

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

SIÇAN KOLON KANSERİNDE SEÇİLİ
COX-2 İNHİBİTÖRLERİNİN
ANTİPROLİFERATİF
ETKİNLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Solmaz SUSAM

2020

ONAY SAYFASI



Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Nevin İLHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

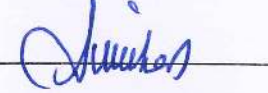
Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nevin İLHAN



Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nevin İLHAN 

Prof. Dr. Nezip İLHAN 

Prof. Dr. Tayfun GÜLDİR 

Prof. Dr. Mustafa KAVUTCU 

Prof. Dr. Behmetin HANCI ÖZCAN 



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Solmaz SUSAM

TARİH... 24/01/2020

İMZA... 

Prof. Dr. Nevin İLHAN

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ELAZIĞ

İTHAF

Değerli hocam Prof. Dr. Nevin İLHAN'a ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince akademik açıdan yetişmemi sağlayan, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her konuda destek olan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, hem bilimsel hem de insani değerler bakımından kendisinden çok şey öğrendiğim değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nevin İLHAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Tez konusunda bilgi birikimini esirgemeyen, çalışmaların tamamlanabilmesi için gerekli desteği veren eski danışmanım Sayın Prof. Dr. Necip İLHAN'a ve Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU, Prof. Dr. Ferit GÜRSU, Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ, Prof. Dr. Süleyman AYDIN ve Prof. Dr. Dilara KAMAN'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım esnasında manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli asistan arkadaşlarım Fatma TEDİK, Merve Sefa DEMİR ve Oğuzhan TATAR'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Çıktığım bu yolda beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, hayallerimi devam ettirmem için sonsuz destek sağlayan ve bugünlere gelmem için çok emek veren sevgili aileme sonsuz teşekkürler...

Arş. Gör. Solmaz SUSAM

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
1.ÖZET	1
2.ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1.Kolon	5
3.1.1. Kolon Anatomisi	5
3.1.2. Appendiks	6
3.1.3.Çekum	6
3.1.4. Çıkan Kolon	7
3.1.5. Transvers Kolon	7
3.1.6. İnen Kolon	7
3.1.7. Sigmoid kolon	8
3.2. Kolon Histolojisi	8
3.3. Kolon Fizyolojisi	9
3.4. Kanser Tanımı ve Gelişimi	9
3.4.1. Kolorektal Kanser	11
3.4.1.1.Etiyoloji	12
3.4.1.2. Epidemiyoloji	13
3.4.1.3 İnsidans	13

3.4.1.4. Mortalite	14
3.5. Değiştirilebilir Risk Faktörleri	14
3.5.1. Sigara Kullanımı	14
3.5.2. Alkol Tüketimi	15
3.5.3. Beslenme Alışkanlığı	15
3.5.4. Vücut Kitle İndeksi	17
3.5.5. Fiziksel İnaktivite	18
3.5.6. Nonsteroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar	18
3.6. KRK’da Değiştirilemeyen Risk Faktörleri	19
3.6.1. Yaş	19
3.6.2. Cinsiyet	19
3.6.3. Kalıtım ve Aile Öyküsü	20
3.6.4. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı	21
3.6.4.1. Ülseratif Kolit	21
3.6.4.2. Crohn Hastalığı	21
3.6.4.3. Abdominal Radyasyon	21
3.7. Nonsteroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar	22
3.7.1. NSAİİ’lerin Anti-inflamatuvar Etkileri	22
3.7.2. NSAİİ’lerin Anti-Piretik Etkileri	22
3.7.3. NSAİİ’lerin Analjezik Etkileri	23
3.8. NSAİİ ve COX-2 İnhibitörlerinin KRK’deki Rolü	23
3.9. COX-2 İnhibitörleri	27
3.9.1. Diklofenak	27
3.9.1.2. Diklofenak’ın Etki mekanizması	28
3.9.1.3. Diklofenak ve Kolorektal Kanser	29
3.9.2. Selekoksisib	30
3.9.2.1. Selekoksisib’in Etki Mekanizması	31
3.9.2.2. Selekoksisib ve Kolorektal Kanser	33
3.10. Western Yöntemi ile Değerlendirilen Seçili Kanser Yolağı Parametreleri	34

3.10.1. Fosfataz ve Tensin Homoloğu (PTEN)	34
3.10.1.1. PTEN ve Kolorektal Kanser	36
3.10.2. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)	36
3.10.2.1. PI3K ve Kolorektal Kanser	38
3.10.3. Akt	39
3.10.3.1. Akt ve Kolon Kanseri	40
3.11. ELISA Yöntemiyle Değerlendirdiğimiz Seçili Parametreler	42
3.11.1. Karsinoembriyonik Antijen (CEA) ve Kolon Kanseri	42
3.11.2. Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1 α)	43
3.11.2.1. HIF-1 α ve Kanser	45
3.11.3. Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) ve Kanser	47
3.11.4. Ki-67 ve Kanser	48
3.12. Kimyasal Karsinojenlerle Deneysel Kanser Modeli Oluşturma	50
3.12.1. Dimetilhidrazin (DMH) ve Karsinogenezdeki Rolü	50
4. GEREÇ ve YÖNTEM	52
4.1. Gereç	52
4.1.1. Deney Hayvanları ve Deney Grupları	52
4.1.2. DMH ile İndüklenmiş Kolon Kanseri Protokolünün Oluşturulması	55
4.1.3. Kullanılan Kimyasal Ajanlar ve Hazırlanışları	55
4.1.4. Hayvan Materyallerinden Numunelerin Alınması, Hazırlanması ve Saklanması	56
4.1.4.1. Kan Numunelerinin Alınması, Hazırlanması ve Saklanması	56
4.1.4.2. Doku Numunelerinin Alınması, Hazırlanması ve Saklanması	57
4.2. Yöntemler	57
4.2.1. Biyokimyasal Yöntemler	57
4.2.1.1. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	57
4.2.1.2. Serum CEA Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Değerlendirilmesi	62
4.2.1.3. Serum HIF-1 α Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Değerlendirilmesi	63
4.2.1.4. Serum PCNA Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Değerlendirilmesi	64

4.2.1.5. Serum Ki-67 Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Değerlendirilmesi	64
4.2.2. Western Blot Analizi	65
4.2.2.1. Western Blot Analizinin Uygulama Aşamaları	67
4.2.2.1.1. Western Blot Analizi için Doku Numunelerinin Homojenizasyonu	67
4.2.2.1.2. Doku Numunelerinde Protein Miktarı Tayini	68
4.2.2.1.3. Jele Yüklenecek Olan Protein Numunelerinin Hazırlanması	68
4.2.2.1.4. Protein Karışımlarının Dikey SDS-PAGE'e Yüklenmesi ve Yürütülmesi	69
4.2.2.1.5. Blotlama, Bloklama ve Antikorlarla İnkübasyon İşlemleri	70
4.2.2.1.6. Protein Bantlarının Görüntülenmesi ve Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	72
4.3. Kolon Dokusunun Histopatolojik Analizi	72
4.4. İstatistiksel Analiz	72
5. BULGULAR	74
5.1. Çalışma Gruplarındaki Sıçanların Kilo Alımları ve Büyüme Oranları Üzerine Etkisi	74
5.2. Kemopreventif Ajanların Seçilen ELISA Parametreleri Üzerine Etkisi	75
5.3. Doku PTEN Protein Ekspresyon Düzeyleri	76
5.4. Doku PI3K Protein Ekspresyon Düzeyleri	77
5.5. Doku Akt Protein Ekspresyon Düzeyleri	79
5.6. Histolojik Bulgular	80
6. TARTIŞMA	82
7. KAYNAKLAR	98
8. ÖZGEÇMİŞ	124

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Standart Rat Yemi	53
Tablo 2. Üretici Firma Tarafından Gönderilen Kit İçerikleri	59
Tablo 3. ELISA’da Kullanılan ve Üretici Firmanın Temin Etmediği Malzemeler	59
Tablo 4. Western Blot Analizinde Kullanılan Cihazlar	66
Tablo 5. Western Blot Analizinde Kullanılan Malzemeler	67
Tablo 6. Doku Süpernatantlarından Jele Yüklenecek Olan Protein Karışımının Hazırlanmasını Gösteren Örnek Hesaplama	69
Tablo 7. Bloklama, Antikor Yıkama ve Antikor Sulandırma Solüsyonlarının Hazırlanışları	71
Tablo 8. DMH ve Kemopreventif Gruplardaki Sıçanların Kilo Alımları ve Büyüme Oranları	75
Tablo 9. Kemopreventif Ajanların Seçilen ELISA Parametreleri Üzerindeki Etkisi	76

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Kolon anatomisi (4).	5
Şekil 2.	Appendiks ve çeşitli konumları (5).	6
Şekil 3.	Kolonun ışık mikroskobu altında görüntüsü (1).	9
Şekil 4.	Normal hücrelerin, çeşitli dış uyaranlarla kanserli hale dönüştürülmesinde rol oynayan aşamalar	11
Şekil 5.	NSAİİ'lerin ve coxib'lerin genel mekanizması, COX sinyal transdüksiyonu kaskadının inhibisyonu (105).	25
Şekil 6.	Diklofenak'ın yapısı (117).	28
Şekil 7.	Araşidonik asitin COX Yolu (122).	29
Şekil 8:	Selekoksib'in Yapısı (130).	31
Şekil 9.	Selekoksib'in apoptoz indüksiyonu, hücre döngüsü arresti, anjiyogenezin düzenlenmesi ve endoplazmik retikulum stresinin indüklenmesi gibi muhtemel antikanser mekanizmaları.	33
Şekil 10.	PTEN Regülasyonu ve Fonksiyonları	35
Şekil 11.	PI3K yapısı: Yapısal ve biyokimyasal özellikleri	37
Şekil 12.	PTEN/PI3K/Akt Yolağının Düzenlenmesi	38
Şekil 13.	Akt izoformları arasındaki homoloji	39
Şekil 14.	İnsan kanserlerinde yer alan Akt yolunun şematik gösterimi.	41
Şekil 15.	Hipoksi ve HIF'lerin etkileri.	44
Şekil 16.	HIF-1 α düzenleyici genler ve kanser progresyonu üzerine etkileri	46
Şekil 17.	DMH'ın yapısı (232).	50
Şekil 18.	Deney Gruplarının Oluşturulması.	54
Şekil 19.	ELISA çeşitleri	58

Şekil 20. Standart Dilüsyonu.	60
Şekil 21. ELISA işleminin şematik diyagramı	62
Şekil 22. CEA Standart Eğrisi	63
Şekil 23. HIF-1 α Standart Eğrisi	63
Şekil 24. PCNA Standart Eğrisi	64
Şekil 25. Ki-67 Standart Eğrisi	65
Şekil 26. Pten ve β -actin proteinlerine ait bant görüntüleri	77
Şekil 27. Gruplara göre Doku PTEN Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)	77
Şekil 28. PI3K ve β -actin proteinlerine ait bant görüntüleri	78
Şekil 29. Gruplara göre Doku PI3K Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)	78
Şekil 30. PI3K ve β -actin proteinlerine ait bant görüntüleri	79
Şekil 31. Gruplara göre Doku Akt Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)	80
Şekil 32. Çalışma gruplarındaki histolojik görünüm.	81

KISALTMALAR LİSTESİ

AA	: Araşidonik asit
AOM	: Azoksimetan
APC	: Adenomatoz Polipozis Koli
ASCO	: Amerikan Klinik Onkoloji Derneği
CA19-9	: Kanser Antijen 19-9
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDKN1A	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A
CDKN1B	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B
CEA	: Karsinoembriyonik Antijen
COX-2	: Siklooksijenaz 2
DCF	: Diklofenak
DMH	: 1,2-Dimetilhidrazin
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA	: Enzime Bağlı İmmünosorbent Metodu
FAP	: Ailesel Adenomatoz Polipozis
H₂O₂	: Hidrojen Oeroksit
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HIF-1α	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1 α
HNPCC	: Kalıtsal Polipozis Olmayan Kolorektal Kanser
IL	: İnterlökin

iNOS	: Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentaz
KRK	: Kolorektal Kanser
MAM	: Metilasiloksimetanol
MAPK	: Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz
MMP-9	: Matriks Metalloproteinaz 9
MSI	: Mikrosatellit İnstabilite
NaCl	: Sodyum Klorür
NF-κB	: Nükleer Faktör-κB
NSAİİ	: Non Steroid Antiinflamatuvar İlaçlar
O₂	: Oksijen
O₂[•]	: Süperoksit Radikali
OH[•]	: Hidroksil Radikali
PCNA	: Proliferatif Hücre Nükleer Antijen
PDK1	: Fosfoinositide Bağımlı Protein Kinaz 1
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
PI3K	: 3,4,5 Trifosfat Fosfatidilinozitol 3-Kinaz
PIP2	: Fosfatidilinozitol (4,5)-Bifosfat
PIP3	: Fosfatidilinozitol 3,4,5-Trifosfat
PKB	: Protein Kinaz B
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homoloğu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SH2	: Src Homolog 2
TAG-72	: Tümör-İlişkili Glikoprotein-72

TNF : Tümör Nekrozis Faktör

TPS : Doku Polipeptidine Özgü Antijen

TXA₂ : Tromboksan A₂

USPSTF : Amerika Birleşik Devletleri Önleyici Hizmetler Görev Gücü

VEGF : Vasküler Endotel Hücre Büyüme Faktörü

VKİ : Vücut Kitle İndeksi



1. ÖZET

Kolorektal kanser (KRK) dünya çapında üçüncü en yaygın kanser türü olup çevresel ve genetik faktörlerden oluşan karmaşık bir etiyolojiye sahiptir. 1,2 Dimetilhidrazin (DMH), iyi bilinen ve deneysel kolon karsinogenez modeli oluşturmada yaygın olarak kullanılan bir ajandır. KRK'ların erken teşhisi ve tedavisi, sağkalımı artırmak için önemlidir. Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ'ler), tümör gelişimini ve hücre proliferasyonu bloke etme kabiliyetleri nedeniyle çeşitli kanser türlerine karşı kullanılan yeni kemopreventif ajanlar olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Bu çalışmada, deneysel KRK modelinde iki NSAİİ'nin (Diklofenak ve Selekoksisib) tümör gelişimi ve hücre proliferasyonu üzerindeki kemopreventif etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Wistar türü sıçanlar dört gruba ayrılmıştır. Grup 1'deki sıçanlara ilk 12 hafta boyunca 1 mL DMSO ve 1 mM EDTA, kalan 13 hafta boyunca sadece DMSO uygulanmış ve bu grup kontrol grubu olarak belirlenmiştir. 25 mg/kg dozundaki DMH haftada 1 kez olmak üzere subkutan yolla ilk 12 hafta boyunca uygulanmış, deney süresi boyunca da 1 mL DMSO günlük olarak oral gavaj yöntemiyle uygulanmıştır ve bu grup kolon kanser grubu olarak belirlenmiştir. Grup 3 ve 4'e, grup 2'deki gibi DMH uygulanmıştır. Bununla birlikte, Grup 3'teki sıçanlara her gün 25 hafta oral gavaj yoluyla diklofenak (8 mg/kg vücut ağırlığı) ve grup 4'teki sıçanlara ise selekoksisib (6 mg/kg vücut ağırlığı) uygulanmıştır. Serum CEA, HIF-1 α , PCNA ve Ki-67'nin düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. PTEN, PI3K ve Akt ekspresyonunu tespit etmek için Western blot analizi kullanılmıştır. DMH uygulamasının ardından CEA, HIF-1 α , PCNA ve Ki-67 düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. Seçilen kemopreventif ajanların uygulandığı

gruplarda ise bu parametrelerin düzeylerinin normale yakın değere indiği gözlenmiştir ki bu durum diklofenak ve selekoksibin anti-kanserojen etki sergilediğini düşündürmektedir. Western blot analiziyle DMH uygulamasının PTEN kaybına yol açtığı, PI3K ve Akt protein ekspresyon düzeylerini ise artırdığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, diklofenak ve selekoksib uygulanan sıçanlarda, PTEN protein ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı, PI3K ve Akt protein ekspresyonlarının ise azaldığı saptanmıştır. Elde edilen bu bulgulardan, seçici olmayan veya seçici COX-2 inhibitörlerinin, kanser gelişimine ve DMH kaynaklı hücre proliferasyonunun baskılanmasına karşı koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: kolorektal kanser, diklofenak, selekoksib, COX-2

2. ABSTRACT

EVALUATION OF ANTIPROLIFERATIVE EFFICACY OF SELECTED COX-2 INHIBITORS IN RAT COLON CANCER

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide and has a complex aetiology consisting of environmental and genetic factors. The dimethyhydrazine (DMH) is an agent well-established, and widely used for experimental colon carcinogenesis. Early diagnosis and treatment of CRCs are of importance for improving the survival. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are emerging as novel chemopreventive agents against a variety of cancers owing to their capability in blocking the tumor development and cellular proliferation. In the present study, it was aimed to evaluate the chemopreventive effects two NSAIDs (diclofenac and celecoxib) on tumor development and proliferation in experimental CRC model. Wistar rats divided into four groups. Rats in group 1 received 1 mL DMSO and 1 mM EDTA for initial 12 weeks and treated with only DMSO for remaining 13 weeks served as control. Group 2 rats received DMH (25 mg/kg body weight) once a week subcutaneously for the first 12 weeks and treated with 1 mL DMSO throughout experimental period which represent the colon cancer bearing rats. Group 3 and 4 received DMH as in group 2. In addition, Group 3 rats received diclofenac (8 mg/kg body weight) and group 4 received celecoxib (6 mg/kg body weight) via oral gavage 25 weeks every day. The serum levels of CEA, HIF-1 α , PCNA, and Ki-67 were determined by ELISA. Western blot analysis was utilized to detect the expression of the PTEN, PI3K and Akt. The levels of CEA, HIF-1 α , PCNA and Ki-67 increased following DMH treatment. Administration of the

selected chemopreventive agents significantly returned these levels to near normal, which points out the anti-carcinogenic efficacy of diclofenac and celecoxib. Western blot analysis revealed that treatment with DMH lead to loss of PTEN and also elevate PI3K and Akt protein expression levels. The findings also revealed that rats received diclofenac and celecoxib treatment show markedly increased PTEN protein expression and decreased PI3K and Akt protein expressions. These results indicate that the nonselective or selective COX-2 inhibiting agents protects against the development of major forms of cancer and suppress DMH induced cell proliferation.

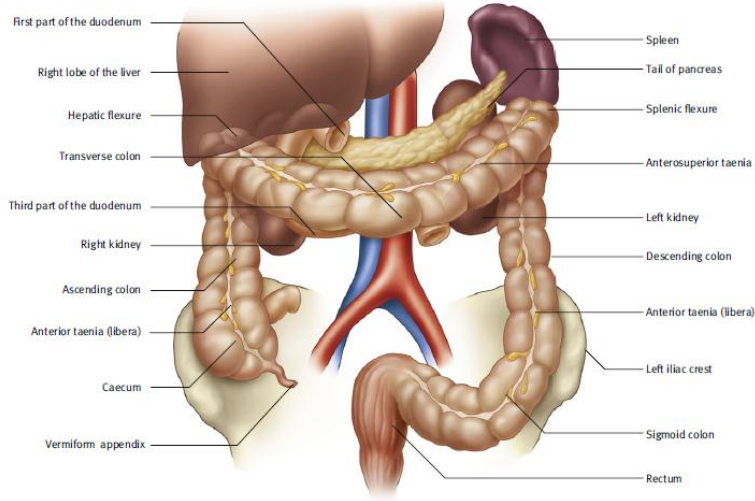
Key words: colorectal cancer, diclofenac, celecoxib, COX-2

3. GİRİŞ

3.1.Kolon

3.1.1. Kolon Anatomisi

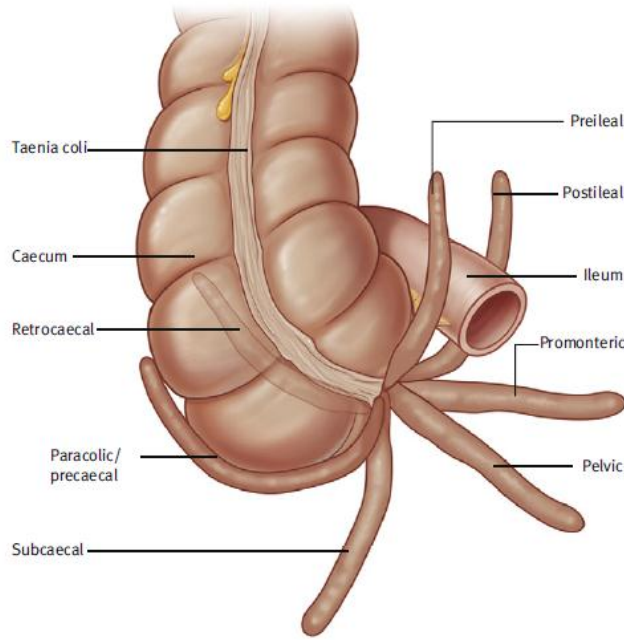
Kolon; gastrointestinal sistemin ileoçekal valv ile rektosigmoid köşe arasında kalan yaklaşık 150 cm'lik bölümüdür ve rektum ile anal kanaldan oluşur. İleumun bitiminden başlayan kolon sakrumun promontoryumunda son bulur. Kolon dışında 3 adet tenia coli bulunmaktadır ve bunların aralarındaki açı 120 derecedir. Kolon lokalizasyonuna göre sırasıyla çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon ile devam ederek rektosigmoid köşede rektum ile birleşir (1). Embriyolojik açıdan çekum, çıkan kolon, transvers kolonun sağ yarısı midguttan (orta bağırsak) gelişirken, transvers kolonun sol yarısı, inen kolon ve sigmoid kolon, rektum ve anüs hindguttan (alt bağırsaktan) gelişmiştir (2,3).



Şekil 1. Kolon anatomisi (4).

3.1.2. Appendiks

Anatomik fonksiyonu olmayan ancak genellikle sütür hattını belirlemeye ya da kolon perforasyonunu kapatmaya yardımcı olan appendiks epiploikalar, yağlı çıkıntılar olup tenialara tutunurlar. Appendiksin uzunluğu 12 mm ile 20 cm arasındadır. Bulunduğu konumu oldukça değişkendir (pelvik, subakal, preileal ve retroileal), genellikle çekumun arkasına doğru uzanır konumdadır (5).



Şekil 2. Appendiks ve çeşitli konumları (5).

3.1.3.Çekum

Kolonun başlangıç kısmı olan çekum; ortalama 6 cm uzunluğa, 7,5 cm genişliğe sahiptir ve kolonun en geniş kısmını oluşturur. Sağ fossa iliakada bulunur, iliakus ve psoas majör kası üzerinde uzanır ve genellikle anterior abdominal duvar ile temas halindedir. Kolon; sigmoid kolona doğru ilerledikçe daralır ve en dar olduğu yer 2,5 cm

çapı ile sigmoid kolondur. Bu yüzden çekum tümörleri büyüdükçe semptomatik özellik göstermelerine rağmen, sigmoid kolon tümörleri küçükken bile semptomatiktirler. Distal kolon tıkanmasında kolonun en sık perforan olan kısmı da çekumdur (6,7).

3.1.4. Çıkan Kolon

Ortalama uzunluğu 20 cm olan çıkan kolon, çekumun üst kenarından başlayarak yukarıda karaciğerin sağ lobunun alt yüzeyinde sola ve öne doğru kıvrılarak transvers kolon olarak devam eder. Bu bölge hepatik fleksura olarak adlandırılır. Çıkan kolonun arka yüzü hariç, her tarafı peritonla örtülüdür ve arka yüzünde gözenekli doku (toldt fasyası) ile karın arka duvarına tutunur (8).

3.1.5. Transvers Kolon

Uzunluğu yaklaşık 50 cm olan transvers kolon; kolonun en hareketli ve en uzun kısmı olup, hepatik fleksuradan splenik fleksuraya kadar uzanır. Hemen hemen tamamı periton ile örtülüdür. Mezosu ile pankreas ve sol böbrek kapsülüne asılarak batını alt ve üst olmak üzere iki bölüme ayırır ki bu anatomik yapı bir bölgedeki enfeksiyonun diğer bir bölgeye yayılmasında bariyer olur (3).

3.1.6. İnen Kolon

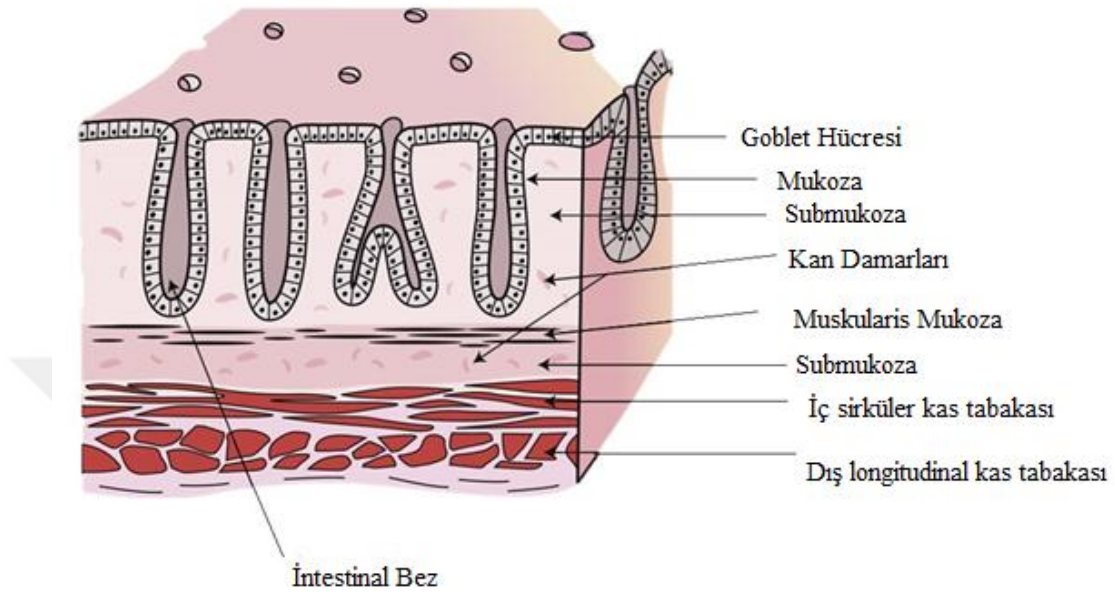
Çapı çıkan ve transvers kolona göre daha dar olan inen kolon, yaklaşık 25 cm uzunluğundadır ve splenik fleksuradan başlayıp sigmoid kolona kadar uzanır. Ön ve yan yüzeyleri peritonla örtülüyken arka kısmında periton yoktur (9).

3.1.7. Sigmoid kolon

İnen kolonun devamı olan sigmoid kolon, ortalama 40 cm uzunluğundadır ve tüm yüzeyi peritonla örtülüdür. Normalde pelvis içinde lokalizedir ancak serbest hareket yeteneği ile abdominal kavite içine de yer değiştirebilir. Rektosigmoid köşeden sonra rektum olarak devam eder (3).

3.2. Kolon Histolojisi

Gastrointestinal sistemin çoğu yerinde bulunan aynı 4 tabaka (mukoza, submukoza, muskularis ve seroza) kolonda da mevcuttur (Şekil 3). Mukoza; çok sayıda mukus salgılayan goblet hücresi (ince bağırsakta bulunan villus kolonda bulunmaz), lamina propria ve muskularis mukozasına sahip kolumnar epitel içeren bir bağ dokusudur. Submukoza kan damarları ve Meissner sinir pleksusu içeren gevşek bağ dokusudur. Muskularis tabakası lümene yakın kısmında sirküler, dışta longitudinal olan iki kas tabakasından oluşmuştur ve bu tabakalar arasında myenterik (Auerbach's) sinir pleksus mevcuttur. Seroza, kolonun dış tabakasıdır, tek katlı yassı epitel (mezotel) hücreler ile örtülüdür ve kan, lenf ve yağ dokusu bakımından zengindir (1).



Şekil 3. Kolonun ışık mikroskobu altında görüntüsü (1).

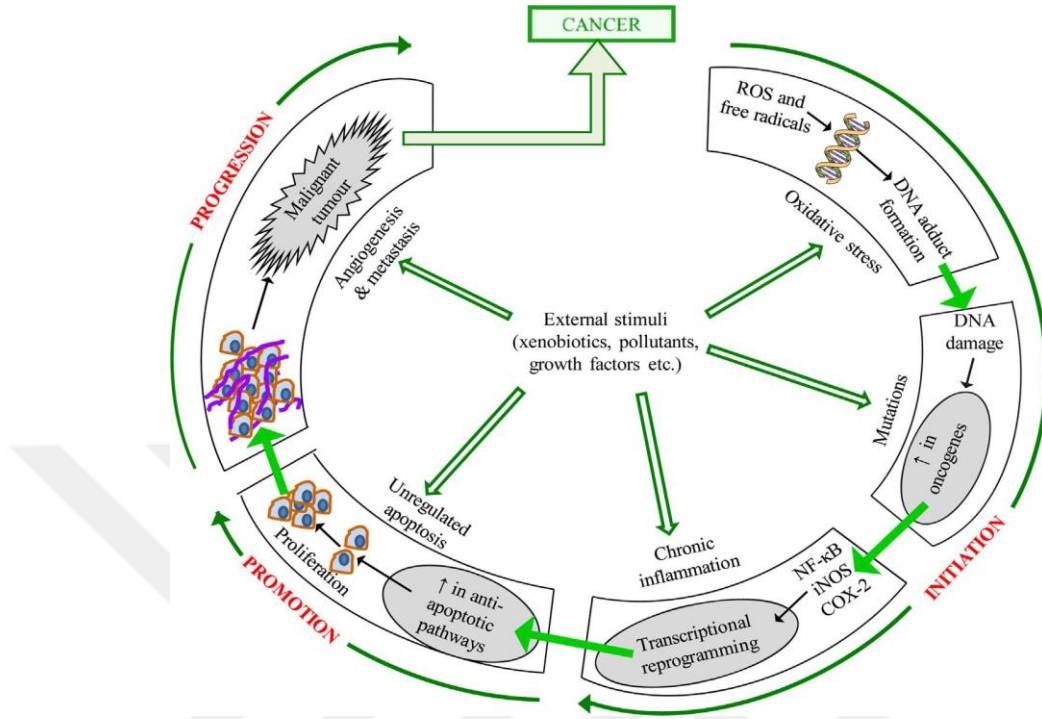
3.3. Kolon Fizyolojisi

Kalın bağırsağın birincil görevi fekal materyali dışkılamadan önce depolamak ve yoğunlaştırmaktır. Kalın bağırsak dışkı ve bazı gazları depolar. Su Emilimi çekum ve çıkan kolonda olur. Kolondan sodyum, klorür, sakkaroz ve laktoz da emilir (10).

3.4. Kanseri Tanımı ve Gelişimi

Kanser, hem genetik hem de çevresel koşulların değişmesiyle görülme sıklığı her geçen gün artan, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme sonuçlanan hastalıklardan biridir (11). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre bulaşıcı olmayan hastalık kaynaklı ölümlerin %63'ü kanser ile ilişkilidir ve ölüme en çok sebebiyet veren

kanser türlerinin akciğer, mide, kolon, karaciğer ve meme kanserleri olduğu bildirilmektedir (12,13). Erkeklerde en sık rastlanan kanser türlerini prostat, akciğer, bronş ve kolorektal kanserler oluştururken, kadınlarda meme, akciğer ve bronş kanserleri oluşturur (14). Birçok kanser türünün çevresel ve/veya yaşam tarzı faktörlerine maruz kalmanın bir sonucu olduğuna dair bilgiler mevcuttur ve yalnızca küçük bir oranın (%10 kadar) doğuştan gelen genetik bozukluklardan kaynaklandığı bildirilmiştir (15,16). Kanser progresyonu çoklu sinyal yollarını içeren çok basamaklı bir süreçtir ve kanser araştırmalarına her yıl milyarlarca dolar harcanmasına rağmen, kanserin tam olarak nasıl geliştiği sorusuna net bir yanıt bulunamamıştır (17). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi ile kanser başlangıcı arasında güçlü bir ilişki vardır (18). ROS kaynaklı DNA instabilitesi, normal hücrelerin malign hücrelere dönüşmesinde kritik olan ve istenmeyen birçok metabolik yolu tetikleyebilir (19). Bununla birlikte oksidatif stresin neden olduğu DNA hasarı, ksenobiyotik ve kanserojenlere bağlı karaciğer hasarı, proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, kalıcı inflamasyon ve kontrolsüz hücre proliferasyonu kanser progresyonunda en çok kabul gören hipotezlerdendir (11).



Şekil 4. Normal hücrelerin, çeşitli dış uyarılarla kanserli hale dönüştürülmesinde rol oynayan aşamalar. ·OH: hidroksil radikali; iNOS: uyarılabilir nitrik oksit sentaz; COX-2: siklooksijenaz 2; NF-κB: nükleer faktör κB; DNA: deoksiribonükleik asit; H₂O₂: hidrojen peroksit; ; CDK'lar: siklin bağımlı kinazlar; O₂^{·-}: süperoksit radikali (11).

3.4.1. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser (KRK) terimi, rektum veya kolonun iç astarında tümör veya doku büyümesi olarak başlayan ve yavaş gelişen bir kanser türünü ifade eder (20). Polip olarak bilinen bu anormal büyüme, kanserli hale gelirse, rektum veya kolon duvarında tümör oluşturabilir ve daha sonra diğer anatomik bölgelere metastaz yaparak kan damarları veya lenf damarları halinde büyür (21). Kolorektal bölgede başlayan kanserlerin büyük çoğunluğunu (%95'in üzerinde) adenokarsinomlar oluşturur ve bunlar kolon ve rektumu kaplayan mukus yapım bezlerinde lokalizedirler (20). Kolorektal

bölgede daha az görülen diğer kanser türlerini ise; karsinoid tümörler (hormon üreten bağırsak hücrelerinde başlayan), gastrointestinal stromal tümörler (cajal'ın interstisyel hücreleri olarak bilinen özel kolonik hücrelerde oluşan), lenfoma (kolon veya rektumda oluşan immün sistem kanserleri) ve sarkomalar oluşturur (tipik olarak kan damarlarında başlar, ancak bazen kolorektal duvarlarda da oluşur) (20,21).

3.4.1.1.Etiyoloji

KRK sporadik (%70), familyal clustering (%20) veya kalıtsal sendromlar (%10) olarak ortaya çıkabilir. En yaygın kalıtsal KRK sendromları ailesel adenomatoz polipozis (FAP) ve Lynch sendromu (kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser [HNPCC]) ve hamartomatöz polipozis sendromudur ve tüm KRK kanserlerinin yaklaşık %5'i bu hamartomatözlerle ilişkilidir.

Kişisel veya ailesel KRK öyküsü, adenomatöz polipler ve villöz veya tubulovillous displazili polipler, 5 yılda %3 ile %5'e varan senkronöz ve metakronöz KRK primer kanseri için yüksek bir risk olduğunu göstermektedir.

Abdominal radyasyon (30 Gy'den büyük) alan çocukluk çağındaki kanser mağdurları KRK riski altındadır ve bu hastalara radyasyon maruziyetinden 10 yıl sonra veya 35 yaşına geldiklerinde tarama önerilmektedir. KRK riskini arttıran diğer hastalıklar diabetes mellitus/insülin direnci, kontrolsüz akromegali hastalığı ve uzun süreli immünosüpresyonlu renal transplanttır. KRK riskinin obezite, kırmızı/işlenmiş et, tütün, alkol ve kolesistektomi ile birlikte artabileceği de bildirilmiştir (22).

3.4.1.2. Epidemiyoloji

KRK insidansı ve mortalite oranları tüm dünyada belirgin şekilde değişmektedir. Dünya Sağlık Örgütü GLOBOCAN veritabanına göre, KRK'nin erkeklerde en sık görülen üçüncü kanser, kadınlarda ise ikinci kanser türü olduğu bildirilmiştir ve 2018 yılında 1,8 milyon kişiye tanı koyulmuş olup, neredeyse 861000 vakanın ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (23).

3.4.1.3 İnsidans

En yüksek insidans oranları Avustralya, Yeni Zelanda, Avrupa ve Kuzey Amerika'da olup, en düşük oranlar ise Afrika ve Güney-Orta Asya'da görülmektedir (24). Bu coğrafi farklılıkların genetik olarak belirlenmiş duyarlılığa ek olarak diyet ve çevresel maruziyetlerdeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (23). Fiziksel hareketsizlik, sağlıksız beslenme, sigara ve obezite gibi potansiyel olarak değiştirilebilecek davranışların, KRK riskindeki sosyoekonomik eşitsizliğin önemli bir bölümünü oluşturduğu düşünülmektedir (25,26).

Yapılan bir kohort çalışmasında 50 yaşın altında tanı alan hastaların %86'sından fazlasının tanı sırasında semptomatik olduğu, ve bu hastaların sol kolon ya da rektal kanserin ileri evresinde oldukları bildirilmiştir (27). Şu anda, çoğu kılavuzda, pozitif aile öyküsü ya da yatkın bir kalıtsal sendrom olmadıkça, 50 yaşın altındaki asemptomatik bireylerin taranması önerilmemektedir. Bununla birlikte, 2018'de Amerikan Kanser Derneği, ortalama 45 yaşında KRK riski taşıyan kişileri taramaya başlamak için "nitelikli" bir öneri yayınlamıştır (28).

3.4.1.4. Mortalite

Amerika Birleşik Devletleri'nde ve diğer birçok batı ülkesinde 1980'lerin ortasından bu yana KRK'den ölüm oranları giderek azalmıştır (29,30). Bu azalış, kolonik poliplerin saptanması ve çıkarılması, daha erken bir aşamada KRK'lerin saptanması ve daha etkili primer ve adjuvan tedavilerin varlığı ile ilişkilendirilmektedir (31).

3.5. Değiştirilebilir Risk Faktörleri

3.5.1. Sigara Kullanımı

Sigara kullanımı ile akciğer kanseri arasında sıkı bir bağlantı olmakla birlikte, sigara kolon ve rektum için de son derece zararlıdır (32). Sigara içmek, kolorektal kanserin bilinen öncü lezyonları olan adenomatoz poliplerin oluşumunu ve büyümesini hızlandırır. Kolon ile rektumda bulunan daha büyük poliplerin uzun süreli sigara içiciliği ile korele olduğu bildirilmiştir (33). Tütün dumanı; heterosiklik aminler, nitrozaminler ve polisiklik hidrokarbonlar dahil olmak üzere bilinen kanserojenleri içerir ve bu bileşiklerin, hayvan modellerinde Adenomatoz Polipozis Koli (APC) geni ile etkileşime girdiği bilinmektedir (34). Yapılan çalışmalarda, kolorektal adenom büyüklüğü sigara içmeyenlerle sigara içenler arasında karşılaştırıldığında, adenom büyüklüğünün sigara içen hastalarda önemli ölçüde daha fazla olduğu rapor edilmiştir (35,36). Bununla birlikte; cinsiyet, polip alt tipi, yer ve şiddetine bakılmaksızın sigara içiciliği ile polip riski arasında sıkı bir ilişki olduğu bildirilmiştir (37,38).

3.5.2. Alkol Tüketimi

Sigara kullanımı gibi düzenli olarak alkol tüketimi de kolorektal kanser geliştirme riski ile ilişkilidir. Alkol tüketiminin, genç yaşta kolorektal kanser gelişimine, aynı zamanda distal kolondaki tümörlerin orantısız bir şekilde artmasına neden olduğu bildirilmiştir (32). Alkolün zararlı etkisi reaktif metabolitlerinden biri olan asetalaldehitten ya da alkolün kanserojen moleküllerin mukozal hücrelere penetrasyonunu artıran bir çözücü olarak işlev görmesinden ileri gelebilir (39). Blasiak ve arkadaşları etanol maruziyeti ile kolonik mukoza DNA ipliklerinde kırılmalarda doza bağlı bir artış tespit etmişlerdir (40). Bununla birlikte asetaldehitin kromozom kırılmasına neden olabilecek folat bozulmasına yol açabileceği ve alkolün bu mekanizmayla kolorektal karsinogenezi teşvik edebileceği de bildirilmiştir (41).

3.5.3. Beslenme Alışkanlığı

Diyet, kolorektal kanser etiyolojisinde bugüne kadar tanımlanan en önemli eksojen faktör olmakla birlikte, gıda alışkanlıklarındaki değişiklikler ile kolorektal kanserlerin %70'inin önlenebileceği tahmin edilmektedir (42). Literatürde en sık incelenen diyet faktörlerinden bazıları; hayvansal yağ alımı ve kırmızı et tüketiminde artış, azalan folat ile kalsiyum ve meyve ve sebze tüketimidir (33).

Bazı çalışmalar artmış hayvansal yağ alımı ile kolorektal polip riski arasında pozitif bir ilişki olduğunu gösterirken (43,44), bazı çalışmalarda herhangi bir ilişkinin olmadığı bildirilmiştir (45,46). Kolonoskopi tabanlı sistematik bir çalışmada, yüksek trigliserit ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol konsantrasyonlarındaki azalış, kolorektal adenom prevalansının yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir (47).

Yüksek miktarda kırmızı ve işlenmiş et tüketimi kolorektal kanserin gelişimine katkıda bulunan diğer bir beslenme alışkanlığıdır. Kırmızı et tüketiminin kolorektal kanser ile pozitif ilişkisinin altında yatan sebep; yüksek ateşte pişirilmiş etlerde poliaromatik hidrokarbonlar, heterosiklik aminler ve kolesterol oksidasyon ürünleri ile çeşitli nitrozaminler gibi kanserojenik bileşenlerin oluşabilmesidir (48).

Her ne kadar bazı diyetlerin diğerlerinden daha sağlıklı olduğu düşünülse de, belirli diyet modelleriyle ilgili tanımlar güncel literatürlerde farklılık göstermektedir (33). Bazı araştırmalarda meyve ve sebze içeriği düşük diyet yapanların kolorektal kansere yakalanma riskinin daha yüksek olabileceğini düşündürmektedir (49,50). Godos ve ark. meyve ve sebze tüketiminin yüksek olduğu diyeti sağlıklı diyet, kırmızı/işlenmiş et, tuz, şeker ve rafine tahılların yüksek oranda tüketildiği diyeti ise sağlıksız diyet olarak tanımlamışlardır. Elde ettikleri analiz sonuçlarında ise, sağlıklı bir beslenme alışkanlığına sahip olan kişilerde kolorektal adenom riskinin %20 oranında azaldığı, sağlıksız bir diyet alışkanlığına sahip olanlar için neredeyse % 25'lik nispi bir risk artışı olduğunu belirtmişlerdir (51).

Bazı epidemiyolojik çalışmalar ve meta-analizler, diyet folatı ile kolorektal polip ve kanser riski arasında ters bir ilişki olduğunu gösterirken (43,52), bazıları folatın hiçbir etkisinin olmadığını veya risk artışına neden olmadığını bildirmişlerdir (53,54). Folatın, maruziyet zamanlamasına göre KKK riskini farklı şekilde etkileyebileceği varsayılmıştır (55). Normal mukozada folat eksikliği DNA instabilitesine neden olabilirken, yeterli miktarda folat varlığı kolorektal karsinogenezin başlama riskini azaltabilir (56).

Prospektif kohort çalışmaları, yüksek kalsiyum alımının KKK riskini azalttığı, ancak bu etkisini 1000 mg/gün dozu üzerinde alım ile gösterebildiğini bildirmişlerdir

(57). Bu miktar da günde yaklaşık üç bardak süt, yoğurt veya soyaya karşılık gelmektedir (58). Kalsiyum, safra asitleri ve yağ asitlerini bağlayarak kalın bağırsaktaki neoplazilere karşı koruma sağlayabilir, böylece onların kolonik epitel hücreleri üzerindeki proliferatif ve kanserojen etkilerini azaltır (33).

Diyet lifinin dışkı hacmini ve atılım hızını artırarak, kolon bakteri florasını değiştirerek, toksik metabolitlerin üretimini önleyerek ve bu metabolitlerin bağırsak hücreleriyle temas sürelerini kısaltarak KRK riskini azalttığı düşünülse de yapılan çalışmalarda sonuçlar net değildir (49). Şöyle ki; KRK gelişiminde diyet lifinin koruyucu etkisinin olduğunu destekleyen çalışmalar mevcutken (59,60), son zamanlarda yapılan randomize kontrollü bir çalışmada diyetel lif alımının artırılması, adenomatöz polip öyküsü olanlarda adenomatöz poliplerin rekürrensini azalttığına dair net bir kanıt bulunamamıştır (61). Bununla birlikte, lif içeriği zengin diyetin genel sağlığa yararı nedeniyle, Amerikan Kanseri Derneği ve Dünya Kanseri Araştırma Fonu, kanserin önlenmesi için kepekli tahıl, meyve ve sebze içeriği yüksek bir diyetin tercih edilmesini önermektedir (62,63).

3.5.4. Vücut Kitle İndeksi

Normal kilolu insanlara kıyasla, obez erkekler yaklaşık %50 oranında daha yüksek kolon kanseri riski taşıırken, obez kadınlarda bu oran yaklaşık % 20 civarındadır (64). Bel çevresi ile ölçülen abdominal obezite de KRK riskini arttırır (65), bu yüzden vücut kitle indeksinin (VKİ) bel çevresi ile birlikte ölçülmesi tavsiye edilmektedir (66). Artmış VKİ ve kolorektal polip riski arasındaki ilişkinin altında yatan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Buna karşılık, insülin direncinin ve hiperinsülineminin,

insülin/insülin benzeri büyüme faktörü aksıyla mitojenik ve antiapoptotik sinyalizasyonuna yol açabileceği hipotezi ortaya konulmuştur (67). Aşırı kilo aynı zamanda kronik düşük dereceli bir inflamasyon durumu olarak kabul edilebilir ve böylece kanser riskini artırabilir (68).

3.5.5. Fiziksel İnaktivite

Yapılan araştırmalarda fiziksel olarak aktif kişilerde, proksimal ve distal tümör gelişim riskinin, daha az aktivite gösteren kişilere göre %25 daha düşük olduğu bildirilmiştir (69,70). Bununla birlikte, KRK tanısından önce fiziksel olarak daha aktif olan kişilerin daha az aktif olanlara göre hastalıktan ölme olasılığının daha düşük olduğu rapor edilmiştir (71). Yapılan başka bir çalışmada, fiziksel aktivitesi çok az olan kişiler (örneğin, saatlerce televizyon izleyerek vakit geçirenler) hareketli kişilere göre %25 ile %50 oranında artmış kolon kanseri riski taşıdığı gösterilmiştir (72). Yapılan bu çalışmalar fiziksel aktivitenin karsinogenez sürecinde rol oynadığını, bu etkiyi de bağışıklık fonksiyon gelişimi, inflamasyon azalması, insülin düzeyinin azalması ve insülin direnci dâhil olmak üzere çeşitli mekanizmalar üzerinden gösterdiği düşünülmektedir (33).

3.5.6. Nonsteroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar

Aspirin ve Nonsteroid Anti-İnflamatuvar İlaçların (NSAİİ'lerin), siklooksijenaz-2 (COX-2) enziminin inhibe edilmesine aracılık eden anti-inflamatuvar ve apoptotik etkilerle KRK riskini azalttığı düşünülmektedir (73,74). Bununla birlikte, aspirinin trombosit agregasyonunu inhibe edebildiği ve antitümörijenik etki sağlayabildiği

bildirilmiştir (74). Kolon kanseri gelişen aspirin kullanan bireylerde aspirin kullanmayanlara göre daha az agresif tümör geliştiği ve bu kullanıcılarda sağkalımın daha iyi olduğu görülmektedir (75). Ancak bu ilaçların ciddi gastrointestinal kanama veya seçici COX-2 inhibitöründen ötürü kalp krizi geçirme riski gibi yan etkileri olması nedeniyle genel popülasyonda kanser önleme amacıyla kullanılması önerilmemektedir. Bununla birlikte Amerika Birleşik Devletleri Önleyici Hizmetler Görev Gücü (USPSTF) 50 yaşlarındaki kardiyovasküler hastalık riski taşıyan belirli bireyler için kalp damar hastalığı ve KRK'nin önlenmesi için günlük düşük dozda aspirin kullanımını önermektedir (76).

3.6. KRK'da Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

3.6.1.Yaş

Kolorektal kanser gelişme riski ilerleyen yaşla birlikte artar ve bu kanser türü 40 yaşından önce nadir görülür; insidansı 40 ile 50 yaş arasında belirgin bir şekilde artmaya başlar ve sonraki her on yılda yaşa özgü insidans oranları daha da artar. Kolorektal kanser vakalarının %90'ından fazlası 50 yaş ve üstü kişilerde görülür. 65 ile 85 yaş arasındaki kişilerin kolorektal kanser geliştirme olasılığı 50 yaşın altındaki bireylerden altı kat daha fazladır (77).

3.6.2. Cinsiyet

KRK insidansı erkeklerde kadınlardan yaklaşık %30 daha yüksek iken, mortalite oranları yaklaşık % 40 daha yüksektir. Kadınlar ve erkekler arasındaki oranların farklı olmasının nedenleri tam olarak anlaşılamamıştır, ancak kısmen risk faktörlerine (örneğin

sigara içimi) maruz kalma ve seks hormonlarının etkisi olabileceği düşünülmektedir (78).

3.6.3. Kalıtım ve Aile Öyküsü

Kolorektal karsinom hem sporadik, hem de kalıtsal olarak ortaya çıkabilir (79). Vakaların % 70 ile % 75'inde sporadik tür görülürken, yaklaşık %20 ile 25'i aile öyküsüne sahip kişilerde görülür. 60 yaşından önce kolon kanseri veya kolon polipleri teşhisi konmuş birinci derece akrabaya sahip olan kişilerin önemli bir kolon kanseri öyküsü olduğu kabul edilir (80). Son araştırmalar, aile riskinin birinci derece akrabaların ötesine geçtiğini göstermektedir (81). Ayrıca adenom teşhisi konan birinci veya ikinci dereceden akraba olan kişilerde de risk artmaktadır (82).

Karakterize edilmiş hereditör sendromlar, tüm KRK'lerin yaklaşık %5'ini oluşturur ve bunlar spesifik gen mutasyonları ile ilişkilidir (83). En sık görülen kalıtsal durumlar Lynch sendromu olarak da adlandırılan HNPCC ve FAP'tır. HNPCC, DNA tamir prosesinde yer alan genlerdeki mutasyonlarla, yani HNPCC'li bireylerde sorumlu mutasyonlar olan MLH1 ve MSH2 genleriyle ilişkilidir. Lynch sendromlu bireyler, endometrial, yumurtalık, ince bağırsak ve mide de dâhil olmak üzere çok çeşitli başka kanserlerde de yüksek risk altındadır (84). Lynch sendromlu kişilerde tahminen erkeklerin %18'inde ve kadınların %19'unda, 50 yaşına kadar KRK gelişecek ve yaş ilerledikçe sırasıyla bu oran %45 ve %54'e yükselecektir (85).

FAP varyantları (Gardner sendromu, Turcot sendromu ve attenué familial adenomatöz), KRK'lerin %1'inden azını oluşturur. Tipik FAP'da, çocukluk çağında çok sayıda kolon adenomu görülür ve semptomlar ortalama olarak yaklaşık 16 yaşında başlar

ve tedavi edilmeyen kişilerin %90'ında 45 yaşına kadar kolon kanseri gelişir. FAP, kromozom 5 üzerinde bulunan APC genindeki germline mutasyonlarından kaynaklanır. Aynı gen attenu FAP formunda da rol oynar, ancak APC gen mutasyonlarının yerleri farklıdır (86).

3.6.4. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı

3.6.4.1. Ülseratif Kolit

Ülseratif kolit kolon ve rektum mukozasında inflamasyona neden olur ve kronik ülseratif kolit ile kolon neoplazisi arasında sıkı bir ilişki vardır (87). Pankolit genel popülasyonda kolon kanseri gelişme riskini 5-15 kat artırırken, kolonun sol tarafı ile sınırlı olan ülseratif kolit bu riski üç kat artırır, bununla birlikte sadece proktit veya proktosigmoidit ile riskin anlamlı olarak artmayacağı bildirilmiştir (88).

3.6.4.2. Crohn Hastalığı

Kolorektal kanser oluşma riski kolon tutulumu olan Crohn hastalarında en az ülseratif kolitte olduğu kadar artmış düzeydedir (89).

3.6.4.3. Abdominal Radyasyon

Çocukluk çağı malignitesinde abdominal radyasyon alan kişiler, sonraki gastrointestinal neoplazmalar açısından önemli derecede artmış risk altındadırlar (90,91). Çocuk Onkoloji Grubu rehberleri, 30 Gy veya daha fazla abdominal radyasyon alan çocukluk kanseri mağdurları için radyasyon alınımından 10 yıl sonra veya 35 yaşından itibaren başlamak suretiyle her 5 yılda bir kolonoskopi yapılmasını önermektedir (92).

3.7.Nonsteroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar

NSAİİ'ler anti-inflamatuvar, anti-piretik ve analjezik farmakolojik etki/yan etkiler gösteren ve dünya çapında en sık reçete edilen ilaçlardır (93). NSAİİ'ler hem hidrofilik hem de hidrofobik gruptan oluştuğu için amfifilik moleküllerdir. Hidrofobik özelliklerinden dolayı suda az miktarda çözünürler ve anti-piretik, anti-inflamatuvar ve trombosit agregasyonunu önleyici özellikler sergilerler. NSAİİ'ler ayrıca kan damarlarında pıhtılaşma inhibitörü olarak hareket ederler ve böylece kalp krizi ve kolon kanserinin önlenmesine yardımcı olurlar (94).

3.7.1 NSAİİ'lerin Anti-inflamatuvar Etkileri

NSAİİ'ler siklooksijenazı yarışmalı ve geri dönüşümlü inhibe ederek prostaglandin sentezini baskırlar ve prostaglandinlerin görev gördüğü inflamatuvar reaksiyonları kontrol altına alarak anti-inflamatuvar etki gösterirler (95).

3.7.2. NSAİİ'lerin Anti-Piretik Etkileri

Malignite, inflamasyon veya enfeksiyon gibi durumlar lökositlerden pirojenik etkili sitokinlerin (İnterlökin (IL)-1, IL-2, IL-6, Tümör Nekrozis Faktör (TNF), interferon vb.) salınımına yol açarlar. Bu sitokinler, prostaglandin E₂ (PGE₂) sentezini uyarak termoregülatuvar merkezin ayar noktasını (set-point) yükseltirler. NSAİİ'ler PGE₂'nin sentezini ve salınımını azaltarak, periferik vazodilatasyon ve terleme ile ısı kaybını arttırarak anti-piretik özellik gösterirler (95).

3.7.3.NSAİİ'lerin Analjezik Etkileri

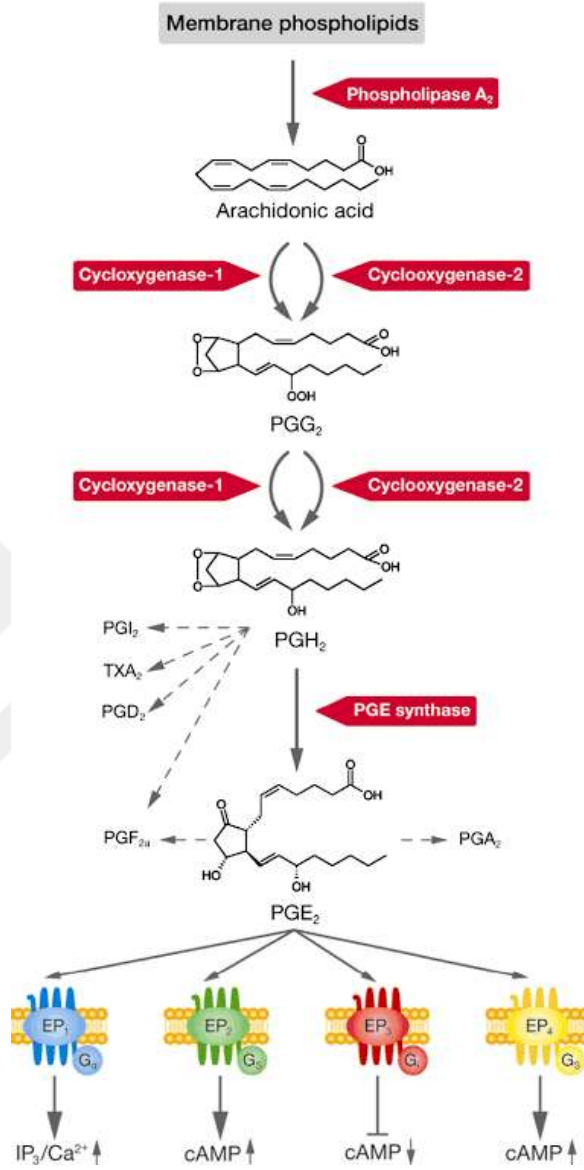
NSAİİ'ler inflamatuvar süreçte hücrelerden lokal olarak salgılanan bradikinin, histamin ve diğer kimyasal mediyatörlere sinir uçlarının daha duyarlı hale gelmesine yol açan PGE₂ sentezini azaltarak analjezik etki gösterirler ve böylelikle ağrı hissini azaltırlar (95).

3.8. NSAİİ ve COX-2 İnhibitörlerinin KRK'deki Rolü

NSAİİ'lerin ve COX-2 inhibitörlerinin (coxibs) KRK'nin kemoprevensiyonu için umut verici ajanlar oldukları bildirilmiştir. Bu ajanların tümörögenез üzerindeki baskılayıcı etkisi bir dizi epidemiyolojik, klinik çalışma ve hayvan deneyleri ile desteklenmiştir. NSAİİ ve coxib'ler apoptozis, hücre döngü arresti ve anjiyogenезin inhibisyonu gibi yollarla tümör oluşumunu inhibe ederler (96). COX enziminin COX-1, COX-2 ve COX-3 olmak üzere 3 izoformu vardır. COX-1; yapısal, konstitütif izoform olup, böbrek kan akışını düzenler ve bağırsak mukozasının bütünlüğünü korur. Normal hücre aktivitesini düzenleyen PG'lerin sentezlenmesinde yer alır. Aktivasyon durumunda ise farklı fonksiyonlarda görev yapar (PGI₂ üretimi, endotelyumdan salındığında antitrombojenik, gastrik mukozadan salındığında hücre koruyucu etkisi vb. gibi). Trombositlerdeki COX-1, Tromboksan A₂ (TXA₂) üretimini indükleyerek trombositlerin agregasyonu yoluyla beklenmeyen kanamaların oluşmasını engeller (97).

COX-2 promotor bölgelerinde taşıdığı inflamatuvar mediatörlere duyarlı transkripsiyon faktörü sayesinde hızlı uyarılabilir. COX-2'nin inflamasyon ve neoplazinin geliştiği dokularda daha fazla eksprese olduğu ve inflamasyonda görevli

PG'lerin sentezine aracılık ettiği bildirilmiştir. Normal dokularda aktivitesi ölçülemeyecek kadar düşüktür (98). COX-3 ise COX-1'in ek varyantı olup, asetaminofen inhibisyonuna duyarlıdır ve fonksiyonu tam olarak aydınlatılamamıştır (99). NSAİİ'ler temel etkilerini yarışmalı, geri dönüşümlü olarak farklı düzeyde COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyonu ile birlikte PG sentezini azaltarak gösterirler (100). COX-1 ve COX-2 enzimleri araşidonik asitten (AA) prostaglandin (PG'ler) ve tromboksan oluşumunu katalize ederler (101). COX-2 geni, neoplastik ve inflamatuvar uyaranlarla (sitokinler, büyüme faktörleri ve mitojenler vb.) transkripsiyonel olarak düzenlenen bir gen dir ve tümöröenezde önemli rol oynar. COX-2 düzeylerinin premalign ve malign dokularda yükseldiği bildirilmiştir (102). KKK'nın % 85-90'ında ve adenomların %40-50'sinde, COX-2 ekspresyonu artar (103). Her iki COX (COX-1 ve COX-2) enzimi AA'nın PG öncüsü olan prostaglandin H₂'ye (PGH₂) dönüşmesini katalize eder (104). (şekil 5).



Şekil 5. NSAİİ'lerin ve coxib'lerin genel mekanizması, COX sinyal transdüksiyonu kaskadının inhibisyonu (105).

PG'ler, özellikle de PGE₂, COX-2'nin proinflatuvar ve tümör teşvik edici etki göstermesine aracılık ederler (106). PGE₂, hücre büyümesini ve inflamasyon ile ilgili sayısız süreci uyarır (107). Artmış PGE₂'nin düzeyi kolon kanserogenezi hızlandıran lipid peroksidasyonu ve DNA eklentilerinin oluşumu ile korelidir (108).

NSAİİ'ların kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaları (109):

- Salisilatlar (Aspirin, Diflunisal)
- Paraaminofenol türevleri (Asetaminofen)
- Asetik asid türevleri (İndometazin, Diklofenak, Etodolak, Sulindak, Mefenamik asid, Meklofenamatlar, Flufenamik asid, Ketorolak)
- Propiyonik asid türevleri (Naproksen, İbuprofen, Fenoprofen, Ketoprofen, Oksaprozin, Flurbiprofen)
- Pirazolon türevleri (Aminopirin, Propifenazon, Metimazol soydum (dipiron), Fenilbutazon, Oksifenbutazon)
- Profenler (fenilpropionik asid türevleri)
- Enolik asid türevleri (Nabumeton, Piroksikam, Meloksikam)
- Selektif COX-2 inhibitörleri (Selekoksib, Rofekoksib, Valdekoksib, Etorikoksib, Parekoksib, Lumirakoksib).
- Diğer ilaçlar (Glukozamin hidroklorür).

NSAİİ'ların ilk temsilcisi Aspirin'dir. COX-1 ve COX-2 molekülünde, substrat araşidonik asidin içine girerek bağlandığı kanal çeperindeki bir amino asid rezidüsünü asetilleyerek bu enzimleri geri dönüşümsüz olarak inhibe eder; diğer NSAİİ'lar ise geri dönüşümlü inhibisyona neden olurlar (109). NSAİİ'ler kimyasal çeşitlilik açısından geniş bir yelpazeye sahip olmalarına rağmen tamamı COX'un aktif bölgesindeki Arjinin (Arg)-120 ile iyon çifti oluşturan bir karboksilat fonksiyonuna (AA ile benzer) sahiptirler (110).

3.9. COX-2 İnhibitörleri

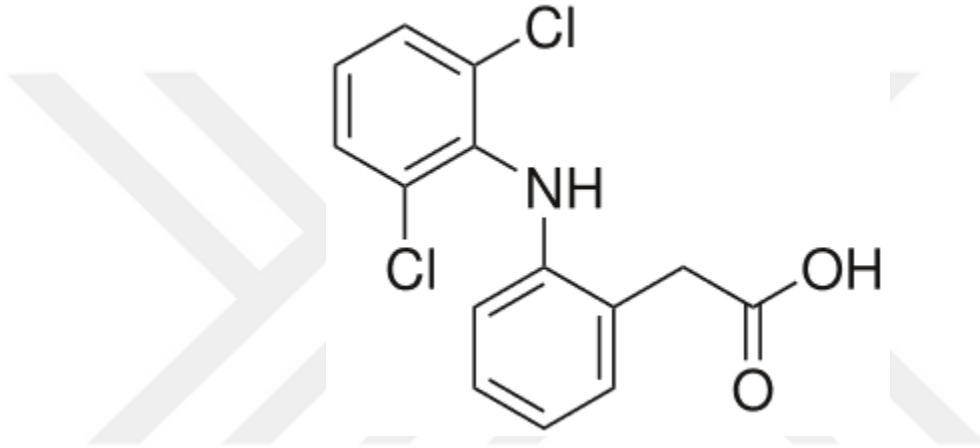
COX inhibitörleri, analjezik, anti-inflamatuvar ve anti-piretik özellikleri nedeniyle birçok hastalık türünde kullanılmaktadırlar. NSAİİ'lerin COX-1 ve COX-2 enzimleri üzerine olan selektiviteleri aynı olmayıp, büyük farklılıklar göstermektedir. Şöyle ki, selektif olmayan inhibisyonda COX-1 enzim inhibisyonuna bağlı yan etkiler ortaya çıkarken, selektif inhibisyonda inflamasyon yan etkiler olmadan baskılanabilir. Klasik NSAİİ'ler her iki enzimi (COX-1 ve COX-2) birden inhibe ederken, COX-2 inhibitörleri indüklenebilir COX-2'yi inhibe etmekte ve yapısal yan etki ortaya çıkmaksızın inflamasyonu baskılamaktadırlar. Bu yaklaşımla COX-2 inhibitörleri sınıflandırılacak olursa;

- a) COX-2 selektif ajanlar: Klinik terapötik dozlarda insan ve hayvanda COX-2 inhibisyonu yaparken, artan dozlarda belirginleşen COX-1 inhibisyonuna neden olurlar (meloksikam, nabumetane, nimesulid vb).
- b) COX-2 spesifik ajanlar: Maksimum terapötik dozda bile klinik olarak anlamlı COX inhibisyonuna neden olmayan ajanlardır (selekoksib, rofekoksib vb) (111).

3.9.1. Diklofenak

Diklofenak (DCF), 2-{2-[(2,6-dikloroanilino)fenil]asetik asit, diğer birçok tıbbi kullanımın yanı sıra akut- kronik ağrıların özellikle de iskelet- kas sistemi ağrılarının tedavisinde kullanılan kısa yarı ömürlü nonselektif NSAİİ türü bir ilaçtır (112). Diklofenak'ın anti-inflamatuvar etkisi, COX enzimlerini inhibe edebilmesinden ileri gelmektedir. Bununla birlikte bu ilaç, analjezik, anti-inflamatuvar ve anti-piretik

özelliklere sahip fenilasetik asit yapısına sahiptir ve COX-2'yi, COX-1'e kıyasla daha güçlü bir şekilde inhibe eder (113). Yapılan deneysel çalışmalarda diklofenakın tümör ksenograftlarının büyümesini, bununla birlikte konsantrasyona bağlı bir şekilde kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği bildirilmiştir (114,115). Sıçan kolon kanseri modelinde de kemopreventif bir ajan olarak etki gösterdiği bildirilmiştir (116).

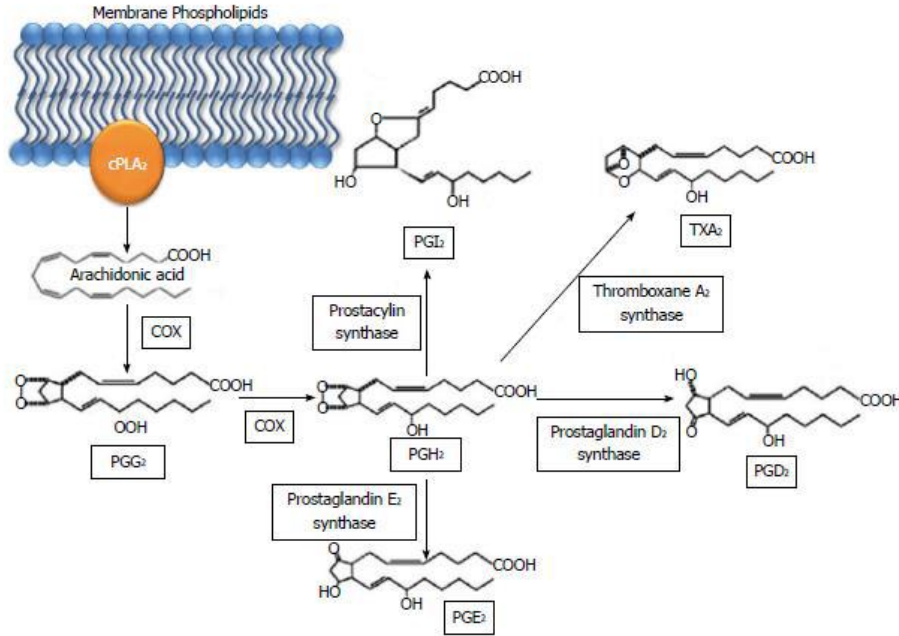


Şekil 6. Diklofenak'ın yapısı (117).

3.9.1.2. Diklofenak'ın Etki mekanizması

DCF'nin antikanser etkilerini açıklamak için sunulan birden fazla etki mekanizması vardır ki bu etki mekanizmalarının çoğu özellikle selekoksib ve diğer benzer NSAİİ türü COX-2 inhibitör ilaçlar için ortak özellik gösterir (118). COX yolu ve araşidonik asit ve diğer yağ asitlerinden PG, prostasiklin ve tromboksan türleri üretilir. Bu yolda ilk olarak COX enziminin katalizlediği reaksiyon ile PGH-2 üretilir. Daha sonra PGE₂ sentetaz enzimi ile PGH-2'den hızlı bir şekilde biyolojik olarak aktif olan PGE₂ sentezlenir (119). Daha önce tanımlanmış olan COX- 1 enzimi birçok dokudaki hücre membranının yapıcısı olarak ifade edilirken; COX-2 enzimi sitokinler, büyüme faktörü ve endotoksinler gibi çeşitli faktörleri tetikleyicisi

olarak bilinir (120). COX-2 enzim sentezinin artması, proinflatuvar oluşumun evrensel transkripsiyon faktörü olarak bilinen nükleer faktör kappa β (NF- $\kappa\beta$) aktivasyonu ile başlar. Akut inflamasyonda COX-2 enzimi endotel, epitel ve stromal hücrelerde, monosit ve lenfositlerde PGE₂ üretimini bazal düzeyin 100 katına çıkarır (119). Yükselmiş PGE₂ düzeyleri, pro-tümör mikro-ortamı ile ilişkili kronik inflamasyonla ilişkilidir. Özetle, DCF, diğer COX enzimlerinin inhibitörleri ile ortak olarak PGE₂ sentezini azaltma eğilimi gösterir, bu nedenle DCF'nin antikanser etkilerinin çoğu, doğrudan veya dolaylı olarak PGE₂ düzeylerindeki azalmayla ilişkilidir (121).



Şekil 7. Araşidonik asitin COX Yolu (122).

3.9.1.3. Diklofenak ve Kolorektal Kanseri

DCF de dâhil olmak üzere çeşitli NSAİİ'lerin anti-proliferatif etkileri 1994 yılında üç insan kolon kanseri hücre hattında (HT 29, SW480 ve DLD-1) *in vitro* olarak

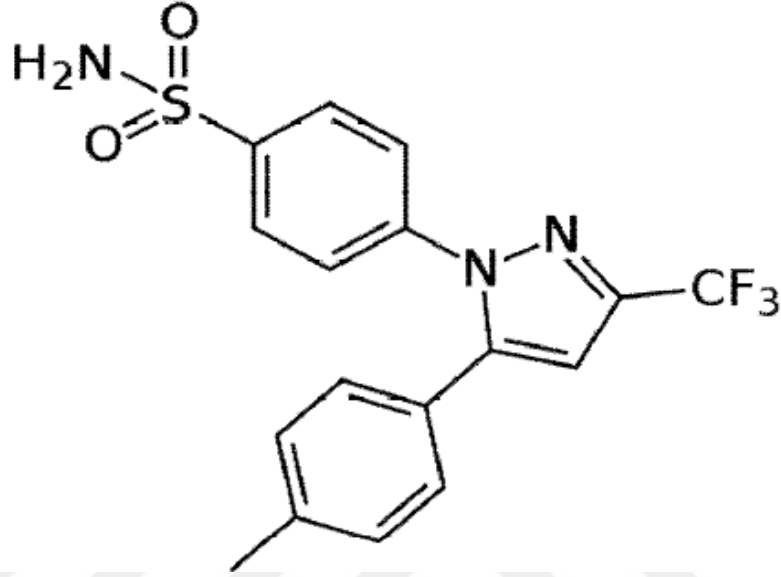
değerlendirilmiş ve DCF'nin anti-proliferatif bir etki gösterdiği bildirilmiştir (123). Daha sonra araştırmacılar, bir BALB/c murin modelinde implante edilmiş kolon-26 adenokarsinom tümörlerinde DCF'nin hiyalüronan ile topikal uygulamasının *in vivo* etkisini incelemiş ve 6 mg/kg'lık bir dozda topikal uygulamanın tümör oluşumunu geciktirdiği, daha sonra kontrollere kıyasla tümör büyümesini durdurduğu bildirilmiştir (124).

Bununla birlikte, diklofenak onkoloji hastalarında kanserle ilişkili ağrının tedavisinde ümit verici bir ilaç haline gelmiştir. Şöyle ki, deneysel çalışmalara göre Diklofenak'ın hücre canlılığını azaltan etkileri nedeniyle kemoterapötik bir ilaç olarak önerilmiştir. Yapılan bir çalışmada yüksek konsantrasyonlarda diklofenak, yüksek agresif kolon kanseri hücrelerinde (HT-29, SW480 ve DLD-1) kontrol numunelerine kıyasla hücre canlılığı kaybını arttırabilmiştir (125).

3.9.2. Selekoksib

Bir diarilpirazol türevi olan Selekoksib, 4-[5-(4-Metilfenil)-3-(triflorometil) pyrazol-1-il] benzen sulfonamid kimyasal yapısında COX-2'yi seçici olarak inhibe eden NSAİİ türü bir ilaçtır. Akut ve kronik ağrılar ile çeşitli artrit formlarının tedavisinde kullanılır ve analjezik, anti-inflamatuvar ve anti-pretik özellik gösterir (126). Bununla birlikte Selekoksib'in kolorektal, meme ve baş-boyun kanseri gibi farklı kanser türlerinde kemopreventif ajan olarak aktif bir şekilde kullanıldığı da bildirilmiştir (127). Bu nedenle kolon kanserli hastaların adjuvan tedavisi için selekoksib kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmıştır (128). Selekoksib'in anti-tümör etkisini gösterdiği mekanizma tam olarak aydınlatılamamış olsa da etki mekanizmasının

terapötik konsantrasyonda COX-2 izoenzimini inhibe ederek prostaglandin sentezini önlemesine dayandığı düşünülmektedir (129).



Şekil 8: Selekoksib'in Yapısı (130).

3.9.2.1. Selekoksib'in Etki Mekanizması

Seçici COX-2 inhibitörleri, özellikle selekoksib, klinik çalışmalarda çeşitli maligniteler için potansiyel bir kanser kemopreventif ve terapötik ajan olarak kullanılmaktadır (130). Selekoksib'in FAP hastalarında ve sporadik kolorektal adenom hastalarında kolorektal polip sayısını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (131,132). Bununla birlikte Selekoksib'in, kolon, akciğer ve prostat kanseri dâhil olmak üzere invaziv tümörlerde antikanser etkisi olduğu hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir (133-135). Selekoksib'in, anti-kanser etki mekanizması net olmasa da apoptoz indüksiyonu, hücre döngü arresti, anjiyogenezin düzenlenmesi ve endoplazmik retikulum stresinin indüklenmesi şeklinde olabileceği düşünülmektedir (130). (Şekil 9).

Yapılan hücre kültürü çalışmalarında selekoksib'in hücre döngü progresyonunu inhibe ettiği, bununla birlikte p21 (CDKN1A geni tarafından kodlanan) ve p27 (CDKN1B geni tarafından kodlanan) hücre döngü inhibitörlerinin ekspresyonunu artırdığı ve/veya CCNA1, CCNB1 ve CCND1 genleri tarafından kodlanan siklinlerin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (136-137). Selekoksib ile tedavi edilen insan kolon kanser hücrelerinde artmış β -katenin degradasyonu gözlenmiştir ve bu durum tümör hücresinde belirgin azalmalar ile ilişkilendirilmiştir (138). Selekoksib tarafından apoptozun uyarılması, kaspazlar ve CHOP gibi proapoptoz moleküllerin aktivasyonu (139) ve de Fosfoinositide Bağımlı Protein Kinaz 1 (PDK1) gibi antiapoptotik moleküllerin inhibisyonu ile ilişkilidir (130). Selekoksib tedavisinin kanser dokularında ve hücre hatlarında vasküler endotel hücre büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu azalttığı ve matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9) ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (140,141).

COX-2'nin yanı sıra selekoksib, antitümör yanıt mekanizmasında önemli rol oynayabilecek diğer birkaç hedefi doğrudan bağlayabilir ve engelleyebilir. PDK1, Selekoksibin doğrudan bir hedefidir ve PDK1/Akt sinyallemesinin inhibisyonu, hem kolon hem de prostat tümör hücre hatlarında selekoksib kaynaklı apoptoz ile bağlantılıdır (142,143).

Selekoksib ayrıca sarkoplazmik/ER kalsiyum ATPaz'a bağlanır ve onu inhibe eder (144). Bu bağlanma, sitozole kalsiyumun hızlı bir şekilde sızmasına neden olabilir, ER stresini tetikler ve sonuçta apoptoza yol açar (145). Bu aktivite selekoksib için oldukça spesifiktir ve diğer COX inhibitörleri ile ilişkilendirilmemiştir (130).

etkiler nedeniyle önerilmemektedir (146). Bu yan etkilerden kaçınmak amacıyla, selekoksib ve rofecoksib gibi seçici COX-2 inhibitörü geliştirilmiştir. Yapılan klinik çalışmalarda, coxib'lerin geleneksel NSAİİ'lere benzer, ancak daha az gastrointestinal toksisiteye sahip anti-inflamatuvar aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (147). Bununla birlikte Selekoksib'in insan kolon kanseri hücrelerinde survivinin ekspresyonunu ve aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (148,149). Survivin, apoptoz inhibitör ailesinin bir üyesi olup, hücre proliferasyonu ve sağkalımının temel bir düzenleyicisi olarak görev görür. Normal koşullar altında, survivin, başlıca embriyonik gelişim sırasında bulunur ve yetişkin dokusunda tespit edilmez. Survivin yüksek oranda tümöre özgüdür ve KRK'de ve hemen hemen bütün diğer insan kanserlerinde aşırı eksprese edilir (150).

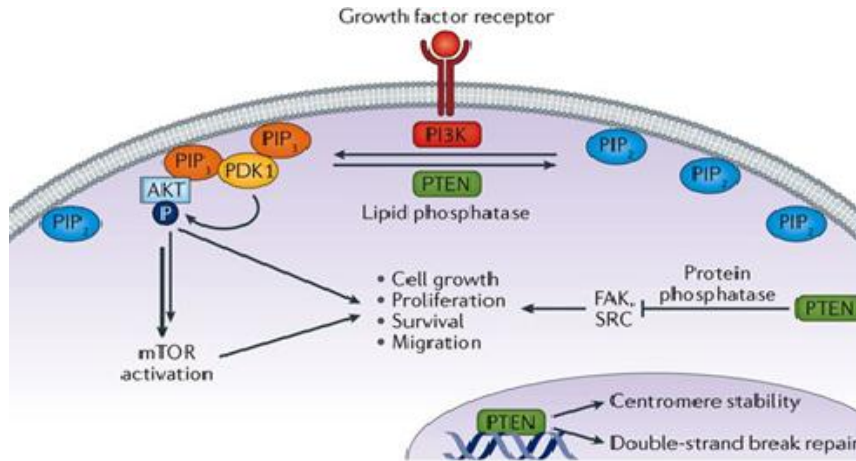
3.10. Western Yöntemi ile Değerlendirilen Seçili Kanser Yolağı Parametreleri

3.10.1. Fosfataz ve Tensin Homoloğu (PTEN)

1997 yılında keşfedilmiş olan fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) 10q23.31 kromozomu üzerinde lokalize olan ve 403 aminoasitten oluşan bir tümör süpresör genidir (151,152). İşlevsel olarak PTEN, p-tirozin, -serin ve -treonin rezidülerini defosforile ederek protein fosfataz aktivitesi, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfatın (PIP3) inositol halkasının D3-pozisyonundaki fosfat grubunu defosforile ederek de lipid fosfotaz aktivitesi gösterir (153). PTEN' in başlıca hücresel substratı, ikincil haberci olan PIP3'tür ve 3,4,5 trifosfat fosfotidilinozitol 3-kinaz (PI3K) enzimi aracılığıyla PIP3'ü defosforile ederek fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfata (PIP2) 'ye dönüştürür (154,155).

PTEN, PI3K sinyalinin dolayısıyla PIP3'e bağımlı süreçleri (hücre yaşamı, büyümesi ve çoğalması) inhibe eder. PTEN'in başlıca biyolojik fonksiyonu lipid substratlarını defosforile etmektir ancak PTEN'in hücre göçünün engellenmesi ve hücre siklusunun durdurulması dâhil olmak üzere bazı biyolojik etkilerinden sorumlu olan protein fosfataz aktivitesi gösterdiği de rapor edilmiştir (156,157). PTEN'in fonksiyon gösterdiği hücresel olaylar Şekil 10'da gösterilmiştir.

PTEN kanser vakalarında somatik mutasyonlar, gen susturma veya epigenetik mekanizmalar yoluyla fonksiyonunu kaybeder. Tümör ile ilişkili mutasyonlar, tüm PTEN domainlerinde meydana gelebilir, bu nedenle her bir ayrı protein bölgesinin (ve ilgili her bir PTEN aktivitesinin), kanser başlangıcı ve progresyonu ile patolojik olarak ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda PTEN gen/protein oranının tümör gelişimi ile kantitatif olarak ilişkili olduğu ve PTEN fonksiyonunun kısmi kaybının bile bazı insan malignitelerinde büyümeyi teşvik etmek için yeterli olabileceği bildirilmiştir (158,159).



Şekil 10: PTEN Regülasyonu ve Fonksiyonları (160).

3.10.1.1. PTEN ve Kolorektal Kanser

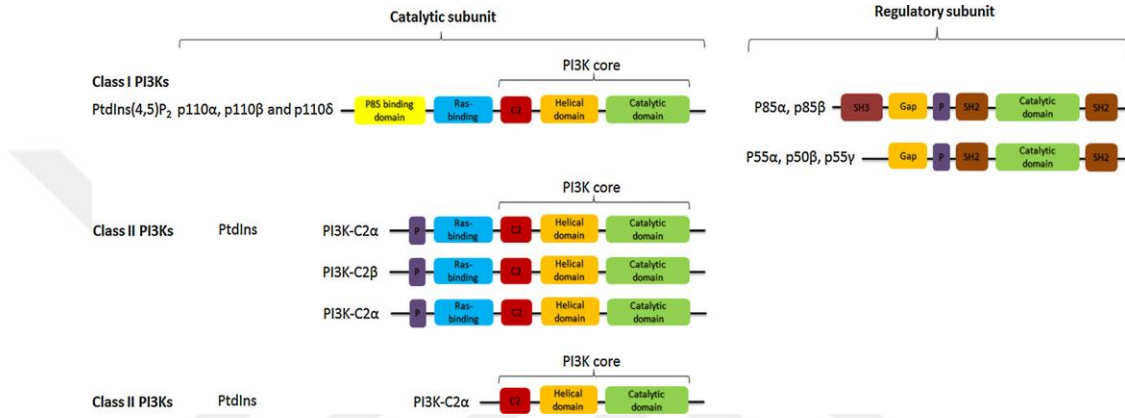
PTEN mutasyonları kolorektal kanserde sıkça görülür ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) inhibitörüne dayalı tedavilere yanıtın potansiyel belirteçlerini oluşturur. Aslında, sporadik kolorektal kanserlerin % 5-30'unda PTEN kaybı veya PTEN'i inaktive edici mutasyonlar gözlenir (161,162).

PTEN ekspresyonu ve mutasyon oranının sağ taraflı (proksimal) kanserlere kıyasla sol taraflı (distal) KKR'de daha düşük olduğu rapor edilmiştir (163,164). Bu bulgunun proksimal ve distal sporadik KKR'lerin tümör genезine yol açan farklı genetik mekanizmalarla ilgili olması muhtemeldir. Sağ kolonda ortaya çıkan kanserler genellikle mikrosatellit instabilite (MSI) ile distal kolonda ve rektumda ortaya çıkanlar ise sıklıkla kromozomal instabilite ile karakterize edilir. Bu nedenle, PTEN değışikliklerinin MSI ve MSI'ye yol açan mekanizmalarla bağlantılı olabileceğı söylenebilir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda PTEN mutasyonları ve MSI arasında doğrudan bir ilişki olduğu gösterilmiştir; bu da PTEN geninin, MSI kolorektal tümör genезinde genomik instabilitenin bir hedefi olabileceğini düşündürmektedir (165,166).

3.10.2. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)

Fosfoinositid kinazlar (PIK'ler), fosfoinositidlerin inositol halkasını fosforile eden, böylece sinyal transdüserleri olarak işlev gören lipid kinazlardır. Karbonhidrattaki fosforilasyon bölgesine bağlı olarak, PIK'ler üçe ayrılır: fosfoinositid 3-kinazlar (PI3Ks), fosfoinositid 4-kinazlar (PIP4Ks) ve fosfoinositid 5-kinazlar (PIP5Ks) (167). PI3K'ler yapısal özelliklerine, substrat seçiciliklerine, subünitelerine, aktivasyon mekanizmalarına ve fonksiyonlarına bağlı olarak üç sınıfa ayrılırlar. Sınıf 1 PI3K'lar

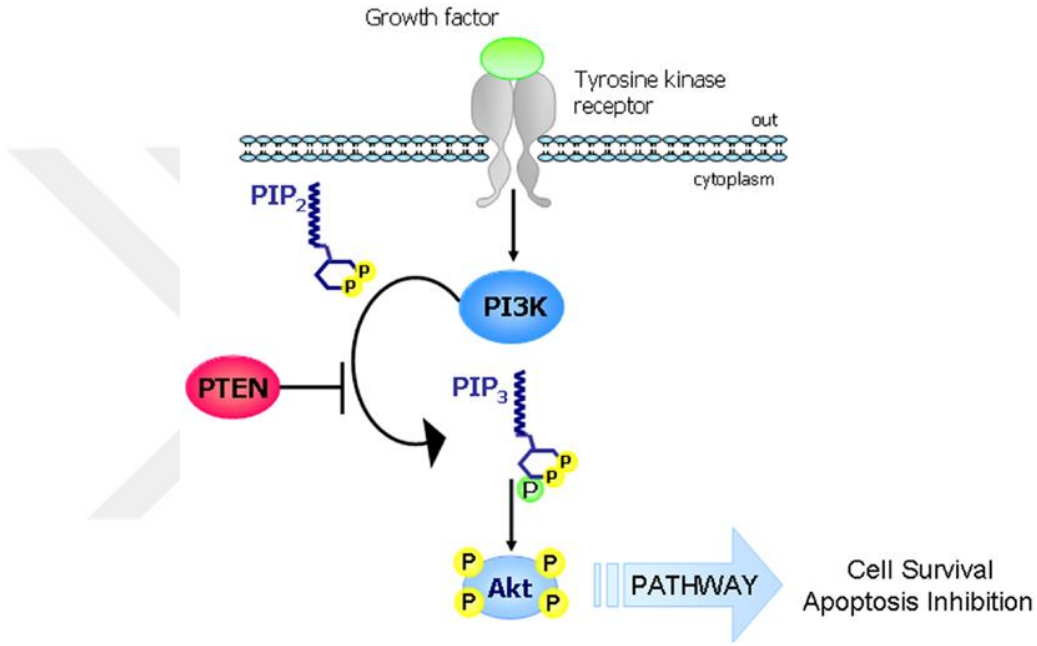
sırasıyla katalitik (p110) ve bağdaştırıcı/düzenleyici (p85) olmak üzere 2 subünitten oluşur (168). (Şekil 11). p85 düzenleyici alt birimin farklı izoformları PIK3R1, PIK3R2 ve PIK3R3 genleri tarafından kodlanırken, p110 α , p110 β ve p110 δ katalitik alt birimleri sırasıyla PIK3CA, PIK3CB ve PIK3CD genleri tarafında kodlanır (168,169).



Şekil 11. PI3K yapısı: Yapısal ve biyokimyasal özellikleri farklı olan üç tip PI3K bulunmaktadır. Sınıf I PI3K'lar, karsinom gelişimine en çok neden olanlardır ve p85 izoformu ile (p110 α , p110 β , p110 δ için) veya p101 veya p87 (p110 δ için) kompleks halinde bulunurlar. p85 izoformları iki Src homolog 2 (SH2) domaininden oluşur ve PIK3R1, PIK3R2 ve PIK3R3 tarafından kodlanır. II. Sınıf PI3K'lar düzenleyici alt birimlere sahip değildir, ancak protein-protein etkileşimlerine aracılık edebilecek amino ve karboksi terminal uzantılarına sahiptir. Sınıf III PI3K'lar, proteinlerin ve veziküllerin yapımında rol oynuyor gibi görünmektedir (168).

PI3K kompleksi, büyüme faktörü tarafından aktive edildiğinde, kompleks sitoplazmadan iç hücre zarı üzerindeki tirozin kinaz reseptörüne alınır. Burada PIK3CA, substrat PIP2'yi inositol halkanın 3 konumunda fosforile eder ve ikincil haberci olan PIP3'ü oluşturur. PIP3 düzeyleri, PTEN ve SH2 içeren inozitol 5-fosfataz (SHIP) gibi fosfatazların etkisiyle sıkı bir şekilde düzenlenir (170). PI3K sinyal yolağı, glukoz

homeostazı, protein sentezi, hücre çoğalması ve hayatta kalma gibi kritik hücresel işlemlere aracılık ederek hücresel fizyolojide merkezi bir rol oynar (171). Dolayısıyla bu yolak kanser tedavisi ile ilgili yapılan araştırmalarda önemli bir hedef olarak karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 12. PTEN/PI3K/Akt Yolağının Düzenlenmesi (160).

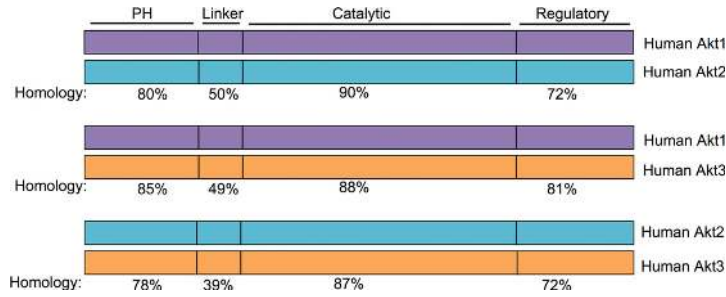
3.10.2.1. PI3K ve Kolorektal Kanser

Yapılan çalışmalarda, PI3K/Akt/mTOR sinyallerinin kanser büyümesi, metabolizması, hayatta kalma ve motilite üzerinde merkezi role sahip olduğu bildirilmiştir (172,173). PI3K/Akt /mTOR yolağı, insan kanserlerinde tümörlerin % 30-50'sini etkileyen ve en sık aktive olan yolaklardan biridir. Bu yolağın inhibe edilmesi hem hücresel proliferasyonun azalmasına hem de hücresel ölümün artmasına yol açabilir (174). PI3K/Akt/mTOR yolağının patolojik aktivasyonuna, PI3K'nın nokta

mutasyonları, PTEN'in inaktivasyonu ve Akt'nin amplifikasyonu veya mutasyonu gibi birçok faktör neden olabilir (175). PI3K/Akt/mTOR patolojik sinyalleşmeye, reseptör tirozin kinazlar (RTK'lar), G protein-bağımlı reseptörler ve diğer onkojenler dâhil olmak üzere başka yollarla sebep olabilir (176,177).

3.10.3.Akt

Protein kinaz B (PKB) olarak da bilinen Akt, proliferasyon ve surviv dâhil olmak üzere kritik hücresel fonksiyonları düzenlemede kilit rol oynayan bir serin/treonin protein kinazıdır (178). Akt; Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) ve Akt3 (PKB γ) olmak üzere 3 izoformdan oluşur ve bu izoformlar, bir N-terminali pleckstrin homologu domaini (PH), bir kinaz domaini ve bir hidrofobik motif içeren C-terminali regülâtör domaininden oluşan korunmuş bir yapıyı paylaşırlar (179,180). Şekil (13). Akt izoformları farklı genlerin ürünleri olmalarına rağmen, aminoasit dizilimlerinde %80'den fazla homoloji gösterirler ve benzer aktivasyon mekanizmalarına sahiptirler (181).



Şekil 13. Akt izoformları arasındaki homoloji (178).

Akt izoformları her hücre tipinde ve dokusunda bulunurlar (182). Akt1, beyin, kalp ve akciğerlerde, Akt2 çoğunlukla iskelet kaslarında, Akt3 ise beyin, böbrek ve embriyonik kalpte eksprese edilir (179). Akt izoformlarının hücresel lokalizasyonları da

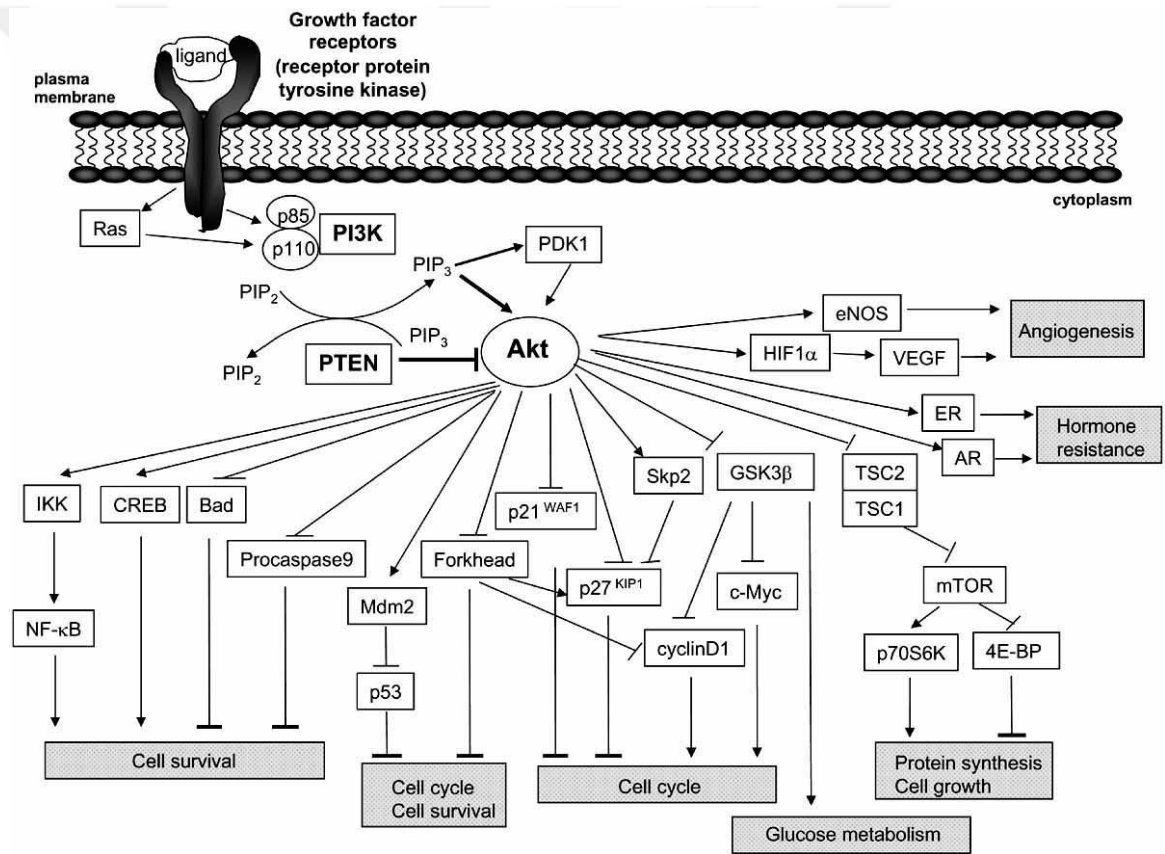
farklılık gösterir. Akt1'in sitoplazmada; Akt2'nin çekirdekte, sitoplazmada ve mitokondride; Akt3'ün ise nükleer zarda yerleşmiş olduğu bilinmektedir (183). Bu izoformların farklı fizyolojik fonksiyonlara sahip olduğunu doğrulamak için Akt1, Akt2 veya Akt3 knockout farelerde araştırmalar yapılmıştır ve bu çalışmalarda Akt1'in hücre yaşamı için gerekli olduğu, Akt2'nin glukoz homeostazında, Akt3'ün ise beyin gelişiminde rol oynadığı bildirilmiştir (184,185). Her ne kadar Akt izoformları tümör durumunda anormal şekilde eksprese edilse de, bu izoformlar tümöre spesifik ekspresyon sergilerler. Akt1 amplifikasyonu; mide kanseri hücrelerinde (186), Akt2; meme, yumurtalık ve kolon kanserlerinde (187-189), Akt3 ise meme ve prostat kanserlerinde amplifikasyona uğrar (190,191).

3.10.3.1. Akt ve Kolon Kanseri

Tirozin fosforilasyonu, O-N-Asetilglukozaminasyon, lizin modifikasyonları ve asetilasyon dâhil olmak üzere Akt'nin posttranslasyonel modifikasyonunun, normal PI3K ve PTEN aktivitesinin varlığında bile kanserlerde Akt hiperaktivasyonuna yol açtığı düşünülmektedir (192,193). Bununla birlikte, Akt'nin anormal aktivite göstermesine yol açan birçok mekanizma mevcuttur. Örneğin, PI3K'da mutasyonların veya amplifikasyonların aktivasyonu, PTEN kaybı, büyüme faktörü, sitokin reseptörleri ve Ras gibi hücre içi onkogen mutasyonların aktivasyonu kanserde sık görülen bulgulardır ve üç Akt izoformunun birinin, ikisinin veya hepsinin ekspresyonu ve aktivitesinde artış ile sonuçlanır (194).

Aktif Akt, KRK metastazına aracılık eden Bcl-2 ve fokal adhezyon kinaz (FAK) proteinlerinin ekspresyonunu düzenler. Strese cevap olarak, Akt1 doğrudan FAK'a

bağlanır, böylece onu üç serin kalıntısından (Ser 517, 601, 695) fosforile eder. Sırasıyla 3 serin kalıntısının fosforilasyonu, tirozin kalıntısını (Tyr397) fosforile ederek onu aktive eder. Bu da integrinlerin matrikse bağlanmasını artırarak hücre adhezyonunu indükler ve metastazın artmasına yol açar (179). İnsan kanserlerinde yer alan Akt yolunun ana fonksiyonları Şekil 14’te özetlenmiştir.



Şekil 14. İnsan kanserlerinde yer alan Akt yolunun şematik gösterimi. Akt sinyal yolunun aktivasyonu, reseptör tirozin kinaz aktivasyonu yoluyla PI3K aktivasyonu ve PTEN fonksiyonunun kaybı dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalardan kaynaklanır (195).

3.11.ELISA Yöntemiyle Değerlendirdiğimiz Seçili Prametreler

3.11.1.Karsinoembriyonik Antijen (CEA) ve Kolon Kanseri

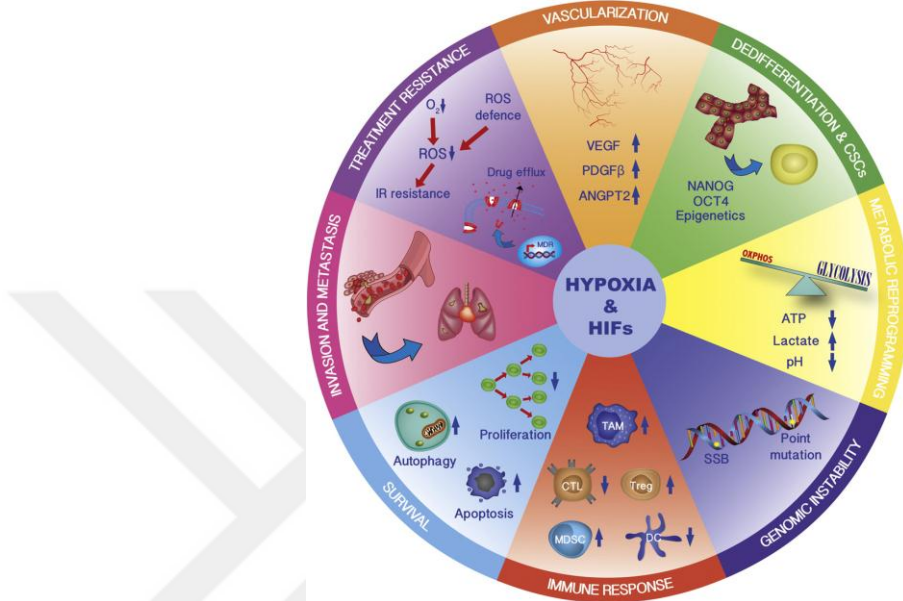
Karsinoembriyonik Antijen (CEA), sindirim sisteminde endoderm kaynaklı epitelyal tümör hücreleri tarafından üretilen yüksek molekül ağırlığına sahip onkofetal bir antijendir (196). Yapılan çalışmalarda, serum CEA düzeylerinin, kolon, mide ve akciğer kanserinde, benign koşullardaki düzeylerine kıyasla çarpıcı bir şekilde arttığı ve konsantrasyonlarının 20 µg/L'nin üzerinde olduğunda kanserojenik durumu gösterdiği bildirilmiştir (197,198). CEA, KRK için tümör nüksünü, metastazı ve hastalık ilerlemesini göstermede sıklıkla kullanılır ancak özgüllüğü sınırlıdır ve yalancı pozitiflik oranları yüksek olduğundan Amerikan Klinik Onkoloji Derneği (ASCO) tarafından KRK taramasında kullanımı önerilmemektedir (199). Bununla birlikte, kolorektal karsinomlarla ilişkili CEA'nın aşırı ekspresyonu, CEA'nın KRK için mükemmel ve kullanışlı bir marker olmaya devam etmesine olanak tanımaktadır. Serum CEA konsantrasyonlarıyla kolorektal tümör evresi, derecesi ve tümörün yeri pozitif korelasyon gösterir. Serum CEA düzeylerinin tayin edilmesinin diğer bir faydası ise KRK hastalarında prognozun değerlendirilebilmesine yardımcı olmasıdır (200). Bununla birlikte hastaların tedaviye verdiği yanıtın izlenmesi ve kanserin erken rekürrensini saptanmasında da kullanılmaktadır. Cerrahi operasyon sonrası 6 hafta içinde normal sınırlara dönen CEA düzeyi prognoz açısından önem taşımaktadır. Postoperatif kolorektal kanserli hastalarda CEA düzeylerinin 6 hafta sonra normal sınırlara dönmesi beklenir ancak cerrahi sonrası artmış CEA düzeyi tümör rekürrensini veya metastaz varlığını düşündürmektedir. CEA ölçümlerinin en yararlı klinik uygulaması ameliyattan

sonra rekürrenslerin erken tanısıdır. Ancak serum CEA düzeylerinin birçok farklı durumdan etkilenecek artabileceği göz önünde bulundurulduğunda, sonuçların klinik ve diğer laboratuvar ölçümlerinin ışığında değerlendirilmesi gerekmektedir (201). Dolayısıyla kolorektal kanser tanısı, izlenmesi ve prognozu için CEA ile birlikte Kanser Antijen 19-9 (CA19-9), doku polipeptidine özgü antijen (TPS) ve Tümör-ilişkili glikoprotein-72 (TAG-72) gibi birbirlerini tamamlayıcı olan tümör belirteci panellerinin kullanılmasının daha sağlıklı olacağı düşünülmektedir (202).

3.11.2. Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1 α)

Memeli hücrelerinin aerobik metabolizmalarını gerçekleştirebilmeleri ve enerji ihtiyaçlarını giderebilmeleri için oksijen (O₂) hemostazlarını sürdürmeleri gerekmektedir. Kanserde, kalp veya kronik obstrüktif akciğer hastalıkları gibi hastalıklarda hücresel oksijen dengesi bozulur ve hücreler hipoksik hale gelir. Hipoksi, tümör hücrelerinin hızlı bir şekilde çoğaldığı ve büyük katı tümör kitleleri oluşturduğu birçok kanser türünde gözlenen oldukça yaygın bir durumdur ve bu tümör kitlelerini çevreleyen kan damarlarının tıkanmasına ve sıkışmasına neden olur. Hipoksi yüzünden normal yapısı bozulan kan damarları genellikle işlevlerini tam olarak yerine getiremezler ve tümör bölgelerine yeterince oksijen sağlayamazlar (203). Bu hipoksik bölgedeki tümör hücreleri, birkaç hayatta kalma yolunu aktive ederek düşük oksijen koşullarına adapte olmaya çalışırlar. Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HIF)-1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu, bu zorlu mikro ortamda hipoksik hücreler tarafından benimsenen en tanınmış yoldur (204,205). Bununla birlikte hipoksinin ilaç direnci, anjiyogenez, invazivlik, metastaz, hücre ölümü direnci, metabolizma değişikliği ve

genom instabilitesi üzerinde etkileri vardır ve yine tüm bu etkileri HIF proteinleri tarafından regüle edilir (206). (Şekil 15).



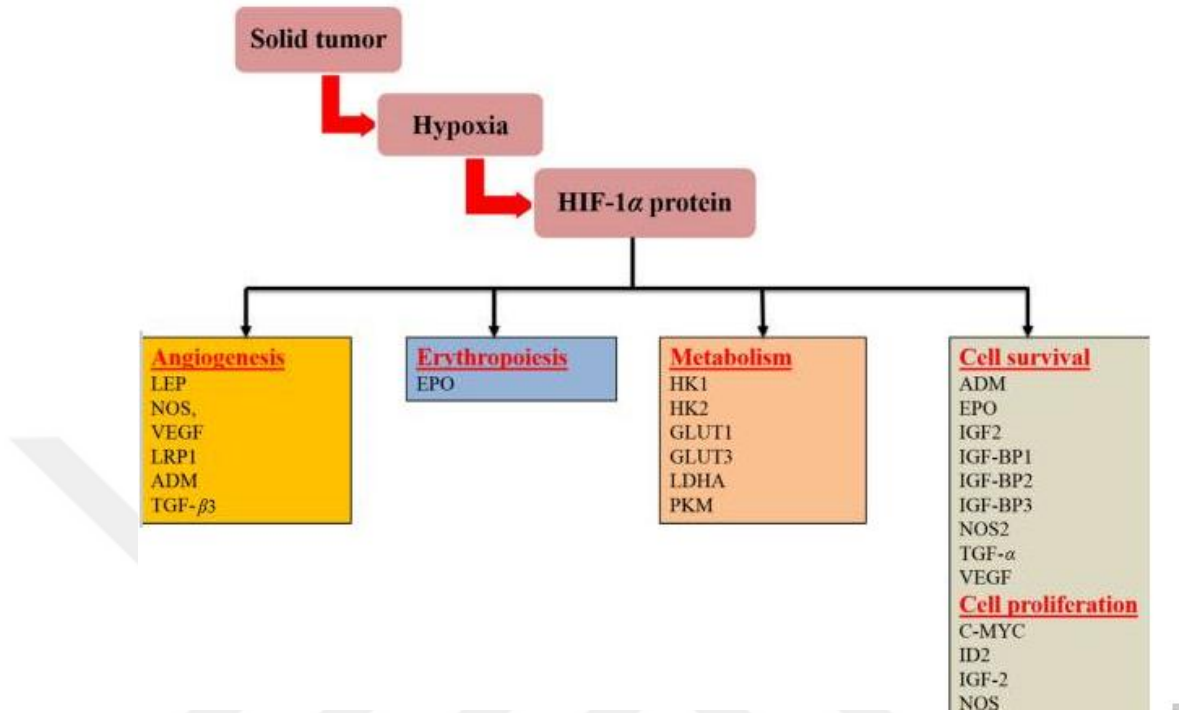
Şekil 15. Hipoksi ve HIF'lerin etkileri. Kısaltmalar: VEGF, vasküler endotel büyüme faktörü; PDGF-P, trombosit kaynaklı büyüme faktörü-P; ANGPT2, anjiyopoietin 2; oksfos, oksidatif fosforilasyon; SSB, tek telli kopma; TAM, tümörle ilişkili makrofaj; CTL, sitotoksik T-lenfosit; Treg, düzenleyici T hücresi; MDSC, miyeloid türevli baskılayıcı hücre; DC, dendritik hücre; MDR, çoklu ilaç direnci; ROS, reaktif oksijen türleri; IR, iyonlaştırıcı radyasyon (207).

HIF'ların başlıca HIF-1, HIF-2 and HIF-3 olmak üzere 3 izoformu bulunmaktadır. HIF-1, tümör dokusunun büyümesi esnasında ortaya çıkan ve oksijen ihtiyacının karşılanmasını sağlayan heterodimerik yapıya sahip bir transkripsiyon faktörüdür ve HIF-1 α ve HIF-1 β olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. HIF-1 α , oksijen regülasyonunu sağlayan subunit olup, HIF-1 aktivitesini belirler ve HIF ailesinin en çok çalışılan izoformu ve prototipidir. Buna karşılık HIF-1 β oksijen konsantrasyonundan etkilenmez ve selüler hipoksiden bağımsız olarak ortama salınır

(208). HIF-1 α genetik değişiklikler sonucunda oksijenden bağımsız bir şekilde aktive olarak tümör progresyonuna ve de profilerasyonuna katkıda bulunabilmektedir (209). HIF-1 α aşırı ekspresyonunun anjiogenez artışına, tümör büyümesine ve metastaz gelişmesine, bununla birlikte kemoterapi ve radyoterapi direncine yol açabileceği düşünülmektedir. Başta böbrek ve kolorektal kanser olmak üzere birçok kanser türünde aşırı eksprese olan HIF-1 α kötü prognostik faktör olarak saptanmıştır (210,211).

3.11.2.1. HIF-1 α ve Kanser

Aktif HIF-1 α , 100'den fazla genin transkripsiyonunu aktive ederek tümör hücrelerinin oksijendeki değişimlere karşı adapte olmasına yardımcı olur ve tümörün hayatta kalması ve progresyonu için gerekli hayati biyolojik süreçleri düzenler (203). Hipoksi ve değişen glukoz metabolizmasına selüler adaptasyon kanser biyolojisinin temelini oluşturmaktadır. Kanser metabolizması belirgin şekilde HIF-1 α tarafından indüklenir ve HIF aktivasyonu proliferasyon, hipoksi ve anjiyogenez, oksijen desteğinin sürdürülmesine göre dizayn edilmiş fizyolojik yollarla ilişkilidir (203) (Şekil 16).



Şekil 16. HIF-1 α düzenleyici genler ve kanser progresyonu üzerine etkileri. LEP, leptin; NOS, nitrikoksit sentaz; VEGF, vasküler endotel büyüme faktörü; LRP1, LDL reseptörüyle ilgili protein1; ADM, adrenomedullin; TGF- β 3, büyüme faktörü- β 3'ü dönüştüren; EPO, eritropoietin; Hk1, hexokinase1; HK2, heksokinaz2; GLUT1, glukoz taşıyıcı 1; GLUT3, glukoz taşıyıcı 3; LDHA, laktat dehidrojenaz; PKM, piruvat kinaz M; IGF2, insülin benzeri büyüme faktörü 2; IGF-BP2, IGF faktörü bağlayıcı protein 2; IGF-BP3, IGF faktörü bağlayıcı protein 3; TGF- α , transforme büyüme faktörü α ; C-MYC, miyelo sitomatoz virüsü onkojen hücrel homolog; ID2, DNA bağlayıcı protein inhibitörü (208).

Örneğin, hızla büyüyen bir tümör dokusunda, HIF-1 α , hipoksik tümör hücrelerinin enerji ihtiyacını karşılamak için glukozu, getirisi daha fazla olan oksidatif fosforilasyon yerine aerobik glikolizis ile metabolize etmektedir (Warburg Etkisi) (212). Bu nedenle, hipoksik hücreler enerji ihtiyaçlarını karşılamak için daha fazla glukoz tüketme eğilimi gösterirler. HIF-1, bu metabolik dönüşüme, glikoliz yolunda yer alan enzimleri indükleyerek ve tümör hücrelerine glukoz alımını artıran glukoz taşıyıcılarının

(GLUT) ekspresyonunu artırarak katkı sağlar (205). Başka bir örnek verilecek olursa HIF-1 α tümör hücrelerinin büyümeleri ve gerekli oksijen temini için yeni kan damarlarının oluşmasını sağlayan VEGF gibi bazı pro-anjiyogenik faktörlerin transkripsiyonunu da indükler (213). Bununla birlikte, HIF-1 α , Transforming Growth Factor- β_3 (TGF- β_3), epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi onkojenik büyüme faktörlerinin transkripsiyonel aktivasyonu ile tümör metastazını teşvik eder (214,215). Tümörün oluşturduğu kronik ve intermitan hipoksi, reaktif oksijen türevlerinin üretilmesine ve HIF-1 α 'nın aktive olmasına neden olur. Bu durum da kalıcı oksidatif stresin oluşumuna ve dolayısıyla HIF-1 α 'nın devamlı olarak uyarılmasına yol açar (216). Çok sayıda yapılan çalışmada, kolon, meme, akciğer gibi sık görülen tümörlerde HIF-1 α ekspresyonunun arttığı ve tümör progresyonu ve kötü prognozla pozitif ilişkili olduğu bildirilmiştir (217-219). Elde edilen çalışma bulgularından HIF-1 α protein düzeylerinin çeşitli kanser türlerinde ve ilişkili yolaklarda, yeni tedavi protokolleri planlanırken bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

3.11.3. Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) ve Kanser

Bir tümörün büyüme hızı, proliferatif aktiviteye ve tümör hücresinin ölüm hızına bağlıdır ve Proliferatif hücre nükleer antijen (PCNA) ve Ki-67 proteinleri, tümör hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan önemli parametrelerdir (216). PCNA, ökaryotik hücrelerde DNA replikasyonu ve hücre proliferasyonunda yer alan 36 kD'luk bir çekirdek proteindir (220). Fonksiyonel olarak iki farklı formu vardır ki bunlardan biri, DNA onarımı ile ilişkilidir ve ekspresyonu tüm hücre döngüsü boyunca sabit kalır. PCNA'nın bu süreçteki rolü, temel işlevi DNA onarımı olan DNA polimeraz epsilon ile

olan etkileşimleriyle ilişkilidir. Diğer formunun replikasyon enzimi olan DNA polimeraz δ 'ya kofaktör olarak görev yaptığı bildirilmiştir (221). PCNA, hücre döngüsünün G1 fazında birikmeye başlar, S fazında maksimum ekspresyona ulaşır ve ardından yavaş yavaş mitozun sonuna doğru kaybolur (222). Bununla birlikte, DNA replikasyonuna ek olarak, kromatin yeniden düzenlenmesi, DNA tamiri, kardeş kromatin kohezyonu ve hücre siklusunun kontrolü gibi proseslerde görev aldığı bildirilmiştir (223, 224).

PCNA ekspresyonu çoğalan hücrelerde ortaya çıktığından, PCNA düzeyleri hücre döngüsü kinetiğinin ve çoğalma aktivitesinin bir işareti olarak ölçülebilir. PCNA seviyesi ile tümör malignitesi, vasküler infiltrasyon, uzak metastaz ve sağkalım derecesi arasında anlamlı bir korelasyon olduğu belirtilmiştir (221). PCNA ekspresyonu, hücre proliferatif aktivitesini yansıttığından ve proliferasyon, kolorektal karsinom da dahil olmak üzere, neoplazma oluşumuyla ilişkili olduğundan, bu antijen, kolorektal karsinom riskinin bir biyobelirteci olarak tanımlanmıştır (221).

3.11.4. Ki-67 ve Kanser

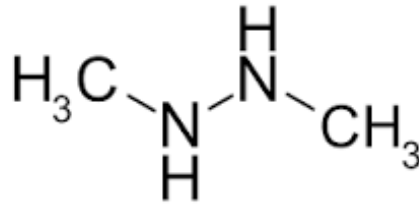
MKI67 geni tarafından kodlanan ve bir hücre çekirdek proteini olan Ki-67, hücre proliferasyonunu gösteren güvenilir bir belirteçtir (225). Ki-67; 345 ve 395 kilo dalton ağırlığında iki molekülden oluşur ve 10. kromozom üzerinde lokalize olmuştur (226). Ki-67 hücre döngüsünün tüm aktif evrelerinde (G1, S, G2 ve mitoz) eksprese edilirken, istirahat halindeki G0 evresinde eksprese edilmeyişi onu incelenen hücre popülasyonunun büyüme fraksiyonunu belirlemede ideal bir belirteç haline getirmiştir (225). Gerdes ve ark. tonsillerdeki germinal merkez hücrelerinin, epitelin bazal hücrelerinin ve testislerin farklılaşmamış spermatogonialarının tümünün Ki-67 ile

boyanmasının pozitif olması; karaciğer, böbrek ve beyin hücrelerinin Ki-67 boyanmasının negatif bulunması, bununla birlikte fitohemaglutinin ile çoğalması için stimule edilen periferik kandaki lenfositlerin pozitif boyanırken, forbol esterleri tarafından makrofaj hücrelerine farklılaşması indüklenen HL-60 hücrelerinde boyanmanın görülmemesi bu proteinin hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğu görüşünü desteklemektedir (227). İmmünohistokimya ile Ki-67 için pozitif nükleer boyanma gösteren hücre yüzdesi, proliferasyon indeksini gösterir. Malign tümörlerde bu oran yüksek olup meme, kolon, akciğer, özofagus, böbrek ve prostat kanseri, malign melanom, nonhodgkin lenfoma, glial tümörler gibi birçok tümör tipinde yüksek Ki-67 oranının kötü prognostik faktör ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (228). Ki-67 kolorektal adenom ve karsinomlarında proliferasyon aktivitesini belirlemede önemli bir antijendir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda adenokarsinomların Ki-67 indeksi adenomlardan, az diferansiye adenokarsinomların Ki-67 indeksi, iyi diferansiye adenokarsinom ve orta derecede diferansiye adenokarsinoma göre yüksek bulunmuştur (229). Özellikle tanı konma güçlüğü yaşanan adenomatoid kolon lezyonlarında Ki-67 indeksi oldukça yararlıdır. Ancak Ki-67 indeksinin yüksek bulunması her zaman karsinom tanısını desteklemez, dolayısı ile klinik parametreler ve invazyon varlığıyla korele edilerek tanıya gidilmelidir (230).

3.12. Kimyasal Karsinojenlerle Deneysel Kanser Modeli Oluşturma

3.12.1. Dimetilhidrazin (DMH) ve Karsinogenezdeki Rolü

1,2-dimetilhidrazin (DMH), $\text{CH}_3\text{NHNHCH}_3$ kimyasal yapısında bir metil hidrazin türevi olup, deneysel kolon kanseri oluşturmada ve özellikle de distal kolon tümör oluşumunu indüklemekte kullanılan toksik bir prokarsinogen'dir (231). şekil (17).



şekil 17. DMH'in yapısı (232).

Yapılan hayvan çalışmalarında, DMH'nin neden olduğu deneysel kolonik tümörlerin histoloji, morfoloji, insan kolon mukozasının anatomisi, mikroskopik patoloji ve immünobiyoloji açısından insan kolon karsinomuna çok benzer olduğu bildirilmiştir (233,234). Deneysel karsinogenezis oluşum mekanizması şu şekilde açıklanmaktadır; subkutan bölgedeki hücreler, DMH ile reaksiyona girebilen enzimlere sahip değıldir. Bu nedenle, deri altından enjekte edilen DMH, dolaşım yoluyla karaciğere ulaşır ve azoksimetan (AOM) ve metilasiloksimetanol (MAM) gibi çeşitli ara maddelere metabolize olur (235). Daha sonra, MAM, nihai karsinojenik metaboliti olan elektrofilik metildiazonyum iyonunu üretmek üzere safra veya kan yoluyla kolona taşınır ve bu da kolon karsinogenezini tetikleyen nükleik asitlerin metilasyonundan sorumlu olan karbon iyonunu üretir ve karsinogenezis başlatılmış olur (234). Deneysel kolon kanseri

oluşturmada kullanılan diğer karsinojenler ise azoksi metan, N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidin ve N-metil-N-nitros üre' dir, ancak DMH ve AOM daha ucuz, daha güçlü ve kullanıma daha uygun olduğundan çalışmalarda nitrozaminler veya heterosiklik aminlere göre daha sıklıkla tercih edilirler (236).

DMH ile indüklenen karsinogenez, morfoloji, hücre büyüme paterni ve klinik bulgular bakımından sporadik insan kolon kanserine benzediğinden, en çok kullanılan kolorektal kanser modellerinden biridir. Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkan, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında olan kompleks bir hastalıktır. Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte günümüzde var olan tedavilere ek olarak yeni tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Standart olarak kabul edilen kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlere ek olarak aşılar, biyolojik, hormonal tedaviler ve gen terapileri giderek artan sayıda kullanılmaya başlanmıştır. Kanser tedavisinin yanı sıra, kansere neden olan etmenlerin bulunması, kanserin oluşmadan engellenmesi, kanseri son derece kompleks ve büyük bir problem haline getirmektedir. Dolayısı ile bu çalışma “Kolorektal kanserden korunmada seçili kemopreventiflerin aktif bir rolü var mı?” sorusuna bir yanıt aramak için tasarlanmıştır. Çalışma kapsamında Wistar Albino sıçanlarda DMH ile deneysel olarak oluşturulmuş kolon kanser modelinde, Diklofenak ve Selekoksib'in ayrı ayrı ve de birlikte uygulanmalarının kolon hasarı üzerindeki koruyucu etkilerini ve PTEN/PI3K/Akt sinyal ileti yolağını etkileyip etkilemediğini biyokimyasal olarak araştırmak hedeflenmiştir.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Gereç

4.1.1. Deney Hayvanları ve Deney Grupları

Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) tarafından barındırılıp, üretilen *Sprague Dawley* türü sıçanlar kullanılmıştır. Çalışmanın etik kurul onayı Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Toplantı Sayısı 2018/06, Karar No: 76, Protokol No: 2018/49).

Çalışma gruplarındaki tüm sıçanlar 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsüne uygun olacak şekilde sabit ısı (22-24 °C) otomatik olarak klimatize edilen odalarda 3'erli ve 5'erli gruplar halinde, hayvanlar için hazırlanmış kenarları sert plastik ve üstünde çelik ızgara bulunan, deney grubuna göre etiketlenmiş ve tabanı talaş ile döşenen kafeslerde barındırıldılar. Hayvanlar Elazığ yem fabrikasından temin edilen standart 8mm'lik pellet cinsi yem ve musluk suyu ile *ad libitum* olarak serbest beslenmeye tabi tutuldular. Sıçanların beslenmesinde kullanılan yemin bileşimi Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Standart rat yemi

Yem Bileşimi	Yüzde Oranları
Ham protein	% 24
Ham selüloz	% 7
Ham kül	% 8
HCl’de çözünmeyen kül	% 2
NaCl	% 1
Mineral Karması *	% 1.25
Vitamin Karması **	% 1.25
Su	% 12
Metabolik enerji	2650 kcal

* Mineral Karması: Kalsiyum (% 1.0-2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (%0.5-0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg).

** Vitamin Karması: Vitamin A (300 IU/kg), Vit. D3 (1000 IU/kg), Vit. E (60 mg/kg), Vit. B2 (4 mg/kg).

Çalışmaya 8-10 haftalık *Sprague Dawley* cinsi 48 adet erkek sıçan dâhil edildi ancak kemopreventif gruplardan ikişer adet sıçan öldüğünden çalışma toplam 44 sıçanla sürdürüldü. Çalışma grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur ve şekil 16’da şematize edilmiştir.

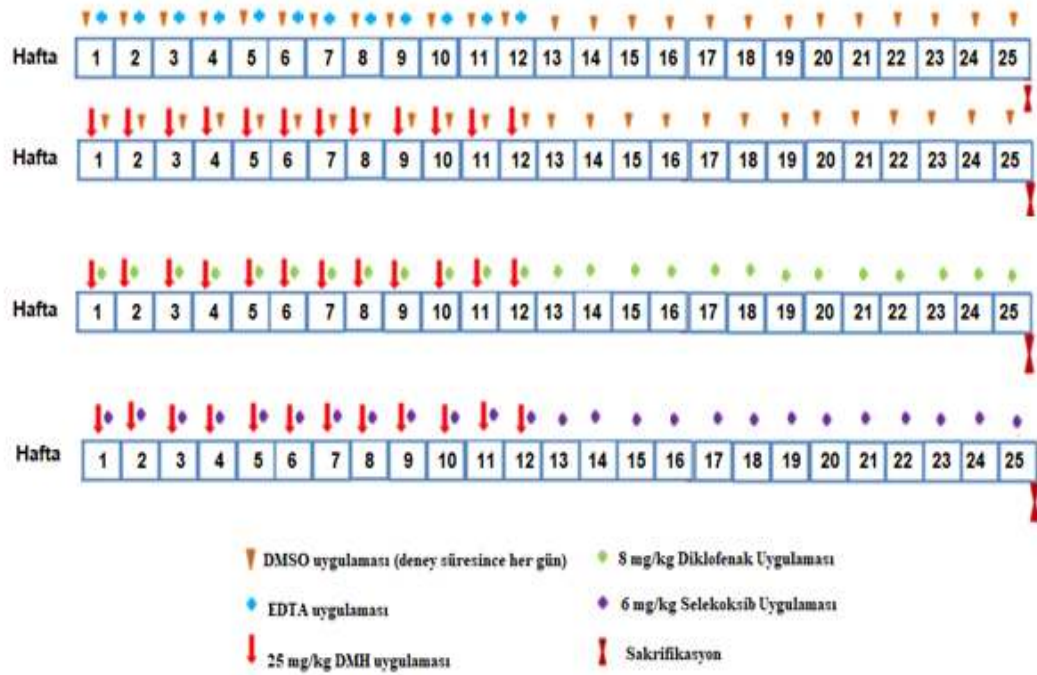
Kontrol Grubu (n=8): 1 mM EDTA-salin, subkutan (s.c) olarak haftada bir kez 12 hafta boyunca enjekte edildi. Bununla birlikte, 1 ml Dimetil sülfoksit (DMSO) deney süresi boyunca (25 hafta) günlük olarak oral gavaj yöntemiyle uygulandı.

DMH Grubu (n=16): 25 mg/kg dozundaki DMH 1 mM EDTA-salin içinde çözündürülerek haftada 1 kez olmak üzere s.c yolla 12 hafta boyunca, yine 1 ml DMSO deney süresince günlük olarak oral gavaj yöntemiyle uygulandı.

DMH+Diklofenak Grubu (n=12): 25 mg/kg dozundaki DMH, 1 mM EDTA-salin içinde çözündürülerek haftada 1 kez s.c yolla 12 hafta boyunca enjekte edildi. DMH ile eş zamanlı olarak 8 mg/kg dozundaki Diklofenak, DMSO’da çözündürülerek 25 haftalık deney süresi boyunca her gün oral gavaj yöntemiyle uygulandı.

DMH+Selekoksis Grubu (n=12): 25 mg/kg dozundaki DMH, 1 mM EDTA-salin içinde çözündürülerek haftada 1 kez s.c yolla 12 hafta boyunca enjekte edildi. DMH ile eş zamanlı olarak 6 mg/kg dozundaki Selekoksis, DMSO içinde çözülerek 25 haftalık deney süreci boyunca her gün oral gavaj yoluyla uygulandı.

Tüm enjeksiyonlar sıçanların bel omurları seviyesinde sırt bölgesinden rotasyon şeklinde uygulandı ve DMH uygulamaları esnasında hayvanları irrite etmemek ve enfeksiyon gelişimini önlemek adına her hayvan için ayrı bir insülin enjektörü kullanıldı. Son DMH enjeksiyonunu takiben 13 hafta tümoral dönüşüm için beklenen latent dönem olarak belirlendi ve bu sürenin sonunda 25. haftanın bitiminde deney hayvanları sakrifiye edildi.



Şekil 18. Deney Gruplarının Oluşturulması.

Çalışmaya başlamadan önce, çalışma süresince haftada bir kez ve çalışma bitiminde sıçanlar sakrifiye edilmeden önce gruplardaki hayvanların vücut ağırlıkları ölçülüp kayıt altına alındı.

4.1.2. DMH ile İndüklenmiş Kolon Kanseri Protokolünün Oluşturulması

Deneyssel olarak tasarlanmış sıçan kolon kanser çalışmalarında kanserojen ajan olarak azoksimetan veya DMH gibi karsinojenlerin farklı dozajlarda, farklı uygulama süresi ve sıklığında kullanıldığı bildirilmiştir (237,238). Örneğin; DMH'nin sıçanlara oral yoldan verilmesi sonucu düşük tümör insidansı görülürken (%30), intramüsküler (i.m) uygulamalarda %80, s.c uygulamalarda ise %100 oranında tümör geliştiği gözlenmiştir (239). Zhang ve arkadaşları sıçan kolon kanser modeli oluşturmak için 30 mg/kg dozajındaki DMH'ı 10 hafta boyunca s.c. olarak uyguladıklarını bildirmişlerdir (240). Yine yapılan başka bir araştırmada 20 mg/kg dozundaki DMH subkutan olarak 4 hafta boyunca haftada bir kez olmak üzere kolon kanseri oluşturmak için kullanılmıştır (238). Tüm bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda DMH ile *in-vivo* kolon kanseri oluşturma protokolü şu şekilde belirlenmiştir; sıçanlara 25 mg/kg DMH 12 hafta boyunca, haftada bir kez subkutan olarak uygulanmıştır.

4.1.3 Kullanılan Kimyasal Ajanlar ve Hazırlanışları

DMH; kolon kanseri indüksiyonu için kullanılan DMH (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) 1 mM EDTA içerisinde çözündürüldü, pH'ı 1 mM NaOH ile 7'ye ayarlandı ve subkutan uygulamadan hemen önce taze olarak hazırlandı (238).

Diklofenak; kemopreventif ajanlarımızdan biri olan Diklofenak (8mg/kg) (Dikloron tablet, Deva Holding A.Ş, Türkiye) 1 mL DMSO içerisinde çözündürülerek kullanıma hazır hale getirildi (241).

Selekoksib; diğer bir kemopreventif ajanımız olan Selekoksib (6 mg/kg) (Santa Cruz Biotechnology, USA) kullanılan NSAİİ'ların dozları bildirilen ED50 (medyan etkin doz) değerine dayanarak terapötik doz aralığında belirlendi ve 1 mL DMSO içerisinde çözündürülerek kullanıma hazır hale getirildi (241).

DMSO; Seçili kemopreventif ajanlar deney süresi boyunca hergün polar özellikli bir çözücü olan DMSO içinde çözüldükten sonra 2:1 (DMSO: su; v:v) oranında distile su ile dilüe edilerek, gavaj uygulamalarından önce günlük taze hazırlanarak kullanıldı. Tüm oral gavaj uygulamaları esnasında hayvanları irrite etmemek ve uygulama kolaylığı sağlamak amacıyla sıçanlarda eter inhalasyonu yoluyla kısa süreli bir sedasyon oluşturuldu.

4.1.4. Hayvan Materyallerinden Numunelerin Alınması, Hazırlanması ve Saklanması

4.1.4.1. Kan Numunelerinin Alınması, Hazırlanması ve Saklanması

25 haftalık deney periyodu sonunda sıçanlar ksilazin-ketamin anestezisi altında, steril aletler kullanılarak sakrifiye edildi, kan ve doku örnekleri alındı. Kan örnekleri analizler için uygun olacak şekilde düz biyokimya tüplerine alınarak 3000 rpm'de 10 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi (Heraeus Biofuge Stratos; Kendo Laboratory Products, Osterode-Germany) ve serumları ayrıldı. Çalışma gününe kadar -80°C'de muhafaza edildi.

4.1.4.2. Doku Numunelerinin Alınması, Hazırlanması ve Saklanması

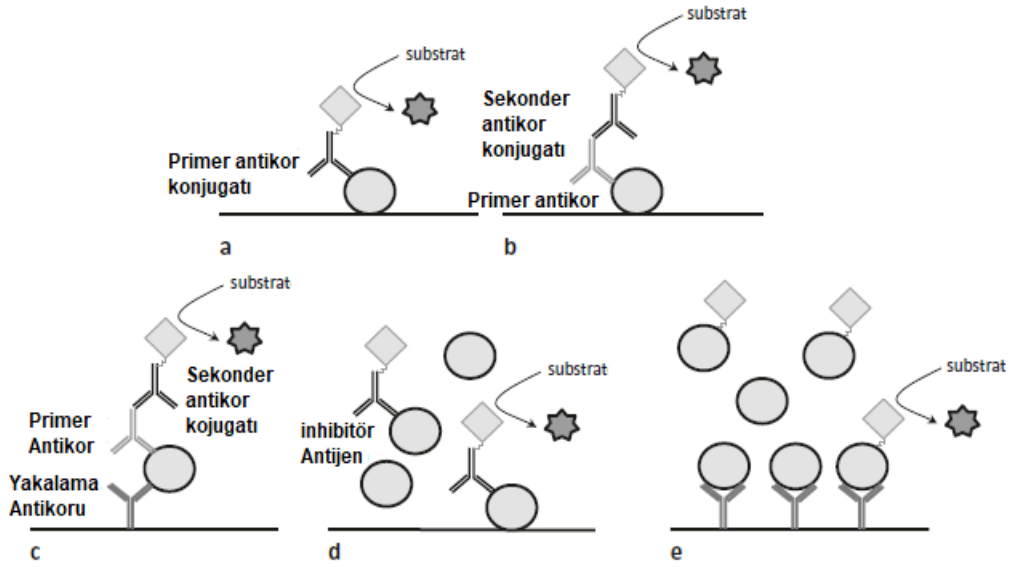
Tümörlü dokuyu kapsayacak şekilde ekzize edilen kolon dokusunun bir kısmı % 0,9'luk soğuk (+4°C) sodyum klorür (NaCl) ile yıkandı ve kurutma kâğıdı ile kurutulduktan sonra dokular porsiyonlar halinde, western blot çalışmaları analizi yapılincaya kadar -80°C'de saklandı. Ayrıca eksize edilen tümörlü kolon dokusunun diğer kısmı da %10'luk formaldehitte tespit edilerek analiz edilmek üzere hazır hale getirildi.

4.2. Yöntemler

4.2.1. Biyokimyasal Yöntemler

4.2.1.1. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Enzime bağlı immünosorbent metodu (ELISA) biyolojik numunelerdeki antikorları, antijenleri, proteinleri ve glikoproteinleri ölçmek için yaygın olarak kullanılan immünolojik bir testtir. ELISA yöntemiyle özgül antikor kullanılarak örnekteki antijen miktarı, özgül antijen kullanarak örnekteki antikorun miktarı tayin edilebilir. En sık kullanılan ELISA türleri Şekil 17'de şematize edilmiştir.



Şekil 19. ELISA çeşitleri. (a) Direkt ELISA, (b) İndirekt ELISA, (c) Sandviç ELISA, (d) Antikorla işaretli kompetitif ELISA, (e) Antijenle işaretli kompetitif ELISA
ELISA'nın temel bileşenleri sıralanacak olursa:

- a) Katı faz (matriks):** Genellikle 48 ya da 96 kuyucuktan oluşan mikropalakalardır.
- b) Antikor:** IgG fraksiyonlarıdır.
- c) Enzim ve substratlar:** En sık kullanılan konjugat işaretleyicileri alkalen fosfat (AP) ve horseradish peroksidaz (HRP) enzimleridir. AP aktivitesinin kolorimetrik tespiti için (5-bromo-4chloro-3-fosfat indolyl/Nitro mavi tetrazolium (BCIP/NBT), HRP aktivitesinin kolorimetrik tespiti için ise tetramethylbenzidine (TMB) kullanılır.
- d) Yıkama:** Antikor-antijen kompleksi dışında oluşan maddelerin ortamdan uzaklaştırılması için fosfatlı tampon solüsyonu (PBS) ile yıkama işlemi yapılır.
- e) Durdurma:** Bu aşamada devam eden reaksiyonu sonlandırmak için asidik veya bazik çözeltiler (H_2SO_4 , HCl, NaOH) kullanılır.

Çalışmamızda kullandığımız tüm ELISA kitleri (HIF-1 α , CEA, PCNA ve KI-67) Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd firmasına ait olup, uygulanan prosedür ana hatlarıyla “Genel Test Prosedürü” başlığı altında verilmiştir. Üretici firma tarafından gönderilen kit içerikleri Tablo 2’de listelenmiştir. Kitlerin kendilerine ait özellikleri ise ayrı başlıklar altında detaylandırılmıştır.

Tablo 2. Üretici firma tarafından gönderilen kit içerikleri

Reaktif	Miktarı	Reaktif	Miktarı
Kaplı Elisa plate	96 testlik	Washing concentrate (30X)	20 mL
Standart Dilüsyonu	3 mL	Biotinle işaretli antikor	1 mL
Kromojen A	6 mL	Stop solüsyonu	6 mL
Kromojen B	6 mL	Plate membranı	2 adet
Streptavidin-HRP	6 mL	Datasheet	1 adet
Standard çözelti	0,5 mL		

ELISA yöntemi için gerekli ancak üretici firma tarafından temin edilmeyen malzemeler ise Tablo 3’te listelenmiştir.

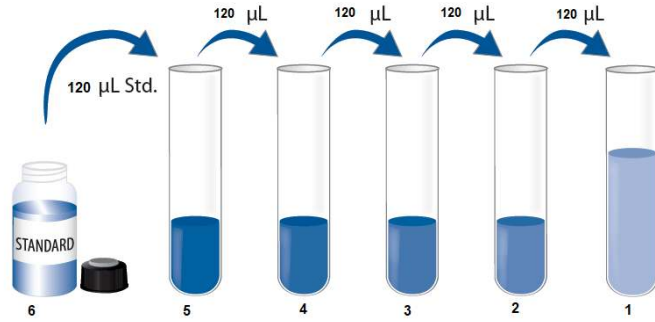
Tablo 3. ELISA’da kullanılan ve üretici firma tarafından temin edilmeyen malzemeler

1) 37 °C $\pm$ 0.5 °C’ye kadar stabil inkübasyon koşulları sağlayabilen bir inkübatör
2) 450 $\pm$ 10nm filtreli mikroparka okuyucu
3) Vortex
4) Hassas pipetler ve tek kullanımlık pipet uçları
5) Kurutma kağıdı
6) Distile su

Genel Test Prosedürü

1) Standartların Çözeltilerinin Hazırlanması: Üretici firma tarafından kullanıma hazır halde gönderilen stok standart çözeltisi seri dilüsyona tabi tutularak standartlar hazırlandı. (Şekil 18).

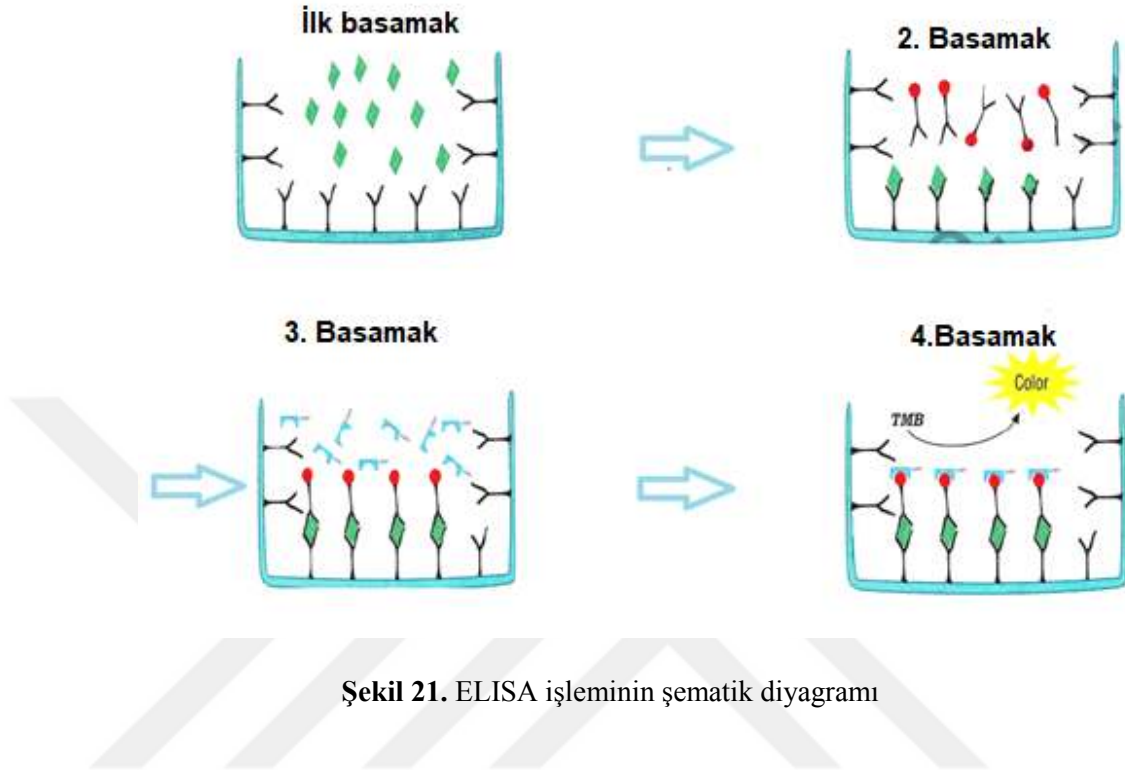
Standard No.5	120µl Original Standard + 120µl Standard diluent
Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard diluent
Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard diluent
Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard diluent
Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard diluent



Şekil 20. Standart Dilüsyonu.

2) Örneklerin ekimi :1) **Kör kuyucuğu:** Bu kuyucuğa sadece Kromojen A ve B çözeltileri ile stop solüsyonu eklendi. 2) **Standart Kuyucukları:** 50µl standart çözeltisi ve 50 µl kullanıma hazır halde gönderilmiş streptavidin-HRP çözeltisi eklendi. 3) **Örnek kuyucukları:** her bir serum örneğinden 40µl eklendi, ardından her bir kite ait kullanıma hazır antikorlardan 10µl ve 50µl streptavidin-HRP çözeltisinden eklendi. Ardından plate'lerin üzeri kapatıldı ve 60 dakika boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.

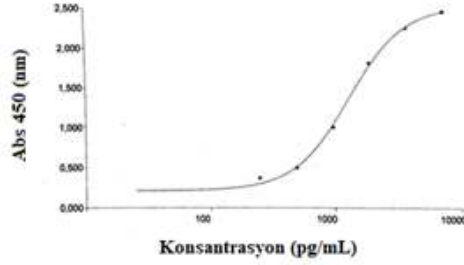
- 3) **Yıkama çözeltisinin hazırlanması:** (30X) Konsantrasyonda gönderilen yıkama çözeltisi kullanıma hazır hale getirilmek için distile suyla seyreltilti.
- 4) **Yıkama İşlemi:** 60 dakikalık inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra yıkama işlemi gerçekleştirilmek üzere Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) marka ELISA yıkayıcısına alındı ve plate her bir kuyucuğa 350 µl yıkama solüsyonundan eklenmek suretiyle 5 kez yıkama işlemine tabi tutuldu.
- 5) **Renk gelişimi:** Her kuyucuğa önce 50µl kromojen A çözeltisi daha sonra 50µl kromojen B çözeltisi eklendi. Karıştırmak için hafifçe çalkalandı. Renk gelişimi için ışıktan uzakta 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi (Şekil 19).
- 6) **Reaksiyonun durdurulması:** Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklendi ve mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlendi.
- 7) **Absorbans ve konsantrasyonların tayini:** Stop solüsyonu eklendikten sonra 10 dakika içerisinde plate'de bulunan standartların ve örneklerin 450 nm dalga boyundaki absorbanları ve bu absorbansa karşılık gelen konsantrasyonları EPOCH 2 (BioTek Instrument, Inc, USA) ELISA plate okuyucusunda okutularak tayin edildi.



Şekil 21. ELISA işleminin şematik diyagramı

4.2.1.2. Serum CEA Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Değerlendirilmesi

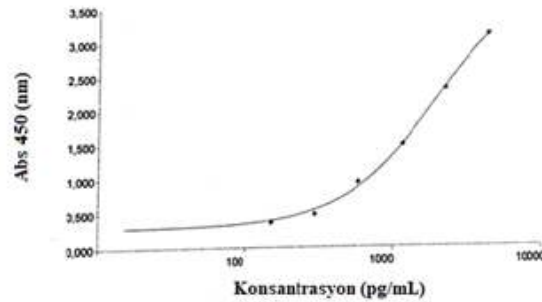
Çalışma gruplarındaki serum CEA düzeyleri laboratuvar çalışmaları için üretilmiş ticari rat CEA Elisa kiti (SunRed, Cat No: SRB-T-80635) kullanılarak tayin edilmiştir. Kit ile gönderilen prosedürde kitin sensitivitesinin 23,871 pg/mL, ölçüm aralığının 25-7200 pg/mL, intra assay'in: CV<%10, inter assay'in: CV<%12 olduğu bildirilmiştir. Plate yıkamaları ELX 50 yıkayıcısı ile, absorbans ve konsantrasyon tayini ise spektrofotometrik olarak 450 nm'de EPOCH 2 (BioTek Instrument, Inc, USA) mikro plate okuyucusu kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan standartların grafiği Şekil 20'de verilmiştir.



Şekil 22: CEA Standart Eğrisi

4.2.1.3. Serum HIF-1 α Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Değerlendirilmesi

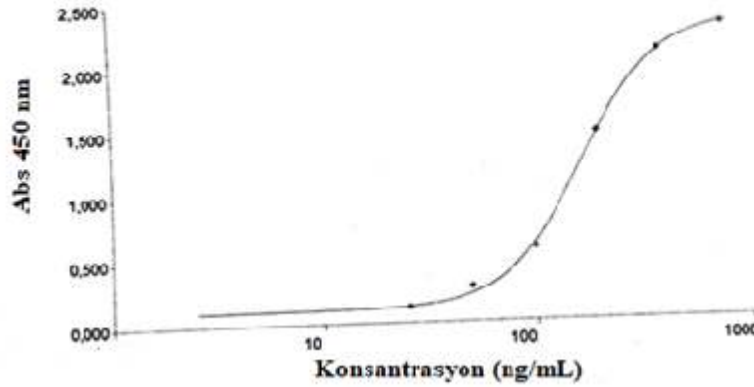
Serum HIF-1 α düzeyleri ticari olarak temin edilen rat HIF-1 α Elisa kiti (SunRed, Cat No: SRB-T-82633) kullanılarak belirlenmiştir. Kitin sensitivitesi 13,778 pg/mL, ölçüm aralığı 15-4200 pg/mL, intra assay'in: CV<%8, inter assay'in: CV<%11 olduğu bildirilmiştir. Plate yıkamaları ELX 50 yıkayıcısı ile, absorbans ve konsantrasyon tayini ise spektrofotometrik olarak 450 nm'de EPOCH 2 (BioTek Instrument, Inc, USA) mikro plate okuyucusu kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan standartların grafiği Şekil 21'de verilmiştir.



Şekil 23: HIF-1 α Standart Eğrisi

4.2.1.4. Serum PCNA Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Değerlendirilmesi

Serum PCNA düzeyleri, ilgili firma yetkilisinden ticari olarak temin edilen rat PCNA Elisa kiti (SunRed, Cat No: 201-11-0399) kullanılarak belirlenmiştir. Kitin sensitivitesi 2,36 ng/mL, ölçüm aralığı 2,5-720 ng/mL, intra assay'in: CV<%10, inter assay'in: CV<%12 olduğu bildirilmiştir. Plate yıkamaları ELX 50 yıkayıcısı ile, absorbans ve konsantrasyon tayini ise spektrofotometrik olarak 450 nm'de EPOCH 2 (BioTek Instrument, Inc, USA) mikro plate okuyucusu kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan standartların grafiği Şekil 22'de verilmiştir.

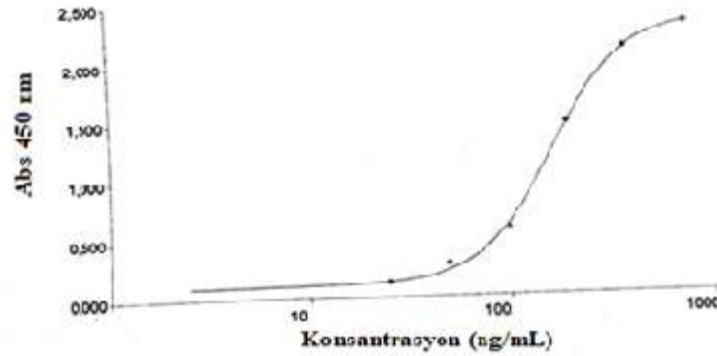


Şekil 24: PCNA Standart Eğrisi

4.2.1.5. Serum Ki-67 Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Değerlendirilmesi

Serum Ki-67 düzeyleri ilgili firma yetkilisinden ticari olarak temin edilen rat Ki-67 Elisa kiti (SunRed, Cat No: SRB-T-80522) kullanılarak belirlenmiştir. Kitin sensitivitesi 0,125 ng/mL, ölçüm aralığı 0,2-36 ng/mL olduğu bildirilmiştir. Plate yıkamaları ELX 50 yıkayıcısı ile, absorbans ve konsantrasyon tayini ise

spektrofotometrik olarak 450 nm’de EPOCH 2 (BioTek Instrument, Inc, USA) mikro plate okuyucusu kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan standartların grafiği Şekil 23’te verilmiştir.



Şekil 25: Ki-67 Standart Eğrisi

4.2.2. Western Blot Analizi

Western Blot; numune içerisinde spesifik bir proteinin analiz edilmesinde yaygın olarak kullanılan moleküler biyoloji yöntemidir. Bu yöntem sayesinde numunede bulunan bir proteinin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonu hakkında analiz edilen protein bandının renk yoğunluğuna ve ölçüsüne göre yarı kantatif yorum yapılabilir. Western blotlama yöntemi genel hatlarıyla 4 temel kısımdan oluşur:

- 1) **Örneklerin Hazırlanması:** *In vitro* veya *in vivo* çalışma yapıldıktan sonra kültür hücreleri veya dokudaki proteinler diğer kısımlardan izole edilmek için parçalanırlar. Daha sonra protein konsantrasyonu uygun bir yöntem yardımıyla tayin edilir. Bu işlem her bir Western jel kuyucuğuna eşit miktarda protein yüklenilmesini sağlar.

- 2) Yürütme ve Transfer:** Bu basamakta proteinler denatüre edilerek jelde düzgün yürütülebilecek hale getirilir ve sonra jel üzerindeki kuyucuklara dikkatle yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutulurlar. Daha sonra proteinler molekül ağırlıklarına göre bantlar halinde ayrıştırılarak (running) bir membran üzerine aktarılırlar (transfer). Bu işlemin temel amacı antikorlarla işaretlenebilecek bir yapı elde etmektir (membran veya blot).
- 3) İlgili Proteinin İşaretlenmesi ve Boyanması:** Bu proses blokaj, birincil antikor, yıkama, ikincil antikor, yıkama ve boyama işlemlerinden oluşur.
- 4) Görüntüleme ve Analiz:** Bu proseste bantlar görülebilir ve analiz edilebilir hale getirilir. Önceki basamakların sorunsuz yapılmış olması bu basamağın da sorunsuz yapılabilmesini sağlar.

Tablo 4. Western Blot Analizinde Kullanılan Cihazlar

Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, USA)

X Cell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System (Invitrogen™, USA)

Elektroforez Güç Kaynağı (Bio-Rad Laboratories, USA)

iBlot® Dry Blotting System (iBlot® Gel Transfer Device and apparatus),
(Invitrogen™, USA)

Shaker (Metabolik inkübatör, Thermo-shaker MBS100-4A, Poland)

Vorteks (VELP SCIENTIFICA, F20220176, Europe)

Scanner (Hewlett Packard Company, Photosmart C3100, California, ABD)

Tablo 5. Western Blot Analizinde Kullanılan Malzemeler

Mouse Monoclonal Anti- β -Aktin primer antikoru Finetest (Cat No:FNab00871)
Mouse Monoclonal Anti-PTEN primer antikoru Finetest (Cat No:FNab06912)
Mouse Monoclonal Anti-PI3K primer antikoru Finetest (Cat No: FNab06422)
Mouse Monoclonal Anti-Akt primer antikoru Finetest (Cat No: FNab00271)
NuPAGE [®] Sample Reducing Agent (10X)
NuPAGE [®] LDS Sample Buffer (4X)
NuPAGE [®] Novex 4-12% Bis-Tris Jel 1mm X 10 kuyucuklu (Invitrogen [™] , USA)
NuPAGE [®] MES BIS-TRIS Running Buffer Kit COMBO (20 X) (Invitrogen [™] , USA)
NuPAGE [®] Antioxidant (Invitrogen [™] , USA)
NuPAGE [®] Novex 4-12% Bis-Tris Jel 1mm X 10 kuyucuklu (Invitrogen [™] , USA)
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen [™] , USA)
iBlot [®] Transfer Stacks, PVDF membran, regular-size 10 Blots (Invitrogen [™] , USA)
WesternBreeze [®] Chromogenic Detection Kit–Anti-Mouse (WB7103, Invitrogen [™] , USA)

4.2.2.1. Western Blot Analizinin Uygulama Aşamaları

4.2.2.1.1. Western Blot Analizi için Doku Numunelerinin Homojenizasyonu

-80 °C’de derin dondurucuda saklanan kolon dokuları oda ısısına geldikten sonra 100 mg olacak şekilde hassas terazide (SARTORİUS GMBH, Germany) tartıldı. Bu dokular RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz[®] Biotechnology, Inc. USA) çözeltisi (1;9,w;v), içerisinde homojenizatör (Ultra TurraxType T25-B, IKA Labortechnik,

Germany) kullanılarak 16.000 rpm’de 3 dk boyunca homojenizasyon işlemine tabi tutuldular. Homojenizasyon işlemi boyunca buz kalıpları kullanılarak soğuk ortam sağlandı. Elde edilen süpernatantlar hem total protein tayini hem de western blot analizleri için kullanılmak üzere ayrı ayrı etiketlendirilmiş eppendorf tüplere aktarıldılar.

4.2.2.1.2. Doku Numunelerinde Protein Miktarı Tayini

Hazırlanan doku homejenizatlarından elde edilen süpernatant örneklerinde protein yoğunluğunun ölçülmesinde Qubit protein ölçüm kiti (Qubit Protein Assay Kit, Invitrogen, USA) ile Qubit Fluorometer cihazı (Invitrogen, USA) kullanıldı. Yapılan tüm işlemler kit prosedürüne bağlı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçların birimi mg/mL olarak kaydedildi.

4.2.2.1.3. Jele Yüklenecek Olan Protein Numunelerinin Hazırlanması

10 kuyucuklu %4-12 Bis-Tris gradyen jellere yükleme işlemi yapılmadan önce, kuyucuklara eşit miktarda protein yükleme yapılabilmesi için örneklerden alınması gereken hacimler Tablo 6’daki örnekte belirtildiği şekilde hesaplandı. Daha sonra her bir kuyucuğa örnek, NuPAGE Sample Reducing Agent (10X), NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) ve distile sudan oluşan 20 µL’lik karışım yüklendi. Western blot işleminin bu aşamasında kullanılan kitteki tespit yöntemi kromojenik olduğu için jele yüklenmesi gereken protein miktarı 30 µg olarak belirlenmiştir. Kit içeriğinde bulunan LDS sample buffer ve sample reducing agent’ların volümleri sabit ve toplamda 7 µL’dir. Total hacmin 20 µL’ye tamamlanması için distile su kullanıldı. 200 µL’lik eppendorf tüplerde hazırlanmış olan bu karışım 10 dk, 70 °C’de Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, USA) cihazında denatüre edildikten sonra -20 °C’de 3-5 dk bekletildi.

Tablo 6. Doku Süpernatantlarından Jele Yüklenecek Olan Protein Karışımının Hazırlanmasını Gösteren Örnek Hesaplama

Tayin Edilen Protein düzeyleri (mg/mL)	Jele yüklenecek örnek miktarları (µL)	LDS Sample Buffer (4X) (µL)	Sample Reducing Agent (10X) (µL)	Distile su (µL)
3,23	9,3	5	2	3,7

4.2.2.1.4. Protein Karışımlarının Dikey SDS-PAGE’e Yüklmesi ve Yürütülmesi

Western blot’ın bu aşamasında yükleme jeli olarak % 4-12 Bis-Tris Protein jel kasetleri (Invitrogen, Novex) kullanıldı. Jel kasetinin en alt kısmında yer alan beyaz bant çıkarıldıktan sonra jelin üst tarafında gömülü olan tarak dikkatlice alındı. Daha sonra jel kaseti dikey elektroforez tankı içine yerleştirilerek sabitlendi, daha sonra yürütme solüsyonu olarak MES SDS Running Buffer 20X’ten (NuPAGE® MES BIS-TRIS Running Buffer Kit COMBO, Invitrogen™, USA) elde edilmiş 1x MES SDS Running Buffer eklenildi. Yürütme esnasında proteinlerin indirgenmiş halde kalmalarını sağlamak amacı ile 500 µL antioxidant (NuPAGE® Invitrogen™, USA) jel kasetlerinin orta kısma denk gelecek şekilde eklendi. Jelli kasetin ilk kuyucuğuna proteinlerin büyüklüklerini tahmin etmek amacıyla içinde bilinen büyüklüklerde çeşitli proteinler bulunan markerden (SeeBlue Plus2 Pre-stained Standart, Invitrogen™, USA) 5 µL ekildi, kalan diğer kuyucuklara ise protein örnekleri yüklendikten hemen sonra tank sisteminin üzeri kapatıldı ve tank sistemi güç sistemine (Bio-Rad Laboratories, USA) bağlandı. Güç kaynağı 200 V sabit akım olacak şekilde 35 dakikaya ayarlanıp elektroforez

başlatıldı. Standart takip edilerek istenilen yol geçildikten elektroforez işlemine son verildi. Jel kasetler steril jel bıçağı yardımı ile bağlantı noktalarından jele zarar vermemeye dikkat edilerek ayrıldı. Son olarak distile su bulunan temiz bir kap içerisinde jeli kasetten ayırma işlemi gerçekleştirildi.

4.2.2.1.5. Blotlama, Bloklama ve Antikorlarla İnkübasyon İşlemleri

Blotlama İşlemi: Elektroforezi tamamlanan jellerin blotlama işlemleri iBlot Dry Blotting System cihazı içerisinde (iBlot® Gel Transfer Device and Apparatus, Invitrogen™, USA), iBlot® Transfer Stack, PVDF membran kit (Invitrogen™, USA) kutusundan çıkarılan bir adet anod, katot, filtre kağıdı ve sünger yardımı ile gerçekleştirildi. Anod'un üzerindeki jelatin çıkarılıp plastik kabıyla birlikte en alta konulduktan sonra distile su içerisinde bulunan jel dikkatli bir şekilde nitrosellüloz membran içeren bu anod tabakanın üstüne yerleştirildi. Filtre kâğıdı distile su yardımıyla ıslatıldıktan sonra jelin üzerine yerleştirildi, cihaz ile birlikte verilen rulo ile aralarda oluşan hava kabarcıkları çıkarıldı. Daha sonra katod bakır yüzey süngere bakacak şekilde ve jelli kısım ise filtre kâğıdının üzerine bakacak şekilde yerleştirildi. Son olarak cihazın kapak kısmında kendine özgü yeri olan sünger yerleştirildi ve cihaz çalıştırılarak transfer işlemi başlatıldı. Transfer işlemi tamamlandıktan sonra anod tabakanın üzerine yerleştirilen nitrosellüloz membran steril bir bistüri yardımıyla alındı.

Bloklama İşlemi: Transfer sonrasında membran, blotlama sırasında özgül olmayan bağlanmaların engellenmesi için bloklama işlemine tabi tutuldu. Bu basamakta membran distile sudan geçirildikten sonra çalkalayıcı üzerinde bloklama solüsyonu (WesternBreeze® Chromogenic Kit–Anti- Mouse, WB7103, Invitrogen™, USA) ile 30

dakika oda sıcaklığında muamele edildi. Bloklama solüsyonları kit prosedüründe yazan şekilde hazırlandı (Tablo 7). Bloklama işlemi tamamlandıktan sonra membran toplamda 2 kez olacak şekilde 20 mL distile su ile çalkalayıcıda 5 dakika boyunca yıkama işlemine tabi tutuldu.

Primer ve sekonder antikorlarla inkübasyon ve diğer işlemler; Bloklamadan alınan membranlar Tablo 7’de gösterildiği gibi hazırlanan primer antikorlar ile oda sıcaklığında 60 dk boyunca shakerda bekletildiler. Inkübasyon işleminden sonra primer antikor solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı ve membranlar kullanıma hazır hale getirilmiş 20 mL antikor yıkama solüsyonu ile toplamda 4 kez olacak şekilde yıkama işlemine tabi tutuldular ve bağlanmayan antikorlar ortamdan uzaklaştırıldılar. Bu işlem tamamlandıktan sonra membran, kit ile kullanıma hazır halde gönderilen sekonder antikor ile çalkalayıcıda yarım saat süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra membranlar tekrar 4 kez 5’ er dakika antikor yıkama solüsyonları ile yıkandı ve bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı.

Tablo 7. Bloklama, antikor yıkama ve antikor sulandırma solüsyonlarının hazırlanışları

Gerekli Solüsyonlar	PVDF Membran için	
Bloklama Solüsyonunun İçeriği ve Hazırlanışı	Ultra filtre edilmiş su	14 mL
	Blocker/Diluent A	4 mL
	Blocker/Diluent B	2 mL
Toplam Hacim 20 mL		
Referans Primer Antikoru dilüsyonu	β-Aktin primer antikoru, 1:2000 oranında, 10 mL bloklama solüsyonu içerisinde dilüe edildi.	
Hedef Primer Antikorların Dilüsyonu	PTEN primer antikoru,	1:2000,
	PI3K primer antikoru,	1:2000,
	Akt primer antikoru	1:2000,
Antikor Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması	Tüm primer antikorlar 10 mL bloking solüsyonu ile dilüe edildi.	
	Ultra filtre edilmiş su	150 mL
	Antikor Yıkama solüsyonu (16X)	10 mL
Toplam Hacim 160 mL		

4.2.2.1.6. Protein Bantlarının Görüntülenmesi ve Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Yıkama işleminin tamamlanmasının ardından membranlar kullanıma hazır halde gelen kromojenik substratın 5 mL'si ile bant gelişimi oluncaya kadar (yaklaşık 20-30 dk) inkübe edildi. Bu işlemden sonra membranlar 20 mL distile su ile toplamda 3 kez olacak şekilde 2'şer dakika boyunca yıkama işlemine tabi tutuldular. Son olarak membranlar uygun bir tarayıcıda (Hewlett Packard Company, Photosmart C3100, California, ABD) 600 dpi ile taranarak bant görüntüleri bilgisayar ortamına aktarıldı. Protein bant yoğunlukları IMAGE-J (National Institute of Health, Bethesda, ABD) Analysis Software programında değerlendirildi. Veriler β -Aktin housekeeping proteinine karşı normalize edildi.

4.3. Kolon Dokusunun Histopatolojik Analizi

Histopatolojik inceleme için sıçanlardan çıkarılan kolon dokuları %10'luk formaldehit çözeltisi içerisinde tespit edildi. Kalınlığı 5 mikron olan standart kesitler Hematoksilen-Eosin (H&E) ile boyanarak mikroskopik inceleme için hazırlandı ve lezyonlar Olympus BX43 ışık mikroskobu altında incelenerek, Olympus DP72 görüntüleme cihazı ile fotoğraflandı.

4.4. İstatistiksel Analiz

Araştırma sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows 22.0 paket programı kullanıldı. Analiz aşamasında kullanılacak yöntemin belirlenebilmesi için veri setinde ilgilenilen

değişkenin normal dağılımdan gelip gelmediğinin tespit edilmesi için Shapiro-Wilk testi uygulandı. Shapiro-Wilk testinin yanı sıra çarpıklık (skewness), basıklık (kurtosis) katsayıları, kutu grafiği (boxplot) ve Q-Q plot da incelenerek veri setinin normalliğine ilişkin karar verildi. İki'den fazla grubun sürekli ölçümlerinin genel karşılaştırılmasında varsayımların sağlanması durumunda Tek Yönlü Varyans Analizi, varsayımların sağlanmaması durumunda ise Kruskal Wallis testi kullanıldı. Bu karşılaştırmalarda anlamlı bulunan durumlar için grupların ikili karşılaştırılmalarında varsayımların sağlanması durumunda grup içi varyansların homojen olup olmamasına göre Tukey testleri kullanıldı. Grupların ikili karşılaştırılmalarında varsayımların sağlanmaması durumunda ise Bonferroni düzeltmesi yapılmış Mann Whitney U testi kullanıldı. Sürekli ölçümler ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum-maksimum) olarak özetlendi. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Çalışma Gruplarındaki Sıçanların Kilo Alımları ve Büyüme Oranları Üzerine Etkisi

Deney süresi boyunca çalışma gruplarındaki tüm sıçanların kiloları haftalık olarak tartılıp, kayıt altına alındı. Tüm gruplardaki sıçanların kilo alımlarının deney süresince normal seyirde devam ettiği gözlemlendi. Başlangıç ve son haftadaki kiloları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak bir farklılık saptanmadı. DMH uygulanan sıçanların ortalama ağırlık artışı kontrollere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). DMH ile birlikte kemopreventif ajanların uygulandığı gruplarda kilo alımının, sadece DMH uygulanmış gruptaki sıçanlara göre daha fazla olduğu belirlendi ($p<0,05$). Yalnızca DMH uygulanan grupta kontrollere göre önemli ölçüde azalmış kilo alımı ve büyüme oranları görülürken, Diklofenak ve Selekoksisib uygulamalarının ağırlık kazancı ve büyüme oranlarına DMH grubuna kıyasla önemli ölçüde katkıda bulunduğu gözlenmiştir ki bu durum seçilen kemopreventif ajanların DMH'ın indüklediği kolon karsinogenezine karşı sıçanlara optimum koruma sağladığını düşündürmektedir (Tablo 8).

Tablo 8. DMH ve kemopreventif gruplardaki sıçanların kilo alımları ve büyüme oranları

Gruplar	Başlangıç (g)	Final (g)	Kilo Alımı (g)	Büyüme Oranı
Kontrol	247,75 ± 20,35	362,125±26,32	114,38 ± 18,49	0,65 ± 0,11
DMH	269,81 ± 30,23	337,27±46,69	65,06 ± 30,34**	0,37 ± 0,17**
DMH+Diklofenak	250,00 ± 22,55	342,2±31,71	92,20 ± 17,75*	0,53 ± 0,10*
DMH+Selekoksib	272,90 ± 18,66	368,0±34,54	95,10 ± 22,38*	0,54 ± 0,13*

*p<0,05 kontrol grubuna kıyasla

**p<0,001 kontrol grubuna kıyasla

Sıçanların büyüme oranları ise aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır: Büyüme oranı = (Final vücut ağırlığı - Başlangıç vücut ağırlığı) / Toplam deney günü sayısı.

5.2. Kemopreventif Ajanların Seçilen ELISA Parametreleri Üzerine Etkisi

Diklofenak ve Selekoksib'in serum CEA, HIF-1 α , PCNA ve Ki-67 düzeylerine etkisini değerlendirdiğimiz bu bölümde elde edilen sonuçlar Tablo 9'da sunulmuştur. Sadece DMH uygulanan gruptaki sıçanlarda serum CEA, HIF-1 α , PCNA ve Ki-67 düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak arttığı gözlenmiştir (p<0,05; PCNA için, p<0,001; CEA, HIF-1 α ve Ki-67 parametreleri için). Kemopreventif ajanların uygulandığı gruplardaki serum CEA, HIF-1 α , PCNA ve Ki-67 düzeylerinin de kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak arttığı saptanmıştır. DMH grubu ile kemopreventif ajanların uygulandığı gruplar birebir kıyaslandığında ise seçili tüm parametlerin kemopreventif gruplarda istatistiksel olarak azaldığı gözlenmiştir.

Tablo 9. Kemopreventif ajanların seçilen ELISA parametreleri üzerindeki etkisi

Gruplar	CEA (pg/mL)	HIF-1 α (pg/mL)	PCNA (ng/mL)	Ki-67 (ng/mL)
Kontrol	310,50 $\pm$ 30,50	322,60 (279,12-348,05)	72,12(48,34-85,53)	5,29 $\pm$ 0,65
DMH	565,83 $\pm$ 97,33**	400,31(361,64-596,58)**	93,37(83,01-105,17)*	7,45 $\pm$ 0,86**
Diklofenak	424,67 $\pm$ 40,14 ⁺⁺	365,78(295,73-384,88) ⁺	82,04(65,80-88,28) ⁺⁺	6,30 $\pm$ 0,56 ⁺
Selekoksib	468,17 $\pm$ 43,26 ⁺	370,92(324,52-392-74) ⁺	83,30(72,62-94,68) ⁺	6,50 $\pm$ 0,68 ⁺

*p<0,05 kontrol grubuna kıyasla

**p<0,001 kontrol grubuna kıyasla

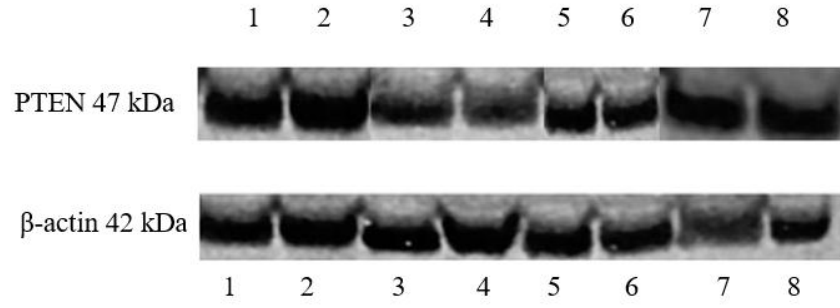
⁺p<0,05 DMH grubuna kıyasla⁺⁺p<0,001 DMH grubuna kıyasla

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma ya da medyan (minimum-maksimum) şeklinde ifade edilmiştir.

*Kontrol grubu ile kıyaslandığında; p<0,05, **Kontrol grubu ile kıyaslandığında p<0,001; ⁺DMH grubu ile kıyaslandığında; p<0,05, ⁺⁺DMH grubu ile kıyaslandığında; p<0,001.

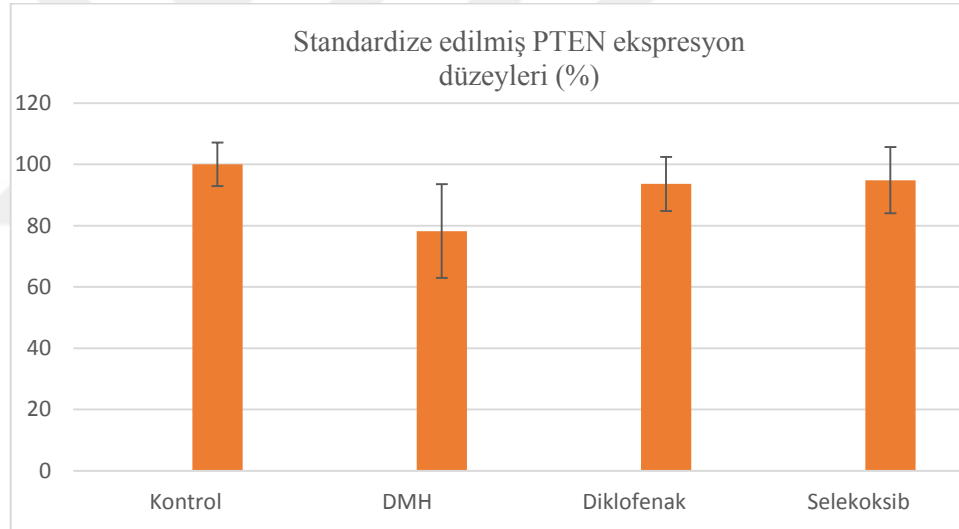
5.3. Doku PTEN Protein Ekspresyon Düzeyleri

Doku PTEN protein ekspresyon düzeyleri kontrol grubunda (%100) kabul edilerek hesaplandığında; DMH grubunda PTEN ekspresyon kaybının ~%22 oranında olmasıyla birlikte protein ekspresyonunun %78,219 olduğu saptanmıştır. Dolayısı ile kontrol grubuna kıyasla DMH grubunda doku PTEN protein ekspresyonunda istatistiksel olarak bir azalma gözlenmiştir (p<0,05). Kemopreventif ajanların uygulandığı gruplar incelendiğinde ise; Diklofenak grubunda PTEN ekspresyonunun %93,681 olduğu, Selekoksib grubunda ise %94,814 olduğu gözlenmiştir. Her iki kemopreventif grubunda da protein düzeylerinin istatistiksel olarak arttığı saptanmıştır (Diklofenak için, p<0,05; Selekoksib için, p<0,05).



Şekil 26. Pten ve β-actin proteinlerine ait bant görüntüleri

(1,2: Kontrol; 3,4: DMH; 5,6: Diklofenak; 7,8: Selekoksisib grubunu temsil etmektedir.)

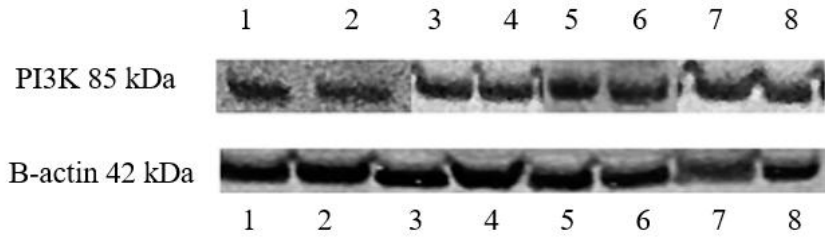


Şekil 27: Gruplara göre Doku PTEN Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)

5.4. Doku PI3K Protein Ekspresyon Düzeyleri

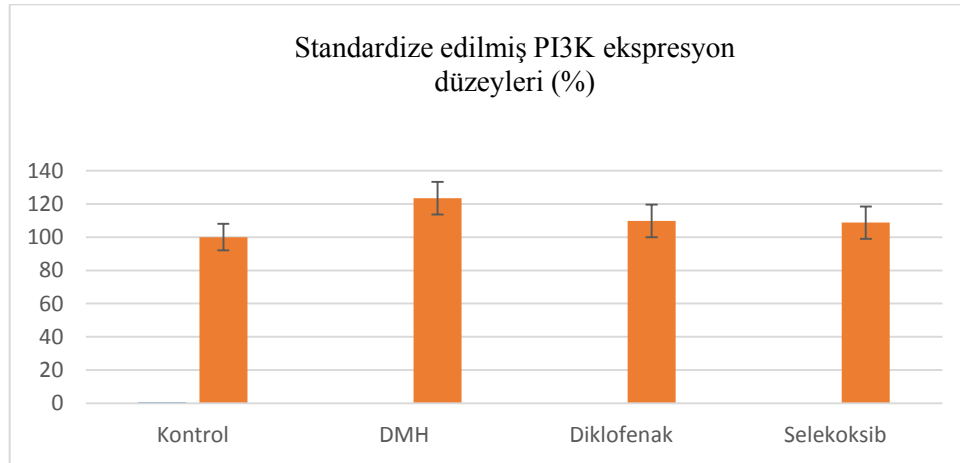
Doku PI3K protein ekspresyon düzeyleri kontrol grubunda %100 kabul edilerek hesaplandığında; DMH grubunda PI3K ekspresyonunun artmasıyla birlikte protein ekspresyonunun %123,377 olduğu saptanmıştır. Dolayısı ile kontrol grubuna kıyasla

DMH grubunda doku PI3K protein ekspresyonunda istatistiksel olarak bir artış olduğu gözlenmiştir ($p < 0,001$). Diklofenak uygulanan grupta ise PI3K protein ekspresyonunun %109,732 olduğu, Selekoksisib uygulanan grupta ise protein düzeyinin %108,732 olduğu saptanmıştır. Her iki kemopreventif grubunda da protein düzeylerinin DMH grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,05$ her iki kemopreventif ajan için).



Şekil 28. PI3K ve β -actin proteinlerine ait bant görüntüleri

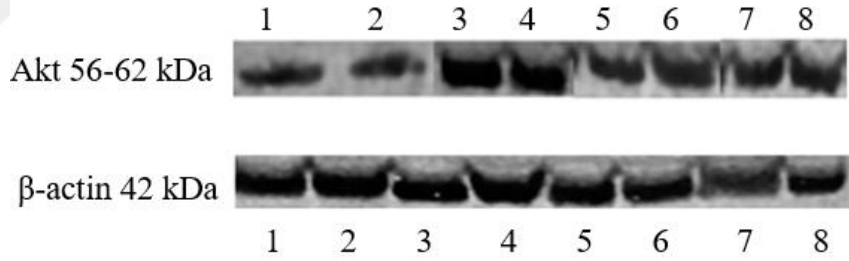
(1,2: Kontrol; 3,4: DMH; 5,6: Diklofenak; 7,8: Selekoksisib grubunu temsil etmektedir.)



Şekil 29: Gruplara göre Doku PI3K Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)

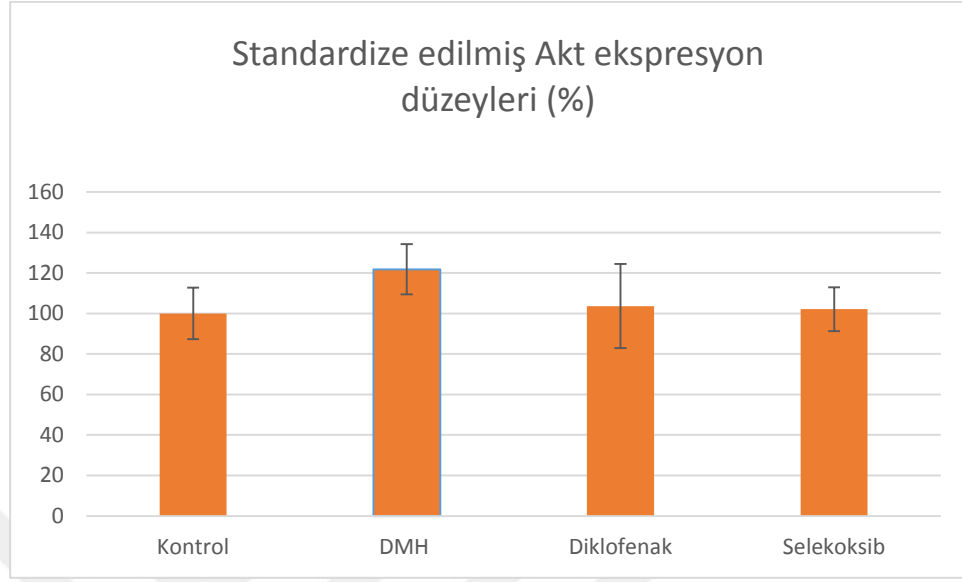
5.5. Doku Akt Protein Ekspresyon Düzeyleri

Doku Akt protein ekspresyon düzeyleri kontrol grubunda %100 kabul edilerek hesaplandığında; DMH grubunda Akt ekspresyonunun artmasıyla birlikte protein ekspresyonunun %121,786 olduğu saptanmıştır. Dolayısı ile kontrol grubuna kıyasla DMH grubunda doku PI3K protein ekspresyonunda istatistiksel olarak bir artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Diklofenak uygulanan grupta ise Akt protein ekspresyonunun %103,658 olduğu, Seleksib uygulanan grupta ise protein düzeyinin (%102,113) olduğu saptanmıştır. DMH grubuna göre her iki kemopreventif grubunda da protein düzeylerinin istatistiksel olarak azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$ her iki kemopreventif ajan için).



Şekil 30. PI3K ve β-actin proteinlerine ait bant görüntüleri

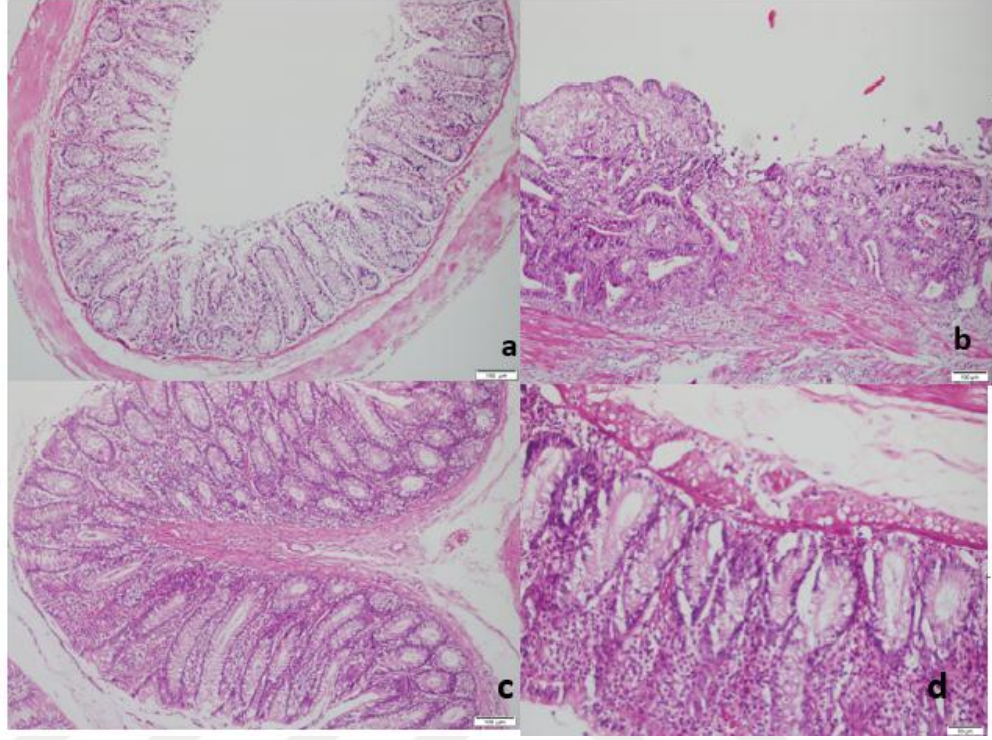
(1,2: Kontrol; 3,4: DMH; 5,6: Diklofenak; 7,8: Seleksib grubunu temsil etmektedir.)



Şekil 31. Gruplara göre Doku Akt Protein Ekspresyon Düzeyleri (%)

5.6. Histolojik Bulgular

Hematoksilen-Eozin boyama metodunun uygulandığı kesitlerde, kontrol grubunda herhangi bir patolojik lezyon tespit edilmedi. DMH uygulanan grupta invaziv tubuler adenokarsinomun L. Muscularise varan invazyonu gözlemlendi. Diklofenak'ın DMH ile birlikte uygulandığı grupta, submukozal inflamatuvar mononükleer hücreler, kriptlerde ve glanduler epitelde atipik hücreler tespit edildi. Selekoksibin DMH ile birlikte uygulandığı grupta ise hafif inflamatuvar reaksiyonlar ile birlikte minimal atipik epitel hücre değişiklikler gözlemlendi (Şekil 32).



Şekil 32. Çalışma gruplarındaki histolojik görünümeler.

Histolojik analiz sonuçları: (a) Kontrol Grubu: Kolon, mukoza ve submukozal bezler düzenli, normal mikroskopik görünüm (H&E X10), (b) DMH Grubu: İnvaziv tubuler adenokarsinomun L. Muscularise varan invazyonu (H&E X100) (c) DMH + diklofenak grubu: Submukozal inflamatuvar mononükleer hücreler, kriptlerde ve glanduler epitelde atipik hücreler (H&E X20) (d) DMH + selekoksib grubu: Hafif inflamatuvar reaksiyonlar ile birlikte minimal atipik epitel hücre değişiklikler (H&E X20)

6. TARTIŞMA

Kolorektal kanser, kadın ve erkeklerde dünya çapında görülen en yaygın üçüncü kanser türü olup, kanserle ilgili ikinci, gastrointestinal kanserde ise başlıca ölüm nedenidir (242). Karsinogenez gelişimi; proliferasyon, diferansiyasyon ve hücre sağkalımını düzenleyen genetik mekanizmaların aracılık ettiği proteinlerin miktar veya aktivitesinde progresif değişikliklerle karakterize çok adımlı süreçtir (243). Kanser hücreleri çevre doku ve kan damarlarını istila ve yok etme, uzak organlara metastaz yapma yeteneğine sahiptirler ve tedavi edilmediklerinde ölüme sebebiyet vermektedirler (244).

Kolon tümörlerinin oluşması ve ilerlemesinde rol oynayan faktörlerin araştırılması ile ilgili çalışmalar gittikçe önem arz etmektedirler. Kolon tümör indüksiyonunun ilk kez denenmesinden bu yana, kanserojen aktiviteye sahip çeşitli maddeler çalışılmış ve hayvan modelleri geliştirilmiştir. Kanserojen kaynaklı deneysel kolon kanserleri, insan tümörleri ile birçok benzer özellik taşımaktadırlar ve bu modeller kanser patogenezinin anlaşılmasında önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (245). Kemirgenlerde kolorektal karsinogenez çalışması yaklaşık 80 yıl öncesine dayanan uzun bir geçmişe sahiptir. Halen, deneysel kolorektal kanser modeli oluşturmak için DMH ve AOM kanserojen ajanları sıklıkla kullanılmaktadırlar (243, 246). Sıçanlarda tümör indüklemesinde en eski ve en çok kullanılan kanserojen ajanlardan biri olan DMH, metil azoksi metanolün (MAM) metabolik öncüsüdür. DMH'nin kanserojen etkisi, tek bir enjeksiyondan sonra veya bir dizi haftalık enjeksiyon yoluyla elde edilebilir (247,248). Malign lezyon, displastik olmayan mukozadan kaynaklanır ve DMH uygulanmasından

4-30 hafta sonra ortaya çıkar. DMH'ın küçük dozlarının uygulanmasından sonra bile farelerin % 80'inde adenokarsinom gelişebildiği bildirilmiştir (244). Kolorektal kanser indüksiyonu ile ilgili sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada DMH ve AOM ajanlarının etkileri karşılaştırılmış ve DMH'ın kolorektal kanser indüklenmesinde daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır (243). Essawy ve ark. deneysel kolon kanseri oluşturmak için 20 mg/kg dozajında DMH'ı subkutan yolla 15 hafta boyunca uygulamışlar ve deney sonunda başarılı bir şekilde kanser modeli oluşturduklarını rapor etmişlerdir (249). Yapılan başka bir çalışmada 12 haftalık Siyah 6 (B6NTac) erkek sıçanlar üzerinde kolon kanseri oluşturmak amacıyla 30 mg/kg dozajındaki DMH subkutan yolla on yedi hafta boyunca haftada bir kez olacak şekilde uygulanmıştır. Daha sonra bu sıçanlar sisplatinin farklı dozlarıyla 8 hafta boyunca tedavi edilmişlerdir. Histolojik analizler sonucunda, on yedi hafta boyunca DMH uygulanan hayvanların %43'ünde kolon kanseri ile birlikte karaciğer toksisitesinin de geliştiği bildirilmiştir (250). Dolayısı ile yaptığımız literatür taramalarını göz önünde bulundurduğumuzda, deneysel olarak kolorektal kanser oluşturduğumuz çalışmamızda 25 mg/kg dozajındaki DMH'ı, haftada bir kez, 25 hafta boyunca subkutan olarak verilmesi uygun görülmüştür.

Kolorektal kanser etiyolojisinde aile, çevre ve diyet ajanları dâhil olmak üzere birçok faktörün rol oynadığı bilinmektedir. Bugüne kadar karsinogenez sürecinin anlaşılmasında yol kat edilmesine rağmen; cerrahi, radyasyon ve kemoterapi içeren tedaviler KRK'nın ileri aşamalarını tedavi etmek için hala tam olarak yeterli değildir. Bununla birlikte bu standart kemoterapi toksisiteden dolayı sınırlı sağ kalım süresi yaratmaktadır. Bu yüzden malignite problemi nasıl çözülür sorusuna verilebilecek tek yanıt bu malignitenin oluşmadan önlenmesidir (243). KRK'nın gelişmesini ve

ilerlemesini engellemeyi amaçlayan etkili önleyici stratejilerin belirlenmesi, bu malignitenin insidansını ve mortalitesini azaltmada kritik öneme sahiptir (251). Gözlemsel (252,253) ve geniş randomize çalışmalarda (254,255) aspirin ve diğer steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçların kolon adenomlarının ve KRK'nın gelişmesini önlediği ve hastalık nüksünü azalttığı gösterilmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda NSAİİ'lerin apoptozisin indüklenmesi ve hücre çoğalmasının önlemesi suretiyle antikanser aktivite gösterdiği bildirilmiştir (256,257). Diklofenak, aspirin, indometasin ve sulindak gibi geleneksel NSAİİ'ler hem COX-1 hem de COX-2 aktivitesini inhibe ederken, selekoksib ve rofekoksib gibi yeni nesil ilaçlar, COX-2 aktivitesini seçici olarak inhibe eder. Seçici ve seçici olmayan COX-2 inhibitörlerinin, COX-2 enzimini hedefleyerek anti-neoplastik özellikler gösterdiği konusunda klinik araştırmalardan ve hayvan çalışmalarından ikna edici kanıtlar elde edilmesine rağmen, altta yatan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılmamıştır (258). Dolayısı ile kolorektal kanser prevensiyonu olarak tasarladığımız çalışmamızda, kemopreventif ajan olarak NSAİİ türü olan selekoksib ve diklofenak kullanılmış olup; seçili ajanlar gerçekten etkili midirler? Optimum doz nedir? Optimal kemoprevensiyon için bu NSAİİ'ler ne kadar süreyle uygulanmalıdır? sorularına yanıt bulmak için literatür taraması yapılmıştır. Setia ve arkadaşları tarafından yapılan ülseratif kolite bağlı kolon kanseri çalışmasında, deney gruplarından alınan kolonik örneklerin morfolojik ve histolojik incelemesi yapılmış ve kanser grubunda kontrollere kıyasla hem inflamasyon hem de kanser oluşumunun daha fazla olduğu bildirilmiştir (259). Yapılan başka bir çalışmada kolon kanserinde oksidatif strese neden olan reaktif oksijen ve azot türlerinin DMH ve dekstran sülfat sodyum (DSS) gruplarında yükseldiği ve tüm bu etkilerin ikinci nesil bir NSAİİ türü ilaç olan

selekoksibin DSS ve DMH ile birlikte uygulanmasıyla normale döndüğü bildirilmiştir (260). Diklofenak ile ilgili yapılan *in vitro* bir çalışmada diklofenakın, kanser hücrelerinde siklooksijenaz enzimlerinin upregülasyonunu inhibe ederek fibroblast ve kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği sonucuna varılmıştır (261). Yine başka bir çalışmada hem diklofenak hem de kurkuminin, erken neoplazm üzerinde tek başına kemopreventif etkilere sahip olduğu ve bu ajanların apoptozu indükleyebildikleri rapor edilmiştir (262). Doz çalışmasıyla ilgili çalışmalar irdelendiğinde ise, NSAİİ türü ilaçların kolon kanserinde inflamatuvar yollar üzerindeki kemopreventif etkisinin incelendiği bir çalışmada 6 mg/kg dozajında selekoksib ve 8 mg/kg dozajında diklofenakın ayrı ayrı haftada bir kez DMH uygulanan sıçanlara günlük olarak uygulandığı rapor edilmiştir (263). Deneysel olarak DMH ile oluşturulmuş başka bir çalışmada selekoksibin terapötik anti-inflamatuvar dozunun (ED50) sıçanlar için, 6 mg/kg vücut ağırlığı, diklofenakın ise günlük terapötik anti-inflamatuvar dozunun (ED50) sıçanlar için, 8 mg/kg vücut ağırlığı olduğu bildirilmiştir (264). Yine deneysel olarak tasarlanmış kolorektal kanserin erken neoplazmasında NSAİİ'lerin kemopreventif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada da aynı doz ve uygulama sıklıklarında diklofenak ve selekoksib uygulandığı görülmüştür (265). Bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda biz de çalışmamızdaki kemopreventif gruplara uygulanan dozları selekoksib için 6 mg/kg ve diklofenak için 8 mg/kg olacak şekilde tasarladık.

PTEN, PI3K/Akt yolunun temel bir bileşenidir ve PTEN kaybının, tümör oluşumuna yol açan Akt yolunu yapısal olarak aktive ettiği düşünülmektedir (266). PTEN, hücre proliferasyonu, farklılaşma, DNA/kromozom bütünlüğü, apoptoz ve invazivlik ile ilgili bir dizi fizyopatolojik süreci kontrol eder. Bununla birlikte PTEN,

sadece proteinleri değil, aynı zamanda PI3K tarafından üretilen fosfoinosititleri de defosforile eder, böylece Akt sinyal yolağını inhibe eder (267). PTEN aktivitesi, çeşitli kanserlerde mutasyon, delesyon ve promoter metilasyonu içeren bir takım mekanizmaların etkisiyle kaybolur (268). Meme kanseri, prostat ve akciğer kanseri, mide ve kolon kanseri, cilt kanseri ve endometriyal karsinom gibi farklı kanser türlerinde PTEN fonksiyon kaybı sık olarak saptanmıştır (269). Metastatik KRK'lı 173 hastanın parafine gömülü arşiv tümör dokularından yapılan retrospektif bir çalışmada, immünohistokimya analizi sonucu hastaların %19,9'unda PTEN ekspresyon kaybı olduğu bildirilmiştir (270). Loupakis ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 102 hastadan oluşan arşiv dokusunda PTEN de dahil olmak üzere bir takım biyobelirteç geriye dönük olarak analiz edilmiş ve primer tümörlerin %58'inde immünohistokimya ile PTEN pozitifliği tespit edilmiştir (271). PTEN gen mutasyon oranı endometriyada yüksektir ve PTEN ekspresyon kaybı, endometriyal hiperplazi ve malign transformasyon ile ilişkilidir (272,273). Endometriyal kanser ile ilgili yapılan bir araştırmada PTEN'in tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceği ve PTEN ekspresyonunun azalması veya kaybının endometriyal kanser gelişiminde önemli kontrol faktörleri olabileceği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada PTEN'in azalmış ekspresyonlarının, tümör çoğalması, farklılaşma ve invazyon gibi endometriyal kanserin biyolojik davranışlarıyla yakından ilişkili olduğu ve PTEN ekspresyon düzeylerinin, endometriyal kanser tanısı ve hastalık ilerlemesinin belirlenmesinde önemli bir gösterge olarak kullanılabileceği önerilmiştir (274). Retrospektif çalışmaların yanı sıra PTEN ekspresyon düzeylerinin incelendiği deneysel kanser fare modelleri de mevcuttur. Örneğin, fare prostat kanser modeli çalışmalarında, prostat kanserinin oluşması için PTEN ekspresyon kaybının gerekli

olduğu bildirilmiştir (275,276). Sıçan meme bezlerinde hücre proliferasyonu ve apoptozisin western blot yöntemiyle değerlendirildiği bir çalışmada, kanser taşıyan sıçanlarda PTEN ekspresyonunun azaldığı, genistein ile tedavi edilen sıçanlarda ise bu protein ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (277). Piplani ve ark. tarafından DMH ile oluşturulan sıçan kolon kanser modelinde PTEN ve Egr-1 protein ekspresyonlarının kolon kanseri gelişimi sırasında azaldığı, selekoksib ve dolastatin tedavilerinin bu proteinlerin ekspresyonunu artırdığı, tümör gelişimini azaltmada yardımcı olduğu ve aynı zamanda apoptotik hızı artırdığı bildirilmiştir (278). Kolon kanseri üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise kolonik homojenatta immünofloresan ve western blot yöntemiyle PTEN ekspresyonu incelenmiş ve sadece DMH uygulanarak kanser oluşturulmuş gruba kıyasla, kontrol grubunda olduğu kadar piroksikam ve c-fosiyanin ile tedavi edilen gruplarda belirgin bir şekilde PTEN ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (279). DMH ile kolorektal kanser modeli oluşturduğumuz çalışmamızda western blot yöntemiyle tüm çalışma gruplarındaki PTEN ekspresyonları değerlendirilmiş olup, kanser oluşturulmuş grupta, kontrol grubuna göre PTEN ekspresyonunun yukarıda bahsedilen çalışmalarla uyumlu bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç sadece DMH uygulanan grupta gözlenen PTEN ekspresyon kaybının kanser gelişimine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Kemopreventif ajanların uygulandığı gruplarda ise DMH grubuna kıyasla PTEN protein ekspresyonunun arttığı görülmüştür ki bu durumun PTEN ekspresyon kaybının genellikle karsinogenezisin başlangıç aşamasında meydana geldiğinden ve de Diklofenak ve Selekoksib'in kemopreventif özellik sergileyerek PTEN ekspresyon kaybını kısmen engelleyebilmesinden ileri gelebileceği düşünülmektedir.

PI3K sinyal yolağı hücre proliferasyonu, sağkalımı, büyümesi, motilitesi ve metabolizması için hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda kritik öneme sahiptir ve bu prosesleri kontrol eden çok çeşitli hedef proteinleri düzenlemede görev almaktadır (280). Tümörler intrinsik olarak stresli ortamlarda (düşük besin ve oksijen, düşük pH gibi) varlığını sürdürdükleri için bu yolağın kanser için önemi göz ardı edilemez boyuttadır ve çeşitli kanser türlerinde PI3K/Akt yolağını düzenleyen genlerde birçok mutasyon saptandığı bildirilmiştir (281-283). Reseptör tirozin kinazların aşırı ekspresyonu ile birlikte bu genomik anomaliler pek çok kanser çeşidinde sinyal yolağı enzimlerinin ve downstream moleküllerinin sürekli aktivasyonuna neden olarak kontrolsüz hücre çoğalmasına ve büyümesine sebebiyet vermektedir (284). Bununla birlikte somatik mutasyonlar ve/veya önemli genlerin kaybı veya kazanımı diğer genetik alterasyonların yanında birçok solid ve hematolojik tümörler de bu yolağın etkileneşine neden olmaktadır. PI3K/Akt yolağının aktivasyonu hücre büyümesi ve sağkalımı kontrolünde defektlere neden olur ki bu da rekabetli büyüme avantajının, metastatik potansiyelin, anjiyogenezin ve tedavi direncinin artmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte kanserde PI3K/Akt yolağının aşırı aktivasyonunun meme, glioblastoma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerde hormon terapisi, radyoterapi, kemoterapi ve reseptör tirozin kinaz inhibitörleri gibi konvensiyonel tedavilere karşı dirence yol açtığı da bildirilmiştir (285-287). Bu durum PI3K/Akt yolağını anti-kanser ajanların geliştirilmesi için önemli hedef haline getirmektedir (288). 55-75 yaş arası toplam 27 benign prostat hiperplazisi (BPH) olan hastaların dâhil edildiğı bir çalışmada transüretal rezeksiyon sonrası prostatik dokular alınmış ve PI3K ve Akt'nin gen ekspresyon düzeyleri q-PCR ile değerlendirilmiştir. PI3K ve Akt2

proteinin gen ekspresyonu, daha küçük prostat boyutuna kıyasla daha büyük prostat büyüklüğüne sahip BPH hastalarında anlamlı şekilde arttığı, PI3K/Akt yolağının overekspresyonunun BPH'de azalmış apoptoz ve artan prostat büyüklüğü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (281). Deneysel olarak oluşturulmuş gastrik kanser modelinde PI3K/Akt sinyal yolağı tümörlerde enerji metabolizmasının düzenlenmesinde çok önemli olduğundan hedef yolak olarak belirlenmiş ve PI3K-Akt protein ekspresyonları hem kanser grubunda hem de kemopreventif ajanların uygulandığı gruplarda tayin edilmiştir. Her iki protein ekspresyonunun kontrol grubuna göre mide kanseri oluşturulmuş grupta arttığı, kemopreventif ajanların uygulandığı gruplarda ise normale yakın bir düzeye indiği rapor edilmiştir (289). Preoperatif radyoterapi, kemoterapi veya immünoterapi almayan kolorektal adenokarsinomlu sporadik hastalardan alınan örneklerden yapılan bir araştırmada PI3K'nın artmış ekspresyonunun KRK metastazı ile ilişkili olduğu, kullanılan PI3K inhibitörünün, KRK hücrelerinde apoptozu indüklediği ve yüksek metastatik hücreler için güçlü sitotoksiste gösterdiği bildirilmiştir. Bu yüzden PI3K inhibisyonunun, KRK için etkili bir tedavi olabileceği önerilmiştir (290). Bununla birlikte DMH ile kolon kanseri oluşturulmuş bir çalışmada da PI3K ve Akt protein ekspresyonları ölçülmüş ve bu protein ekspresyonlarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (291). Doğal bir alkaloid olan piperlongumine'in kemopreventif etkinliğinin araştırıldığı başka bir deneysel kolon kanser çalışmasında ise DMH uygulanan farelerde PI3K ve Akt ekspresyonlarının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak arttığı ve DMH ile Piperlongumine'nin birlikte uygulandığı grupta ise her iki protein düzeyinin sadece DMH uygulanan gruba göre istatistiksel olarak azaldığı ifade edilmiştir (292). Yukarıda bahsedilen araştırmalardaki sonuçlara paralel olarak, biz

de çalışmamızda PI3K ve Akt ekspresyonlarının kontrol grubuna kıyasla DMH grubunda istatistiksel olarak arttığını gözlemledik. PI3K/AKT sinyal yolağı; hücre büyümesi, proliferasyon, hayatta kalma ve apoptozis gibi normal hücresel işlemlerin ana düzenleyicisi olduğundan, PI3K/Akt proteinlerinin artmış ekspresyonlarının tümör gelişmesi ve ilerlemesine katkıda bulunarak tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve çoğalmasını teşvik ettiğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte, seçili kemopreventif ajanların DMH ile birlikte uygulandığı gruplarda ise bu protein ekspresyonlarının sadece kanserojen ajan uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak azaldığını tespit ettik. PTEN, PI3K ve Akt protein düzeylerinin Diklofenak ve Selekoksib uygulamasıyla DMH grubuna kıyasla normal düzeye gelmesinin altında yatan sebebin seçili ajanların kemopreventif özellik sergileyerek DMH'ın yıkıcı ve zararlı etkisini azaltmasından ve antiproliferatif özellik gösterebildiklerinden ileri gelebileceğini düşünmekteyiz.

Kanser hastalıklarının tanı, teşhis ve tedavisinde, bununla birlikte tedavi sonrası hastaların takibinde kullanılan parametreler tümör belirteçleri olarak adlandırılırlar. En sık kullanılan tümör belirteçleri arasında yer alan CEA, yaklaşık 200 kDA'lık moleküler ağırlığa sahip, fetal bağırsağın gelişimi sırasında eksprese edilen bir hücre yüzey glikoprotein olup, mide ve kolon gibi gastrointestinal karsinomlarının teşhisi ve prognozu için kullanılmaktadır (293,294). 1965'teki keşfinden bu yana kolorektal kanser için bir tümör markeri olarak kullanılmıştır. Ayrıca, yumurtalık, meme, pankreas ve karaciğer kanserinin tanımlanmasında da tercih edilmektedir (295,296). Sağlıklı bireylerin serumunda düşük konsantrasyonlarda CEA bulunabilirken, serumdaki yüksek CEA düzeyleri malign durumun göstergesi olabilmektedir (297). Çeşitli kanser türleri ile ilgili yapılan klinik ve deneysel araştırmalarda ölçülen CEA

düzeylerinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmalardan bir kaçına yer verilecek olursa; 444 erkek ve 143 kadın hastadan alınan serum örneklerinde yüksek CEA düzeylerinin erken mide kanserinin kötü prognozu için bağımsız bir risk faktörü olabileceği rapor edilmiştir (298). Kolorektal kanser tanılı hastalar üzerinde yapılan klinik bir araştırmada, hastalığın 1.evresinde olan hastalardaki serum CEA düzeylerinin daha ileri evre hastalardaki düzeylere kıyasla anlamlı derecede daha düşük olduğu bildirilmiştir (299). Li ve ark. serum CEA overekspresyonunun primer hepatoselüler karsinomda (HCC)'de değil de, metastatik HCC'de görüldüğünü bildirmişlerdir (300). Yapılan başka bir çalışmada ise dietnitrozaminin neden olduğu sıçan karaciğer modelinde, serum CEA düzeyinin az miktarda yükseldiği, ancak bu yükselişin kontrol grubunda kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmadığı rapor edilmiştir (301). Aynı araştırmacılar elde ettikleri bu sonucun CEA'nın primer karaciğer kanserinde anlamlı olarak artmadığını bildiren Li ve ark.nın yaptıkları araştırmayı destekler nitelikte olduğunu vurgulamışlardır (301). N-metil-N-nitrozoüre indüksiyonlu kolon kanser modelinde de CEA düzeylerinin kanser grubunda arttığı, kemoprevetif ajan uygulanan gruplarda ise kanser grubuna göre düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (302). Zencefilin polifenolik bir alkanonu olan zingeron'un deneysel olarak oluşturulmuş kolorektal kanser modelinde kemopreventif etkinliğinin incelendiği bir araştırmada, DMH indüksiyonu yapılan grupta CEA düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yükseldiği, DMH ile birlikte zingereon uygulanan gruplarda ise CEA düzeylerinin sadece DMH uygulanan gruba kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir (303). Yine DMH ile oluşturulmuş bir başka kolon kanser modelinde nar ekstraktının koruyucu özelliği araştırılmış ve kanser grubunda artmış CEA düzeylerinin nar ekstraktının

uygulandığı grupta normal düzeye indiği bildirilmiştir (304). Çalışmamızda da yukarıda bahsettiğimiz araştırmalarla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Şöyle ki DMH'ın uygulandığı sıçanlarda CEA düzeyinin kontrol grubuna göre yükseldiği görülmüştür ve bu artışın muhtemelen malign lezyon oluşumu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, DMH ile eş zamanlı olarak kemopreventif ajanların uygulandığı gruplarda CEA düzeylerinin kanser grubuna göre düzeldiği gözlenmiştir. Bu gruplarda CEA düzeylerinin DMH grubuna göre düşük çıkmasının altında yatan mekanizma, uygulanan kemopreventif ajanların prokarsinogen inflamatuvar süreçlerin başlamasını önlemesi veya geciktirmesi olabileceği düşünülmektedir.

Tümör hipoksisi, kanser progresyonunu büyük ölçüde etkiler ve genellikle proliferasyon, hücre sağkalımı, invaziv/metastatik yetenek, tedaviye direnç ve değişmiş kanser kök hücre aktivitesi nedeniyle kanser hastalarında kötü prognoz ile bağlantılıdır (305,306). Oksijen homeostazının korunmasında bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1 α , hipoksinin bu etkilerine aracılık etmede rol oynayan merkezi bir moleküldür (307). Kolorektal kanserde hipoksi, HIF-1 α transkripsiyon faktörünü stabilize ederek tümör vaskülarizasyonu, metastaz/göç, hücre sağkalımında rol oynayan genlerin ekspresyonuna yol açar (308). Bu nedenle, HIF-1 α , kolorektal kanser için yeni terapötiklerin geliştirilmesinde rasyonel bir hedef haline gelmiştir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanser hastaları üzerinde yapılan bir araştırmada HIF-1 α düzeyleri değerlendirilmiş ve hasta gruplarında HIF-1 α düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu bildirilmiştir (309). Ovaryum kanser tanısı konmuş hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, HIF-1 α düzeylerinin hasta grubunda yükseldiğini, HIF-1 α 'nın over kanser prognozu için predüktör olabileceğini ve

over kanseri için yeni tedavilerin geliştirilmesinde heder olabileceğini ortaya koymuşlardır (310). Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda HIF-1 α (mRNA ve/veya protein) hem adenomlarda hem de kolorektal adenokarsinomlarda tespit edildiği ve adenomlara kıyasla adenokarsinomlarda daha fazla eksprese edildiği bildirilmiştir (311,312). HIF-1 α ekspresyonunun ayrıca hastalık aşaması ile de yakında ilişkili olduğu bildirilmiştir (313). Bununla birlikte yapılan hepatosellüler karsinom modelinde HIF-1 α düzeylerinin kanser grubunda yüksek, kemopreventif grupta ise daha düşük düzeyde olduğu bildirilmiştir (314). 7,12-dimetilbenz (a) antrasen ile oluşturulmuş ovaryum kanser modelinde de HIF-1 α ekspresyonlarının kanser grubunda arttığı bildirilmiştir (315). Proksimal kolon kanser fare modeli oluşturulmuş bir çalışmada ise HIF-1 α eksikliğinin inflamasyonu azalttığı bildirilmiştir (316). Çalışmamızda da serum HIF-1 α düzeylerinin DMH grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak arttığı, kemopreventif gruplarda ise anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, hipoksik bölgelerde bulunan HIF1- α eksprese eden hücrelerin, lokal mikro ortamın hipoksik olmayan bölgelerindeki hücrelerin davranışını değiştirerek tümörün ilerlemesine katkıda bulunma ihtimalinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, kemopreventif ajanların uygulanmasıyla HIF-1 α düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir ki bu durum kemopreventif ajanların HIF-1 α oluşumunu süprese ederek hipoksiye adaptasyonu ve beslenmesi azalan kanser hücrelerinin kanser progresyonunu potansiyel olarak inhibe ettiğini düşündürmektedir.

PCNA; Ki-67'den daha sonra kullanıma giren ve özellikle tümörlerin değerlendirilmesinde Ki-67 ile birlikte kullanılan bir immünohistokimyasal markıdır. Ki-67 G1, S, G2 ve M fazlarında eşit oranda bulunmasına rağmen, PCNA hücresel

döngünün daha çok S fazına spesifiktir. PCNA başlıca endometriyum, meme ve mide tümörlerinde mitoz derecesini değerlendirmek için kullanılmaktadır (317). Hücre DNA'sının sentezi ile yakından ilgilidir ve hücre çoğalmasının başlatılması için iyi bir belirteçtir. Yapılan çalışmalarda, PCNA'nın, tümör farklılaşma derecesi, kanser evresi ve kanser prognozu ile doğrudan ilişkili olduğu da bildirilmiştir (318,319). PCNA'nın immünohistokimyasal olarak saptanması hem aktif DNA replikasyonunu hem de karsinogenezis ile sonuçlanan DNA hasarını göstermektedir. Dolayısı ile PCNA ekspresyonunun düzensiz hücre proliferasyonunun göstergesi olarak kullanılabileceği önerilmiştir (320). PCNA'nın non-epitelyal over tümörlerinde proliferasyon indeksi olarak kullanılabilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada tümör grade'i ve stage ile PCNA Li indeksleri arasında pozitif bir korelasyon bulunduğu ve tümör grade ve stage arttıkça PCNA immunoreaktivitesi ve Li indeksinin de paralel olarak anlamlı artış gösterdiği bildirilmiştir (320). Yapılan bir çalışmada QRT-PCR deneyleri ve istatistik verilerine göre, meme kanseri dokularında Endoglin, östrojen reseptör ve PCNA mRNA ekspresyon düzeylerinin, bitişik dokulara kıyasla arttığı gösterilmiştir. Bu araştırmacılar Endoglin proteininin meme kanserinde ekspresyonunun arttığını ve lenf nodu metastazı ve TNM evresi ile ilişkili olduğunu, bununla birlikte Endoglin proteini ve PCNA protein ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Endoglin ve PCNA'nın meme kanser patogenezinde sinerjistik bir ilişki gösterebileceğini önermişlerdir (319). Yapılan başka bir çalışmada ise pozitif PCNA ekspresyonunun mide kanserli hastaların prognozu için risk faktörü olduğu ve mide kanseri dokusunda PCNA ekspresyonunun arttığı öne sürülmüştür (321). Yapılan deneysel kanser hayvan modelinde sarımsak yağının PI3K-AKT-NF-kB yolağını inhibe etmek suretiyle DEN ile

indüklenmiş hepatokarsinom oluşumunu engellediği ve PCNA düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (322). Başka bir araştırmada DMH ile indüklemiş kolon kanser modelinde PCNA düzeyleri hem ELISA hem de western blot yöntemiyle değerlendirilmiş ve kolonik kanser dokularında PCNA düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (323). Bizim çalışmamızda da DMH ile indüklenmiş kolon kanseri grubunda PCNA düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttığı, kemopreventif ajan uygulanan gruplarda ise DMH grubuna nazaran istatistiksel olarak azalışlar olduğu saptanmıştır. PCNA, hücre döngüsü ve DNA sentezi, onarımı ve metilasyonu gibi birçok biyolojik yoldaki kritik role sahip olduğundan hücre çoğalmasının iyi bir göstergesi olarak kabul edilir. Bununla birlikte epitelyal kolon dokularında aşırı hücre proliferasyonunun, neoplazi gelişiminde kaçınılmaz olduğu bilinmektedir. Dolayısı ile PCNA düzeylerinin DMH grubunda artmış hücre proliferasyonuna bağlı olarak yükseldiğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte seçili kemopreventif ajanların kolon mukozasında değişmiş PCNA ekspresyonunu baskılayarak ya da kolon dokularındaki proliferasyon bölgesinin azalmasını sağlayarak kemoprevensiyon sağlayabildiği düşünülmektedir.

Kanserogenezis, çoğu zaman kontrolsüz hücre proliferasyonu olarak tanımlanan çok aşamalı bir prosestir ve bu kontrolsüz büyüme, PCNA ve Ki-67 gibi bazı proliferatif proteinlerin etkisiyle ilişkilidir. Mükemmel bir mitotik indeks belirteci ve bölünen hücrelerin fraksiyonu olan Ki-67, G0-fazı hariç hücre döngüsünün hemen hemen tüm aşamalarında tespit edilmiştir. Ki-67 ekspresyonu, neoplastik hastalığın seyri ile ilişkilidir ve bu nedenle hastanın hayatta kalmasını ve kanserin ilerlemesini değerlendirmek için kullanılabilir, dolayısı ile Ki-67, çok çeşitli malignitelerin tanı ve tedavisi için umut verici bir moleküler aday olarak gösterilmektedir (324). Örneğin

rahim ağzı kanseri olan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada Ki-67, p53, Bcl-2, VEGF ekspresyonları değerlendirilmiş ve bu parametreler seçili sitokinlerle korele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, rahim ağzı kanser progresyonunun, bölgesel ve sistemik sitokin fonksiyonlarının konakçı homeostazındaki neoplazm entegrasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (325). Kolorektal kanserli erkek hastalarda yapılan bir çalışmada KRK'da hem Ki-67 hem de p53 over ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (326). Yapılan bir çalışmada kurkuminin hepatokarsinogenez sırasında hücre proliferasyonunu etkileyip etkilemediğini belirlemek için karaciğer dokusunda Ki-67 ekspresyonları immünohistokimyasal teknik ile belirlenmiş ve HCC grubunun karaciğer dokusunda Ki-67 pozitif hücrelerin sayısında kayda değer bir artış olduğu gösterilmiştir (327). Dietilnitrozamin ile Wistar türü fareler üzerinde oluşturulmuş karaciğer kanser modelinde diosminin tümör markırları (ODC, PCNA ve Ki-67) üzerindeki kemopreventif etkisi araştırılmış ve bu ajanın hiper hücre proliferasyonunu ve hepatokarsinogenezisi azalttığı gösterilmiştir (324). Araştırmacılar Diosmin'in bu koruyucu etkinliğinin; görünür hepatik nodüllerin yüzdesini azaltarak ve erken tümör belirteçlerini (ODC, PCNA ve Ki67), oksidatif stres biyobelirteçlerini, serum sitotoksikite belirteçlerini (AST, ALT ve LDH), hücre nekroz belirteçlerini (NF-kappa B and TNF- α) ve inflamatuvar belirteçlerini (COX-2 and iNOs) restore etme yeteneğiyle gerçekleştirdiğini öne sürmüşlerdir (324). Azoksimetanla oluşturulmuş rat kolon kanser modelinde kırmızı üzüm suyunun kemoprevenif etkinliği araştırılmış ve kanser oluşturulmuş grupta Ki-67 protein ekspresyonunun arttığı, AOM ile kırmızı üzüm suyunun eş zamanlı verildiği grupta ise Ki-67 ekspresyonunun azaldığı rapor edilmiştir (328). Yine yapılan başka deneysel bir çalışmada DMH ile kolon kanseri oluşturulmuş ve Ki-

67 ekspresyonunun arttığı, glisirizik asidin DMH ile birlikte uygulanmasının ise bu protein ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (329). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara benzer şekilde çalışmadaki tüm deney gruplarımızda Ki-67 düzeyleri değerlendirilmiş ve bu protein düzeylerinin kanser grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttığı tespit edilmiştir. Ki-67 protein ekspresyonu, malign tümör hücrelerinde intrinsik hücre popülasyonunda proliferatif aktivasyon ile ilişkilidir ki bu Ki-67'nin tümör agresifliği için bir markır olarak kullanılabileceği anlamına gelir. Dolayısı ile artmış Ki-67 düzeylerinin tümör formasyonuna bağlı olarak arttığını düşünmekteyiz. Bununla birlikte, seçili COX-2 inhibitörlerinin Ki-67 ekspresyonunu down-regüle ederek normal kolon hücrelerin kanserojen hale dönüşmesini yavaşlatmak suretiyle anti-kanserojen etki sergileyebildiklerini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; *in vivo* olarak kolorektal kanser oluşturulan sıçanlarda diklofenak ve selekoksib'in antiproliferatif etkinliklerini değerlendirdiğimiz çalışmamızda DMH uygulamasının CEA, HIF-1 α , PCNA ve Ki-67 düzeylerinin artmasına, bununla birlikte PTEN protein ekspresyon kaybına, PI3K ve Akt protein ekspresyon düzeylerinin artmasına yol açarak tümör oluşumuna yol açtığı, diklofenak ve selekoksib'in ise tümör oluşumuna yatkın bu mikroçevrede kanser sinyal yollarında görevli bu moleküllerin ekspresyonlarını düzenleyerek koruyucu bir etki gösterebileceği kanısına varılmıştır. Bununla birlikte, seçili COX-2 inhibitörlerinin kolon kanseri üzerinde sağladığı antiproliferatif etkinlik, bu iki ajanın, etkin bir kemopreventif ajan olabileceklerini göstermektedir. Farklı kanser modellerinde yapılacak benzer çalışmalara bağlı olarak bu verileri destekler nitelik kazanmasıyla, yeni bir kemopreventif ajan olarak kullanılabilecekleri ön görülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Mahadevan V. Anatomy of the caecum, appendix and colon. Surgery (Oxford) 2017; 35:115-120.
2. Maqbool A. Colon: structure, function, and disorders. Encyclopedia of Human Nutrition (third edition) 2013: 378-396.
3. Kelley MP, Efron J, Fang SH, Safar B, Gearhart S. Chapter 143 - Operative anatomy of the colon, rectum, and anus. Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set (Eighth Edition), 2019: 1662-1675.
4. Ellis H. Anatomy of the caecum, appendix and colon Surgery (Oxford), 2011;29:1-4.
5. Ellis H, Mahadevan V. Anatomy of the caecum, appendix and colon. Surgery (Oxford), 2014; 32:155-158.
6. Arıncı K, Elhan A. Anatomi Cilt I. 4. Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi. 2006; 251-61.
7. Hacıfazlıoğlu Ç. Tüm abdomen BT incelemelerinde kolon pozisyon varyasyonlarının incelenmesi. Uzmanlık Tezi, Bolu: Abant İzzet Baysal Üniversitesi / Tıp Fakültesi / Radyodiagnostik Anabilim Dalı, 2009.
8. İlhan Y. Evre 3 Kolorektal karsinom tanılı hastalarda tümör yerleşim yerinin nüks, prognoz ve sağ kalım üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 2017.
9. Williams P, Warwick R, Dyson M, Bannister LH: Gray's Anatomy. Chapter 67, 40th, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2008;1137-1162.
10. Akın T. Rektum ve rektosigmoid kanserlerin tedavisinde laparoskopik cerrahinin perioperatif ve erken dönem onkolojik sonuçları ile yaşam kalitesine etkisi. Uzmanlık Tezi, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, 2009.
11. Kaur V, Kumar M, Kumar A et al. Pharmacotherapeutic potential of phytochemicals: Implications in cancer chemoprevention and future perspectives. Biomed Pharmacother. 2018; 97:564-586.
12. Monteiro LS, Bastos KX, Barbosa-Filho JM et al. Medicinal plants and other living organisms with antitumor potential against lung cancer. Evid Based Complement Alternat Med 2014; 2014: 1–15.
13. Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M. Apoptosis in cancer an update. Asian Pac J Cancer Prev. 2012; 13:4873-4878.

14. Miller KD, Siegel RL, Lin CC et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016; 66:271-289.
15. Weiderpass E. Lifestyle and cancer risk. *J Prev Med Public Health.* 2010; 43:459-471.
16. Heikkilä K, Nyberg ST, Theorell T et al. Work stress and risk of cancer: meta-analysis of 5700 incident cancer events in 116,000 European men and women. *BMJ.* 2013;346: f165.
17. Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science.* 2015; 349:1483-1489.
18. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog.* 2006; 5:14.
19. Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science.* 2015; 349:1483-1489.
20. Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2016; 7:105-114.
21. alasty S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011; 147: 275-92.
22. Recio-Boiles A, Waheed A, Cagir B. Cancer, Colon. 2019 Jun 3. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan 3.
23. <https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors#H2/21.05.2019>
24. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol.* 2017; 3:524-548.
25. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM et al. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer.* 2012; 118:3636-3644.
26. Doubeni CA, Major JM, Laiyemo AO, et al. Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104:1353-1362.
27. Dozois EJ, Boardman LA, Suwanthanma W et al. Young-onset colorectal cancer in patients with no known genetic predisposition: can we increase early recognition and improve outcome? *Medicine (Baltimore).* 2008; 87:259-263.

28. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21457/](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21457) 12.06.2019.
29. Jemal A, Ward EM, Johnson CJ et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2014, featuring survival. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109.
30. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin.* 2009; 59:366-378.
31. Lee BY, Sonnenberg A. Time trends of mortality from colorectal cancer in the United States: a birth-cohort analysis. *JAMA Intern Med.* 2013; 173:1148-1150.
32. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009; 22:191-197.
33. Øines M, Helsing LM, Bretthauer M, Emilsson L. Epidemiology and risk factors of colorectal polyps. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017; 31:419-424.
34. Amersi F, Agustin M, Ko CY. Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and health services. *Clin Colon Rectal Surg.* 2005; 18:133-140.
35. Aune D, Chan DS, Lau R et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and doseresponse meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 2011;343:d6617.
36. Egeberg R, Olsen A, Loft S et al. Intake of wholegrain products and risk of colorectal cancers in the Diet, Cancer and Health cohort study. *Br J Cancer* 2010; 103:730e4.
37. Anderson JC, Rangasamy P, Rustagi T et al. Risk factors for sessile serrated adenomas. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45:694e9.
38. Shin A, Hong CW, Sohn DK et al. Associations of cigarette smoking and alcohol consumption with advanced or multiple colorectal adenoma risks: a colonoscopy-based case-control study in Korea. *Am J Epidemiol* 2011; 174:552e62.
39. Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol.* 2004; 39:155-165.
40. Blasiak J, Trzeciak A, Malecka-Panas E, Drzewoski J, Wojewódzka M. In vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde in human lymphocytes and the gastrointestinal tract mucosa cells. *Toxicol In Vitro.* 2000; 14:287-295.
41. Fagunwa IO, Loughrey MB, Coleman HG. Alcohol, smoking and the risk of premalignant and malignant colorectal neoplasms. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017; 31:561-568.
42. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S et al. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010; 74:106-133.

43. Davenport JR, Su T, Zhao Z et al. Modifiable lifestyle factors associated with risk of sessile serrated polyps, conventional adenomas and hyperplastic polyps. *Gut*. 2018; 67:456-465.
44. Willett WC. Epidemiologic studies of diet and cancer. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 1990;7(2e3):93e7.
45. Robertson DJ, Sandler RS, Haile R et al. Fat, fiber, meat and the risk of colorectal adenomas. *Am J Gastroenterol* 2005; 100:2789e95.
46. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ et al. Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* 1994; 54:2390e7.
47. Passarelli MN, Newcomb PA. Blood lipid concentrations and colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis of colonoscopy studies in Asia, 2000-2014. *Am J Epidemiol* 2016; 183:691e700.
48. Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer* 2008; 60:131–144.
49. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*. 2015; 148:1244-60. e16.
50. Key TJ. Fruit and vegetables and cancer risk. *Br J Cancer*. 2011;104: 6–11.
51. Godos J, Bella F, Torrisi A et al. Dietary patterns and risk of colorectal adenoma: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Hum Nutr Diet* 2016; 29:757e67.
52. Bailie L, Loughrey MB, Coleman HG. Lifestyle risk factors for serrated colorectal polyps: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 2017; 152:92e104.
53. Cole BF, Baron JA, Sandler RS et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA* 2007; 297:2351e9.
54. Logan RF, Grainge MJ, Shepherd VC, Armitage NC, Muir KR. Aspirin and folic acid for the prevention of recurrent colorectal adenomas. *Gastroenterology* 2008; 134:29e38.
55. Wei EK, Wolin KY, Colditz GA. Time course of risk factors in cancer etiology and progression. *J Clin Oncol* 2010; 28:4052e7.
56. Kim YI. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51:267e92.
57. Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D et al. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1015e22.
58. U.S. Department of Agriculture. ChooseMyPlate. Available from: <http://www.choosemyplate.gov/dairy/07.04.2019>.

59. Aune D, Chan DS, Lau R et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 2011;343: d6617.
60. Egeberg R, Olsen A, Loft S et al. Intake of wholegrain products and risk of colorectal cancers in the Diet, Cancer and Health cohort study. *Br J Cancer* 2010; 103:730e4.
61. Yao Y, Suo T, Andersson R et al. Dietary fibre for the prevention of recurrent colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Database Syst. Rev* 2017;1:CD003430.
62. El-Shami K, Oeffinger KC, Erb NL et al. American Cancer Society colorectal cancer survivorship care guidelines. *CA Cancer J Clin.* 2015;65: 428-455.
63. Kushi LH, Doyle C, McCullough M et al. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin.* 2012;62: 30-67.
64. Ma Y, Yang Y, Wang F et al. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PLoS One.* 2013;8: e53916.
65. Ma Y, Yang Y, Wang F, et al. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PLoS One.* 2013;8: e53916.
66. Keum N, Lee DH, Kim R, Greenwood DC, Giovannucci EL. Visceral adiposity and colorectal adenomas: dose-response meta-analysis of observational studies. *Ann Oncol.* 2015;26: 1101-1109.
67. Clayton PE, Banerjee I, Murray PG, Renehan AG. Growth hormone, the insulinlike growth factor axis, insulin and cancer risk. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7: 11e24.
68. Kim S, Keku TO, Martin C et al. Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res* 2008; 68:323e8.
69. Boyle T, Keegel T, Bull F, Heyworth J, Fritschi L. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104: 1548-1561.
70. Røksahm TE, Aagnes B, Hjørtaker A et al. Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer Prev.* 2013; 22:492-505.
71. Campbell PT, Patel AV, Newton CC, Jacobs EJ, Gapstur SM. Associations of recreational physical activity and leisure time spent sitting with colorectal cancer survival. *J Clin Oncol.* 2013;31: 876-885.

72. Schmid D, Leitzmann MF. Television viewing and time spent sedentary in relation to cancer risk: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(7). pii: dju098.
73. Wang Y, Zhang FC, Wang YJ. The efficacy and safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs in preventing the recurrence of colorectal adenoma: a meta-analysis and systematic review of randomized trials. *Colorectal Dis* 2015; 17:188e96.
74. Wakeman C, Keenan J, Eteuati J et al. Chemoprevention of colorectal neoplasia. *ANZ J Surg.* 2017;87: E228-E232.
75. Bains SJ, Mahic M, Myklebust TA et al. Aspirin as secondary prevention in patients with colorectal cancer: an unselected population-based study. *J Clin Oncol.* 2016;34: 2501-2508.
76. Chubak J, Kamineni A, Buist DSM, Anderson ML, Whitlock EP. Aspirin use for the prevention of colorectal cancer: an updated systematic evidence review for the u.s. preventive services task force. Rockville (MD), 2015.
77. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009; 22:191-197.
78. Murphy G, Devesa SS, Cross AJ et al. Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *Int J Cancer.* 2011;128: 1668-1675.
79. Stigliano V, Sanchez-Mete L, Martayan A, Anti M. Early-onset colorectal cancer: a sporadic or inherited disease? *World J Gastroenterol.* 2014; 20:12420-12430.
80. Henrikson NB, Webber EM, Goddard KA et al. Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review. *Genet Med.* 2015;17:702-712.
81. Samadder NJ, Curtin K, Tuohy TM et al. Increased risk of colorectal neoplasia among family members of patients with colorectal cancer: a population-based study in Utah. *Gastroenterology.* 2014;147: 814-821 e815; quiz e815-816.
82. Tuohy TM, Rowe KG, Mineau GP et al. Risk of colorectal cancer and adenomas in the families of patients with adenomas: a population-based study in Utah. *Cancer.* 2014;120: 35-42.
83. Patel SG, Ahnen DJ. Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field. *Curr Gastroenterol Rep.* 2012;14: 428-438.
84. Win AK, Lindor NM, Young JP et al. Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104:1363-1372.
85. Bonadona V, Bonaiti B, Olschwang S et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA.* 2011;305: 2304-2310.

86. Boursi B, Sella T, Liberman E et al. The APC p. I1307K polymorphism is a significant risk factor for CRC in average risk Ashkenazi Jews. *Eur J Cancer* 2013; 49:3680.
87. Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2016; 7:105-114.
88. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323:1228.
89. Delaunoy T, Limburg PJ, Goldberg RM, Lymp JF, Loftus EV Jr. Colorectal cancer prognosis among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006; 4:335-342.
90. Henderson TO, Oeffinger KC, Whitton J et al. Secondary gastrointestinal cancer in childhood cancer survivors: a cohort study. *Ann Intern Med* 2012; 156:757.
91. Nottage K, McFarlane J, Krasin MJ et al. Secondary colorectal carcinoma after childhood cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30:2552.
92. <http://www.survivorshipguidelines.org/pdf/ColorectalCancer.pdf/06/07/2019>
93. Kaplan AA, Yurt KK, Deniz ÖG, Altun G. Peripheral nerve and diclofenac sodium: Molecular and clinical approaches. *J Chem Neuroanat.* 2018; 87:2-11.
94. Lomesh SK, Bala M, Kumar D, Kumar I. Investigation of molecular interactions of the drug diclofenac sodium salt in water and aqueous sorbitol systems at different temperatures. 2019;289: 109479.
95. Sert İ. Bazı nonsteroidal antiinflatuvarların amit türevlerinin sentezi ve olası ön ilaçlar olarak değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2013.
96. Greiner AK, Papineni RV, Umar S. Chemoprevention in gastrointestinal physiology and disease. Anti-inflammatory approaches for colorectal cancer chemoprevention. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014;307: G1-15.
97. Botting RM, Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004) *Journal of Therm Biol* 2006; 31: 208-219.
98. Sam TM, Gayathri DS, Prasanth BV. Efficacy and Safety of COX-2 Inhibitors in the Clinical Management of Arthritis: Mini Review *ISRN Pharmacol* 2011; 2011: 480291.
99. Half E, Arber N. Chemoprevention of gastrointestinal neoplasia. *Curr Gastroenterol Rep.* 2013; 15:320.
100. Ketenci. A. Nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar. *Doktor dergisi. Fiziksel Tıp Rehabilitasyon.* Şubat-Mart 2012: 86-88.

101. Nørregaard R, Kwon TH, Frøkiær J. Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the kidney. *Kidney Res Clin Pract.* 2015; 34: 194–200.
102. Temraz S, Mukherji D, Shamseddine A. Potential targets for colorectal cancer prevention. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:17279-17303.
103. Wang D, DuBois RN. The role of anti-inflammatory drugs in colorectal cancer. *Annu Rev Med.* 2013; 64:131-144.
104. Gurpinar E, Grizzle WE, Piazza GA. NSAIDs inhibit tumorigenesis, but how? *Clin Cancer Res.* 2014; 20:1104-1113.
105. Konya V, Marsche G, Schuligoi R, Heinemann A. E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy. *Pharmacol Ther.* 2013; 138:485-502.
106. Komiya M, Fujii G, Takahashi M, Iigo M, Mutoh M. Prevention and intervention trials for colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2013; 43:685-694.
107. Iwama T. NSAIDs and colorectal cancer prevention. *J Gastroenterol.* 2009;44 Suppl 19:72-76.
108. Pandurangan AK, Esa NM. Dietary non-nutritive factors in targeting of regulatory molecules in colorectal cancer: an update. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14:5543-5552.
109. Melli M. Non-Steroidal antiinflamatuvar ilaçlar. Kayaalp. O (editör). Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 13.Baskı. Ankara. Pelikan yayıncılık, 2012: 869-902.
110. Dannhardt G, Kiefer W. Cyclooxygenase inhibitors current status and future prospects. *Eur J Med Chem* 2001; 36: 109.
111. Güngör H. Deneysel kolorektal kanser modelinde siklooksijenaz-2 inhibitörlerinin etkinliği ve anjiyogenezisin değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 2014.
112. Kant Lomesh S, Bala M, Dinesh Kumar D, Kumar I. Investigation of molecular interactions of the drug Diclofenac Sodium Salt in water and aqueous sorbitol systems at different temperatures (305.15 K–315.15 K). *J. Mol. Liq.* 2019;289: 109479.
113. Altman R, Bosch B, Brune K, Patrignani P, Young C. Advances in NSAID development: evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs.* 2015;75:859-877.
114. Mayorek N, Naftali-Shani N, Grunewald M. Diclofenac inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer by modulation of VEGF levels and arginase activity. *PLoS One.* 2010;5:e12715.

115. Smirnova AV, Lazebnik LB, Trubitsina IE et al. Antiproliferative activity of diclofenac at tumor cell cultures. *Eksp Klin Gastroenterol*. 2012;(5):66-69.
116. Rana C, Vaish V, Piplani H, Nehru B, Nath Sanyal S. Nuclear Factor-kB is expressed in early colon cancer and its down-regulation by Curcumin and Diclofenac is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 2012; 2: 228–238.
117. Altay A, Caglar S, Caglar B, Sahin O. Synthesis, structural, thermal elucidation and in vitro anticancer activity of novel silver(I) complexes with non-steroidal antiinflammatory drugs diclofenac and mefenamic acid including picoline derivatives. *Polyhedron* 2018;151: 160–170.
118. Pantziarka P, Sukhatme V, Bouche G, Meheus L, Sukhatme VP. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-diclofenac as an anti-cancer agent. *Ecancermedicalsecience*. 2016;10:610.
119. Harris RE, Casto BC, Harris ZM. Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014; 5:677-692.
120. Tolba RH, Fet N, Yonezawa K et al. Role of preferential cyclooxygenase-2 inhibition by meloxicam in ischemia/reperfusion injury of the rat liver. *Eur Surg Res*. 2014;53:11-24.
121. Pantziarka P, Sukhatme V, Bouche G, Meheus L, Sukhatme VP. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-diclofenac as an anti-cancer agent. *Ecancermedicalsecience*. 2016;10:610.
122. Knab LM, Grippo PJ, Bentrem DJ. Involvement of eicosanoids in the pathogenesis of pancreatic cancer: the roles of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. *World J Gastroenterol*. 2014; 20:10729-10739.
123. Hixson LJ, Alberts DS, Krutzsch M et al. Antiproliferative effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs against human colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3:433-438.
124. Seed MP, Brown JR, Freemantle CN et al. The inhibition of colon-26 adenocarcinoma development and angiogenesis by topical diclofenac in 2.5% hyaluronan. *Cancer Res*. 1997;57:1625-1629.
125. Arisan ED, Ergül Z, Bozdağ G et al. Diclofenac induced apoptosis via altering PI3K/Akt/MAPK signaling axis in HCT 116 more efficiently compared to SW480 colon cancer cells. *Mol Biol Rep*. 2018; 45:2175-2184.
126. Nagano A, Arioka M, Takahashi-Yanaga F, Matsuzaki E, Sasaguri T. Celecoxib inhibits osteoblast maturation by suppressing the expression of Wnt target genes. *J Pharmacol Sci*. 2017;133:18-24.

127. Kim JY, Alam F, Chung SW et al. Combinational chemoprevention effect of celecoxib and an oral antiangiogenic LHD4 on colorectal carcinogenesis in mice. *Anticancer Drugs*. 2014;25:1061-1071.
128. Venkatesan P, Puvvada N, Dash R et al. The potential of celecoxib-loaded hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the treatment of colon cancer. *Biomaterials*. 2011;32:3794-3806.
129. Nagano A, Arioka M, Takahashi-Yanaga F, Matsuzaki E, Sasaguri T. Celecoxib inhibits osteoblast maturation by suppressing the expression of Wnt target genes. *J Pharmacol Sci*. 2017; 133:18-24.
130. Gong L, Thorn CF, Bertagnolli MM et al. Celecoxib pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*. 2012; 22:310-318.
131. Burke CA, Phillips R, Berger MF et al. Children's International Polyposis (CHIP) study: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of celecoxib in children with familial adenomatous polyposis. *Clin Exp Gastroenterol*. 2017; 10:177-185.
132. Martinez JA, Yang J, Wertheim BC et al. Celecoxib use and circulating oxylipins in a colon polyp prevention trial. *PLoS One*. 2018;13:e0196398.
133. Jain S, Ghanghas P, Rana C, Sanyal SN. Role of GSK-3 β in Regulation of Canonical Wnt/ β -catenin Signaling and PI3-K/Akt Oncogenic Pathway in Colon Cancer. *Cancer Invest*. 2017;35:473-483.
134. Hou LC, Huang F, Xu HB. Does celecoxib improve the efficacy of chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer? *Br J Clin Pharmacol*. 2016;81:23-32.
135. Flamiatos JF, Beer TM, Graff JN et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition for prostate cancer chemoprevention: double-blind randomised study of pre-prostatectomy celecoxib or placebo. *BJU Int*. 2017;119:709-716.
136. Dvory-Sobol H, Cohen-Noyman E, Kazanov D et al. Celecoxib leads to G2/M arrest by induction of p21 and down-regulation of cyclin B1 expression in a p53-independent manner. *Eur J Cancer*. 2006; 42:422–426.
137. Patel MI, Subbaramaiah K, Du B et al. Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:1999–2007.
138. Maier TJ, Janssen A, Schmidt R, Geisslinger G, Grosch S. Targeting the beta-catenin/APC pathway: a novel mechanism to explain the cyclooxygenase-2-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *FASEB J*. 2005; 19:1353–1355.

139. Jendrossek V, Handrick R, Belka C. Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *Faseb J*. 2003; 17:1547–1549.
140. Sun YZ, Cai N, Liu NN. Celecoxib Down-Regulates the Hypoxia-Induced Expression of HIF-1 α and VEGF Through the PI3K/AKT Pathway in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 44:1640-1650.
141. Gungor H, Ilhan N, Eroksuz H. The effectiveness of cyclooxygenase-2 inhibitors and evaluation of angiogenesis in the model of experimental colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2018; 102:221-229.
142. Setia S, Nehru B, Sanyal SN. Upregulation of MAPK/Erk and PI3K/Akt pathways in ulcerative colitis-associated colon cancer. *Biomed Pharmacother*. 2014; 68:1023-1029.
143. Setia S, Nehru B, Sanyal SN. The PI3K/Akt pathway in colitis associated colon cancer and its chemoprevention with celecoxib, a Cox-2 selective inhibitor. *Biomed Pharmacother*. 2014; 68:721-727.
144. Johnson AJ, Hsu AL, Lin HP, Song X, Chen CS. The cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca²⁺ - ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks. *Biochem J*. 2002; 366:831–837.
145. Tanaka K, Tomisato W, Hoshino T et al. Involvement of intracellular Ca₂⁺ levels in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2005; 280:31059–31067.
146. Siu YA, Hao MH, Dixit V, Lai WG. Celecoxib is a substrate of CYP2D6: Impact on celecoxib metabolism in individuals with CYP2C9*3 variants. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2018;33:219-227.
147. Fajardo AM, Piazza GA. Chemoprevention in gastrointestinal physiology and disease. Anti-inflammatory approaches for colorectal cancer chemoprevention. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;309:G59-70.
148. Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:736-747.
149. Pyrko P, Soriano N, Kardosh A et al. Downregulation of survivin expression and concomitant induction of apoptosis by celecoxib and its non-cyclooxygenase-2-inhibitory analog, dimethyl-celecoxib (DMC), in tumor cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer*. 2006;5:19.

150. Kim SA, Hong R. Significance of intracellular localization of survivin in cervical squamous cell lesions: Correlation with disease progression. *Oncol Lett.* 2014;7:1589-1593.
151. Li J, Yen C, Liaw D et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997;275:1943-1947.
152. Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* 1997;57:2124-2129.
153. Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J et al. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:6199-6204.
154. Ciuffreda L, Falcone I, Incani UC et al. PTEN expression and function in adult cancer stem cells and prospects for therapeutic targeting. *Adv Biol Regul.* 2014; 56:66-80.
155. Blind RD. Disentangling biological signaling networks by dynamic coupling of signaling lipid stomodifying enzymes. *Adv Biol Regul.* 2014; 54:25-38.
156. Leslie NR, Foti M. Non-genomic loss of PTEN function in cancer: not in my genes. *Trends Pharmacol Sci.* 2011; 32:131-140.
157. Milella M, Falcone I, Conciatori F et al. PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Front Oncol.* 2015;5:24.
158. Alimonti A. PTEN breast cancer susceptibility: a matter of dose. *Ecancermedicallscience.* 2010; 4:192.
159. Alimonti A, Carracedo A, Clohessy JG, Trotman LC, Nardella C, Egia A et al. Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet.* 2010; 42:454-458.
160. Molinari F, Frattini M. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2014; 3:326.
161. Naguib A, Cooke JC, Happerfield L et al. Alterations in PTEN and PIK3CA in colorectal cancers in the EPIC Norfolk study: associations with clinicopathological and dietary factors. *BMC Cancer.* 2011; 11:123.
162. Frattini M, Signoroni S, Pilotti S et al. Phosphatase protein homologue to tensin expression and phosphatidylinositol-3 phosphate kinase mutations in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2005; 65:11227.
163. Day FL, Jorissen RN, Lipton L et al. PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:3285-3296.

164. Colakoglu T, Yildirim S, Kayaselcuk F et al. Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence? *Am J Surg.* 2008; 195:719-725.
165. Zhou XP, Loukola A, Salovaara R et al. PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers. *Am J Pathol.* 2002; 161:439-447.
166. Shin KH, Park YJ, Park JG. PTEN gene mutations in colorectal cancers displaying microsatellite instability. *Cancer Lett.* 2001; 174:189-194.
167. Liu X, Xu Y, Zhou Q et al. PI3K in cancer: its structure, activation modes and role in shaping tumor microenvironment. *Future Oncol.* 2018; 14:665-674.
168. Papadatos-Pastos D, Rabbie R, Ross P, Sarker D. The role of the PI3K pathway in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015; 94:18-30.
169. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006; 7:606–619.
170. Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol.* 2006;18:77-82.
171. Lien EC, Dibble CC, Toker A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT. *Curr Opin Cell Biol.* 2017; 45:62-71.
172. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13: 195-203.
173. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28: 1075-1083.
174. Bauer TM, Patel MR, Infante JR. Targeting PI3 kinase in cancer. *Pharmacol Ther.* 2015; 146:53-60.
175. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4:988-1004.
176. Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med.* 2014; 46:372-383.
177. Yanamandra M, Mitra S, Giri A. Development and application of PI3K assays for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2015; 10:171-186.
178. Clark AR, Toker A. Signalling specificity in the Akt pathway in breast cancer. *Biochem Soc Trans.* 2014; 42:1349-1355.

179. Agarwal E, Brattain MG, Chowdhury S. Cell survival and metastasis regulation by Akt signaling in colorectal cancer. *Cell Signal*. 2013; 25:1711-1719.
180. Mundi PS, Sachdev J, McCourt C, Kalinsky K. AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *Br J Clin Pharmacol*. 2016;82:943-956.
181. Kim M, Kim YY, Jee HJ et al. Akt3 knockdown induces mitochondrial dysfunction in human cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2016; 48:447-453.
182. Brand Y, Levano S, Radojevic V et al. All Akt isoforms (Akt1, Akt2, Akt3) are involved in normal hearing, but only Akt2 and Akt3 are involved in auditory hair cell survival in the mammalian inner ear. *PLoS One*. 2015;10:e0121599.
183. Krześlak A, Pomorski L, Lipińska A. Expression, localization, and phosphorylation of Akt1 in benign and malignant thyroid lesions. *Endocr Pathol*. 2011; 22:206-211.
184. Hollander MC, Maier CR, Hobbs EA et al. Akt1 deletion prevents lung tumorigenesis by mutant K-ras. *Oncogene*. 2011; 30:1812-1821.
185. Häggblad Sahlberg S, Mortensen AC, Haglöf J et al. Different functions of AKT1 and AKT2 in molecular pathways, cell migration and metabolism in colon cancer cells. *Int J Oncol*. 2017; 50:5-14.
186. Petrini I, Lencioni M, Vasile E et al. EGFR and AKT1 overexpression are mutually exclusive and associated with a poor survival in resected gastric adenocarcinomas. *Cancer Biomark*. 2018;21:731-741.
187. Riggio M, Perrone MC, Polo ML et al. AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins. *Sci Rep*. 2017; 7:44244.
188. Zheng B, Geng L, Zeng L, Liu F, Huang Q. AKT2 contributes to increase ovarian cancer cell migration and invasion through the AKT2-PKM2-STAT3/NF- κ B axis. *Cell Signal*. 2018;45:122-131.
189. Li D, Wang G, Jin G et al. Resveratrol suppresses colon cancer growth by targeting the AKT/STAT3 signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2019; 43:630-640.
190. Stottrup C, Tsang T, Chin YR. Upregulation of AKT3 Confers Resistance to the AKT Inhibitor MK2206 in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2016; 15:1964-1974.
191. Lin HP, Lin CY, Huo C et al. AKT3 promotes prostate cancer proliferation cells through regulation of Akt, B-Raf, and TSC1/TSC2. *Oncotarget*. 2015; 6:27097-27112.
192. Yang WK, Wu CY, Wu J, Lin HK. Regulation of AKT signaling activation by ubiquitination. *Cell Cycle* 2010; 9: 487–497.

193. Chan CH, Jo U, Kohrman A et al. Posttranslational regulation of AKT in human cancer. *Cell and Bioscience* 2014; 4: 59.
194. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007; 7: 1261–1274.
195. Tokunaga E, Oki E, Egashira A et al. Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8:27-36.
196. Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *Biomed Res Int*. 2015; 2015:149014.
197. Sun Z, Zhang N. Clinical evaluation of CEA, CA19-9, CA72-4 and CA125 in gastric cancer patients with neoadjuvant chemotherapy. *World J Surg Oncol*. 2014; 12:397.
198. Liu CC, Yang H, Zhang R, Zhao JJ, Hao DJ. Tumour-associated antigens and their anti-cancer applications. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2017;26(5).
199. McKeown E, Nelson DW, Johnson EK et al. Current approaches and challenges for monitoring treatment response in colon and rectal cancer. *J Cancer*. 2014; 5:31-43.
200. McVicker B, Tuma DJ, Lazure KE, Thomas P, Casey CA. Alcohol, carcinoembryonic antigen processing and colorectal liver metastases. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 815:295-311.
201. Şahin MA. Kolorektal kanserlerin tani ve takibinde F-18 Fdg Pet-Bt yönteminin yeri. *Uzmanlık Tezi, Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı*, 2015.
202. McKeown E, Nelson DW, Johnson EK et al. Current approaches and challenges for monitoring treatment response in colon and rectal cancer. *J Cancer*. 2014; 5:31-43.
203. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5: 378–389.
204. Choudhry H, Harris AL. Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell Metab*. 2018; 27:281-298.
205. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:705-713.
206. Vadde R, Vemula S, Jinka R et al. Role of hypoxia-inducible factors (HIF) in the maintenance of stemness and malignancy of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017; 113:22-27.
207. Wigerup C, Pålman S, Bexell D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol Ther*. 2016; 164:152-169.

208. Hielscher A, Gerecht S. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Free Radic Biol Med.* 2015; 79:281-91.
209. Demirel SH, Çetinkaya S. Hipoksiyle indüklenen faktör-1: hücrenin hipoksiye fizyolojik ve patolojik cevabı. *Sakaryamj* 2014;4(4):171-177.
210. Baba Y, Nosho K, Shima K et al. HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. *Am J Pathol.* 2010; 176:2292-2301.
211. Myszczyzyn A, Czarnecka AM, Matak D et al. The role of hypoxia and cancer stem cells in renal cell carcinoma pathogenesis. *Stem Cell Rev.* 2015;11:919-943.
212. Kısacım MA, Temizer Ozan PS. Kanser hücrelerinin metabolik ihtiyaçları ve bağımlılıkları. *F.Ü. Sağ.Bil. Vet.Derg.* 2017; 31: 67- 72.
213. Zhang K, Han ES, Dellinger TH et al. Cinnamon extract reduces VEGF expression via suppressing HIF-1 α gene expression and inhibits tumor growth in mice. *Mol Carcinog.* 2017; 56:436-446.
214. Zhao J, Hao J, Fei X, Wang X, Hou Y, Deng C. Isoflurane inhibits occludin expression via up-regulation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Brain Res.* 2014;1562:1-10.
215. Cheng JC, Klausen C, Leung PC. Hypoxia-inducible factor 1 alpha mediates epidermal growth factor-induced down-regulation of E-cadherin expression and cell invasion in human ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* 2013;329:197-206.
216. Hielscher A, Gerecht S. Hypoxia and free radicals: role in tumor progression and the use of engineering-based platforms to address these relationships. *Free Radic Biol Med.* 2015; 79:281-291.
217. Yeh YH, Hsiao HF, Yeh YC, Chen TW, Li TK. Inflammatory interferon activates HIF-1 α -mediated epithelial-to-mesenchymal transition via PI3K/AKT/mTOR pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018; 37: 70.
218. Peng J, Wang X, Ran L, Song J, Luo R, Wang Y. Hypoxia-inducible factor 1 α regulates the transforming growth factor β 1/smad family member 3 pathway to promote breast cancer progression. *J Breast Cancer.* 2018; 21: 259–266.
219. Lin CS, Liu TC, Lee MT, Yang SF, Tsao TC. Independent prognostic value of hypoxia-inducible factor 1-alpha expression in small cell lung cancer. *Int J Med Sci.* 2017;14:785-790.
220. Juríková M, Danihel Ľ, Polák Š, Varga I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem.* 2016;118:544-552.

221. Guzińska-Ustymowicz K, Stepień E, Kemona A. MCM-2, Ki-67 and PCNA protein expressions in pT3G2 colorectal cancer indicated lymph node involvement. *Anticancer Res.* 2008;28(1B):451-457.
222. Yang HB, Hsu PI, Chan SH et al. Growth kinetics of colorectal adenoma-carcinoma sequence: an immunohistochemical study of proliferating cell nuclear antigen expression. *Hum Pathol.* 1996;27:1071-1076.
223. Strzalka W, Zeimienowicz. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany.* 2011;107: 1127–1140.
224. Maga G, Hübscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science.* 2003; 116: 3052-3060.
225. Klöppel G, La Rosa S. Ki67 labeling index: assessment and prognostic role in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Virchows Arch.* 2018; 472:341-349.
226. Mizrak A. Psöriaziform dermatitlerin histopatolojik ayırıcı tanısında immünohistokimyasal olarak Glut-1, Ki-67 ve PCNA antikorlarının kullanımı. Tıpta Uzmanlık Tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2019.
227. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 1983; 31:13-20.
228. Ilıkı Gözü H, Ege AG, Sargın H, et al. Proliferation activity in parathyroid adenomas and its relation to the clinical parameters. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism* 2006;3; 57-61.
229. Mehmet K, Filiz K, Sancar B, et al. Kolorektal karsinomlarda e-kadherin ve Ki-67 ekspresyonunun evre, histolojik tip ve derece ile ilişkisi. *Türk Patoloji Dergisi* 2005; 21:8-19.
230. Moray M. Kolorektal Adenomlarda Revize Viyana Sınıflandırılmasına Göre Patologlar Arasındaki Uyum ile Ki-67 ve p53 İmmunhistokimyasal Boyamalarının Histopatolojik Tanıdaki Rolü. Tıpta Uzmanlık Tezi, Bursa: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2014.
231. El-Khadragy MF, Nabil HM, Hassan BN et al. Bone marrow cell therapy on 1,2 dimethylhydrazine (dmh)-induced colon cancer in rats. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 45:1072-1083.
232. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_2-dimethylhydrazine/12.08.2019
233. Nirmala P, Ramanathan M. Effect of myricetin on 1, 2 dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *J Exp Ther Oncol.* 2011; 9:101-108.

234. Muthu R, Thangavel P, Selvaraj N, Ramalingam R, Vaiyapuri M. Synergistic and individual effects of umbelliferone with 5-fluorouracil on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against 1, 2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Biomed. Prev. Nutr.* 2013; 3:74-82.
235. Torabi F, Dadkhah A, Fatemi F et al. Prevention and therapy of 1, 2-dimethyl hydrazine induced colon carcinogenesis by *Ferula assafoetida* hydroalcoholic extract. *Turk J Biochem.* 2015; 40: 390–400.
236. Perše M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: 473964.
237. Burlamaqui IM, Dornelas CA, Almeida PR et al. Hepatic repercussions of azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis. *Rev Col Bras Cir.* 2013; 40:137-141.
238. Vinothkumar R, Vinoth Kumar R, Sudha M et al. Modulatory effect of troxerutin on biotransforming enzymes and preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colon carcinogenesis. *Exp Mol Pathol.* 2014; 96:15-26.
239. Heijstek O, Kranenburg IHM, Borel R. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 2005; 22: 16–25.
240. Zhang M, Fan X, Fang B et al. Effects of *Lactobacillus salivarius* Ren on cancer prevention and intestinal microbiota in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. *J Microbiol.* 2015;53:398-405.
241. Jain S, Ghanghas P, Rana C, Sanyal SN. Role of GSK-3 β in Regulation of canonical wnt/ β -catenin signaling and PI3-K/Akt oncogenic pathway in colon cancer. *Cancer Invest.* 2017;35:473-483.
242. Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores EH et al. Colorectal cancer: a review. *Int J Res Med Sci* 2017; 5:4667.
243. Jucá MJ, Bandeira BC, Carvalho DS, Leal AT. Comparative study of 1, 2-dimethylhydrazine and azoxymethane on the induction of colorectal cancer in rats. *Journal of Coloproctology* 2014;34: 167-173.
244. Machado VF, Feitosa MR, Rocha JJRD, Féres O. A review of experimental models in colorectal carcinogenesis. *Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)* 2016; 36: 53-57.
245. Taketo MM, Edelmann W. Mouse models of colon cancer. *Gastroenterology.* 2009; 136:780–798.

246. Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2009; 30:183–196.
247. Oliveira EC, Leite MS, Miranda JA et al. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Carcinogenesis*. 2001; 22:737–40.11.
248. Gois E Jr, Daniel RA, Parra RS et al. Hyperbaric oxygen therapy reduces COX-2 expression in a dimethylhydrazine-induced rat model of colorectal carcinogenesis. *Undersea Hyperb Med*. 2012; 39:693–698.
249. Essawy SS, Bilasy SE, Mohammad HM, Shaalan AA. Effect of celecoxib and cisplatin combination on apoptosis and cell proliferation in a mouse model of chemically-induced colonic aberrant crypt foci. *Egyptian journal of basic and applied sciences*. 2017; 4: 323-331.
250. Daaboul HE, Daher CF, Bodman-Smith K et al. Antitumor activity of β -2-himachalen-6-ol in colon cancer is mediated through its inhibition of the PI3K and MAPK pathways. *Chem Biol Interact*. 2017; 275:162-170.
251. Ilhan N, Gungor H, Gul HF, Eroksuz H. Expression of endoglin and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in experimental colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2016; 36:3953-3959.
252. Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, et al. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA*. 2005; 294:914–923.
253. Chan AT, Giovannucci EL, Schernhammer ES, et al. A prospective study of aspirin use and the risk for colorectal adenoma. *Ann Intern Med*. 2004; 140:157–166.
254. Flossmann E, Rothwell PM, British Doctors Aspirin Trial and the UK-TIA Aspirin Trial. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *Lancet*. 2007; 369:1603–1613.
255. Baron JA, Cole BF, Sandler RS, et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med*. 2003; 348:891–899.
256. Chen J, Stark LA. Aspirin prevention of colorectal cancer: focus on NF-kB signalling and the nucleolus. *Biomedicine* 2017; 5; pii: E43
257. Liebman TN, Stein JA, Polsky D. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors for chemoprevention of nonmelanoma skin cancer: is there a role for these agents? *J Am Acad Dermatol*. 2013; 68:173-176.

258. Sareddy GR, Kesanakurti D, Kirti PB, Babu PP. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and celecoxib attenuates Wnt/ β -catenin/Tcf signaling pathway in human glioblastoma cells. *Neurochem Res.* 2013; 38:2313-2322.
259. Setia S, Nehru B, Sanyal SN. Upregulation of MAPK/Erk and PI3K/Akt pathways in ulcerative colitis-associated colon cancer. *Biomed Pharmacother.* 2014; 68:1023-1029.
260. Setia S, Nehru B, Sanyal SN. The PI3K/Akt pathway in colitis associated colon cancer and its chemoprevention with celecoxib, a Cox-2 selective inhibitor. *Biomed Pharmacother.* 2014; 68:721-727.
261. Al-Nimer MS, Hameed HG, Mahmood MM. Antiproliferative effects of aspirin and diclofenac against the growth of cancer and fibroblast cells: In vitro comparative study. *Saudi Pharm J.* 2015; 23:483-486.
262. Rana C, Vaish V, Piplani H, Nehru B, Sanyal SN. Nuclear Factor- κ B is expressed in early colon cancer and its down-regulation by Curcumin and Diclofenac is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 2012; 2:228-238.
263. Ghanghas P, Jain S, Rana C, Sanyal SN. Chemopreventive action of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the inflammatory pathways in colon cancer. *Biomed Pharmacother.* 2016; 78:239-247.
264. Jain S, Ghanghas P, Rana C, Sanyal SN. Role of GSK-3 β in regulation of canonical wnt/ β -catenin signaling and PI3-K/Akt oncogenic pathway in colon cancer. *Cancer Invest.* 2017; 35:473-483.
265. Vaish V, Tanwar L, Kaur J, Sanyal SN. Chemopreventive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in early neoplasm of experimental colorectal cancer: an apoptosome study. *J Gastrointest Cancer.* 2011; 42:195-203.
266. George B, Kopetz S. Predictive and prognostic markers in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep.* 2011; 13:206-215.
267. Kotelevets L, Scott MGH, Chastre E. Targeting PTEN in colorectal cancers. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1110:55-73.
268. Parsons DW, Wang TL, Samuels Y, et al. Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature.* 2005; 436:792.
269. Xi Y, Chen Y. Oncogenic and therapeutic targeting of PTEN Loss in bone malignancies. *J Cell Biochem.* 2015; 116:1837-1847.

270. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:5924–5930.
271. Loupakakis F, Pollina L, Stasi I, et al. PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27:2622–2629.
272. Stelloo E, Nout RA, Osse EM et al. Improved risk assessment by integrating molecular and clinicopathological factors in early-stage endometrial Cancer-Combined analysis of the PORTEC cohorts. *Clin Cancer Res* 2016; 22:4215-4224.
273. Espinosa I, D'Angelo E, Palacios J, Prat J. Mixed and ambiguous endometrial carcinomas: a heterogenous group of tumors with different clinicopathologic and molecular genetic features. *Am J Surg Pathol* 2016; 40: 972-981.
274. Zhang HM, Fan TT, Li W, Li XX. Expressions and significances of TTF-1 and PTEN in early endometrial cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(3 Suppl):20-26.
275. Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feed backs and cross- talks. *Oncogene* 2008; 27:5527–41.
276. Carver BS, Pandolfi PP. Mouse model in ginoncologic preclinical and translational research. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5305–5311.
277. Wang J, Jenkins S, Lamartiniere CA. Cell proliferation and apoptosis in rat mammary glands following combinational exposure to bisphenol A and genistein. *BMC Cancer*. 2014; 14:379.
278. Piplani H, Rana C, Vaish V, Vaiphei K, Sanyal SN. Dolastatin, along with Celecoxib, stimulates apoptosis by a mechanism involving oxidative stress, membrane potential change and PI3-K/AKT pathway down regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1830:5142-5156.
279. Saini MK, Sanyal SN. PTEN regulates apoptotic cell death through PI3-K/Akt/GSK3 β signaling pathway in DMH induced early colon carcinogenesis in rat. *Exp Mol Pathol*. 2012; 93:135-146.
280. Slattery ML, Mullany LE, Sakoda LC et al. The PI3K/AKT signaling pathway: Associations of miRNAs with dysregulated gene expression in colorectal cancer. *Mol Carcinog*. 2018; 57:243-261.
281. Sreenivasulu K, Nandeesh H, Dorairajan LN, Nachiappa Ganesh R. Over expression of PI3K-Akt reduces apoptosis and increases prostate size in benign prostatic hyperplasia. *Aging Male*. 2018:1-7.

282. Shinderman-Maman E, Weingarten C, Moskovich D, Werner H, Hercbergs A, Davis PJ, Ellis M, Ashur-Fabian O. Molecular insights into the transcriptional regulatory role of thyroid hormones in ovarian cancer. *Mol Carcinog*. 2018;57(1):97-105.
283. De Marco C, Laudanna C, Rinaldo N et al. Specific gene expressionsignatures induced by the multiple oncogenic alterations that occur within the PTEN/PI3K/AKT pathway in lung cancer. *PLoS One*. 2017;12: e0178865.
284. Nizam E. Metastatik meme kanserinde CXC kemokin reseptör 2 antagonistlerinin anti-tümöral etkilerine karşı dirençte pi3k ve pkc alt tiplerinin etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Antalya, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2018.
285. Ebbesen SH, Scaltriti M, Bialucha CU et al. Pten loss promotes MAPK pathway dependency in HER2/neu breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113: 3030-3035.
286. Wang Q, Liu P, Spangle JM, et al. PI3K-p110alpha mediates resistance to HER2-targeted therapy in HER2+, PTEN-deficient breast cancers. *Oncogene*. 2016; 35: 3607-3612.
287. Zhang C, Xu B, Liu P. Addition of the p110alpha inhibitor BYL719 overcomes targeted therapy resistance in cells from Her2-positive-PTEN-loss breast cancer. *Tumour Biol*. 2016; 37: 14831-14839.
288. Massacesi C, Di Tomaso E, Urban P et al. PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: implications for clinical trial design. *Onco Targets Ther*. 2016;9: 203-210.
289. Cai T, Zhang C, Zeng X et al. Protective effects of Weipixiao decoction against MNNG-induced gastric precancerous lesions in rats. *Biomed Pharmacother*. 2019; 120:109427.
290. Zhu YF, Yu BH, Li DL et al. PI3K expression and PIK3CA mutations are related to colorectal cancer metastases. *World J Gastroenterol*. 2012; 18:3745-3751.
291. Zhang L, Chen C, Duanmu J et al. Cryptotanshinone inhibits the growth and invasion of colon cancer by suppressing inflammation and tumor angiogenesis through modulating MMP/TIMP system, PI3K/Akt/mTOR signaling and HIF-1 α nuclear translocation. *Int Immunopharmacol*. 2018; 65:429-437.
292. Kumar S, Agnihotri N. Piperlongumine, a piper alkaloid targets Ras/PI3K/Akt/mTOR signaling axis to inhibit tumor cell growth and proliferation in DMH/DSS induced experimental colon cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019; 109:1462-1477.
293. Cai W, Olafsen T, Zhang X et al. PET imaging of colorectal cancer in xenograft-bearing mice by use of an 18F-labeled T84.66 anti-carcinoembryonic antigen diabody. *J Nucl Med*. 2007; 48:304-310.

294. Ahmad B, Gul B, Ali S, Bashir S, Mahmood N, Ahmad J, Nawaz S. Comparative study of carcinoembryonic antigen tumor marker in stomach and colon cancer patients in khyber pakhtunkhwa. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16:4497-4502.
295. Al-Saady RK, Al-Tai WF, Himdan TA. Determination of cancer antigen CA15-3 and carcino embryonic antigen CEA concentration as tumor markers in patients with stomach and colorectal cancers. *J Facul Med Baghdad*. 2012; 54:256-258.
296. Liu X, Cai H, Wang Y. Prognostic significance of tumor markers in T4a gastric cancer World. *World J Surg Oncol*. 2012; 10: 1-9.
297. Moldrich G, Lange P, Strick H. Carcinoembryonic antigen in the CSF of Cancer Patients - the value of intrathecal synthesis and correlation with IgA-diffusion dynamics. *Acta Neural Belg* 2010; 110: 314-320.
298. Feng F, Tian Y, Xu G et al. Diagnostic and prognostic value of CEA, CA19-9, AFP and CA125 for early gastric cancer. *BMC Cancer*. 2017; 17:737.
299. Stojkovic Lalosevic M, Stankovic S, Stojkovic M et al. Can preoperative CEA and CA19-9 serum concentrations suggest metastatic disease in colorectal cancer patients? *Hell J Nucl Med*. 2017; 20:41-45.
300. Li N, Xiao B, Chen XB, et al. Relationship between expression of CEA, E-cadherin and liver metastasis in colorectal cancer. *Chin J Clin Oncol* 2008; 5:429-32.
301. Ganaie MA, Al Saeedan A, Madhkali H et al. Chemopreventive efficacy zingerone (4-[4-hydroxy-3-methylphenyl] butan-2-one) in experimental colon carcinogenesis in Wistar rats. *Environ Toxicol*. 2019; 34:610-625.
302. Zhang HX, Liu DD, Jin BJ et al. Changes of serum trace elements, AFP, CEA, SF, T3, T4 and IGF-II in different periods of rat liver cancer. *Chin J Cancer Res*. 2011; 23:301-305.
303. Iliemene UD, Atawodi SE. Preventive potential of dietary inclusion of *Brachystegia eurycoma* (Harms) seeds on N-methyl-N-nitrosourea-induced colon carcinogenesis in Wistar rats. *J Ethnopharmacol*. 2019; 238:111858.
304. Sadik NA, Shaker OG. Inhibitory effect of a standardized pomegranate fruit extract on Wnt signalling in 1, 2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Dig Dis Sci*. 2013; 58:2507-2517.
305. Samanta D, Gilkes DM, Chaturvedi P, Xiang L, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(50): E5429–E38.

306. Harrison H, Pegg HJ, Thompson J, Bates C, Shore P. HIF1- α expressing cells induce a hypoxic-like response in neighbouring cancer cells. *BMC Cancer*. 2018; 18:674.
307. Ma J, Mi C, Wang KS, Lee JJ, Jin X. Zinc finger protein 91 (ZFP91) activates HIF-1 α via NF- κ B/p65 to promote proliferation and tumorigenesis of colon cancer. *Oncotarget*. 2016; 7:36551-36562.
308. Nagaraju GP, Bramhachari PV, Raghu G and El-Rayes BF. Hypoxia inducible factor-1 α : Its role in colorectal carcinogenesis and metastasis. *Cancer letters*. 2015; 366:11-18.
309. Liang J, Qian Y, Xu D, Yin Q, Pan HJ. Serum tumor markers, hypoxia-inducible factor-1 α HIF-1 α and vascular endothelial growth factor, in patients with non- small cell lung cancer before and after intervention. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14:3851-3854.
310. Qin J, Liu Y, Lu Y et al. Hypoxia-inducible factor 1 α promotes cancer stem cells-like properties in human ovarian cancer cells by upregulating SIRT1 expression. *Sci Rep*. 2017; 7:10592.
311. Simiantonaki N, Taxeidis M, Jayasinghe C, Kurzik-Dumke U, Kirkpatrick CJ. Hypoxia-inducible factor 1 α expression increases during colorectal carcinogenesis and tumor progression. *BMC Cancer* 2008; 8:320.
312. Greijer AE, Delis-van Diemen PM, Fijneman RJA et al. Presence of HIF-1 and related genes in normal mucosa, adenomas and carcinomas of the colorectum. *Virchows Arch* 2008; 452:535-544.
313. Baltaziak M, Wincewicz A, Kanczuga-Koda L et al. The relationships between hypoxia-dependent markers: HIF-1 α , EPO and EPOR in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2013; 51:320-325.
314. Andrade FO, Furtado KS, Heidor R et al. Antiangiogenic effects of the chemopreventive agent tributyrin, a butyric acid prodrug, during the promotion phase of hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2019; 40:979-988.
315. Zonta YR, Martinez M, Camargo IC et al. Melatonin reduces angiogenesis in serous papillary ovarian carcinoma of ethanol-preferring rats. *Int J Mol Sci*. 2017;18. pii: E763.
316. Mladenova DN, Dahlstrom JE, Tran PN et al. HIF1 α deficiency reduces inflammation in a mouse model of proximal colon cancer. *Dis Model Mech*. 2015; 8:1093-1103.
317. Mailand N, Seymour IG, Jensen SB. Regulation of PCNA protein interactions for genome stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013; 14:269-282.

318. Malkas LH, Herbert BS, Abdel-Aziz W, et al. A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:19472-19477.
319. Guo JL, Gu SQ, Li Y, Zhang XY. Evaluation of clinical significance of endoglin expression during breast cancer and its correlation with ER and PCNA. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017; 21:5402-5407.
320. Abike Faruk, Zengeroğlu Sema, Dünder İlkan. Epitelyal Olmayan Over Kanserlerinde Pcn a Ekspresyonu ve Prognoza Etkileri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 2010, 13.
321. Hu L, Li HL, Li WF et al. Clinical significance of expression of proliferating cell nuclear antigen and E-cadherin in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2017; 23:3721-3729.
322. Zhang CL, Zeng T, Zhao XL, Xie KQ. Garlic oil suppressed nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinoma in rats by inhibiting PI3K-AKT-NF- κ B Pathway. *Int J Biol Sci*. 2015; 11:643-651.
323. Verma S, Das P, Kumar VL. Chemoprevention by artesunate in a preclinical model of colorectal cancer involves down regulation of β -catenin, suppression of angiogenesis, cellular proliferation and induction of apoptosis. *Chem Biol Interact*. 2017; 278:84-91.
324. Tahir M, Rehman MU, Lateef A et al. Diosmin abrogates chemically induced hepatocarcinogenesis via alleviation of oxidative stress, hyperproliferative and inflammatory markers in murine model. *Toxicol Lett*. 2013; 220:205-218.
325. Gening TP, Antoneeva II, Abakumova TV, et al. Dynamics of proinflammatory cytokine levels and their role in the development of local and systemic effects during progressing cervical cancer. *Bull Exp Biol Med*. 2014; 157:776-780.
326. Lumachi F, Orlando R, Marino F, Chiara GB, Basso SM. Expression of p53 and Ki-67 as prognostic factors for survival of men with colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2012; 32:3965-3967.
327. Ahmed HH, Shousha WG, Shalby AB et al. Curcumin: a unique antioxidant offers a multimechanistic approach for management of hepatocellular carcinoma in rat model. *Tumour Biol*. 2015; 36:1667-1678.
328. Silva RM, Campanholo VM, Paiotti AP et al. Chemopreventive activity of grape juice concentrate (G8000TM) on rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015;40:870-875.

329. Khan R, Rehman MU, Khan AQ, Tahir M, Sultana S. Glycyrrhizic acid suppresses 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis in Wistar rats: Alleviation of inflammatory, proliferation, angiogenic, and apoptotic markers. *Environ Toxicol.* 2018;33:1272-1283.



8. ÖZGEÇMİŞ

05.01.1987 tarihinde Elazığ'da doğdum. İlk, orta, lise ve üniversite öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 2014 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Programı Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimimi tamamladıktan sonra aynı ana bilim dalında doktora eğitimime başladım. 2015 yılında Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında ÖYP araştırma görevlisi olarak göreve başladım.