; bu yöntemle şüpheli lezyonlara müdahale edilip patolojik inceleme yapılabilir. Ayrıca dışkıda gizli kan testi ve DNA temelli testler de tanıda destekleyici rol oynamaktadır (23). Tedavide cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi ve hedefe yönelik ajanlar hastalığın evresine göre kombine şekilde uygulanır. Erken evrede tam kür sağlanabilirken, ileri evrelerde yaşam süresini uzatmaya yönelik tedavi planları devreye girmektedir. Korunmada ise sağlıklı yaşam tarzı ve düzenli tarama testleri temel stratejilerdir (24).

2.2. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi

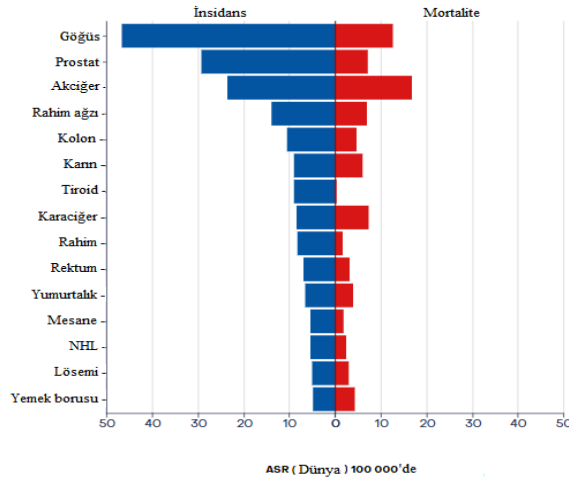
Kolon kanseri, dünya çapında en sık görülen maligniteler arasında yer almakta ve hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde, önemli bir halk sağlığı sorununu oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) 2024 yılı listesine göre, kolorektal kanserler, globalde tüm kanserler arasında üçüncü sırada yer alırken, kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Bu yüksek insidans ve mortalite oranlarının, özellikle yaşam tarzındaki değişiklikler ve yaşlı nüfusun artışıyla doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir (25).

Kolon kanserinin görülme sıklığı, yaşanan coğrafya ve sosyoekonomik gelişmişlik düzeyine göre farklılık göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde batı tarzı yaşam biçiminin benimsenmesi, yüksek yağ ve kırmızı et tüketimi, besin içeriği açısından yetersiz beslenme ve hareketsiz yaşam gibi risk faktörlerinin daha yaygın olması

nedeniyle kolon kanseri insidansı daha yüksektir. Amerika Birleşik Devletleri ve Batı Avrupa gibi bölgelerde kolon kanseri, Afrika ve Güneydoğu Asya gibi düşük gelirli bölgelere kıyasla daha sık görülmektedir. Ancak son yıllarda, düşük ve orta gelirli ülkelerde de kolon kanseri vakalarında artış gözlenmektedir (26). Kolorektal kanser (kolon ve rektum), ABD’de hem kadınlarda hem erkeklerde en sık görülen üçüncü kanser türü olup, kanser kaynaklı ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır. 2024 yılı itibarıyla ABD’de yaklaşık 106.590 yeni kolon ve 46.220 yeni rektum kanseri vakası beklenmektedir (27).

Dünya sağlık örgütünün 2022 yılına ait dünya genelindeki 100.000 kişide görülen oranlara göre, kanser insidans (yeni vaka) ve mortalite (ölüm) oranları değerlendirildiğinde, kolon kanseri, en sık rastlanan ilk 15 kanser arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Bu karşılaştırma, kolon kanserinin erken tanı ve önleyici sağlık politikaları açısından öncelikli bir kanser türü olduğunu ortaya koymaktadır (28).

Yaşa Göre Standardize Oran (Dünya) 100.000’de, İnsidans ve Ölüm Oranı, Her iki cinsiyet, 2022
Kıtalar
(ilk 15 kanser bölgesi)

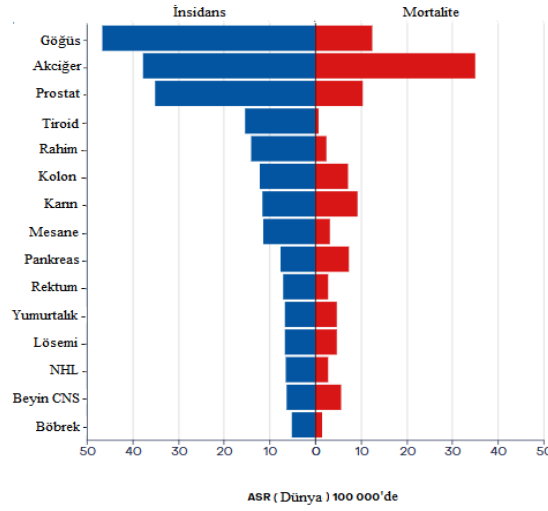


Kanser BÜGÜN! IARC - <https://gco.iarc.who.int>
Veri sürümü : Globocan 2022 (sürüm 11) - 08.02.2024
© Tüm Hakları Saklıdır 2025

International Agency
for Research on Cancer
World Health
Organization

Şekil 2.1 2022 Yılında dünyada her iki cinsiyette de sık görülen ilk 15 kanser türüne ait yaşa göre standardize edilmiş (ASR) dünya 100.000’de vaka ve ölüm sayılarının oranları (28).

2022 yılı verilerine göre, Türkiye’de ise en sık görülen ilk 15 kanser arasında kolorektal kanser; göğüs, akciğer, prostat ve tiroid kanserlerinden sonra dördüncü sırada yer almaktadır. Ölüm oranlarına bakıldığında, akciğer ve mide kanserlerinin ardından kolon kanseri ölüm oranının önemli bir paya sahip olduğu görülmektedir. Bu durum, kolon kanserinin yalnızca yüksek görülme sıklığına değil, aynı zamanda ciddi ölüm oranlarına da yol açtığını göstermektedir (29).



Kanser BÜGÜNÜ|IARC-<https://gco.iarc.who.int>
Veri sürümü : Globocan 2022 (sürüm 11) - 08.02.2024
© Tüm Hakları Saklıdır 2025

International Agency
for Research on Cancer
World Health
Organization

Şekil 2.2 2022 yılında Türkiye'de her iki cinsiyette de sık görülen ilk 15 kanser türüne ait standardize edilmiş (dünya) 100.000'de görülme oranları (29).

Yaş, kolon kanseri riskinin en önemli belirleyicilerinden biridir. Vakaların büyük çoğunluğunun 50 yaş ve üzerinde olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda Batı toplumlarında 50 yaş altı bireylerde kolorektal kanser insidansında artış rapor edilmektedir. Bu artışın nedenleri tam olarak bilinmemekle birlikte, genetik yatkınlık, obezite, diyabet ve sedanter yaşam tarzının önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca, genç yaş gruplarında tanı konulan olguların genellikle daha ileri evrede ve agresif seyirli olduğu görülmektedir (20, 30).

Kolon kanseri cinsiyete göre değerlendirildiğinde hem erkeklerde hem de kadınlarda görülmekle birlikte, erkeklerde daha yüksek oranlara rastlanmaktadır. Bu farkın olası nedenleri arasında yaşam tarzı farklılıkları, hormonal etkiler ile erkeklerde sigara ve alkol tüketiminin daha yaygın olması yer almaktadır. Ayrıca, erkek bireylerde kolon kanserinin genellikle daha ileri evrelerde teşhis edildiği gözlemlenmektedir (31).

Kolon kanserinin epidemiyolojisinde genetik faktörlerin de önemli rol oynadığı bilinmektedir ve ailede kolon kanseri öyküsü olan bireylerde risk önemli ölçüde artmaktadır. Özellikle kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser (HNPCC) ve ailesel adenomatöz polipozis (FAP) gibi genetik sendromlar, genç yetişkinlerde kolon kanser gelişimi için majör risk faktörleridir (32).

Kolon kanserinde erken tanı oranı, tarama programlarının yaygınlaşması ile birlikte belirgin biçimde artabilmektedir. Özellikle kolonoskopi ve gaitada gizli kan

testlerinin yaygın olarak kullanılması, erken evre kanserlerin ve premalign poliplerin tespitini artırmıştır. Bu tarama programları sayesinde kolon kanserine bağlı mortalite oranlarında azalma sağlanmaktadır. Ancak, tarama hizmetlerinin erişiminin kısıtlı olduğu bölgelerde olguların genellikle ileri evrede saptanması, sağkalım oranlarını olumsuz etkilediği görülmektedir (33). Erken tanı ve önleyici stratejiler, kolon kanseri ile mücadelede kritik öneme sahiptir. Sonuç olarak kolon kanseri insidansının ve buna bağlı ölümlerin; başta yaş, genetik yatkınlık, yaşam tarzı ve beslenme olmak üzere birçok faktörün varlığı ile ilişkili olduğu net bir şekilde görülmektedir (34).

2.3. Risk faktörleri

Yakın dönemde kolon kanseri üzerine yapılan araştırmalarda, özellikle 50 yaş üzerindeki bireylerde riskin arttığını göstermektedir. Ancak genç yaşta da vakaların arttığı görülmekte ve bu durumun nedenleri araştırılmaktadır. Ailede kolon kanseri öyküsü ve bazı kalıtsal sendromlar da riski artıran genetik etkenlerdendir (35).

Beslenme ve yaşam tarzı da kolon kanseri gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Özellikle kırmızı ve işlenmiş etin fazla tüketilmesi, liften fakir beslenme, alkol ve sigara kullanımı riski artırırken; sebze, meyve ve tam tahıllar tüketmek, düzenli egzersiz yapmak ve ideal kiloda kalmak koruyucu etkiye sahiptir. Ayrıca, obezite ve metabolik sendrom da kolon kanseri gelişim riskini daha da artırabilir (36). Ek olarak diyabet, hareketsizlik ve D vitamini eksikliği de kolon kanseri riskini artıran diğer faktörlerdendir. Diyabetli bireylerde gelişen insülin direnci ve düşük D vitamini düzeyleri bu riski yükseltebileceği bildirilmektedir (37). Diğer taraftan inflamatuvar bağırsak hastalıkları, özellikle uzun süreli ülseratif kolit ve Crohn hastalığı, kolon kanseri riskini artırmaktadır. Bu durumlarda kronik inflamasyon DNA hasarına yol açmasıyla birlikte, hastalığın süresini ve şiddetini arttırdıkça kanser riski de artar; bu nedenle inflamatuvar bağırsak hastalıkları olan kişilerin düzenli kolonoskopi yapılması önerilir (38).

Kolorektal kanser riskini artıran çeşitli kalıtsal sendromlar, belirli genetik mutasyonlarla ilişkilidir. Lynch sendromu, en sık görülen otozomal dominant kalıtmı bir sendromdur. MMR (Mismatch Repair – DNA Uyumsuzluk Onarımı), DNA'da oluşan baz eşleşme hatalarını düzelterek genom bütünlüğünü koruyan normal bir tamir sistemidir. Buna karşılık, dMMR (defective Mismatch Repair – Bozuk DNA Uyumsuzluk Onarımı) bu sistemin genetik mutasyonlar veya epigenetik değişiklikler nedeniyle işlevini yitirmiş, yani bozulmuş hâlini ifade eder. MMR genleri; MLH1 (MutL homolog 1), MSH2 (MutS homolog 2), MSH6 (MutS homolog 6), PMS2 (Postmeiotic segregation

increased 2) ve EPCAM (Epitel hücre adezyon molekülü) şeklinde sıralanır. Bu genlerin bozulması; hücrelerin DNA hasarlarını düzgün onaramamasına ve başta kolorektal kanser (%3'ü), endometriyal (%2'si), over, mide, ince bağırsak, pankreas, prostat, cilt kanserleri olmak üzere birçok kansere yatkınlığa sebep olur. Bu sendromu taşıyanlarda yaşam boyu kolorektal kanser gelişme riski %25–75 arasında değişmektedir (3, 39-41).

Ailevi Adenomatöz Polipozis sendromu ise APC (Adenomatöz Polipozis Coli) genindeki mutasyonla ilişkilidir. APC geni, hücre büyümesini kontrol eden bir tümör baskılayıcı gendir. Bu sendromda, yüzlerce ila binlerce polip oluşur ve tedavi edilmezse bireylerin neredeyse %100'ü kolorektal kanser geliştirir (42). MutY DNA glikozilaz homologu (MUTYH) ile ilişkili polipozis, DNA baz çiftleri arasındaki hataları düzelten MUTYH genindeki mutasyonlarla ilişkilidir. İki kopya mutasyon taşıyan bireylerde (%40–90 riskiyle) yüksek kanser riski varken, tek kopya taşıyanlarda bu oran daha düşüktür (%5–10). Bu gen, baz eksizyon onarımı sisteminde görev alır ve özellikle oksidatif DNA hasarının tamirinde önemlidir. MUTYH genindeki mutasyonlar, MUTYH ile ilişkili polipozis (MAP) adı verilen, otozomal resesif geçişli kalıtsal bir kolorektal kanser sendromuna neden olabilir (3).

Akdeniz diyeti gibi biyolojik olarak aktif bileşenlerce zengin gıdaların, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının kontrol altına alınmasına veya kısmen tedavi edilmesine katkı sağlayabileceği önerilmiştir (43). Reddy ve arkadaşları kolon kanseri Caco-2 hücrelerinde yaptığı çalışmada, orta zincirli yağ asitleri (MCFA) içeren ortamda inkübe ettikten sonrasında oksidatif stres indükleyicisi tert-bütil hidroperoksiti yüksek seviyelerde bulmuşlardır. Bu hücre hasarının artmasına, glutatyon seviyelerinin azalmasına ve enflamatuvar sitokinler olan interlökin-1 beta (IL-1 β)'nin ve interlökin-8 (IL-8) üretimini uyarmasına yol açmaktadır. MCFA besiyerinde kültürlenmiş hücrelerin aksine, zeytinyağında bulunabilen oleik asit (omega-9) ve hidroksitirosol ile zenginleştirilmiş besiyerindeki hücreler yüksek tert-bütil hidroperoksit seviyeleri göstermediği bulunmuştur. Araştırmacılar ayrıca, tek bir bileşenin kullanılmasıyla karşılaştırıldığında, omega-3 yağ asitleri olan eikosapentaenoik asit (EPA), dokosaheksaenoik asit (DHA) ve hidroksitirosol kombinasyonunun hücre hasarını ve IL-8 sentezini daha büyük ölçüde azalttığını gözlemlemişlerdir (44).

Özellikle abdominal obezite (karın çevresinde yağlanma) kolorektal kanser gelişimini artıran önemli bir risk faktörüdür. Visceral yağ dokusunun artışı; insülin direnci, inflamasyon, diyabet (özellikle Tip 2) adipokin (leptin, adiponektin) dengesizlikleri ve bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler de KRK'e zemin hazırlar. Leptin tümör

büyümesini teşvik ederken, adiponektin koruyucu olabilir. Ayrıca, bağırsaktaki faydalı bakterilerin azalması da tümör gelişimine sebep olur. Yağ hücrelerinin büyümesi, oksijen yetersizliği (hipoksi) ve artan oksidatif stresle sonuçlanır. Bu süreçte interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), interlökin-12 (IL-12) ve interlökin-23 (IL-23) gibi sitokinlerin salgılanması artar ve kanserle ilişkili hücrel sinyalleri aktive eder. Bu biyolojik mekanizmalar obeziteyi KKK için çok yönlü bir risk faktörü haline getirmektedir (45).

Son dönemlerin popüler konularından biri olan mikrobiyota ile ilgili Science dergisinde yayınlanmış bir çalışmada, bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerin de kolon kanserine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Özellikle bazı bakteriler tümör hücrelerinin büyümesini kolaylaştırabilir. Antibiyotikler, beslenme ve çevresel etkenler mikrobiyotayı etkileyerek riski artırabilir. Mikrobiyotanın hedeflenmesi gelecekte yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından önemli bir potansiyel taşımaktadır (46). Tüm bu bulgular, kolon kanserinin çok faktörlü bir hastalık olduğunu desteklemektedir.

2.3.1. Etnik Köken

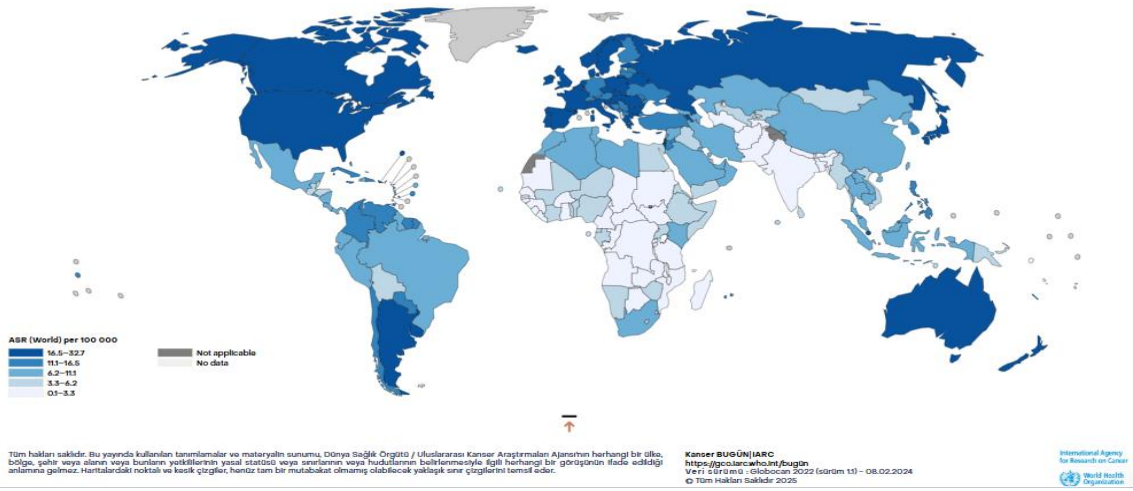
Kolorektal kanserin görülme ve ölüm oranları etnik gruplar arasında önemli farklılıklar göstermektedir. 2023 verilerine göre, ABD'de Afroamerikalıların bu kansere yakalanma ve hastalıktan ölme açısından en yüksek risk altındayken, beyaz Amerikalılar orta düzeyde bir risk taşımaktadır (26, 47). Asyalı Amerikalılar ve Pasifik Adalıları genel olarak daha düşük oranlara sahip olsa da grup içinde farklılıklar mevcuttur; diğer bölgelere göre daha sanayileşmiş bölgede yaşayan Japon kökenlilerde risk yüksekken, Çinli ve Hint kökenlilerde oldukça düşüktür. Bu farklar; genetik yapı, beslenme alışkanlıkları ve tarama programlarına katılım düzeyine bağlı olabilir (48). Ancak diğer etnik gruplara göre en yüksek sağkalım oranları Japonlar görülmektedir. Japonlar arasındaki sağkalım avantajının öncelikle sosyodemografik faktörlerden kaynaklandığı ifade edilmektedir (49). Latin kökenli Amerikalılarda kolorektal kanser daha az görülse de sağlık hizmetlerine erişimdeki zorluklar nedeniyle hastalık genellikle geç evrede teşhis edilmektedir. Bu etnik farklılıklar, hedefe yönelik halk sağlığı stratejileri ve erken tarama uygulamalarının önemini ortaya koymaktadır (50).

2.3.2. Coğrafya

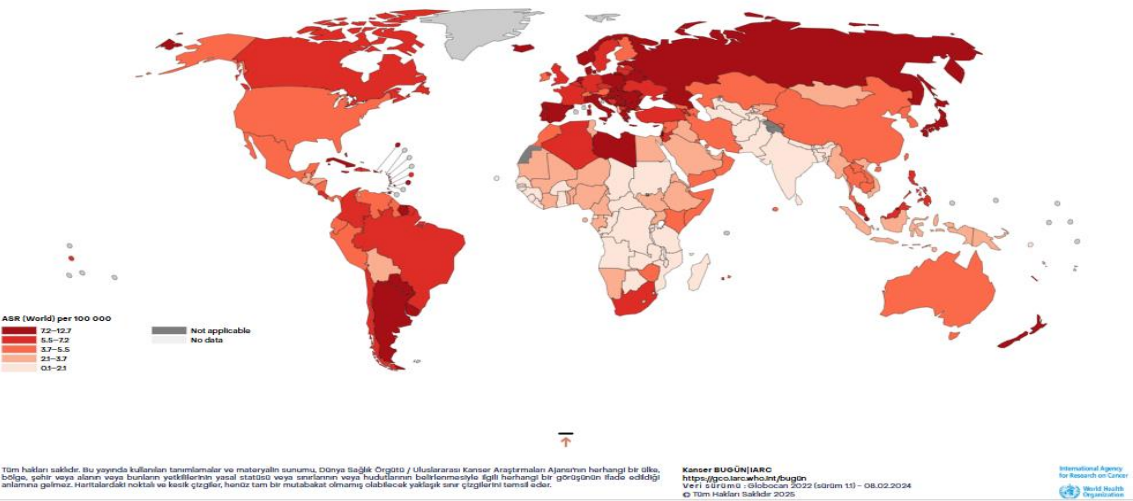
Dünya Sağlık Örgütü'nün 2022 verilerine göre, dünya genelinde 0–39 yaş aralığındaki bireylerde kolon kanseri vaka ve ölüm oranlarının 2045'e kadar bölgelere göre farklı bir seyir izleyeceği öngörülmektedir. 2022 yılında dünya nüfusu yaklaşık 7.885.070.781 iken, bu sayının 2045 yılında 9.467.543.583'e ulaşacağı öngörülmektedir. Kolon kanserine bağlı yıllık vaka sayısının ise 2022'de 1.142.286 iken, 2045'te 1.986.735'e çıkması beklenmektedir. Bu durum, vaka sayılarında toplamda %73,9 oranında bir artış anlamına gelmektedir. Aynı dönemde, kolon kanserine bağlı yıllık ölüm sayısının 538.167'den 1.005.333'e yükselmesi beklenmekte olup, bu da ölümlerde %86,8 oranında bir artışı ifade etmektedir (51, 52).

2022 yılında Afrika kıtasında 1.406.728.760 kişilik bir nüfus bulunurken, bu rakamın 2045'te 2.289.760.665'e yükselmesi beklenmektedir. 2022'de kolon kanserine bağlı ölümler 24.810 iken, bu sayının 2045'te 54.052'ye ulaşacağı öngörülmektedir. Bu da %117,9 oranında bir artışı göstermektedir. Asya kıtasında 2022 yılında nüfus 4.648.273.841 iken, 2045'te 5.248.927.585'e çıkacağı tahmin edilmektedir. Kolon kanserine bağlı ölümler 248.902'den 495.757'ye çıkarak %99,2 artış gösterecektir. Avrupa'da ise 2022'deki 747.543.827'lik nüfusun 2045'te 713.604.953'e düşeceği tahmin edilmektedir. Buna rağmen ölüm sayısında önemli bir artış gözlemlenmekte; 2022'de 160.022 olan ölüm sayısı, 2045'te 223.140'a çıkarak %39,4 artacağı düşünülmektedir. Latin Amerika ve Karayipler bölgesinde 2022 nüfusu 665.450.799 iken, 2045'te 742.562.073'e ulaşacağı öngörülmektedir. Aynı dönemde kolon kanseri ölümleri 53.756'dan 100.791'e yükselerek %87,5 oranında artış göstereceği düşünülmektedir. Kuzey Amerika'da 2022 yılında 373.318.358 olan nüfusun 2045'te 416.765.998'e çıkması beklenmektedir. Kolon kanserine bağlı ölüm sayısı ise 45.443'ten 74.020'ye çıkarak %62,9 oranında bir artış göstereceği düşünülmektedir.

Son olarak Türkiye'ye bakıldığında, 2022'deki nüfus 85.561.976 iken, bu rakamın 2045'te 94.679.262 olacağı öngörülmektedir. Kolon kanserine bağlı ölümler ise 8.295'ten 16.891'e yükselerek %103,6 oranında artış göstereceği düşünülmektedir (53). Tüm bölgelerde kolon kanseri ölümlerinde dikkat çekici bir artış gözlemlenmekte olup, bu artışların hem nüfus artışı hem de yaşam tarzı ve sağlık sistemleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 2.3 2022 Yılı küresel kolon kanseri görülme sıklığı: yaşa göre standardize edilmiş vaka oranlarının coğrafi dağılımı (her iki cinsiyet için, 100.000 kişide) (51).



Şekil 2.4 2022 Yılı küresel kolon kanseri görülme sıklığı: yaşa göre standardize edilmiş ölüm oranlarının coğrafi dağılımı (her iki cinsiyet için, 100.000 kişide) (54).

2.3.3. Yaş ve Cinsiyet

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2022 verilerine göre, dünya genelinde 0–39 yaş aralığındaki bireylerde kolon kanseri vaka ve ölüm oranlarının 2045'e kadar bölgelere göre farklılık göstermektedir. Afrika kıtasında vaka sayısında belirgin bir artış beklenmekte olup, 2022 yılında 4.362 olan yeni vaka sayısının %75,2 oranında artarak 2045'te 7.644'e ulaşacağı öngörülmektedir. Afrika'da kolon kanseri kaynaklı ölüm sayısı

2.643 iken, bu sayının 2045 yılında 4.643'e ulaşması beklenmektedir. Bu, %75,7 oranında bir artışa işaret etmektedir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 Dünyadaki 2022'den 2045'e kadar her iki cinsiyeti kapsayan [0-39] yaş aralığı tahmini yeni kolon kanseri vaka sayısı (55).

2022'den 2045'e kadar tahmini yeni vaka sayısı, İnsidans, Her iki cinsiyet, yaş [0-39]
Kolon

	Nüfus	Yıllık nüfus		Sayı	Sayıdaki değişiklik	Nüfus nedeniyle vaka sayısındaki değişim	Risk nedeniyle vaka sayısındaki değişim
	2022	2045	2022	2045			
Afrika	1 121 231 858	1 704 981 819	4 362	7 644	+75.2%	+75.2%	-
Asya	2 827 385 852	2 660 450 085	17 536	17 584	+0.3%	+0.3%	-
Avrupa	342 108 272	289 936 439	3 121	2 618	-%16,1	-%16,1	-
Latin Amerika ve Karayipler	416 702 571	372 899 648	2 904	2 789	-4.0%	-4.0%	-
Kuzey Amerika	192 229 728	188 664 066	4 670	4 848	+3,8%	+3,8%	-
Türkiye	52 614 110	46 345 927	532	487	-%8,5	-%8,5	-

Asya kıtasında ise vaka sayısında oldukça sınırlı bir artış beklenmekte; 2022 yılında 17.536 olan vaka sayısının 2045'te yalnızca %0,3 artışla 17.584'e çıkacağı tahmin edilmektedir. Asya'da 2022'de 6.154 olan ölüm sayısının 2045'te 6.176'ya yükselmesiyle %0,4 oranında bir artış öngörülmektedir. Avrupa'da kolon kanserine bağlı ölüm sayısının 2022'de 781 iken 651'e düşeceği, bu bağlamda %16,6'lık bir azalma yaşanacağı tahmin edilmekte ve vaka sayılarında bir düşüş öngörülmekte olup, 2022'de 3.121 olan vaka sayısının 2045 yılında %16,1 azalarak 2.618'e gerileyeceği düşünülmektedir. Latin Amerika ve Karayipler bölgesinde %3,1'lik sınırlı bir düşüş beklenirken, 2022'deki 2.904 olan vaka sayısının 2045'te %4 azalarak 2.789'a inmesi öngörülmektedir. Kuzey Amerika'da ise hafif bir artış söz konusudur; 2022'de 4.670 olan vaka sayısının 2045'te %3,8 artışla 4.848'e çıkacağı tahmin edilmektedir. Kuzey Amerika'da %5,9 ölüm oranında bir artış öngörülmektedir (Tablo 2.1) (Tablo 2.2).

Tablo 2.2 Dünyadaki 2022'den 2045'e kadar her iki cinsiyeti kapsayan [0-39] yaş aralığı tahmini kolon kanserinden ölüm sayısı (56).

2022'den 2045'e kadar tahmini ölüm sayısı, Ölüm oranı, Her iki cinsiyet, yaş [0-39]
Kolon

	Nüfus							
	Nüfus	Yıllık nüfus		Sayı		Sayıdaki değişiklik	Nüfus nedeniyle vaka sayısındaki değişim	Risk nedeniyle vaka sayısındaki değişim
		2022	2045	2022	2045			
	Afrika	1 121 231 858	1 704 981 819	2 643	4 643	+75,7%	+75,7%	-
	Asya	2 827 385 852	2 660 450 085	6 154	6 176	+0,4%	+0,4%	-
	Avrupa	342 108 272	289 936 439	781	651	-%16,6	-%16,6	-
	Latin Amerika ve Karayipler	416 702 571	372 899 648	1 585	1 536	-%3,1	-%3,1	-
	Kuzey Amerika	192 229 728	188 664 066	715	757	+5,9%	+5,9%	-
	Türkiye	52 614 110	46 345 927	188	180	-%4,3	-%4,3	-

Türkiye özelinde ise vaka sayısında anlamlı bir düşüş öngörülmektedir; 2022 yılında 532 olan vaka sayısının 2045'te %8,5 azalarak 487'ye gerilemesi beklenmektedir. 2022'de 188 olan ölüm sayısının 2045'te 180'e gerilemesiyle %4,3 oranında azalma yaşanacağı tahmin edilmektedir (Tablo 2.1) (Tablo 2.2). Genel olarak genç yaş grubunda; Afrika ve Kuzey Amerika'da kolon kanserine bağlı ölümler önemli ölçüde artarken, Avrupa ve Türkiye gibi bölgelerde bu oranda düşüş beklenmektedir. Bu farklılıklar, büyük ölçüde beslenme, nüfus dinamikleri ve sağlık sistemlerinin etkinliği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (57).

Dünya sağlık örgütünün 2022 yılında dünyada tüm kıtaların 40-89+ yaş aralığının değerlendirildiği verilerine göre ise; Afrika'da kolon kanseri görülme sıklığında büyük bir artış öngörülmektedir. 2022 yılında 32.038 olan yeni vaka sayısının, 2045'te %119,1 artışla 70.197'ye ulaşacağı tahmin edilmektedir. 2022 yılında 22.167 olan kolon kanseri kaynaklı ölüm sayısının, 2045 yılına gelindiğinde 49.409'a yükselmesi beklenmektedir. Bu, %122,9'luk kayda değer bir artış temsil etmektedir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3 Dünyadaki 2022'den 2045'e kadar her iki cinsiyeti kapsayan [40-85+] yaş aralığı tahmini yeni kolon kanseri vaka sayısı (58).

2022'den 2045'e kadar tahmini yeni vaka sayısı, insidans, Her iki cinsiyet, yaş [40-85+]
Kolon

	Nüfus	Yıllık nüfus		Sayı		Sayıdaki değişiklik	Nüfus nedeniyle vaka sayısındaki değişim	Risk nedeniyle vaka sayısındaki değişim
	2022	2045	2022	2045				
Afrika	285 496 902	584 778 846	32 038	70 197	+1191%	+1191%	-	
Asya	1 820 887 989	2 588 477 500	514 305	944 425	+83.6%	+83.6%	-	
Avrupa	405 435 555	423 668 514	339 221	439 792	+29.6%	+29.6%	-	
Latin Amerika ve Karayipler	248 748 228	369 662 425	93 392	170 637	+82.7%	+82.7%	-	
Kuzey Amerika	181 088 630	228 101 932	116 107	164 716	+41.9%	+41.9%	-	
Türkiye	32 947 866	48 333 335	13 191	25 310	+91.9%	+91.9%	-	

Asya kıtasında da vaka sayılarında 2022 yılında 514.305 olan vaka sayısının 2045'te %83,6 artarak 944.425'e çıkacağı öngörülmektedir. Asya kıtasında 2022'de 242.748 olan ölüm sayısının 2045'te 489.582'ye çıkmasıyla %101,7 oranında bir artış öngörülmektedir. Avrupa'da vaka sayısında 2045'e kadar %29,6 oranında bir artış beklenmektedir. 2022 yılında 339.221 olan yeni kolon kanseri vakası sayısının, 2045'te 439.792'ye ulaşacağı tahmin edilmektedir. 2022 yılında Avrupa'da 159.241 olan ölüm sayısının 2045'te 222.489'a yükselmesiyle %39,7'lik bir artış beklenmektedir. Latin Amerika ve Karayipler bölgesinde de benzer şekilde 2022'de 93.392 olan vaka sayısının, 2045'te %82,7 artarak 170.637'ye yükselmesi beklenmektedir. Amerika ve Karayipler bölgesinde 2022'de, 52171 olan ölümlerin 2045'te 99.256'ya ulaşarak %90,3 oranında

artacağı tahmin edilmektedir. Kuzey Amerika için öngörülen artış %41,9'dur. 2022'de 116.107 olan vaka sayısı, 2045'te 164.716'ya çıkacaktır. Kuzey Amerika'da da ciddi bir artış gözlenmekte olup, %63,8 oranında bir yükselişle ölümlerin 44.728'den 73.263'e çıkması beklenmektedir. Türkiye özelinde de kayda değer bir artış beklenmektedir. 2022'de 13.191 olan vaka sayısının, %91,9 oranında artarak 2045 yılında 25.310'a yükselmesi tahmin edilmektedir. 2022 yılında 8.107 olan kolon kanseri kaynaklı ölüm sayısının 2045 yılında 16.711'e ulaşacağı tahmin edilmekte ve bu, %106,1'lik bir artış anlamına gelmektedir (58, 59).

Tablo 2.4 Dünyadaki 2022'den 2045'e kadar her iki cinsiyeti kapsayan [40-85+] yaş aralığı tahmini kolon kanserinden ölüm sayısı (59).

2022'den 2045'e kadar tahmini ölüm sayısı, Ölüm oranı, Her iki cinsiyet, yaş [40-85+]
Kolon

	Nüfus	Yıllık nüfus		Sayı		Sayıdaki değişiklik	Nüfus nedeniyle vaka sayısındaki değişim	Risk nedeniyle vaka sayısındaki değişim
		2022	2045	2022	2045			
	Afrika	285 496 902	584 778 846	22 167	49 409	+122,9%	+122,9%	-
	Asya	1 820 887 989	2 588 477 500	242 748	489 582	+101,7%	+101,7%	-
	Avrupa	405 435 555	423 668 514	159 241	222 489	+39,7%	+39,7%	-
	Latin Amerika ve Karayipler	248 748 228	369 662 425	52 171	99 256	+90,3%	+90,3%	-
	Kuzey Amerika	181 088 630	228 101 932	44 728	73 263	+63,8%	+63,8%	-
	Türkiye	32 947 866	48 333 335	8 107	16 711	+106,1%	+106,1%	-

Sonuç olarak kolon kanseri vakaları 0–39 yaş grubunda daha sınırlı artışlar gösterirken, 40 yaş üstü bireylerde belirgin artışlar beklenmektedir. Bu durum, hastalığın esas olarak ileri yaş gruplarını etkilediğini ve nüfusun yaşlanmasıyla birlikte küresel kolon kanseri yükünün önümüzdeki yıllarda ciddi şekilde artacağını göstermektedir. Özellikle yaşlı popülasyonda mortalitedeki artış, tüm bölgelerde sağlık sistemleri üzerinde önemli bir baskı oluşturacaktır. Beslenme alışkanlıkları, hareketsiz yaşam tarzı, sosyo-ekonomik gelişmişlik düzeyi, demografik geçiş süreci ve yaşlanan nüfus yapısı, bu artışın başlıca belirleyicileri arasında yer almaktadır.

ABD'de yapılan bir çalışmada da 2025 yılı için bu oranlara yakın hatta daha yüksek sayıların olduğu görülmektedir. Kolon ve rektum kanserleri için tahmini yeni vaka sayısı erkeklerde 82.460 kadınlarda 71.810 olmak üzere her iki cinsiyet için toplam 154.270 'dir. Yine 2025 yılında, kolon ve rektum kanserleri nedeniyle tahmini ölüm sayısı erkeklerde 28.900, kadınlarda 24.000 olmak üzere toplamda 52.900'dır (27). Türkiye Sağlık Bakanlığı'nın 2021 verilerine göre; 2020 yılında KRK vakaları, erkeklerde kadınlara göre yaklaşık iki kat daha sık görülmüş ve her iki cinsiyette de yılda yaklaşık 20 000 yeni tanı konarak KRK, en sık görülen üçüncü kanser türü olmuştur. Tarama oranı

%30–40 arasında olup, vakaların %24,1'i ileri evrede teşhis edilmiştir. Kolorektal taramaların mortalite üzerindeki olumlu sonuçlarına ulaşmak için en az %70 oranında bir kapsama oranı sağlanmalıdır. Türkiye’de genç erişkinlerde artan insidans mevcut verilere tam olarak yansımamakla birlikte, erken tanı oranlarını artıracak geniş çaplı tarama politikalarına duyulan ihtiyaç açıktır (60).

2.4. Tanı ve Tedavi

Kolon kanserinde erken tanı, hastalığın prognozunu iyileştirmek ve sağkalımı artırmak açısından kritik öneme sahiptir. Günümüzde kolonoskopi hem tanı koymada hem de tedavi amaçlı uygulamalarda altın standart olarak kabul edilmektedir. Dışkıda gizli kan testi, DNA temelli dışkı testleri ve esnek sigmoidoskopi gibi ek yöntemler özellikle erken evre olguların saptanmasında yardımcı olmaktadır. Yüksek riskli bireylerde düzenli tarama uygulamaları hem insidans hem de mortalite oranlarında anlamlı azalma sağlamaktadır (61). Tanı sürecinde, bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi ileri görüntüleme tekniklerinin kullanımı, tümörün lokalizasyonu, evrelemesi ve metastatik yayılımının değerlendirilmesinde önemli katkılar sunmaktadır. Ayrıca, sıvı biyopsi ile dolaşımdaki tümör DNA’sı ve hücrel bileşenlerin non-invaziv olarak tespit edilebilmesi, tanı ve takip süreçlerine yenilikçi bir boyut kazandırmıştır (62). Genomik ve moleküler düzeydeki gelişmeler, kanserde tanı ve tedaviye yönelik yaklaşımları önemli ölçüde dönüştürmektedir. Bu kapsamda, dolaşımdaki tümör DNA’sı (circulating tumor DNA – ctDNA), hem araştırma hem de klinik alanda giderek daha fazla ilgi gören bir biyobelirteç haline gelmiştir. Yapılan erken dönem çalışmalar, ctDNA’nın prognoz belirleme, moleküler profillemeye ve tedavi yanıtının izlenmesi gibi alanlarda klinik anlamda değerli bilgiler sağlayabileceğini ortaya koymuştur (62).

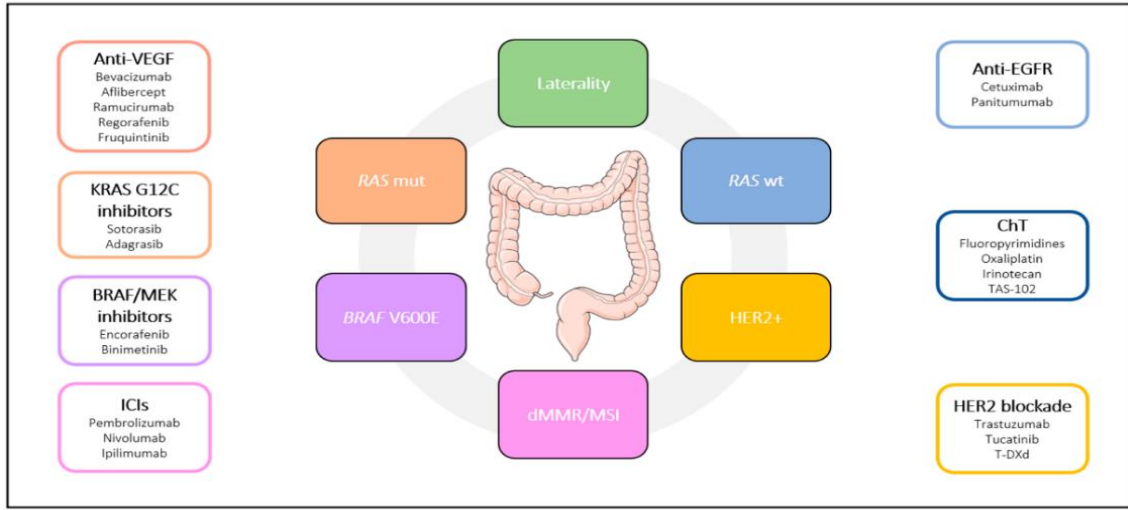
Kolon kanserinde genetik testler, kalıtsal risklerin belirlenmesi; erken tanı, tedavi planlaması ve prognoz açısından oldukça önemlidir. Bu testler hem kalıtsal (herediter) sendromları saptamak hem de sporadik kanserlerde tümöre özgü mutasyonları belirlemek için kullanılır. Lynch sendromu, sıklıkla ailesel kanser öyküsü ile ilişkilidir ve tanısal değerlendirmede Amsterdam II ve Bethesda kriterleri temel alınır. Moleküler düzeyde tanı koymak amacıyla tümör dokusu üzerinde çeşitli testler uygulanır. MMR genindeki germ hattı mutasyonu sonucu sisteminde bir bozukluk varsa, mikrosatellit instabilite (MSI) varlığını belirlemek için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli analizler yapılırken; MMR sistemine ait proteinlerin ekspresyon düzeylerini değerlendirmek için

(özellikle PMS2 ve MSH6 proteinlerinin değerlendirilmesinde duyarlı) doku kesitlerinde immünohistokimyasal (IHK) boyama tercih edilir. MSI, üç düzeyde incelenir: MSI-H (yüksek instabilite, dMMR ile ilişkilidir), MSI-L (düşük instabilite) ve MSI-S (stabil, MMR işlevseldir). Ayrıca, MLH1 kaybının sporadik nedenlerle olup olmadığını ayırt edebilmek amacıyla BRAF V600E mutasyonu ve MLH1 promotör metilasyonu testleri de tanı sürecine dâhil edilir. Bu bütüncül yaklaşım, Lynch sendromunun doğru tanılanmasında ve uygun genetik danışmanlık süreçlerinin başlatılmasında kritik rol oynar (40, 41, 63-66).

Tedavi yaklaşımlarında, lokalize hastalık varlığında cerrahi rezeksiyon genellikle temel yöntem olarak tercih edilmektedir. İleri evre olgularda ise sistemik kemoterapi tercih edilmektedir. Kolorektal kanser tedavisinde, konvansiyonel ajanlar arasında 5-fluorourasil, oksaliptin ve irinotekan yer alırken; hedefe yönelik biyolojik tedaviler, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) inhibitörleri (bevacizumab, ramucirumab, aflibercept) ile EGFR'ye karşı geliştirilen monoklonal antikorlar (cetuximab, panitumumab) gibi moleküler hedefli ajanları kapsamaktadır (67). Modern onkolojik yaklaşımlar çerçevesinde, tümör biyolojisini belirleyen moleküler belirteçler; Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), Neuroblastoma Rat Sarcoma viral oncogene homolog (NRAS), v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF) mutasyonları, tedavi yanıtının öngörülmesinde önemli araçlar olarak kullanılmaktadır. Örneğin anti-EGFR monoklonal antikorlar, özellikle RAS-wild-type hastalarda kemoterapiye eklenerek kullanılır; ancak RAS mutasyonu gelişen alt popülasyonlarda direnç ortaya çıkabilir (68).

Hedefe yönelik tedavilerin, KRK hastalarında genel sağkalımı anlamlı ölçüde artırdığı gösterilmiştir. Özellikle anti-EGFR ajanı setuksimab ve anti-anjiyogenez ajanı bevasizumab gibi tedavilerin etkinliğinin artmasıyla birlikte, çok sayıda immünolojik yolu inhibe eden yenilikçi ilaçlar geliştirilmektedir. Bu çerçevede, bağışıklık kontrol noktalarını hedef alan tedaviler benzeri görülmemiş bir hızla ilerleme kaydetmiştir. Kontrol noktalarının büyük bir kısmı, bağışıklık sistemi ile hücre büyümesi ve gelişimi gibi temel biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. Bu hedefler arasında T hücrelerine ait bağışıklık kontrol noktaları, vasküler endotel büyüme faktörü ve reseptörü (VEGF/VEGFR), epidermal büyüme faktörü ve reseptörü (EGF/EGFR), hepatosit büyüme faktörü (HGF), mezenkimal-epitelyal geçiş faktörü (c-MET), insülin benzeri büyüme faktörü ve IGF-1 reseptörü (IGF/IGF-1R), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF), Wnt/ β -katenin, Notch ve Hedgehog yolları yer almaktadır. Bu kontrol

noktaları, kolorektal kanser tedavisinde hedeflenebilecek potansiyel moleküler hedefler olarak değerlendirilmektedir (13). Kolorektal kanserde moleküler profillemeye dayalı tedavi seçenekleri aşağıda şekil 2.5’de verildi.



Şekil 2.5 Kolorektal kanserde moleküler profillemeye dayalı tedavi seçenekleri (69).

Çoklu kemoterapi ve biyolojik ajan tedavilerine yanıt vermeyen metastatik kolorektal kanserli hastalarda hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için trifluridin/tipiracil ve regorafenib, üçüncü ve sonraki basamak tedavilerinde kullanılan palyatif, yaşam uzatıcı ve hastalık kontrolüne yönelik sistemik ajanlardır (70-72). Bu tedavi yaklaşımlarının dışında MSI yüksek tümörlerde ise immünoterapötik ajanların etkinliği dikkat çekmektedir. Pembrolizumab gibi PD-1 inhibitörlerinin kullanımı artmaktadır. Bu gelişmeler, tedavi protokollerinin bireye özgü olmasını mümkün kılmaktadır (73). Son yıllarda tüm bu tedavi algoritmaları hastanın genetik profili (RAS durumu, MSI) ve tedaviye yanıt geçmişi göz önünde bulundurularak bireyselleştirilmektedir.

Tedavi sonrası takip süreci, hastalığın erken dönemde tekrarlamasını saptamak açısından kritik öneme sahiptir. Bu amaçla düzenli fiziki muayene, laboratuvar tetkikleri ve görüntüleme yöntemleri önerilmekte; ayrıca, serum karsinoembriyonik antijen (CEA) düzeyleri nüks izleminde faydalı bir biyobelirteç olarak kullanılmakta, sıvı biyopsi ve yeni nesil biyobelirteçler sayesinde rekürrens daha erken dönemde tespit edilebilmektedir (74). Kolon kanserinde genç yaş grubunda artan insidans, tarama yaşının 45’e çekilmesini gündeme getirmiştir. Dolaşımdaki tümör DNA’sı adjuvan tedavi kararlarını yönlendirirken, immünoterapi yalnızca dMMR pozitif hastalarda etkinlik göstermekte; BRAF inhibitörleri ise kemoterapiye dirençli olgular için potansiyel bir hedefli tedavi seçeneği olarak değerlendirilmektedir (75).

Kemoterapötik ajanlar, kanser tedavisinde kullanılan ve hızlı bölünen hücreleri hedef alan bileşiklerdir. Alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antitümör antibiyotikleri, bitkisel alkaloidler ve platin bileşikleri gibi sınıflara ayrılırlar. Her biri hücre döngüsünün farklı aşamalarında etkili olarak kanser hücrelerinin çoğalmasını engeller (76). Son yıllarda kemoterapötik ajanlarda önemli ilerlemeler kaydedilmiş, özellikle hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapiler ile kemoterapinin etkinliği artırılmıştır. Moleküler biyolojideki gelişmeler sayesinde, tümörün zayıf noktalarını hedefleyen ilaçlar geliştirilmiş; bu da tedavi başarısını artırırken yan etkileri azaltmıştır (77). Geleneksel kemoterapilerin en büyük dezavantajı sağlıklı hücelere de zarar vererek bulantı, saç dökülmesi, kemik iliği baskılanması ve enfeksiyon riski gibi ciddi yan etkilere yol açmasıdır. Ancak yeni nesil ajanlarla bu yan etkilerin daha hafif seyrettiği bildirilmektedir (78).

Kemoterapideki bir diğer önemli sorun ise tümör hücrelerinin ilaçlara karşı direnç geliştirmesidir. Bu direnç başlangıçtan itibaren mevcut olabileceği gibi tedavi sürecinde de gelişebilir. Direnci aşmak için kombinasyon tedavileri, doz ayarlamaları ve kişiselleştirilmiş yaklaşımlar uygulanmaktadır. Genomik analizler de direnç mekanizmalarının belirlenmesine katkı sağlayarak tedavi sürecini bireye özel hâle getirmektedir (79). Gelecek araştırmalar ise nanoteknoloji, akıllı ilaç taşıyıcı sistemler ve immünoterapi kombinasyonları gibi yenilikçi yöntemlere odaklanmakta; bu sayede ilaçların doğrudan tümöre ulaşarak etkinliğin artırılması ve yan etkilerin en aza indirilmesi hedeflenmektedir (80). Sonuç olarak, doğal ve mühendislikle tasarlanmış antikorlar, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve otoimmün bozukluklar gibi pek çok hastalığın tedavisinde yeni nesil immünoterapötikler olarak umut vaat etmektedir. Son dönemde FDA tarafından onaylanan ve tedavi algoritmalarına giren ilaçlar aşağıdaki tablo 2.5’de verildi.

Son dönem veriler, yeniden programlanmış lipit metabolizmasının özellikle artmış yağ asidi sentezi, fosfolipitlerin yeniden düzenlenmesi ve yağ asidi oksidasyonu (FAO) gibi süreçlerin kanser ilaçlarına karşı direnç gelişiminde etkili olduğunu göstermektedir. Bu süreçler, hücre zarında yapısal değişikliklere neden olmakta, ABC taşıyıcılarını aktive etmekte ve hücrelerin stres koşullarına adaptasyonunu desteklemektedir. Lipit metabolizmasına yönelik bu ve yeni yolların hedeflenmesi, ön klinik modellerde kemorezistansın tersine çevrilmesi katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (81-83).

Tablo 2.5 Kolon Kanseri Tedavisi için FDA Onaylı Kişiselleştirilmiş Hedefli İlaçlar (13).

İlaç Adı	Onay yılı	Hedeflenen biyobelirteç	Kullanım Durumu	Molekül Tipi
Cetuximab	2004	EGFR	KRAS/NRAS wild-type metastatik kolorektal kanserde	Kimerik IgG1 mAb (-ximab)
Panitumumab	2006	EGFR	KRAS/NRAS wild-type metastatik kolorektal kanserde	Tam insan IgG2 mAb (-umab)
Bevacizumab	2004	VEGF-A	Tüm KRAS tiplerinde, kemoterapiyle birlikte ilk basamak tedavide	Humanize IgG1 mAb
Ziv-aflibercept	2012	VEGF-A, VEGF-B, PlGF	Bevacizumab sonrası progresyon gelişen hastalarda kullanılır	Rekombinant protein:VEGF tuzağı (füzyon proteini)
Ramucirumab	2015	VEGFR-2	İkinci basamak (FOLFIRI ile birlikte)	Humanize IgG1 mAb
Nivolumab	2017	PD-1	MSI-H veya dMMR metastatik kolorektal kanserde (immünoterapi)	Tam insan IgG4 mAb
Pembrolizumab	2017	PD-1	MSI-H veya dMMR metastatik kolorektal kanserde (immünoterapi)	Humanize IgG4 mAb
Regorafenib	2012	VEGFR1-3, EGFR, PDGFR, KIT, BRAF, BRAF ^{V600E} mutasyonu vb.	Daha önce kemoterapi (FOLFOX, FOLFIRI), anti-VEGF veya anti-EGFR tedavisi almış ve ilerleme göstermiş metastatik kolorektal kanserli hastalarda	Küçük molekül multi-kinaz inhibitörü. (antianjiyogenez etkisi var, Oral)
İpilimumab	2018	CLTA-4	Nivolumab ile ipilimumab kombinasyon halinde, MSI-H/dMMR tümörlerde kullanılır. (T hücre inhibisyonunu engeller)	Tam insan mAb (-umab), (İmmün kontrol noktası inhibitörü)
Encorafenib	2018	BRAF ^{V600E}	BRAF V600E mutasyonu taşıyan metastatik kolorektal kanser hastalarında, cetuximab ile kombine kullanılır.	Küçük molekül BRAF inhibitörü
Atezolizumab	2016	PD-L1	Klinik çalışmalarda (MSI-H/dMMR veya mikrobiyota odaklı tedavilerde). Kolorektal kanser için henüz FDA onayı yoktur.	Humanize mAb

2.5. Yağ Asitleri

Yağ asitleri, terminal bir karboksil grubuna (-COOH) sahip alifatik monokarboksilik asitler olup, hidrokarbon zinciri uzunluğuna ve çift bağ içerip içermemesine göre sınıflandırılır. Doymuş yağ asitleri, zincirlerinde çift bağ içermeyen ve düz yapılı bileşiklerdir; kısa (4–6 karbon), orta (8–12 karbon) ve uzun zincirli (14 ve üzeri karbon) alt tiplere ayrılır. Doymuş yağ asitleri; süt ürünleri, hindistancevizi yağı, palmiye yağı, kırmızı et ve tereyağı gibi kaynaklarda bulunur (84). Doymamış yağ asitleri, MUFA ve PUFA olarak sınıflandırılır. En yaygın MUFA örneği olan oleik asit, gen ekspresyonu ve hücre sel sinyal yollarını etkileyerek anti-inflamatuar ve antioksidan etkiler gösterir. PUFA'lar ise hücre zar yapısı, sinyal iletimi ve eikozanoid sentezinde rol alır. Oleik asitten türetilen oleoylethanolamide (OEA), enerji dengesi üzerinde etkili olup metabolik hastalıklarda terapötik potansiyel taşımaktadır (85). Hücre zarının lipit bileşimindeki değişikliklerin kanser gelişiminde rol oynadığı, özellikle omega-3 PUFA'ların zar akışkanlığını düzenleyerek kanser hücrelerinin biyolojik davranışlarını etkileyebileceği bildirilmiştir (86). Linoleik asit (18:2, n-6, omega-6), memeliler tarafından sentezlenemeyen ve bu nedenle esansiyel olarak kabul edilen bir çoklu doymamış yağ asididir. Mısır, soya fasulyesi ve aspir tohumu gibi bitkisel yağlarda bol miktarda bulunan linoleik asit, endojen enzimatik yollarla araşidonik aside (20:4, n-6, omega-6) dönüştürülebilir. Araşidonik asit ise prostaglandinler, tromboksanlar ve lökotrienler gibi biyolojik açıdan aktif lipit medyatörlerinin prekürsörü olarak görev yapar ve bu sayede inflamasyon, immün yanıtlar ve hücre proliferasyonu gibi birçok fizyolojik sürecin düzenlenmesinde kritik rol oynar (87).

Son yıllarda, kanser hücrelerinin enerji gereksinimlerini karşılamak amacıyla yağ asidi metabolizmasını yeniden programladığı ve bu durumun, lipit metabolizmasını antikanser hedefleme açısından ön plana çıkardığı gösterilmiştir (88, 89). Aynı zamanda, bağışıklık hücrelerinin metabolik yeniden programlanmasında yağ asitlerinin işlevi giderek daha iyi anlaşılmış, özellikle yağ asidi oksidasyonu gibi yolların immün yanıtları hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar yönde etkileyebileceği ortaya konmuştur (90, 91). Lipit metabolizması, tümör hücrelerinin çevresel streslere adaptasyonu ve proliferasyonu açısından merkezi bir rol üstlenmekte olup, bu süreçte hem yağ asidi hem de kolesterol metabolizması etkili olmaktadır (92, 93).

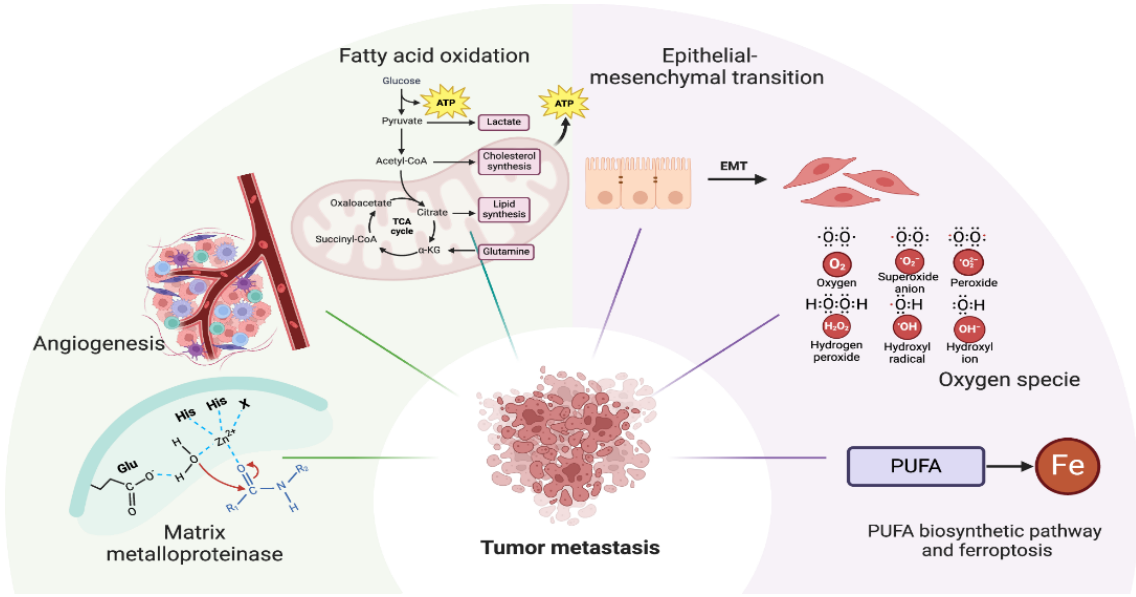
Özellikle radyoterapi bağlamında, yağ asidi metabolizmasının anti-tümör bağışıklık tepkilerini şekillendirdiği ve tümör mikroçevresindeki metabolik sinyallere

yanıt olarak bağışıklık sistemini önemli ölçüde etkileyebileceği gösterilmiştir (94). Kanserin tedaviye direnci, en büyük zorluklardan biridir ve bu dirençte lipit metabolizmasındaki yeniden programlama önemli bir rol oynar. Kanseri hücreleri, lipit metabolizmasını yeniden düzenleyerek bağışıklık sisteminden kaçınır ve tedaviye karşı direnç geliştirir. Bu süreç, tümör mikroçevresiyle kurdukları karmaşık etkileşimlerle desteklenir. Bu mekanizmaların daha iyi anlaşılması, dirençli hastalarda daha etkili tedavi kombinasyonlarının geliştirilmesine katkı sağlayabilir (95).

2.6. Hücre Zarındaki Yağ Asitlerinin Rolü

Hücre zarının temel yapı taşlarından biri olan yağ asitleri, zarın bütünlüğü, akışkanlığı ve işlevselliği için hayati öneme sahiptir. Hücre membranında fosfolipitlerin yapılarını oluşturan yağ asitleri, zarın esnekliğini ve geçirgenliğini belirler. Doymamış yağ asitlerinin oranı arttıkça membran daha akışkan hale gelirken, doymuş yağ asitlerinin fazla olması zarın daha esnek olmayan yapıda olmasına yol açar. Bu dinamik yapı, hücresel sinyal iletimi ve madde alışverişinin etkin bir şekilde sağlanmasını mümkün kılar (96). Yağ asitlerinin hücre zarı üzerindeki bir diğer önemli rolü, zar proteinlerinin yerleşimi ve fonksiyonları üzerindeki etkileridir. Hücre zarında bulunan reseptörler, iyon kanalları ve taşıyıcı proteinler, çevrelerindeki lipit ortamının fiziksel ve kimyasal özelliklerinden doğrudan etkilenir. Özellikle doymamış yağ asitlerinin fazlalığı, bazı membran proteinlerinin fonksiyonunu artırabilirken, doymuş yağ asitleri veya kolesterol oranının fazlalığı bu proteinlerin hareketini kısıtlayabilir (97).

Yağ asitleri, hücre zarında sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde de görev alır. Özellikle omega-3 ve omega-6 gibi çoklu doymamış yağ asitleri, hücre zarında eikozanoidler ve diğer sinyal moleküllerinin sentezinde öncül olarak kullanılır. Bu moleküller, inflamasyon, bağışıklık yanıtı ve hücresel büyüme gibi birçok fizyolojik sürecin düzenlenmesinde kritik rol oynar. Ayrıca, “lipid rafts” adı verilen zarda özel lipit alanları, sinyal proteinlerinin bir araya gelmesini kolaylaştırarak hücresel yanıtların hızlanmasını sağlar (98). Doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri bazı kanser türlerinde biyobelirteç olarak kullanılabildiği de novo PUFA sentezi ve desaturaz aktivitesine ilişkin bulguların bu alandaki yeni gelişmeler arasında yer aldığı bildirilmektedir. Yağ asitleri, obezite ve kanser ilişkisiyle birlikte tanı, tedavi ve beslenme stratejilerinde önemli bir yer tutmaktadır (99).



Şekil 2.6 Kolorektal kanser metastazında yağ asidi metabolizmasıyla ilişkisi (100)

Hücre zarındaki yağ asitlerinin kompozisyonu, oksidatif stres ve hücresel yaşlanma süreçlerinde de belirleyici olabilir. Doymamış yağ asitleri, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek lipid peroksidasyonu adı verilen hasara yol açabilir. Bu durum, hücre bütünlüğünün bozulmasına ve özellikle nörodejeneratif ile kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere çeşitli hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir. Zar lipidlerinin dengesinin korunması, hücresel sağlığın sürdürülmesi açısından kritik öneme sahiptir (101). Yağ asitlerinin hücre zarı aracılığıyla ilaçların ve terapötik ajanların hücreye alımında da önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir. Özellikle kanser hücrelerinde, zar lipid kompozisyonundaki değişiklikler kemoterapiye duyarlılığı etkileyebilir ve ilaç direncinin gelişmesine katkıda bulunabilir. Bu nedenle, hücre zarının lipid bileşiminin hedeflenmesi, yeni nesil tedavi stratejileri için potansiyel bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (102).

2.7. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri, hücresel metabolizmanın yan ürünleri olarak ortaya çıkar ve başta mitokondriler olmak üzere çeşitli hücresel organellerde üretilir. Düşük dozlarda fizyolojik koşullarda, ROS hücresel sinyal iletimi ve savunma mekanizmalarında önemli rol oynar. Ancak aşırı üretimleri hücresel hasara neden olabilir (103). Serbest radikaller, elektron kaybederek veya kazanarak diğer moleküllerle kolayca reaksiyona girerler. Bu reaktivite, özellikle oksidatif stres durumlarında önemli biyolojik sonuçlar doğurabilir. Mitokondriyal solunum zinciri, hücrede ROS üretiminin başlıca kaynağıdır ve özellikle

süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\bullet OH$) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi moleküllerin açığa çıkmasına neden olur. Bunun yanı sıra, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oksidaz, NOX), peroksisomlar ve sitokrom P450 enzimleri de hücrede ROS üretiminde önemli rol oynar.

Mitokondriyal ROS (mtROS), hücre içi homeostazı kontrol etmekte ve aşırı üretildiğinde oksidatif hasara yol açmaktadır. Özellikle enerji ihtiyacının arttığı veya mitokondriyal işlevin bozulduğu durumlarda mtROS üretimi de önemli ölçüde artar (104).

Hücre içindeki çeşitli enzim ve organellerin etkisiyle, ROS seviyeleri sürekli değişim göstererek kontrol altında tutulur. Bu türler, hücresel bileşenlerle etkileşime girerek hücre zarlarına, proteinlere, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilir. Bu durum, hücre döngüsü kontrolünü bozar ve tümör progresyonunda anahtar rol oynar. Lipit peroksidasyonun başlatıcı rolü, kanser biyolojisinin anlaşılmasında önemli bir yere sahiptir. Sonuç olarak, hücre ölümü, mutasyonlar ve doku hasarı gibi ciddi biyolojik etkiler ortaya çıkabilir (105, 106).

Diğer taraftan hücreler, glutatyon, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan sistemlerle ROS seviyelerini dengelemeye çalışır. Bu antioksidan savunmaların yetersiz kaldığı durumlarda oksidatif stres ortaya çıkarak hücresel işlevler bozulmasına ve hücre ölüm mekanizmalarının tetiklenmesine neden olur (107-110).

Bağışıklık sistemi hücrelerinde, özellikle fagositlerde ROS üretimi patojenlerin yok edilmesinde kritik rol oynar. Ancak aşırı ROS üretimi doku hasarına ve iltihabın kronikleşmesine yol açabilir (111). Son yıllarda yapılan araştırmalar, ROS'un hem hücre sağ kalımını destekleyen hem de hücre ölümünü tetikleyen karmaşık bir dengeye sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle ROS, kanser hücrelerinin hedeflenmesinde yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önem kazanmıştır (112). Sonuç olarak, ROS'un üretimi ve detoksifikasyonu arasındaki dengenin bozulması, birçok hastalığın ortaya çıkışında temel bir mekanizma olarak görülmektedir. Bu nedenle, ROS'un biyolojik etkilerini ve regülasyonunu anlamak klinik uygulamalar için büyük önem taşır (113).

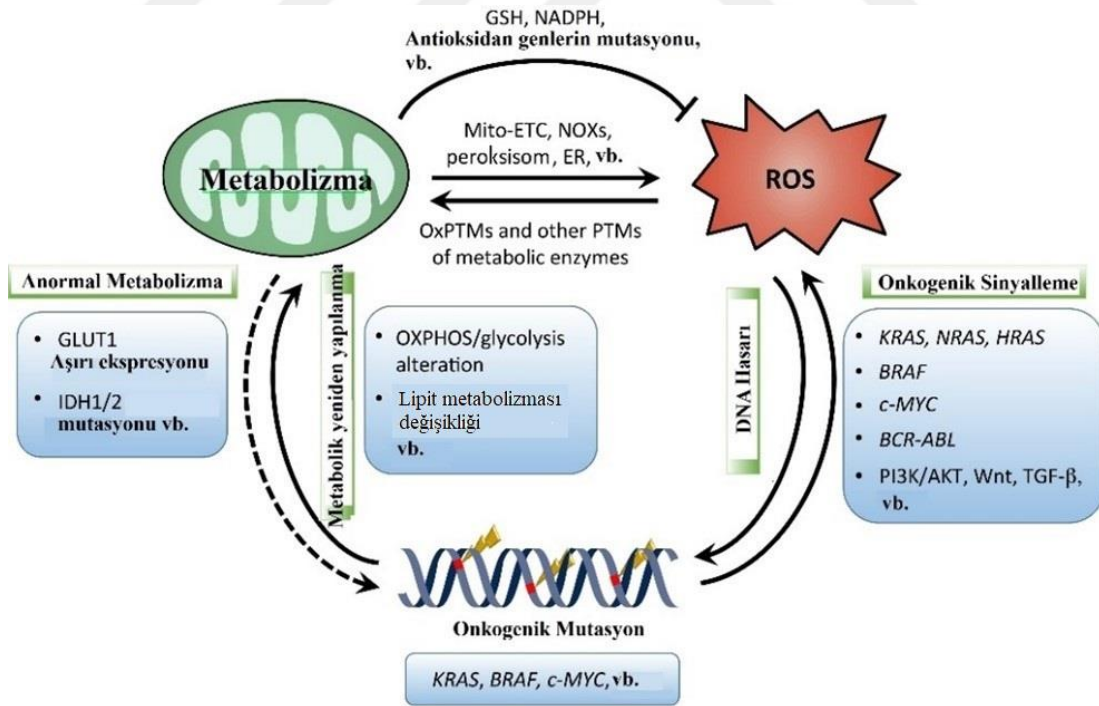
2.8. ROS ve Kanser İlişkisi

Reaktif oksijen türleri, lipit, protein ve DNA'ya zarar vererek oksidatif strese yol açar ve bu durum kanserin başlangıcı ile ilerleyişinde kritik bir rol oynar (114, 115). Kanser hastalarında genellikle lipit peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehitin (MDA) seviyelerinin yükseldiği, buna karşın antioksidan enzim düzeylerinin azaldığı

bildirilmiştir (114). Aynı zamanda ilaç direncinin gelişiminde de etkili olan ROS, dirençli kanser hücrelerinde artmış düzeylerde ve tedaviye yanıtı azaltan önemli bir düzenleyici olarak rol oynar (116).

Başlıca kaynağı mitokondriler olan ROS'un, bu üretimi dengelemek amacıyla Prdx3 ve Prdx5 gibi mitokondriyal antioksidan enzimlerle desteklenir. Bu enzimlerin çeşitli kanser türlerinde yukarı regüle olduğu ve tümör gelişimi ile kemoterapi direnciyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (117). Çoklu ilaç direnci (MDR) durumunda hem ROS düzeyleri hem de antioksidan savunma mekanizmaları artar ve bu hücreler ROS seviyelerindeki değişikliklere karşı daha hassas hale gelir. Bu bağlamda, ROS'u modüle eden ajanlar, MDR hücreleri hedefleyerek kemoterapötik ilaçlara duyarlılığı artırmada potansiyel taşıyıcıdır (118).

Reaktif oksijen türlerinin hem tümör hücre proliferasyonunu destekleyen hem de uygun koşullarda hücre ölümünü tetikleyen çift yönlü etkileri bulunur. Tümör hücreleri hayatta kalmak için gelişmiş antioksidan sistemler geliştirerek yükselmiş ROS düzeylerini dengeler ve bu değişmiş redoks dengesi, ROS'u hedef alan tedavi stratejileri açısından umut verici bir yaklaşım sunar (112).

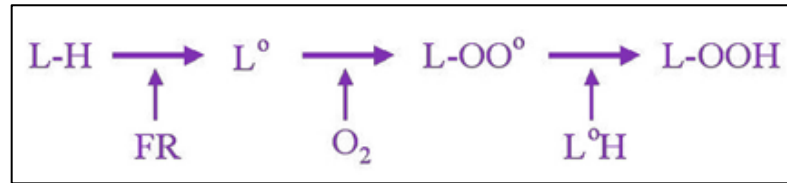


Şekil 2.7 Metabolik bozulma ve onkogenik mutasyonlar arasındaki geri besleme mekanizması (119).

Farklı kaynaklardan gelen ROS, tümörler üzerinde zıt etkilere sahip olabilir ve aynı kaynaktan gelen ROS bile farklı tümör tiplerinde farklı etkiler gösterebilir (120).

2.9. Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu, hücre zarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller tarafından oksidasyona uğramasıyla ortaya çıkan karmaşık bir biyokimyasal süreçtir. Bu sürecin, zar bütünlüğünün değişmesine, hücre ömrünün olumsuz etkisine ve çeşitli hastalıkların tetiklenmesine neden olabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, lipit peroksidasyonunun birçok kronik hastalık ve iyileşme süreciyle birlikte onarılmasıyla ortaya çıkmıştır (121). Serbest radikaller, özellikle ROS'lar, lipit peroksidasyonunun başlatıcısı olarak görev yapar. Bu moleküller, organizmada çeşitli metabolik süreçler sırasında doğal olarak oluşmakla birlikte, çevresel toksinler, iyonize radyasyon ve bazı ilaçlar gibi dış etmenlere maruziyetle de artış gösterebilir. Lipit peroksidasyonunun ilk aşaması, hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomunun koparılması ile başlar ve bu aşama “inisiyasyon” olarak adlandırılır (122). Lipit peroksidasyonunun ilerleyen aşamalarında, lipit radikallerinin oksijenle reaksiyona girerek lipit peroksil radikallerini ve ardından lipit hidroperoksitlerini oluşturan “yayılım” evresi gerçekleşir. Bu süreç, zincir sistemleri şeklinde hızlı bir şekilde dağılır ve zar lipitlerinde ciddi hasara yol açar. Son aşama ise “sonlandırma” olarak bilinir; burada radikal parçalar sona erer ve çeşitli son ürünler oluşur (123). Lipit peroksidasyonun zincir reaksiyonunu tanımlayan şematik gösterimi şekil 7.1’de sunulmuştur (124).



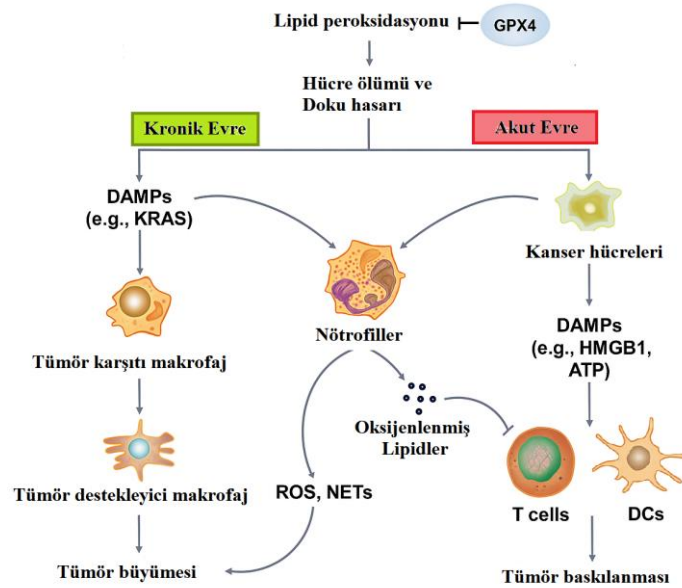
Şekil 2.8 Lipit peroksidasyon şematik gösterimi

Lipit peroksidasyonunun en önemli biyokimyasal göstergelerinden biri MDA ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi aldehit örnekleridir. Bu moleküller, proteinler, DNA ve diğer biyomoleküllerle reaksiyona girerek toksik reaksiyonlar ortaya çıkar. Özellikle 4-HNE'nin hücre sinyali, gen ifadesi ve apoptoz gibi işlevlerde önemli tamamlayıcı rolleri mevcuttur (125). Lipit peroksidasyonu ve ürünlerinin; diyabet, kanser, nörodejeneratif hastalık ve inflamatuvar hastalıklar gibi birçok kronik hastalık patogeneğinde kritik rol oynadığı belirtilmektedir.

2.10. Kanser ile Lipit Peroksidasyon İlişkisi

Lipit peroksidasyonu, hücre zarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller tarafından oksidasyonu ile meydana gelir. Bu süreç, hücre membran bütünlüğünün bozulmasına, sinyal iletiminde aksaklıklara ve DNA hasarına yol açabilir. Özellikle kanser gelişiminde lipit peroksidasyonun rolü, oksidatif stresin artmasıyla birlikte DNA mutasyonlarının ve genetik instabilitenin tetiklenmesiyle ilişkilidir. Bu biyokimyasal süreç, hücrelerin apoptozdan kaçmasına ve tümör oluşumuna zemin hazırlayabilir (101).

Lipit peroksidasyonun ara ürünleri olan malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksi-nonenal (4-HNE), hücresel protein ve DNA ile reaksiyona girerek fonksiyonel bozukluklara neden olur. Bu moleküller, hücrede apoptozu baskılayarak kanser hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyebilir. Ayrıca, bu ürünlerin onkogenik sinyal yollarını aktive ettiği ve tümör mikroçevresinde inflamasyonu artırarak kanser gelişimini beslediği gösterilmiştir (125). Lipit peroksidasyonu, tümör mikroçevresinde hem tümör büyümesini teşvik edici hem de baskılayıcı etkiler gösterebilir. Bir yandan kronik inflamasyonu tetikleyip makrofajların tümör destekleyici hale gelmesine ve DAMP'lerin (Damage-Associated Molecular Patterns) salınımıyla tümörün büyümesine katkıda bulunabilir. Öte yandan, aşırı lipit peroksidasyonu tümör hücrelerini öldürerek bağışıklık hücrelerini tümör bölgesine çekip tümör büyümesini engelleyebilir (Şekil 2.7) (126).



Şekil 2.9 Kanserde lipit peroksidasyonun ikili rolü (126).

Son yıllarda yapılan klinik araştırmalar, lipit peroksidasyon düzeylerinin bazı kanser türlerinde tanı ve prognoz belirteci olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca, lipit peroksidasyonu azaltmaya yönelik terapötik ajanların geliştirilmesiyle, kanser tedavisinde yeni stratejiler ortaya çıkmaktadır. Bu ajanlar hem tümör büyümesini yavaşlatmak hem de tedaviye duyarlılığı artırmak amacıyla umut vadetmektedir (107).

2.11. Sapienik Asidin Biyolojik Önemi

Hekzadekenoik yağ asidi izomerlerinin biyobelirteç potansiyelini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada kimyasal biyoloji temelli bir yaklaşım geliştirilerek, bu izomerlerin insan plazmasındaki dağılımını ve tanımlanmasını detaylı şekilde incelemişlerdir. İnsan vücudunda bulunan tekli doymamış hegzadekenoik yağ asitlerinin, özellikle palmitoleik asit (9-cis-16:1) ve sapienik asidin (6-cis-16:1), plazma lipidomik analizlerde biyobelirteç olarak potansiyel rolüne odaklanmaktadır (127). Sapienik asit, kanser hücre zarında yapısal ve işlevsel rol oynayan özel bir tekli doymamış yağ asididir. Palmitik asitten delta-6 desaturaz (FADS2) aracılığıyla sentezlenir ve özellikle insan sebumunda bol miktarda bulunur (12). Palmitik asitten türeyen bu izomerlerin metabolik ve fizyolojik işlevleri giderek daha fazla önem kazanmakta olup, özellikle sapienik asidin trans izomerinin ilk kez tanımlanması bu alandaki literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır. Çalışmada geliştirilen analitik yaklaşımlar sayesinde, 16:1 yağ asidi izomerlerinin çift bağ pozisyonu ve geometrisi kesin olarak belirlenmiş; bu da düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve plazma kolesterol ester fraksiyonlarında söz konusu izomerlerin kantitatif olarak analiz edilmesini mümkün kılmıştır. Elde edilen bulgular, hegzadekenoik yağ asitlerinin lipit metabolizmasındaki yerini ve serbest radikal aracılı izomerizasyon gibi endojen süreçlere bağlı oluşumunu aydınlatmakta, bu lipitlerin oksidatif stres ve diğer sağlık durumlarıyla ilişkili olarak değerlendirilmesinin önünü açmaktadır. Sonuç olarak, tekli doymamış hegzadekenoik yağ asitlerinin plazma lipidomikleri kapsamında değerlendirilmesi, çeşitli metabolik ve patofizyolojik durumların tanısında ve izleminde yeni perspektifler sunmaktadır (128).

Palmitik asit metabolizmasında delta-6 desaturaz enzimiyle oluşan sapienik asit, kanser hücrelerinde n-10 serisi PUFA sentezini artırabilir. Caco-2 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, sapienik asit uygulamasıyla membran fosfolipitlerinde ve trigliseritlerde değişikliklere yol açtığı, doymuş yağlar azalttığı, n-10 PUFA arttırdığı ve kolesterol esterleri sadece sapienik asit varlığında oluştuğu bulunmuştur. Ayrıca, sapienik asidin en az toksik olan yağ asidi olarak bulunmuş ve membran akışkanlığını artırmıştır. Bu

bulgular, MUFA izomerlerinin ve de novo PUFA sentezinin lipidomik ve kanser araştırmalarında önemli olduğunu göstermektedir (129).

Kanser hücreleri, palmitatı FADS2 enzimi ile sapienata dönüştürerek lipit metabolizmasında esneklik gösterir. FADS2 ifadesi, mTOR (Rapamisin Hedefi Mekanizması / Memeli TOR Hedefi) sinyali ve SREBP-1 (Sterol Düzenleyici Eleman Bağlayıcı Protein 1) aktivitesi ile ilişkilidir ve bazı kanserlerde kötü prognozla bağlantılıdır. Bu mTOR sinyalinin artması FADS2 ve sapienat üretimini artırırken, mTOR inhibisyonu bu süreci azaltır. Bu nedenle, mTOR sinyal yolunu hedeflemek, kanserde sapienat metabolizmasını kontrol altına alabilir (130).

Sapienik asidin kanser tedavisindeki rolünü araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada; sapienik asitten yeni bileşikler (N-sapienoyl amino asitler) sentezlenmiştir. Bu bileşikler ile dört farklı kanser hücresinde test edilmiş ve N-sapienoyl izolösin bileşiği    kanser hücresine karşı etkili olmuştur. Dolayısıyla, bu yeni bileşiklerden bazıları kanser hücrelerine karşı potansiyel tedavi maddesi olabileceği öne sürülmüştür (131).

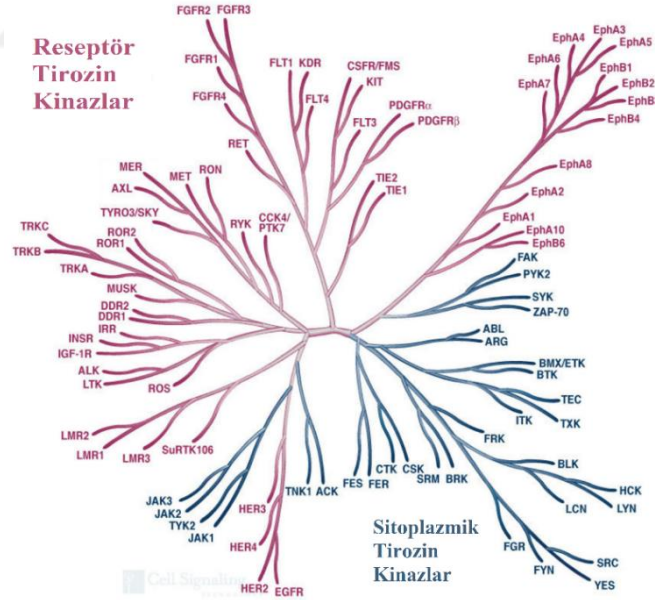
Tekli doymamış yağ asitleri sağlık biyobelirteçleri olarak da önem kazanmaktadır. Morbid obez kişilerde, eritrosit membranlarında sapienik asit ve palmitik asit artarken, plazma kolesterol esterlerinde bu eğilim tersine dönmektedir. Ayrıca, obezlerde stearik asit ve omega-6 yağ asitleri artarken, oleik asit ve omega-3 DHA azalmaktadır. Trans yağ asitleri de her iki lipit sınıfında yükselmiştir. Bu bulgular, C16 MUFA izomerlerinin yeni metabolik belirteçler olarak potansiyelini ve lipit profillerinin doğru yorumlanması için lipit türlerine dikkat edilmesi gerektiğini göstermektedir (128).

Bazı kanser hücreleri, yağ asidi doymunluğunda Stearoyl-CoA desaturaz (Δ -9-desaturaz veya SCD) enzimi yerine alternatif olarak FADS2 enzimiyle sapienat adlı yağ asidini üretir. Bu durum, SCD inhibitörlerine karşı direnç gelişmesine katkıda bulunur. Sapienat, kanser hücrelerinde membran yapısında kullanılır ve hücrelerin çoğalmasını destekler. Hem SCD hem FADS2'nin birlikte engellenmesi tümör büyümesini azaltabilir. İnsan karaciğer ve akciğer kanserlerinde de sapienat metabolizması artmıştır. Sonuç olarak bu durum, kanserlerin yağ asidi metabolizmasında yeni bir adaptasyon biçimi olarak değerlendirilmektedir (132). Yağ asidi metabolizması ve özellikle FADS2 enziminin düzensizliği çeşitli kanser türlerinde yapılan bir çalışmada; FADS2 aktivitesi meme kanseri gibi durumlarda değişerek farklı yağ asitlerinin üretimine yol açmaktadır. Bazı kanser hücreleri (melanom, prostat, karaciğer, akciğer) SCD inhibitörlerine dirençli olup, FADS2 ve SA biyosentezini artırabilir. Hepatosit karsinomu hastalarında serumda bir omega-9 yağ asidi olan mead asit seviyelerinin yükselmesi FADS2 yoluna dikkat

çekmektedir. Ayrıca, FADS2'nin dairesel RNA formları kolorektal ve akciğer kanserlerinde yüksek olup, kolorektal kanserde kötü sağ kalımla ilişkilidir. Bu bulgular, FADS2'nin kanserde hem tümör gelişimini etkileyen hem de potansiyel tedavi hedefi olabilecek önemli bir molekül olduğunu göstermektedir (133). Kanser hücrelerinde SA'nın ve türevi sebaleik asidin metabolizması, hücre zarının akışkanlığını, sinyal yollarını ve invazivliği etkileyebileceği özellikle meme kanseri hücrelerinde SA takviyesi, EGFR-AKT-mTOR yolunu aktive ederek hücre içi onkojenik sinyalleme artırıldığı bildirilmiştir. Bu nedenle SA ve n-10 yağ asitleri, kanser biyolojisinde yeni terapötik hedefler olabilir (12).

2.12. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Yolağı

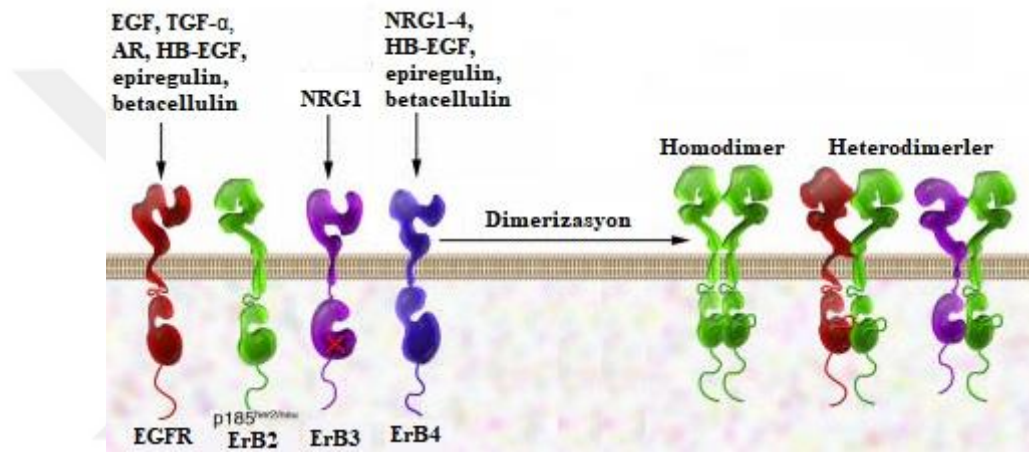
İnsan Genomu Projesi'nin tamamlanmasının ardından, protein tirozin kinaz ailesine yönelik kapsamlı analizler, bu gen ailesinin özellikle kanser gibi hastalıklarla olan ilişkisini ortaya koymuştur. Genom taramaları sonucunda, beşi psödogen (protein kodlamayan gen) olmak üzere toplam 90 benzersiz tirozin kinaz geni tanımlanmıştır. Bu genlerin 58'i reseptör tirozin kinaz (RTK) olarak 20 alt aileye, 32'si ise reseptör olmayan tirozin kinaz olarak 10 alt aileye ayrılmıştır (134).



Şekil 2.10 Tirozin kinaz ailesi (135)

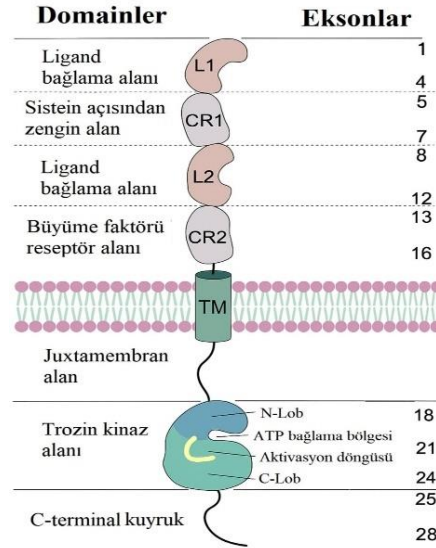
EGFR'nin kanserle ilişkisi ilk olarak, eritroblastik lösemi virüsü ile ilişkili onkogen homologu / insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (v-ErbB/Her) onkogeninin insan EGFR'sinin mutant bir versiyonu olduğunun bulunmasıyla anlaşılmıştır. ErbB ailesi, dört transmembran proteinden oluşan (ErbB1/EGFR/Her1,

ErbB2/Her2/Neu, ErbB3/Her3 ve ErbB4/Her4) bir RTK ailesidir. Bu reseptörlerden ErbB3'ün kinaz aktivitesi yani bir enzimin başka bir moleküle özellikle bir proteine fosfat grubu eklemesi (fosforilasyon) yeteneği bulunmazken, ErbB2'nin bilinen bir ligandı yani bir reseptöre (alıcı moleküle) spesifik şekilde bağlanabilen molekülü yoktur ve başka reseptörlerle dimer (çift yapılu bir kompleks) oluşturarak işlev görürler. RTK'lar ligand afinitesi (bağlanması) sonrası (ErbB2 hariç) homodimer (örneğin EGFR–EGFR) ya da heterodimer (örneğin EGFR–ErbB2) oluşturarak reseptörün otofosforilasyonunu yani hücre içindeki tirozin kalıntıları (tirozin amino asitleri) üzerine fosfat grubu (PO_4^{3-}) eklenmesiyle başlatır (136).



Şekil 2.11 ErbB reseptör ailesi üyeleri ve ligand bağlanması sonrası dimerizasyon mekanizması (137)

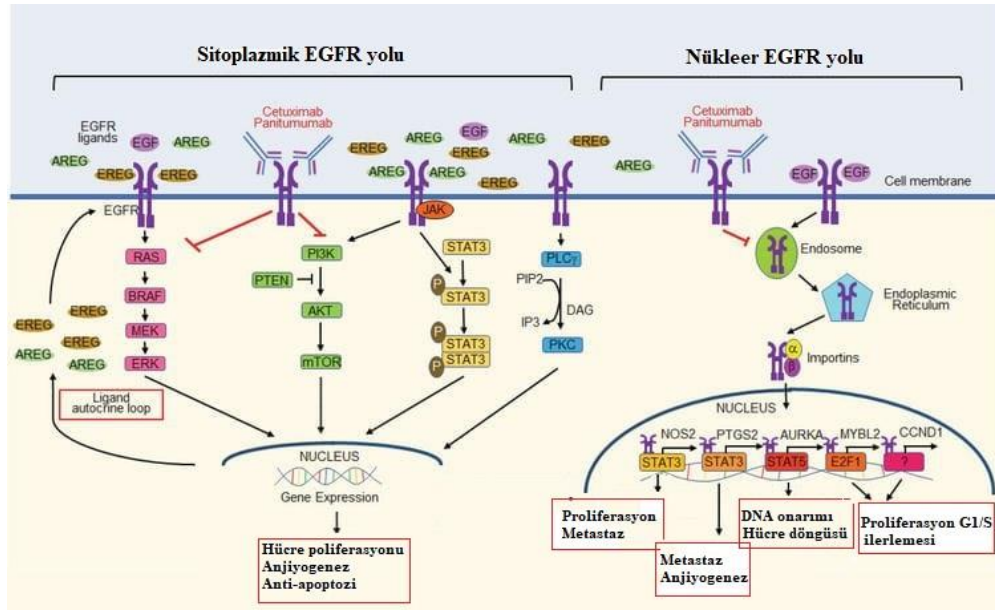
ErbB ailesini aktive edebilen ligand sayısının evrimsel süreçte artış gösterdiği bilinmektedir. *C. elegans*'ta tek bir ligand, *Drosophila*'da dört ligand bulunurken, memelilerde bir düzineden fazla EGFR ligandı tanımlanmıştır (138). Bu ligandlar, hücre dışı bölgelerinde sistein açısından zengin EGF-benzeri motifler içeren TGF- α , EGF, Amphiregulin (AREG), Betacellulin (BTC) ve Epiregulin (EREG) gibi erken tanımlanan ligandlar ile başlar. Bu moleküller, EGFR'ye yüksek afiniteli bağlanarak güçlü ve kısa süreli proliferatif sinyaller oluştururlar (139).



Şekil 2.12 Epidermal büyüme faktörü reseptörünün yapısı (140)

EGFR, hücre dışında ligandları tanıyıp dimerleşmeyi başlatan dört domainli bir dış bölgeye, sinyalin iletimini sağlayan tek alfa heliks yapıları bir transmembran bölgeye, ligand bağlanınca aktive olup ATP'den aldığı fosfatı kendi tirozinlerine aktaran tirozin kinaz iç bölgesine ve fosforile tirozinleriyle SH2/PTB içeren adaptör proteinleri bağlayarak farklı sinyal yollarını başlatan C-terminal düzenleyici kuyruk bölgesine sahip bir reseptördür. Ligandların bağlanması, reseptörün homodimerizasyonunu tetikler ve bu durum tirozin kinaz alanının konformasyonel aktivasyonuna yol açar (141).

Oto-fosforilasyonun ardından, Fosfatidilinozitol 3-Kinaz (PI3K)/ Protein Kinaz B (AKT)/ memelilerde tapamisin hedefi (mTOR) yolağı, hücre dışı sinyalle uyarılan protein kinaz yolu (MAPK) yolağı ; rat sarkomu virüsüne benzer onkogen homologu (RAS)/ hızlı Artan fibrosarkom (RAF) / mitojenle aktive olan protein kinaz kinazı (MEK)/ hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), fosfolipaz C gama (PLC γ) / protein kinaz C (PKC) yolağı , janus kinaz (JAK)/ sinyal iletili transkripsiyon aktivatörü (STAT) yolağı gibi çeşitli hücre içi pro-onkogenik sinyal kaskadlarını tetiklerler (142, 143).



Şekil 2.13 EGFR aktivasyonu sonrası hücre içi sinyal yolları ve hücresel sonuçları (144)

EGFR, hücre çoğalması, farklılaşması ve gelişimi için kritik bir reseptördür; aynı zamanda kanserin ilerlemesi ve tedavi direnciyle bağlantılıdır. ErbB ailesi ve ilişkili sinyal yollarının aşırı aktivasyonu, birçok kanserde görülür ve kanser kök hücrelerinin (CSC) hayatta kalmasına ve tümör oluşturmaya sebep olur (145). EGFR'nin benzersiz dimerizasyon mekanizması ve transotofosforilasyon yeteneği, onu klasik RTK'lerden ayırır ve bu farklılıklar, hedefe yönelik kanser tedavilerinde değerlendirilebilecek özel stratejilerin temelini oluşturur (14). Bazı kanser türlerinde EGFR'nin yüksek düzeyde ekspresyonu ve aktive edici mutasyonları, kök hücre benzeri özellikler, invazyon, metastaz ve ilaç direnci gibi kötü huylu tümör davranışlarıyla ilişkilidir. EGFR'nin bu onkojenik aktivitesindeki artışın temel nedenleri arasında aktive edici mutasyonlar, gen amplifikasyonu ve endositoz bozuklukları yer alır (146).

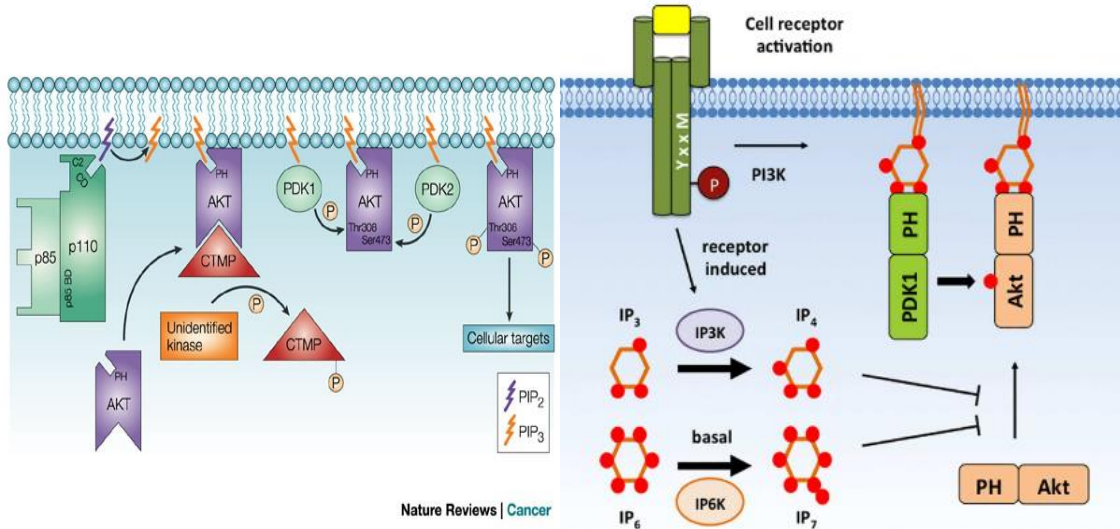
EGFR mutasyonları, genellikle hücre dışı bölge (ektodomain), kinaz alanı ve C-terminal kuyruğunda görülür. Glioblastomalarda ektodomain mutasyonları (örneğin EGFRvIII), küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde (KHDAK) ise kinaz alanı mutasyonları yaygındır. Kolorektal kanserlerde ise EGFR mutasyonları daha az sıklıkta görülse de olguların yaklaşık %50'sinde EGFR gen amplifikasyonu mevcuttur. Bu tür mutasyonlar ya da EGFR'nin aşırı ifadesi, B-Raf ve Ras gibi onkogenlerle birlikte ERK/MAPK yolunun kalıcı aktivasyonuna yol açar. Aktifleşen ERK, çekirdeğe taşınarak transkripsiyon faktörlerini fosforile eder ve gen ekspresyonunu değiştirir. Bu değişiklikler, TGF- α gibi EGFR ligandlarının artışını tetikleyerek Ras-Raf-ERK yolunu sürekli aktif tutan otokrin bir geri besleme döngüsü oluşturur; bu da tümör hücrelerinin

büyüme ve çoğalma sinyallerini sürekli almasına neden olur (14, 82). Bu nedenle EGFR, antikanser tedaviler için önemli bir hedef haline gelmiştir. EGFR'yi hedefleyen tedavi stratejileri arasında en gelişmiş olanlar monoklonal antikorlar (mAb'lar) ve tirozin kinaz inhibitörleridir (TKI). Bu tedavilerin klinik çalışmaları umut verici sonuçlar göstermektedir (147, 148).

2.13. Sitoplazmik EGFR Yolunun PI3K-AKT-mTOR Yolağı Bağlantısı

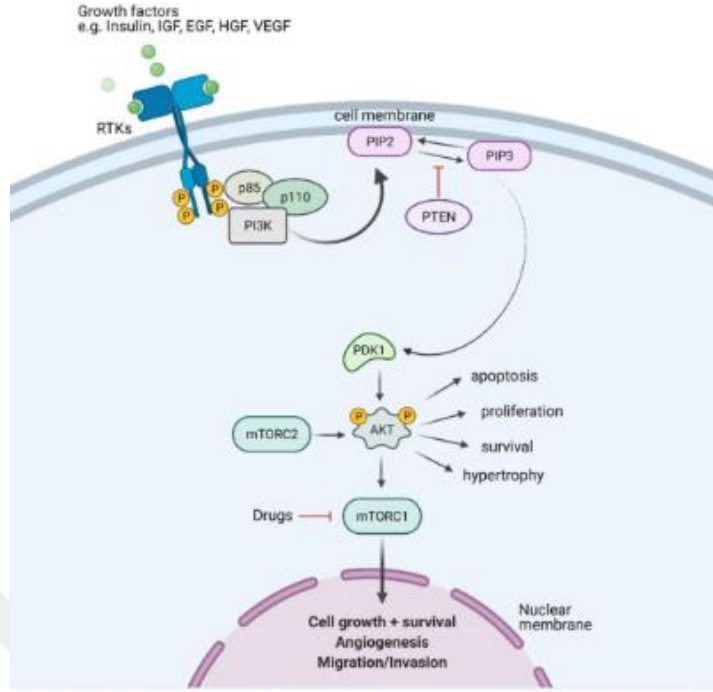
PI3K-AKT-mTOR sinyalizasyon yolu, hücre büyümesi, çoğalması, metabolik düzenleme ve hayatta kalma süreçlerinde merkezi bir rol oynayan karmaşık bir hücresel iletişim ağıdır (149). Bu yolak normal fizyolojik koşullarda hücre homeostazını sürdürürken, anormal aktivasyon veya mutasyonlar sonucunda kanser dahil birçok patolojik sürecin gelişiminde etkili olmaktadır (150). Hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerin ligandlarla etkileşmesi sonucu sinyal iletimi başlamaktadır. Hücre içinde ise ardışık kinazlar aracılığıyla devam ederek gen ekspresyonu, metabolizma ve büyüme gibi önemli olayları düzenlemektedir. PI3K-AKT-mTOR yolunun aktivasyon mekanizması; RTK'ler, integrinler, B ve T hücre reseptörleri ile G-protein bağlantılı reseptörler (GPCR'ler) gibi çeşitli hücre dışı uyarılarla aktive edilir. Bu reseptörler, büyüme faktörleri, sitokinler veya insülin gibi ligandların bağlanmasıyla uyarılır. Böylece hücre dışı sinyaller, membran düzeyinde PI3K'nın aktivasyonunu başlatan içsel biyokimyasal tepkimelere dönüştürülür (151).

Yapısal özelliklerine ve substrat özgüllüğüne göre PI3K ailesi üç sınıfta incelenir: Sınıf I, Sınıf II ve Sınıf III. Bu sınıflar arasında özellikle Sınıf I PI3K'lar, hücre yüzey reseptörleri tarafından aktive edilmeleri nedeniyle sinyal iletiminde kritik öneme sahiptir. Sınıf I PI3K enzimleri, katalitik (p110) ve düzenleyici (p85 veya p101) olmak üzere iki alt birimden oluşur. Hücre dışı uyarılara yanıt olarak Grb2 ile ilişkili bağlayıcı protein 2 (GAB2) veya İnsülin Reseptör Substratı 1/2 (IRS1/2) gibi adaptör proteinleri p85 alt birimine bağlanarak PI3K aktivasyonunu sağlar. Aktive edilen PI3K, membranda yer alan fosfatidilinositol 4,5-bisfosfatı (PIP2) fosforile ederek fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfata (PIP3) dönüştürür. Bu olay, sinyalin membranda birikmesini ve aşağı akış kinazların bağlanmasını kolaylaştırır (152).



Şekil 2.14 Hücredeki PI3K/AKT aktivasyonu (153, 154)

AKT, Serin/Treonin kinaz yapısında bir proto-onkogendir ve üç izoformu tanımlanmıştır: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) ve Akt3 (PKB γ) (154). Bu izoformların her biri yapısal olarak benzer olup, N-terminalde pleckstrin-homoloji (PH) alanı, ortada katalitik alan (Thr308 bölgesi) ve C-terminalde düzenleyici bir kuyruk (Ser473 bölgesi) içerir (155). İnaktif durumda olan AKT sitoplazmada bulunur; PI3K aracılı PIP3 üretimi sonrasında membrana transloke olur. Membranda, 3-fosfoinozotid bağımlı kinaz-1 (PDK1) tarafından Thr308 bölgesinde, mTOR kompleksi 2 (mTORC2) tarafından ise Ser473 bölgesinde fosforilasyon gerçekleşir. Bu çift fosforilasyon sonucu AKT tam aktivasyon kazanır. AKT'nin aktive olmasıyla birlikte, metabolizma, hücre büyümesi, transkripsiyonel düzenleme ve apoptozun engellenmesi gibi pek çok biyolojik süreçte görev alan çok sayıda substrat fosforile edilir (156).



Şekil 2.15 Hücredeki PI3K/AKT/PTEN/mTOR sinyal yolunu gösteren şematik diyagram (157)

Kanser hücrelerinde (Phosphatase and Tensin Homolog) PTEN, p53, PP2A ve PHLPP gibi inhibitörlerin mutasyon veya ekspresyon kaybı sonucu işlevlerini yitirmesi, AKT'nin sürekli aktif kalmasına yol açar. Bu durum, hücrelerin apoptozdan kaçınmasına, kontrolsüz proliferasyona ve tümör oluşumuna zemin hazırlar (158). Aktive AKT, çok sayıda substratı fosforile ederek hücresel yanıtları düzenler. Başlıca hedefleri arasında Glikojen Sentaz Kinaz-3 Beta (GSK-3 β), glikojen metabolizması, Forkhead Box O (FOXO) transkripsiyon faktörleri ve hücre döngüsü kontrolü, Bcl-2 ile ilişkili ölüm uyarıcısı protein (BAD) apoptoz düzenlenmesi ve Tüberöz Skleroz Kompleksi 2 (TSC2), mTOR aktivasyonu ile ilişkili olarak bulunur (159). mTOR, PIKK ailesine ait büyük bir Ser/Thr kinazdır ve rapamisine duyarlılığıyla karakterizedir (160). İki farklı çoklu protein kompleksi şeklinde görev yapmaktadır: mTORC1 ve mTORC2. mTORC1; mTOR, Raptor, mLST8, Deptor ve PRAS40 alt birimlerinden oluşurken; mTORC2, mTOR, Rictor, mLST8, mSIN1, Deptor ve Protor proteinlerini içerir. Bu iki kompleks, bileşenleri, substrat özgüllükleri ve rapamisine duyarlılıkları açısından farklılık göstermektedir (161). Büyüme faktörleri, amino asitler, enerji durumu ve hücresel stres gibi çeşitli sinyallerle, mTORC1 düzenlenir. Aktive olan mTORC1'in başlıca alt akış hedefleri ribozomal protein S6 kinaz (S6K) ve eIF4E bağlayıcı protein 1'dir (4EBP1). mTORC1, 4EBP1'i fosforile ederek eIF4E'nin translasyon baskısından kurtulmasını sağlar; böylece eIF4E, eIF4A ve eIF4G proteinlerinden oluşan eIF4F kompleksi oluşur

ve mRNA translasyonu başlatılır. Bu süreç, hücre büyümesi ve protein sentezinin artmasına katkı sağlar. Ayrıca, S6K'nın aktivasyonu ribozomal biyogenez ve translasyonel kapasitenin artırılmasında etkilidir.

Rictor içerdiği için mTORC2 rapamisine duyarsızdır ve AKT'nin Ser473 bölgesinde fosforilasyonundan sorumludur. Bu kompleks, AKT, PKC ve SGK1 gibi kinazları fosforile ederek hücre iskeleti organizasyonu, metabolik düzenleme ve hücre hayatta kalma süreçlerinde görev alır. mTORC2'nin tam aktivasyon mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da, PI3K aktivasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (162). Bu yolağın aktivitesi, hücre dengeyi korumak amacıyla çeşitli negatif düzenleyiciler tarafından kontrol edilmektedir. PTEN, PIP3'ü PIP2'ye defosforile ederek PI3K sinyalini doğrudan baskılar. PTEN ise, insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı genlerden biridir (163).

Yolağın (PI3K-AKT-mTOR) aktivasyonu, hücre büyüme ve proliferasyonu teşvik eder. AKT ve mTORC1 aracılığıyla artan protein sentezi, hücre kütlelerinin ve biyosentetik kapasitenin yükselmesine yol açar. Ayrıca AKT, glikoz alımı, lipogenez ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde görev alarak hücre metabolizmasını optimize eder. Apoptotik süreçlerin baskılanması, AKT'nin pro-apoptotik proteinleri inhibe etmesiyle sağlanır. Öte yandan mTORC1'in aktif olduğu durumlarda otofaji baskılanırken, inhibisyonu otofajinin uyarılmasına neden olur (164, 165). Sapienik asidin özellikle EGFR sinyal yolağı ve aşağı akım AKT-mTOR aktivasyonu üzerindeki etkileri henüz yeterince aydınlatılmamıştır. Oksidatif stres, hücre redoks dengesizliği oluşturarak PI3K-AKT-mTOR gibi proliferatif sinyal yollarını aktive edebilmektedir. Çalışmamızda; sapienik asidin HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında EGFR-AKT-mTOR sinyal yolağı ve oksidatif stres belirteçleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulguların, EGFR aracılı hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde lipid türevi moleküllerin rolüne ışık tutarak yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği öngörülmektedir.

3. YÖNTEM

3.1 Hücre Kültürü Çalışmaları ve İlaçlar

Çalışmamız, Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı bünyesinde yürütülmüş olup, deneysel uygulama aşamaları üniversitenin Tıp Fakültesi laboratuvar olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İnsan kökenli kolorektal adenokarsinomdan türetilmiş olan HCT116 hücre hattı, epitel özellik taşıyan ve yüzeye yapışarak büyüyen (adherent) bir in vitro hücre modelidir. Yaklaşık olarak diploid kromozom yapısına sahip olan bu hücreler aynı zamanda mutant KRAS ve MSI-H özellikleri nedeniyle daha invazif ve EGFR bağımsız sinyalleşme gösterir. Bu nedenle, gastrointestinal (GI) araştırmalarında özellikle hedefe yönelik tedavi ve genetik düzenleme çalışmalarında en sık kullanılan kolorektal kanser hücre hatlarından biridir. Bu sebeple, tez çalışmamızdaki deneyler HCT116 hücre hattında yapıldı.

3.1.1. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Deneylere Hazırlanması İçin Gerekli Çözeltiler

1) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): Çalışmada kullanılan DMEM besiyeri Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Her 500 mL'lik DMEM çözeltisine, %10 oranında steril FBS (Fetal Sığır Serum) 50 ml ve %1 oranında steril penisilin-streptomisin 5 ml solüsyonu ilave edildi. Hazırlanan besiyeri, kullanılıncaya dek +4 °C'de muhafaza edildi.

2) FBS (Fetal Sığır Serum): İnaktive edilmiş ürün, Gibco firmasından temin edildi. Kullanım kolaylığı sağlamak amacıyla 50 mL'lik falcon tüplerine bölünerek -20 °C'de depolandı.

3) Penisilin-Streptomisin: İlgili çözelti Gibco firmasından temin edildi. 10 mL hacmindeki falcon tüplere bölünerek, kullanılmadığı sürece -20 °C'de uygun koşullarda muhafaza edildi.

4) DMSO (Dimetil Sülfoksit): İlgili madde Sigma firmasından temin edildi ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

5) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Magnezyumsuz ve kalsiyumsuz) (PBS): Hazır formu Sigma firmasından temin edildi, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

6) Trypsin-EDTA Solüsyon: Hazır formu Sigma firmasından temin edildi, +4 °C'de muhafaza edildi.

7) Tripkan mavisi: Sigma firmasından temin edildi ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

8) Toluidin mavisi: Sigma firmasından temin edildi ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

9) Sapienik Asit: Hücrelere uygulanan sapienik asit Cayman kimyasaldan temin edildi ve %100 DMSO'da çözülerek -20°C'de saklandı. Sapienik asit dozları ana stok çözeltiden hesaplanarak hücrelerin kendi medyumları içinde inkübe edildi.

10) RIPA: Radyo İmmüno Presipitasyon Assay Lizis Tamponu 100X konsantrasyonda hazırlanmış ve -20 °C'de muhafaza edildi.

11) PIC: Protein inhibitör kokteyli hazırlanarak +4 °C'de korunacak şekilde saklandı.

12) Antikorlar: Western blotda kullanılan tüm birincil antikorlar Cell Signaling Technology firmasından temin edildi ve -20°C'de şekilde saklandı, ikincil antikor ise SeraCare firmasından temin edildi ve +4 °C'de şekilde saklandı.

3.1.2. Hücrelerin Çoğaltılması

- Hücre kültürü işlemleri, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren steril DMEM besiyeri kullanılarak gerçekleştirildi.
- HCT116 hücre hattı çözdürüldükten sonra, %5 CO₂, %95 nem ve 37 °C sıcaklıktaki steril inkübatörde çoğaltıldı.
- Hücreler, kültür flasklarda %80–90 konfluens seviyesine ulaştığında yüzeyden uzaklaştırılmaları için tripsin enzimi kullanıldı.
- Öncelikle, 25 cm²'lik kültür flasklardaki besiyeri steril pipet ile uzaklaştırıldı.
- Ardından, yüzeydeki ölü hücrelerin elimine edilmesi ve tripsin etkisinin artırılması amacıyla 1–2 mL PBS eklendi ve yüzeye nazikçe yayılması sağlandı.
- PBS uzaklaştırıldıktan sonra, flakonlara 1 mL tripsin çözeltisi ilave edildi ve hücrelerin yüzeyden ayrılması için yaklaşık 5–6 dakika inkübatörde bekletildi.
- Hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskop altında kontrol edildi.
- Ayrılan hücreler üzerine taze DMEM eklenerek hafif pipetaj yapıldı ve homojen bir şekilde yeni flasklara dağıtıldı. Hücre yoğunluğu ve deneysel ihtiyaçlara bağlı olarak bu işlem birkaç kez tekrarlandı.
- Yeterli hücre yoğunluğuna ulaşıldığında, SA ile inkübasyon amacıyla hücreler eşit şekilde petri kaplarına ekildi.
- İnkübasyon sürecinin ardından, hücrelerin yüzeyden kaldırılması için tripsin yerine hücre kazıyıcı (scraper) kullanılarak mekanik ayrılma işlemi gerçekleştirildi.

3.1.3. Hücrelerin Dondurulması

- Hücrelerin bir kısmı, ileride gerçekleştirilecek deneyler için stoklanarak dondurulmuş formda saklandı. Bu amaçla, hücreler flasklardan tripsin kullanılarak uzaklaştırıldı ve enzimatik etkinliğin sonlandırılması için üzerine medyum ilave edildi.
- Hücre süspansiyonu steril pipet yardımıyla falkon tüpe aktarıldı ve $300 \times g$ 'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında oluşan süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından, DMEM medyumuna hacimce %5 oranında dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek dondurma solüsyonu hazırlandı.
- Bu çözeltiden uygun hacimde alınarak elde edilen hücre pelleti üzerine eklendi ve pipetaj ile homojenleştirildi.
- Hazırlanan hücre süspansiyonları, her biri 1 mL olacak şekilde cryo-tüplere aktarılıp -80°C 'de derin dondurucuya yerleştirilerek uzun süreli saklama amacıyla işlem gerçekleştirildi.

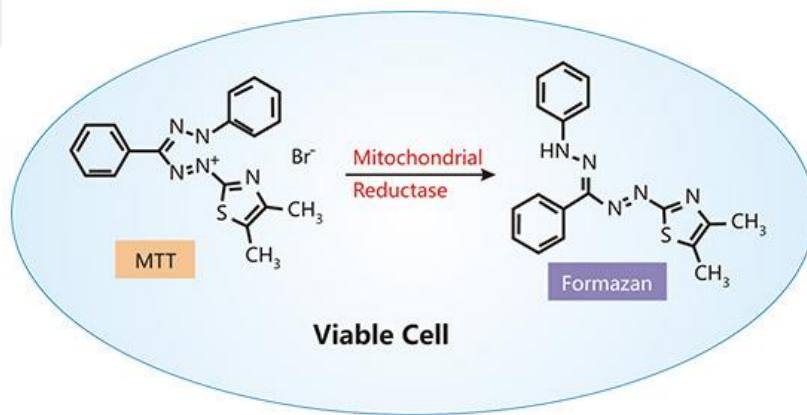
3.1.4. Hücrelerin Çözülmesi

- Sonraki deneylerde kullanılmak üzere dondurularak saklanan hücreler, 37°C sıcaklıktaki su banyosunda hızlı bir şekilde çözündürülerek kullanıma hazır hâle getirildi.
- Çözünme işlemi tamamlanır tamamlanmaz, cryo tüplerin dış yüzeyleri %70 etanol ile dezenfekte edildi.
- Steril çalışma kabini içerisinde, 15 mL'lik falkon tüpe 9 mL DMEM medyumunu eklendi. Çözülen 1 mL'lik hücre süspansiyonu dikkatlice falkon tüpe aktarıldı ve yavaşça pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- Ardından hücreler, $300 \times g$ 'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpte kalan hücre pelleti taze DMEM ile süspanse edildi.
- Hazırlanan hücre süspansiyonu, kültür falkonlarına eşit hacimlerde dağıtıldı. Hücrelerin çoğaltılması amacıyla, %5 CO_2 içeren, %95 nemli ve 37°C sıcaklığa ayarlanmış inkübatörde kültüre alındı.

3.2. Sapienik Asidin Sitotoksosite Çalışması

3.2.1. Hücrelerin %50'sini İnhibe eden Konsantrasyonun (IC₅₀) MTT Kiti ile Belirlenmesi

Sapienik asidin HCT116 hücre dizileri üzerindeki %50 inhibitör konsantrasyonunu belirlemek amacıyla MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid] testi uygulandı. IC₅₀ bir hücre hattında, test edilen maddenin hücre canlılığını %50 inhibe ettiği (yani azalttığı) konsantrasyondur. MTT testi sadece hücre canlılığını ölçmek için kullanılan yöntemdir; IC₅₀ ise bu ölçümden elde edilen bir dozdur. Bu yüzden, bir ilacın etkinliği hakkında evrensel ve karşılaştırılabilir bir eşik sağlar bu yüzden altın standarttır. Çok yüksek veya çok düşük yüzdelere daha değişken sonuçlar verir. Doz-yanıt etkide yarı maksimum inhibisyon noktası %50 olarak kabul edilir. Bu testte, metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından sarı renkli tetrazolyum tuzu, mor renkli formazana indirgenerek reaksiyon gerçekleştirildi. Oluşan mor rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen absorbans değerlerinin, hücre canlılığı ile doğru orantılı olduğu belirlendi.



Şekil 3.1 MTT reaksiyon görseli

3.2.2. Reaktifler

- 1) **Reaktif A:** MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid), 50 mg/vial.
- 2) **Solüsyon B:** PBS, pH 7,4, 15 mL.
- 3) **Solüsyon C:** DMSO (Dimetil Sülfoksit) +4°C'de

Sapienik asidin sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla, hücreler 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µM konsantrasyonlarında SA ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. Ardından hücre canlılığına yönelik değerlendirmeler MTT testi aracılığıyla gerçekleştirildi.

3.2.3. Deneyin Yapılışı

- Sapienik asidin HCT116 hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirebilmek amacıyla deneysel çalışma üç gün süresince yürütüldü.
- İlk gün, çoğaltılmak üzere flakonlara alınan hücreler tripsin yardımıyla yüzeyden uzaklaştırıldı.
- Ardından taze DMEM medyum eklenerek tripsinin etkisi sonlandırıldı. Hücre süspansiyonu 10 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve $300 \times g$ 'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası oluşan süpernatant uzaklaştırıldı ve elde edilen hücre pelleti 2 mL uygun medyum ile süspanse edildi.
- Hücre süspansiyonundan 10 μ L alınarak 10 μ L tripan mavisi ile karıştırıldı ve hücre sayımı Bio-Rad TC20 otomatik hücre sayım cihazı ile gerçekleştirildi.
- Her bir kuyucuğa 25.000 hücre gelecek şekilde, 100 μ L hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu plaklara ekildi.
- Hücrelerin yüzeye tutunabilmesi için plakalar 24 saat boyunca %5 CO₂, %95 nemli hava içeren ve 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde bekletildi.
- Yapışma sürecinin ardından medyum uzaklaştırıldı ve önceden belirlenen SA konsantrasyonları her bir kuyucuğa eklendi. 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar, aynı inkübasyon koşullarında gerçekleştirildi.
- Süre tamamlandığında, her kuyucuk bir kez PBS ile yıkandı. Ardından her kuyucuğa 100 μ L DMEM medyum ve 20 μ L MTT reaktifi (Reaktif A) ilave edilerek plakalar tekrar inkübasyona bırakıldı.
- 2–3 saat sonunda, kuyucukların dibinde oluşan mor renkli formazan kristalleri gözlemlendi. Üzerlerine 100 μ L DMSO içeren Solüsyon C eklendi ve kristallerin çözünmesi için plakalar çalkalayıcı üzerinde 5 dakika bekletildi.
- Absorbans ölçümleri 570 nm dalga boyunda ve 630 nm referans filtresi kullanılarak BioTek Synergy H1 Hybrid çok modlu mikroparka okuyucusunda gerçekleştirildi.
- Her konsantrasyonun canlılık yüzdelерinin hesaplanması için elde edilen veriler Microsoft Excel programına aktarıldı.
- Kontrol grubunun absorbans değеrleri, SA ile muamele edilen grupların değеrlerinden çıkarılarak canlı hücre yüzdesi hesaplandı.

- Doz-yanıt eğrisinin oluşturulabilmesi amacıyla maddelerin uygulandığı konsantrasyonlar logaritmik ($\log_{10}$) forma dönüştürüldü. Logaritması alınmış doz değerleri x-ekseni, yüzde canlılık değerleri ise y-ekseni olacak şekilde grafiğe aktarıldı. Excel'in "Eğilim Çizgisi (Trendline)" ve "Sigmoidal (doz-yanıt)" eğriye en yakın dağılım çizgisi fonksiyonları kullanılarak dört parametrelili lojistik modele (4PL) uygun bir doz-cevap eğrisi elde edildi.
- Deneyler iki kez tekrarlandı ve her bir doz grubu için en az dört örnekle tekrar yapıldı.

3.3. Sapienik Asidin HCT116 Hücreleri ile İnkübasyonu ve Hücrelerin Toplanması

3.3.1. Gruplandırma

Grup 1: Sapienik asidin 50 μ M dozunun HCT116 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol (SA uygulanmayan), 0, 30 dk, 1, 2, 3 ve 6 saat inkübasyonları.

Grup 2: Sapienik asidin 50 μ M dozunun HCT116 hücreleri üzerinde uzun vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol (SA uygulanmayan), 24, 48 ve 72 saat inkübasyonları.

3.3.2. Deneyin Yapılışı

- Flasklarda çoğaltılan HCT116 hücreleri, tripsin ile yüzeyden ayrıldıktan sonra her bir Petri kabına 3×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.
- Hücrelerin yüzeye tutunabilmesi için 24 saat %5 CO₂, %95 nem oranına sahip ve 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde bekletildi.
- Ertesi gün, her Petri kabı için taze DMEM ve 10 μ M konsantrasyonunda SA içeren çözelti hazırlandı.
- Mevcut medyumlar uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkandı.
- Kontrol grubuna SA içermeyen DMEM eklenirken, deney gruplarına 0, 30. dk, 1, 2, 3 ve 6. saatlik inkübasyonlar için ilaçlı medyumlar eklendi.
- Aynı şekilde, 24,48 ve 72 saatlik inkübasyonlar da yine kontrol ve deney grupları için planlandı.
- Tüm petri kapları uygun atmosfer koşullarına sahip inkübatörde inkübe edildi.
- Hücrelerin toplanmasından önce PBS ve RIPA çözeltileri +4°C'de soğutuldu.
- İn vitro inkübasyon süresi tamamlandığında, hücrelerden ilaçlı medyum uzaklaştırıldı ve iki kez PBS ile yıkama işlemi uygulandı.
- Protein inhibitör kokteyli (PIC), %1'lik oranla seyreltildi (100X'ten 1X'e).

- Ardından, 3000 µL RIPA çözeltisine 50 µL PIC ilave edildi ve bu karışımdan her petri kabına 500 µL eklendi.
- Hücreler bu koşulda 15 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi.
- Süre sonunda kazıyıcı kullanılarak hücreler dikkatli şekilde yüzeyden uzaklaştırıldı ve elde edilen hücre süspansiyonu ependorf tüplere aktarıldı.
- Numuneler 1 dakika boyunca vorteks ile karıştırıldı ve önceden +4°C'ye soğutulmuş santrifüj cihazında 20.000 × g'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Elde edilen süpernatant yeni bir ependorf tüpe dikkatlice aktarıldı, etiketlendi ve protein tayini ile western blot analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

3.4.1. Prensip

Bu yöntem, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanmasıyla oluşan renk değişimini temel almaktadır. Başlangıçta kırmızı-kahverengi tonunda olan bu boya, proteinlerin bazik aminoasit kalıntılarına bağlandığında mavi renge dönüşmektedir. Protein çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarında oluşan mavi rengin yoğunluğundaki değişim incelenerek nicel analiz gerçekleştirilir. Renk yoğunluğu, 595 nm dalga boyunda çalışan spektrofotometrik mikropalak okuyucu ile ölçülmüş ve bilinmeyen örneklerin protein konsantrasyonları, önceden oluşturulmuş standart eğri yardımıyla hesaplanır.

3.4.2. Reaktifler

- 1) **BSA:** Sığır serum albümini (Bovine Serum Albumin, BSA) 2 mg/mL konsantrasyonda hazırlanarak +4°C'de muhafaza edildi.
- 2) **CPPA:** Coomassie Plus Protein Assay Kit, +4°C'de saklandı.
- 3) **UPS:** Ultra Saf su

3.4.3. Gruplandırma

Grup 1: Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol, 0, 30 dk, 1, 2, 3 ve 6 saat inkübasyonlardan sonra elde edilen hücre lizatlarından protein tayinlerinin yapılması.

Grup 2: Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücreleri üzerinde uzun vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol, 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlardan elde edilen hücre lizatlarından protein tayinlerinin yapılması.

3.4.4. Deneyin Yapılışı

Standart eğri grafiği için belli aralıktaki konsantrasyonlar ile standart çalışması yapıldı. Standart çalışmasında kullanılan protein BSA' dır.

Tablo 3.1 Protein Standart çözeltisi hazırlama tablosu

Tüp	BSA (µL)	Su (µL)	Konsantrasyon (µg/mL)	CPPA (µL)
A	0	1000	0	1000
B	1	999	2	1000
C	2	998	4	1000
D	4	996	8	1000
E	6	994	12	1000
F	8	992	16	1000
G	10	990	20	1000
H	16	984	32	1000

- Standart çalışmasında 8 tane 2 mL'lik ependorf tüplere yukarıdaki harflendirme marker kalem ile yapıldı.
- Ultra saf su sırasıyla yukarıda verilen ölçülerde tüplere sırasıyla hazırlandı.
- BSA +4°C dolabından çıkarıldıktan sonra tabloda verilen ölçüde tüplere eklendi.
- CPPA boyası her tüpe 1000 µL eklendi.
- Tüplerin her birinden 200 µL alınıp 96 kuyucuklu plakalara ikili tekrar olacak şekilde eklendi.
- Örnekler kuyucuklara eklendikten sonra BioTek Synergy H1 Hybrid multi-mode monokromatör floresans mikropalak okuyucuda 595 nm' de ölçüldü. Absorbans değerleri kaydedildi ve standart grafik oluşturularak numunelerdeki protein miktarı µg/mL olarak hesaplandı.

3.5. Western Blot Protein Tayin Yöntemi

3.5.1 Prensip

Western blot protein tayin yöntemi hücre lizatları içerisindeki spesifik proteinlere uygun antikorlar ile nitelik ve nicelik analizi yapılmasını sağlar. Proteinlerin konsantrasyon değişimlerini karşılaştırma ve görsel açıdan gözlemleyebilmek için değerli bir yöntemdir. Proteinler denatüre edilir ve jelde elektroforezi yapılır. Jelde proteinler

elektrik alan ile kilodaltonlarına (kDa) göre ayrılır. Proteinlerin antikor ile işaretlenip görüntülenebilmesi için uygun bir membrana elektrik akımını ileten bir düzenek ile aktarılır. Membrana geçen proteinlerden spesifik proteinlerin tayini için immünoiblotlama yani antikorlarla işaretleme işlemi gerçekleştirilir. İşaretlenen spesifik proteinlerin antikorları tanıyan enzim bağlı ikincil bir antikor ile işaretlenmesi yapılır. Bu ikincil antikora bağlı enzim substratı kemilüminesans ışımaya veren ürüne dönüştürür. Işımlar görüntüleme cihazı ile görüntülenir ve kaydedilir.

3.5.2. Reaktifler

- 1) **Ayrıştırma Tamponu (1,5 M Tris Base):** pH: 8,8'e ayarlandı ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.
- 2) **Yükleme Tamponu (0,5 M Tris Base):** pH: 6,8'e ayarlandı ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.
- 3) **%10 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS):** 10 gr SDS tartıldı, dH₂O ile çözüldü ve 100 mL'e tamamlandı 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.
- 4) **%10 Amonyum persülfat (APS):** Her jel dökümü için günlük taze hazırlandı. dH₂O ile çözüldü ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.
- 5) **4X Yükleme tamponu:** 900 µl Laemli Buffer, 100 µl β-merkaptotanol hazırlandı ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.
- 6) **Running (Yürütme) Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0,1 SDS):** 1000 mL dH₂O ile çözüldü.
- 7) **Transfer Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0,05 SDS):** dH₂O ile çözüldü. Ayrı bir mezüre 250 mL metanol eklendi. Transfer işlemine kadar hem tampon hem de metanol 4°C'de soğutuldu. Transfer işleminden hemen önce tampon ve metanol karıştırıldı.
- 8) **TBS (Tris Base Solution):** 1000 mL dH₂O çözdürüldü ve pH 7,6'ya ayarlandı.
- 9) **Tween 20 (T):** Sigma'dan hazır olarak alındı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.5.3. Gruplandırma

Grup 1: Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için 0, 30 dakika ile 1, 2, 3 ve 6 saatlik inkübasyon sonrasında elde edilen hücre lizatlarında spesifik protein düzeylerinin belirlenmesi.

Grup 2: Sapienik asidin 50 μ M dozunun HCT116 hücreleri üzerinde uzun vadede etkilerini gözlemlemek için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında elde edilen hücre lizatlarında spesifik protein düzeylerinin belirlenmesi.

3.5.4. SDS-PAGE için jelin dökülmesi, örneklerin yürütülmesi ve transferi

- Western blot çalışmalarımız her aşaması Mini-PROTEAN (BioRad) sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Jel dökümü için sistemin kalın ve ince camları önce saf su ile yıkandı ve %70'lik alkol ile silinerek temizlendi ve sistemin jel dökme aparatına yerleştirildi. Öncelikle Separating (Ayrıştırma) jeli %10 Akrilamid/bis-akrilamid olacak şekilde hazırlandı.
- 1,5 mm'lik camlar kullanıldı. Camlar birleştirilip sıkıştırıldıktan sonra otoklav bandı ile alt tarafı sızmasını önlemek amacıyla bantlandı ve kalın camın üst kısmından ve %10 ayrıştırma jeli 1 cm kalacak şekilde döküldü. Vakit kaybetmeden üstüne 1 mL izopropanol alkol döküldü.
- Ayrıştırma jeli tamamen polimerize olduğunda (45-60 dk) izopropanol kurutma kâğıdı yardımıyla alındı ve Stacking (Yükleme) Jeli %5 Akrilamid/bis-akrilamid olacak şekilde. Ardından taraklar nazikçe yerleştirildi ve 30 dk polimerize olması beklendi.
- Daha önceden konsantrasyonlarını Bradford yöntemi ile tayin ettiğimiz örneklerden 30 μ g olacak şekilde alınarak steril bir ependorfa aktarıldı. Daha sonra örnek hacminin 1/3'ü oranında 4x yükleme tamponu eklendi ve 95°C'de 5 dakika kaynatıldı. Tamamen polimerize olmuş olan SDS-PAGE jel sistemin yürütme tankına alındı ve yürütme tamponu eklendi. Hazırlanan örnekler kuyulara yüklendi.
- 4 μ l marker yüklendi. Örnekler yüklendikten sonra 130 V' da 90 dakika yürütüldü. Yürütme işlemi ile ayrılan protein örnekleri, SDS-PAGE jelden Polyvinylidene flüoride (PVDF) membrana daha önceden hazırlanan transfer tamponu içinde 4°C'de 83 mA'de 17 saat süresince ıslak transfer yöntemi ile transfer edildi.
- PVDF membrana transfer olan protein örneklerimiz immünoyoblotlama için ilgili ilk olarak süt tozu ile bloklama yapıldı.
- Yıkamalar için 20X TBS'den 1X'e çevrildi. Ultra saf sudan 950 mL, 50 mL TBS ve 1 mL Tween 20 karıştırılarak TBS-T solüsyonu hazırlandı.

- 1X TBS ile %5'lik süt tozu karışımı hazırlandı. PVDF membran 1 saat bloklandı. Bloklama bittikten sonra daha önce hazırladığımız TBS-T ile 3 kez 10'ar dakika çalkalayıcıda yıkama yapıldı.
- Primer antikorlar ile 1:1000 oranında %5 BSA ile hazırlandı. Toz BSA 1X TBS içinde çözdürüldü. PVDF membranlar antikorlar ile işaretleme yapılacak bölgelerden işaretlendi ve bu alanlar kesildi. Kesilen membranlar uygun antikorlar ile +4°C'de 2 saat inkübe edildi.
- Primer ile işaretleme bittikten sonra TBS-T ile 3 kez 10'ar dakika çalkalayıcıda yıkama yapıldı. Yıkama bittikten sonra 1:20000 oranında süt tozu ile hazırladığımız HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Sekonder ile işaretlendikten sonra son kez TBS-T ile 3 kez 10'ar dakika çalkalayıcıda yıkama yapıldı. Yıkama işlemleri sonunda ECL (Gelişmiş Kemilüminesans) solüsyonu kullanılarak kemilüminesans reaksiyonu başlatıldı ve spesifik protein bantları Syngene G: Box görüntüleme cihazı tarafından fotoğraflandı ve cihazın kendi programıyla nicelik analizi yapıldı.

3.6. Toplam Oksidan Durumunun (TOS) Belirlenmesi

3.6.1. Prensip

Asit koşulları altında, numunedeki oksitleyici madde Fe^{2+} 'yi Fe^{3+} 'e oksitleyebilir ve bu da mavi-mor bir kompleks üretmek için ksilenol turuncusu ile yüksek oranda bağlanır. Çözeltilerin pH'ı 2-3 aralığında olduğunda, maksimum absorpsiyon dalga boyu 590 nm civarındadır ve renk derinliği, numunenin toplam oksidasyon durumunu dolaylı olarak hesaplamak için belirli bir konsantrasyondaki ve zamandaki oksidasyon maddelerinin içeriğiyle orantılıdır.

3.6.2. Gruplandırma

Grup 1: Sapienik asidin 50 μ M dozunun HCT116 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için 0, 30 dk, 1, 2, 3 ve 6 saat inkübasyonlardan sonra elde edilen hücre lizatlarının içerisindeki TOS belirlenmesi.

Grup 2: Sapienik asidin 50 μ M dozunun HCT116 hücreleri üzerinde uzun vadede etkilerini gözlemlemek için 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlardan sonra elde edilen hücre lizatlarının içerisindeki TOS belirlenmesi.

3.6.3. Reaktifler

1. Kromojenik Ajan: Numunedeki oksidan maddeler ile reaksiyona girerek renk oluşumunu sağlayan ana reaktiftir. Miktarı, 24 mL (1 falkon), 2–8°C’de, ışık almayan ortamda saklandı.
2. **Substrat:** Kromojenik ajanla etkileşerek ölçülebilir renkli ürünün oluşmasını sağlayan destek reaktiftir. Miktarı, 6 mL (1 flakon). 2–8°C’de, ışık almayan ortamda saklandı.
3. **200 µmol/L Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Standardı:** Standart eğrinin oluşturulmasında kullanılan referans çözeltidir. Miktarı, 1 mL (1 flakon). 2–8°C’de, ışık almayan ortamda saklandı.
4. **Çift Distile Su (ddH₂O)**
5. **Normal Salin:** %0,9 NaCl
6. **PBS:** 0,01 M, pH 7,4

3.6.4. Deneyin Yapılışı

- Her bir deney grubu için gerekli 1×10^6 hücre sayısı belirlendi ve petrilere ekimi yapıldı.
- Toplanan hücreler, fosfat tamponlu salin (PBS; 0,01 M, pH 7,4) ile dikkatlice yıkandı.
- Hücre peleti, 200 µL PBS (0,01 M, pH 7,4) içinde çözülerek 4°C’de bir ultrasonik hücre parçalayıcı kullanılarak homojenize edildi.
- Homojenat, çözünmeyen kalıntıların uzaklaştırılması amacıyla $10.000 \times g$ ’de, 4°C’de 10 dakika süreyle santrifüjlendi.
- Elde edilen süpernatant dikkatlice toplandı ve analiz gerçekleşene kadar buz üzerinde muhafaza edildi.
- Aynı zamanda, bradford protokolü kullanılarak süpernatant içerisindeki toplam protein konsantrasyonu belirlendi.
- Her bir standart kuyucuğa, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standart çözeltilerden 20 µL eklendi. Her bir örnek kuyucuğa 20 µL numune ilave edildi.
- Tüm kuyucuklara 200 µL kromojenik ajan (Reaktif 1) ilave edildi.
- Mikroplate, BioTek Synergy H1 Hybrid multi-mode monokromatör floresans mikropalak okuyucusu ile 5 saniye süreyle homojen şekilde karıştırıldı. Her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD) 590 nm dalga boyunda ölçülerek "A₁" değeri olarak kaydedildi.

- Her bir kuyucuğa 50 µL substrat çözeltisi (Reaktif 2) eklendi.
- Mikroplate tekrar 5 saniye boyunca karıştırıldı ve 37°C'de 5 dakika süreyle inkübe edildi. Ardından, kuyucukların OD değerleri yeniden 590 nm'de ölçüldü ve bu değerler "A₂" olarak kaydedildi.
- Her bir kuyucuk için reaksiyon sinyali, $\Delta A = A_2 - A_1$ formülü kullanılarak hesaplandı.
- Her standart çözeltisi için çift absorbans ölçümünün ortalaması alındı. Kontrol (0 µmol/L) standartın ortalama ΔA değeri, diğer tüm standartlardan çıkarıldı ve mutlak ΔA elde edildi. Mutlak ΔA (y eksen) ve konsantrasyon (x eksen) kullanılarak bir standart eğri çizildi. Grafik yazılımı, Excel programı ile eğri denklemi ($y = ax + b$) şeklinde bulundu.
- Örneklerin toplam oksidan düzeyleri bu eğriye göre hesaplandı. Hesaplamalarda aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. /gprot}) = (\Delta A_{590} - b) \div a \div C_{pr} \times f \quad (3.1)$$

ΔA_{590} : $\Delta A_{\text{Örnek}} - \Delta A_{\text{Kör}}$ ($\Delta A_{\text{Kör}}$, standart konsantrasyon 0 olduğunda ΔA 'dır).

f: Testten önce numunenin seyreltme faktörü.

C_{pr} : Numunenin protein konsantrasyonu, gprot/L

3.7. Toplam Antioksidan Durumunun (TAS) Belirlenmesi

3.7.1 Prensip

Antioksidan kapasitelerini ölçmek için ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)), uygun oksidan ile yeşil $\text{ABTS}^{\bullet+}$ 'ya oksitlenir ve antioksidanların varlığında renksiz ABTS'ye indirgenebilir. Numunenin TAS'ı, ABTS^+ 'nin 660 nm'deki absorbansı ölçülerek belirlenebilir ve hesaplanabilir. Trolox, VE'nin bir analogudur ve VE'ninkine benzer bir antioksidan duruma sahiptir. Troloks, toplam antioksidan durumu için referans madde olarak kullanılır.

3.7.2 Gruplandırma

Grup 1: Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için 0, 30 dk, 1, 2, 3 ve 6 inkübasyonlardan sonra elde edilen hücre lizatlarının içerisindeki TAS belirlenmesi.

Grup 2: Sapienik asidin 50 μ M dozunun HCT116 hücreleri üzerinde uzun vadede etkilerini gözlemlemek için 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlardan sonra elde edilen hücre lizatlarının içerisindeki TAS belirlenmesi.

3.7.3 Reaktifler

- 1) **Tampon Çözelti:** 30 mL hacminde tek bir flakon olarak sağlandı. Bu reaktif, -20°C'de saklanmalı ve raf ömrü 12 aydır.
- 2) **Kromojenik Ajan:** 5 mL hacminde bir flakon olarak sağlandı. Işıktan korunarak -20°C'de muhafaza edildi ve raf ömrü 12 aydır.
- 3) **2 mmol/L Trolox Standart Solüsyonu:** 4 mL'lik bir flakon halinde sağlanmaktadır. Işıktan korunarak -20°C'de muhafaza edildi ve raf ömrü 12 aydır.
- 4) **%60 Etanol** (analiz saflığında)
- 5) **Çift damıtılmış su** (ddH₂O)

3.7.4 Deney Yapılışı

- Tüm reaktifler analiz öncesinde oda sıcaklığına dengelendi. Standart eğrinin oluşturulabilmesi için 2 mmol/L konsantrasyonundaki Trolox çözeltisi, %60 etanol ile sırasıyla 0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8 ve 2,0 mmol/L konsantrasyonlarında seyreltildi. Her seyreltme taze olarak hazırlandı ve kullanım sonrasında atıldı.
- Doku örnekleri için, yaklaşık 20 mg doku, 180 μ L %60 etanol içerisinde homojenize edildi, ardından 10.000 $\times$ g'de 10 dakika süreyle 4°C'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Elde edilen süpernatant analizde kullanıldı. Gerektiğinde örnekler üretici tarafından önerilen seyreltme oranlarına göre %60 etanol ile seyreltildi.
- Her bir standart ve örnek kuyucuğuna 10 μ L hacminde uygun standart çözeltisi ya da numune eklendi.
- Tüm kuyucuklara 200 μ L Tampon Çözelti (Reaktif 1) ilave edildi.
- Mikroplate plaka, 660 nm dalga boyunda çalışan BioTek Synergy H1 Hybrid multi-mode monokromatör floresans mikropalak okuyucusu ile taranarak ilk absorbans değeri (A1) kaydedildi.
- Ardından her kuyucuğa 20 μ L Kromojenik Ajan (Reaktif 2) eklendi ve 5–6 kez pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- Plate, 37°C'de 5 dakika süreyle inkübe edildi.

- İnkübasyon sonunda ikinci kez 660 nm’de absorbans ölçümü gerçekleştirildi ve ikinci değer (A2) kaydedildi.
- Her örnek için net absorbans değişimi $\Delta A = A2 - A1$ olarak hesaplandı. Standart çözeltilerden elde edilen ΔA değerleri kullanılarak standart eğri ($y = ax + b$) oluşturuldu.
- Örneklerin toplam antioksidan düzeyleri bu eğriye göre hesaplandı. Hesaplamalarda aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{TAS (mmol Trolox Equiv. /kg yaş ağırlık)} = (\Delta A_{\text{Kör}} - \Delta A_{\text{Örnek}} - b) \div a \div (m \div V) \times f \quad (3.2)$$

Trolox: toplam antioksidan durumu için referans madde olarak kullanılır.

a: Standart eğrinin eğimi.

b: Standart eğrinin kesişme noktası.

$\Delta A_{\text{Örnek}}$: Numunenin OD değeri (A2- A1).

m : Doku numunesinin ağırlığı (g).

V : Eklenen homojenatın hacmi (mL).

f: Testten önce numunenin seyreltme faktörü

3. 8. Koloni Formasyon Deneyi

3.8.1 Prensip

Koloni formasyon deneyi, tek bir hücrenin çoğalarak bağımsız bir koloni oluşturma yeteneğini değerlendirmeye dayanan bir in vitro yöntemdir. Bu deney, hücrelerin proliferasyon (çoğalma) kapasitesini, canlılık durumunu ve uzun süreli sitotoksik etkilere karşı dirençlerini belirlemek için kullanılır. Temel prensip, hücrelerin düşük yoğunlukta ekilerek birbirlerinden bağımsız şekilde büyümelerine olanak tanımadır. Canlı ve bölünme yeteneğini koruyan hücreler zamanla koloni oluştururken, hasar görmüş veya ölü hücreler koloni oluşturamaz. Belirli bir süre sonunda koloniler fiks edilip kristal viyole ile boyanır ve sayıları karşılaştırılarak, uygulanan madde veya dozun hücre çoğalması üzerindeki etkisi değerlendirilir. Kristal viyole, kimyasal formülü $C_{25}H_{30}ClN_3$ olan, trifenilmetan grubuna ait bir katyonik boyadır. Bu bileşik, özellikle mikrobiyolojik ve histolojik boyama tekniklerinde yaygın olarak kullanılan bir boyadır. Bu yöntem, özellikle kanser hücrelerinde antikanser ilaçların, radyasyonun veya genetik değişikliklerin proliferasyon üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

3.8.2 Gruplandırma

Sapienik asidin 50 μ M dozunun HCT116 hücreleri üzerinde uzun vadede hücre çoğalması üzerindeki etkilerini gözlemlemek için 24., 48. ve 72. saat inkübasyonların koloni formasyon deneyi ile değerlendirilmesi.

3.8.3. Reaktifler

- 1) **Paraformaldehit (PFA):** Carlo Erba temin edildi, oda sıcaklığında muhafaza edildi.
- 2) **Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Magnezyumsuz ve kalsiyumsuz) (PBS), [pH:7,4]:** Hazır formu Sigma firmasından temin edildi, oda sıcaklığında muhafaza edildi.
- 3) **Kristal Viyole [4,4'-Bis(dimetilamino)benzofenon]:** Sigma firmasından temin edildi, oda sıcaklığında muhafaza edildi.
- 4) **%99,8 Extra Pure Metanol (analiz saflığında)**
- 5) **Asetik Asit:** Sigma firmasından temin edildi, oda sıcaklığında muhafaza edildi.
- 6) **Çift damıtılmış, saf su (ddH₂O)**

3.8.4. Deney Yapılışı

- 6'lı plakalara gerekli sayıda hücre (aynı sütundaki kuyucuklara sırasıyla 500, 1000 ve 2000 hücre) olacak şekilde hücre sayımı yapıldı ve hücre ekildi. Birkaç gün, hücrelerin plaka yüzeyine yapışması ve kolonileşmesi beklenildi. Deney için gerekli solüsyonların hazırlığı yapıldı.
- 2 gram paraformaldehit tartıldı ve 50 ml PBS içerisinde 60–80°C aralığında, uzun süre devamlı karıştırılarak çözündürüldü. Sonrasında 4°C'de saklandı.
- 0,5 gram kristal viyole tartıldı. Ardından, 25 ml metanol ve 75 ml saf suda çözündürülerek, %0,5'lik kristal viyole çözeltisi hazırlanarak filtreden (0,22–0,45 μ m) geçirildi. Oda ısısında ışık almadan saklandı.
- 90 ml saf su üzerine 10 ml asetik asit eklenerek, %10'luk asetik asit çözeltisi hazırlandı.
- Hücrelerin kolonileştikleri mikroskop altında gözlemledikten sonra, inkübasyon süresi tamamlanan her bir kuyucuktaki hücrelerden besiyeri (medyum) dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Ardından hücreler, art arda yapılacak fiksasyon ve boyama işlemleri öncesinde, kalıntı medyumun tamamen temizlenmesi amacıyla bir kez PBS ile nazıkçe

yıkandı. Bu adım, hücrelerin yüzeyinde bulunan serum ve metabolit kalıntılarının uzaklaştırılmasını sağlayarak, fiksasyon işleminin daha homojen olarak gerçekleşmesine olanak tanır.

- Falkon tüpünün içerisine hazırlanmış olan kontrol gruplarının ve sapienik asidin besiyeri, belirlenen miktarlarda mikropipet yardımıyla kuyucuklara eklendi. Plakalar sapienik asitle 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi.
- Hücrelerin morfolojik bütünlüğünü korumak ve yapısal sabitleme sağlamak amacıyla, her bir kuyucuğa 1'er ml %4'lük PFA çözeltisi ile oda sıcaklığında 20 dakika süreyle fiksasyon gerçekleştirildi. Fiksasyon süresi tamamlandıktan sonra, fazla fiksatifin ortamdan uzaklaştırılması için hücreler yeniden PBS ile yıkandı.
- Fiksasyonun ardından koloni boyama işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamada, kolonilerin görünür hale getirilmesi amacıyla hücreler %0,5'lik kristal viyole çözeltisi ve %25 MeOH içeren boyama karışımı ile 20–30 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu işlem, canlı ve sabitlenmiş hücre kolonilerinin mor renkli olarak belirginleşmesini sağlandı.
- Boyama işlemi tamamlandıktan sonra, fazla boyanın uzaklaştırılması için plateler saf suyla nazikçe yıkandı ve kolonilerin net bir şekilde gözlenebilmesi için plateler oda sıcaklığında tamamen kuruyana kadar bekletildi. Kurutma işlemi sonrasında kolonilerin fotoğrafları çekildi.
- Ardından, kristal viyole'nin ekstraksiyonu ve absorbans ölçümlerinin yapılabilmesi için plakalara %10 (v/v) asetik asit çözeltisi eklendi. Hazırlanan çözeltinin, boyalı kolonileri çözmesiyle 96'lık kuyulu plakalara mikropipet yardımıyla aktarıldı, 580 nm dalga boyunda spektrofotometrik absorbans ölçümleri yapıldı.

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Graphpad Prism Version 5,03 paket programı kullanılarak yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Deneyler her grup için 3 tekrarlı olarak yapıldı. Gruplar arasında karşılaştırma yapılırken, parametrik verilerde, Student T-Test ve ANOVA; non-parametrik verilerde Mann-Whitney U ve Kruskal–Wallis testi kullanıldı.

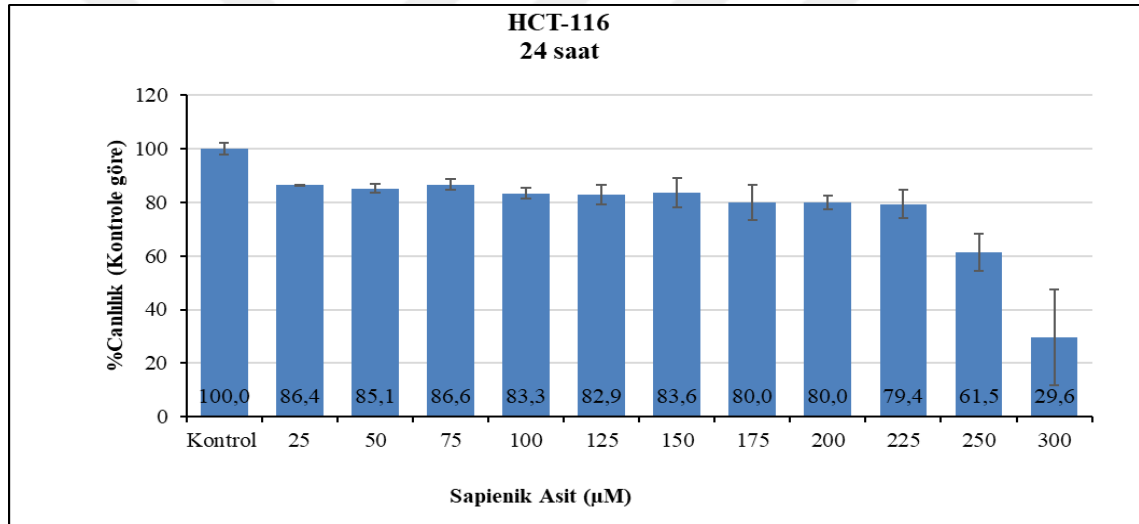
4. BULGULAR

4.1. Sitotoksosite Bulguları

Sapienik asidin kolon kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkisi, MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid] deneyi ile belirlendi. Sapienik asidin belirli aralıkta değişen konsantrasyonları ile HCT-116 hücreleri 24 saat inkübe edildi. MTT sonuçlarına göre 24 saat için hücrelerin %50'sini inhibe doz (IC_{50}) hesabı yapıldı.

4.1.1. HCT-116 Hücrelerinde Sapienik Asidin Sitotoksitesitesi

HCT-116 hücrelerinde 24 saat için 5; 10; 20; 50; 100; 200; 250; 300; 400 ve 500 μ M SA dozları kullanıldı ve 24 saat için IC_{50} ; 245,1 μ M olarak hesaplandı.



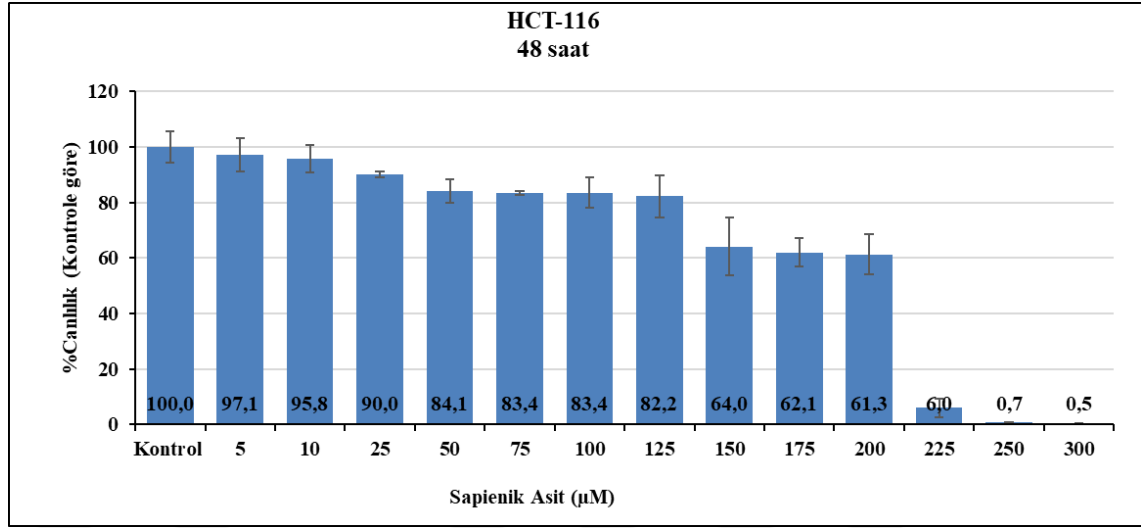
Şekil 4.1 Farklı dozlardaki sapienik asidin HCT-116 hücrelerinde 24 saat için % canlılık üzerine etkisi

Sitotoksosite çalışmalarında 25 μ M SA dozunun 225 μ M dozuna kadar olan doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görüldü ($p>0,05$). Çalışmanın amacı düşük fizyolojik dozlarda EGFR aktivasyonundaki değişimi değerlendirmek olduğundan, sonraki deneylerde 50 μ M SA dozu kullanıldı.

4.1.2. HCT-116 Hücrelerinde Sapienik Asidin Etkisinin Mikroskopla Gözlenmesi

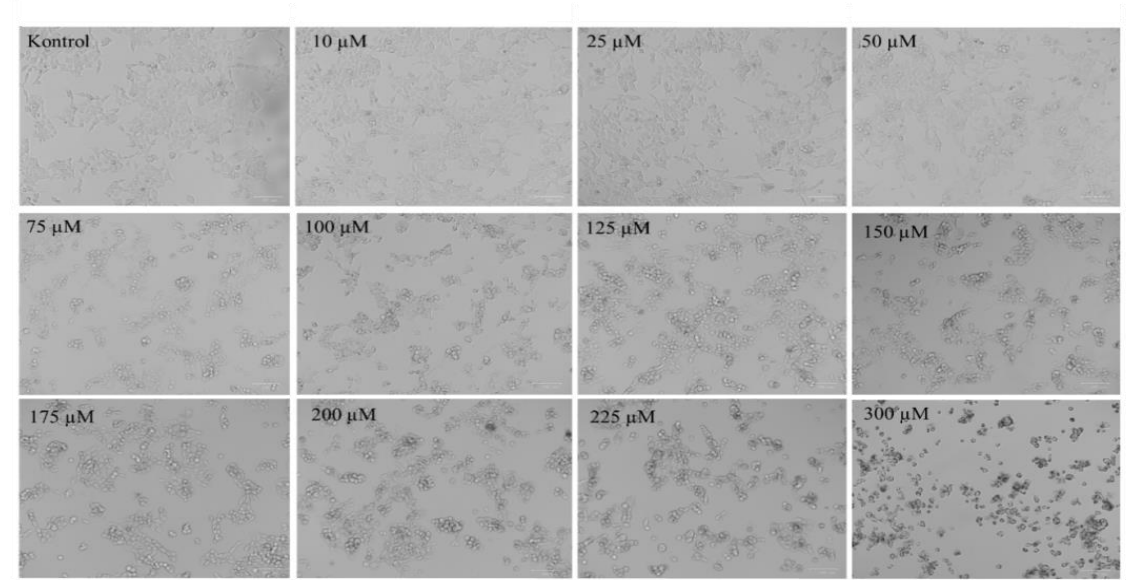
HCT-116 hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki SA etkilerini mikroskop görüntüleriyle kontrol grubu ile karşılaştırdık. İnkübasyonlar 24 saatlik olup SA grubu için 5-1000 μ M konsantrasyon aralığı uygulandı. Hücre gruplarının fotoğrafları inverted Zeiss Axio Vert.A1 mikroskobu ile 20X büyütmede görüntülendi. Hücre gruplarının fotoğrafları Şekil 4.2'de gösterilmektedir.

HCT116 hücrelerinde 48 saat için 5; 10; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 200; 225; 250 ve 300 μM SA dozları kullanıldı ve 48 saat için IC_{50} ; 197,4 μM olarak hesaplandı.



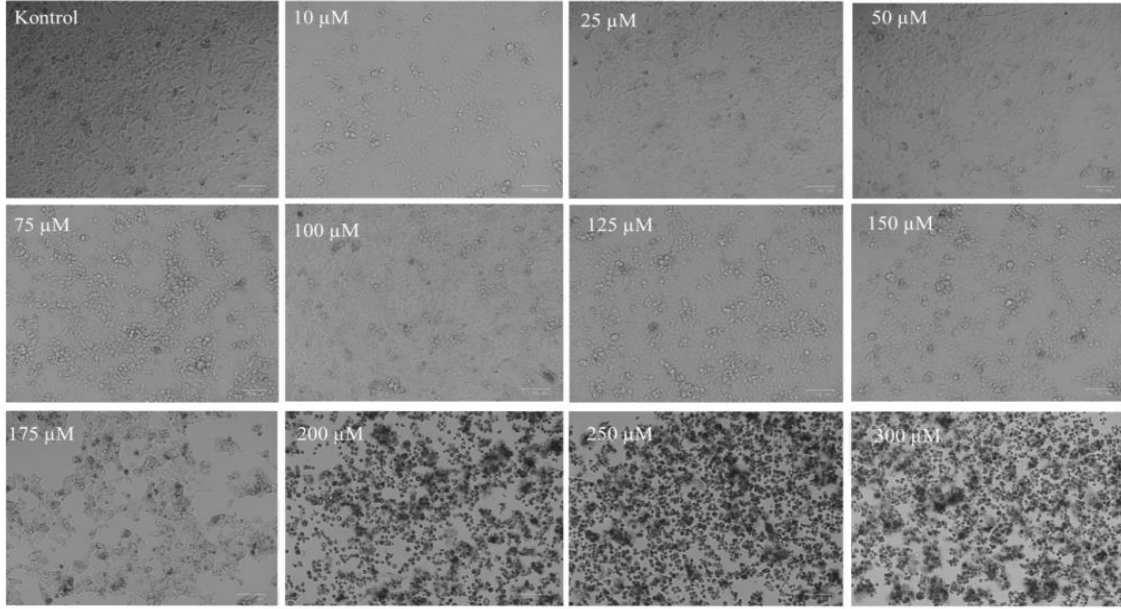
Şekil 4.2 Farklı dozlardaki sapientik asidin HCT116 hücrelerinde 48 saat için % canlılık üzerine etkisi

Sitotoksosite çalışmalarında 10 μM SA dozunun 50 μM dozuna kadar olan doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görmedik. Ayrıca çalışmada amacımız düşük doz SA uygulaması, kanser hücresinde fizyolojik FADS2 aktivitesinin taklit edilmesini sağlayarak hücre ölümüne yol açmadan özellikle EGFR–AKT–mTOR eksenini üzerindeki erken sinyal etkilerini görmek istedik. Dolayısıyla bundan sonraki deneylerde 50 μM SA dozu kullanıldı.



Şekil 4.3 Farklı dozlardaki sapientik asidin HCT-116 hücrelerinde 24 saat sonunda 20X mikroskop görüntüleri.

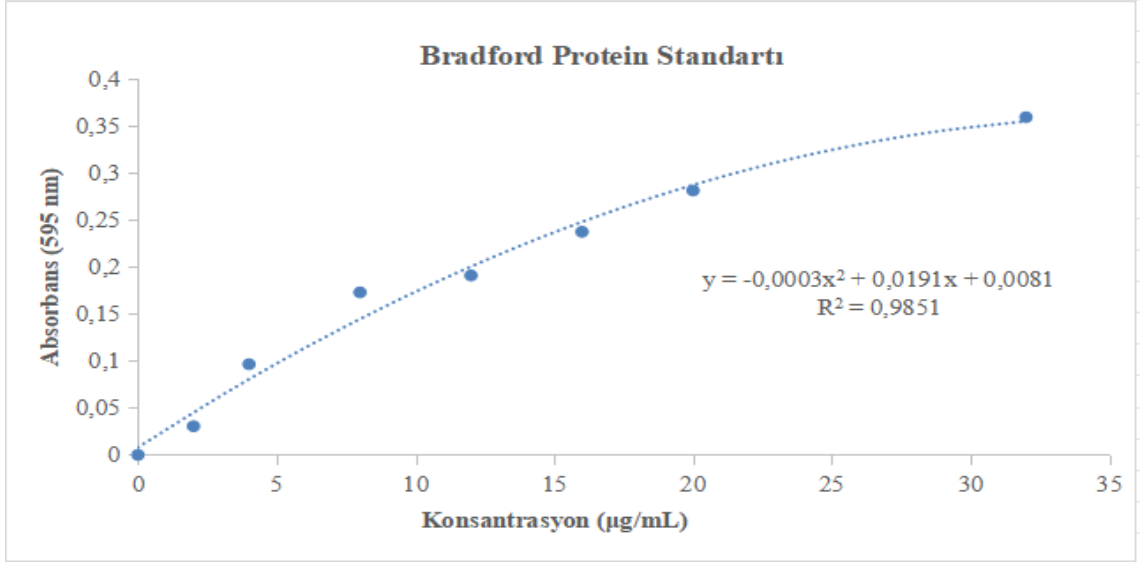
48 saatlik inkübasyonda SA grubu için 5-500 μM konsantrasyon aralığı uygulandı. Hücre gruplarının fotoğrafları inverted Zeiss Axio Vert.A1 mikroskop ile 20X büyütmede görüntülendi. Hücre gruplarının fotoğrafları Şekil 4.4'te gösterilmektedir.



Şekil 4.1 Farklı dozlardaki sapienik asidin HCT116 hücrelerinde 48 saat sonundaki 20X mikroskop görüntüleri

4.2. Bradford Protein Tayin Yöntemi ile Total Protein Ölçümü

Sapienik asidin HCT116 hücrelerinde farklı sürelerle inkübasyonu sonrasında total protein düzeyleri belirlendi. Protein miktarlarının hesaplanabilmesi için her deney öncesinde BSA standart çözeltileri kullanılarak standart eğri oluşturuldu ve bu eğriye ait grafik (Şekil 4.5'te) gösterildi. Deneysel numunelerin protein konsantrasyonları, elde edilen bu standart eğri temel alınarak hesaplandı.



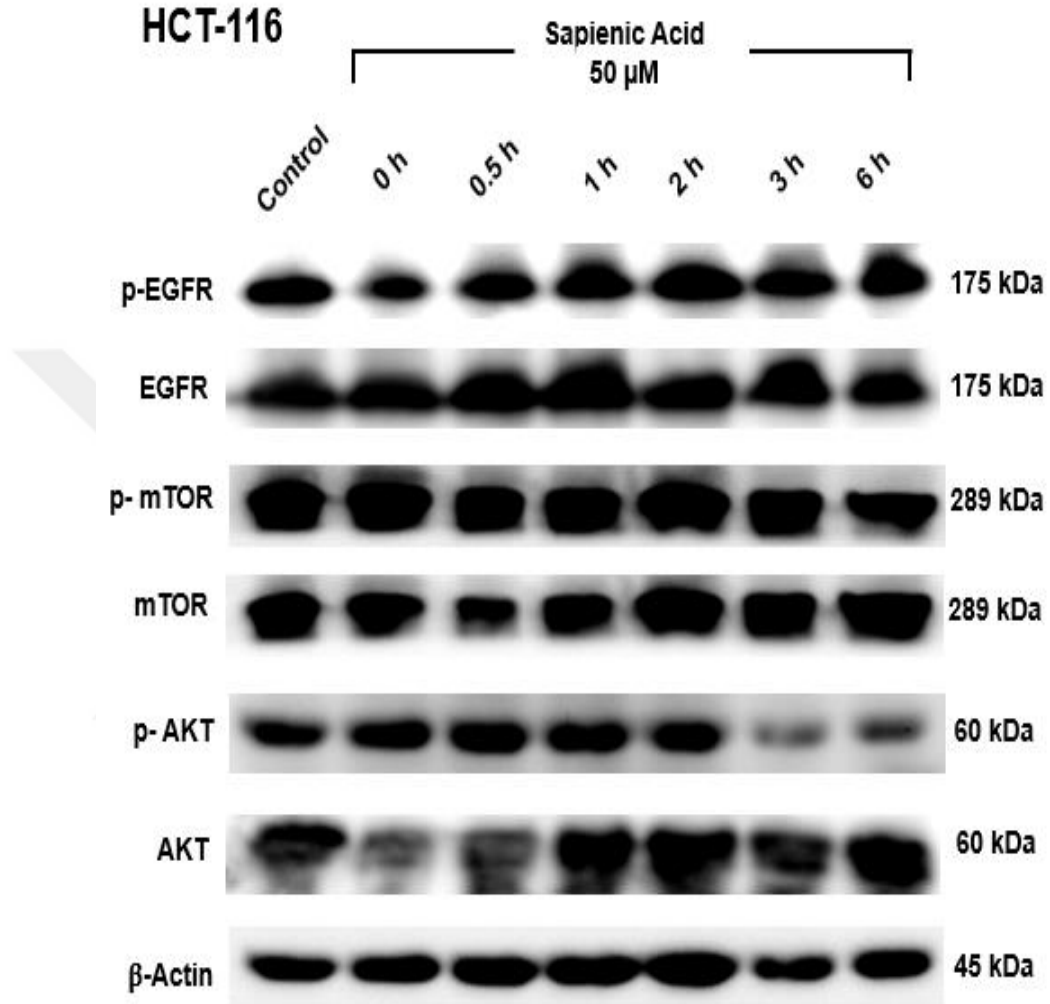
Şekil 4.5 Bradford yöntemi kullanılarak oluşturulan ve absorbans değerlerine karşılık protein konsantrasyonlarını gösteren standart eğri grafiği

Bradford protein tayini için oluşturulan standart eğri incelendiğinde, protein konsantrasyonu ile 595 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri arasındaki ilişkinin ikinci dereceden polinom denklemine uyduğu görülmektedir. Elde edilen regresyon katsayısı ($R^2 = 0,9851$), deneysel veriler ile model arasında yüksek düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir. Grafikte 0–20 µg/mL aralığında konsantrasyon ve absorbans arasındaki ilişkinin büyük ölçüde doğrusal olduğu, 20 µg/mL sonrasında ise artış hızının azalarak eğrinin doygunluk eğilimine girdiği tespit edildi. Bu durum, Bradford yönteminin yüksek konsantrasyonlarda doğrusal olmaması ile uyumludur. Dolayısıyla bilinmeyen örneklerin protein miktarının doğru şekilde hesaplanabilmesi için, ölçüm değerlerinin mümkün olduğunca eğrinin doğrusal kısmında kalmasına dikkat edildi. Bu standart eğri, bilinmeyen örneklerin absorbans değerlerinden güvenilir protein konsantrasyonu hesaplamalarında kullanıldı.

4.3. Western Blot Bulguları

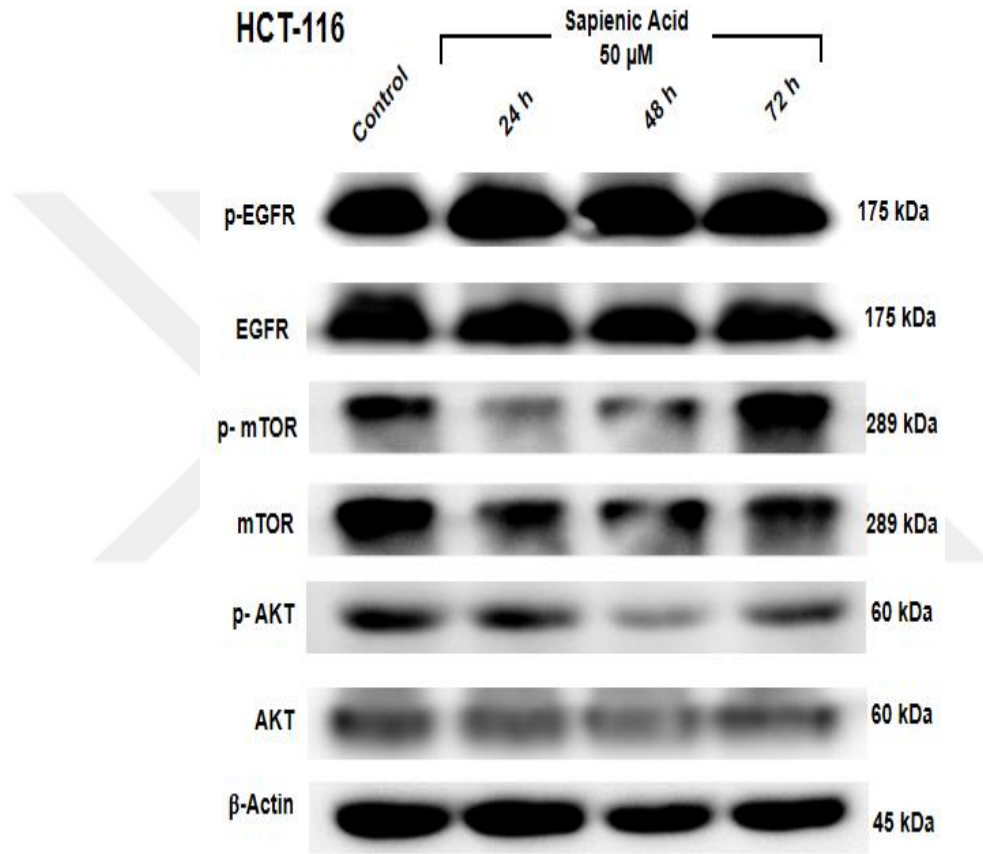
Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücre hattı üzerindeki etkilerini incelemek üzere iki deney grubu oluşturuldu. Grup 1, kısa vadeli (0–6 saat), Grup 2 ise uzun vadeli (24–72 saat) inkübasyon sürelerini kapsamaktadır. Bradford yöntemiyle toplam protein miktarları belirlenerek, elde edilen değerlere göre her kuyucuğa 50 µg protein yüklendi. Western blot analizleri sonucunda elde edilen spesifik bantlar Syngene G: BOX sistemi kullanılarak görüntülendi ve dansitometrik değerlendirmeye tabi tutuldu.

Kısa vadeli etki grubunda, kontrol ile 0., 0,5., 1., 2., 3. ve 6. saatlik zaman noktalarındaki protein düzeyleri incelendi. Analizlerde β -Actin normalizasyon proteini olarak kullanıldı. Elde edilen β -Actin, p-EGFR, EGFR, p-mTOR, mTOR p-AKT ve AKT proteinlerinin bant görüntüleri Şekil 4.6’da gösterildi.



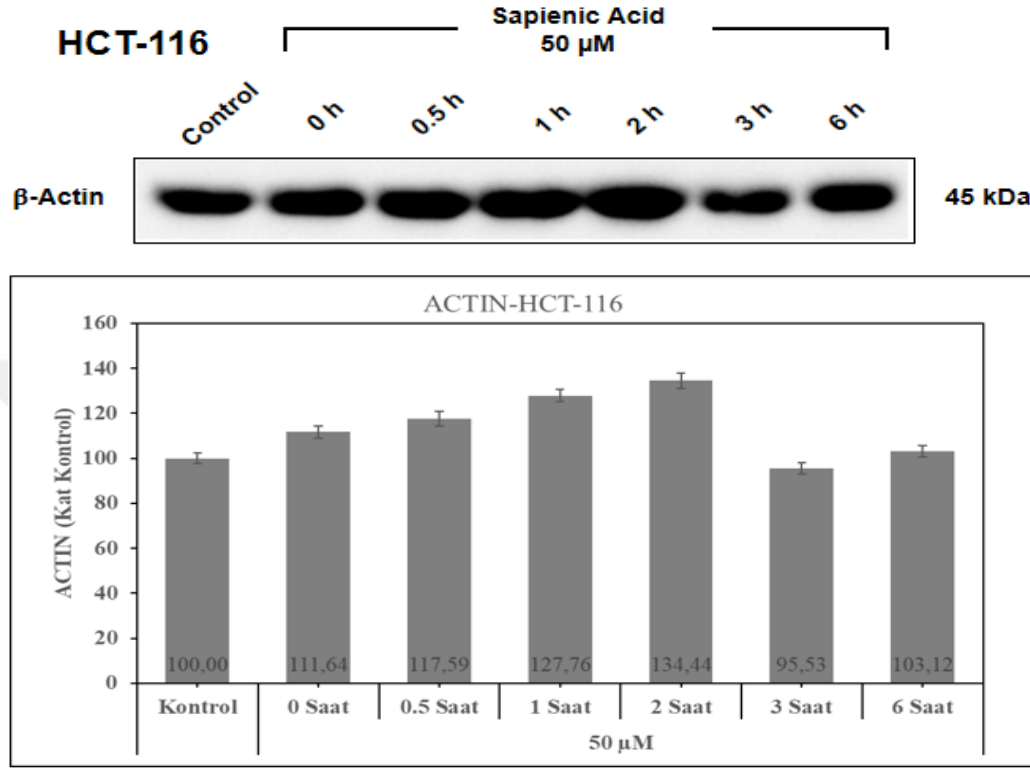
Şekil 4.6 Sapienik asidin 50 µM dozu ile HCT116 hücreleri üzerinde kısa vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol, 0., 0,5., 1., 2., 3., ve 6. saat inkübasyonları ile β -Actin, p-EGFR, EGFR, p-mTOR, mTOR p-AKT ve AKT proteinlerinin ekspresyon seviyelerini gösteren western blot görüntüleri.

Uzun vadeli etki grubunda, kontrol ile 24., 48., ve 72. saatlik zaman noktalarındaki protein düzeyleri incelendi. Analizlerde β -Actin normalizasyon proteini olarak kullanıldı. Elde edilen β -Actin, p-EGFR, EGFR, p-mTOR, mTOR p-AKT ve AKT proteinlerinin bant görüntüleri Şekil 4.7’da gösterildi.

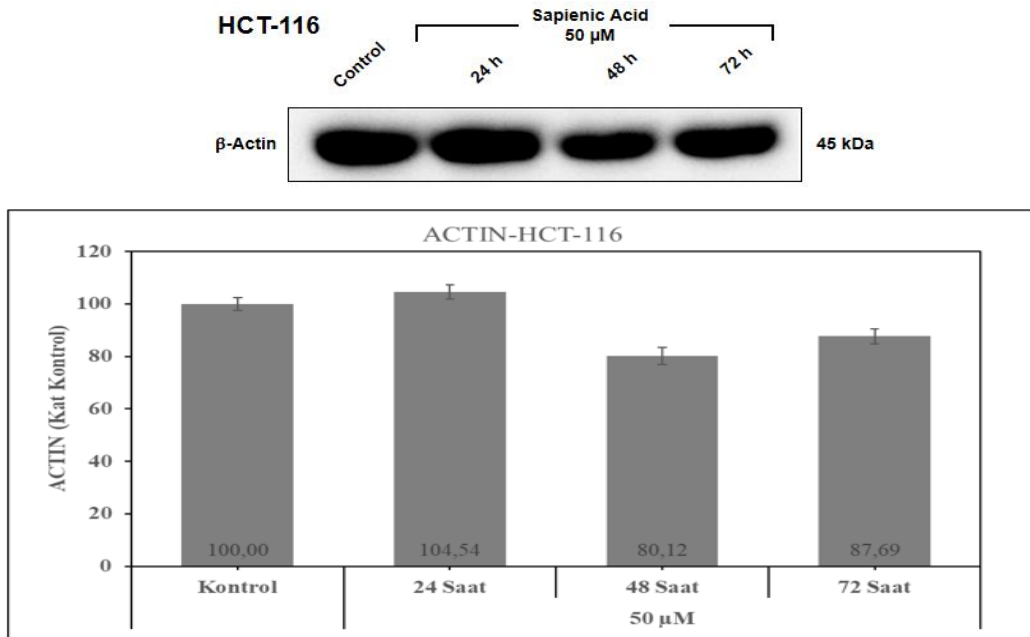


Şekil 4.7 Sapienik asidin 50 μ M dozu ile HCT116 hücreleri üzerinde uzun vadede etkilerini gözlemlemek için kontrol, 24., 48., ve 72. saat inkübasyonları ile β -Actin, p-EGFR, EGFR, p-mTOR, mTOR p-Akt ve Akt proteinlerinin ekspresyon seviyelerini gösteren western blot görüntüleri.

Sapienik asidin 50 μM dozunun HCT116 hücrelerine kısa ve uzun süreli inkübasyonunda β -Actin proteinini üzerine etkisi gösterildi (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). β -Actin proteinine sapienik asidin bir etkisi olmadığı görüldüğü için inkübasyonlarda normalizasyon β -Actin proteinine göre yapıldı.

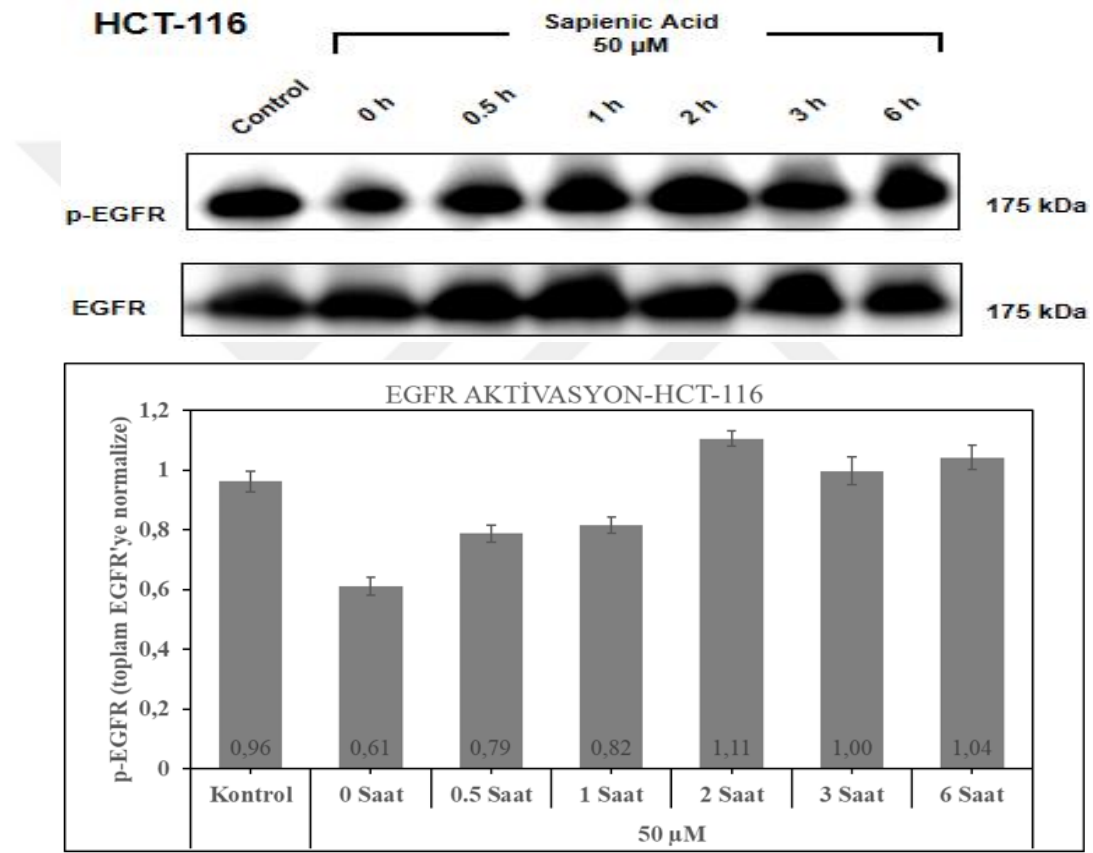


Şekil 4.8 Sapienik asidin 50 μM dozu ile HCT116 hücrelerindeki β -Actin proteinini üzerine kısa vade etkisi.



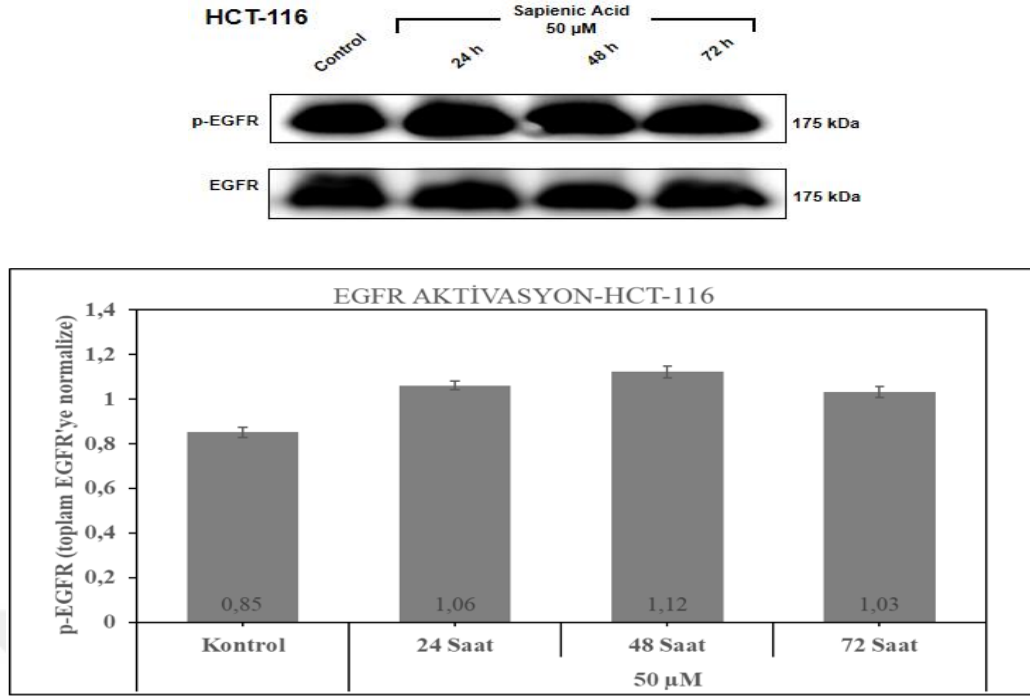
Şekil 4.9 Sapienik asidin 50 μM dozunun HCT116 hücrelerindeki β -Actin proteinini üzerine uzun vade etkisi.

Sapienik asidin 50 μM dozunun 0, 0.5, 1, 2, 3 ve 6 saatlik kısa dönem uygulamalarının EGFR aktivasyonu üzerindeki etkileri analiz edildi (Şekil 4.10). Y eksenini, p-EGFR düzeyinin toplam EGFR'ye normalize edilmiş oranını (p-EGFR/toplam EGFR) göstermektedir. Kontrol grubunda bu oran 0,96 olarak belirlendi. Uygulamanın hemen ardından 0. saat p-EGFR düzeyinde (0,61) belirgin bir düşüş gözlemlendi. 0,5 ve 1. saatlerde kısmi bir artış (sırasıyla 0,79 ve 0,82) izlendi. En yüksek aktivasyon 2. saatte kaydedilmiş (1,11), ardından 3. ve 6. saatlerde değerlerin sırasıyla 1,00 ve 1,04 düzeyinde sabitlendiği görüldü.



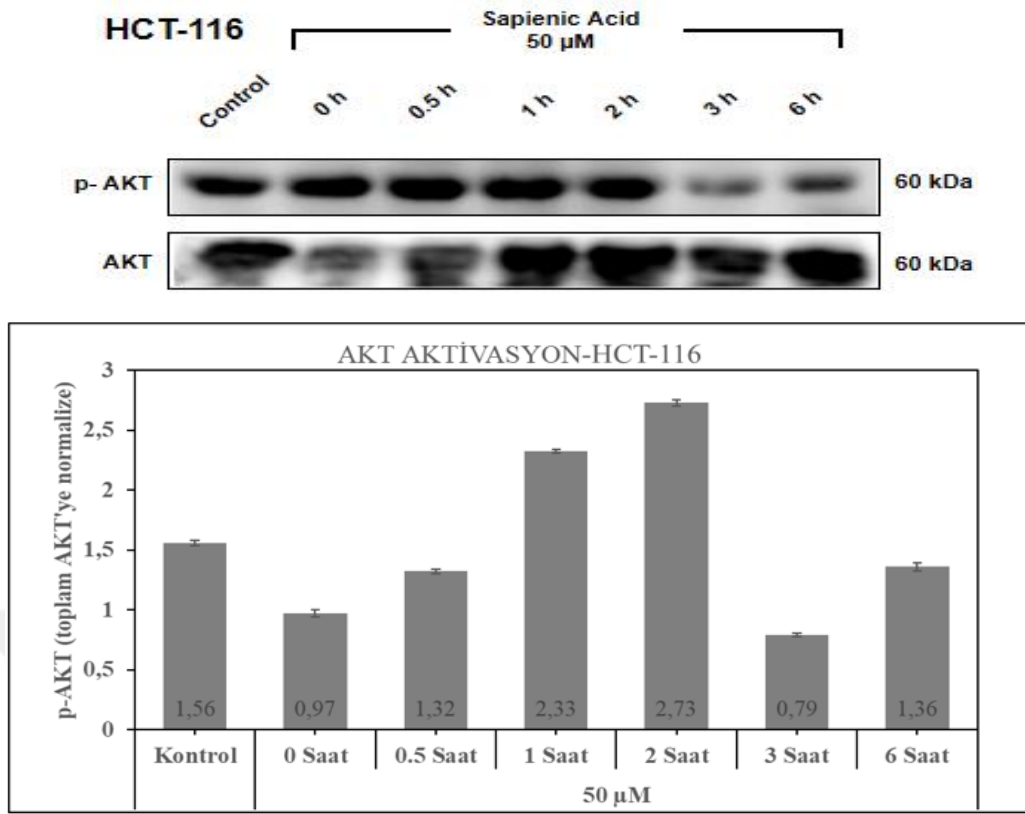
Şekil 4.10 Sapienik asidin 50 μM dozunun HCT116 hücrelerindeki p-EGFR ve EGFR proteinlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine kısa vade etkisi.

Sapienik asidin 50 μM dozunun uzun dönem etkileri (24, 48 ve 72 saat) değerlendirildi (Şekil 4.11). Kontrol grubunda p-EGFR/toplam EGFR oranı 0,85 olarak belirlendi. Uygulamanın 24. saatinde bu oran 1,06'ya, 48. saatte 1,12'ye yükseldi, 72. saatte ise hafifçe azalarak 1,03 düzeyinde seyretti.



Şekil 4.11 50 µM Sapienik asit dozunun HCT116 hücrelerinde p-EGFR ve EGFR proteinlerinin aktivasyonu üzerine uzun vade etkisi.

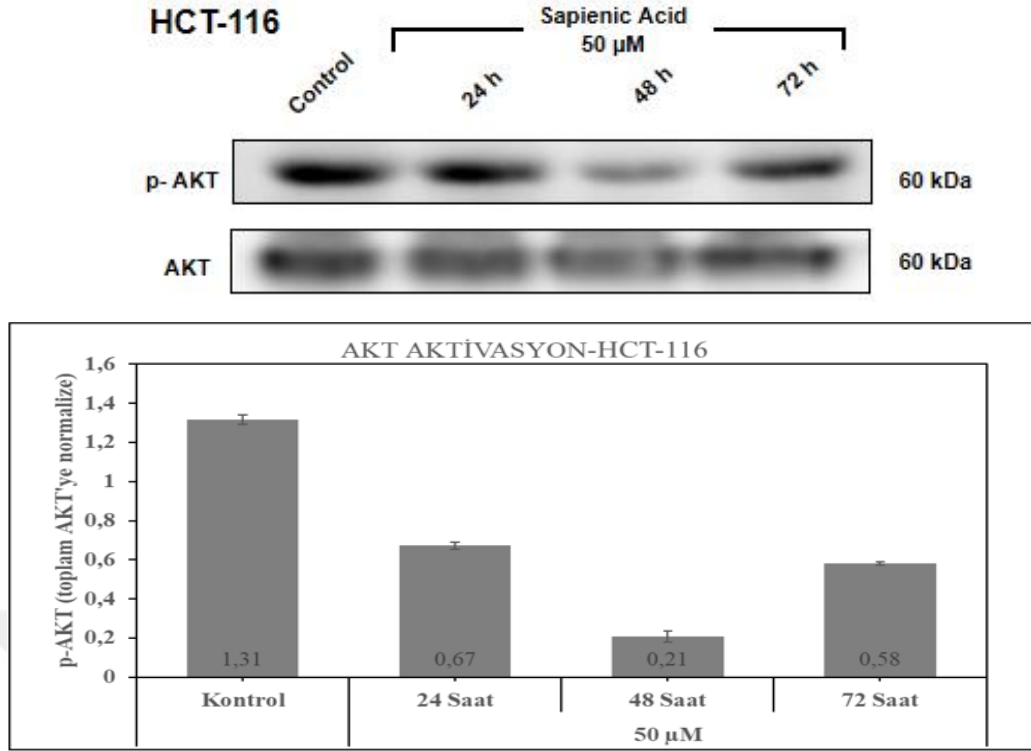
Sapienik asidin 50 µM dozunun 0, 0,5, 1, 2, 3 ve 6 saatlik kısa dönem uygulamalarının AKT aktivasyonu üzerindeki etkileri analiz edildi (Şekil 4.12). Y eksen, p-AKT / toplam AKT'ye normalize edilmiş oranını göstermektedir. Kontrol grubunda bu oran 1,56 olarak belirlendi. Uygulamanın hemen ardından (0. saat) p-AKT düzeyinde düşüş gözlemlendi (0,97), 0,5. saatte kısmi bir artışla 1,32 seviyesine yükseldi. 1. saatte p-AKT oranı belirgin şekilde artarak 2,33, 2. saatte ise en yüksek değere ulaşarak 2,73 oldu. 3. saatte p-AKT oranı keskin biçimde azalarak 0,79'a düştü, 6. saatte ise yeniden toparlanma eğilimi gösterdi ve 1,36 düzeyine ulaştı.



Şekil 4.12 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerindeki p-AKT ve AKT proteinlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine kısa vade etkisi.

Elde edilen kısa vadedeki sonuçlar, SA'nın AKT sinyal yolunu hızlı, geçici ve dalgalı bir biçimde aktive ettiğini göstermektedir. Erken dönemde (0–0,5 saat) p-AKT seviyesindeki azalma, SA'nın ilk anda AKT fosforilasyonunu baskıladığını düşündürmektedir. Ancak 1. ve 2. saatlerdeki keskin artış, SA'nın kısa sürede AKT aktivasyonunu güçlü biçimde tetiklediğini ortaya koymaktadır. Bu artışın ardından 3. saatte gözlenen düşüş, aktivasyonun sürdürülebilir olmadığını ve muhtemelen negatif geri bildirim mekanizmalarının devreye girdiğini düşündürmektedir. 6. saatteki kısmi toparlanma, hücrelerin AKT fosforilasyon düzeyini yeniden dengelemeye çalıştığını göstermektedir. Sonuç olarak, SA kısa dönemde AKT sinyal yolunu hızlı bir şekilde aktive etmiş, ancak bu etki kısa sürede sönümlendi.

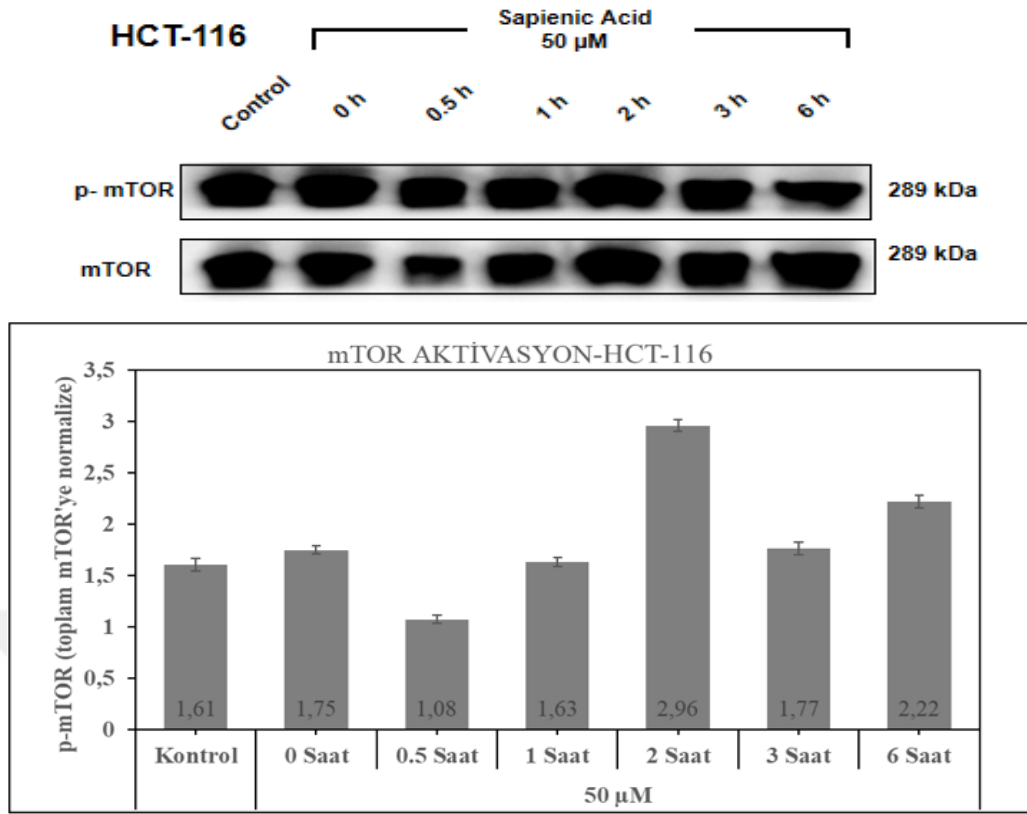
Sapienik asidin 50 µM dozunun 24, 48 ve 72 saatlik uzun dönem uygulamalarının AKT aktivasyonu üzerindeki etkileri analiz edildi (Şekil 4.13). Kontrol grubunda p-AKT/toplam AKT oranı 1,31 olarak ölçüldü. 24. saatte bu oran 0,67'ye düşmüş, 48. saatte minimum seviyesine inerek 0,21 oldu. 72. saatte ise p-AKT düzeyi kısmen artarak 0,58 değerine ulaştı. Bu veriler, uzun süreli SA uygulamasının AKT fosforilasyonunu belirgin biçimde baskıladığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.13 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerindeki p-AKT ve AKT proteinlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine uzun vade etkisi.

Uzun vadedeki sonuçlar, SA'nın AKT aktivitesini sürdürülebilir biçimde inhibe ettiğini göstermektedir. 24. ve 48. saatlerde p-AKT oranındaki keskin düşüş, bileşiğin hücre içi AKT fosforilasyonunu baskıladığını ve bu etkinin zamana bağlı olarak güçlendiğini göstermektedir. 72. saatte kısmi bir artış görülse de p-AKT seviyesi kontrol grubunun oldukça altında kalmıştır.

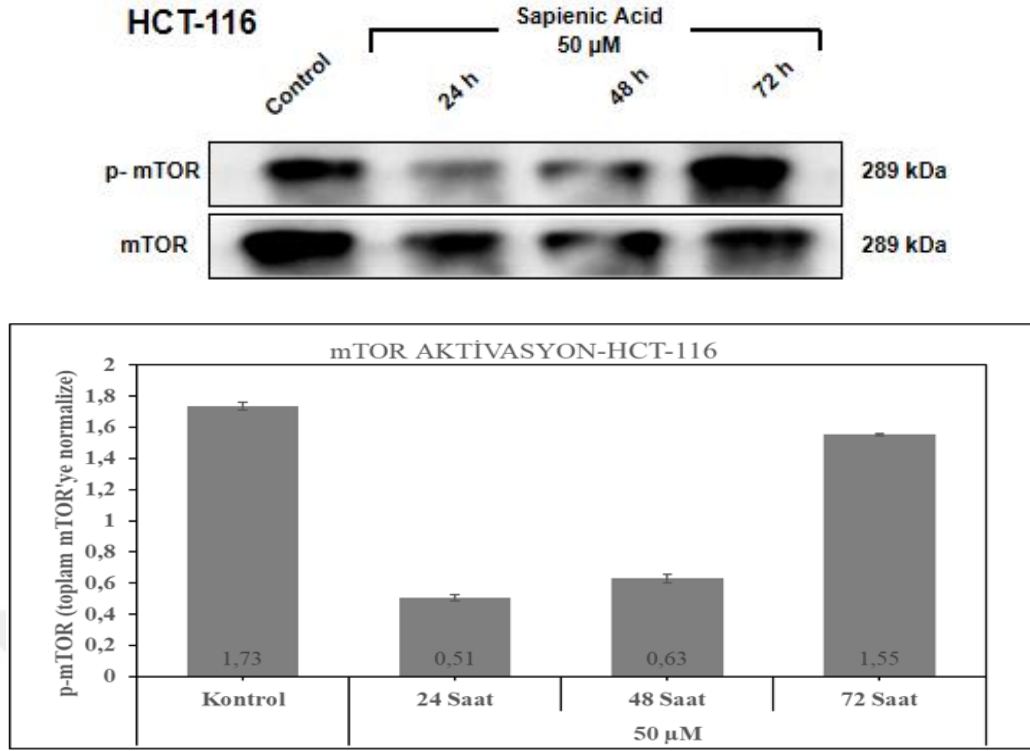
Sapienik asidin 50 µM dozunun 0, 0,5, 1, 2, 3 ve 6 saatlik kısa dönem uygulamalarının mTOR aktivasyonu üzerindeki etkileri analiz edildi (Şekil 4.14). Kontrol grubunda p-mTOR/toplam mTOR oranı 1,61 olarak saptandı. Uygulama sonrasında 0. saatte hafif bir artış gözlemlendi (1,75), 0,5. saatte bu değer en düşük seviyesine düştü (1,08). 1. saatte yeniden yükselme eğilimi başladı (1,63) ve 2. saatte maksimum düzeyine ulaşarak 2,96 değerine kadar arttırdı. 3. saatte bu oran tekrar azalarak 1,77, 6. saatte ise 2,22 olarak ölçüldü.



Şekil 4.14 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerindeki p-mTOR ve mTOR proteinlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine kısa vade etkisi.

Kısa vadedeki veriler, 50 µM SA uygulamasının mTOR fosforilasyonunda zamana bağlı çift yönlü bir yanıt oluşturduğunu göstermektedir. İlk 30 dakikalık süreçte p-mTOR seviyesinin düşmesi, bileşiğin erken dönemde mTOR aktivitesini baskıladığını düşündürmektedir. Ancak bu baskı kısa sürede yerini belirgin bir aktivasyon artışına bırakmıştır. Özellikle 2. saatte gözlenen yaklaşık iki katlık artış, SA'nın mTOR sinyal yolunu kısa sürede güçlü biçimde uyardığını göstermektedir.

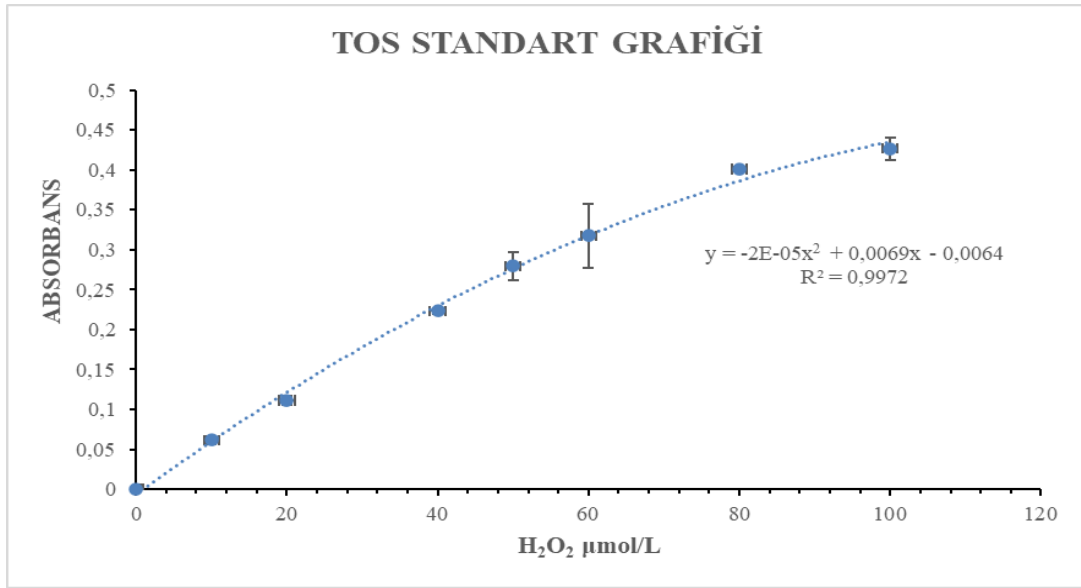
Aynı koşullarda, 50 µM SA'nın uzun dönem etkileri (24, 48 ve 72 saat) mTOR aktivasyonu üzerindeki etkileri incelendi (Şekil 4.15). Kontrol grubunda p-mTOR/toplam mTOR oranı 1,73 olarak belirlendi. Uygulamanın 24. saatinde oran 0,51'e kadar düştü, 48. saatte hafif bir artışla 0,63 düzeyine yükseldi. Uzun inkübasyonun sonunda, 72. saatte ise p-mTOR düzeyi yeniden belirgin şekilde arttı ve 1,55 değerine ulaştı.



Şekil 4.15 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerindeki p-mTOR ve mTOR proteinlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine uzun vade etkisi.

4.5 Toplam Oksidan Durumunun (TOS) Bulguları

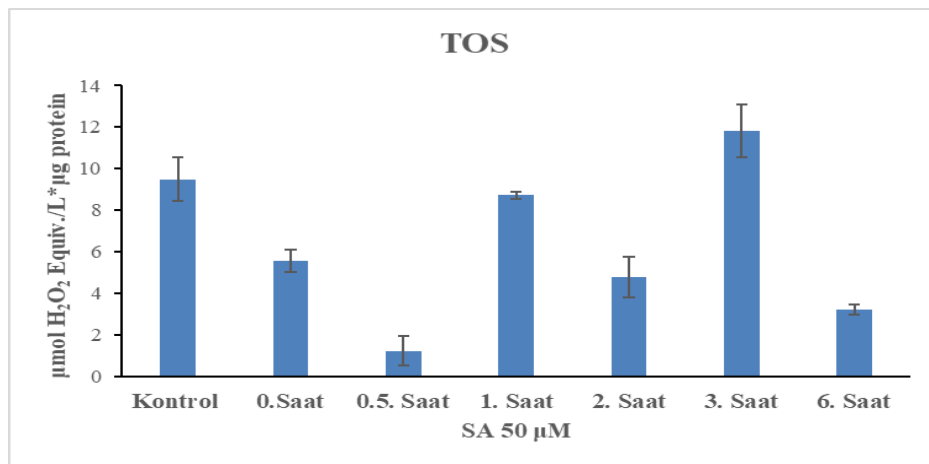
Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücre hattında farklı inkübasyon süreleri uygulandıktan sonra TOS ölçümü yapıldı. TOS standart grafiği, toplam oksidan seviyesinin belirlenmesinde kullanılan bir kalibrasyon eğrisini göstermektedir (Şekil 4.16). Bu yüzden, farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ standart çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerin absorbans değerleri spektrofotometrede ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri yatay eksenle H₂O₂ konsantrasyonu (µmol/L), dikey eksenle absorbans olacak şekilde grafiğe aktarıldı. Ölçüm tekrarlarından elde edilen ortalama değerler hata çubukları ile gösterildi, ardından elde edilen veriler kuadratik regresyon analizine tabi tutularak denklem ($y = -2E-05x^2 + 0,0069x - 0,0064$) ve uyum (korelasyon) katsayısı ($R^2 = 0,9972$) belirlendi. Bilinmeyen numunelerin TOS düzeylerini hesaplamada kullanılabilecek güvenilir bir standart eğri grafiği elde edildi.



Şekil 4.16 Sapienik asidin 50 μM dozunun HCT116 hücrelerindeki TOS standart eğrisi.

Sapienik asidin 50 μM dozunun HCT116 hücrelerinde TOS üzerine kısa zaman aralıklı (0–6 Saat aralığı) etkilerine bakıldı (Şekil 4.17). Kısa zaman aralıklı grupların kontrol grubunda TOS seviyesi başlangıçta oldukça yüksek (~9 μmol H₂O₂ eqv. /μg protein). 0. saatte TOS seviyesi düştü ve 0.5. saatte ise minimum seviyeye ulaştı. Bu durum kısa süreli olarak oksidan seviyelerinin baskılandığını düşündürmektedir. 1. saatte tekrar yükselme, 2. saatte yeniden düşüş ardından 3. saatte maksimum artış, yani oksidatif stresin en yüksek olduğu zaman noktası gözlemlendi. 6. saatte değer tekrar düştü.

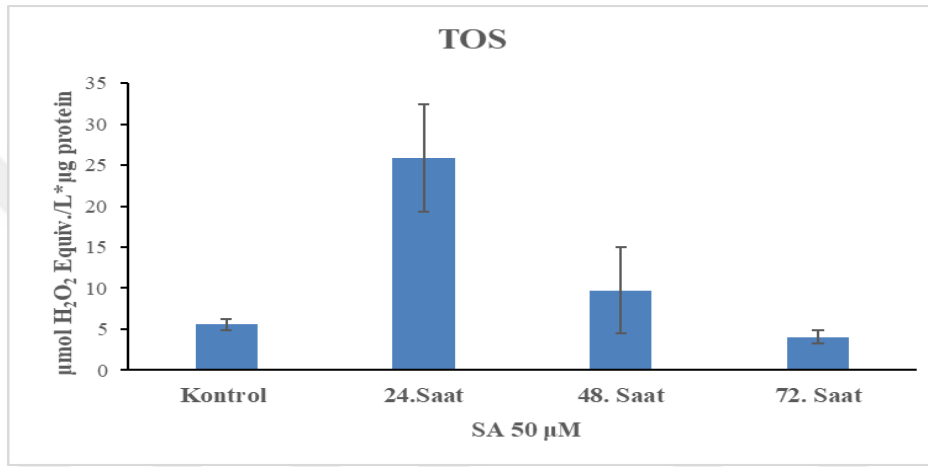
Bu dalgalanmalar, uygulanan 50 μM SA'nın hücrelerde oksidatif stres cevabını zamana bağlı olarak değişken şekilde etkilediğini gösterdi. Özellikle 3. saatte güçlü bir oksidan yanıt oluştu.



Şekil 4.17 Sapienik asidin 50 μM dozunun HCT116 hücrelerindeki TOS üzerine kısa zaman aralıklı (0–6 Saat) etkileri.

Sapienik asidin 50 μM dozunun HCT116 hücrelerinde TOS üzerine uzun zaman aralıklı (24–72 saat) etkilerine bakıldı (Şekil 4.18). Uzun zaman aralıklı inkübasyonlarda kontrol düşük seviyede (~ 5 μmol civarında) gözlemlendi. 24. saatte TOS değeri belirgin şekilde arttı, bu da uzun sürelerde oksidan seviyelerinin arttığını göstermektedir. 48. saatte belirgin bir düşüş var. 72. saatte ise kontrol seviyesine yakın seviyeye düştü.

Elde edilen veriler, SA uygulaması sonrası oksidan yanıtın uzun sürede (24. saat) en yüksek düzeye çıktığını, ardından giderek azaldığını ve 72. saatte kontrol grubu seviyesine yakın seviyeye döndüğünü gösterdi.



Şekil 4.18 50 μM SA uygulamasının HCT116 hücrelerindeki TOS üzerine uzun zaman aralıklı (24–72 Saat) etkileri.

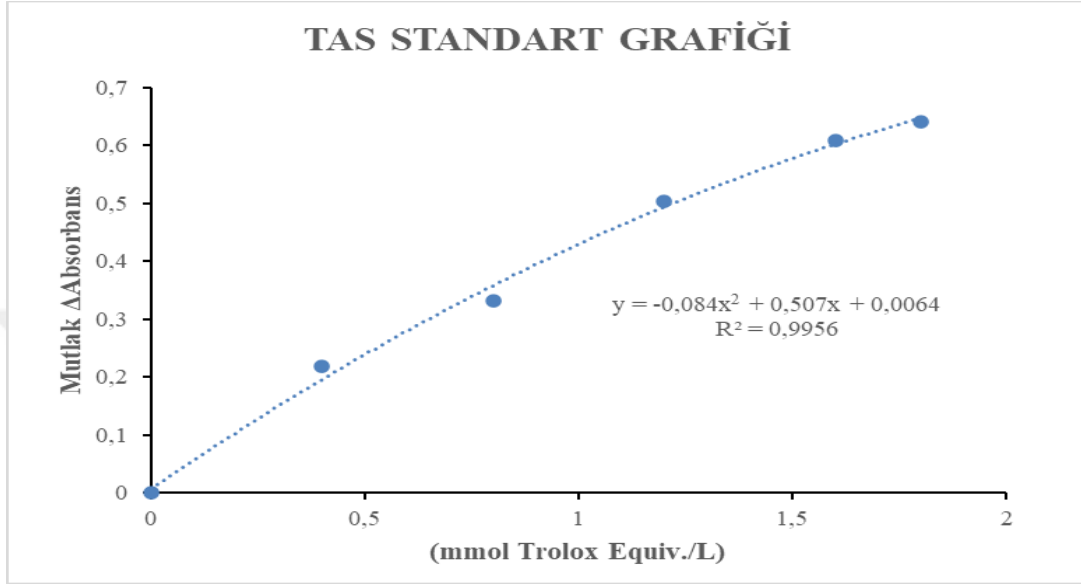
Genel olarak, kısa dönemde (0-6 saat) TOS seviyeleri dalgalı seyretti; özellikle 3. saatte ani bir yükselme görüldü. Uzun dönemde (24–72 saat); en güçlü oksidatif stres yanıtı 24. saatte ortaya çıktı, daha sonra azalarak kontrol seviyelerine yaklaştı.

Bu sonuçlar, 50 μM SA'ın hücrelerde zaman bağımlı oksidatif stres yanıtı oluşturduğunu; erken dönemde dalgalanmalar, geç dönemde ise güçlü ve geçici bir artış meydana getirdiğini gösterdi.

4.6 Toplam Antioksidan Durumunun (TAS) Bulguları

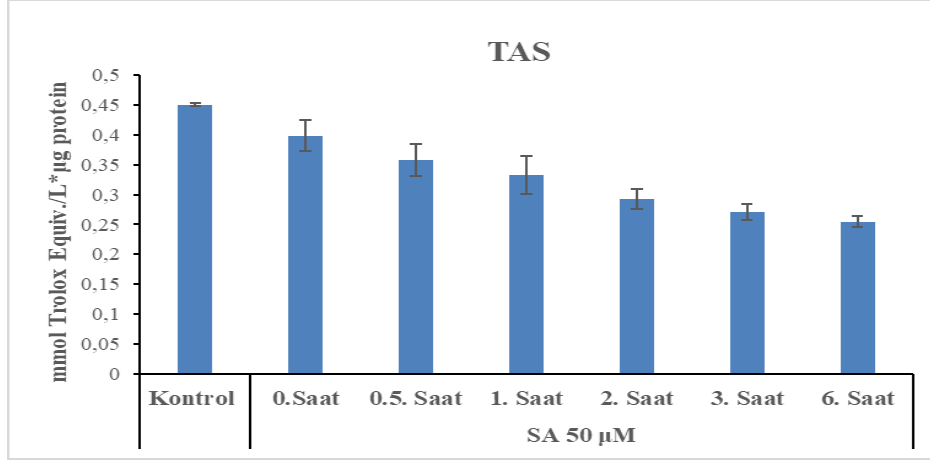
Sapienik asidin 50 μM dozunun HCT116 hücre hattında farklı inkübasyon süreleri uygulandıktan sonra TAS ölçümü yapıldı. TAS standart grafiği, toplam antioksidan seviyesinin belirlenmesinde kullanılan bir kalibrasyon eğrisini göstermektedir (Şekil 4.19). Standart olarak Trolox kullanıldı ve sonuçlar mmol Trolox eşdeğeri/L cinsinden ifade edildi.

Grafikte yatay eksen Trolox konsantrasyonunu (mmol Trolox Eşdeğeri/L), dikey eksen ise mutlak absorbans değişimini (Δ Absorbans) göstermektedir. Bulunan korelasyon katsayısı ($R^2 = 0,9956$), eğri verilerin oldukça yüksek bir doğrulukta olduğunu göstermektedir. Bu durum, oluşturulan standart eğrinin güvenilir olduğunu ve deneysel ölçümler için uygun bir kalibrasyon aracı olarak kullanılabilir olduğunu göstermektedir.



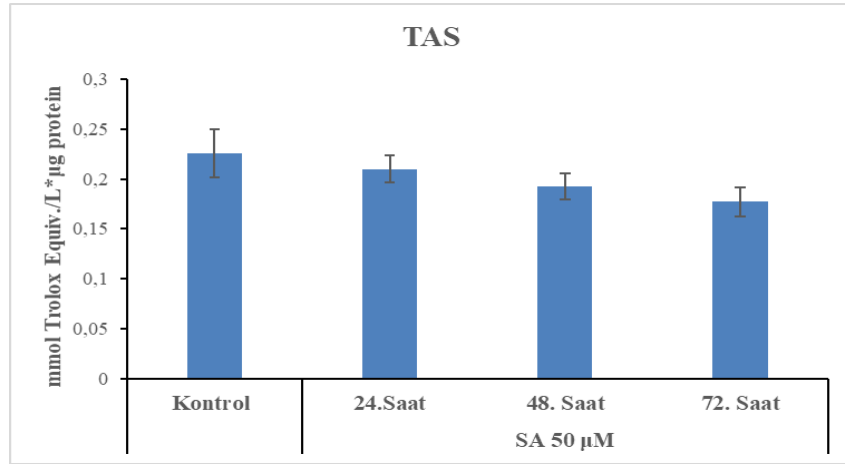
Şekil 4.19 Sapienik asidin 50 μ M dozunun HCT116 hücrelerindeki TAS standart eğrisi.

İlk grafikte, 50 μ M SA uygulamasının HCT116 hücrelerinde kısa zaman aralıklı (0–6 saat aralığı) inkübasyonların TAS düzeyleri üzerine etkisi gösterilmektedir (Şekil 4.20). Kısa zaman aralıklı inkübasyon kontrol grubunda en yüksek TAS değeri gözlenirken, SA uygulamasıyla birlikte TAS düzeylerinde erken dönemden itibaren belirgin bir azalma saptandı. Özellikle 0,5.–2. saatler arasında düşüş daha belirgin olup, 3. ve 6. saatlerde TAS seviyeleri en düşük düzeylere ulaştı. Eğrinin plato yapmaması SA'nın etkisinin geçici değil, ilerleyici olduğunu düşündürmektedir. Bu saatlerde genellikle ROS üretimi artar; TAS'ın ise bu üretimi kompanse edemediği anlaşılmaktadır. Bu durum, kısa süreli SA uygulamasının hücrelerin antioksidan savunma kapasitesini hızlı bir şekilde zamana bağlı baskıladığını göstermektedir.



Şekil 4.20 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerindeki TAS üzerine kısa zaman aralıklı (0–6 Saat) etkileri.

İkinci grafikte, 50 µM SA uygulamasının HCT116 hücrelerinde uzun zaman aralıklı (24-72. saat aralığı) inkübasyonların TAS düzeyleri üzerine etkisi gösterilmektedir (Şekil 4.21). Kontrol grubuna kıyasla 24. saatten itibaren TAS düzeylerinde kademeli bir azalma gözlemlendi. 48. ve 72. saatlerde bu düşüş daha da belirgin hale geldi ve TAS seviyeleri en düşük düzeyine ulaştı. Bu sonuç, SA'nın uzun süreli uygulamasının da hücrelerin antioksidan kapasitesini giderek azalttığını ortaya koymaktadır.



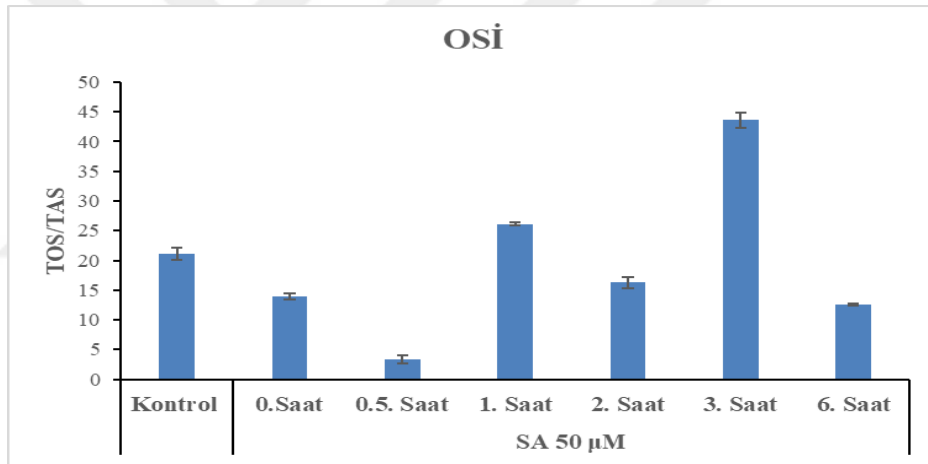
Şekil 4.21 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerindeki TAS üzerine uzun zaman aralıklı (24–72 Saat) etkileri.

Genel olarak değerlendirildiğinde, 50 µM'lık SA uygulaması hem kısa süreli hem de uzun süreli inkübasyonlarda hücrelerin toplam antioksidan seviyelerinde anlamlı bir düşüşe yol açtı. Bu bulgular, TOS yükselmesi ile birlikte değerlendirildiğinde, SA'nın pro-oksidan etki göstererek hücresel stres oluşturduğu yönünde önemli bir

destekleyicidir. SA'nın hücrelerde oksidatif dengeyi bozarak antioksidan savunma mekanizmalarını baskıladığını düşündürmektedir.

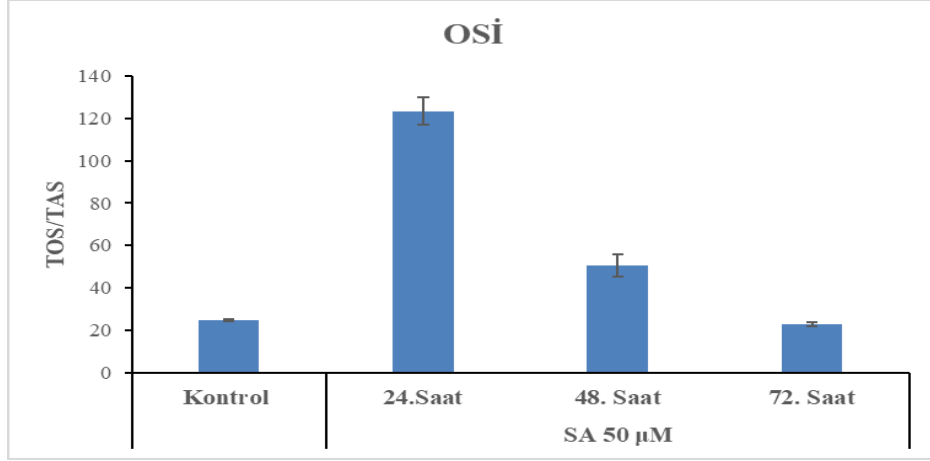
4.7 Oksidatif Stres Endeksinin (OSI) Bulguları

Elde edilen TOS ve TAS verileri oranlanarak OSI değeri hesaplandı. 50 μ M'lık SA ile kısa zaman aralıklı inkübasyon sonucunda elde edilen OSI değerleri şekil 4.22'de gösterildi. Sonuçlar, 50 μ M SA uygulamasının hücrelerde dinamik ve dalgalı bir etkisi olduğunu göstermektedir. Kontrol grubuna kıyasla, SA uygulamasını takiben 0. saatte OSI değerlerinde belirgin bir düşüş gözlemlendi, özellikle 0.5. saatte OSI en düşük seviyeye ulaştı. Bununla birlikte, 1. saatte OSI değerlerinde hızlı bir yükseliş izlendi, 3. saatte zirveye ulaştı. Bu gözlem, SA'nın kısa vadede hücrelerde ciddi oksidatif stres oluşturabildiğini göstermektedir. 6. saatte ise OSI tekrar düşüşe geçti, bu da hücrelerin belirli bir süre sonunda adaptif yanıt geliştirdiğini işaret etmektedir.



Şekil 4.22 Sapienik asidin 50 μ M dozunun HCT116 hücrelerindeki kısa dönem OSI (TOS/TAS) değişimi.

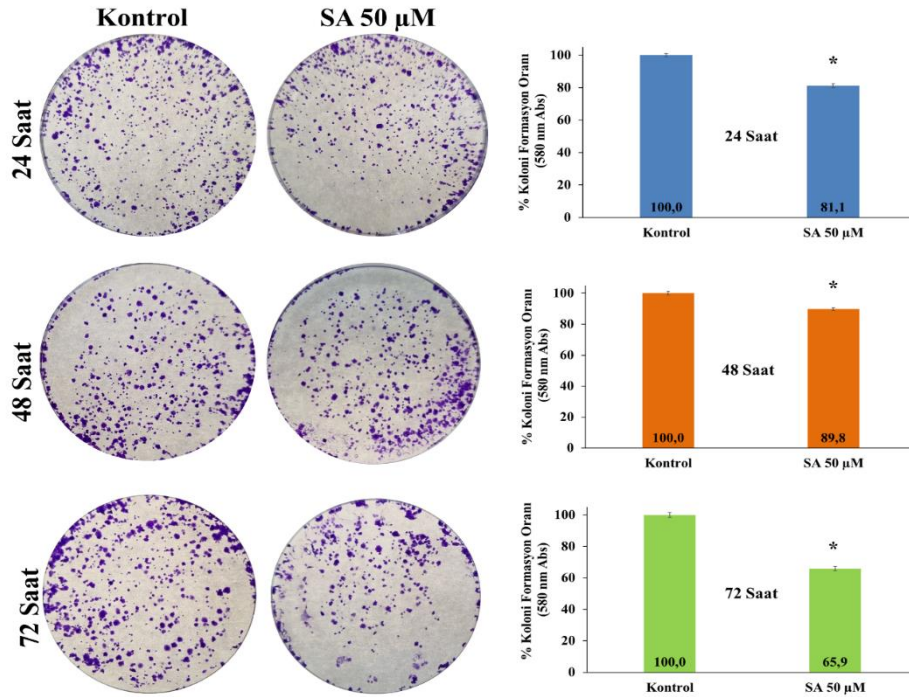
Uzun zaman aralıklı inkübasyon (24–72 saat) OSI ölçümleri ise SA'nın etkisinin zamanla değiştiğini şekil 4.23'de göstermektedir. Kontrol grubunun OSI değerleri dengeli ve düşük kalırken, SA uygulaması sonrası 24. saatte OSI yaklaşık beş kat artış göstererek en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bu durum, uzun vadede SA'nın güçlü bir pro-oksidan etki oluşturduğunu işaret etmektedir. 48. saatte OSI değerlerinin düşmeye başlaması, hücrelerin antioksidan sistemlerini aktive ederek oksidatif dengeyi kısmen geri kazanmaya çalıştığını düşündürmektedir. 72. saatte OSI değerlerinin kontrol düzeyine yaklaşması ise uzun dönemde hücrelerin SA'ya adaptif yanıt geliştirdiğine işaret etmektedir.



Şekil 4.23 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerindeki uzun dönem OSİ (TOS/TAS) değişimi.

4.8 Koloni Formasyon Bulguları

Koloni formasyon analizi, 50 µM SA uygulamasının hücrelerin klonojenik hayatta kalma yeteneği üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirildi. 1000 hücre yoğunluklarında ekim yapılan hücrelerde, 24, 48 ve 72 saatlik SA ile inkübasyonlarının ardından, koloniler kristal viyole ile boyandı ve 580 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Çubuk grafikler ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi (n=3). “*” işareti, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı belirtmektedir (p<0.05).



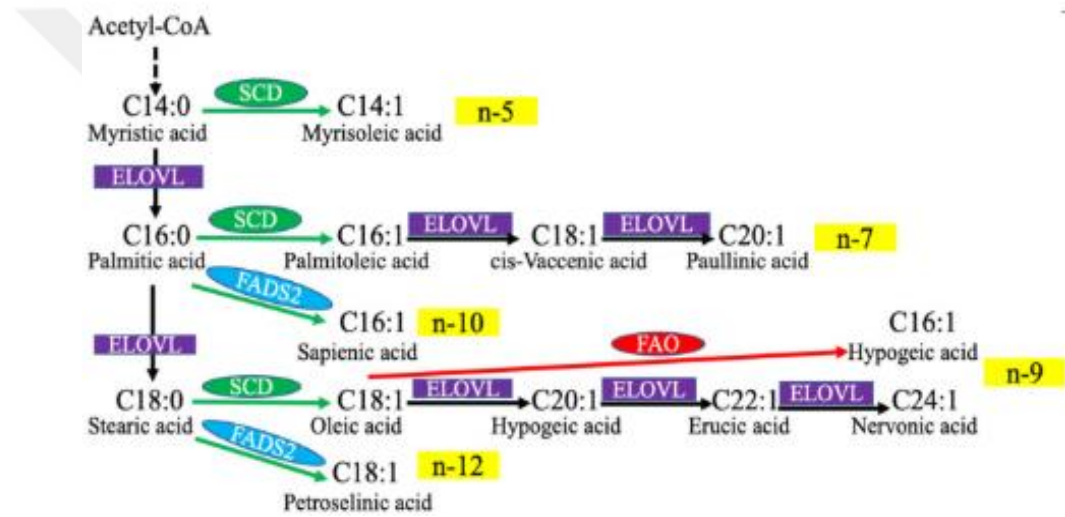
Şekil 4.24 Sapienik asidin 50 µM dozunun HCT116 hücrelerinde 24., 48., 72. saatte hücre canlılığı ve koloni oluşum kapasitesi üzerindeki zamana bağlı değişen etkileri.

Çalışmada hücreler kontrol gruplarına ve 50 μ M SA uygulanan deneme gruplarına ayrıldı. Soldaki görsellerde, her bir sürede kontrol ve SA ile muamele edilen hücrelerde oluşan mor boyalı koloniler görülmektedir. Şekil 4.24'te görüldüğü üzere, SA uygulanan gruplarda koloni sayısı kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldı. Sağdaki grafikler, bu gözlemleri kantitatif olarak desteklemektedir. 24 saatte koloni formasyon oranı %100'den %81,1'e, 48 saatte %89,8'e, 72 saatte ise %65,9'a düştü. Sonuç olarak, 50 μ M SA uygulamasının hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini zamana bağlı olarak anlamlı şekilde azalttığı, yani hücre çoğalmasını baskıladığı görülmektedir. Bu durum, SA'nın hücre proliferasyonunu inhibe eden veya sitotoksik etki gösteren bir bileşik olabileceğini düşündürmektedir.



5. TARTIŞMA

Lipitler hücre zarının temel yapı taşlarını oluşturarak zarın esneklik, plastisite ve korunma özelliklerini sağlayan yapılardır. Enerji depolamanın yanı sıra, hücre içi sinyal iletiminde ikincil haberci olarak görev alarak hücresel süreçlerin düzenlenmesinde kritik rol oynarlar. Güncel çalışmalar, biyoaktif lipitlerin reseptör sinyalleşmesi, enzimatik kaskadların düzenlenmesi ve hücreler arası iletişimde önemli düzenleyiciler olduğunu göstermektedir. Lipit metabolizması hücrenin proliferasyon, farklılaşma, apoptozis ve metastaz gibi süreçlerini etkiler. Özellikle kanser hücrelerinde lipit metabolizmasının yeniden programlanması hem hücre çoğalmasını hem de apoptozisi düzenleyerek tümör progresyonuna çift yönlü katkı sağlamaktadır (166-169).

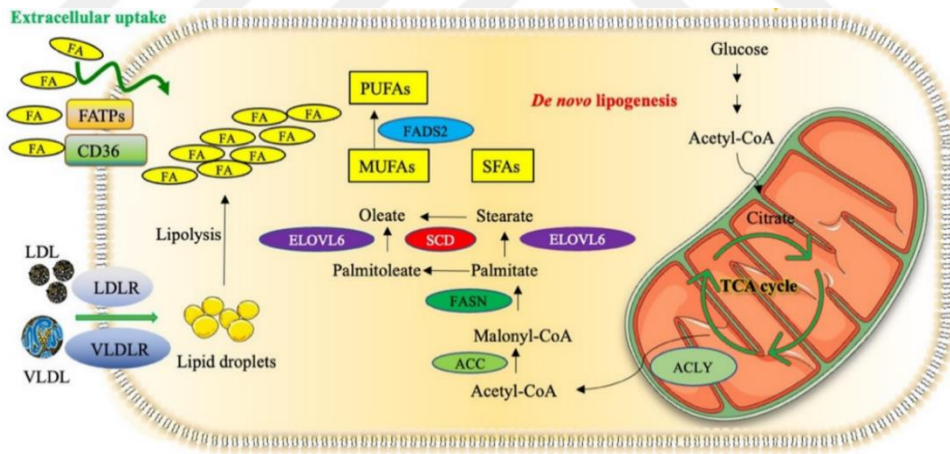


Şekil 5.1 Doymamış yağ asidi biyosentezi (6)

Şekil 5.1’de gösterildiği üzere, sapienik asidin (SA) biyosentezinde merkezi rol üstlenen FADS2, farklı dokularda çeşitli yağ asidi substratlarına yönelik özgül desatürasyon tepkimeleri katalize eder. FADS2, fizyolojik koşullarda öncelikle PUFA yüksek afinite gösterse de PUFA tükenmesi, metabolik stres veya lipid kompozisyonundaki değişiklikler gibi belirli durumlarda palmitik asidi (16:0) $\Delta 6$ -desatüre ederek SA sentezini başlatabilir. Palmitik asidin FADS2 yoluna yönlendirilmesi, hücre içi palmitat düzeylerinin artması, FADS2 ekspresyonunun yükselmesi ve rekabetçi enzim olan SCD1’in baskılanması gibi bir dizi metabolik düzenleme ile kolaylaşır. Ancak SCD1 inhibisyonu bu süreçte önemli olmakla birlikte, SA üretimi yalnızca bu mekanizmaya bağlı değildir; PUFA mevcudiyeti, membran fosfolipidlerinin yeniden düzenlenmesi ve lipogenezde görev alan transkripsiyonel programlar da yağ asidi akışını belirleyen ek faktörlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, FADS2 aracılı alternatif

MUFA sentezi sonucu oluşan SA'nın, kanser hücrelerinde membran mimarisi, reseptör aracılı sinyal iletimi özellikle EGFR ilişkili yollar ve oksidatif stres yanıtları üzerinde modulator etkiler gösterebileceğine işaret etmektedir. Mevcut bilgiler ışığında, SA'nın HCT116 kolorektal kanser hücrelerinde EGFR sinyal iletimi ve redoks dengesi üzerindeki etkilerini sistematik olarak değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu araştırma, lipid metabolizması ile onkojenik sinyal ağlarının kesişim noktasına ilişkin literatürde önemli bir boşluğu doldurmaktadır.

Şekil 5.2'de gösterildiği üzere, MUFA / SFA oranı hücre membran akışkanlığını, sinyal komplekslerinin organizasyonunu ve reseptör aktivasyonlarını değiştirir. Örneğin MUFA'lar membran akışkanlığını artırarak bazı sinyal yollarını (reseptör klasterizasyonu, endositoz vb.) etkileyebilir. SFA'ların aşırı birikimi lipotoksisteye, ER stresi ve apoptoza yol açabilir; hücreler SFA'yı MUFA'ya çevirmek için SCD gibi enzimleri kullanarak bu stresi azaltır. Bir SFA olan palmitat, hücre içinde ELOVL enzimleri aracılığıyla karbon zinciri uzatılabilir, SCD enzimleri tarafından MUFA'lara dönüştürülebilir ve FADS enzimlerinin etkisiyle daha da doymamış hale getirilerek PUFA biyosentezine katkı sağlayabilir (6).

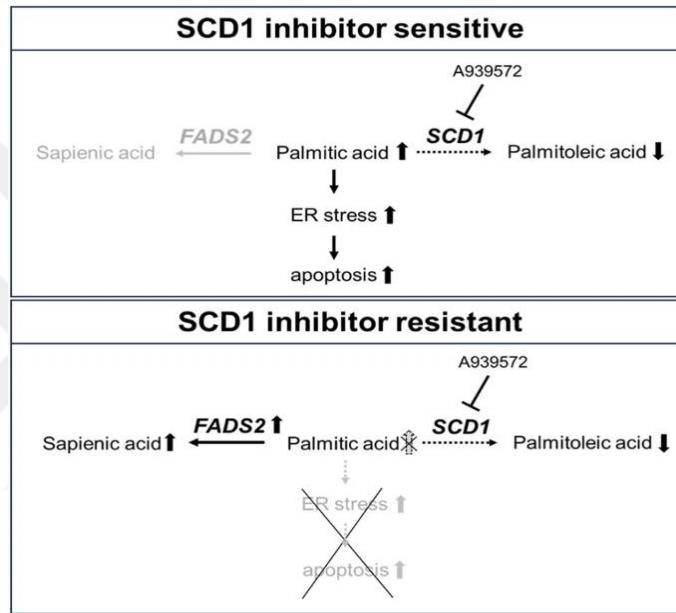


Şekil 5.2 Yağ asitlerinin hücre içi metabolik akışı ve biyosentezi (6)

SCD enzimleri, düz endoplazmik retikulumda yer alan ve doymuş yağ asitlerini MUFA'lara dönüştüren ana desaturazlardır. İnsanlarda iki izoform bulunur: SCD1 (çoğu dokuda) ve SCD5 (özellikle beyin ve pankreasta). SCD1 ekspresyonu; mTOR gibi faktörler tarafından düzenlenir ve p53 ile ilişkisi kanser gelişiminde önem taşır. Dikkat çekici bir şekilde, PI3K/AKT/mTOR sinyalleme sisteminin, kanser hücrelerinde lipogenez aktivasyon mekanizmasının bir parçası olarak SCD1 ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur. Son çalışmalar, bazı kanser hücrelerinde FADS1/2 enzimlerinin SCD dışı

MUFA izomerleri (örneğin sapienat) ürettiğini, bunun da lipit plastisitesi ve kanser hücrelerinin adaptasyonunu desteklediğini göstermiştir. (6)

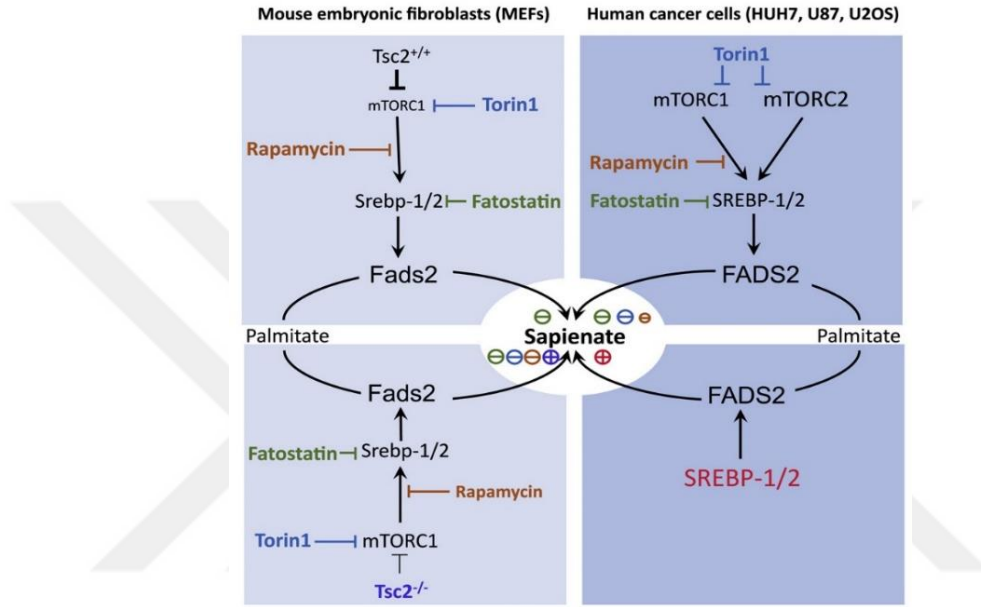
Kanser hücrelerinde yağ asidi desaturazlarının metabolik stres ve hücresel adaptasyon üzerindeki rolleri giderek daha net anlaşılmaktadır. Ikeda ve ark. (2024), SCD1 inhibisyonuna dirençli kanser hücrelerinde FADS2'nin palmitik asit birikimini engelleyerek ER stresine bağlı hücre ölümünü azalttığını ve bu nedenle SCD1 monoterapisinin etkinliğini sınırladığını göstermiştir; ayrıca SCD1 ve FADS2'nin birlikte baskılanmasının dirençli hücrelerde belirgin ER stresine bağlı ölüm oluşturduğunu bildirmiştir (Şekil 5.3) (170).



Şekil 5.3 FADS2 Aktivasyonu ve ER stresinin SCD1 inhibitör direncindeki rolü (170)

Benzer şekilde Şekil 5.4'de şematize edilen çalışmada, Xuan ve ark. (2022), asit ortamından elde edilen over kanseri hücrelerinde SCD1 ve FADS2'nin birlikte yüksek düzeyde eksprese olduğunu ve bu enzimlerin inhibisyonunun lipit oksidasyonu ile ferroptosis duyarlılığını artırarak tümör ilerlemesini baskıladığını ortaya koymuştur (171). FADS2'nin kanser biyolojisindeki daha geniş kapsamlı rolü ise Li ve ark. (2020) tarafından ele alınmış; çalışmada FADS2'nin meme, akciğer, karaciğer ve kolon kanserleri de dâhil olmak üzere pek çok tümör tipinde yükseldiği, desaturasyon yollarını değiştirerek tümör gelişimini desteklediği ve terapötik bir hedef olarak dikkat çektiği vurgulanmıştır (172). Bu metabolik ekseninde SCD1'in çok yönlü etkileri, Sen ve ark. (2023) tarafından özetlenmiş; SCD1'in lipit metabolizması, hücre proliferasyonu, metastaz ve kendini yenileme gibi süreçlerde kritik rol oynadığı, ayrıca ferroptosisle bağlantılı bir kırılma noktası oluşturduğu belirtilmiştir (173). Bununla birlikte, Triki

ve ark. (2020), mTOR/SREBP sinyal yolunun FADS2 ekspresyonunu artırarak metabolik stres koşullarında kanser hücrelerinin hayatta kalmasını desteklediğini göstermiştir; bu bulgu literatürde FADS2'nin genellikle tümör progresyonunu kolaylaştırıcı bir mekanizma olduğuna işaret etse de, çalışmamızda bu eksenin tam tersi yöndeki etkilerinin, özellikle FADS2–SCD1 dengesinin bozulmasının hücresel stres yanıtını artırarak tümör hücrelerini daha duyarlı hâle getirme potansiyeli üzerinde durulacaktır (130).



Şekil 5.4 Hücre tipine göre sapienate'nin mTOR–SREBP–FADS2 sinyal ağı üzerindeki düzenleyici rolü (130)

Çalışmamızda, SA'nın kolon kanseri hücre hattı olan HCT116 üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirildi. Sitotoksikite analizinde MTT testi kullanıldı ve farklı konsantrasyonlardaki SA uygulamalarına karşılık hücre canlılığı üzerindeki etkiler, inkübasyon süresine bağlı olarak incelendi. Bulgular, SA'nın doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını gösterdi. Özellikle 48 saatlik inkübasyon sonucunda 132,7 μ M olarak hesaplanan IC₅₀ değeri, 24 saatte elde edilen 245,1 μ M'lik IC₅₀ değerine kıyasla daha düşük bulundu. Bu durum, SA'nın sitotoksik etkinliğinin zamanla arttığını ve hücrelerde biriken bir etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Sitotoksik etkinliğin değerlendirilmesinde mikroskopik görüntüler de destekleyici nitelikte oldu, SA uygulanan gruplarda morfolojik değişiklikler gözlemlendi. Hücrelerdeki bu değişiklikler, hücresel bütünlüğün bozulduğunu ve ölüm sürecinin başladığını işaret etmektedir. Özellikle 100 μ M ve üzeri dozlarda belirgin hücresel

dejenerasyon, hücre yoğunluğunda azalma ve yapısal bütünlükte bozulma dikkat çekmiştir.

Ancak, yapılan istatistiksel analizler sonucunda, 10 μ M ile 50 μ M arasındaki dozların canlılığı yaklaşık olarak %15 düşürdüğü ve anlamlı bir fark gözlemlenmedi. Bu nedenle, çalışmanın ileri deney aşamalarında düşük ve fizyolojik olarak daha anlamlı kabul edilen 50 μ M SA dozu tercih ettik. Bu dozun tercih edilmesinin temel nedeni, SA'nın kanser hücrelerinde FADS2 tarafından sentezlenen endojen bir MUFA olmasıdır. Düşük dozda SA'nın hücre yüzey reseptörleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek, özellikle EGFR gibi proliferasyonda kilit rol oynayan sinyal yolları üzerindeki potansiyel etkileri anlamak açısından önemlidir. EGFR aktivitesi, membran lipid kompozisyonuyla yakından ilişkilidir. Lipit raftlarının bileşimi reseptörün dimerizasyonunu ve sinyal iletim gücünü doğrudan etkiler. Bu nedenle SA gibi membran lipidlerini değiştiren moleküllerin EGFR sinyal yolağı üzerinde önemli etkileri olabileceği düşünülmektedir.

Western blot deneyleri sonucu elde edilen, proteinlerin hem kısa hem de uzun vadedeki aktivasyon değerleri birlikte değerlendirildiğinde, SA'nın EGFR aktivasyonu üzerindeki etkisinin zamana bağlı ve iki fazlı (bifazik) bir dinamik sergilediği görülmektedir. Kısa dönemde (0–6 saat) EGFR fosforilasyonu baskılanmış, ancak bu erken inhibisyon kısa sürede yerini yeniden aktivasyona bırakmıştır.

Çalışmamızın en dikkat çekici bulgusu, SA'nın EGFR/AKT/mTOR sinyal yollarında zamana bağlı iki fazlı yanıt oluşturmalarıdır. Bu bifazik yanıt paterni, literatürde birçok biyoaktif lipidin hücresel sinyal yollarında gösterdiği karakteristik bir özelliktir. Kısa dönemde (0-6 saat) gözlenen erken baskılama fazı, ardından gelen reaktivasyon fazı, hücrelerin adaptif yanıt mekanizmalarını ve geri bildirim döngülerini aktive ettiğini göstermektedir. Wee ve Wang (2017) EGFR sinyalizasyonunda benzer dinamik yanıtların, reseptör tirozin kinazların ligand maruziyeti sonrası gösterdiği tipik adaptasyon mekanizmaları olduğunu bildirmiştir (14). Arteaga ve Engelman (2014) ErbB reseptör ailesinin bu tür geri bildirim döngüleriyle hızla yeniden düzenlenebildiğini ve bu durumun özellikle kanser hücrelerinin tedavi direnci geliştirme mekanizmalarının temelini oluşturduğunu vurgulamıştır (145).

Uzun dönemde (24–72 saat) ise bu aktivasyonun sürdüğü ve 48. saatte maksimum düzeye ulaştığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, bileşiğin EGFR sinyal yollarında başlangıçta inhibitör bir etki gösterdiğini, fakat hücrelerin zamanla bu baskıya adaptasyon geliştirerek reseptör aktivasyonunu artırdığını göstermektedir. Dolayısıyla, bileşiğin etkisi akut fazda

baskılayıcı, kronik fazda ise telafi edici/uyarıcı bir özellik taşımaktadır. Bu durum, EGFR hedefli tedavi stratejilerinde zamanlamanın ve dozun hücrel yanıt açısından kritik öneme sahip olduğunu vurgulamaktadır.

Western blot bulgularının bütüncül analizleri sonucu, SA'nın mTOR aktivasyonu üzerinde de zamana bağlı, iki fazlı ve geri bildirim kontrollü bir yanıt oluşturduğu görülmektedir. Kısa dönemde (0–6 saat), bileşik mTOR aktivitesini erken dönemde baskılamış ancak ardından belirgin şekilde arttı; bu durum, SA'nın mTOR yolunu hızlı biçimde uyarabildiğini göstermektedir. Buna karşın uzun dönemde (24–72 saat) mTOR aktivitesinin ilk 24. saatte anlamlı biçimde azaldığı, fakat 72. saatte yeniden toparlandığı görülmektedir. Bu sonuçlar, SA'nın mTOR sinyal yolunu akut fazda geçici bir aktivasyonla uyardığını, kronik fazda ise inhibitör etki sonrası adaptif bir reaktivasyonun gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, SA'nın mTOR üzerindeki etkisi zaman bağımlı, geri besleme mekanizmalarıyla düzenlenen bir yanıt profili göstermekte olup, bu durum mTOR aracılı hücrel metabolizma ve proliferasyon süreçlerinde önemli biyolojik sonuçlar doğurabilir.

Sapienik asidin AKT aktivasyonu üzerindeki etkisinin zamana bağlı çift fazlı bir yanıt oluşturduğu görülmektedir. Kısa dönemde (0–6 saat) bileşik AKT fosforilasyonunu geçici olarak artırarak hücre içi sinyalleme aktif etti, ancak bu etkinin sürdürülebilir olmadığı gözlemlendi. Uzun dönemde (24–72 saat) ise AKT aktivitesi belirgin biçimde azaldı ve bu azalma özellikle 48. saatte maksimum düzeye ulaştı. Bu bulgular, SA'nın AKT/mTOR ekseninde erken fazda uyarıcı, geç fazda ise inhibitör bir etki oluşturduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, SA'nın AKT fosforilasyonu üzerindeki etkisi geçici bir aktivasyonun ardından kalıcı bir baskılanma şeklinde seyretmektedir. Bu sonuç, SA'nın uzun vadede AKT aracılı hücrel büyüme ve sağkalım sinyallerini zayıflatabileceğini ve antikanser potansiyelinin bu mekanizma üzerinden gerçekleşebileceğini düşündürmektedir.

The American Chemical Society (ACS) dergisinde 2025 yılına ait, Mayo Suzuki ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, sapienik asidin hidroksil radikalleriyle etkileşim dinamiklerini ve reaksiyon sonucunda meydana gelen ürünleri kapsamlı olarak göstermişlerdir. Elde ettikleri bulgular sonucu, genel olarak, SA'nın UV ışığı ve H₂O₂ varlığında kontrollü oksidatif dönüşümler geçirebilen bir lipit yapısı olduğunu ve bu özelliğiyle ROS karşı duyarlılığının biyokimyasal açıdan önemli olduğunu ortaya koymuşlardır (Şekil 5.5) (174).

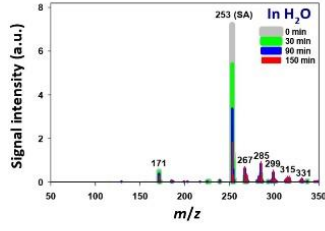


Figure S5: Negative-ion mass spectra (m/z 50–350) of a mixture of 0.1 mM SA and 1.0 mM H_2O_2 in water irradiated by ultraviolet light at pH 6.3 as a function of irradiation time. No product signals appeared at $50 \leq m/z \leq 250$

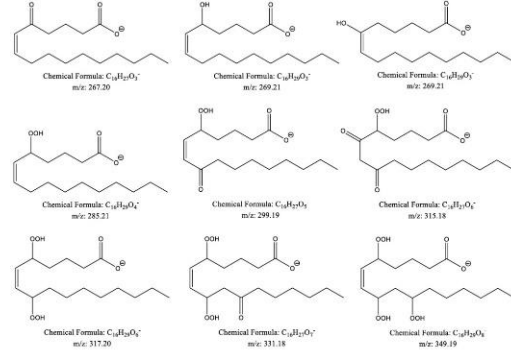
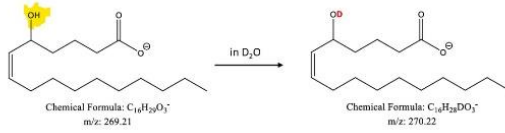


Figure S7: Examples of proposed SA-oxidation products. Note that there are multiple isomeric products not shown here.

Şekil 5.5 Sapienik Asidin Sudaki Hidroksil Radikaliyle Reaksiyonu: Kinetik ve Ürün Çalışması (174).

Literatürde, sapienik asidin anti-inflamatuar ve bağışıklık yanıtlarını modüle edici etkileri gösterilmiştir. Ancak, kanser hücreleri üzerindeki etkilerine dair veriler sınırlıdır. Son yıllarda doymamış yağ asitlerinin, özellikle tekli doymamış ve dallanmış zincirli yağ asitlerinin, hücre membran dinamiklerini, sinyal iletimini ve hücre proliferasyonunu etkileyebileceğine dair kanıtlar artmaktadır. Bu bağlamda, SA'nın da benzer biyolojik etkilere sahip olabileceği ve EGFR gibi membran proteinlerinin lokalizasyonu veya aktivasyonu üzerinde düzenleyici rol oynayabileceği öngörülmektedir. Mevcut literatürde MUFA'ların kanser hücre hatlarında hücre içi sinyal yollarına olan spesifik etkileri yeterince aydınlatılamamıştır. Bu nedenle bu alanda daha derin çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma, SA'nın EGFR/AKT/mTOR etkilerini gösteren ilk çalışmalardan biridir. Ayrıca, sapienik asidin oksidatif stres ve enflamasyon durumunda aynı araşidonik asitten türeyen eikozanoid metabolitleri gibi türeyebileceği ve bu moleküllerinden hücresel strese katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan TOS analizleri sonucunda, 50 μ M SA uygulamasının hücrelerde zaman bağımlı oksidatif stres yanıtı oluşturduğu gözlemlendi. Kısa süreli ölçümlerde (0–6. saat), TOS seviyelerinin dalgalı bir seyir izlediği ve özellikle 3. saatte belirgin bir artış göstererek maksimum düzeye ulaştığı tespit edildi. Bu durum, SA'nın kısa süre içerisinde hücresel oksidan/antioksidan dengesini etkileyerek geçici fakat güçlü oksidatif yanıt oluşturduğunu düşündürmektedir. Uzun süreli ölçümlerde (24–72. saat) ise TOS düzeylerinde belirgin bir zaman bağımlı değişim saptandı. Özellikle 24. saatte kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bir artış meydana geldi, ardından 48. saatte bu seviyelerin düşüşe geçtiği ve 72. saatte kontrol grubunu seviyesine düşüğü belirlendi. Bu

bulgular, SA uygulamasının oksidatif stresi özellikle 24. saatte maksimum düzeye çıkardığını, ancak bu etkinin ilerleyen saatlerde azaldığını göstermektedir. Artan oksidatif stres AKT-mTOR baskılanmasıyla uyumludur. Genel olarak elde edilen sonuç, SA'nın kısa süreli inkübasyonlarında dalgalı, uzun süreli inkübasyonlarında ise güçlü fakat geçici bir oksidatif stres yanıtı oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda, SA 50 μ M uygulamasının hücrelerin TAS üzerindeki etkileri hem kısa süreli (0–6 saat) hem de uzun süreli (24–72 saat) inkübasyonlarında değerlendirildi. Elde edilen bulgular, SA'nın uygulandığı tüm zaman noktalarında kontrol grubuna kıyasla TAS seviyelerinde anlamlı bir azalmaya yol açtığını göstermektedir. Kısa süreli inkübasyon sonuçlarına bakıldığında, özellikle ilk 6 saat içerisinde TAS düzeylerinde hızlı bir düşüş gözlemlendi. Bu durum, SA'nın hücrelerde erken dönemde oksidatif stres yanıtını tetikleyerek antioksidan savunma kapasitesini baskıladığına işaret etmektedir. Hücrelerin başlangıçta sahip olduğu endojen antioksidan rezervleri, SA maruziyetine karşı kısa sürede tüketilmiş olabilir. Bu bulgu, SA'nın oksidatif dengeyi bozarak ROS üretimini artırabileceğini düşündürmektedir. Uzun süreli inkübasyon sonuçları incelendiğinde ise (24–72 saat), TAS düzeylerinde kademeli ancak sürekli bir azalışın devam ettiği görülmektedir. Bu durum, SA'nın hücrelerde antioksidan kapasiteyi yalnızca erken dönemde değil, ilerleyen saatlerde de baskılamaya devam ettiğini göstermektedir. Olası mekanizma olarak, SA'nın antioksidan enzimlerin aktivitesini inhibe etmesi veya redoks dengesini bozarak antioksidan sistemlerin yeterli yanıt verememesine yol açması öne sürülebilir. Ayrıca, uzun süreli SA maruziyetinin hücrelerin adaptif yanıt mekanizmalarını aşarak oksidatif hasarı artırabileceği değerlendirilmektedir.

SA (50 μ M) uygulamasının farklı zaman noktalarında hücrelerde oluşturduğu oksidatif stres yanıtı, TOS/TAS (OSİ) oranı üzerinden değerlendirildi. Elde edilen bulgular, SA'nın uygulama sonrası erken ve geç dönemlerde oksidatif stres üzerinde farklı etkiler yarattığını göstermektedir. Kısa süreli uygulamalarda (0–6. saat aralığı), OSİ değerlerinde dalgalanmalar gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla özellikle 1. ve 3. saatlerde belirgin artış olduğu dikkat çekmektedir. Bu sonuç, SA'nın hücrelere alındıktan sonra erken dönemde oksidan/antioksidan dengesini bozarak geçici bir oksidatif stres oluşturduğunu düşündürmektedir. Ancak 6. saate gelindiğinde OSİ düzeyinin tekrar düşmesi, hücrelerin savunma mekanizmalarının (antioksidan enzim aktivasyonları, redoks dengeleme mekanizmaları vb.) devreye girmiş olabileceğini düşündürmektedir. Uzun süreli etkilerine bakıldığında (24–72. saat), OSİ değerlerinin özellikle 24. saatte çok

belirgin şekilde arttığı görülmektedir. Bu durum, SA'nın uzun süreli etkisinin hücrelerde güçlü bir oksidatif yanıt oluşturduğunu ortaya koymaktadır. 24. saatteki bu yüksek oksidatif stres, muhtemelen SA'nın hücre içi metabolizmasında ortaya çıkan ROS birikiminden kaynaklanmaktadır. 24. Saatteki bu maksimum artış AKT-Mtor baskılanmasıyla ilişkilendirilebilir. Yüksek OSİ, AKT ve mTOR baskılanmasıyla paralellik göstermektedir. Ancak 48. ve 72. saatlerde OSİ düzeylerinin kademeli olarak azalması, hücrelerin adaptasyon geliştirerek oksidatif dengeyi yeniden sağlamaya çalıştığını düşündürmektedir. Bu sonuçlar, SA'nın zaman bağımlı etkiler gösterdiğini ve hücrel redoks homeostazında geçici bozulmalar yarattığını ortaya koymaktadır.

Koloni formasyon deneylerinin sonucu, SA 50 μ M uygulamasının hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini doza bağlı olmasa da zamana bağlı olarak anlamlı şekilde azalttığını açıkça göstermektedir. 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, SA uygulanan gruplarda koloni sayısının giderek azaldığı, özellikle 72. saatte bu azalmanın belirginleştiği görülüyor. 24 saatte %81,1, 48 saatte %89,8 ve 72 saatte %65,9'luk oranlar, hücrelerin SA'ya maruziyet süresi uzadıkça hayatta kalma ve çoğalma kapasitelerinin azaldığını gösteriyor. Bu sonuçlar SA'nın hücre proliferasyonunu baskılayıcı bir etki yaptığını, muhtemelen anti-proliferatif veya sitotoksik bir mekanizmayla hücrelerin koloni oluşturmalarını engellediğini düşündürüyor. İstatistiksel anlamlılığın ($p < 0.05$) bulunması, bu etkinin rastlantısal olmadığını ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, SA 50 μ M'nin hücrelerin uzun süreli yaşama ve koloni oluşturma yeteneğini önemli ölçüde azalttığını, dolayısıyla potansiyel olarak antikanser veya antiproliferatif özellik gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, elde edilen veriler SA'nın hücrelerde hem kısa hem de uzun dönemde antioksidan kapasiteyi azalttığını ve belirli koşullarda oksidatif stres indükleyici bir ajan olarak davranabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, SA'nın biyolojik sistemlerde çift yönlü (antioksidan/pro-oksidan) etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir. Gelecekte yapılacak çalışmaların, farklı konsantrasyonlar ve hücre tiplerinde SA'nın redoks dengesi üzerindeki etkilerini, özellikle de antioksidan enzim aktiviteleri ile ilişkisini detaylı biçimde incelemesi, SA'nın oksidatif stres üzerindeki mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına önemli katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, bir MUFA olan SA'nın kolon kanseri hücre hattı HCT116 üzerindeki etkileri değerlendirildi. Elde edilen bulgular, SA'nın hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak azalttığını, EGFR/AKT/mTOR sinyal yollarında çift fazlı ve zamana bağımlı bir düzenleme oluşturduğunu göstermiştir. Ayrıca, SA'nın hücrelerde oksidatif stresi artırarak antioksidan kapasiteyi azalttığı ve pro-oksidan özellik sergilediği belirlenmiştir.

1. Sapienik asidin HCT116 kolon kanseri hücrelerinde düşük dozlarda sitotoksik etki göstermediği, MTT analizinde 5–50 μ M aralığında hücre canlılığı üzerinde anlamlı azalma oluşturmadığı belirlendi.
2. Sapienik asidin 24 saatlik inkübasyonda IC_{50} değerinin 245,1 μ M, 48 saatlik inkübasyonda ise 197,4 μ M olarak hesaplanması, SA'nın toksik etkisinin zaman ve doza bağımlı olduğunu gösterdi.
3. Sapienik asidin 50 μ M dozu, sitotoksikite oluşturmaması ve fizyolojik doz aralığını temsil etmesi nedeniyle sonraki sinyal yolak analizleri için uygun bulundu.
4. Kısa dönem (0–6 saat) SA uygulaması sonucunda p-EGFR düzeylerinde zaman bağımlı artış tespit edildi; en belirgin artış 1. saatte gözlemlendi. Total EGFR düzeyleri ise anlamlı değişiklik göstermedi.
5. Uzun dönem (24–72 saat) analizlerinde p-EGFR aktivitesi 24. saatte kontrolün üzerinde kaldı, ancak 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda azalma eğilimi sergiledi.
6. Sapienik asidin kısa dönem uygulamasında p-AKT seviyeleri 1–3 saat aralığında belirgin şekilde yükseldi, 6. saatte düşüş eğilimi gösterdi. Total AKT protein seviyeleri sabit kaldı.
7. Uzun dönem uygulamada p-AKT seviyeleri 24 ve 48 saatlerde artış, 72 saatte ise anlamlı düşüş gösterdi. Bu sonuçlar SA'nın AKT aktivasyonunu zamana bağlı olarak modüle ettiğini ortaya koydu.
8. mTOR fosforilasyonunun kısa dönemde (1–3 saat) arttığı, 6. saatte azaldığı görüldü; p-mTOR aktivitesi özellikle 48. saatte en yüksek düzeye ulaştı. Bu durum SA'nın erken ve geç dönemlerde farklı mTOR yanıtları oluşturduğunu göstermektedir.

9. TOS analizlerinde SA uygulaması sonrasında 0–6 saatlik zaman aralığında oksidan düzeylerinin belirgin şekilde arttığı, özellikle 2–3. saatlerde TOS artışının en yüksek değerlere ulaştığı görüldü.
10. TAS analizlerinde SA uygulaması sonrası erken dönemde antioksidan kapasitede azalma saptandı; 2–3. saat aralığında TAS değerleri belirgin düştü ve 6. saatte sınırlı düzeyde toparlanma eğilimi gözlemlendi.
11. OSI hesaplamaları, SA uygulamasının oksidatif stres indeksini anlamlı şekilde yükselttiğini, 2–3. saatlerde OSI değerlerinin en yüksek seviyeye ulaştığını ve 6. saatte düşüşe rağmen kontrolün üzerinde kaldığını gösterdi.
12. TOS artışı, TAS azalması ve OSI yükselişi birlikte değerlendirildiğinde, SA'nın erken dönemde güçlü bir oksidatif stres yanıtı oluşturduğu, bu yanıtın sinyal yollarındaki değişimlerle paralel ilerlediği sonucuna varıldı.
13. Elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde SA'nın, EGFR/ AKT/ mTOR eksenini zaman bağımlı olarak modüle ettiği, aynı zamanda oksidatif stres yanıtını artırdığı ve bu etkilerin düşük dozlarda %15'lik bir sitotoksite oluşturarak gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.
14. Bu çalışma, SA'nın kolon kanseri hücrelerinde membran kaynaklı sinyal iletiminde modülatör rol oynayabileceğini, redoks homeostazı ve proliferatif sinyaller arasında anlamlı bir bağlantı oluşturabileceğini göstermiştir.
15. Literatürde SA'nın kolorektal kanser hücrelerinde EGFR ve aşağı akım yolları üzerindeki etkilerini değerlendiren önceki bir çalışma bulunmadığından, bu tez konu üzerinde yapılan ilk sistematik incelemelerden biri olarak özgün bilimsel katkı sunmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, sapienik asidin düşük dozlarda sitotoksik olmaksızın EGFR/AKT/mTOR eksenini ve oksidatif stres yanıtını modüle ettiğini göstermektedir. Bu etki profili ile gelecekte yapılacak çalışmalarda farklı kanser türlerinde, SA'yı tek başına terapötik bir ajan olmaktan ziyade, özellikle EGFR inhibitörleri, mTOR inhibitörleri ve oksidatif stres artırıcı kemoterapilerle kombine kullanılabilecek potansiyel bir biyolojik modülatör olarak konumlandırmaktadır. Kanser hücrelerinde FADS2 aktivitesinin yüksek olması ve lipid metabolizmasının yeniden programlanması, SA'nın kombinasyon tedavilerinde tümör-selektif bir duyarlılık artırıcı ajan olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKÇA

- 1.WHO. Estimated number of deaths from 2022 to 2045, Mortality, Both sexes, age [0-85+]: World Health Organization.; 2025 [Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?cancers=8&mode=population&group_populations=0&types=1&populations=900&multiple_cancers=0&multiple_populations=1&single_unit=1000&sexes=0].
- 2.Murphy N, Moreno V, Hughes DJ, Vodicka L, Vodicka P, Aglago EK, et al. Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Mol Aspects Med.* 2019;69:2-9.
- 3.Stoffel EM, Murphy CC. Epidemiology and Mechanisms of the Increasing Incidence of Colon and Rectal Cancers in Young Adults. *Gastroenterology.* 2020;158(2):341-53.
- 4.Vernia F, Longo S, Stefanelli G, Viscido A, Latella G. Dietary Factors Modulating Colorectal Carcinogenesis. *Nutrients.* 2021;13(1).
- 5.de Carvalho C, Caramujo MJ. The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules.* 2018;23(10).
- 6.Guo Z, Bergeron KF, Lingrand M, Mounier C. Unveiling the MUFA-Cancer Connection: Insights from Endogenous and Exogenous Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2023;24(12).
- 7.Harwood JL. Polyunsaturated Fatty Acids: Conversion to Lipid Mediators, Roles in Inflammatory Diseases and Dietary Sources. *Int J Mol Sci.* 2023;24(10).
- 8.Papsdorf K, Miklas JW, Hosseini A, Cabruja M, Morrow CS, Savini M, et al. Lipid droplets and peroxisomes are co-regulated to drive lifespan extension in response to mono-unsaturated fatty acids. *Nat Cell Biol.* 2023;25(5):672-84.
- 9.Dyall SC, Balas L, Bazan NG, Brenna JT, Chiang N, da Costa Souza F, et al. Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: Recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions. *Prog Lipid Res.* 2022;86:101165.
- 10.Min JY, Kim DH. Stearoyl-CoA Desaturase 1 as a Therapeutic Biomarker: Focusing on Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2023;24(10).
- 11.Choi S, Yoo YJ, Kim H, Lee H, Chung H, Nam MH, et al. Clinical and biochemical relevance of monounsaturated fatty acid metabolism targeting strategy for cancer stem cell elimination in colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;519(1):100-5.

- 12.Kucuksayan E, Sansone A, Chatgililoglu C, Ozben T, Tekeli D, Talibova G, et al. Sapienic Acid Metabolism Influences Membrane Plasticity and Protein Signaling in Breast Cancer Cell Lines. *Cells*. 2022;11(2).
- 13.Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):22.
- 14.Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. 2017;9(5).
- 15.Yu J, Fang T, Yun C, Liu X, Cai X. Antibody-Drug Conjugates Targeting the Human Epidermal Growth Factor Receptor Family in Cancers. *Front Mol Biosci*. 2022;9:847835.
- 16.Beekhof R, Bertotti A, Bottger F, Vurchio V, Cottino F, Zanella ER, et al. Phosphoproteomics of patient-derived xenografts identifies targets and markers associated with sensitivity and resistance to EGFR blockade in colorectal cancer. *Sci Transl Med*. 2023;15(709):eabm3687.
- 17.Menendez JA, Lupu R. Mediterranean dietary traditions for the molecular treatment of human cancer: anti-oncogenic actions of the main olive oil's monounsaturated fatty acid oleic acid (18:1n-9). *Curr Pharm Biotechnol*. 2006;7(6):495-502.
- 18.Zhang J, Song F, Zhao X, Jiang H, Wu X, Wang B, et al. EGFR modulates monounsaturated fatty acid synthesis through phosphorylation of SCD1 in lung cancer. *Mol Cancer*. 2017;16(1):127.
- 19.InformedHealth.org. Overview: Colorectal cancer. 2024.
- 20.Health NCIatNIH. Why Is Colorectal Cancer Rising Rapidly among Young Adults? 2020[Available from: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2020/colorectal-cancer-rising-younger-adults>.
- 21.Roshandel G, Ghasemi-Kebria F, Malekzadeh R. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Cancers (Basel)*. 2024;16(8).
- 22.Duan B, Zhao Y, Bai J, Wang J, Duan X, Luo X, et al. Colorectal Cancer: An Overview. In: Morgado-Diaz JA, editor. *Gastrointestinal Cancers*. Brisbane (AU)2022.
- 23.McCulloch SM, Aziz I, Polster AV, Pischel AB, Stalsmeden H, Shafazand M, et al. The diagnostic value of a change in bowel habit for colorectal cancer within different age groups. *United European Gastroenterol J*. 2020;8(2):211-9.
- 24.Menon G, Cagir B. Colon Cancer. *StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Burt Cagir declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2025.

- 25.Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
- 26.Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(1):17-48.
- 27.Siegel RL, Kratzer TB, Giaquinto AN, Sung H, Jemal A. Cancer statistics, 2025. *CA Cancer J Clin.* 2025;75(1):10-45.
- 28.WHO. Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence and Mortality, Both sexes, in 2022 Continents (Top 15 cancer sites): World Health Organization. The International Agency for Research on Cancer (IARC). *Cancer TODAY*; 2025 [Available from: https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/bars?mode=cancer&group_populations=1&types=0_1&sort_by=value1&group_crc=0].
- 29.WHO. Absolute numbers, Incidence and Mortality, Both sexes, in 2022 Türkiye (Top 15 cancer sites): World Health Organization. The International Agency for Research on Cancer (IARC). *Cancer TODAY*; 2022 [Available from: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars?mode=cancer&types=0_1&sort_by=value1&populations=792&multiple_populations=1&group_crc=0&group_populations=1&key=total&include_nmssc=1].
- 30.Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer.* 2021;127(16):3029-30.
- 31.Araghi M, Soerjomataram I, Jenkins M, Brierley J, Morris E, Bray F, et al. Global trends in colorectal cancer mortality: projections to the year 2035. *Int J Cancer.* 2019;144(12):2992-3000.
- 32.Vuik FE, Nieuwenburg SA, Bardou M, Lansdorp-Vogelaar I, Dinis-Ribeiro M, Bento MJ, et al. Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut.* 2019;68(10):1820-6.
- 33.Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandala M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013;24 Suppl 6:vi64-72.
- 34.Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15065.
- 35.Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet.* 2014;383(9927):1490-502.

36. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1244-60 e16.
37. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(12):713-32.
38. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(6):639-45.
39. Peltomaki P, Nystrom M, Mecklin JP, Seppala TT. Lynch Syndrome Genetics and Clinical Implications. *Gastroenterology*. 2023;164(5):783-99.
40. Pellat A, Netter J, Perkins G, Cohen R, Coulet F, Parc Y, et al. [Lynch syndrome: What is new?]. *Bull Cancer*. 2019;106(7-8):647-55.
41. Goosenberg E, Kaur A, Babiker HM. A Review of Hereditary Colorectal Cancers. *StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Anahat Kaur declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Hani Babiker declares no relevant financial relationships with ineligible companies. 2025.
42. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(2):385-98.
43. Radziszewska M, Smarkusz-Zarzecka J, Ostrowska L, Pogodzinski D. Nutrition and Supplementation in Ulcerative Colitis. *Nutrients*. 2022;14(12).
44. Reddy KVK, Naidu KA. Oleic acid, hydroxytyrosol and n-3 fatty acids collectively modulate colitis through reduction of oxidative stress and IL-8 synthesis; in vitro and in vivo studies. *Int Immunopharmacol*. 2016;35:29-42.
45. Nguyen L, Shanmugan S. A Review Article: The Relationship Between Obesity and Colorectal Cancer. *Curr Diab Rep*. 2024;25(1):8.
46. Garrett WS. The gut microbiota and colon cancer. *Science*. 2019;364(6446):1133-5.
47. Primm KM, Malabay AJ, Curry T, Chang S. Who, where, when: Colorectal cancer disparities by race and ethnicity, subsite, and stage. *Cancer Med*. 2023;12(13):14767-80.
48. Torre LA, Sauer AM, Chen MS, Jr., Kagawa-Singer M, Jemal A, Siegel RL. Cancer statistics for Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders, 2016: Converging incidence in males and females. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(3):182-202.
49. Gomez SL, O'Malley CD, Stroup A, Shema SJ, Satariano WA. Longitudinal, population-based study of racial/ethnic differences in colorectal cancer survival: impact of neighborhood socioeconomic status, treatment and comorbidity. *BMC Cancer*. 2007;7:193.

50. Viramontes O, Bastani R, Yang L, Glenn BA, Herrmann AK, May FP. Colorectal cancer screening among Hispanics in the United States: Disparities, modalities, predictors, and regional variation. *Prev Med*. 2020;138:106146.
51. WHO. Estimated number of new cases from 2022 to 2045, Incidence, Both sexes, age [0-85+] Colon Cancer: World Health Organization. The International Agency for Research on Cancer (IARC). *Cancer Tomorrow*; 2025 [Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?cancers=8&mode=population&group_populations=0&types=0&populations=900&multiple_cancers=0&multiple_populations=1&single_unit=1000&sexes=0].
52. WHO. Estimated number of deaths from 2022 to 2045, Mortality, Both sexes, age [0-85+] Colon cancer: World Health Organization. The International Agency for Research on Cancer (IARC). *Cancer Tomorrow*; 2025 [Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?cancers=8&mode=population&group_populations=0&types=1&populations=900&multiple_cancers=0&multiple_populations=1&single_unit=1000&sexes=0].
53. WHO. Estimated number of deaths from 2022 to 2045, Mortality Tables, Both sexes, age [0-85+] Colon Cancer: World Health Organization. The International Agency for Research on Cancer (IARC). *Cancer Tomorrow*; 2025 [Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?cancers=8&mode=population&group_populations=0&types=1&populations=903_908_935_905_904_792&multiple_cancers=0&multiple_populations=1&single_unit=1000&sexes=0].
54. WHO. Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence Heatmap, Both sexes, in 2022 Colon cancer: World Health Organization. The International Agency for Research on Cancer (IARC). *Cancer TODAY*; 2025 [Available from: <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population&cancers=8&types=0>].
55. WHO. Estimated number of new cases from 2022 to 2045, Incidence, Both sexes, age [0-39] Colon Cancer: World Health Organization. The International Agency for Research on Cancer (IARC). *Cancer Tomorrow*; 2025 [Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?cancers=8&mode=population&group_populations=0&types=0&populations=903_908_935_905_904_792&multiple_cancers=0&multiple_populations=1&single_unit=1000&sexes=0&age_start=0&age_end=7].
56. WHO. Estimated number of deaths from 2022 to 2045, Mortality, Both sexes, age [0-39] Colon cancer: World Health Organization. The International Agency for Research on

Cancer (IARC). Cancer Tomorrow; 2025 [Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?cancers=8&mode=population&group_populations=0&types=1&populations=903_908_935_905_904_792&multiple_cancers=0&multiple_populations=1&single_unit=1000&sexes=0&age_start=0&age_end=7].

57.WHO. Estimated numbers from 2022 to 2050, Males and Females, age [0-39] Colon Cancer: World Health Organization. The International Agency for Research on Cancer (IARC). Cancer Tomorrow; 2025 [Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/trends?cancers=8&mode=population&group_populations=0&types=0_1&populations=903_908_935_905_904_792&multiple_cancers=0&multiple_populations=1&single_unit=1000&sexes=1_2&age_start=0&age_end=7].

58.WHO. Estimated number of new cases from 2022 to 2045, Incidence, Both sexes, age [40-85+]

Colon: World Health Organization. The International Agency for Research on Cancer (IARC). Cancer Tomorrow; 2025 [Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?cancers=8&mode=population&group_populations=0&types=0&populations=903_908_935_905_904_792&multiple_cancers=0&multiple_populations=1&single_unit=1000&sexes=0&age_start=8&age_end=17].

59.WHO. Estimated number of deaths from 2022 to 2045, Mortality, Both sexes, age [40-85+] Colon Cancer: World Health Organization. The International Agency for Research on Cancer (IARC). Cancer Tomorrow; 2025 [Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?cancers=8&mode=population&group_populations=0&types=1&populations=903_908_935_905_904_792&multiple_cancers=0&multiple_populations=1&single_unit=1000&sexes=0&age_start=8&age_end=17].

60.Türkiye Kanser Kontrol Programı 2021 T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Kanser Dairesi Başkanlığı; 2025 [Available from: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/dokumanlar-kanserdb/raporlar.html>].

61.Wolf AMD, Fontham ETH, Church TR, Flowers CR, Guerra CE, LaMonte SJ, et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. CA Cancer J Clin. 2018;68(4):250-81.

62.Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. Nat Rev Cancer. 2017;17(4):223-38.

63. Zhang X, Wu T, Cai X, Dong J, Xia C, Zhou Y, et al. Neoadjuvant Immunotherapy for MSI-H/dMMR Locally Advanced Colorectal Cancer: New Strategies and Unveiled Opportunities. *Front Immunol.* 2022;13:795972.
64. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2014;147(2):502-26.
65. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(4):261-8.
66. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58(22):5248-57.
67. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2016;27(8):1386-422.
68. Baretta M, Personeni N, Destro A, Santoro A, Rimassa L. Emergence of KRAS-mutation in liver metastases after an anti-EGFR treatment in patient with colorectal cancer: Are we aware of the therapeutic impact of intratumor heterogeneity? *Cancer Biol Ther.* 2018;19(8):659-63.
69. Salva de Torres C, Baraibar I, Saoudi Gonzalez N, Ros J, Salva F, Rodriguez-Castells M, et al. Current and Emerging Treatment Paradigms in Colorectal Cancer: Integrating Hallmarks of Cancer. *Int J Mol Sci.* 2024;25(13).
70. Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, Yoshino T, Garcia-Carbonero R, Mizunuma N, et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(20):1909-19.
71. Yoshino T, Komatsu Y, Yamada Y, Yamazaki K, Tsuji A, Ura T, et al. Randomized phase III trial of regorafenib in metastatic colorectal cancer: analysis of the CORRECT Japanese and non-Japanese subpopulations. *Invest New Drugs.* 2015;33(3):740-50.
72. Van Cutsem E, Martinelli E, Cascinu S, Sobrero A, Banzi M, Seitz JF, et al. Regorafenib for Patients with Metastatic Colorectal Cancer Who Progressed After Standard Therapy: Results of the Large, Single-Arm, Open-Label Phase IIIb CONSIGN Study. *Oncologist.* 2019;24(2):185-92.

- 73.Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(2):79-92.
- 74.Marmol I, Sanchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1).
- 75.Fabregas JC, Ramnaraig B, George TJ. Clinical Updates for Colon Cancer Care in 2022. *Clin Colorectal Cancer*. 2022;21(3):198-203.
- 76.DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer : principles and practice of oncology. Twelfth edition. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2023. 1 volume (various paging) p.
- 77.Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005;205(2):275-92.
- 78.Nurgali K, Jagoe RT, Abalo R. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? *Front Pharmacol*. 2018;9:245.
- 79.Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. *Nature*. 2019;575(7782):299-309.
- 80.Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(1):20-37.
- 81.Germain N, Dhayer M, Boileau M, Fovez Q, Kluza J, Marchetti P. Lipid Metabolism and Resistance to Anticancer Treatment. *Biology (Basel)*. 2020;9(12).
- 82.Wang Z, Wang Y, Li Z, Xue W, Hu S, Kong X. Lipid metabolism as a target for cancer drug resistance: progress and prospects. *Front Pharmacol*. 2023;14:1274335.
- 83.Vishwa R, BharathwajChetty B, Girisa S, Aswani BS, Alqahtani MS, Abbas M, et al. Lipid metabolism and its implications in tumor cell plasticity and drug resistance: what we learned thus far? *Cancer Metastasis Rev*. 2024;43(1):293-319.
- 84.Council NR. Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk. Washington, DC: The National Academies Press; 1989. 768 p.
- 85.Santa-Maria C, Lopez-Enriquez S, Montserrat-de la Paz S, Geniz I, Reyes-Quiroz ME, Moreno M, et al. Update on Anti-Inflammatory Molecular Mechanisms Induced by Oleic Acid. *Nutrients*. 2023;15(1).
- 86.Colomer R, Menendez JA. Mediterranean diet, olive oil and cancer. *Clin Transl Oncol*. 2006;8(1):15-21.

- 87.Zhang Y, Liu Y, Sun J, Zhang W, Guo Z, Ma Q. Arachidonic acid metabolism in health and disease. *MedComm* (2020). 2023;4(5):e363.
- 88.Jin Z, Chai YD, Hu S. Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1280:231-41.
- 89.Munir R, Lisec J, Swinnen JV, Zaidi N. Too complex to fail? Targeting fatty acid metabolism for cancer therapy. *Prog Lipid Res*. 2022;85:101143.
- 90.Zhou X, Zhu X, Zeng H. Fatty acid metabolism in adaptive immunity. *FEBS J*. 2023;290(3):584-99.
- 91.Kemp F, Braverman EL, Byersdorfer CA. Fatty acid oxidation in immune function. *Front Immunol*. 2024;15:1420336.
- 92.Winkelkotte AM, Al-Shami K, Chaves-Filho AB, Vogel FCE, Schulze A. Interactions of Fatty Acid and Cholesterol Metabolism with Cellular Stress Response Pathways in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2025;15(3).
- 93.Smith DM, Choi J, Wolfgang MJ. Tissue specific roles of fatty acid oxidation. *Adv Biol Regul*. 2025;95:101070.
- 94.De Martino M, Daviaud C, Hajjar E, Vanpouille-Box C. Fatty acid metabolism and radiation-induced anti-tumor immunity. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2023;376:121-41.
- 95.Cioce M, Arbitrio M, Polera N, Altomare E, Rizzuto A, De Marco C, et al. Reprogrammed lipid metabolism in advanced resistant cancers: an upcoming therapeutic opportunity. *Cancer Drug Resist*. 2024;7:45.
- 96.van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(2):112-24.
- 97.Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(5):281-96.
- 98.Calder PC. Very long-chain n-3 fatty acids and human health: fact, fiction and the future. *Proc Nutr Soc*. 2018;77(1):52-72.
- 99.Ferreri C, Sansone A, Ferreri R, Amezaga J, Tueros I. Fatty Acids and Membrane Lipidomics in Oncology: A Cross-Road of Nutritional, Signaling and Metabolic Pathways. *Metabolites*. 2020;10(9).
- 100.Li B, Mi J, Yuan Q. Fatty acid metabolism-related enzymes in colorectal cancer metastasis: from biological function to molecular mechanism. *Cell Death Discov*. 2024;10(1):350.

101. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
102. Peetla C, Vijayaraghavalu S, Labhasetwar V. Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(13-14):1686-98.
103. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453-62.
104. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1-13.
105. Holmstrom KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(6):411-21.
106. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010;49(11):1603-16.
107. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19.
108. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7(1):65-74.
109. Moris D, Spartalis M, Spartalis E, Karachaliou GS, Karaolani GI, Tsourouflis G, et al. The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. *Ann Transl Med*. 2017;5(16):326.
110. Batty M, Bennett MR, Yu E. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Cells*. 2022;11(23).
111. Nathan C, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(5):349-61.
112. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;80:50-64.
113. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(7):363-83.
114. Klaunig JE. Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des*. 2018;24(40):4771-8.
115. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther*. 2021;17(1):22-8.

- 116.Zhou X, An B, Lin Y, Ni Y, Zhao X, Liang X. Molecular mechanisms of ROS-modulated cancer chemoresistance and therapeutic strategies. *Biomed Pharmacother.* 2023;165:115036.
- 117.Ismail T, Kim Y, Lee H, Lee DS, Lee HS. Interplay Between Mitochondrial Peroxiredoxins and ROS in Cancer Development and Progression. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18).
- 118.Cui Q, Wang JQ, Assaraf YG, Ren L, Gupta P, Wei L, et al. Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer. *Drug Resist Updat.* 2018;41:1-25.
- 119.Wang K, Jiang J, Lei Y, Zhou S, Wei Y, Huang C. Targeting Metabolic-Redox Circuits for Cancer Therapy. *Trends Biochem Sci.* 2019;44(5):401-14.
- 120.Jiang Q, Lin X, Zhai M, Gong Y, Li Y, Liu S. The Role of ROS and Its Sources in Tumorigenesis: Friend or Foe? *Adv Biol (Weinh).* 2025;9(7):e2400549.
- 121.Goodman CV, Bashash M, Green R, Song P, Peterson KE, Schnaas L, et al. Domain-specific effects of prenatal fluoride exposure on child IQ at 4, 5, and 6-12 years in the ELEMENT cohort. *Environ Res.* 2022;211:112993.
- 122.Ren K, Jiang H, Li T, Qian C, Zhu L, Wang T. Correlation of sLOX-1 Levels and MR Characteristics of Culprit Plaques in Intracranial Arteries with Stroke Recurrence. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(4).
- 123.Samrat SK, Xu J, Li Z, Zhou J, Li H. Antiviral Agents against Flavivirus Protease: Prospect and Future Direction. *Pathogens.* 2022;11(3).
- 124.Pratico D. Lipid peroxidation and the aging process. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2002;2002(50):re5.
- 125.Li Y, Zhao T, Li J, Xia M, Li Y, Wang X, et al. Oxidative Stress and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE): Implications in the Pathogenesis and Treatment of Aging-related Diseases. *J Immunol Res.* 2022;2022:2233906.
- 126.Zheng Y, Sun J, Luo Z, Li Y, Huang Y. Emerging mechanisms of lipid peroxidation in regulated cell death and its physiological implications. *Cell Death Dis.* 2024;15(11):859.
- 127.Sansone A, Melchiorre M, Chatgililoglu C, Ferreri C. Hexadecenoic fatty acid isomers: a chemical biology approach for human plasma biomarker development. *Chem Res Toxicol.* 2013;26(11):1703-9.
- 128.Sansone A, Tolika E, Louka M, Sunda V, Deplano S, Melchiorre M, et al. Hexadecenoic Fatty Acid Isomers in Human Blood Lipids and Their Relevance for the Interpretation of Lipidomic Profiles. *PLoS One.* 2016;11(4):e0152378.

129. Scanferlato R, Bortolotti M, Sansone A, Chatgililoglu C, Polito L, De Spirito M, et al. Hexadecenoic Fatty Acid Positional Isomers and De Novo PUFA Synthesis in Colon Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(4).
130. Triki M, Rinaldi G, Planque M, Broekaert D, Winkelkotte AM, Maier CR, et al. mTOR Signaling and SREBP Activity Increase FADS2 Expression and Can Activate Sapienate Biosynthesis. *Cell Rep.* 2020;31(12):107806.
131. Gopal SC, Kaki SS, Rao BV, Poornachandra Y, Kumar CG, Narayana Prasad RB. Synthesis of novel lipoamino acid conjugates of sapienic acid and evaluation of their cytotoxicity activities. *J Oleo Sci.* 2014;63(7):717-22.
132. Vriens K, Christen S, Parik S, Broekaert D, Yoshinaga K, Talebi A, et al. Evidence for an alternative fatty acid desaturation pathway increasing cancer plasticity. *Nature.* 2019;566(7744):403-6.
133. Kothapalli KSD, Park HG, Kothapalli NSL, Brenna JT. FADS2 function at the major cancer hotspot 11q13 locus alters fatty acid metabolism in cancer. *Prog Lipid Res.* 2023;92:101242.
134. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene.* 2000;19(49):5548-57.
135. Prieto AL, Lai C. The TAM Subfamily of Receptor Tyrosine Kinases: The Early Years. *Int J Mol Sci.* 2024;25(6).
136. Wang Z. ErbB Receptors and Cancer. *Methods Mol Biol.* 2017;1652:3-35.
137. Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, et al. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest.* 2007;117(8):2051-8.
138. Stein RA, Staros JV. Insights into the evolution of the ErbB receptor family and their ligands from sequence analysis. *BMC Evol Biol.* 2006;6:79.
139. Singh B, Carpenter G, Coffey RJ. EGF receptor ligands: recent advances. *F1000Res.* 2016;5.
140. Shi K, Wang G, Pei J, Zhang J, Wang J, Ouyang L, et al. Emerging strategies to overcome resistance to third-generation EGFR inhibitors. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):94.
141. Purba ER, Saita EI, Maruyama IN. Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The "Rotation Model". *Cells.* 2017;6(2).
142. Ayyappan S, Prabhakar D, Sharma N. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapies in esophagogastric cancer. *Anticancer Res.* 2013;33(10):4139-55.

- 143.Hassan G, Seno M. ERBB Signaling Pathway in Cancer Stem Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2022;1393:65-81.
- 144.Sakthianandeswaren A, Sabljak P, J. Elliott M, Palmieri M, M. Sieber O. Predictive Biomarkers for Monoclonal Antibody Therapies Targeting EGFR (Cetuximab, Panitumumab) in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Advances in the Molecular Understanding of Colorectal Cancer*2019.
- 145.Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2014;25(3):282-303.
- 146.Sapmaz A, Erson-Bensan AE. EGFR endocytosis: more than meets the eye. *Oncotarget.* 2023;14:297-301.
- 147.Lockhart AC, Berlin JD. The epidermal growth factor receptor as a target for colorectal cancer therapy. *Semin Oncol.* 2005;32(1):52-60.
- 148.Li J, Ma X, Chakravarti D, Shalapour S, DePinho RA. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes Dev.* 2021;35(11-12):787-820.
- 149.Yu JS, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development.* 2016;143(17):3050-60.
- 150.Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med.* 2014;46(6):372-83.
- 151.Butti R, Das S, Gunasekaran VP, Yadav AS, Kumar D, Kundu GC. Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: signaling, therapeutic implications and challenges. *Mol Cancer.* 2018;17(1):34.
- 152.Fox M, Mott HR, Owen D. Class IA PI3K regulatory subunits: p110-independent roles and structures. *Biochem Soc Trans.* 2020;48(4):1397-417.
- 153.Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(7):489-501.
- 154.Schultze SM, Jensen J, Hemmings BA, Tschopp O, Niessen M. Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism. *Arch Physiol Biochem.* 2011;117(2):70-7.
- 155.Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129(7):1261-74.
- 156.Bozulic L, Hemmings BA. PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(2):256-61.

- 157.Deng S, Leong HC, Datta A, Gopal V, Kumar AP, Yap CT. PI3K/AKT Signaling Tips the Balance of Cytoskeletal Forces for Cancer Progression. *Cancers (Basel)*. 2022;14(7).
- 158.Glaviano A, Foo ASC, Lam HY, Yap KCH, Jacot W, Jones RH, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Mol Cancer*. 2023;22(1):138.
- 159.Szymonowicz K, Oeck S, Malewicz NM, Jendrossek V. New Insights into Protein Kinase B/Akt Signaling: Role of Localized Akt Activation and Compartment-Specific Target Proteins for the Cellular Radiation Response. *Cancers (Basel)*. 2018;10(3).
- 160.Yuan HX, Guan KL. Structural insights of mTOR complex 1. *Cell Res*. 2016;26(3):267-8.
- 161.Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell*. 2006;11(6):859-71.
- 162.Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*. 2004;24(1):200-16.
- 163.Georgescu MM. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer*. 2010;1(12):1170-7.
- 164.Lien EC, Lyssiotis CA, Cantley LC. Metabolic Reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR Pathway in Cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2016;207:39-72.
- 165.Meijer AJ, Lorin S, Blommaert EF, Codogno P. Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction. *Amino Acids*. 2015;47(10):2037-63.
- 166.Bari M, Bisogno T, Battista N. Bioactive Lipids in Health and Disease. *Biomolecules*. 2020;10(12).
- 167.Sunshine H, Iruela-Arispe ML. Membrane lipids and cell signaling. *Curr Opin Lipidol*. 2017;28(5):408-13.
- 168.Koundouros N, Poulogiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer*. 2020;122(1):4-22.
169. Huang C, Freter C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2015;16(1):924-49.

170. Ikeda T, Katoh Y, Hino H, Seta D, Ogawa T, Iwata T, et al. FADS2 confers SCD1 inhibition resistance to cancer cells by modulating the ER stress response. *Sci Rep.* 2024;14(1):13116.
171. Xuan Y, Wang H, Yung MM, Chen F, Chan WS, Chan YS, et al. SCD1/FADS2 fatty acid desaturases equipose lipid metabolic activity and redox-driven ferroptosis in ascites-derived ovarian cancer cells. *Theranostics.* 2022;12(7):3534-52.
172. Li YL, Tian H, Jiang J, Zhang Y, Qi XW. Multifaceted regulation and functions of fatty acid desaturase 2 in human cancers. *Am J Cancer Res.* 2020;10(12):4098-111.
173. Sen U, Coleman C, Sen T. Stearoyl coenzyme A desaturase-1: multitasker in cancer, metabolism, and ferroptosis. *Trends Cancer.* 2023;9(6):480-9.
174. Suzuki M, Numadate N, Enami S. Reaction of Sapienic Acid with Hydroxyl Radical in Water: A Kinetic and Product Study. *J Phys Chem A.* 2025;129(39):9052-61.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Ebru Büşra UĞUR

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2021, T.C. Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Lisans

