

**PALLADYUM (II) BİLEŞİĞİ VE CANERTİNİBİN
KOLON KANSER HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİSİTE,
ANJİYOGENEZ, İLAÇ DİRENÇLİLİĞİ VE OTOFAJİ
MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Şeyma AYDINLIK



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PALLADYUM (II) BİLEŞİĞİ VE CANERTİNİBİN
KOLON KANSER HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİSİTE,
ANJİYOGENEZ, İLAÇ DİRENÇLİLİĞİ VE OTOFAJİ
MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Şeyma AYDINLIK

Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2017
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Şeyma AYDINLIK tarafından hazırlanan “Palladyum (II) bileşiği ve canertininbin kolon kanser hücrelerinde sitotoksisite, anjiyogenez, ilaç dirençliliği ve otofaji mekanizmaları üzerine etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

Başkan: Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,

Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Engin ULUKAYA

İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Ferda ARI

Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,

Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Elif İLKAY ARMUTAK

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,

Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Arzu Yılmaztepe ORAL

Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İmza

İmza

İmza

İmza

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım


Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

29/12/2017

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

29/12/2017

Şeyma AYDINLIK

ÖZET

Doktora Tezi

PALLADYUM (II) BİLEŞİĞİ VE CANERTİNİBİN KOLON KANSER HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİSİTE, ANJİYOGENEZ, İLAÇ DİRENÇLİLİĞİ VE OTOFAJİ MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Şeyma AYDINLIK

Uludağ Üniveristesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

Metastatik kolon kanseri agresif kemoterapi rejimlerinin kullanılmasına rağmen, % 5'den az bir hayatta kalma oranına sahiptir. Kolon kanserinde epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) prognostik ve prediktif önemi hala tartışmalıdır. Bu nedenle EGFR reseptörünü bloke etmek amacıyla bu çalışmada tirozin kinaz inhibitörü canertinib kullanılmıştır. Bu amaçla Uludağ üniversitesi kimya bölümü tarafından sentezlenen Palladyum(Pd) (II) bileşiği [PdCl(terpy)](sac).2H₂O ve bu bileşiğin canertinib ile kombinasyonunun etkileri araştırılmıştır. Ayrıca kemoterapötik ilaç 5-Fluorourasil (5-FU) ve bu ajanın canertinib ile kombinasyonu ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, Palladyum (II) bileşiği ile canertinib tek başına ve kombinasyon tedavileri ve aynı şekilde 5- Fluorourasil ve bu ajanın canertinib ile kombinasyonunun insan kolon kanseri hücre soyları (HCT-15, HT-29) üzerine sitotoksik etkileri SRB canlılık testi ile belirlenmiştir. Kombinasyon tedavisinin sitotoksik etkilerinden sorumlu hücre ölümü (apoptozis/otofaji) akım sitometrisi, hücrelerde apoptoz varlığı Anneksin-V-Cy3/SYTOX ikili boyama yöntemi ile asidik veziküller organellerin varlığı akridin boyaması ile mitokondri depolarizasyonu tetra etil benzimidazol karboksinin iyodür (JC-1) ile floresan mikroskopta görüntülenerek desteklenmiştir. EGFR ilişkili yaşam yollarında, bu reseptörün inhibe edilmesi ile gerçekleşen değişimler, epidermal mezenkimal dönüşüm (EMT) ile ilişkili proteinlerdeki değişimler ve apoptoz/otofaji ilişkili proteinlerdeki değişimler ise western blot yöntemi ile değerlendirildi. Bunun dışında ilaç taşıyıcı proteinler üzerine etkisi MDCKII polarize hücre soyları kullanılarak önce SRB yöntemi ile daha sonra ilişkili proteinlerdeki değişimler western blot ile belirlendi. Ayrıca bu yaşam yolağının inhibisyonunun kombinasyon tedavileri ile birlikte invazyon, yara iyileşmesi ve koloni oluşturma yetenekleri üzerine etkileri belirlendi. Son olarak HUVEC endotel hücrelerinde EGFR inhibisyonunun kombinasyon tedavileri ile birlikte tüp oluşturma yeteneği in vitro matrigel testi ile ve damar oluşumu üzerine etkileri ayrıca in vivo Chorio-allantoik membran (CAM) testi ile değerlendirildi. Sonuç olarak, Pd (II) bileşiği ve canertinib kombinasyonunun kolon kanseri hücre soylarında sitotoksik aktivite ve apoptoz artışına, invazyon, yara iyileşmesi yeteneklerinde ve damar oluşumunda azalmaya neden olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Trozin kinaz inhibitörleri, Anjiyogenez, Otofaji, EMT, İlaç dirençliliği

2017, xvi + 180 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

EFFECTS OF PALLADIUM (II) COMPOUND AND CANERTINIB ON CYTOTOXICITY, ANGIOGENESIS, DRUG RESISTANCE AND AUTOPHAGIC MECHANISM IN COLON CANCER CELLS

Şeyma AYDINLIK

Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Egemen DERE

Metastatic colon cancer has a survival rate less than %5 despite the use of effective chemotherapeutic regimen. Prognostic and predictive importance of epidermal growth factor receptor (EGFR) is still contradictive in colon cancer. For this reason, the tyrosine kinase inhibitor canertinib was used in this study to block the EGFR receptor. The effect of Palladium (Pd) (II) compound [PdCl(terpy)](sac).2H₂O] which was synthesized by Uludağ University chemistry department and canertinib alone and the effect of Pd(II) compound and canertinib combination treatment was investigated in this study. 5-fluorouracil (5-FU), a chemotherapeutic drug commonly used in the treatment of cancer and its combination with canertinib was used as positive control. Therefore, the cytotoxic effects of the combination of Palladium (II) compound and EGFR inhibitor canertinib and the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil and canertinib combination on human colon cancer cell line (HCT-15, HT-29) were also determined by the SRB viability test. Cell death (apoptosis/autophagy) responsible for the cytotoxic effects of the combination therapy, presence of apoptosis in cells and the presence of acidic vesiculations, mitochondrial depolarization were determined by flow cytometry, Annexin-V-Cy3/SYTOX dual staining method, acridine staining and tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) staining respectively. Alterations in proteins related with EGFR-associated survival pathway and alterations in proteins associated with epidermal mesenchymal transformation (EMT) and transformation in apoptosis/autophagy-related proteins were evaluated by western blot. In addition, effects on drug carrier proteins were first determined by SRB method using MDCKII polarize cell lines and then changes in proteins were determined by western blot. Also, effects of inhibition of this life pathway with combination therapy together on invasion, wound healing and colony forming ability were determined. Finally, effects of EGFR inhibition with combination treatments together on the ability to form tubes in HUVEC endothelial cells was assessed by in vitro matrigel test and the effects on vessel formation were also assessed by in vivo Chorio Allantoic Membrane (CAM) test. In conclusion, the combination of Pd (II) compound and canertinib has been shown to increase cytotoxic activity, induced apoptosis, decreased invasion, wound healing abilities and vessel formation in colon cancer cell lines.

Keywords: Tyrosine kinase inhibitors, Angiogenesis, Autophagy, EMT, Drug resistance

2017, xvi + 180 pages

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım sırasında danışmanlığımı yapan, eğitimimin düzenli işleyişi için büyük bir özveri gösteren değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE'ye

Doktora eğitimim boyunca, bilimsel kariyerime tüm bilgi ve tecrübeleriyle bıkmadan destek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya, bir yandan özgürce çalışmamıza izin verip diğer yandan ihtiyacımız olduğunda hep yanımızda olduğunuzu hissettirdiniz. Bu sayede daha organize ve daha sorumluluk sahibi biri olduğuma inanıyorum. Tüm katkılarınız ve bana grubunuzda çalışma fırsatı tanıdığınız için minnettarım.

Doktora eğitimim sırasında birlikte yaptığımız çalışmalarla stresi, sevinci, kızgınlığı birlikte yaşayıp her daim kendisinin moral verici konuşmaları ve hep yanımda olduğunu hissettirmesiyle işin üstesinden beraber geldiğimiz çok değerli hocam Prof. Dr. Elif İlkay ARMUTAK'a, kırılma anlarımda hissedip beni arayarak çalışmalarına devam edebilmem ve yeni projelere odaklanabilmem için gereken cesareti bana verdiğiniz için çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince sorularımı asla yanıtsız bırakmayan ve destekleriyle hep yanımda olan değerli hocalarım, Sayın Doç. Dr. Ferda ARI'ya ve Sayın Doç. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL,

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerimizi paylaştığımız değerli çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Ayrıca hayatımda varlıkları hep mutluluk olan isimleri sayamayacağım kadar çok olan ve beni hep destekleyen dostlarıma teşekkürü bir borç bilirim. Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimine bu çalışmayı destekledikleri için teşekkür ederim (DDP(F)-2017).

Babam Mehmet AYDINLIK ve Annem Kerime AYDINLIK, şu an yazacağım tüm sözler beni bile tatmin etmiyor fakat size ne kadar teşekkür etsem yetmez. Ben ne kadar bunaldıysam siz de benimle bunaldınız, ne kadar sevinip üzüldüysem siz de benimle birlikte aynı duyguları yaşadınız. Her türlü duygu durumunda bana eşlik ettiniz. Bir anne babanın çocukları açısından yaşabileceği zorlukların üstüne ben bir de doktora zorluğunu kattım. Fakat siz herkese karşı durarak beni desteklediniz, maddi ve manevi olarak çalışmadığım için kendimi kötü hissetmemem için elinizden geleni yaptınız. Bu yüzden başarım aynı zamanda sizin başarınızdır.

Canımdan parça olan kardeşlerim Suna KAYAN ve Ahmet AYDINLIK, tüm doktora süresinde benim gizli destekçilerim oldunuz. Bu süreçte yüzümün gülümseme sebebiydiniz. Laboratuvarıda gecelere kadar kaldım, yollarda kaldım ama siz hep telefonun diğer ucundaydınız. Beceremem dediğim şeylerde bana yol gösterdiniz, akıl verdiniz ve olmadı işin ucundan tutunuz. Hayatımda önemli olan hiçbir anda sizin olmadığınız bir an olmadı. Hep fazla fazla oldunuz. Başarımdan duyduğunuz mutluluğu ve gururu her zaman hissettim. Varlığınız ve sevginiz için sonsuz teşekkür ederim.

Şeyma AYDINLIK

29/12/2017

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|-------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| Sayfa..... | iv |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | xi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xvii |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2.KAYNAK ÖZETLERİ | 3 |
| 2.1.Kolon Anatomisi ve Fizyolojisi | 3 |
| 2.2. Kolon Kanseri, Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi | 3 |
| 2.3. Kolon Kanseri Histolojisi..... | 8 |
| 2.4. Kolon Kanseri Moleküler Biyolojisi..... | 9 |
| 2.5. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)..... | 12 |
| 2.5.1. Kolon kanserinde EGFR ekspresyonu | 16 |
| 2.5.2. Tirozin kinaz inhibitörleri | 17 |
| 2.6. Apoptozis | 19 |
| 2.6.1. Apoptotik hücrede görülen morfolojik değişiklikler..... | 20 |
| 2.6.2. Apoptozis mekanizması | 21 |
| 2.6.3. Kaspazların apoptozis sürecindeki rolü | 24 |
| 2.6.4. Mitokondri dış membran permeabilizasyonu (MOMP)..... | 25 |
| 2.7. Otofaji | 27 |
| 2.8.Anjiyogenez | 31 |
| 2.8.1. Anjiyogenez mekanizması | 32 |
| 2.9.İlaç Dirençliliği | 33 |
| 2.9.1.İlaç efluks mekanizması | 34 |
| 2.10. Palladyum (II) Bileşiği Yapısı ve Kanseri Tedavisindeki Yeri | 37 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM..... | 39 |
| 3.1. Materyal | 39 |
| 3.1.1. Hücre kültürü malzemeleri ve kimyasal maddeler..... | 39 |
| 3.1.2. Sarf malzemeler | 40 |

| | |
|--|----|
| 3.1.3. Cihazlar | 41 |
| 3.2. Yöntem..... | 42 |
| 3.2.1. Hücre kültürü | 42 |
| 3.2.2. Kullanılan besiyerinin hazırlanması..... | 42 |
| 3.2.3. Palladium(II) terpiridin sakkarinat bileşiğinin [PdCl(terpy)](sac).2H ₂ O], Klorokin ve Canertinibin Hazırlanması..... | 42 |
| 3.2.4. Hücre soylarının stoktan çıkartılması..... | 43 |
| 3.2.5. Hücre soylarının pasajlanması | 43 |
| 3.2.6. Hücre stoklanması..... | 43 |
| 3.2.7. Hücrelerin sayımı | 44 |
| 3.2.8. Sulforhodamine B (SRB) hücre canlılık testi | 44 |
| 3.2.9. Anneksin-V boyama metodu..... | 47 |
| 3.2.10. Akım sitometri analizleri | 49 |
| 3.2.10.1. Anneksin-V testi | 49 |
| 3.2.10.2. Mitokondri membran potansiyeli testi | 51 |
| 3.2.10.3. Kaspaz 3/7 testi | 52 |
| 3.2.10.4. Gamma H2A.X aktivasyonu ile DNA hasarının belirlenmesi | 54 |
| 3.2.10.5. Oksidatif stres belirlenmesi..... | 56 |
| 3.2.10.6. PI3K (Fosfatidilinositol 3 kinaz) aktivasyonunun belirlenmesi..... | 57 |
| 3.2.11.7. Pd(II) bileşiği ve EGFR inhibitörünün otofaji belirteci LC3-II üzerine etkisinin akım sitometrisi ile belirlenmesi | 60 |
| 3.2.12. Koloni oluşturma yeteneği testi | 62 |
| 3.2.13. Hücre migrasyon testi | 62 |
| 3.2.14. Matrijel hücre invazyon testi..... | 62 |
| 3.2.15. Western blot metodu | 63 |
| 3.2.15.1. Western blot analizleri için protein izolasyonu..... | 63 |
| 3.2.15.2. Proteinlerin BCA yöntemi ile konsantrasyonlarının ölçülmesi | 64 |
| 3.2.15.3. SDS-PAGE ve proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılması..... | 64 |
| 3.2.15.4. Membranların bloklanması ve antikor eklenmesi | 65 |
| 3.2.16. Gen ekspresyon analizleri | 66 |
| 3.2.16.1. RNA izolasyonu | 66 |
| 3.2.16.2. cDNA sentezi | 67 |
| 3.2.16.3. Real time PCR ile ekspresyon analizleri..... | 68 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.17. Akridin boyama..... | 69 |
| 3.2.18. JC-1 boyama | 70 |
| 3.2.19. Tüp oluşum testi..... | 71 |
| 3.2.20. CAM (Chorio-allantoik membran) testi..... | 71 |
| 3.2.21. İstatistiksel analiz | 74 |
| 4. BULGULAR..... | 75 |
| 4.1. Canertinib ve Pd(II) Bileşiğinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin SRB Canlılık Metodu ile Belirlenmesi..... | 75 |
| 4.2. HCT-15 ve HT-29 Hücrelerinde Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin EGFR ve Diğer Yaşam Yolakları Üzerine Etkileri..... | 83 |
| 4.3. Tüm Hücre Soylarında Pd(II) Bileşiği ve Canertinib Kombinasyonunun Apoptoz mekanizması üzerine etkileri..... | 87 |
| 4.3.1. Apoptozun belirlenmesine ilişkin Anneksin-V ölçülmesinin boyama ile değerlendirilmesi..... | 87 |
| 4.3.2. Tüm hücre soylarında apoptozun belirlenmesine ilişkin Anneksin-V ölçülmesinin akım sitometrisi ile değerlendirilmesi..... | 91 |
| 4.3.3. Apoptotik ölüm mekanizmasının belirlenmesinde tüm hücre soylarında mitokondriyal membran potansiyeli ve JC-1 boyama sonuçlarının değerlendirilmesi... | 93 |
| 4.3.4. Tüm hücre soylarında apoptozun belirlenmesine ilişkin kaspaz3/7 ölçülmesinin akım sitometrisi ile değerlendirilmesi..... | 98 |
| 4.3.5. Tüm hücre soylarında apoptoz ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi | 99 |
| 4.4. Kullanılan Pd(II) Bileşiği ve Trozin Kinaz İnhibitörü Canertinib ile Kombinasyonunun Otofaji Üzerine Etkisi | 101 |
| 4.5. Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin HCT-15, HT-29 Hücrelerinin İnvazyon Yetenekleri Üzerine Etkisi | 111 |
| 4.6. Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin HCT-15, HT-29 Hücrelerinin Koloni Oluşturma Yetenekleri Üzerine Etkisi | 114 |
| 4.7. Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin HCT-15, HT-29 Hücrelerinin Göç Etme (Migrasyon) Yetenekleri Üzerine Etkisi | 115 |
| 4.8. Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin HCT-15, HT-29 Hücrelerinde Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMT) Süreci ile İlişkili Proteinler Üzerine Etkisi..... | 116 |
| 4.9. Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin HCT-15, HT-29 Hücrelerinde DNA Hasarı Üzerine Etkisi..... | 117 |
| 4.10. HCT-15, HT-29 Hücrelerinde Pd(II) ve Canertinib Bileşikleri ile Tedavi Sonucu Oksidatif Stresin (ROS) Belirlenmesi..... | 120 |

| | |
|---|-----|
| 4.11. Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin İlaç Dirençliliği Üzerine Etkileri..... | 123 |
| 4.12. HCT-15, HT-29 Hücrelerinde Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin Anjiyogenez Üzerine Etkileri | 125 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ | 132 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ | 149 |
| ÖZGEÇMİŞ | 178 |



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|----------------|--------------------------------------|
| 5-FU | 5-Flurourasil |
| 7-AAD | 7-Aminoaktinomisin D |
| ABC | ATP bağlayıcı kaset |
| ACF | Anormal kript odaklama |
| AIF | Apoptozis indükleyici faktör |
| AKT | Protein kinase B |
| Apaf-1 | Apoptotik proteaz aktive eden faktör |
| APC | Adenomatöz polipozis koli |
| ATP | Adenozin trifosfat |
| AVs | Otofojik vakuoller |
| BCA | Biçinkoninik asit |
| BH | Bcl-2 homoloji bölgeleri |
| BCRP | Meme kanseri direnci proteini |
| BSA | Sığır serum albümin |
| CI-1033 | Canertinib |
| CAD | Kaspaz aktive edici DNaz |
| CARD | Kaspaz takviye domain |
| CIN | Baskın kromozomal instabilite |
| CIMP | CpG adası metilasyon fenotipi |
| DED | Ölüm etkileyici domain |
| DISC | Ölüm indükleyici sinyal kompleksi |
| DMSO | Dimetilsulfoksit |
| DNA | Deoksi ribonükleik asit |
| EDTA | Etilen Diamin Tetraasetik Asit |

| | |
|---------------------------------|---|
| EGF | Epidermal büyüme faktörü |
| EGFR | Epidermal büyüme faktör reseptörü |
| EMT | Epidermal mezenkimal dönüşüm |
| ERK | Ekstraselüler sinyal düzenleyen kinaz |
| FAP | Ailesel adenomatöz polipozis |
| FADD | Fas ilişkili ölüm alanı |
| FBS | Fetal sığır serumu |
| FITC | Fluoresin izotiyosiyanat |
| FGF | Fibroblast büyüme faktörü |
| Grb2 | Büyüme faktörü reseptör protein 2 adaptör protein |
| GST | Glutasyon S-transferaz |
| GTP | Guanozin trifosfat |
| HIF-1α | Hipoksi ile uyarılabilir faktör-1 α |
| HNPCC | Kalıtımsal nonpolifozit kolorektal kanser |
| IGF | İnsülin benzeri büyüme faktörü |
| kDa | KiloDalton |
| LIR | LC3 etkileşim bölgesi |
| MAPK | Mitojen aktive protein kinaz |
| MDR1 | Çoklu ilaç direnci protein 1 |
| MOMP | Mitokondri dış membran permeabilizasyonu |
| MMR | DNA uyuşmazlığı onarım |
| MMP | Matriks metalloproteinazları |
| MRP1 | Çoklu ilaca dirençle ilişkili protein 1 |
| MSI | Mikrosatellit istikrarsızlığı |
| mTOR | Rapamisin hedefi |
| PARP | Poli(ADP-riboz)polimeraz |

| | |
|-----------------|---|
| PBS | Fosfat tuz tamponu |
| PCR | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| Pd | Palladyum |
| PI | Propidyum iyodür |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-kinaz |
| PIP2 | Fosfatidilinositol (4, 5) bisfosfat |
| PIP3 | Fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfat |
| PS | Fosfatidil serin |
| PTEN | Fosfataz ve tensin homolog proteini |
| PTP | Permeabilizasyon geçiş poru |
| RNA | Ribo nükleik asit |
| ROS | Reaktif oksijen türleri |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute Medium |
| SDS | Sodyum dodesil sülfat |
| SDS-PAGE | SDS- Poliakrilamid Jel Elektroföresi |
| SRB | Sulforhodamine B |
| TCA | Trikloroasetik asit |
| TK | Tirozin kinaz |
| TKI | Tirozin kinaz inhibitörleri |
| TGF | Transforme edici büyüme faktörü |
| TNF | Tümör nekrozis faktör |
| TRAIL | TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand |
| VEGF | Vasküler endotelial büyüme faktörü |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1. Kolonun bölümleri | 4 |
| Şekil 2.2. Ligand bağlanması ile EGFR proteinin yapısı (A), aktivasyonu (B) ve dimerizasyonu (C) (Tetsuya ve Yasushi 2010)..... | 14 |
| Şekil 2.3. EGFR sinyal yolağı (Tetsuya ve Yasushi 2010)..... | 15 |
| Şekil 2.4. Canertinib kimyasal yapısı..... | 19 |
| Şekil 2.5. Apoptozis ve Nekrozisin şematik karşılaştırılması..... | 21 |
| Şekil 2.6. Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu | 23 |
| Şekil 2.7. Kaspaz aktivasyonunun mitokondriyal yolu (A) Apoptozom oluşumu ve aktivasyonu (B) | 24 |
| Şekil 2.8. Memeli kaspazlarının yapıları ve alt birim organizasyonları | 25 |
| Şekil 2.9. Apoptozis'in Bcl-2 ailesi tarafından düzenlenmesi | 27 |
| Şekil 2.10. Makrotofaji (Gump ve ark. 2011)..... | 29 |
| Şekil 2.11. Otofaji ve apoptoz arasındaki ilişki (Tait ve ark. 2014) | 30 |
| Şekil 2.12. Pd(II) bileşiğinin kimyasal yapısı | 38 |
| Şekil 3.1. SRB testinin uygulanması (Houghton ve ark. 2007 değiştirilerek alınmıştır) | 45 |
| Şekil 3.2. Apoptotik hücrelerde fosfotidil serin translokasyonu (Anonim 2011). | 48 |
| Şekil 3.3. Anneksin-V-FITC Boyama (Anonim 2013a) | 51 |
| Şekil 3.4. Mitokondri Membran Potansiyelinin Ölçülmesi (Anonim 2013b)..... | 52 |
| Şekil 3.5. Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Ölçülmesi (Anonim 2013c)..... | 54 |
| Şekil 3.6. DNA Hasarının (γ -H2AX) Ölçülmesi (Anonim 2013d)..... | 56 |
| Şekil 3.7. Oksidatif Stres Miktarının (ROS) Ölçülmesi (Anonim 2014e). | 57 |
| Şekil 3.8. PI3K/AKT sinyal yolağı (Anonim 2013f). | 58 |
| Şekil 3.9. p-Akt (Ser473) düzeyinin ölçülmesi (Anonim 2013f)..... | 60 |
| Şekil 3.10. LC3-II miktarının belirlenmesi (Anonim 2013g) | 61 |
| Şekil 4.1. Pd (II) bileşiği uygulanan HCT-15 ve HT-29 hücre soylarının canlılık yüzdelerinin grafiği. | 76 |
| Şekil 4.2. Otofaji inhibitörü ve EGFR inhibitörü uygulanan HCT-15, HT-29 hücre soylarının canlılık yüzdelerinin grafiği. | 78 |
| Şekil 4.3. 5-FU'nun (2,7-173 μ M) HCT-15 HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin canlılığa etkisinin doza bağlı olarak değişimi. | 80 |
| Şekil 4.4. Pd (II) bileşiğinin farklı konsantrasyonları ile canertinib inhibitörü kombinasyonunun 24 saat kombinasyon tedavisi sonucu HCT-15, HT-29 kanser hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği. | 81 |
| Şekil 4.5. 5-FU kemoterapötik ajanı, canertinib (5 μ M) inhibitörü ile 5-FU ajanının farklı konsantrasyonları ile 24 saat kombinasyon tedavisi sonucu HCT-15, HT-29 kanser hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği. | 82 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.6. Seçilen Pd(II) bileşiği (12,5 µM), Canertinib (5 µM), 5-FU (10,8 µM) dozlarında kombinasyon tedavisi sonucu HCT-15 ve HT-29 hücrelerinin yüzde canlılık grafiği. | 83 |
| Şekil 4.7. Pd(II) bileşiğinin canertinib ile kombinasyonun EGFR, ERK,P38 yaşam yolları üzerine etkisi | 84 |
| Şekil 4.8. Pd(II) bileşiğinin HCT-15 (A) ve HT-29 (B) kolon kanser hücresinde canertinib ile kombinasyonun AKT yaşam yolağı üzerine etkisi | 86 |
| Şekil 4.9. Pd (II) bileşiği, 5-FU, Canertinib tek başına ve Canertinibin Pd (II) bileşiği ve 5-FU kemoterapötik ajanı ile kombinasyonunun HCT-15 kanser hücrelerinde tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri. Anneksin-V (Kırmızı), SYTOX ile boyama (Yeşil)..... | 88 |
| Şekil 4.10. Pd (II) bileşiği, 5-FU, Canertinib tek başına ve Canertinibin Pd (II) bileşiği ve 5-FU kemoterapötik ajanı ile kombinasyonunun HT-29 kanser hücrelerinde tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri..... | 90 |
| Şekil 4.11. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrasında HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramları | 92 |
| Şekil 4.12. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrasında HT-29 kolon kanseri hücrelerinde Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramları | 93 |
| Şekil 4.13. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde histogramları..... | 94 |
| Şekil 4.14. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubu ve klorokin (10 µM) 24 saat ön tedavi sonrasında, Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat tedavi sonrası grubu ve bu bileşiklerin üçlü kombinasyon grubunun HT-29 kolon kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde histogramları..... | 95 |
| Şekil 4.15. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15, HT-29 kolon kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişiminin ($\Delta\Psi_m$) floresan mikroskop görüntüleri | 97 |
| Şekil 4.16. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramları | 98 |
| Şekil 4.17. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HT-29 kolon kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramları | 99 |

| | |
|---|-----|
| Şekil 4.18. HCT-15 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerinde, Pd (II) bileşiği (6,25µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunda PARP1, FAS, DR4,p-c-jun, p-Src, Bax protein ekspresyonlarının western blot yöntemiyle alınan sonuçları | 101 |
| Şekil 4.19. Otofaji inhibitörü uygulanan HCT-15, HT-29, hücre soylarının canlılık yüzdelerinin grafiği. | 102 |
| Şekil 4.20. HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde, Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubu ve klorokin (10 µM) 24 saat ön tedavisi sonrasında, Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat tedavi sonrası grubunda Atg5, p62, mTOR protein ekspresyonlarının western blot yöntemiyle alınan sonuçları..... | 103 |
| Şekil 4.21. HT-29 kolon kanseri hücrelerinde, Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubu ve klorokin (10 µM) 24 saat ön tedavisi sonrasında, Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat tedavi sonrası grubunda Atg5, p62, protein ekspresyonlarının Western blot yöntemiyle alınan sonuçları | 104 |
| Şekil 4.22. HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücre soyunda EGFR inhibitörü uygulanmasının Pd(II) bileşiği ve 5-FU ajanının p70s6K ve PTEN proteinleri üzerine etkisinin incelenmesi..... | 105 |
| Şekil 4.23.1. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile kombinasyonu ve CQ 24 saat ön tedavi sonrası Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde LC3-II ifadesinin histogramı. | 107 |
| Şekil 4.23.2. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile kombinasyonu ve CQ 24 saat ön tedavi sonrası Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HT-29 kolon kanseri hücrelerinde LC3-II ifadesinin histogramı..... | 108 |
| Şekil 4.24. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubu ve klorokin (10 µM) 24 saat ön tedavi sonrasında, Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde akridin boyama sonuçlarının floresan mikroskop görüntüleri..... | 109 |
| Şekil 4.25. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubu ve klorokin (10 µM) 24 saat ön tedavi sonrasında, Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat tedavi sonrası grubunun HT-29 kolon kanseri hücrelerinde akridin boyama sonuçlarının floresan mikroskop görüntüleri..... | 110 |
| Şekil 4.26. HCT-15 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerinde, Pd (II) bileşiği (12,5µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunda Atg3,Atg5, BECLIN1, gen ekspresyonlarının RT-PCR yöntemiyle alınan | 111 |

| | |
|---|-----|
| Şekil 4.27. HCT-15 kolon kanser hücre soyunda Canertinib uygulanmasının Pd(II) bileşiği ve 5-FU ajanı ile kombinasyonunda invazyon yetenekleri üzerine etkisinin incelenmesi..... | 112 |
| Şekil 4.28. HT-29 kolon kanser hücre soyunda Canertinib uygulanmasının Pd(II) bileşiği ve 5-FU ajanı ile kombinasyonunda invazyon yetenekleri üzerine etkisinin incelenmesi..... | 113 |
| Şekil 4.29. HCT-15 (A) ve HT-29 (B) hücrelerinin canertinib, Pd(II), 5-FU ve bunların canertinib ile kombinasyonlarının uygulaması sonucu koloni oluşturabilme yetenekleri | 115 |
| Şekil 4.30. HCT-15 (A), HT-29 (B) kanser hücre soyunda EGFR inhibitörü uygulanmasının Pd(II) bileşiği ve 5-FU ajanının migrasyon yetenekleri üzerine etkisinin incelenmesi..... | 116 |
| Şekil 4.31. HCT-15 ve HT-29 kanser hücre soyunda EGFR inhibitörü uygulanmasının Pd(II) bileşiği ve 5-FU ajanının EMT proteinleri üzerine etkisinin incelenmesi..... | 117 |
| Şekil 4.32. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde p-γH2AX yüzde değerlerinin histogramı | 118 |
| Şekil 4.33. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HT-29 kolon kanseri hücrelerinde p-γH2AX yüzde değerlerinin histogramı | 119 |
| Şekil 4.34. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15 kolon kanser hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin histogramı | 121 |
| Şekil 4.35. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HT-29 kolon kanser hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin histogramı | 122 |
| Şekil 4.36. Pd(II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubu ve klorokin (10 µM) 24 saat ön tedavi sonrasında, Pd(II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat tedavi sonrası grubunun MDCK dirençli ve duyarlı hücreler üzerine etkisinin SRB yöntemi ile belirlenmesi | 124 |
| Şekil 4.37. Pd(II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun MRP1, MDR protein ekspresyon seviyesi üzerine etkisinin HCT-15 ve HT-29 kanser hücrelerinde western blot yöntemi ile belirlenmesi | 125 |
| Şekil 4.38. Canertinib (1,56-100 µM), Pd(II) bileşiği (1,56-100 µM) ve kombinasyonları ve 5-FU (2,7-173µM) ve kombinasyon dozlarının HUVEC hücrelerinin canlılığa etkisinin doza bağlı olarak değişiminin SRB canlılık metodu ile belirlenmesi | 126 |
| Şekil 4.39. Canertinib (6,25 µM), Pd(II) bileşiği (50 µM) ve kombinasyonları ve 5-FU (86,5 µM) ve kombinasyon dozları ve pozitif kontrol olarak kullanılan bevacizumab'ın | |

| | |
|--|-----|
| (0,125mg/ml) 2 (A)-4 (B)-8 (C)-12 (D) zaman diliminde HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma yetenekleri üzerine etkisinin belirlenmesi..... | 128 |
| Şekil 4.40. Canertinib, Pd(II) bileşiği ve kombinasyonları ve 5-FU ve kombinasyon dozları ve pozitif kontrol olarak kullanılan bevacizumab'ın CAM testi ile anyiyogenez üzerine etkisinin belirlenmesi | 131 |



ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|-----|
| Tablo 3.1. cDNA Sentez Mix Hazırlanışı | 68 |
| Tablo 3.2. Otofaji ile İlişkili Genlerin Primer Dizileri..... | 68 |
| Tablo 3.3. qPCR Master Mix'in Hazırlanışı | 69 |
| Tablo 3.4. CAM üzerinde anjiyogenik etkinin değerlendirilmesi için kullanılan skor değerleri..... | 73 |
| Tablo 4.1. Pd (II) bileşiği uygulanan hücre soylarında SRB canlılık testi sonuçlarına göre 24-48 saat tedavi süresindeki IC50 değerleri | 77 |
| Tablo 4.2. Canertinib, Klorokin, Pd(II) bileşiği ve kombinasyonları ve 5-FU ve kombinasyon dozları ve pozitif kontrol olarak kullanılan bevacizumab'ın Anti-anjiyogenik etkileri..... | 130 |



1.GİRİŞ

Kolon kanseri erkeklerde ve kadınlarda üçüncü en yaygın kanser türüdür ve her iki cinsiyette de kansere bağlı mortalitenin en sık görülen üçüncü sebebini oluşturmaktadır (Anonim 2014). Agresif kemoterapi rejimlerine rağmen, metastatik kolon kanseri halen yaklaşık %10'luk kötü bir 5 yıllık sağkalıma sahiptir ve bu da daha etkin tedavi rejimlerine acil ihtiyaç olduğunu göstermektedir. 5-fluorourasil (5-FU) bazlı rejimlerle tedavi, kolorektal kanserli hastaların tedavisinde uzun süredir kullanılan bir tedavi rejimidir. Halen oxaliptin veya irinotekan ile kombinasyon halinde 5-FU, ileri kolon karsinoması için standart öncü tedavi olmaya devam etmektedir.

Son yüzyıldaki genetik ve moleküler biyolojideki devrim, tümörigenezin moleküler temeli hakkındaki bilgilerimize önemli kazançlar sağladı. Büyüme, apoptoz, farklılaşma ve vaskülarizasyon gibi süreçlerde yer alan sinyal yollarının düzenlenmesi, hastalığın gelişimi ve progresyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Normal hücrelere göre tümör hücrelerinde aşırı aktif olan büyüme faktör yolakları gibi biyolojik yolakları hedefleyen ajanların hem neoplastik hem de normal hücreleri hedefleyen sitotoksik ajanlarla karşılaştırıldığında daha düşük toksisite ihtimali sunarlar.

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve diğerleri gibi reseptörlerin rasyonel olarak hedeflenmesi, yeni antikanser ajanlarının tasarımının arkasındaki önemli bir stratejidir. EGFR'nin aşırı ekspresyonu birçok tümörde sık görülür. Özellikle kolon kanserinde EGFR'nin, tümörlerin %60-80'inde aşırı eksprese edildiği ve zayıf bir prognoz ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Bu sebeplerden dolayı EGFR, küçük molekül inhibitörleri ve monoklonal antikorlarla tedavi için bir lokus olarak hedeflenmiştir ve metastatik hastalığın tedavisinde rol oynamaktadır. Mevcut vaskülatürden yeni damar oluşumu olan anjiyogenez, tümör büyümesi ve metastaz oluşumu için gereklidir. Birçok inhibitör ve stimülatör bu karmaşık, çok aşamalı işlemi düzenler. Endotel hücrelerinin proliferasyon, farklılaşma ve göçünü uyaran vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) anjiyogenezin anahtar stimülatörüdür (Ferrara 2004). EGF reseptörünün onkojenitesi kısmen, VEGF'i upregüle ederek anjiyogenezin teşvik edilmesine aracılık edilebilir (Petit ve ark. 1997). EGFR'nin uyarılması veya inhibisyonunun tümör kaynaklı anjiyogenez için önemli sonuçlara sahip olduğuna dair artan çalışmalar yapılmıştır (Yen ve ark. 2002, Ellis 2004). Bu çalışmada da EGFR fonksiyonunun anjiyogenezle ilgili yönlerini ve EGFR hedefli tedavilerin tümör

kaynaklı anjiyogenez üzerindeki etkisi ele alınmıştır. Ayrıca tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç, klinik çalışmalarda giderek daha fazla kullanıldığından ve hastalara uygulanmasından dolayı sıklıkla çalışılmaktadır (Janne ve ark. 2009, Sierra ve ark. 2010). ATP bağlayan kaset (ABC) ilaç taşıyıcılarının ekspresyonundan kaynaklanan direnç, tirozin kinaz inhibitörlerine yapıcı ve kazanılmış ilaç direnci için belirtilen mekanizmalardan biridir (Mahon ve ark. 2003, Hirayama ve ark. 2008, Assef ve ark. 2009). Bu taşıyıcılar tarafından kemoterapötiklerin enerjiye bağlı eflüksüsü çoklu ilaç direncinin (MDR) gelişimine neden olur ve esasen P- glikoprotein (P-gp) ve meme kanseri rezistans proteini (BRCP) tarafından tirozin kinaz inhibitörlerin eflüksüsü da bu ajanlara direncin gelişmesine katkıda bulunan faktörler olarak rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada ayrıca kullanılan bileşiklerin ve tirozin kinaz inhibitörünün ilaç taşıyıcıların üzerine etkisi araştırılmıştır.

Bu nedenle bu çalışmada, kolon kanseri hücrelerinde öncelikle Pd(II) bileşiği ve pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU kemoterapötik ajanın etkilerinin yanısıra, tirozin kinaz inhibitörü canertinib ile EGFR inhibisyonunun bu ajanlarla birlikte, apoptoz, otofaji, ilaç dirençliliği, anjiyogenez, EMT üzerine etkileri araştırıldı. Bu çalışma canertinib aracılığıyla EGFR inhibisyonunun hücrenin farklı moleküler mekanizmaları üzerine etkisini gösteren ilk çalışmadır.

2.KAYNAK ÖZETLERİ

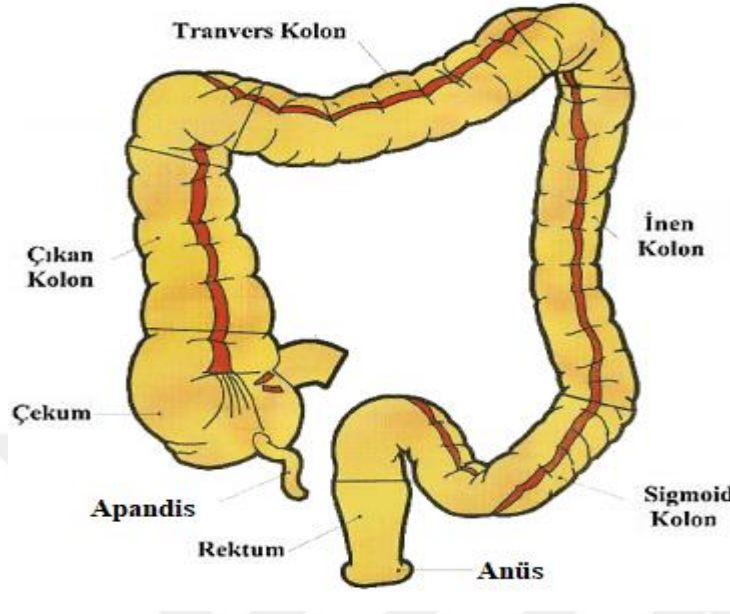
2.1.Kolon Anatomisi ve Fizyolojisi

Kolorektal kanser terimi, çekum, artan (sağ) kolon, transvers kolon, inen (sol) kolon, sigmoid kolon ve rektum olarak bölünen alt gastrointestinal sistemde ortaya çıkan kanseri tanımlar. Geniş barsak (kolorektum), yaklaşık iki ila üç inç uzunluğunda bir kese olan çekum ile başlar. Apandis, çekumun tabanından çıkar. Artan kolon, sağ üst kadranda ve karaciğerin alt yüzeyine doğru çekumdan sağ posterior duvarı boyunca Transvers kolon, sol üst kadranda dalak yönünde karın boşluğunu geçerek, dalak bükülmesinden döner. Karnın sol tarafında ise inen kolon mediale ve altına dönüştürerek S-şekilli sigmoid kolonu oluşturur. Rektum, sigmoid kolondan anal kanala kadar başlayarak kalın bağırsağın son beş ila on santimini oluşturur. Rektum pelvis içinde bulunur ve gerçek bir intra-abdominal yapı değildir. Rektumun çapı kolondan daha büyüktür ve öncelikle bir depolama rezervuarı olarak hizmet eder (Şekil 2.1). Tüm kalın bağırsağın uzunluğu yaklaşık beş ile altı metre arasında değişmekte olup, çapı bir ile iki inç arasında değişmektedir. Kolonun işlevleri arasında iletim kanalı ve sindirim artıklarının deposu olmak yer alır. Bağırsaklar, bağırsak içeriğini yağlayan ve bağırsaktaki bakteriler tarafından oluşturulan asitleri nötralize eden büyük miktarda alkalın mukus salgılar. Bu bakteriler parçalanma ve aşındırma işlemi yoluyla sindirilmemiş gıda kalıntısı, emilmemiş karbohidratlar, aminoasitler, hücre artıkları ve ölü bakterilerin parçalanmasına yardımcı olur. Bozulmuş karmaşık karbonhidratlardan gelen bakterilerin oluşturduğu kısa zincirli yağ asitleri, sol kolon hücreleri için bir enerji kaynağı oluşturur. Potasyum dengesinin korunması aynı zamanda kolon tarafından gerçekleştirilir; burada epitel, potasyum ve bikarbonat emer ve salgılar. Bu salgılanan bikarbonat mukus sayesinde belli karbohidratların, proteinlerin sindirimi için K vitaminin bakteriyel üretimini sağlayan ortam oluşturur.

2.2. Kolon Kanseri, Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi

Kolorektal kanseri tüm dünyada morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir (Anonin 2002). Bu durum tüm kanser insidansının % 9'undan fazlasını oluşturmaktadır (Boyle ve Langman 2000, Anonim 2007). Dünya çapında en yaygın üçüncü kanserdir ve ölümün dördüncü en yaygın nedenidir (Anonim 2007). Bir milyondan fazla yeni vaka

ile erkekleri ve kadınları neredeyse eşit derecede etkilemekte, yaklaşık 700 binden fazla ölüm ile sonuçlandığı düşünülmektedir (Arnold ve ark. 2015).



Şekil 2.1. Kolonun bölümleri

Coğrafik dağılım açısından bu kanser, İnsan Gelişim Endeksi açısından değerlendirildiğinde sanayileşmiş ülkelerde yükseldiği görülmektedir (Dolatkhah ve ark. 2015). Son yıllarda Doğu Avrupa, Latin Amerika ve Asya da kolorektal kanser insidans ve ölüm oranları diğer ülkelere göre daha da büyümüştür (Center ve ark. 2009a). İnsan gelişim endeksinin en yüksek olduğu ülkelerde kolorektal kanser insidans ve ölüm oranları, bazı Batı Avrupa ülkeleri ve Birleşik Devletler'de azaldığı görülmüştür (Arnold ve ark. 2015). Koruyucu önlemler, terapötik ve tanı yöntemlerindeki ilerlemeler (polipektomi gibi), ameliyat öncesi değerlendirmenin kalitesindeki iyileşmeler ve tedaviler (radyoterapi ve kemoterapi gibi) bu trendin azaltılmasında önemli roller oynamıştır (Center ve ark. 2009b, Murphy ve ark. 2015). Cinsiyet açısından bakılırsa her iki cinsiyette de neredeyse eşit şekilde görünse de, kadınlara göre erkeklerde daha çok görülür (Ferlay ve ark. 2015). Kolorektal kanser gelişme riski yaşla birlikte artar. Gerçekten de teşhis konmuş hastaların %90'dan fazlası 50 yaşın üzerindedir ve kolorektal kanser tanısının ortalama yaşı 64'tür (Amersi et ve ark. 2005). Ayrıca, kolorektal kanser insidans hızındaki önemli coğrafi değişiklikler, birden fazla faktörün kolorektal kanser oranındaki artışı etkileyebileceğini göstermektedir (Alberts ve ark. 2005, Saltz ve ark. 2008), bu nedenle kolorektal kanserin epidemiyolojik yönlerini

anlamak da eşit derecede önemlidir. Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar, artan meyve ve sebze tüketimi ile kolorektal kanser riskinde azalma arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Slattery ve ark.1998, Terry ve ark. 2001). Meyve ve sebzelerin, lif, folik asit, antioksidanlar ve vitaminlerin zenginlikleri nedeniyle kolorektal kanserine karşı koruyucu bir etkisi olduğu görülmektedir (Willett ve ark. 1990). Birkaç epidemiyolojik ve laboratuvar çalışması diyet lifinin kolorektal kanser patogenezindeki rolünü doğrulamıştır (Ahnen ve Macrae, 2010). Fiber bakımından zengin bir diyet, sigmoid kolonun pH'sını düşürerek, kolon transit süresini azaltarak, kolorektal kanser riskini azaltabilir ve sebzelerdeki folik asit ve mikro besin maddelerinin (antioksidanlar gibi) alımını arttırmaktadır. Etlerin, hayvan yağlarının ve kolesterol bakımından zengin gıdaların tüketiminin artması kolorektal kanser riskinin artmasıyla ilişkilidir (Chao ve ark. 2005). Yapılan bir çalışmanın bulguları, her gün 160 gramdan fazla işlenmiş et yiyen insanlarda kolorektal kanser riskinin önemli derecede yüksek olduğunu göstermiştir (Norat ve ark. 2005). Aslında kolorektal kanser riski, yüksek et tüketiminden sonra, insülin sekresyonunun uyarılması, demir absorpsiyonunun (heme) artması ve yağ alımının artması nedeniyle artmaktadır (Gerhardsson de Verdier ve ark. 1991). Üstelik, etlerin daha uzun pişme süresi, heterosiklik amin üretimini arttırmakta ve bu da kolorektal kanser insidansının artışına katkıda bulunabilmektedir (Anderson 2011, Martínez ve ark. 2007). Alkol tüketimi ve kolorektal kanser riski açısından karşılaştırıldığında alkol tüketimiyle kolorektal kanser insidansı arasında pozitif bir ilişki bildirilmiştir (Fedirko ve ark. 2011, Longnecker ve ark. 1990). Etanol içeren içecekler, kanserojen maddeler üretmek ve safra asit bileşimlerinde değişiklikler yaratarak kolorektal kanser insidansını arttırmaktadır (Choi ve ark. 1999, Kune ve Vitetta 1992). Kafein tüketimi ile kolorektal kanser insidansı arasındaki ilişki kesin olarak doğrulanmamıştır (Lin 2009). Kanıta dayalı çalışmaların bir meta-analizin bulguları, kafein tüketimi ile artmış kolorektal kanser riski arasında bir korelasyon olduğunu ortaya koymasına rağmen (Giovannucci ve ark. 1994), Hemşire Sağlık Çalışması (NHS) ve Sağlık Uzmanları İzleme Çalışması (HPFS) bulguları bu iddiayı desteklememiştir (Michels ve ark. 2000). Özellikle tütün tüketimi ve sigara kullanımı her iki cinste de kolorektal kanser için ortak risk faktörleridir (Giovannucci 2004). Yapılan bir çalışmada, sigara paketleri sayısı ile kolorektal kanser riski arasında herhangi bir ilişki bulunmamasına rağmen, kolorektal kanser riski 45 yıl boyunca sigara

içmiş kişilerde artmıştır (Cho ve ark. 2015). Azalan fiziksel aktivite kolorektal kanser riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir (Lee ve ark. 2012, Meyerhardt ve ark. 2006). Bununla birlikte günlük hareketsizlik, bir başka risk faktörü olan obezite de kolorektal kanser için insidansı artırabilmektedir (Bardou ve ark. 2013). Fiziksel aktivitenin koruyucu etkisinin kesin mekanizması halen belirsizdir, ancak fiziksel aktivite, kolonik geçiş süresini azaltarak ve insülin seviyelerini düşürerek kolorektal kanser riskini düşürmektedir (Gribovskaja-Rupp ve ark. 2011, Mao ve ark. 2003). Obezite, serum leptin düzeylerini artırır (Frezza ve ark. 2006) ve leptin kolorektal kanser gelişimine yol açmaktadır (Sierra-Honigmann ve ark. 1998). Aslında, leptin kolon kanseri hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını artırır. Obezite, tip 2 diyabet için ana risk faktörlerinden biridir ve bu da tesadüfen kolon kanseri için bağımsız risk faktörlerinden biridir (Larsson ve ark. 2005). Çeşitli araştırmalar, diyabet deneklerinin, diyabet olmayan kişilerle karşılaştırıldığında kolorektal kanserine yakalanma riskinde olduğunu göstermiştir (Hu ve ark. 1999, Will ve ark.1998). Bir meta-analiz çalışması, diyabetli kişilerin kolorektal kanser riskinin, diyabetli olmayan deneklerden % 35 daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Luo ve ark. 2016). İnsülin konsantrasyonunun ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) -1 seviyelerinin artması, glukozun artması (hiperglisemi) ve kolorektal mukozanın dışkıda safra asitlerine (kabızlık nedeniyle) uzun süre maruz kalması kolorektal karsinogenezde önemli rol oynamaktadır (Airley ve Mobasheri 2007, Giovannucci 2001a, Stadler ve ark. 1988). İnsülin direncinin yol açtığı karsinogenez hücre proliferasyonunun artmasına ve apoptozun azalmasına neden olur (Grimberg ve Cohen, 2000, Gunter ve Leitzmann, 2006, Sandhu ve ark. 2002).

Kolorektumun neoplastik polipleri, yani tübüler ve villöz adenomlar, kolorektal kanserin öncü lezyonlarıdır (Janout 2001). sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %95'i bu adenomlardan gelişir (Anonim 2005). Adenom öyküsü olan bir kişide daha önce adenom öyküsü olmayan kişilere göre kolorektal kanser gelişme riski artar (de Jong ve ark. 2005). Adenomlardan malignite gelişiminde genellikle 5 ile 10 yıl arasında uzun bir latans periyodu gereklidir (de Jong ve ark. 2005, Davies ve ark. 2005). Malign dönüşümden önce bir adenomun saptanması ve çıkarılması kolorektal kanser riskini azaltabilmektedir (Grande ve ark. 2008). Bununla birlikte, adenomatöz polip veya lokalize karsinomun tamamen çıkarılması gelecekte kolondaki ve rektumdaki metakron kanseri gelişim olasılığı artışı ile ilişkilendirilmektedir (Anonim 2002).

İnflamatuvar bağırsak hastalığı, ülseratif kolit ve Crohn hastalığını tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Ülseratif kolit kolondaki mukozanın ve rektumun iltihaplanmasına neden olur. Crohn hastalığı bağırsak duvarının kalınlığında iltihaplanmaya neden olur ve sindirim borusunun ağızdan anüse kadar herhangi bir bölümünü etkileyebilir. Bu koşullar bir kişinin kolorektal kanser geliştirme riskini arttırmaktadır (Anonim 2006). İnflamatuvar barsak hastalığı olan hastalarda kolorektal kanserin görülme riski 4-20 kat arasında tahmin edilmektedir (Janout 2001). Bu nedenle, inflamatuvar barsak hastalığına sahip bireylerin yaşı ne olursa olsun, kolorektal kanser açısından daha sık taranmaları gerekmektedir.

Kolorektal kanser vakalarının çoğunluğu, ailesinde kolorektal kanser öyküsü olmayan veya predispozan bir hastalık bulunan kişilerde görülür. Bununla birlikte, kolorektal kanser gelişen kişilerin yaklaşık % 20'si bu hastalıktan etkilenen diğer aile bireyleridir (Anonim 2007). Birinci derece akrabalarında kolorektal kanseri veya adenomatöz polip öyküsü olan insanlar artmış risk altındadır. Daha önce kolorektal kanser öyküsü olan kişilerde, örneğin 60 yaşından küçük bir birinci derece akraba olan kolorektal kanser veya adenomatöz polip öyküsü; veya herhangi bir yaşta iki veya daha fazla birinci dereceden akraba bulunan kolorektal kanser öyküsü veya adenomatöz polip öyküsü olan kişilerde bu kansere yakalanma riski daha fazladır (Boardman ve ark. 2007). Artan riskin nedenleri belli değildir, ancak büyük olasılıkla kalıtsal genler, ortak çevresel faktörler veya bunların bazı kombinasyonları nedeniyle olabileceği düşünülmektedir.

Kolorektal kanserler yaklaşık %5 ile %10, bilinen kalıtsal koşulların bir sonucudur (Jackson-Thompson ve ark. 2006). En sık görülen kalıtsal hastalıklar ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve kalıtsal nonpolifozit kolorektal kanser (HNPCC) olup Lynch sendromu olarak da adlandırılır. Bu kalıtsal kolorektal kanser türlerinden sorumlu genler tanımlanmıştır. HNPCC, HNPCC'li bireylerde sorumlu mutasyonlar olan DNA onarım yolunda yer alan genlerdeki mutasyonlarla, yani MLH1 ve MSH2 genleriyle ilişkilidir (Papadopoulos ve ark. 1994). FAP, tümör süpresör geni APC'deki mutasyonlardan kaynaklanır. HNPCC, kolorektal kanserlerinin % 2 - 6'sını oluşturabilir (Anonim 2006). HNPCC ile ilişkili mutasyonlara sahip kişilerde kolorektal kanser riski, 40 yaşlarında ortalama %70-80 olabilir (Anonim 2006). MLH1 ve MSH2 mutasyonları ayrıca rahim, mide, ince bağırsak, pankreas, böbrek ve üreter kanseri gibi birtakım

ekstra kolonik maligniteler de dahil olmak üzere diğer kanserlerin artmış riski ile ilişkilidir (Anonim 2007). FAP, tüm kolorektal kanser vakalarının %1'inden fazlasını oluşturmaktadır (Davies 2005, Anonim 2007). Yalnızca birkaç adenom gelişen HNPCC'li bireylerden farklı olarak, FAP'lı insanlar karakteristik olarak yüzlerce polip geliştirirler ve bu adenomlardan bir veya daha fazlası tipik olarak 20 yaşına kadar malign transformasyona uğramaktadır. (Davies 2005). 40 yaşına gelindiğinde, bu bozukluğu olan neredeyse tüm insanlar kolon kaldırılmazsa kanser gelişecektir (anonim 2006, Anonim 2007). Adenomatöz polipozis koliye (APC) eşlik eden polipozis koşulları, otozomal dominant bir şekilde kalıtsaldır. APC'ye bağlı polipozis koşulları olan kişilerin yaklaşık %75 ila 80'inde etkilenen ebeveynler bulunmaktadır. Etkilenen bir aile üyesinde hastalığa neden olan bir mutasyon saptanırsa, doğum öncesi test ve preimplantasyon genetik teşhisi mümkündür (Lynch 2008).

Kolorektal kanserin teorik olarak önlenabilir nedenlerinin tanımlanmasından önleyici stratejilerin uygulanmasına geçiş, hastalığın gelişimi ile nedensel olarak ilişkili olduğu düşünülen maruz kalmaların tanımlanmasına bağlıdır. Analitik epidemiyolojiden, kolorektal kanser yükünü azaltmaya yönelik önlemler hakkında bazı açık fikirler ortaya çıkmıştır. Kolorektal kanser gelişimiyle nedensel olarak ilişkili olduğu düşünülen birkaç faktör vardır. Profilaktik risk faktörlerinin (yüksek yağlı diyet, düşük lif, obezite, hareketsizlik ve sigara içme gibi) kolon kanseri insidansının önemli katkıda bulunduğu gerçeği nedeniyle, bunları önlemek için, özellikle yüksek risk gruplarında kapsamlı bir planlamaya ihtiyaç duyulmaktadır. Kalıtsal kolorektal kanserin en yaygın biçimlerinden sorumlu genler de tespit edilmiştir. Neyse ki, kolorektal kanser vakalarının büyük çoğunluğu kanser önleme konusunda mevcut bilgileri uygulanarak engellenebilir. Uygun diyet değişiklikleri, düzenli fiziksel aktivite ve sağlıklı kilo koruması, hedef tarama programları ve erken terapötik müdahale ile birlikte, zamanla, kolorektal kanser ile ilişkili morbidite ve mortaliteyi önemli ölçüde azaltılabileceği düşünülmektedir.

2.3. Kolon Kanser Histolojisi

Kolon kanseri, normal glandüler mimarinin ve sitolojik özelliklerin korunma derecesine göre iyi diferansiye edilmiş, orta derecede iyi diferansiye veya kötü diferansiye olarak sınıflandırılır. Kötü diferansiyasyon muhtemelen altta yatan genetik mutasyonların histolojik bir işaretidir, ancak kötü diferansiyasyon ile ilişkili mutasyonlar hala

bilinmemektedir. Kolon kanserlerinin yaklaşık %20'si kötü diferansiyedir ve kötü prognoz göstermektedir (Hassan 2005). Kolon kanserlerinin yaklaşık %15'i müsinöz veya hücre içi müsinöz birikiminden dolayı kolloid olarak sınıflandırılır. Müsinöz kolon kanserinin halka çeşitliliğinde, kanserli hücreler çok fazla müsinöz içerdikleri için çekirdek çevresel olarak yer değiştirmektedir. Bu kanser türü çok agresiftir ve kötü prognoza sahiptir (Kang 2005). Bu biyolojik davranış, ekstraselüler müsinin tümör duvarının ötesinde disekstrasyon sonucunda ortaya çıkabileceği gibi, bu da lokal uzantıya neden olur (Green 1993). HNPCC ile ilişkili kolon kanseri, müsinöz farklılaşma, belirgin lenfositik reaksiyon ve medüller büyüme paterni gibi olağandışı histopatolojik özelliklere sahiptir (Gryfe 2006). Önceden ayırt edilemeyen bir karsinom olarak sınıflandırılmış olan kolon kanseri medüller formu, küçük lenfositlerle yoğun şekilde infiltre olan ve glandüler elementlerden yoksun eozinofilik ve poligonal hücreler tabakasıyla karakterizedir. Bu kanser türü ayrıca yüksek mikrosatellite kararsızlığı ile ilişkilidir (Gatalica 2007). Kolonun diğer kanser türleri nadirdir. Karsinoid genellikle rektumda veya apandikte alt gastrointestinal sistemde bulunur ancak kolonun geri kalanında nadiren görülebilir.

2.4. Kolon Kanseri Moleküler Biyolojisi

Kolorektal kanser, erkeklerde kanser insidansının ikinci büyük nedenini oluşturmaktadır. Kadınlarda ise üçüncü sırada olup morbidite ve mortalitenin başlıca nedenlerinden biridir. İnsidansına göre, bu patoloji kendini üç şekilde gösterir: aile, kalıtsal ve en yaygın olarak sporadik. Kalıtım modeline ve aile yatkınlığa sahip türler için tümörler, adenomatöz lezyonlardan malign bir tümörün ortaya çıkmasına kadar değişen tanımlanmış aşamalarla gelişir. Çevresel ve kalıtsal faktörlerin kolorektal kanser gelişimine katkıda bulunduğu saptanmıştır. Onkogenlerde (DNA'yı onaran veya baskılayan genler) mutasyon birikimi ile gösterildiği gibi, tümörün ortaya çıkabileceği çeşitli yolakların varlığını işaret eder. Baskılayıcı ve mutasyona uğramış yolaklar söz konusu olduğunda, bunlar, adenom/karsinomadaki morfolojik ilerleme dizilimindeki fenotipik değişikliklerle ilgili genetik bozukluklar ile karakterizedir. Dahası, BRAF ve KRAS genlerinde mutasyona yol açan diğer yollar poliplerin kansere ilerlemesi ile ilişkilidir. Kolon kanseri heterojen bir hastalıktır. Kolon kanseri ve patolojik öncüleri farklı moleküler imzalar, farklı patolojik özellikler ve farklı doğal geçmişler gösterir. Kolon kanserinde rol alan en az üç major moleküler yol vardır, bunlardan biri vakaların

% 85'ini oluşturan baskın kromozomal instabilite (CIN) yoludur. Diğeri ise sporadik kolon kanserinde önemli rol oynayan CpG adası metilasyon fenotipi (CIMP) yolağıdır ve sporadik mikrosatellit istikrarsızlığı (MSI) yüksek kanserleri içerir. Son olarak ise diğerk yolak DNA uyuşmazlığı onarım (MMR) geninde germline mutasyonuyla sonuçlanan MSI yolağını içerir. Kalıtsal nonpolifozisli kolorektal kanser (HNPCC) MSI yolu ile gelişir.

Kolon kanserlerinin yaklaşık %70-85'i CIN yolu ile gelişir. CIN yolunda moleküler sapmalar, sayısal veya yapısal kromozomal anormalliklerin (anöploidi) birikimi yoluyla ortaya çıkar (Rajagopalan ve ark. 2004). Bu yolda tanımlanabilen en erken lezyon polip gelişiminden önce mikroskopik bir mukozal lezyon olan displazik anormal kript odaklama (ACF) dir (Freeman ve ark. 2001). CIN yolağı, KRAS onkogeninin mutasyonu, kromozom 18q kaybı ve önemli tümör baskılayıcı gen TP53'ü içeren kromozom 17p'nin silinmesini içeren APC'deki mutasyon ya da kromozom 5q kaybıyla ilişkilidir (Grady 2004). APC, CIN yolağında önemli bir tümör süpresör gendir. APC'deki patojen mutasyon sıklıkla APC proteini keser ve APC'nin β-katenin'e bağlanmasını engeller. APC'nin β-katenin'e bağlanması, Wnt-sinyal yolunu bastırmaya yardımcı olur (Cadigan ve Liu 2006). Wnt sinyali büyüme, apoptoz ve farklılaşmayı düzenler ve özellikle doku spesifik kök hücre bölümlerinin muhafaza edilmesinde önemlidir (Kuhnert ve ark. 2004). Fonksiyonel APC'nin kaybı, CIN'e katkıda bulunan mitozun düzenlenmesini de engelleyebilir (Fodde ve ark. 2001). Erken adenomlarda APC veya β-katenin mutasyon sıklığı,% 80 gibi yüksek bir oranda bildirilmiştir (Jass ve ark. 2002).

KRAS, CIN yolağında diğerk önemli bir gendir. KRAS, mutasyona uğradığında kalıtsal GTPaz aktivitesinde bir kayıp oluşturabilen bir GTP bağlayıcı proteini kodlar ve böylece RAS-RAF-MEK-ERK temel yolağını kullanır (Leslie ve ark. 2002). BRAF, özellikle CIMP yolunda bu sinyalleme kaskadında önemli bir faktördür. Aktif KRAS mutasyonları kolon kanserlerinin %35-42 sinde bulunur (Cheng ve Lai 2003). KRAS'ın rolü CIN yolağına özgü değildir, CIMP yolağında da önemli bir role sahiptir.

SMAD2 ve SMAD4, büyümenin ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan TGF-β sinyal yolağında yer alırlar. SMAD4'ün germ mutasyonu, kolon kanseri ile ilişkili jeneralize juvenil polipozis sendromuna neden olabilir (Bevan ve ark. 1999).

Son olarak, TP53'ün (17p13) 17p allel kaybıyla bozulması, adenomdan adenokarsinomaya geçişe eşlik etmekle birlikte geç gerçekleşen bir olaydır. TP53 anormallikleri, mutasyon ya da heterozigotluk kaybı, incelenen lezyonun gelişen histolojik evresine göre artar, %4-26 adenomlarda, %50 invaziv odaklı adenomlar ve %50-75 TP53'in bozulmuş işlevine sahip kolon kanser hücrelerdir (Leslie ve ark. 2002). P53 proteini, hücre döngüsünü yavaşlatarak ve DNA onarımı için yeterli zaman sağlamak için hücre döngüsü genlerinin ekspresyonunu artırır. Dahası, devam eden genetik hasar, hücrenin onarımı için çok büyük olduğu zaman, p53; pro-apoptotik genleri indükler, böylece programlanmış hücre ölümüyle genetik hasar içerir (Mills 2005).

Genomik istikrarsızlığın bir diğer önemli türü MSI'dir. Mikrosatellitler genom boyunca dağınık tekrar eden nükleotid dizisidir ve MSI tutarsızlığı temsil eder ve dolayısıyla istikrarsızlık ise tümöre karşı germline DNA'da bulunan, mikrosatellit bölgelerinde bulunan nükleotit tekrarlarının sayısı ile ilişkilidir. DNA polimeraz, bu kısa tekrar dizilerini kopyalarken hata yapmaya ve dolayısıyla MSI'da uyuşmazlık onarımında (MMR) işlev bozukluğuna sebep olması ile sonuçlanır. MSI, genetik hataların dramatik bir şekilde artmasına neden olur ve MSH3, TGFBR2, BAX, CASP5, MSH6, CTNNB1, APC, IGF2 ve E2F4 gibi kolorektal karsinogenezi ile ilişkili genlerde birkaç mikrosatelit bulunur.

CIMP yolu (CpG adası metilatör fenotipi), sporadik kolon kanserlerinin en yaygın ikinci yoludur. CIMP yolu, sporadik vakaların yaklaşık% 15'ini oluşturmaktadır ve CIMP kolon kanserlerinin klinik özelliklerinin MSI ile ilişkili olanlara benzer olduğu bildirilmiştir (Issa 2008, Weisenberger ve ark. 2006). Hücre döngüsü düzenlemesi, apoptozis, anjiyogenezis, DNA onarımı, invazyon ve adhezyon ile ilgili genlerin promoter bölgelerinde lokalize olan CpG dinükleotid dizilerinin anormal hipermetilasyonundan oluşur. Promoter hipermetilasyonlar, gen ifadesinin kaybolmasına neden olur. CIMP yolu, sporadik kanserler için MLH1 gibi anahtar tümör süpresör genlerin promotör bölgelerini metillemek için ya da epigenetik olarak ekspresyonu inaktivite etmek için gerekli epigenetik instabiliteyi sağlar. BRAF onkogen mutasyonu sıklıkla CIMP yüksek kolon kanserlerinde tanımlanır ve artmış hücre büyümesi, karsinogenezin ilerlemesi ve yüksek kolon kanser spesifik mortalite ile

ilişkilidir (Ogino ve ark. 2009). Önemli bir nokta, premalign seril adenomlar (SSA) lezyonlu kolon kanser olgularının % 90'ında BRAF V600E mutasyonları bulunmuştur fakat konvansiyonel adenomlarda görülmemiştir. BRAF mutasyonu tırtıklı yolda erken bir olaydır ve zorla ekspresyonu yaşlanma olarak bilinen bir uyuma halini doğuracaktır. Premalign seril adenomlarda BRAF mutasyonları erken hiperplastik poliplerde (tırtıklı öncüler) ya da gelişmiş displastik tırtıklı poliplerde bulunur ve neoplastik ilerlemedeki rolü teyit edilmiştir (Spring ve ark. 2006, Kambara ve ark. 2004). En önemlisi, CIMP-pozitif kolon kanserleri öncü lezyonlarına göre diğer yollardan farklıdır. CIN yolu ile gelişen kolon kanserleri ve ayrıca HNPCC'de adenomatöz poliplerden kaynaklanır (Horst, ve ark. 2012). Bu CIMP öncü polipleri, kript lümeninin testere dışı görünümünü tanımlamak için "tırtıklı" olarak adlandırılır (Morikawa ve ark. 2012). Tırtıklı kript kolonları bu polipler tarafından paylaşılan apoptozda altta yatan bir kusur nedeniyle oluşur; bu da, aşırı aktif RAS-RAF-MEK-ERK sinyalizasyonunun sonucudur. Bu, kolonositlerin birikmesine ve böylece testere dışı görünümüne yol açar.

Sonuç olarak kolon kanserinin moleküler analizi gelişmiş kolon kanserini tedavi etmek için kullanılan araçlardan biridir. Epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) ve dolayısıyla RAS-RAF-MEK-ERK yolunu hedefleyen monoklonal antikorlar cetuximab ve panitumumab, metastatik kolon kanserinin tedavisinde önemli bir gelişme olmuştur. Bununla birlikte bazı hastaların bu ajanların klinik yararlarına karşı dirençli olduğu ortaya çıkmıştır. KRAS mutasyonuna sahip hastalar veya sağlıklı tip KRAS'a sahip fakat BRAF veya PIK3CA mutasyonuna sahip hastaların, EGFR hedefli ilaçlara daha az yanıt verdiği görülmüştür (Siena ve ark. 2009). Kanserler, rutin olarak bu ilaçları uygulamadan önce KRAS mutasyonları için test edilmektedir.

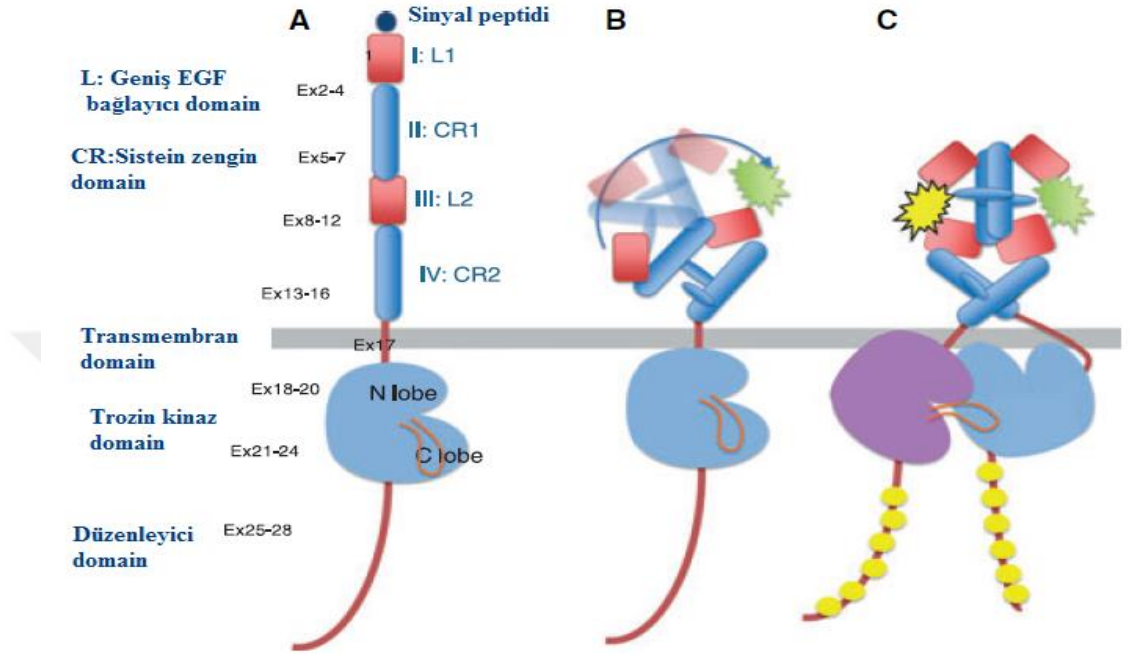
2.5. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

EGFR, hücre zar reseptörlerinin ErbB ailesine ait 170-kDa transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. EGFR'ye (HER1 ve ErbB-1 olarak da bilinir) ek olarak, bu ailenin diğer reseptörleri HER2/c-neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3) ve Her4'ü (ErbB-4) içerir. Bu reseptörler 622 amino asit ekstraselüler ligand bağlama alanı, 23 amino asit hidrofobik transmembran alan ve tirozin kinaz (TK) alanını içeren bir sitoplazmik alan ve tirozin otofosforilasyon bölgeleri olan bir karboksi terminal bölgesinden oluşan transmembran glikoproteinlerdir (Arteaga 2001, Herbst ve Shin 2002, Ritter ve Arteaga 2003). Tüm

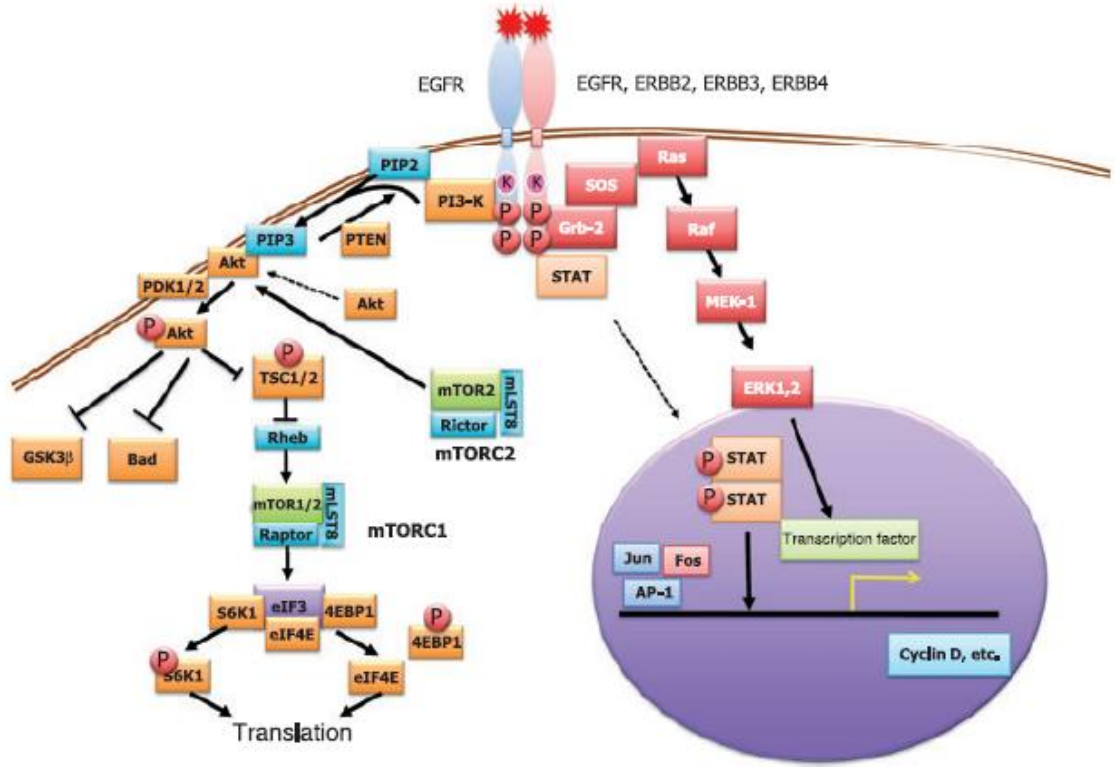
ERBB proteinleri dört işlevsel bölgeye sahiptir: bir hücre dışı ligand bağlama alanı; bir transmembran alan; bir hücre içi tirozin kinaz alanı; ve bir C-terminal düzenleyici alan (Burgess ve ark. 2003). Hücre dışı alan dört bölüme ayrılmıştır. Tirozin kinaz alanı bir N-lob ve bir C-lob içerir ve ATP bu iki lob arasındaki yarığa bağlanır.

ErbB'nin hücre dışı alanına belirli ligandlardan oluşan bir ailenin bağlanması (ErbB2 hariç), homodimerler ve heterodimerlerin oluşumuna neden olur. Bu işlem, I ve II domainlerin rotasyonu ile sağlanır ve bağlı bir konfigürasyondan genişletilmiş konfigürasyona yükselme sağlanır (Şekil 2.2B). Bu, dimerizasyon domainini ortaya çıkarmaktadır. ErbB2, karşılık gelen ligandlara sahip değildir, fakat genişletilmiş konfigürasyonda yapısal olarak eksprese edilmiştir. ErbB2 tercih edilen bir dimerizasyon ortağıdır ve ErbB2 içeren heterodimerler, diğer dimerlere göre daha güçlü sinyalleri yönlendirir. Sitoplazmada, kinaz alanı kuyruk başı oryantasyonunda asimetric olarak dimerleşir (Şekil 2.2C). Bu şekilde, siklinlere bağımlı kinazların siklinler tarafından aktivasyonu durumunda olduğu gibi, tirozin kinaz aktive olur. Dimerizasyon dolayısıyla reseptörlerin intrinsik tirozin kinaz aktivitesini uyarır ve sitoplazmik düzenleyici alan içindeki spesifik tirozin kalıntılarının otofosforilasyonunu tetikler. C-terminal düzenleyici domain, ligand bağlanması üzerine spesifik olarak fosforile olan birçok tirozin rezidülerine sahiptir (Şekil 2.2A). Normal hücrelerde, EGFR sinyalleme kaskadı, EGFR'nin ligand aktivasyonu ile başlar (Şekil 2.3). On bir liganda kadar, EGF ve transforme edici büyüme faktörü alfa da dahil olmak üzere reseptörlerin ErbB ailesini bağlayabilir (Hynes ve Lane 2005). Ligand bağlanması, tirozin kinazın aktivasyonuna yol açan homodimerler ve heterodimerler oluşumu ile reseptörün dimerizasyonunu indükler. Hücre içi tirozin kinaz kalıntıları daha sonra otofosforile hale gelir ve çoklu sinyal iletim yollarının aktivasyonunu indükler. EGFR tarafından aktive edilen iki ana hücre içi yolu, mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolu ve fosfatidilinositol 3-kinaz- (PI3K-) protein kinase B (AKT) yoludur. Bu yollar, proliferasyon, göç, farklılaşma ve apoptoz gibi hücre sel tepkileri etkileyen çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açar (Citri ve Yarden 2006). Birinci karmaşıklık seviyesi, birden fazla ligandın paylaşıldığı reseptör seviyesinde ve lateral sinyalin olduğu ErbB ailesi üyeleri arasında meydana gelir. Sonra, hücrenin türüne bağlı olarak, transkripsiyon faktörlerinin yollara ve diferansiyel aktivasyona yerleştirilmiş pozitif ve negatif geribildirim döngüleri bulunur. Bu sıkı düzenlenen

sistem bozulduğunda, artan hücre çoğalması, uzamış sağkalım, anjiyogenez, antiapoptoz, invazyon ve metastaz yoluyla malign transformasyona ve tümör ilerlemesine katkıda bulunabilir (Spano ve ark. 2005, Mitsudomi ve. Yatabe 2010).



Şekil 2.2. Ligand bağlanması ile EGFR proteinin yapısı (A), aktivasyonu (B) ve dimerizasyonu (C) (Tetsuya ve Yasushi 2010).



Şekil 2.3. EGFR sinyal yolağı (Tetsuya ve Yasushi 2010).

Ligand bağlanması, dimerleşmeye neden olur ve EGFR'yi aktive eder. Tirozin rezidülerinin artan otofosforilasyonu, downstream sinyal yolağını aktive eder. Ras-Raf-MEK-MAPK sinyal yolağında, EGFR sinyalleme kaskadının bir eksenini, büyüme faktörü reseptör protein 2 adaptör protein (Grb2) ile birleşmiş bir adaptör protein Ras GTPaz'ı aktive eder. Aktivasyon sonrasında, Ras (yani KRas), serin protein Raf'yı (yani B-Raf) göreve alır ve aktive eder ve ardından MEK'nin fosforilasyonunu ve aktivasyonunu gerçekleştirir ve daha sonra MAPK meydana gelir ve böylece hücre çekirdeğindeki transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu sağlanır. Ras-Raf-MAPK sinyal yolunun hücre çoğalmasımı, farklılaşmasını ve hayatta kalmayı kontrol ettiği düşünülmektedir. EGFR sinyalleme kaskadının kolorektal karsinogenezinde önemli olan diğer eksenini PI3K-AKT yolağı ve sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü STAT3 ve STAT5 yolağıdır. EGFR tirozin kalıntıları fosforile edildiğinde, PI3K, hücre zarına transloke olur ve fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfat (PIP3) üretmek için PI3K katalitik altbirimi p110'u tetikleyen tirozin fosfatına adaptör altbirimi p85 aracılığıyla bağlanır. PI3K daha sonra AKT aktivasyonunu uyarır. Sitoplazmada mevcut olan aktif

AKT (p-AKT) daha sonra hücre büyümesi, çoğalması ve hayatta kalma ile sonuçlanan çeşitli hedefleri aktive eder (Ras-Raf-MEK-MAPK sinyal yoluna paralel olarak). Önemlisi, bu iki eksen yakından ilişkilidir ve belli bir noktada birleşmektedir. Örneğin, PI3K'nin p110 altbirimi Ras ile etkileşim yoluyla da aktiveleştirilebilir. Ayrıca, tensin homolojisi olan fosfataz (PTEN), PIP3'ü fosfatidilinositol (4, 5) bisfosfata (PIP2) geri dönüştüren ve böylece PI3K-AKT yolağını olumsuz şekilde düzenleyen bir fosfatazdır. Bu yolakların aktivasyonu hücre çoğalması, göç ve metastaz, apoptozdan kaçınma veya anjiyogenez ile sonuçlanır ve bunların hepsi kanser fenotipleriyle ilişkilidir.

2.5.1. Kolon kanserinde EGFR ekspresyonu

EGFR'nin artmış aktivitesi ya da aşırı ekspresyonu, baş ve boyun (Chua ve ark. 1996), akciğer (Tateishi ve ark. 1990), meme (Nicholson ve ark. 1991), gastrointestinal sistem (Jonjic ve ark. 1997) ve mesane (Neal ve ark. 1990) gibi çeşitli malignitelerde tümör progresyonu ve kötü sağkalım ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Kolon kanserinde EGFR'nin aşırı ekspresyonunun hastalığın ilerlemiş bir evresiyle bağlantılı olabileceği (Gross ve ark. 1991) veya olası bir metastatik riski olabileceği (Radinsky ve ark. 1995) belirtilmiştir. Bununla birlikte, EGFR ekspresyonunun hayatta kalma üzerindeki etkisi halen tartışmalıdır ve EGFR'nin aşırı ekspresyonu, olumsuz bir prognozla ilişkili olduğu kesin olarak söylenemez. Kolorektal kanserde çoğu vakada, EGFR'nin saptanması için immünohistokimyasal yöntemler kullanılmıştır. İmmünohistokimyasal teknik kullanılarak, TGF-a, EGF'nin ve bunların ortak reseptör EGFR'ünün yanı sıra EGFR2 ve EGFR3'ün temel ekspresyon seviyesinin, kolorektal kanser dokusundaki çevredeki mukozada yüksek olduğu bulundu (Kluftinger ve ark. 1992, Nakae ve ark. 1993, Yarden ve Sliwkoski 2001). İnsan kolorektal karsinomlarının birincil kültürlerinde, epitelyal luminal hücre zarında tümör progresyonu sırasında yüksek seviyelerde EGFR ekspresyonu gösterilmiş bu da kolon kanseri hücrelerinin mitojenik bir uyarıya duyarlılığının arttığını göstermiştir. EGFR kolon kanserinin %60-80'inde eksprese edilmektedir (Cohen 2003). EGFR'nin tümörjenez teşvik mekanizmaları çeşitlidir ve hem hücre döngüsü bozukluklarını hem de tümör sağkalımına yardımcı faktörleri desteklemektedir. Meme kanseri hücrelerinde artmış EGFR seviyeleri artmış proliferatif ve anjiyogenik aktivite ile ilişkilendirilmiştir. Artmış proliferasyon ve anjiyogenezi, artmış mitotik aktivite ile korele olan TGF'nin indüklediği düşünülmektedir. EGFR

ligandları TGF α ve EGF'nin aynı zamanda endotel hücreleri için kemoatraktan olarak işlev gördüğü ve TGF α 'nın VEGF ekspresyonunu ek olarak desteklediği gösterilmiştir (Gille ve ark. 1997, de Jong ve ark. 1998). Kolorektal kanserde bilinen EGFR ekspresyonu nedeniyle refrakter EGFR pozitif (immünohistokimya ile değerlendirilen) kolorektal kanserli hastalarda bir anti-EGFR monoklonal antikor olan cetuximab'ın faz II çalışması yapılmıştır ve önemli sonuçlar elde edilmiştir (Saltz ve ark. 2004). Bununla birlikte, daha sonra tümördeki EGFR ekspresyonu ile tedaviye yanıt arasında bir korelasyon bulunmadığı keşfedilmiştir (Cunningham ve ark. 2004, Chung ve ark. 2005). Chung ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, EGFR negatif tümörlü cetuximab ve irinotekan tedavisi gören 16 hastadan dördünde (%25) ölçülebilir lezyonların boyutunda %50'den fazla azalma ile kısmi bir yanıt elde edildi. Bu yanıt oranı, EGFR pozitif hastalarda, cetuximab ve irinotekan tedavisi gören hastaların klinik araştırmasında görülen %23 yanıt oranına neredeyse benzemektedir. Bütün bu bulgulara dayanarak, Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN), anti-EGFR monoklonal antikor terapisi için hastanın uygunluğunu değerlendirmede, EGFR ifadesinin değerlendirmesinin immünohistokimya (IHC) yöntemi ile yapılmasının öngörücü değer sağlamayacağını düşünmektedir (Anonim 2006). EGFR ekspresyonunun IHC tabanlı tespitinin aksine, EGFR gen kopya sayısının floresan in situ hibridizasyon (FISH) tabanlı tespiti, EGFR hedefli terapilere cevap verme olasılığını belirlemek için gerçek bir prediktif değere sahip olabileceği düşünülmektedir. Metastatik kolon kanserine (mCRC) sahip 31 hastada EGFR gen kopya sayısını inceleyen yakın tarihli bir çalışmada, artan gen kopya sayısı ile cetuximab veya panitumumab tedavisine yanıt arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ($P < 0.0001$) bulunmuştur (Moroni ve ark. 2005).

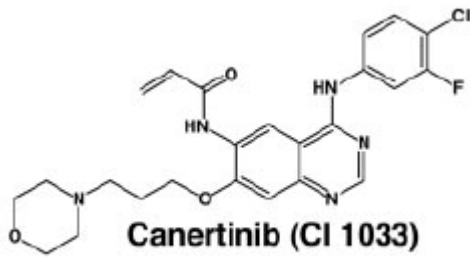
2.5.2. Tirozin kinaz inhibitörleri

Tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) doğası gereği geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olan küçük moleküllerdir. Adenozin trifosfat (ATP) analogları olarak bulunurlar ve reseptör tirozin kinazların (RTK'lar) hücre içi katalitik kinaz domaini üzerinde ATP bağlayıcı cepleri ile bağlanarak EGFR sinyalleşmesini engellerler, böylelikle otofosforilasyon ve downstream sinyal yolağının aktivasyonu engellenir (Ciardiello 2000). Tip I ve II geri dönüşümlü inhibitörler, kinaz aktif konformasyonunu tanıyan ATP molekülleri ile rekabet eder. Geri dönüşümsüz inhibitörler, nükleofilik bir sistein rezidüleri ile spesifik olarak reaksiyona girerek, kinaz aktif bölgesine kovalent olarak

bağlanırlar. Ayrıca, geri dönüşümsüz inhibitörler, uzun süreli klinik etkiler ve sık dozlama ihtiyacını azaltırken, tolere edilebilirliği tehlikeye atabilmektedir (Slichenmyer ve Fry 2001). Bununla birlikte, EGFR inhibitörlerinin (tek bir ajan olarak veya kombinasyon terapisi olarak) kutanöz cilt toksisitelerine neden olduğu için, bu hedef stratejilerin bir güvenlik profili dahilinde kullanımları dikkate alınmalıdır. HER1/EGFR inhibitörü ile ilişkili yan etkiler çoğunlukla hafif ile orta derecededir, ancak bazı hastalarda bu yan etkiler terapötik maddenin dozaj düzeyinde azalmaya hatta tedavinin kesilmesine neden olabilir, ancak yan etkilerin çoğu inhibitör tedavilerine karşı ortaya çıkan geçici reaksiyonlardır ve tedaviyi bıraktıktan sonra birkaç hafta sonra çözülmektedir (Hu ve ark. 2007, Li ve Perez-Soler 2009). Bu sınıfın bazı molekülleri spesifik olarak EGFR tirozin kinaz alanını hedeflerken, ikili EGFR/ErbB-2 ve pan-ErbB inhibitörleri de gelişme aşamasındadır (Pai ve ark. 2002). Tirozin kinaz inhibitörlerinden erlotinib ve gefitinib FDA tarafından onaylanmış tirozin kinaz inhibitörlerdir. Gefitinib, akciğer kanseri, meme karsinomu, yumurtalık, prostat ve kolorektal karsinomunda insan ksenograft modellerine oral yoldan uygulandığında düşük nanomolar konsantrasyonda önemli anti-proliferatif etkiler gösterdiği bulunmuştur (Wakeling ve ark. 1996). Erlotinibin ise kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda, EGF'ye bağımlı hücre proliferasyonunu nanomolar konsantrasyonlarda inhibe ettiğini ve G1 fazındaki hücre döngüsü ilerlemesini engellediği bulunmuştur (Moyer ve ark. 1997).

Canertinib (CI-1033), 3-kloro 4-floro 4-anilinokuinazolin bileşimidir. Düşük molekül ağırlıklı geri dönüşsüz, oral olarak aktif pan-EGFR ailesi tirozin kinaz inhibitörüdür (Smaill ve ark. 1999). Bu, ErbB'ye spesifik sistein rezidülerini alkile etmek için tasarlanmış yeni nesil tirozin kinaz inhibitörüdür ve bu reseptörlerin ve downstream mitojenik sinyal yollarının geri dönüşümsüz inhibisyonuna neden olur (Şekil 2.4). Dört ErbB reseptörü aile üyesini de engeller. EGFR'nin sistein 773, ErbB2'nin sistein 784'ü ve ErbB4'ün sistein 778'i gibi ATP bağlanma cebinde özgü sistein rezidülerine kovalent olarak bağlanarak, böylece ErbB proteinlerinin kinaz domaininde ATP bağlanma domainini bloke eder. Bu reseptörlerin kinaz aktivitelerini ve sinyal yollarını engeller. Aynı zamanda ErbB3'ün transmodülasyonunu önler (Fry ve ark. 1998). Canertinibin kovalent bağlanması, ErbB aktivitesinin uzun süreli bastırılmasına neden olur (Smaill ve ark. 1999). Canertinib ErbB reseptör ailesinin tüm üyeleri

tarafından gönderilen sinyalleri engelleyebildiğinden, ErbB reseptörlerinden yalnızca birinden sinyal vermeyi önleyen inhibitörlere göre daha geniş bir antitümör etkiye sahiptir. İnsan kanser hücre soyları üzerinde yapılan araştırmalar, canertinin ErbB tirozin kinaz aktivitesini güçlü ve sürekli bir şekilde inhibe ettiğini ve böylelikle AKT ve MAPK sinyal yolağının da inhibe olduğunu göstermektedir (Djerf ve ark. 2009, Djerf ve ark. 2011). Klinik çalışmalarda canertinin kabul edilebilir yan etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, faz II çalışmalarında, canertinin meme kanseri ve akciğer kanseri hastalarında orta derece de yan etkiler göstermiştir (Janne ve ark. 2007, Rixe ve ark. 2009). Bu nedenle, tedaviye cevap verme olasılığı en yüksek olan hastaların belirlenmesi önemlidir. Canertinin, sadece ErbB reseptör ailesine değil aynı zamanda hücre içi proteinlere de bağlanan kompleks bir yapıya sahip çoklu-kinaz inhibitörüdür. Örneğin, Src kinaz ailesi dokuz üyeden oluşur, Src, Blk, Fgr, Fyn, Hcy, Lck, Lyn, Yes, ve Yrk, bunlardan Lck proteininin, canertine güçlü bağlanma affinitesi vardır. Buna ek olarak, sadece tirozin fosforilasyonunu inhibe etmekle kalmaz aynı zamanda reseptörlerin ubiquitinasyon ve endositozunu da indükler. Büyüme inhibisyonu ve apoptoz, 1 mikromolar veya nano molar aralığında gerçekleştirebilir ve bu seçicilik, çoklu doz hayvan çalışmalarında gözlenen düşük toksisiteyi açıklar (Slichenmyer ve ark. 2001). Canertinin'in in vitro ve in vivo tümör ksenograft modellerinde çeşitli insan meme kanserlerine karşı etkili aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Allen ve ark. 2002).



Şekil 2.4. Canertinin kimyasal yapısı

2.6. Apoptozis

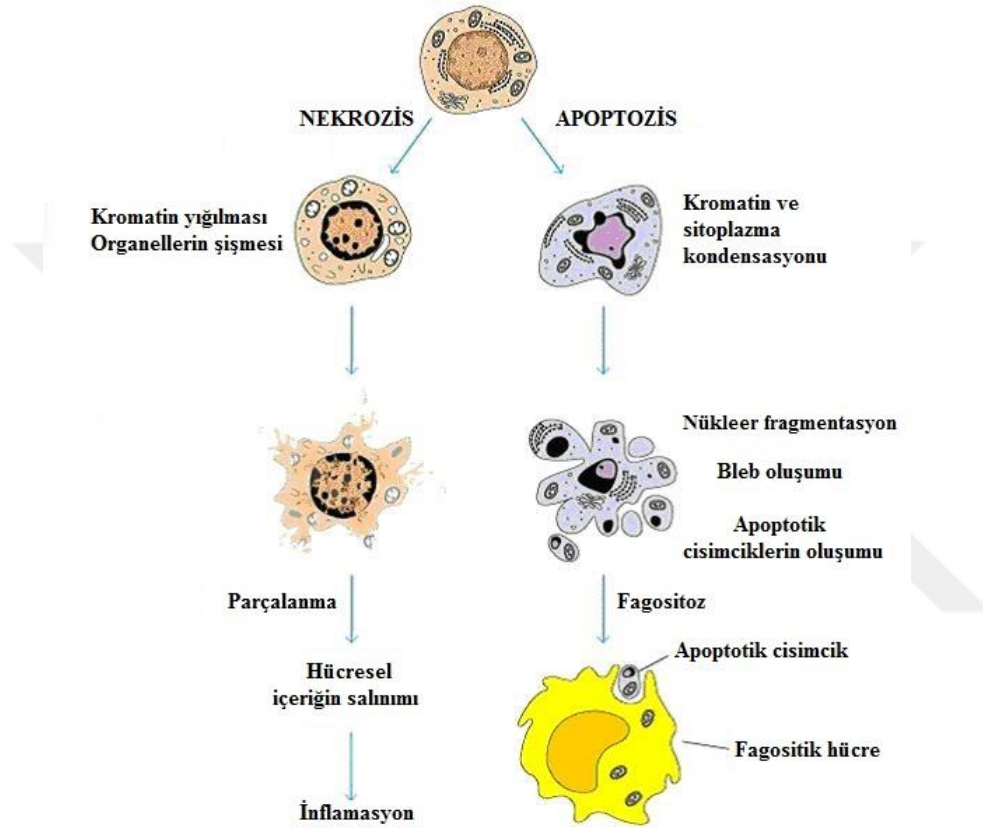
Çok hücreli biyolojik sistemlerin gelişim ve devamlılıkları, organizmayı meydana getiren hücrelerin karşılıklı etkileşimlerine bağlıdır. Gelişim boyunca çoğu hücre fazla miktarda meydana gelir ve neticede programlı bir ölüm gerçekleşir. Böylece pek çok

organ ve dokunun şekillenmesi sağlanır. Programlı hücre ölümünün hayvan gelişiminde yer aldığına dair en belirgin örneklerinden bir tanesi, parmak arası mezenkimal dokuda meydana gelen kitlesel ölüm sonucunda parmakların serbest ve bağımsız bir halde şekillenmesidir. Beyin gelişiminde, ilk zamanlarda oluşan nöronların, beyin şekillenmesi tamamlandığında nicel olarak yarısının bu süreçte ölmesi ve üreme organlarının gelişimi diğer örneklerdendir. Ayrıca, erişkin bir organizmanın hücrelerinde, homeostazı sürdürmek ve sabit sayılarını korumak açısından düzenli bir şekilde fizyolojik ölüm gerçekleşir. Gelişmekte olan lenfositlerin çoğu, çeşitli süreçlerle ölürler ve bu şekilde etkin ve işlevsel havuz sıkıca kontrol edilmekte, aynı zamanda lenfosit sayısı sabit tutulmaktadır. Birlikte ele alındığında; gelişim, farklılaşma, proliferasyon/homeostaz, immün sistemin düzenlenmesi ve işlevi, hasarlı ve zararlı hücrelerin ortadan kaldırılması gibi süreçlerde yer alan apoptozisin biyolojik önemi büyüktür. Apoptotik programda meydana gelen fonksiyon ya da düzenlenme bozuklukları çeşitli patolojik durumlarla ilişkilidir. Apoptozis sürecinde oluşacak bir hata; kanser, otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonların yayılması ile sonuçlanabilir. Buna karşın apoptozisin çok fazla gerçekleştiği durumlar ise nörodejeneratif bozukluklar, AIDS ve iskemik hastalıklar ile sonuçlanabilmektedir.

2.6.1. Apoptotik hücrede görülen morfolojik değişiklikler

Apoptotik hücreler tipik morfolojik değişikliklerle tanımlanabilir: hücre büzülür, deformasyona uğrar ve komşu hücrelerle olan temasını kaybeder. Kromatini kondanse olur ve nükleer membranın altında konumlanır, plazma membranı blebilenir ve hücre son olarak, sitozol, kondanse kromatin ve organelleri içeren membranla çevrili yapılar yani “apoptotik cisimcikler”e parçalanır. Apoptotik cisimcikler, çoğunlukla makrofajlar bazen de komşu hücreler tarafından fagosite edilir ve dokudan herhangi bir inflamatuvar yanıt oluşmadan uzaklaştırılırlar. Bu morfolojik değişiklikler, apoptotik bir hücrede meydana gelen karakteristik moleküler ve biyokimyasal olayların neticesidir. Sitoplazma ve organellerin şekil ve bütünlüğünü belirleyen belli bazı protein substratların ve DNA'nın oligonükleozomal parçalanmasını sağlayan proteolitik enzimlerin aktivasyonu, bu olaylardan öne çıkanlardır. Nekrotik hücre ölümü, apoptozisin tersine, membran bütünlüğünün kaybı, şişme, ve hücrelerin parçalanması ile sonuçlanan bir süreçtir (Şekil 2.5). Nekrozis, enerji üretim yetmezliği, iyon kanallarındaki bozukluklar veya pH dengesindeki aşırı değişimler gibi birtakım

fizyolojik koşulların aşırı bozulması sonucunda hücresel içerik kontrolsüz bir şekilde hücre çevresine dağılır ve bunun sonucu olarak komşu hücrelerin zarar görmesinden dolayı dokuda güçlü bir inflamatuvar yanıt oluşur. Apoptozisde erken hücre-hücre temas kaybı, nekrozisde ise geç hücre-hücre temas kaybı gözlenmektedir. Apoptozis için ATP gerekliyken (aktif süreç) nekrozisde ATP gerekmez çünkü pasif bir süreçtir (Buja ve ark. 1993) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Apoptozis ve Nekrozisin şematik karşılaştırılması

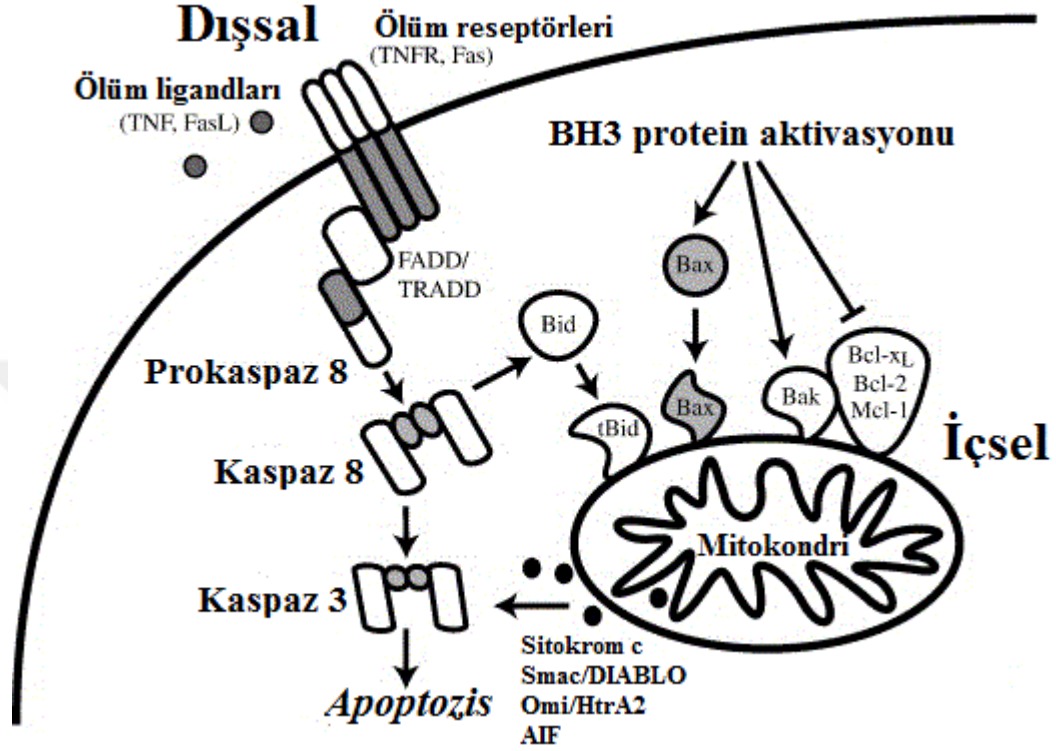
2.6.2. Apoptozis mekanizması

Bir uyarıyı takiben, apoptozisin ilk basamağını/karar fazını hücre ölümünün genetik kontrol noktaları oluşturur. Bunu ise, apoptozisin morfolojik değişikliklerinden sorumlu olan ikinci basamak/ilerleme fazı takip eder. Apoptozisin çok çeşitli fizyolojik ve patolojik uyarınları olup başlıca dört büyük gruba ayrılır. İyonize radyasyon ve alkilleyici antikanser ilaçları içeren ilk grup uyarınlardır DNA hasarına sebep olurlar. İkinci grup ise apoptozisi ya glukokortikoid ve tümör nekroz faktör (TNF) aracılı reseptör aktivasyonu ile ya da büyüme faktörleri (sinir büyüme faktörü ve interlökin-3) aracılı mekanizmalarla uyarır. Fosfatazlar ve kinaz inhibitörlerini içeren üçüncü grup

apoptotik yolları biyokimyasal ajanlarla uyarır. Ultraviyole (UV) ışın ve okside edici ajanları (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit) içeren dördüncü grup doğrudan hücre membran hasarına sebep olurlar. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin fazla miktarda üretimi, lipid membranları, proteinleri, nükleik asitleri ve ekstraselüler matriks glukozaminoglikanlarına zarar veren serbest radikallerinin oluşumuna sebep olur. Bu uyarıların yüksek dozları nekrozise yol açar. Hücre membranının asit sfingomiyelinazı aktive ederek hasarlanması apoptozisi uyarır ve sonuç olarak membran lipidlerinden ikincil mesajcı seramid oluşumu gözlenir. Apoptozisi başlatan sinyaller, hücre yüzey ölüm reseptörlerinin bağlanması ya da genom hasarından kaynaklanabilir (Elmore 2007).

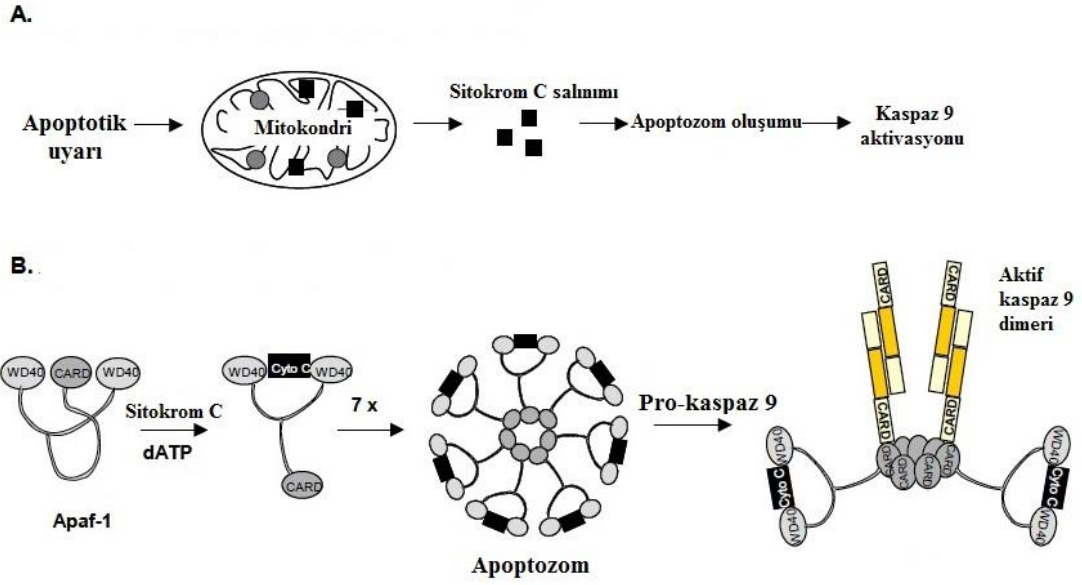
Apoptozis başlıca iki yol aracılığıyla gerçekleşir. İlki dışsal (ekstrinsik)/sitoplazmik yol olup, hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ligandlarıyla bağlanması sonucu aktifleşir. Ölüm reseptörleri TNFR (tümör nekroz faktör reseptörü) süperailisine aittir. Bu aile üyeleri, tip I transmembran proteinleri olup sistence zengin ekstraselüler domainleri ile ligand bağlama özellikleriyle karakterizedir. Ölüm reseptörleri, apoptotik sinyalin transdüksiyonu için gerekli olan 80 amino asit uzunluğunda intraselüler ölüm domaini (DD) içerir. Sıklıkla çalışılan ölüm reseptörleri Fas (CD95/Apo-1), TNFR1, TRAIL-R1 (DR4) ve TRAIL-R2 (DR5/Killer/TRICK2)'dir. Ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar (FasL, TNF α ve TRAIL) yapısal olarak reseptörler ile ilişkili proteinler olup TNF süperailisine aittir. Bu ölüm ligandları tip II transmembran proteinleri gibi eksprese edilirler. Bazı durumlarda, bu proteinler proteolitik kırılabilir ve serbest kalabilirler. TRAIL-R1 veya TRAILR2'ye TRAIL ya da agonistik monoklonal antikörlerin bağlanması, hücre membranında bulunan reseptörün oligomerizasyonu ve apoptozisin başlaması ile sonuçlanır. FasL ve TRAIL tarafından başlatılan hücre içi sinyal kaskadı benzer yolları içerir. Reseptörlerin aktivasyonu, DISC (ölüm indükleyici sinyal kompleksi) denilen ve proteinlerden meydana gelen bir kompleks oluşumuna sebep olur. DISC, reseptörün ölüm alanı ve prokaspaz 8'e kendi ölüm alanı ile bağlanabilen adaptör protein FADD'yi (Fas ilişkili ölüm alanı) içerir. DISC yapısında yer alan prokaspaz 8, otosüreçlerle aktifleşir yani lokal konsantrasyonları otokatalitik aktivasyonlarına ve aktif kaspaz-8 salınımına yol açmaktadır. İnsanlarda kaspaz 10 da, DISC yapısına katılabilir ve apoptozisi teşvik edebilir. Sonrasında aktif kaspaz 8 doğrudan kaspaz 3'ü veya diğer ilerletici kaspazları kırar. Kaspaz 8 ayrıca BH3

proteinlerinden Bid'i de kırabilir. Kırılmış Bid (tBid) sonrasında mitokondriye geçer ve kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonuna neden olacak sitokrom c salınımını uyarır (Ashkenazi 2008) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu

İkincisi içsel (intrinsik)/mitokondriyal yol olup, uyarıldığında mitokondriden sitokrom-c salınımına ve böylece ölüm sinyaline sebep olur. İki yol da, düzenleyici ve yapısal molekülleri kıran ve bunun sonucunda hücrenin ölümüne sebep olan kaspaz denilen proteaz kaskadının aktivasyonunu içeren ortak bir yolda birleşir. Mitokondriyal yolun kilit olayı mitokondri dış membran permeabilizasyonudur (MOMP). Permeabilizasyon sonucunda; sitokrom c, mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, apoptozis indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz D (EndoG) gibi mitokondri membran proteinleri sitozole salınır. Mitokondri iç membran yüzeyinden sitokrom c'nin sitozole salınması ile sitokrom c, sitoplazmik protein olan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, dATP/ATP'nin de ortamda bulunması ile Apaf-1/sitokrom c kompleksi heptamerik bir yapıya oligomerize olur. Bu yapının oluşması, prokaspaz 9'un Apaf-1 ile etkileşimini mümkün kılar ve apoptozom kompleksi oluşur (Fulda ve Debatin 2006) (Şekil 2.7).

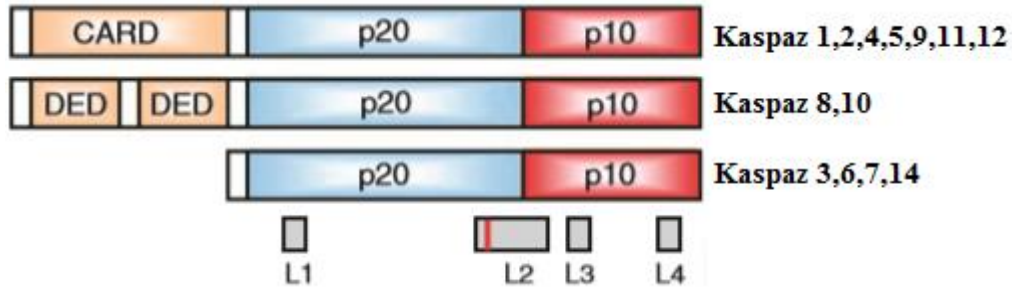


Şekil 2.7. Kaspaz aktivasyonunun mitokondriyal yolu (A) Apoptozom oluşumu ve aktivasyonu (B)

2.6.3. Kaspazların apoptozis sürecindeki rolü

Kaspazlar, sistein proteaz ailesine-katalitik nükleofil olarak sistein rezidülerini kullanan peptidazlar-ait olup hedef proteinleri aspartik asit rezidüleri ardından kesme özgülüğünü paylaşan proteinlerdir. Kaspazların belirli bir grubu apoptozis dışında, prositokin aktivatörleri olarak inflamasyonda görev alırlar. Kaspazların bazıları (2,8,9,10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, bazıları da (3,6,7) ilerletici kaspazlar olarak bilinmektedir. Hatalı düzenlenen kaspaz aktivitesi, hücre için ölümcül olabilir, bu sebeple kaspazlar hücre içerisinde prekürsör yani zimojen olarak sentez edilirler. Dolayısıyla aktivasyon süreci gerektirirler.

Kaspazlar, bir “prodomain”, bir p20 büyük alt birim ve bir p10 küçük alt birim içeren inaktif zimojenler şeklinde sentez edilirler. Zimojenlerin proteolitik kesim ile aktivasyonları sonucu, büyük ve küçük alt birimler ayrılır ve “prodomain”leri uzaklaştırılır. p20 alt biriminde yer alan katalitik rezidüleri, Cys285 ve His237’den oluşan aktif bir alandan oluşur. Kaspazlar, substratlarında birbirini takip eden en az dört amino asit (P4–P3–P2–P1) yapısını tanırlar ve C-terminal rezidüsünden (P1) sonra kırarlar. Bu ise genellikle Asp (aspartik asit) rezidüsüdür.



Şekil 2.8. Memeli kaspazlarının yapıları ve alt birim organizasyonları

Başlatıcı kaspazlar, protein-protein etkileşim motiflerini barındıran uzun bir “prodomain” içerir. Bu motifler, ya ölüm etkileyici domain (DED) ya da kaspaz takviye domainidir (CARD). Kaspazlar bu motifler sayesinde adaptör moleküllerle etkileşimlerini sağlarlar (Şekil 2.8). İlerletici kaspazlar, kısa bir “prodomain” içerirler ve apoptozisin ilerlemesini sağlamak için çok çeşitli hücrel substratları kırarlar (Cohen 1997).

Başlatıcı kaspazlar, aktif formlarının en az bir aktif bölge içeren katalitik üniteleriyle dimer oluştururlar. Katalitik üniteler, bir büyük ve bir küçük olmak üzere iki alt birim içermektedir. Bu alt birimler prekürsör moleküllerin bağlayıcı bölgeden internal kesimi sonucu ayrılmalarıyla meydana gelirler. Fakat son çalışmalar, başlatıcı kaspazların aktivasyonu için kesim sürecinin gerekli olmadığını göstermektedir. Başlatıcı kaspazların zimojenleri hücre içerisinde inaktif monomer durumundadırlar. Monomerik zimojenler, aktif şekilleri için dimerizasyon sürecine ihtiyaçları vardır ve bu aktivasyon kesim işleminden bağımsızdır. Aktive edici kompleksler, içsel ve dışsal yol olmak üzere ölüm uyarısına göre işlev görürler (Şekil 2.8).

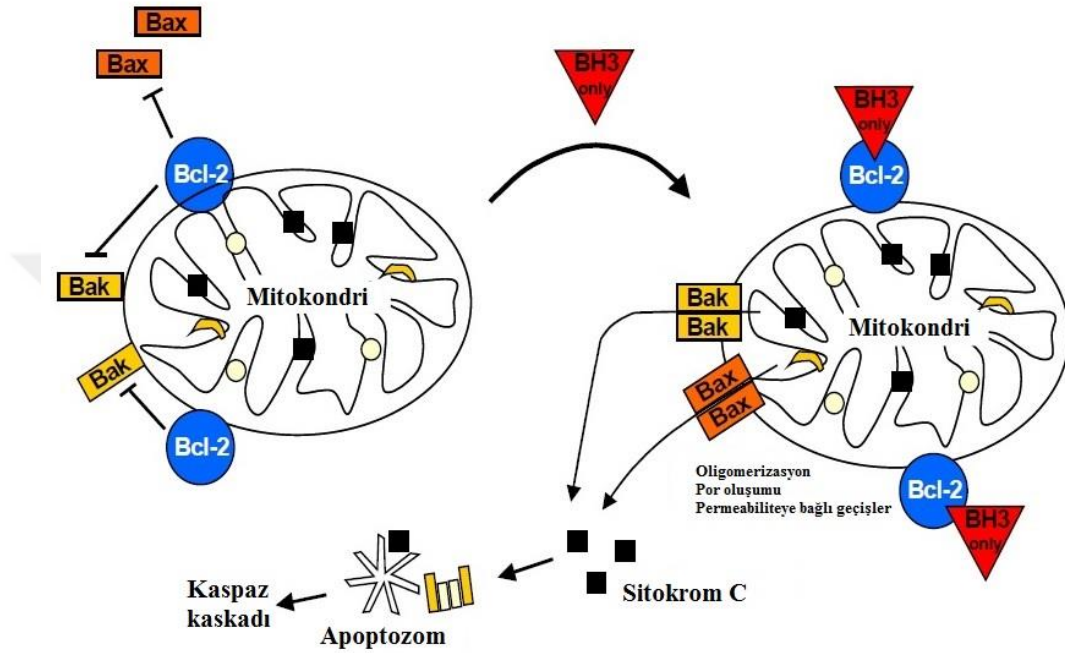
2.6.4. Mitokondri dış membran permeabilizasyonu (MOMP)

Mitokondri, enerji üretiminde rol alan hücrel organellerden biri olup hücrel yaşam için önemi büyüktür. Bunun yanında, hücre ölümünde de önemli roller üstlenmektedir. Apoptozis sürecinde gerçekleşen mitokondri dış membran permeabilizasyonu (MOMP), “geri dönülmez” bir noktayı ifade eder ve takiben, normal (homeostaz) koşullarda mitokondriyal iç (IMM) ve dış (OMM) membranları arasında yer alan birçok proteinin sitozole bırakılması gerçekleşir. MOMP, sıklıkla mitokondri membran potansiyelinin ($\Delta\Psi_m$) bozulmasıyla ilişkilidir. Apoptotik koşullar altında en önemli MOMP mekanizması Bcl-2 aile üyelerini içerir. Apoptozis sırasında aktif Bax ve/veya Bak

mitokondri dış membranında (OMM) porlar oluşturur ve membranlar arası proteinlerin sitozole salınımına sebep olurlar. MOMP indüksiyonuna mitokondri iç membranı (IMM) da katkı sağlayabilir. İç membran, permeabilizasyon geçiş poru (PTP) aracılığıyla MOMP'ye sebep olur. PTP, dış membranda yer alan voltaj bağımlı anyon kanal (VDAC) proteinleri, iç membranda yer alan adenin nükleotit translokator (ANT) ve matrikste bulunan siklofilin D (cypD) gibi çeşitli proteinlerin yer aldığı bir komplekstir. Bu porun açılması, iyonların mitokondri matriksine geçişini sağlamakta ve $\Delta\Psi_m$ kaybı ile birlikte matriksin şişmesine yol açmaktadır (Yong Jeong ve Wu Seol 2008).

Bcl-2 ailesi, işlevlerine ve içerdikleri Bcl-2 homoloji alanlarının (BH) sayısına göre üç gruba ayrılır. Anti apoptotik üyeler (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1 ve Bcl-B) mitokondri dış membranıyla ilişkilidirler ve hücreleri çeşitli apoptotik uyarılara karşı korurlar. Yapılarında dört çeşit BH alanı (BH1-BH4) bulunur. Pro apoptotik üyeler iki gruba ayrılır. Bunlar Bax-benzeri çoklu alan (BH1-BH3) apoptotik proteinleri (Bax, Bak, Bok) ve yalnızca-BH3 proteinleridir (Bik, Bid, Bad, Puma, Noxa, Bim, Hrk, Bmf). Bcl-2 aile proteinleri, homo- ve heterodimerler oluştururlar ve pro ve anti-apoptotik üyeler arasındaki etkileşimler birbirlerinin aktivitelerini dengeler ve bu pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 aile üyelerinin dengesi, hücrelerin yaşamı ve ölümünü belirlemede oldukça önemlidir. BH3 proteinlerinin aktivitesi, transkripsiyonel ya da post-translasyonel seviyede çeşitli mekanizmalarla düzenlenir. En azından dört BH3 proteini, apoptotik uyarılara yanıt olarak transkripsiyonel olarak uyarılır. Bu proteinler; Hrk, Puma, Noxa ve Bim'i içerir. Bad, Bim ve Bik fosforilasyon ile düzenlenir. Bad ve Bim'in pro apoptotik potansiyeli fosforilasyonla azalır. Bunun tersine, Bik'in fosforilasyonu pro apoptotik aktivitesini arttırmaktadır. Bid proteolitik kırılarak aktifleştirilir ve kırılmış Bid'in (tBid) mitokondriye geçişi, kırılma sonrası modifikasyona uygun hale gelmiş bölgenin N-miristilasyonu ile gerçekleşir. Aktifleşmiş BH3 proteinleri anti apoptotik Bcl-2 üyelerin pro apoptotik üyelerini baskılamasını ortadan kaldırır. Apoptotik uyarı akabinde temel olarak Bax ve Bak eksprese edilir ve MOMP uyarılır. Dolayısıyla Bax ve Bak normal hücrelerde inaktif durumdadır. Bax proteinleri, sitozolde monomerler şeklinde bulunurlar ve aktif olmadıkları sürece mitokondri dış membranı ile ilişkileri minimal düzeydedir. Bax, aktivasyon sürecinde mitokondriyal dış membranına transloke olur. Sonucunda, sitokrom c gibi pro apoptotik

faktörler mitokondri iç membranından sitozole salınır ve apoptozom oluşumunu takiben kaspaz kaskadının aktivasyonu gerçekleşir (Şekil 2.9). Bak, aktif olmadığı durumlarda bile mitokondriyal dış membranda konumlanabilir. Belli bazı BH3 proteinlerin aktivasyonu, Bax ve Bak'ın oligomerize olmaları ve sonrasında mitokondri dış membranına stabil şekilde konumlanmaları için gereklidir (Spierings ve ark. 2005).



Şekil 2.9. Apoptozis'in Bcl-2 ailesi tarafından düzenlenmesi

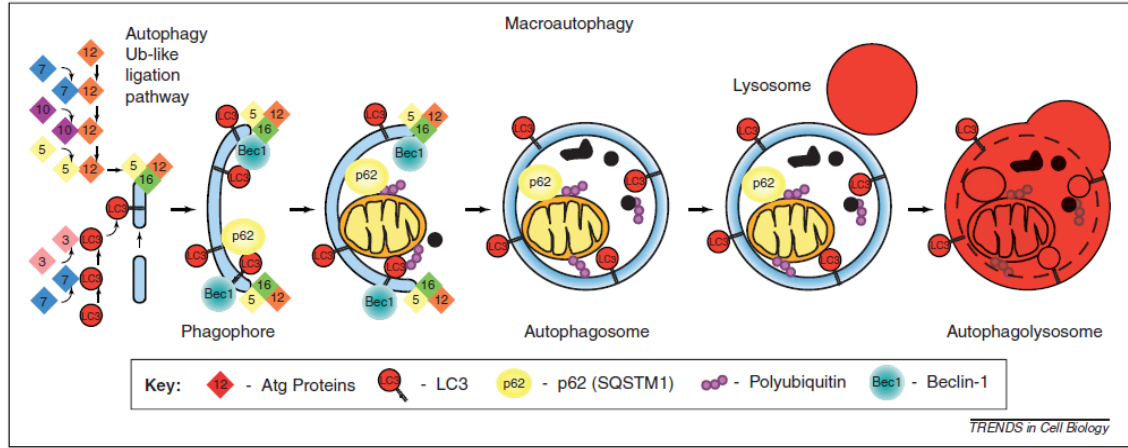
2.7. Otofaji

Otofaji, hasarlı ya da gereğinden fazla, yaşlı organel ve proteinlerin geri dönüşümünü sağlayan, kanser hücrelerinde önemli sitoprotektif mekanizma olarak görev alan katabolik bir yoldur. Büyük proteinlerin ya da organellerin sindirildiği mekanizmaya "makrotofaji" denirken mitokondrinin sindirildiği mekanizmaya özel olarak "mitofaji" denmiştir. Otofajinin bir diğer çeşidi olan mikrotofajide ise oluşan keseciklerin yapısına direkt lizozom enzimleri katılır ve bu kesecikler lizozom görevi görürler; yani makrotofajideki gibi lizozomun yapısına katılmazlar. Şaperon aracılıklı otofajide ise proteinler kesecikler oluşmadan direkt lizozom içerisine alınırlar (Lorina ve ark. 2013). DNA hasarı (kemo veya radyoterapi), hücre proliferasyonunun inhibe edilmesi, büyüme faktörleri, metabolik sinyallerde bozulma hücrede strese neden olur. Bu stres terapisinin sonucu olarak, kanser hücrelerinde otofajik yanıt oluşur, bu da enerjinin açığa çıkmasına ve hücre yaşamına neden olur. Fakat bu stres çok şiddetli ve uzun süreli ise,

otofaji sitotoksik olabilir ve hücre ölümüne neden olur. Radyoterapi, hormon terapi ve çeşitli hedefli terapiler farklı kanser tiplerinde otofajiyi uyarır ve tedavi sırasında kanser hücreleri için yaşam avantajı sağlar. Otofaji düzenlemesi kanser tedavisine karşı direnç etkisini ortadan kaldırır ya da bu tedavilerin etkisini artırır. Araştırmalar, otofaji anormalliklerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını göstermektedir (Zhou ve ark. 2012).

Otofogozomlar ya da otofojik vakuoller (AVs), otofaji sırasında oluşan multimembran veziküllerdir. Otofojik vakuoller (AVs) sitoplazmanın komponentlerini ayrıştırır ve degradasyon için lizozomlara gönderir. Otofajide başlangıç basamak fagoforun formasyonudur. Fagofor genişler ve degrade olmuş materyali çevreler, çift membran otofogozom oluşumu gerçekleşir aynı zamanda erken otofojik vakuol (AV-I) olarak bilinir. Daha sonra lizozomlar ile birleşme, çökme ve geri dönüşüm meydana gelir (Hippert ve ark. 2006). Mayalarda 30 dan fazla ve memelilerde en az 11 tane (ATG 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,12 and 16) ATG geni belirlenmiştir. Memelilerde Atg6, Beclin 1 ve Atg 8 ise LC3 olarak adlandırılır. Otofaji, evrimsel olarak korunmuş ATG genleri tarafından kontrol edilir. Bu genler otofajik veziküllerin indüksiyon ve çekirdeklenmesi, bunların tamamlanması, genişlemesi ve lizozomlar ile birleşme, çökme ve geri dönüşümünü kontrol eder (Amber ve ark. 2013). Atg1, Atg13 ve Atg17 genleri otofogozom başlaması için gereklidir. Vezikül nükleasyonunun bir sonraki adımı Beclin1-phosphatidylinositol-3 kinaz (PI3K) ve Atg14 tarafından düzenlenir. Otofogozomun genişlemesi ve kapanması Atg12-Atg5 ve Atg8/LC3 ubiquitin benzeri konjugasyon sistemine bağlıdır. LC3-I, Atg5 bağımsız yolda otofogozomal membranları hedef alır ve Atg12-Atg5 kompleksinin ayrılmasından sonra orada kalır (Şekil 2.9). Fagofor membranlarının uzatılması iki ubikitin benzeri konjugasyon sistemi ile gerçekleştirilir. ATG12-ATG5-ATG16L1 kompleksi, şekillendirme membranı ile ilişkilidir. ATG12, önce bir el benzeri enzim olan ATG7 ile ATP'ye bağlı bir reaksiyon ile aktive edilir. ATG12, daha sonra bir E2 benzeri enzim olan ATG10 tarafından ATG5'e konjüge edilir. ATG16L1 daha sonra ATG12-ATG5 konjüğü ile etkileşerek bir dimerik kompleks oluşturur. Kompleksin bileşenleri, uzatma tamamlandığında otofagozomdan ayrılır ve sitoplazmaya geri döner. Zarın uzamasına katkıda bulunan ikinci ubikitin benzeri konjugasyon, maya proteini Atg8'in memeli homologu

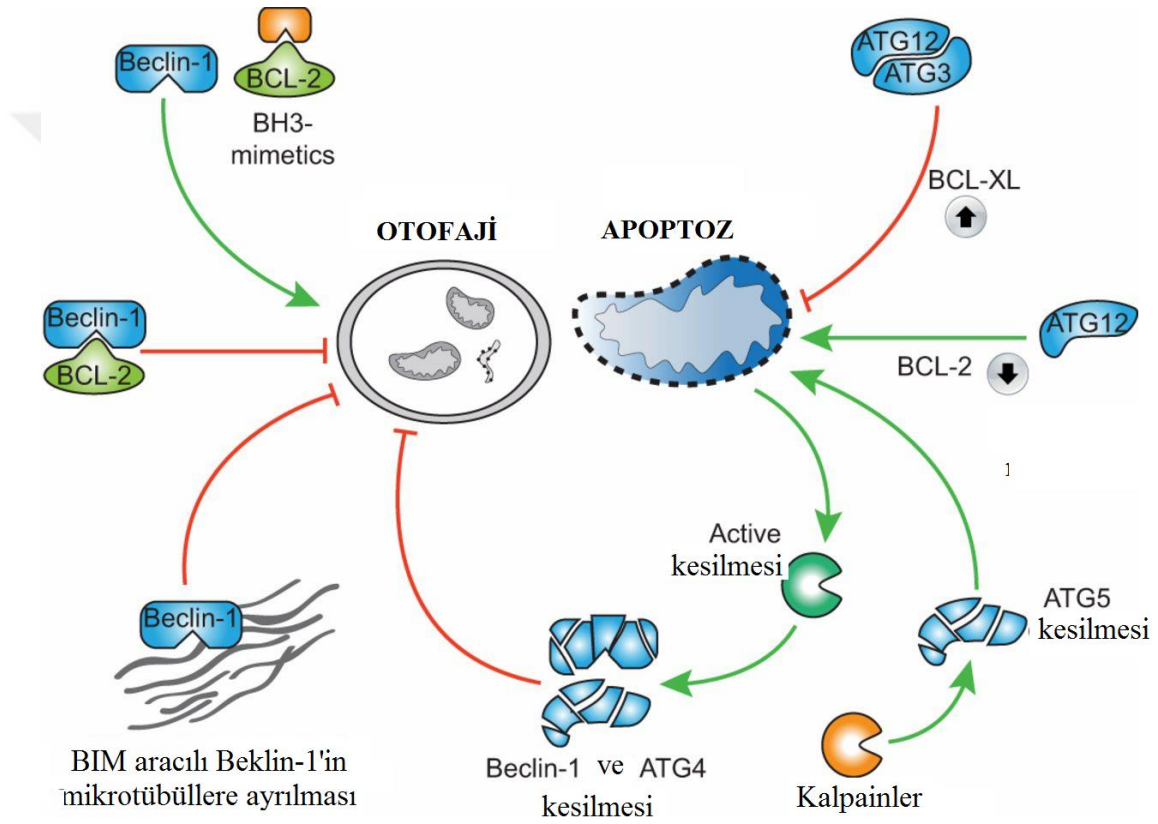
MAP1LC3 dür. Dört memeli ATG4 homologundan biri olan ATG4B, öncü LC3 (proLC3) üreten LC3-I'nin C terminali 22 rezidülerini keser. Daha sonra, sitoplazmik LC3-I, bir E2 benzeri enzim olan ATG7 ve ATG3 tarafından fosfatidiletanolamin (PE) ile konjuge edilir. Lipidlenmiş LC3 (LC3-II) seçici olarak oluşturan otofagozom zar içine dahil edilir (Şekil 2.10). LC3-II ilişkili dış membran ayrışana ve LC3-II ilişkili iç membran otofagosomal kargo ile birlikte lizozomal proteazlar tarafından degrades olana kadar otofagozom ile ilişkili olarak kalır. LC3-II'nin bu özel birleşimi onu çekici bir otofaji belirteci yapar. Otofagozom, otolizozomu oluşturan bir lizozom ile birleşir (Şekil 2.9). Lizozom ile kaynaşma, iç otofagosomal membranın ve kargonun lizozomal proteazlar tarafından parçalanması ve makromoleküllerin geri dönüşümü ile sonuçlanır (Jäger ve ark. 2004, Fader ve ark. 2009).



Şekil 2.10. Makrotofaji (Gump ve ark. 2011)

Yaşam, hücre ölümüne neden olan tedaviye karşı savunma mekanizmasını kendini koruma mekanizması olarak sunarken, aşırı ve uzamış otofaji hücre yaşamını ve iyileşmesini engellemektedir. Bu otofajik hücre ölümü veya programlı hücre ölümü tip II olarak bilinen hücre ölüm programını uyarır, bazen de apoptozu uyarır. Otofajinin hem baskılanması ve uyarılması, gerçekçi terapötik yaklaşımlardır. Tümör hücrelerini otofajik ölüme gitmeye zorlar. Otofajik hücre ölümü, apoptozdan, artmış otofagozom formasyonu ve kaspaz bağımsızlığı açısından farklılık gösterir. Otofajinin inhibisyonu, tedavi süresince yaşam mekanizması olarak kullanılmasını önler. İntact apoptoz sinyaline sahip hücrelerde, otofaji inhibisyonu hücrelerin apoptozla gitmesine neden olur. Stres uyarıcıların yokluğunda anti-apoptotik Bcl2, Beclin1-BH3 domainine bağlanır ve otofaji yeteneğini inhibe eder. Fakat açlık boyunca ya da stres koşulları

altında birçok mekanizma bu etkileşimden kaynaklanan bozukluğu düzeltir ve Beclin1-aktivasyonu stres durumu altında gerçekleşir. Besin yeterliliği durumunda Beclin 1 Bcl-2 ya da Bcl-xL tarafından bağlanır ve otofaji başlatma yeteneğini inhibe eder. Açlık boyunca ya da stres koşulları altında birçok mekanizma bu etkileşimden kaynaklanan bozukluğu düzeltir ve otofajiye olanak sağlar. Bu mekanizmalar; Beclin-1 BH3 domaininin DAPK-aracılığıyla fosforilasyonu, Bcl-2 'nin yapısal olmayan loop'unun JNK aracılığıyla fosforilasyonu Bcl-2/Bcl-xL bağlanması için Bad ve Bax ile rekabet, Beclin-1'e DAMP molekül HMGB-1'in bağlanmasından oluşur (Notte ve ark. 2011).



Şekil 2.11.Otofaji ve apoptoz arasındaki ilişki (Tait ve ark. 2014)

Apoptoz ve otofaji yolları arasındaki kompleks bağlantıya rağmen, otofaji daha çok hücre yaşamı şeklinde sonuçlanır (Şekil 2.11). p62/SQSTM1 veya selektif otofajiyi başlatmak için degrade olan taşıyıcı bir protein ve otofogozom reseptörüdür. p62/SQSTM1, LC3'ü, sekvestozomların bozunması için gerekli olan LC3 etkileşim bölgesi (LIR) vasıtasıyla bağlar. p62/SQSTM1, otofaji de poliubikitin içeren cisimlerin oluşması ve parçalanması için de gereklidir. Otofajide ki p62/SQSTM1 rolünün dışında, hücre sinyallemesinde farklılaşma, apoptoz ve immun cevap üzerine de etkilidir. p62

birçok proteinin seçici otofajik degradasyonuna dahil olsada, p62 ayrıca birçok apoptotik ve yaşam yollarına da dahil olmaktadır. p62 kaspaz 8 ile de etkileşime girer ve etkili kaspaz 8 aktivasyonu için önemlidir. Diğer bir yandan p62, ölüm reseptör aktivasyonuna cevaben kaspaz 6 ve 8 tarafından kırılır ve otofaji tarafından degrade edilir. Bu nedenle apoptozun etkinliğini değiştiren otofaji ve p62 bağımlı otofajiyi etkileyen apoptoz arasında karşılıklı ilişki bulunmaktadır (Jing ve ark. 2016).

2.8.Anjiyogenez

Tümör büyümesi ve metastazı, hızlı büyüme evresindeki tümör hücrelerinden gelen kimyasal sinyaller tarafından tetiklenen anjiyogeneze ve lenf anjiyogeneze bağlıdır (Folkman 1971). Yapılan bir çalışmada aynı organın farklı bölgelerine verilen kanser hücrelerinin davranışları karşılaştırıldı (Muthukkaruppan ve ark. 1982). Bir bölge kan dolaşımına sahip idi; diğeri ise kan dolaşımı olmayan kısım idi. Kan dolaşımı olmayan kanser hücreleri çapı 1-2 mm³'e ulaştığı ve daha sonra durduğu ancak anjiyogenezin mümkün olduğu bir alana yerleştirildiğinde 2 mm³'ün üzerinde büyüdüğü gözlemlendi. Buna göre vasküler desteğin yokluğunda, tümörler nekrotik veya apoptotik hale gelebileceği belirlendi (Holmgren ve ark. 1995, Parangi ve ark. 1996). Bu nedenle anjiyogenez kanser ilerlemesinde önemli bir faktördür. Neovaskülarizasyon, tümör anjiyogenezini de dahil olmak üzere, temel olarak dört basamaklı bir işlemdir. İlk olarak, dokulardaki bazal membran lokal olarak yaralanır ve tahribat ve hipoksi oluşur. İkincisi, anjiyogenik faktörler tarafından aktive edilen endotel hücreleri migrasyon için hazır hale gelir. Üçüncü olarak, endotel hücreleri proliferer ve stabilize olur. Dördüncü olarak, anjiyogenik faktörler anjiyogenik süreci etkilemeye devam etmektedir. Vasküler endotel hücreleri, ortalama olarak her 1000 günde bölünür (Denekamp 1993). Anjiyogenez tümör dokuları besin maddeleri ve oksijen gerektirdiğinde uyarılır. Anjiyogenez hem aktivatör hem de inhibitör moleküller tarafından düzenlenir. Bununla birlikte, anjiyogenik faktörlerin aktivitesinin upregülasyonu, neoplazmanın anjiyogenezisi için yeterli değildir. Negatif düzenleyiciler veya damar büyümesinin önleyicileri de downregüle edilmelidir (Dameron ve ark. 1994).

2.8.1. Anjiyogenez mekanizması

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), anjiyojenin, transforme edici büyüme faktörü (TGF)- α , TGF- β , tümör nekroz faktörü (TNF)- α , trombosit türevi endotel büyüme faktörü, granülosit koloni uyarıcı faktör, plasental büyüme faktörü, interlökin-8, hepatosit büyüme faktörü ve epidermal büyüme faktörü dahil olmak üzere bir düzineden fazla farklı protein, anjiyojenik aktivatörler olarak tanımlandı. VEGF, normal dokularda olduğu gibi neoplastik dokularda da güçlü bir anjiyojenik ajandır. Bazı sitokinlerin ve diğer büyüme faktörlerinin etkisi altında, VEGF ailesi kanserli dokuda ve komşu stromada görülür ve neovaskülarizasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Folkman 1990, 1995a, 1995b). Bazı anjiyogenik fenotipler, büyüyen tümör hücreleri ile kılcal damarlar arasındaki artan mesafeden veya yeni damarların yetersizliğinden kaynaklanan hipoksi ile tetiklenebilir. Hipoksi, hipoksi ile uyarılabilir faktör-1 α (HIF-1 α) aracılığıyla VEGF ve reseptörünün ekspresyonunu indükler (Bottaro ve Liotta 2003). Tümör hücreleri yeni kan damarlarında VEGF üreterek beslenir ve çevredeki dokuya salgılanır. Tümör hücreleri endotel hücreleri ile karşılaştığında endotel hücre dış yüzeyindeki reseptörlere bağlanırlar. VEGF'nin reseptörüne bağlanması, endotel hücrenin çekirdeğine sinyal ileten proteinleri aktive eder. Nükleer sinyaller, bir grup genin endotel hücre büyümesi için gerekli ürünlerin yapılmasını sağlar. VEGF tarafından aktive edilen endotel hücreleri, matriks metalloproteinazları (MMP'ler) üretir. MMP'ler hücreler arasındaki boşlukları dolduran ve protein ve polisakaritlerden oluşan hücre dışı matrisi parçalamaktadır. Bu matris, endotel hücrelerinin migrasyonuna izin verir. Endotel hücreleri bölgedeki dokulara geçtikçe bölünmeye başlarlar. Daha sonra integrin α veya β gibi yapışma faktörleri yardımıyla kademeli olarak kan damarlarının olgun bir ağına dönüşen içi boş tüp halinde organize olurlar. (Mizejewski 1999, Nelson ve ark. 2000). Yeni oluşan kan damarlarının dengelenmesi veya olgunlaşması gerekir. Anjiyotensin-1-2 ve bunların reseptörü Tie-2 vasküler büyümeyi stabilize eder ve yönetir (Suri ve ark. 1996, Maisonpierre ve ark. 1997, Tournaire ve ark. 2004). VEGF ailesinden, kendi reseptörleri üzerinde etki gösteren VEGF-A, VEGF-B, VEGFC ve VEGF-E, kan damarlarının çoğalmasına neden olurken, VEGF-C ve VEGFD lenfanjiogenetikte rol alır (Neufeld ve ark. 1999, Mandriota ve ark. 2001, Rafii ve Skobe 2003). Vasküler endotelial büyüme faktörü-A, en azından altı moleküler izoformda oluşan bir heparin

bağlayıcı glikoproteindir (Ferrara ve ark. 1992, Stalmans ve ark. 2002). VEGF-A, vasküler endotel hücreleri için güçlü ve çok spesifik bir mitojendir ve anjiyogenez için gerekli olan olayların tüm basamaklarını uyarır (Leung ve ark. 1989, Conn ve ark. 1990), ve birçok tümörde aşırı eksprese edilir (Dvorak 2002). VEGF-B, VEGFR-1'e spesifik olarak bağlanan iki protein izoformu VEGF-B167 ve VEGF-B186 olarak bulunur. Bununla birlikte, VEGF-B, VEGF-A ile bir heterodimer oluşturarak onun biyolojik reseptörleri ile olan etkileşimini ve normal fizyolojik etkilerini değiştirir. (Olofsson ve ark. 1996). VEGF-B, kalp, iskelet kası ve vasküler hücrelerde yaygın şekilde bulunurken, biyolojik fonksiyonu belirsizliğini korumaktadır (Olofsson ve ark. 1996, Yonekura ve ark. 1999). Ayrıca, VEGF-B düzeylerinin gelişme boyunca ve doğumdan sonra arttığı ve kardiyak anjiyogenezin progresyonuyla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Bellomo ve ark. 2000). VEGF-C, reseptör bağlanma yerleri ihtiva eden VEGF homoloji domaininden oluşan bir yapıya sahiptir (Joukov ve ark. 1998). VEGF-A'nın aksine, VEGF-C'nin ifadesi hipoksi ile düzenlenmez (Enholm ve ark. 1997). VEGF-C'nin ekspresyonu, erken gelişme ve tümör anjiyogenezi ve lenfojeniz gibi bazı patolojik olaylarla sınırlıdır (Peeper 2001). VEGF-D, c-FOS ile indüklenen büyüme faktörü (FIGF) olarak bilinir ve VEGF-C ile % 61 aynı aminoasit dizisine sahiptir ve bu büyüme faktörlerinin her ikisi de VEGFR-2 ve -3 olarak adlandırılan insan endotel hücrelerindeki aynı reseptörlere bağlanırlar (Orlandini ve ark. 1996, Achen ve ark. 1998, Baldwin ve ark. 2001). VEGF-C ve VEGF-D, embriyogenezin orta evrelerinde lenfojeniz yanısıra anjiyogenezi düzenleyen VEGFR-3'e bağlanır ve etkinleştirir (Soker ve ark. 1998). VEGF-E'nin reseptörü ile etkileşimi, endotelial hücre büyümesini teşvik etmektedir (Ogawa ve ark. 1998). VEGFR-2 üzerindeki VEGF-A bağlanma cebi ile VEGF-E bağlanma cebi arasında bu iki faktör arasında antagonistik bir ilişki olduğunu gösterecek önemli bir örtüşme vardır (Kiba ve ark.2003).

2.9.İlaç Dirençliliği

İlaç direnci, hastalıkların farmasötik tedavilere toleranslı hale gelmesiyle sonuçlanan iyi bilinen bir olgudur. Bu kavram, ilk olarak bakterilerin bazı antibiyotiklere karşı direnç kazanması üzerine anlam kazandı ancak o zamandan beri benzer mekanizmalar kanser dahil diğer hastalıklarda da görüldü. İlaç direncinin bazı yöntemleri hastalığa özgüdür; ilaç efluks evrimsel olarak korunmaktadır. Başlangıçta birçok kanser türü kemoterapiye

duyarlı olsalar da, zamanla bu ve diğer mekanizmalarla (DNA mutasyonları ve ilaç inhibisyonu ve bozulmayı teşvik eden metabolik değişiklikler) direnç geliştirebilirler. Kanser ilaç direnci, ilaç inaktivasyonu, ilaç hedef değişikliği, ilaç efluks, DNA hasar onarımı, hücre ölüm inhibisyonu, EMT, doğal hücre heterojenitesi, epigenetik etkiler veya bu mekanizmaların herhangi bir kombinasyonundan etkilenen karmaşık bir fenomendir. Mevcut paradigma, kombinasyon tedavisinin en iyi tedavi seçeneği olduğunu çünkü ilaç direncinin gelişmesini önlemesi ve herhangi bir ilacın kendinden daha etkili olabilmesi için en iyi tedavi seçeneği olması gerektiğini belirtmektedir (Sarkar, ve ark. 2013, Sarkar ve ark. 2014, Heerboth ve ark. 2014). Bu nedenle, kanserlerde artan ilaç direnci prevalansını gidermek için bu şekilde tedavi rejimleri düşünülmeli ve geliştirilmelidir. Kanser progenitör hücreleri çoğu zaman ilaca dirençlidir. Bu öncü hücreler hastalarda görünüşte remisyona devam edebilir ve metastaz sırasında durağan kalabilir veya diğer bölgelere göç edebilir. Böylece, kanser öncül hücreleri özgün tümör bölgesinde veya uzak organlarda kanser nüksetmesine neden olabilir. Antikanser tedavisinin geliştirilmesindeki bir sonraki adım, böyle kanser öncül hücrelerinin ortadan kaldırılmasını hedef almalıdır. Ek olarak, ilaca dirençli kanser hücrelerinin küçük bir nüfusunun varlığı, ele alınması güç olan başka bir karmaşıklık ortaya koymaktadır (Parkin ve ark. 2013). İlaça dirençli bu kanser hücreleri, remisyon sonrası kanser nüksetmesine katkıda bulunur. Bu nedenle, kanser ilaç direncinin altında yatan mekanizmaları anlamaya yönelik çabaları sürdürmek ve mevcut tedaviye yanıt vermeyen kanserlerin tedavi şeklini belirlemek önemlidir.

2.9.1.İlaç efluks mekanizması

Kanser ilaç direncinin en çok çalışılan mekanizmalarından biri de efluksı arttırarak ilaç birikimini azaltmaktır. ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı aile proteinlerinin üyeleri bu ilaç atılımını mümkün kılar ve sağlıklı hücrelerin plazma membranlarında iyi çalışılan önemli regülatörlerdir. ABC taşıyıcıları, yalnızca insan hücrelerinde değil çeşitli hücrelerde çeşitli maddelerin taşınması için işlev gören tüm filumlarda bulunan transmembran proteinlerdir. Taşıyıcının yapısı proteinden proteine değişmesine rağmen (örneğin, insanlarda ABC ailesinin 49 tanınmış üyesi vardır) oldukça korunmuş bir nükleotid bağlanma domaini ve daha değişken bir transmembran domain olmak üzere hepsi iki farklı domainin varlığı ile sınıflandırılmıştır (Chang ve ark. 2001). Belirli bir

substrat transmembran domaine bağlandığında, nükleotid bağlanma bölgesindeki ATP hidrolizi, konformasyonda bir değişiklik meydana getirir ve substratı hücrenin dışına iter. Bu efluks mekanizması, toksinlerin hücre içinde aşırı birikiminin önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Sauna ve ark. 2001). Şaşırtıcı olmayan bir şekilde, ABC taşıyıcıları karaciğerin ve bağırsağın epitelinde yüksek derecede eksprese edilir; burada proteinler, ilaçları ve diğer zararlı molekülleri safra yoluna ve bağırsak lümenine pompalayarak vücudu korur. Aynı zamanda kan-beyin bariyerini korumada büyük bir rol oynarlar (Schinkel ve ark. 1994, Borst ve ark. 2002).

ABC taşıyıcıları yoluyla efluks normal bir fizyolojik süreçken, kanser hücrelerinde bilinen bir ilaç direnci mekanizmasıdır. Çoklu ilaç direnci protein 1 (MDR1), çoklu ilaca dirençle ilişkili protein 1 (MRP1) ve meme kanseri direnci proteini (BCRP) olmak üzere üç taşıyıcı birçok ilaca dirençli kanserde rol oynar. Her üç taşıyıcı geniş substrat aralığına sahiptir ve vinca alkaloidleri, epipodofilotoksinleri, antrasiklinleri, taksanları ve kinaz önleyicilerini içeren birçok ksenobiyotik maddeyi hücrelerden dışarı atabilirler. Böylece kanser hücrelerini pek çok birinci basamak kemoterapiden korur. P-gp üreten MDR1, tüm taşıyıcılar arasında ilk belirlenen ve çokça çalışılan bir taşıyıcıdır (Gottesman ve ark. 2002, Szakas ve ark. 2004, Hilgendorf ve ark. 2007). Kolon, karaciğer ve böbrekteki MDR1 geninin normal ekspresyonu, bu dokular kanserleştiğinde artar. İlginç bir şekilde bir çalışmada, doksorubisin ile yapılan tedavinin, akciğer kanseri hücrelerinde MDR1 ekspresyonunda büyük bir artışa neden olduğu gösterilmişken, normal akciğer hücrelerinde ekspresyonda belirgin bir değişiklik gözlenmediği gösterilmiştir (Abolhoda ve ark. 1999). Bu da MDR1 aşırı ekspresyonunun hem intrinsik hem de kazanılmış mekanizmalarının bulunduğunu düşündürmektedir. Normalde MDR1'i ifade etmeyen, akciğer, meme ve prostat hücreleri gibi dokular, ilgili taşıyıcıların MRP1 veya BCRP'nin ekspresyonundan dolayı ilaca dirençlidir. BCRP normal hücreleri ksenobiyotik gibi toksinlerin etkilerinden korur, heme ve folat homeostazını korur ve kök hücrelerde eksprese edilir. Çeşitli kanser türlerinde yapılan birçok çalışma, bu taşıyıcıların tümör hücrelerinde artmış ekspresyonunun kötü klinik sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bir nöroblastom çalışmasında, yüksek MRP1 ekspresyon düzeylerinin zayıf klinik sonuçlar ile anlamlı korelasyon gösterdiği bulundu (Haber ve ark. 2006). Benzer şekilde, BCRP'nin ekspresyonu, küçük hücreli akciğer kanseri hastalarında ilaç yanıtını ve sağkalım

oranlarını öngörüyordu. Bazen, ilaç eflüksümü gefitinib gibi bir BCRP inhibitör ilacı kullanarak azaltmak mümkündür. Bu özel ilaç, BCRP'nin taşıyıcı fonksiyonunu bloke etmek, ilaç direncini tersine çevirmek üzere işlev gören bir tirozin kinaz inhibitörüdür (Yanase, ve ark. 2004). Doğrudan BCRP'yi inhibe etmek için az sayıda bileşik tespit edilmesine rağmen, östrojenin BCRP'nin ifadesini düzenlemede büyük bir rol oynadığı açıktır. Bir çalışma, 17b estradiol'ün meme kanseri hücrelerinde BCRP'nin ekspresyonunu downregüle ettiğini ve böylece kanser hücrelerinde kemoterapötik ilaçların konsantrasyonunun arttığını gösterdi (Doyle ve ark. 1998). Genel olarak, bu transkriptlerin inhibisyonu, kanser hücrelerinin ilaç tedavilerine hassaslaşmasına yardımcı olabilir.

Bir ilacın etkinliği, moleküler hedefi ve bu hedefin değişimleri, örneğin mutasyon veya ekspresyon seviyelerinin modifikasyonları tarafından etkilenir. Kanserlerde, bu tür değişiklikler sonuçta ilaç direncine yol açabilir. Kinazlar gibi sinyal moleküllerinin yapısal aktivasyonu hücre döngüsünü kontrol dışı bırakır ve kansere neden olur. Buna ek olarak, bu proteinler ayrıca P-gp ekspresyonunu düzenler ve böylece ilaç direncinin gelişmesini sağlamak için ortamı modüle edebilir. Östrojen, ER-pozitif meme kanseri hücrelerinde P-gp protein sentezini downregüle eder ancak ER-negatif meme kanseri hücrelerinde veya doksorubisine dirençli ER-negatif yumurtalık kanseri hücrelerinde bu geçerli değildir (Imai ve ark. 2005, Mutoh ve ark. 2006). Tersine, reseptör tirozin kinazların downstream yolağında hareket eden HRas, c-Raf, MEK 1/2, ERK 1/2 gibi MAPK yolunda yer alan proteinlerin aşırı ekspresyonu, P-gp ekspresyonunu artırır. Ekstraselüler sinyal düzenleyen kinaz (ERK) yolağının inhibitörleri P-gp ekspresyonunu downregüle ederken EGF ve FGF gibi büyüme faktörleri artırır (Katayama ve ark. 2007). İlginç bir şekilde, pek çok sinyal proteinini stabilize eden bir şaperon protein olan HSP90'ın inhibisyonu, P-gp'yi downregüle eder (Fukuyo ve ark. 2010). Genel olarak, bu sonuçlar, P-gp ekspresyonunun ve stabilitesinin sıkı bir şekilde düzenlendiğini ve tümör hücresi progresyonuna avantajlı olduğunu düşündürmektedir. Kanserlerde sıklıkla aktive olan bu kanserojen kinazları hedef almak, P-gp ekspresyonunu azaltmada ve kanser hücrelerini diğer ilaçlara hassaslaştırmada yararlı olabilmektedir. Bir başka antikanser ilaç hedef sinyal kinazları epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesinin üyeleri ve Ras, Src, Raf ve MEK gibi kinazları işaret eder. Bu kinazların bir kısmı belirli kanserlerde yapısal olarak aktiftir ve bu kontrolsüz

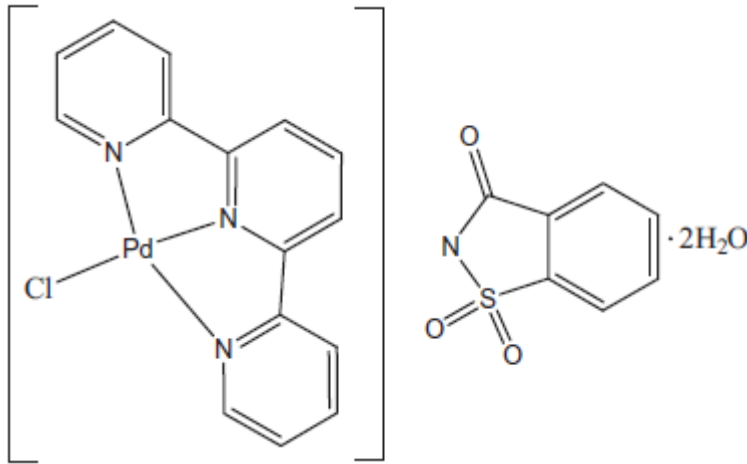
hücre büyümesini teşvik eder. Çoğu durumda, mutasyonlar bu kinazların aşırı aktivasyonuna neden olur. Bununla birlikte, bazen aynı etki, gen aşırı ekspresyonundan kaynaklanır. EGFR ailesinde bir reseptör tirozin kinaz olan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) meme kanseri hastalarının %30'unda aşırı eksprese edilir (Holohan ve ark. 2013) ve bu kinazı hedefleyen inhibitörlerin uzun süreli kullanımından sonra ilaç direnci ortaya çıkabilir (Slamon ve ark. 2001).

2.10. Palladyum (II) Bileşiği Yapısı ve Kanser Tedavisindeki Yeri

Günümüzde, özellikle tedavi imkanları içerisinde ilk sırayı alan kemoterapi, mevcut ilaçlar çerçevesinde yetersiz kalmakta ve birçok kanser türünde etkin bir tedavi sağlanamamaktadır. Bu nedenle son yıllarda yapılan kanseri önleyici yeni ilaç geliştirme çalışmaları heyecan ve umut vaadeden bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle kanser tedavisinde metal bileşiklerin çok çeşitli tümör hücre soylarına karşı umut verici etkilerinden dolayı ilaç olarak kullanımı yaygınlaşmıştır (Abu-surrah ve ark. 2008, Ferraz ve ark. 2009, Garoufis ve ark. 2009, Ulukaya ve ark. 2011a,b). Pt ve Pd gibi metal bileşiği içeren antikanser ajanların DNA'da iplikler arası çapraz bağların, DNA kalıntılarının oluşumuna yol açarak sitotoksik ve apoptotik aktiviteyi modüle ettiği bildirilmektedir (Zhu ve ark. 2009). Bu metal bileşiklerden olan Pd; antifungal, antiviral, antitümör ve antibakteriyal etkilere sahiptir. Bu yapıdaki kimyasalların suda kolay çözünebilmeleri, membranlardan kolayca geçip ve hücre içerisine DNA'ya bağlanabilmeleri, ayrıca yan etkilerinin daha az olması tercih edilmelerine neden olmaktadır (Abu-Surrah ve ark. 2008). Ayrıca yapılan çalışmalarda Pd (II) bileşiklerinin kanser hücrelerinde hücre ölümünü artırarak apoptozise neden oldukları gösterilmiştir (Keter ve ark. 2008, Guney ve ark. 2011a, Ferraz ve ark. 2011, Miklasova ve ark. 2009). Pd (II) bileşiklerinin bu sitotoksik etkiyi DNA'da yüksek düzeyde hasarlar oluşturarak yaptıkları da görülmüştür (Miklasova ve ark. 2009). Cisplatin gibi metal bazlı ilaçların metal merkezleri pozitif yüklüdür ve DNA gibi negatif yüklü biyomoleküllere bağlanma yeteneğine sahiptirler. Hem Pt (II) hem de Pd (II) bileşiklerinin DNA ile etkileşimlerinin mekanizmaları araştırılmış ve DNA'yı iki farklı mekanizma üzerinden etkiledikleri anlaşılmıştır. Birinci mekanizma, Pt (II) veya Pd (II) iyonlarının DNA sarmalındaki amino uçlarına bağlanmasına ve bir koordinasyon molekülü oluşturmasına dayanmaktadır. Küçük hacimli Pt (II) veya Pd (II) bileşikleri DNA'yı oluşturan pürin

bazıları guanin ve adenin ile etkileşir ve bu uçlardan DNA sarmalına bağlanırlar. Pt (II) veya Pd (II) iyonlarının DNA'ya bağlanması sonucunda, hücre bölünmesi sırasında DNA sentezi imkânsız hale gelir ve DNA'sını tamir edemeyen hücre ölür (Petrovic ve ark. 2007). İkinci mekanizmada ise, büyük hacimli ligandların bağlı olduğu Pt (II) veya Pd (II) bileşikler DNA çift sarmalında araya girer (interkalasyon) ve DNA'ya hidrojen bağlarıyla bağlanarak hücre bölünmesini durdurur (Howe-Grant ve ark. 1976, Petrovic ve ark. 2007). Pd bileşiği DNA'yı eşit olmayan iki parçaya ayırır ve hafif DNA parçası yerine ağır parçaya güçlü bir şekilde bağlanır (Mansouri-Torshizi ve ark. 2008). Yapılan çalışmalar Pt (II) bileşikler gibi DNA'da yüksek düzeyde hasar oluşturduğunu ve apoptozisi indüklediğini göstermiştir (Keter ve ark. 2008, Miklasova ve ark. 2009). Ulukaya ve ark. (2011b) yaptığı çalışmada ise Pd (II) bileşiğinin apoptozisi DR4 ve DR5 isimli apoptozis ölüm genleri üzerinden indüklediği bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında kullanılan $[PdCl(terpy)](sac) \cdot 2H_2O$ olarak formüle edilen Pd (II) bileşiği, Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümü Prof. Dr. Veysel Turan Yılmaz ve ekibi tarafından sentezlenmiş, karakterizasyonu yapılmıştır. Pd (II) bileşiği sentezinde Pd (II) iyonları; barbitürik asit, Cl⁻ ve su ile koordinasyonu sonucu oluşmaktadır. Pd (II) kompleksinin açık yapısı aşağıda verilmiştir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Pd(II) bileşiğinin kimyasal yapısı

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre kültürü malzemeleri ve kimyasal maddeler

- Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium Mix with L-glutamine, Gibco, New York, ABD
- Dulbecco's Modification of Eagle's Medium/Ham's F-12 50/50 Mix with L-glutamine, Gibco, New York, ABD
- F-12K Medium (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium), ATCC Manassas, Virginia, ABD
- Fötal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS), Gibco, New York, ABD
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (100X), Gibco, New York, ABD
- Non-essential amino acid (100X) Gibco, New York, ABD
- Endotelyal hücre büyüme tamamlayıcısı Sigma Aldrich, ABD
- Heparin sodyum tuzu Sigma Aldrich, ABD
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Sigma, ABD
- % 0,25 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD
- Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries, İsrail
- Palladyum (II) bileşiği, Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü
- Klorokin, Sigma, Almanya
- Canertinib (CI-1033, PD-183805) BioVision, ABD
- Sulforhodamine B (SRB) Santa Cruz Biotechnology Dallas, Teksas, ABD
- 0.2 µM filtre, PES, steril, Corning New York, ABD
- Dimetil sülfoksit (DMSO), AMRESCO, Solon, ABD
- Annexin V-Cy3 Apoptosis Kit Plus BioVision ABD
- Power SYBR Green PCR master mix Thermo Scientific Massachusetts, ABD
- cDNA Synthesis Kits— Jena Bioscience Germany
- Total RNA Purification Kit Jena Bioscience Germany
- TRIS (Base), Ultra Pure BioShop Canada
- Sodium chloride (NaCl) Millipore, Bedford, MA, USA

- iBlot 2 Transfer Stacks, nitrocellulose, regular size Thermo Scientific Massachusetts, ABD
- Nonfat Dry milk Cell Signalling Technology The Netherlands
- Nupage %4-12 Bis tris gel Thermo Scientific Massachusetts, ABD
- WesternBright ECL HRP substrate Advansta Menlo Park ABD
- Biçinkonik Asit Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)
- Antioksidan (İnvitrogen, CA, USA)
- Tween-20, AMRESCO, Solon, ABD
- SDS Molecular Biology grade, BioChemica Applicham, Almanya
- RIPA lysis buffer (1X) Santa Cruz Biotechnology Dallas, Teksas, ABD
- SDS running buffer (Nu-PAGE, 20X, İnvitrogen, CA, USA)
- Muse Annexin V & Dead Cell Kit Millipore, Bedford, MA, USA
- Muse Cell Cycle Kit Millipore, Bedford, MA, USA
- Muse Caspase-3/7 Kit Millipore, Bedford, MA, USA
- Muse MitoPotential Kit Millipore, Bedford, MA, USA
- Muse Gamma H2AX Kit Millipore, Bedford, MA, USA
- Muse Autophagy LC3 Kit Millipore, Bedford, MA, USA
- Muse Oxidative Stress Kit Millipore, Bedford, MA, USA
- Muse PI3K activation Dual Detection Kit Millipore, Bedford, MA, USA
- Muse EGFR activation Dual Detection Kit Millipore, Bedford, MA, USA
- Muse System Check Kit Millipore, Bedford, MA, USA
- Guava Instrument Cleaning Fluid (ICF), Millipore, Bedford, MA, USA
- Tris-base (Scharlau, Barcelona, Spain)
- β-merkaptotanol (Merck, Schuchard, Germany)

3.1.2. Sarf malzemeler

- 25cm², 75cm² ve 150cm²'lik flasklar, Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium
- 6, 24 ve 96 kuyucuklu pleyt, Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium
- 5ml ve 10ml'lik enjektörler, Becton Dickinson, New Jersey, ABD
- 10µl'lik pipet uçları, SSIBIO,California, ABD
- 100µl'lik pipet uçları, SSIBIO,California, ABD
- 1000µl'lik pipet uçları, SSIBIO,California, ABD

- 15ml'lik ve 50ml'lik falkon, ISOLAB Wertheim, Almanya
- 0,5 ve 1.5 ml'lik santrifüj tüpleri, SSIBIO, California, ABD
- Kriyovial, ATS
- 10 ve 25 ml'lik serolojik pipet, Sarstedt Nümbrecht GERMANY
- 2 ml'lik cam pastör pipetler, Marienfeld Lauda-Königshofen, Almanya
- İnvazyon testi için insert, 0.8 mikron por genişliği, transparan pet membran, 24 kuyulu pleyte uyumlu, Corning, New York, ABD
- Matrijel, Corning Costar, New York, ABD
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA

3.1.3. Cihazlar

- Spektrofotometre (FLASHScan S12, Analytik Jena, Almanya)
- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D
- Luminometre (FL×800 Mikroplate Floresans Okuyucu)
- I-Blot jel transfer cihazına (İnvitrogen, CA, USA)
- Muse Cell Analyzer Cihazı, Merck
- CO2 inkübatörü, Sanyo, Japonya
- Mikroplate inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph, Almanya
- Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye
- Steril kabin, ESCO, Singapur
- Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, Almanya
- Inverted mikroskop, Olympus CKX41, Japonya
- Aspiratör, Rocker 300, Tayvan
- Santrifüj, Rotina 35R, Almanya
- 10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific
- 0,5-5ml pipet, Brand
- 10ml pipet, Eppendorf
- 5-5µl Transferpipet, Thermo Scientific

-Pipet boy, ISO fill

-20-200µl Transferpipet, Brand, Almanya

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

Deneyleerde kullanılan HCT-15 ve HT-29 insan kolon kanser hücre soyları Dr.Konstantinos Dimas (Thessally Üniversitesi) aracılığıyla temin edilmiştir. MDCKII (The Madin–Darby canine böbrek) doğal hücre soyu ve BRCP1, MRP1 transfekte edilmiş insan ve fare hücre soyları ve MDRR1 insan hücre soyu Dr. Alfred Schinkel (Hollanda Kanser Enstitüsü) tarafından temin edilmiştir. HUVEC hücreleri Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den temin edildi (Manassas, Virginia, ABD).

3.2.2. Kullanılan besiyerinin hazırlanması

HT-29 hücreleri Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) besiyeri (Gibco, ABD) içine %10 Fetal sığır serumu (FBS) (Gibco, ABD), %1 Penisilin-Streptomisin (P/S) solüsyonu (Gibco, ABD) VE %1 Minimum essential medium Non-Essential Aminoasit (MEM-NEAA) (Gibco, ABD), eklenmesiyle oluşturulan besiyeri içinde kültüre edildi. HCT-15 hücreleri ise %5 FBS ve %1 P/S, L-glutamin ve %1 MEM-NEAA içeren RPMI-1640 besiyeri içerisinde büyütüldü. MDCKII transport hücreleri ((MDCKII-mBRCP, MDCKII-hBRCP, MDCKII-mMRP, MDCKII-hMRP, MDCKII-MDR1) 1:1 oranındaki Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ve Ham's F12 (DMEM/F12) (Gibco, ABD) besiyeri içine %10 FBS ve %1 P/S solüsyonu eklenmesiyle oluşturulan besiyeri içinde kültüre edildi. HUVEC hücreleri ise F-12K (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium) (ATCC, ABD) besiyeri içerisinde %10 FBS ve %1 P/S solüsyonu 0,1 mg/ml final olacak şekilde heparin sodyum tuzu (Sigma Aldrich, ABD), 0,03mg/ml endotelial hücre büyüme tamamlayıcısı (ECGS) (Sigma Aldrich, ABD) eklendi.

3.2.3. Palladium(II) terpiridin sakkarinat bileşiminin [PdCl(terpy)](sac).2H₂O], Klorokin ve Canertinibin Hazırlanması

Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin ana stoğu 2 mM olacak şekilde 5ml moleküler biyoloji su içerisinde hazırlandı.

3.2.4. Hücre soylarının stoktan çıkartılması

Donmuş haldeki stok hücreleri çoğaltmak için, kriyovialler içerisinde bulunan hücre stokları -80 °C'deki buzdolabından alındı ve hızlı bir şekilde sıcak su banyosunda çözüldü. Çözülen hücre süspansiyonu; 5ml olacak şekilde %10 FBS ve %1 P/S içeren RPMI besiyeri bulunan 15ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Santrifüj tüpü 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen hücrelerden süpernatant kısmı uzaklaştırılarak ve hücre peleti 1 ml besiyeri ile sulandırılarak hücrelerin süspansiyon haline gelmesi sağlandı. Hücre süspansiyonu içerisinde 5ml besiyeri bulunan 25cm²'lik hücre kültürü kapları (Thermo Scientific, USA) içerisine alınarak 37°C'ye ayarlı, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

3.2.5. Hücre soylarının pasajlanması

Hücreler %80-90 arası yoğunluğa ulaştıklarında hücre pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Öncelikle flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından, hücre artıklarından ve besiyeri içerisinde bulunan serumdan uzaklaşmak amacıyla 25 cm²'lik flaskın içerisine 1X PBS'ten (Sigma-Aldrich, ABD) 2 ml ilave edildi (75 cm²'lik flask için 4 ml) ve flask yüzeyi PBS ile yıkandı. Daha sonra PBS uzaklaştırıldı ve hücreleri yapıştıkları yüzeyden kaldırmak amacıyla %0.05 Trypsin-EDTA solüsyonundan (Gibco, ABD) 0,5 ml eklendi (75 cm²'lik için 1 ml) ve hücreler yaklaşık 5 dakika inkübatör içerisinde bekletildi. Flask yüzeyinden ayrıldıkları mikroskop ile belirlenen hücreler, tripsinin hücre membranına zarar vermesini engellemek amacıyla, uygulanan tripsinin yaklaşık on katı bir miktarla yıkanarak 15 ml'lik falkonlara aktarıldı ve 1000 rpm devirde 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve hücre peleti hücre yoğunluğuna ve hücrelerin büyüme hızına göre uygun miktarda besiyeri ile sulandırılarak yeni bir 75 cm²'lik flask içerisine aktarıldı ve hücreler istenilen yoğunluğa (sayıya) ulaşmaya kadar 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı.

3.2.6. Hücre stoklanması

Hücre soylarının pasajlanması işleminde olduğu gibi belli bir yoğunluğa ulaşan hücre soyları flask yüzeyinden %0.05 tripsin-EDTA solüsyonu yardımıyla kaldırıldıktan sonra santrifüj edildi. Santrifüj edilen hücrelerin süpernatant kısmı atılarak pellet üzerine hücre yoğunluğuna göre hücre dondurma besiyeri (5 ml DMSO + 5 ml FBS + 40 ml DMEM) eklendi ve pipetaj yapılarak hücrelerin tek tek dağılması sağlandı. Işığa hassa olan hücre dondurma besiyeri ile süspansiyon edilen hücreler her bir kriyovial başına 1-1,5ml olacak şekilde paylaştırıldı ve kriyovialler -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.7. Hücrelerin sayımı

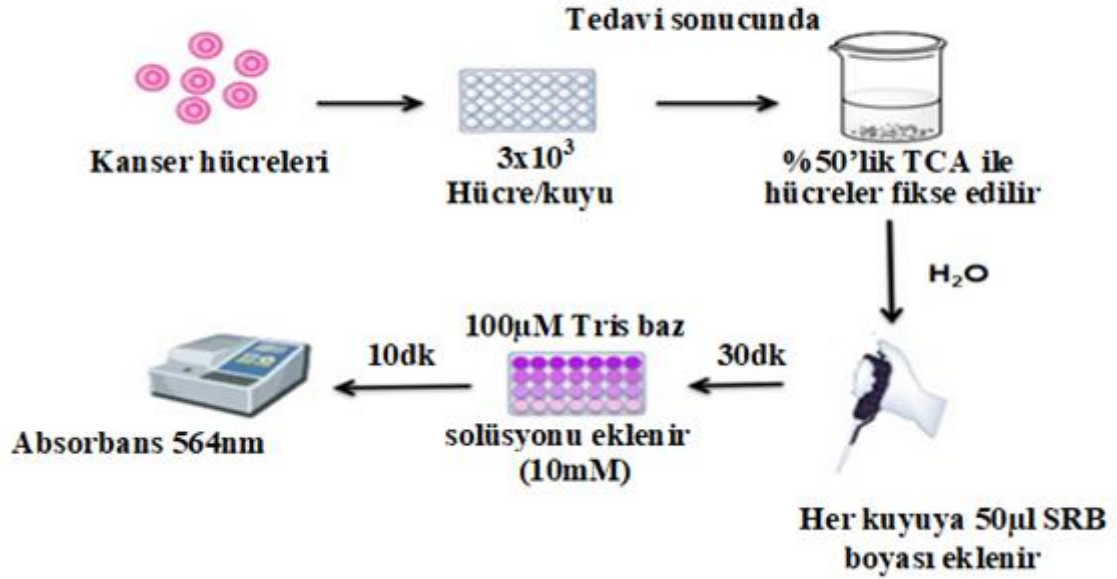
Tripsin-EDTA solüsyonu yardımıyla flask yüzeyinden ayrılan hücreler, 15ml'lik falkon tü içerisinde 1000rpm 5dk santrifüj edildikten sonra, süpernatant kısmı atılır. Hücre pelletinin yoğunluğuna göre besiyeri ile pellet sulandırılır. Bu oluşan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ve 96 kuyucuklu bir hücre kültürü kabının boş bir kuyusuna eklendi. Üzerine 10 µl tripan mavisi (Biological Industries, İsrail) eklendi ve pipetaj yapılarak karışmaları sağlandı. Ardından bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamına çift taraflı olarak aktarıldı ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

3.2.8. Sulforhodamine B (SRB) hücre canlılık testi

Sulforhodamine B (SRB) testi 1990 yılından beri hücre protein içeriğinin ölçümüne dayanan hücre canlılığı/yoğunluğunu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (Skehan ve ark. 1990). Bu metod asidik koşullar altında proteinlere stoikiometrik olarak bağlanan SRB boyasının özelliğine dayanır. SRB, asidik koşullar altında bazik amino asit kalıntılarına bağlanan ve bazik koşullar altında ayrışan iki sülfonik gruba sahip parlak-pembe bir aminoksanten boyadır ve bağlı boyanın miktarı hücre kütleini temsil eder (Lillie 1977).

Bu metod 96 kuyucuklu pleyt içinde yapışan hücrelerde bileşiklerin toksisite taraması için optimize edilmiş bir yöntemidir. Bu amaçla inkübasyon periyodundan sonra hücreler %50 (w/v) soğuk trikloroasetik asit (TCA) ile fikse edilir ve 30 dk %1 asetik asit içinde %0,4 (w/v) SRB ile boyanır. Fazla boya 5 kere %1 (vol/vol) asetik asit ile yıkanarak uzaklaştırılır. Protein bağlayıcı boya 10 mM Tris baz solüsyonu ile çözülür ve optik yoğunluk (absorbans) 564 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülür (Şekil 3.1).

SRB testi



Şekil 3.1. SRB testinin uygulanması (Houghton ver ark. 2007 değiştirilerek alınmıştır)

Çalışmada, kullanılacak olan bileşiklerin hücre proliferasyonuna bir etkisi olup olmadığı SRB canlılık testi ile ölçüldü. İlk olarak HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri 5×10^3 hücre/kuyu 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında ekildikten sonra bir gece yapışmaları beklendi. Uygun doz seçimi yapabilmek amacıyla hücreler, Pd (II) bileşiği ile 7 farklı konsantrasyonda (1,56-100 μ M) 24 ve 48 saat süreyle muamele edildi. Kullanılacak olan otofaji inhibitörü klorokin (CQ) (Sigma, Almanya) ise 1,56-100 μ M doz aralığında 24 saat süreyle hücrelerle muamele edildi. Epidermal büyüme faktörü reseptörü Canertinib (BioVision, ABD) ise 0,5-100 μ M doz aralığında 24,48,72h hücrelerle muamele edildi. Hücrelerde, pozitif kontrol olarak kullanılan 5-fluorouracil (5-FU) ölümün pozitif kontrolü olarak kullanıldı ve farklı konsantrasyonlarda (2,7-173 μ M) hücelere 24 ve 48 saat süreyle muamele edildi. Kör için ayrılan kuyular içerisine ise 200 μ l besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler, istenilen tedavi süreleri boyunca 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

Ayrıca Pd(II) bileşiği ve 5-FU tedavisi tek başlarına ve otofaji ve EGFR inhibitörü ile kombine kullanılarak kombinasyonun hücre canlılığı üzerine etkisi olup olmadığı incelendi. Doz cevap çalışmaları sonucunda ve yapılan literatür taramasına uygun olarak CQ ve canertinib inhibitörü için 24 saat muamele sürecinde toksik olmayan

uygun doz sırasıyla 10 ve 5µM olarak belirlendi. Pd (II) bileşiği ve 5-FU ile yapılan tedavi sonucunda, inhibitörlerle yapılacak olan kombinasyon çalışmaları için SRB canlılık metoduna göre 24 saat süresinde hücreler için yine toksik olmayan doz olarak sırasıyla 6,25 ve 10,8µM dozu seçildi.

Otofaji ve EGFR inhibitörleriyle yapılacak olan kombinasyon çalışmaları için 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında 3×10^3 hücre/kuyu ekildi Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği 6,25µM, 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU 10,8µM, Pd(II) bileşiği ve CQ kombinasyonu ve 5-FU ve CQ kombinasyonu için CQ 10µM uygulandı. 24 saatlik uygulamanın ardından, kuyudan bileşikler çekilerek, kombinasyon kuyularına uygun şekilde hücreler 24 saat süresince Pd (II) kompleksinin 6,25 µM dozu, 5-FU 10,8µM dozu ve canertinib 5µM dozu tedavi edildi.

Aynı şekilde HUVEC endotelial hücreleri ve MDCKII transport hücreleri (MDCKII-mBRCP, MDCKII-hBRCP, MDCKII-mMRP, MDCKII-hMRP, MDCKII-MDR1) 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında 3×10^3 hücre/kuyu ekildi Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği 6,25µM, 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU 10,8µM, Pd(II) bileşiği ve CQ kombinasyonu ve 5-FU ve CQ kombinasyonu için CQ 10µM uygulandı. 24 saatlik uygulamanın ardından, kuyudan bileşikler çekilerek hücreler 24 saat süresince Pd (II) kompleksinin 6,25 µM dozu, 5-FU 10,8µM dozu ve canertinib 5µM dozu tedavi edildi.

Tedavi süreleri sonunda her bir kuyuya fiksasyon için 50µl TCA eklendi ve yaklaşık bir saat +4°C de bırakıldı. Fiksasyon sonunda kuyular distile su ile en az 5 kere yıkandı ve pleyt kurumaya bırakıldı.. Ardından SRB boyası her bir kuyuya 50µl olacak şekilde eklendi ve 30dk karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda fazla boyanın uzaklaştırılması için %1 asetik asit ile kuyular yıkandı ve pleyt tekrar kurumaya bırakıldı. SRB boyasının çözülmesi için her bir kuyuya 150µl 10 mM Tris baz solüsyonu eklendi ve en az 10dk çalkalayıcıda boyanın çözünmesi beklendi. Oluşan renk şiddeti 564 nm dalga boyunda ELISA “microplate” okuyucusunda (FLASH Scan S12, Analytik Jena, Almanya) ölçüldü ve elde edilen Optik Dansite (O.D) değerleri kullanılarak yüzde canlılık hesaplaması yapıldı.

Canlılık hesabı (%): Tedavi edilen hücrelerin canlılıkları tedavi olmamış kontrol hücreleri referans alınarak hesaplanacak ve bu değer %100 canlılık olarak belirlenecektir. Tüm bu değerler ile aşağıdaki formül kullanılarak hücrelerde tedavi süresi sonunda oluşan % canlılık oranları hesaplanacaktır.

% canlılık hesaplaması:

$$\frac{\text{Tedavi grubu x 100}}{\text{Kontrol ortalaması}}$$

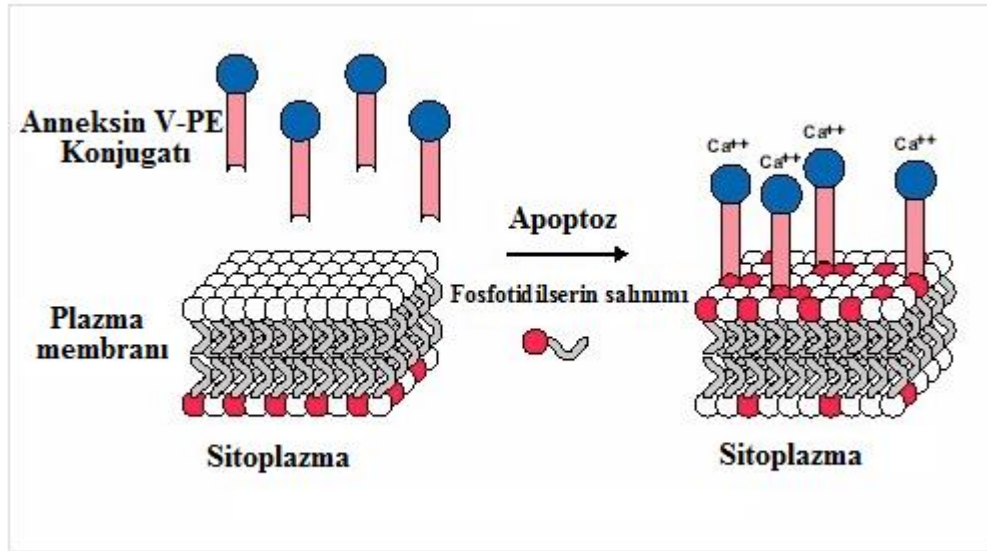
3.2.9. Anneksin-V boyama metodu

Normal de plazma membranının fosfolipidleri asimetric olarak dağılmışlardır. Fosfotidilkolin (PC) ve sfingomyelin gibi kolin içeren lipitler dış membranda yer alırken, fosfotidiletanolamin (PE) ve fosfotidilserin (PS) gibi aminofosfolipitler iç membranda daha yoğun şekilde bulunur. Fosfotidilserin çoğu hücrede yalnızca iç kısımla sınırlandırılmıştır. Fosfolipit asimetrisinin kaybı ve fosfotidilserinin açığa çıkması ilk olarak apoptotik lenfositlerde gösterilmiştir (Fadok ve ark. 1992a, Schlegel ve ark. 1993, Mower ve ark. 1994), fakat bu buluş nötrofil, tümör hücre soyları, düz kas vasküler hücreleri, spermatogonium ve Jurkat T hücreleri ve bunların sitoplazmalarında da kanıtlanmıştır (Fadok ve ark. 1992b, Bennet ve ark. 1995, Homburg ve ark. 1995, Martin ve ark. 1995a, 1996, Shiratsuchi ve ark. 1997). PS salınımı, sadece apoptotik cisimciklerin fagositler tarafından tanınıp atılmasını değil aynı zamanda anyonik lipit bağlayıcı protein annexin V için bağlanma bölgesi sağlamaktadır. Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan PS'ye bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. V-Cy3, FITC gibi) ile işaretlenerek apoptotik hücreler görünür hale getirilir ve floresan mikroskopu ile incelenebilir (Şekil 3.2).

Anneksin V-Cy3 apoptoz boyama/belirleme kiti, Anneksin V-Cy3, SYTOX yeşil boya ve tampon çözelti içerir. SYTOX yeşil boyası canlı ve apoptotik hücrelere karşı geçirimsizdir fakat hücreSEL nükleik asitlere bağlanarak yoğun yeşil floresan ile nekrotik hücreleri boyar. SYTOX yeşil boya, sadece membran hasarlı hücrelere girebilen, dolayısıyla tüm ölü hücreleri (primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik) boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır. Primer nekrozis yani hücre hacminin artması toksik koşullar altında gerçekleşen klasik ölüm şeklidir. Sekonder nekrozis ise, piknotik ya da fragmente

nükleus ile karakterize olup, apoptozisin geç safhasıdır. Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları intakt (erken apoptozda) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptoz/sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Bu nedenle hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar olan SYTOX veya Propidyum iyodür (PI) ile boyanmaya başlarlar.

Tampon çözelti içinde hazırlanan Anneksin V-Cy3 ve SYTOX yeşil boya ile hücre popülasyonu boyandıktan sonra, apoptotik hücreler kırmızı floresan, ölü hücreler yeşil floresan gösterir ve canlı hücreler ise az ya da hiç floresan göstermez. Bu popülasyonlar kolaylıkla FITCH ve rhodamine filtreleri kullanılarak ayırt edilebilir. Bu test apoptoz başlaması ile birlikte membran fosfolipitlerin yer değiştirmesi ile iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olması prensibine dayanır. Hücre yüzeyinde PS, floresan madde işaretli anneksin V ile boyanarak belirlenir. Canlı hücreler; Cy3-/SYTOX-, erken apoptotik hücreler; Cy3+/SYTOX - ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler; Cy3+/SYTOX+ boyanırlar ve bu şekilde birbirlerinden ayırt edilirler (Ulukaya ve ark. 2011)



Şekil 3.2. Apoptotik hücrelerde fosfotidil serin translokasyonu (Anonim 2011).

HCT-15, HT-29 kolon kanser hücreleri 96 kuyucuklu pleytlere 100 µl içerisinde 3×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu

takiben Pd(II) bileşiği 6,25 μ M ve 5-FU 10,8 μ M dozları 100 μ l ierinde olacak Şekilde 24 saat süre ile uygulandı. Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği ortamdan çekilerek canertinib 5 μ M, 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU ortamdan çekilerek canertinib 5 μ M dozları uygulandı. İnkübasyon sürelerinin sonunda her bir kuyudan tüm besiyeri (yaklaşık 170 μ l) uzaklaştırılarak Annexin V-Cy3 Apoptosis Kit Plus (BioVision ABD) içeriğine uygun olarak çalıŐıldı. 500 μ l tampon çözelti içerisine 5 μ l Anneksin-V-Cy3 ve 1 μ l SYTOX yeşil boyası pipetlendi. Her kuyuya boya karıŐımından 30 μ L pipetlenerek yarım saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tedavilerin hücrelerde sebep olduğu lm Őekli floresan mikroskop altında değerlendirildi.

3.2.10. Akım sitometri analizleri

Flow sitometri tek bir hücrenin (nüklei, mikroorganizmalar, lateks boncukları gibi diğer partiküllerin) optikal ve floresan karakteristiklerini ölçmeye yarar. Floresan boyalar DNA RNA gibi farklı hücresel bileŐenlere bağlanır veya interkale olur. Ayrıca floresan boylarla konjuge olmuş antikolar hücre membranlarında veya hücre içerisinde belli proteinlere bağlanır. Her bir spesifik antikor FITC, PE, 7-AAD (7- Aminoaktinomisin D) gibi floresan boylarla iŐaretlenmiŐtir. İŐaretlenmiŐ hücreler ıŐık kaynağından geçtiklerinde floresan moleküller daha yüksek bir enerji durumuna geçerler. Kendi dinlenme durumlarına geri döndüklerinde, yüksek dalga boyunda florokromlar ıŐık enerjisi yayarlar. Her biri benzer uyarma dalgaboyu ve farklı emisyon dalgaboyundaki çoklu florokromların kullanımı, çeşitli hücre özelliklerinin aynı anda llmesine izin verir. Propidyum iyodür, fikoeritrin ve fluoresin gibi sıklıkla kullanılan boylardır. İnternal floresan rezonans enerjisi transferi ile ikili boylar daha uzun dalga boyu ve daha çok renk oluştururlar (Michael Brown ve ark. 2000).

3.2.10.1. Anneksin-V testi

Apoptozis sürecinin karakteristik özelliklerinden biri normalde hücre membranının i yüzünde bulunan ve bir membran fosfolipidi olan fosfatidilserinin, membranın dış

yüzüne transloke olmasıdır. Bu süreçte, spesifik hücresel proteinlerin degradasyonu, kromatin kondensasyonu ve apoptozun geç evresinde membran bütünlüğünün de bozulması da gözlenmektedir. Fosfatidilserinin translokasyonu, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelmektedir. Anneksin-V, fosfatidilserin için yüksek affinite ile Ca²⁺ bağlayıcı bir proteindir ve FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücreleri görünür hale getirilebilmektedir. Fosfatidilserin moleküllerinin Ca²⁺ iyonu varlığında Anneksin-V-FITC kompleksi ile bağlanması sonucu apoptotik hücre ölüm yüzdesi belirlenmektedir. Bu yöntemde ayrıca 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD) boyası da kullanılmaktadır. Bu boya DNA için güçlü affiniteye sahip floresans özellikte bir kimyasal bileşiktir. İntakt (sağlam) hücre zarından kolayca geçemez, bu nedenle zar bütünlüğü bozulmuş hücrelerde (geç apoptotik; nekrotik) çift zincirli DNA'nın GC bakımından zengin bölgelerine bağlanmaktadır.

Boyaların hangi aşamadaki hücrelerle nasıl yanıt verdiği aşağıda özetlenmiştir;

Non-apoptotik hücreler: Anneksin V (-) ve 7- AAD (-)

Erken apoptotik hücreler: Anneksin V (+) ve 7- AAD (-)

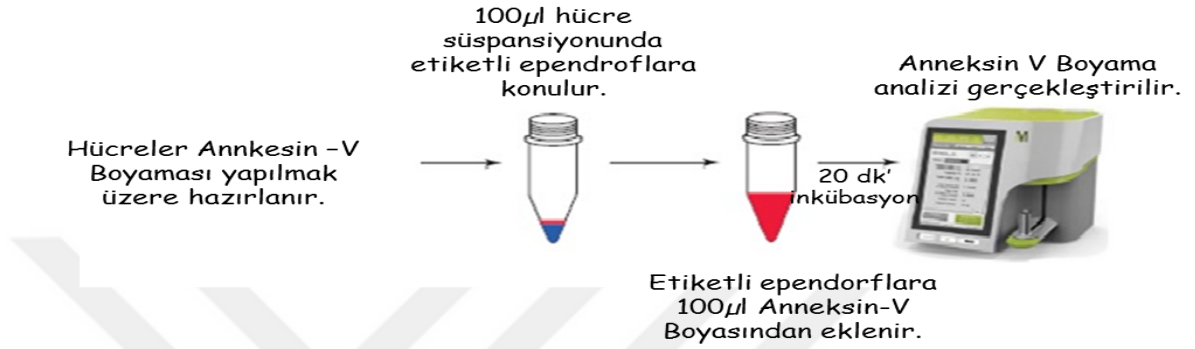
Geç apoptotik hücreler ve ölü hücreler: Anneksin V (+) ve 7- AAD (+)

Çok fazla nükleer debris: Anneksin V (-) ve 7- AAD (+)

Bu çalışma için Muse™ Annexin V & Dead Cell Kiti kullanıldı. HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 150×10³ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonunda Pd(II) bileşiği 6,25 µM ve 5-FU 10,8 µM dozları 100 µl içerisinde olacak şekilde 24 saat süre ile uygulandı. Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği ortamdan çekilerek canertinib 5 µM, 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU ortamdan çekilerek canertinib 5 µM dozları uygulandı Tedavi süreleri sonunda kit bileşenleri oda sıcaklığına getirildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara toplandı ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve 100 µl %1 FBS içeren besiyeri eklendi ve

etiketli ependorflara 100µl hücre süspansiyonu alındı. Bu ependorflara 100µl Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonu eklendi. Orta hızda yaklaşık 5 saniye vorteks yapıldı. Karanlık ortamda 20 dk oda ısısında inkübasyon sonunda Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı (Şekil 3.3).

Tüm basamaklar özetle şu şekildedir:



Şekil 3.3. Anneksin-V-FITC Boyama (Anonim 2013a)

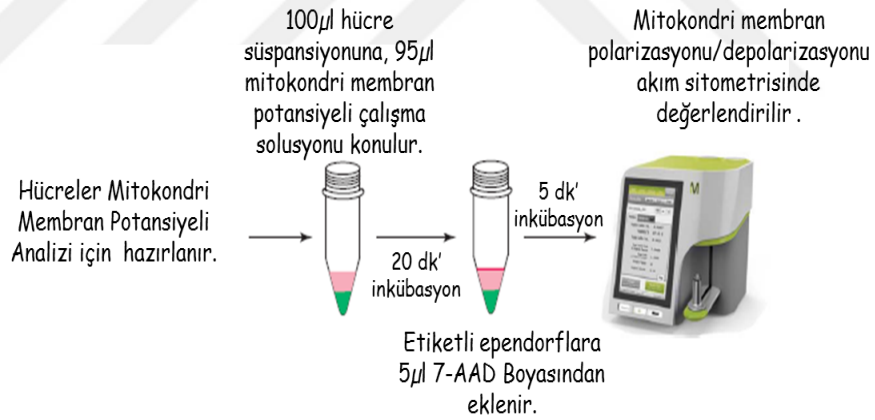
3.2.10.2. Mitokondri membran potansiyeli testi

Mitokondride meydana gelecek değişiklikler hücre metabolizması ve stresi hakkında bilgi veren önemli belirteçlerdendir. Mitokondri apoptozis sürecinde önemli bir role sahip olan regülatörlerden biridir. Apoptotik yolların kesiştiği bir kavşak noktası olan mitokondri aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte geri dönüşümsüz noktayı gösterir. Bu yüzden apoptotik uyarıyı takiben, hücrelerde mitokondriyal bütünlüğün kaybı gözlemlenmektedir.

Mitokondri membran potansiyeli testi için, HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 150×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyon sonunda Pd(II) bileşiği $6,25 \mu\text{M}$ ve 5-FU $10,8 \mu\text{M}$ dozları 100 µl içerisinde olacak şekilde 24 saat süre ile uygulandı. Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği ortamdan çekilerek canertinib $5 \mu\text{M}$, 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU ortamdan çekilerek canertinib $5 \mu\text{M}$ dozları uygulandı. Bu analiz için Muse™ Mitopotential Assay Kiti kullanıldı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları

içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C’de, %5 CO²’li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml’lik falkonlara toplandı 800 rpm’de 5dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve %1 FBS içeren besiyeri ile hücre peletleri sulandırıldı. Ardından 95 µl çalışma soluyonu eklendi ve kısa bir pipetaj işleminin ardından hücreler 20 dk 37oC’de, %5 CO²’li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücrelere 5 µL 7-AAD boyası eklenerek orta hızda yaklaşık 5 saniye vorteks yapıldı ve örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı (Şekil 3.4).

Tüm basamaklar özetle şu şekildedir:



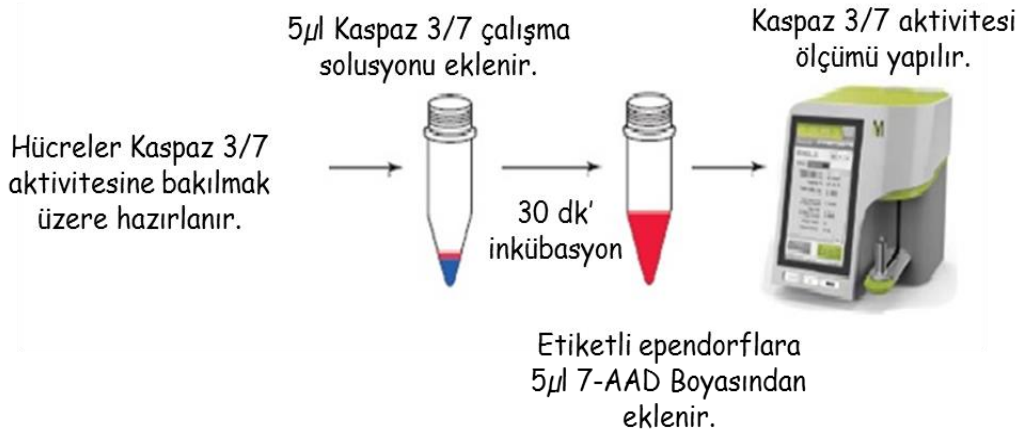
Şekil 3.4. Mitokondri Membran Potansiyelinin Ölçülmesi (Anonim 2013b).

3.2.10.3. Kaspaz 3/7 testi

Kaspazlar, programlı hücre ölümü olan apoptozis sürecinde merkezi bir öneme sahip sistein proteazlardır (Riedl ve ark. 2004). Apoptotik sinyal boyunca etkili olan efektör

kaspazlardan: kaspaz 3/7 aktivasyonu membran integritesi ve hücre ölümü hakkında önemli bilgiler vermektedir.

HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 150×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyon sonunda Pd(II) bileşiği $6,25 \mu\text{M}$ ve 5-FU $10,8 \mu\text{M}$ dozları $100 \mu\text{l}$ içinde olacak şekilde 24 saat süre ile uygulandı. Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği ortamdan çekilerek canertinib $5 \mu\text{M}$, 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU ortamdan çekilerek canertinib $5 \mu\text{M}$ dozları uygulandı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için $0,5 \text{ ml}$ %0.05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C 'de, %5 CO_2 'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda mikroskopla incelendiğinde yüzeyden ayrıldığı gözlenen hücreler, tripsinin inhibe olması için on katı besiyeri ile muamele edildi. Böylelikle tripsinin hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra hücre membranına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15 ml 'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm 'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve 1 ml 'sinde $2 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde hücre peleti sulandırıldı. Tedavi gruplarını içeren etiketli ependorflara hücre süspansiyonundan $50 \mu\text{l}$ eklendi. Daha sonra kaspaz3/7 çalışma solüsyonundan her bir tedavi grubunu içeren ependorflara $5 \mu\text{l}$ konuldu. Kısa bir pipetaj işleminin ardından ependorflar kapakları açık bir şekilde 37°C 'de, %5 CO_2 'li ortamda 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda ependorf içerisinde hücre süspansiyonlarına $150 \mu\text{l}$ DNA'ya bağlanabilen 7-AAD eklenerek kısa bir pipetaj gerçekleştirildi. Daha sonra oda sıcaklığından karanlıkta 5 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra muse cihazında kaspaz3/7 aktivitesi değerlendirildi (Şekil 3.5)



Şekil 3.5. Caspaz 3/7 Aktivitesinin Ölçülmesi (Anonim 2013c).

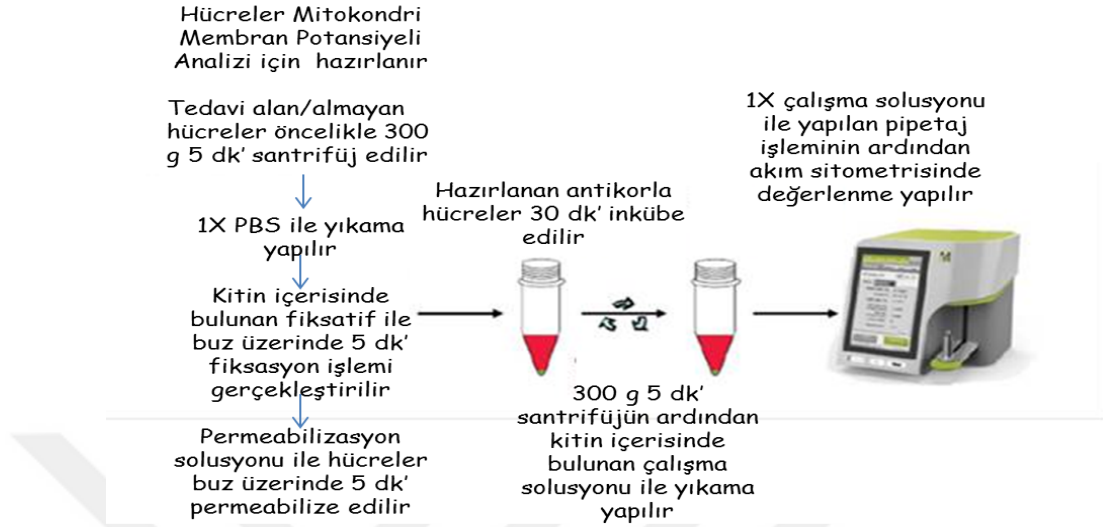
3.2.10.4. Gamma H2A.X aktivasyonu ile DNA hasarının belirlenmesi

DNA molekülü sürekli olarak genotoksik strese yol açan çeşitli faktörlerin etkisi altındadır. Endojen ve ekzojen kökenli pek çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktör DNA zincir kırıklarının oluşumuna neden olan şeker-fosfat omurgasında kırılmalara yol açar. Özellikle DNA çift zincir kırıkları, hücrenin yaşamı boyunca sürekli olarak ortaya çıkabilen en tehlikeli lezyon türleridir ve bunların etkili bir şekilde onarılması hücrenin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için son derece önemlidir. Çünkü tamir edilemeyen bu hasar; genomik kararsızlık, kanser gelişimi ve neoplastik transformasyona yol açan mutasyonların oluşumuna neden olabilmektedir (Kuo ve Yang 2008, Podhorecka ve ark. 2010). DNA tamirinin gerçekleştiği kromatinlerin yapısal ve işlevsel birimleri nükleozomlardır. Her nükleozom 147 baz çiftinden oluşan DNA zinciri ve bu zincirin etrafında sarıldığı dört çekirdek histonundan her birinin iki kopyasından oluşur. Nükleozom yapısını meydana getiren dört çekirdek histon ailesi H2A, H2B, H3 ve H4'tür. H2A histon protein ailesinin de H2A1, H2A2, H2AX ve H2AZ gibi varyantları vardır. Önemli bir H2A tipi olan H2AX proteini, hücre ve doku tipine bağlı olarak memeli H2A histon havuzunun %2-25'lik bir bölümünü oluşturur. Ayrıca karboksil kuyruk kısmında son derece korunmuş özel bir diziyeye sahip olduğu için H2AX proteini, ökaryotlarda önemli ölçüde korunmuş olan bir H2A histon tipidir. Diğer H2A histon ailesi üyeleri gibi, H2AX de fosforilasyon, asetilasyon ve ubikuitinasyona uğrayarak pek çok hücreyel olayın düzenlenmesini sağlar. Hasarlı bölgelerde görev alan bu histon tipi, DNA hasar tamiri sürecinde anahtar bir rol

oynadığı için, hücre bölünmesi ve büyümesi, immüno-reseptörlerin düzenlenmesi gibi pek çok hücreyel olay, genomik kararsızlık ve DNA hasar tamiri ile ilgili sendromlarla yakından ilişkilidir (Kinner ve ark. 2008, Rakiman ve ark. 2008). H2AX, DNA hasarına yanıt yollarında görev alan ilk proteinlerden birisidir. Fosforile olmuş H2AX, gammaH2AX (γ H2AX) adını alır ve DNA çift zincir kırıkları oluştuğunda görülebilir nükleer odaklar oluşturur. Bu nedenle γ H2AX'nin ekspresyonu DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir indikatör olarak son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. DNA tamiri gerçekleştikten sonra γ -H2AX, protein fosfataz 2A tarafından defosforile edilir ve böylece hücredeki γ -H2AX seviyesi düzenlenir. Bu nedenle γ -H2AX 'in de fosforilasyonu DNA tamir çalışmaları için de çok uygun bir parametre oluşturur.

γ -H2AX 'in fosforilasyonu belirlemek amacıyla Muse™ H2A.X Activation Dual Detection Kit kullanıldı. Bu amaçla öncelikle, HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 150×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyon sonunda Pd(II) bileşiği $6,25 \mu\text{M}$ ve 5-FU $10,8 \mu\text{M}$ dozları $100 \mu\text{l}$ içerisinde olacak şekilde 24 saat süre ile uygulandı. Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği ortamdaki çekilerek canertinib $5 \mu\text{M}$, 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU ortamdaki çekilerek canertinib $5 \mu\text{M}$ dozları uygulandı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdaki aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için $0,5 \text{ ml}$ %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C 'de, %5 CO_2 'li ortamda 5dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 300g 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda örnekler 1X PBS ile yıkandı. Fiksasyon aşaması için kit içeriğindeki fiksatif kullanılarak örnekler buz üzerinde 5 dk fikse edildi. Daha sonra örnekler 300 g 5 dk santrifüj edildi ve supernatantlar atılarak hücreler permeabilizasyon için kit içerisindeki permeabilizasyon solüsyonu ile 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 300g 5 dk santrifüj edildi ve daha sonra supernatant kısmı atılarak kit içerisindeki antikolar ile hazırlanan çalışma solüsyonu ile 30 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 300g 5 dk santrifüj edildi ve çalışma solüsyonu

ile sulandırılarak DNA hasarının belirlenmesi üzerine Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı (Şekil 3.6)



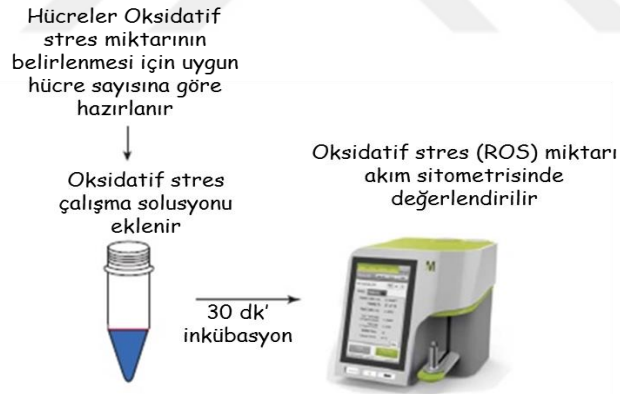
Şekil 3.6. DNA Hasarının (γ -H2AX) Ölçülmesi (Anonim 2013d).

3.2.10.5. Oksidatif stres belirlenmesi

ROS (Reaktif oksijen türleri) normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot})'dir. ROS, çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. ROS oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO_2), ozon (O_3) ve azot dioksit (NO_2^{\cdot}), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar ve hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Kanser, alzheimer, sepsis, diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi çeşitli patofizyolojik hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (Dumont ve Beal 2011, Pelicano 2014).

Kullanılan Muse® Oksidatif Stres kiti de hücre içi süperoksit radikallerini saptayarak hücrelerde görülen oksidatif stres yüzdesi hakkında bilgi vermektedir. Kit içeriğindeki oksidatif stress solusyonunda hücrelerdeki ROS seviyesini saptamaktadır. Oksidatif stres testi için, HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 150×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat $37^\circ C$, %5 CO_2 'li ortamda

inkübasyon sonunda Pd(II) bileşiği 6,25 μM ve 5-FU 10,8 μM dozları 100 μl içerisinde olacak şekilde 24 saat süre ile uygulandı. Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği ortamdan çekilerek canertinib 5 μM , 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU ortamdan çekilerek canertinib 5 μM dozları uygulandı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0,5ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15ml'lik falkonlara toplandı 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre peleti ml'sinde 1×10^6 - 1×10^7 hücre olacak şekilde kit içeriğindeki oksidatif stres çalışma solüsyonu muamele edilerek kısa bir pipetaj işleminin ardından 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örneklerin ölçümü Muse™ Cell Analyzer cihazı ile gerçekleştirildi (Şekil 3.7).

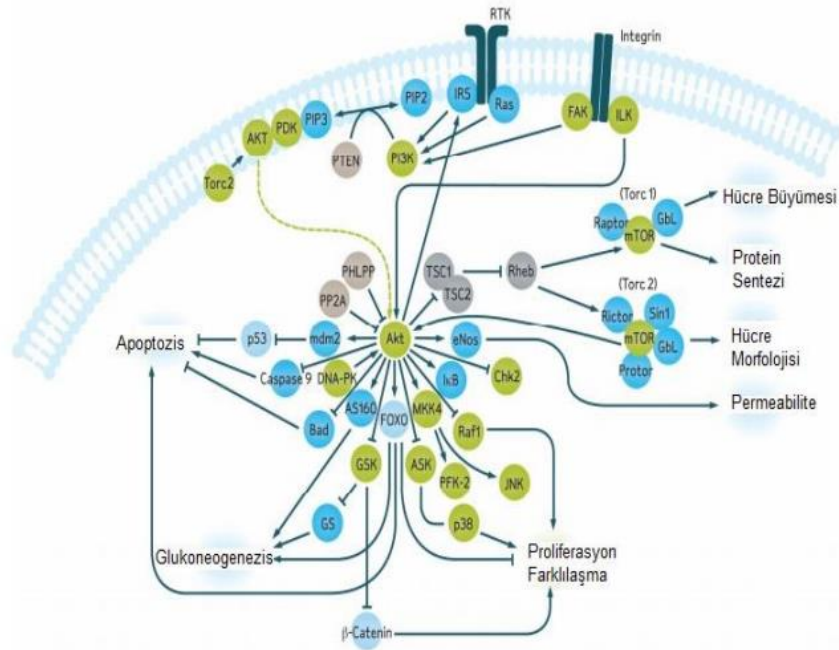


Şekil 3.7. Oksidatif Stres Miktarının (ROS) Ölçülmesi (Anonim 2014e).

3.2.10.6. PI3K (Fosfatidilinositol 3 kinaz) aktivasyonunun belirlenmesi

Kanser hücrelerinde sinyal iletimi sıklıkla sitoplazmik kinazları (serin/tirozin kinazlar gibi) tetikleyen reseptör tirozin kinazların (RTK) aktivasyonunu içerir. Kanserde önemli olduğu saptanan en önemli sinyalizasyon yolu arasında PI3K/ AKT kinaz zinciri yer almaktadır. Önemli bir sinyal yolu olan PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı hücre siklusunun kontrolü, anjiogenez, farklılaşma, hücre büyümesi ve hücre proliferasyonu,

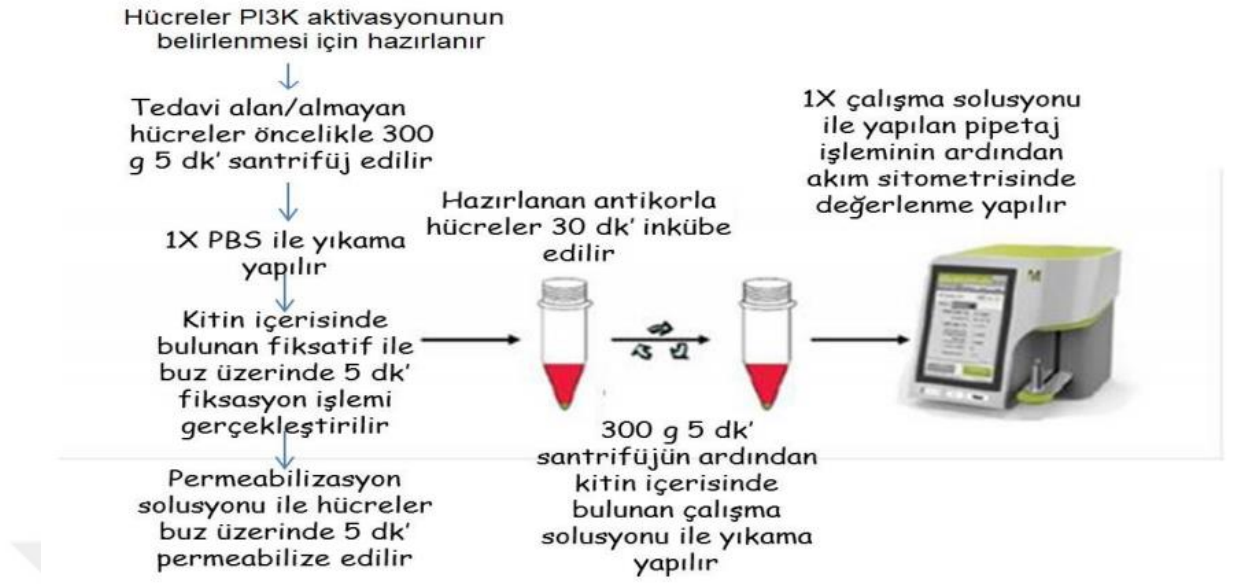
metabolizma ve apoptozis gibi süreçlerinde önemli role sahiptir (Vara 2004, Jiang ve Liu 2008) (Şekil 3.8). PKB (Protein Kinaz B)/Akt'ın tam aktivasyonu, Thr 308 ve Ser 473'ün fosforilasyonuna ihtiyaç duyar. PKB/Akt tedavi olan hücrelerdeki platelet derivated growth faktör (PDGF), epidermal growth faktör (EGF), insülin, trombin ve nerve growth faktör (NGF)'ü içeren geniş yelpazedeki büyüme uyarıcıları ile aktive olur. PKB/Akt regülasyonunda lipid kinaz PI3K gerekmektedir. PI3K'nın aktive edilmiş formlarının sentezi, PKB/Akt uyarımı ile sonuçlanır. PI3K aktivasyonu sonrası membran-sınır lipid fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat(PIP3) sentezlenir ve PH alanına bağlanarak 3-fosfatidilinositol bağımlı kinaz (PDK1)'e katılır. IP3 ve fosfatidilinositol 3,4-bifosfat, PKB/Akt'ın PH alanı ile etkileşerek PKB/ Akt'ı plazma membranına katar. PDK1, PKB/Akt'ın Thr 308'ini ve PDK2 Akt'ın Ser 473'ünü fosforile eder. Her iki tarafta fosforile edilen PKB/Akt aktif hale gelir ve hedef proteinleri fosforile eder. Diğer taraftan mitojen aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) ve aktive edilmiş protein kinaz 2(MAPKAP-kinaz 2) in vitro olarak Ser 473'ü fosforile edebilir ve PKB/Akt'ın çeşitli hücre stres durumlarında aktivasyonuna yol açabilmektedir (Horowitz ve ark. 2004).



Şekil 3.8. PI3K/AKT sinyal yolağı (Anonim 2013f).

PI3K 'ın fosforilasyonu belirlemek amacıyla Muse™ PI3K Activation Dual Detection Kit kullanıldı. Bu amaçla öncelikle, HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri 6 kuyulu

hücre kültür kaplarına 150×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyon sonunda Pd(II) bileşiği $6,25 \mu\text{M}$ ve 5-FU $10,8 \mu\text{M}$ dozları $100 \mu\text{l}$ içerisinde olacak şekilde 24 saat süre ile uygulandı. Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği ortamdan çekilerek canertinib $5 \mu\text{M}$, 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU ortamdan çekilerek canertinib $5 \mu\text{M}$ dozları uygulandı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için $0,5 \text{ ml}$ %0.05 Trypsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C 'de, %5 CO_2 'li ortamda 5dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler $300 \text{ g}'de$ 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda örnekler 1X PBS ile yıkandı. Fiksasyon aşaması için kit içeriğindeki fiksatif kullanılarak örnekler buz üzerinde 5 dk fikse edildi. Daha sonra örnekler $300 \text{ g}'de$ 5 dk santrifüj edildi ve supernatantlar atılarak hücreler permeabilizasyon için kit içerisindeki permeabilizasyon solüsyonu ile 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler $300 \text{ g}'de$ 5 dk santrifüj edildi ve daha sonra supernatant kısmı atılarak kit içerisindeki antikorlar ile hazırlanan çalışma solüsyonu ile 30 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler $300 \text{ g}'de$ 5 dk santrifüj edildi ve çalışma solüsyonu ile sulandırılarak PI3K aktivasyonunun belirlenmesi üzerine Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı (Şekil 3.9).



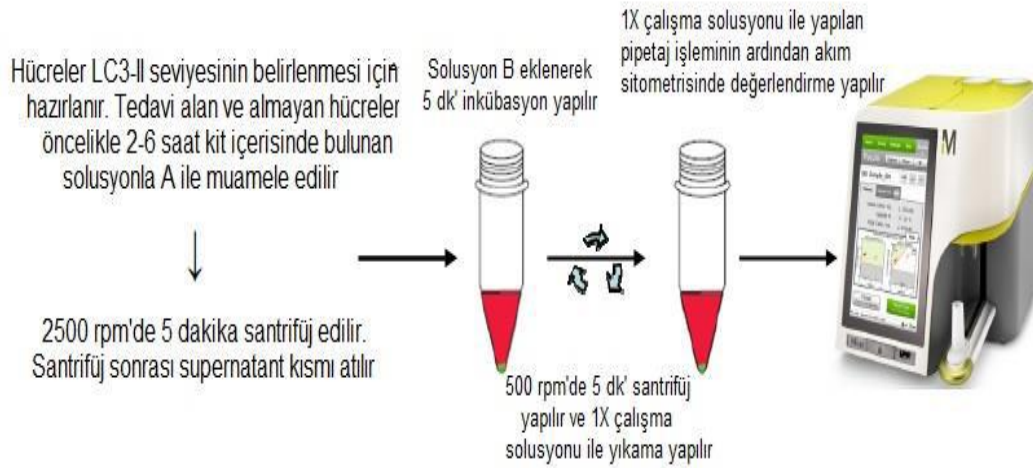
Şekil 3.9. p-Akt (Ser473) düzeyinin ölçülmesi (Anonim 2013f).

3.2.11.7. Pd(II) bileşiği ve EGFR inhibitörünün otofaji belirteci LC3-II üzerine etkisinin akım sitometrisi ile belirlenmesi

LC3, MAP1LC3 (“Microtubule-associated protein 1 light chain 3”, kısaca LC3) ya da mayada Atg8 adı verilen ve otofajik vezikül zar uzamasında rol oynayan önemli bir proteindir. Bütün hücrelerin kendi, endojen Atg8/LC3 protein ifadesi mevcuttur. Otofaji aktivasyonu sonrasında, LC3 proteini, bir yağ molekülü olan fosfatidiletanolamine kovalent olarak bağlanır, yağ moleküllerinin otofajik zarlara taşınmasına ve böylelikle zar uzamasına neden olmaktadır. Serbest LC3, LC3-I olarak adlandırılırken yağ molekülüne konjuge olmuş ve otofajik veziküllere bağlı LC3 ise LC3-II olarak adlandırılmaktadır. Otofaji uyarımı sonrası LC3-I’in LC3-II’ye dönüşmesi, bu olayın son yıllarda genel kabul gören bir otofaji belirteci olarak kullanılmasına neden olmuştur. Kullanılan Muse® LC3 kiti, hücrelerde otofajik veziküllere bağlı LC3-II yüzdesi hakkında bilgi vermektedir.

LC3-II testi için, HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 150×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 ’li ortamda inkübasyon sonunda CQ $10 \mu\text{M}$, Pd(II) bileşiği $6,25 \mu\text{M}$ ve 5-FU $10,8 \mu\text{M}$ dozları $100 \mu\text{l}$ içerisinde olacak şekilde 24 saat süre ile uygulandı. Ertesi gün kombinasyon

kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği ortamdaki çekilerek canertinib 5 µM, 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU ortamdaki çekilerek canertinib 5 µM, Pd(II) bileşiği ve CQ kombinasyonu ve 5-FU ve CQ kombinasyonu için CQ ortamdaki çekilerek Pd(II) bileşiği 6,25 µM ve 5-FU 10,8 µM dozları uygulandı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdaki aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0,5 ml %0.05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda hücrelere otofaji çözültüsü B ve Anti-LC3 Alexa Fluor®555 antikoru içeren PBS çözültüsünden 100µL eklendi ve 30dk karanlıkta buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 300g 5dk santrifüj edildi ve 1X çalışma solüsyonu ile yıkama yapıldı. Çalışma solüsyonu ile yapılan pipetaj işleminin ardından örneklerin ölçümü Muse™ Cell Analyzer cihazı ile gerçekleştirildi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. LC3-II miktarının belirlenmesi (Anonim 2013g)

3.2.12. Koloni oluşturma yeteneği testi

HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücresi 3x10³ olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı. 24 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonunda Pd(II) bileşiği 6,25 µM ve 5-FU 10,8 µM dozları 100 µl iğerinde olacak şekilde 24 saat süre ile uygulandı. Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği ortamdan çekilerek canertinib 5 µM, 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU ortamdan çekilerek canertinib 5 µM, dozları uygulandı. 24 saat sonunda ilaçlar kuyulardan çekilerek serum içeren besiyeri içerisinde yaklaşık 10 gün inkübe edildi. 10. günün sonunda 1 kere soğuk PBS ile yıkandı. Soğuk metanol ile 10 dk fikse edildi. %0,05 15 dk oda sıcaklığında boyandı ve mikroskop altında görüntüledi.

3.2.13. Hücre migrasyon testi

Pd(II) bileşiği ve 5FU tedavilerinin tek başına ve CQ ve canertinib kombinasyonları ile tedavi sonrası hücrelerin migrasyon (göç etme) özelliklerinin incelenmesi için hücre migrasyon testi yapıldı.

Migrasyon testi için, HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri kuyu başına 2x10⁵ hücre olacak şekilde 2 ml besiyeri içerisinde ekildi ve hücrelerin yapışmasına zaman vermek adına gece boyunca inkübatörde inkübe edildi. Ardından deneyin amacına uygun olarak 200 µl'lik pipet ucu yardımıyla kuyular boyunca düz çizgiler çekildi ve her kuyudan 3 alan işaretleterek 0. saat fotoğrafları çekildi. Ardından eş zamanlı olarak Pd(II) bileşiği (6,25 µM), 5FU (10,8 µM) tek başına ve canertinib (5 µM) ile kombinasyon kuyularına bahsedilen bileşikler eklendi. Her bir grup için 0-12-24 saat sonunda işaretle alanlar tekrar fotoğraflandı.

3.2.14. Matrijel hücre invazyon testi

Hücre invazyonu için kullanılacak insertler öncelikle matrijel ile kaplandı. Matrijel son konsantrasyonu 0,4mg/ml olacak şekilde serumsuz besiyeri içerisinde hazırlandı ve vortex kullanarak homojen karışması sağlandı. Ardından, 24 kuyucuklu pleyt için uyumlu olan insertler kuyucuklara yerleştirildi ve hazırlanan matrijelden kuyu başına 100 µl eklendi. Pleytler oda ısısında 4-5 saat bekletilerek matrijellerin donması sağlandı. Hücre süspansiyonu %1 FBS içeren besiyeri içerisinde kuyu başına HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri için 3,5x10⁵ olacak şekilde hazırlandı. Pd(II) bileşiği (6,25 µM),

5FU (10,8 µM) tek başına ve canertinib (5 µM) ile kombinasyon grupları yine %1 FBS içeren besiyeri içerisinde hazırlandı. Hücre süspansiyonu ve bileşikler eş zamanlı olarak matrijel ile kaplanmış olan insertler içerisine ekildi. İnsertlerin dışında kalan alanlara kemoatraktan özellik sağlaması için %10 FBS içeren besiyeri eklendi ve hücreler 24 saat boyunca inkübe edildi. 24 saatin sonunda insertler 1 kere PBS ile yıkandı ve soğuk metanol ile -20°C de fikse edildi. Tekrar 1 kere PBS ile yıkanarak %0,05 kristal viyole ile boyandı. İnsertler distile su içerisinde fazla boyalardan uzaklaştırılarak oda ısısında kurumaya bırakıldı. Her bir insert için rastgele 5 alan mikroskop ile fotoğraflandı.

3.2.15. Western blot metodu

Bu yöntemle, Pd (II) bileşiği, 5-FU tek başına ve CQ ve Cnaertinib inhibitörleri ile kombinasyonuna maruz bırakılan hücrelerde değişen protein profili araştırıldı. Western blot analizleri için HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 150×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonunda Pd(II) bileşiği 6,25 µM ve 5-FU 10,8 µM dozları 100 µl içerisinde olacak şekilde 24 saat süre ile uygulandı. Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği ortamdan çekilerek canertinib 5 µM, 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU ortamdan çekilerek canertinib 5 µM dozları uygulandı.

3.2.15.1. Western blot analizleri için protein izolasyonu

Belirtilen tedaviler sonrasında hücrelerde; hücre ölümü (apoptozis, nekroptozis, otofaji) ile ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyelerini incelemek amacıyla öncelikle HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücrelerinden total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla yukarıda belirtilen tedavi gruplarıyla 6 kuyucuklu pleytlerde olan hücrelere uygulama yapıldı. Tedavi süresi sonunda lizis işlemi, RIPA lizis tamponu ile yapıldı. Sırasıyla aşağıda verilen işlemler gerçekleştirildi.

1. Kuyulardaki tüm hacim falkonlara toplandı ve kuyulara 2 ml soğuk PBS eklenerek içerik tekrar ilgili falkonlara toplandı.
2. Falkonlar +4°C, 1000g, 5 dakika santrifüj yapıldı.
3. Süpernatant tamamen aspire edildi ve pellet üzerine 50 µl (9×10^5 hücre için) lizis tamponu eklendi; (1 ml lizis tamponu (RIPA lysis buffer, Santa Cruz Biotechnology

Inc., CA, USA) için 10 µl 200 mM PMSF (Santa Cruz, CA, USA), 10 µl 100 mM sodyum ortovanadat (Santa Cruz, CA, USA), 15 µl proteaz inhibitör kokteyl (Santa Cruz, CA, USA) eklendi. Solüsyon karanlıkta hazırlandı).

4. Falkonlar 45 dakika +4°C'de ve karanlıkta bekletildi ve bu süre içerisinde 2 defa (15 ve 30. dakikalarda) 10 saniye sonikasyon yapıldı.

5. Süre bitiminde, lizat çözeltisi tamamen bir ependorf tüpüne aktarılarak +4°C, 10.000g, 30 dakika santrifüj yapıldı.

6. Süpernatant etiketlenmiş tüplere aktarıldı (pellet atıldı). Hemen kullanılmayacak örnekler - 20°C'de saklandı. Protein konsantrasyon ölçümü BCA (Bicinchoninic Acid) yöntemi ile gerçekleştirildi.

3.2.15.2. Proteinlerin BCA yöntemi ile konsantrasyonlarının ölçülmesi

BCA ile protein miktarlarını ölçebilmek için sığır serum albumin (BSA) proteininin değişik konsantrasyonları RIPA lizis tamponu ile hazırlanarak bir standart eğri grafiği çizildi. Bunun için ml'sinde 2, 1.6, 1.2, 0.8, 0.4 ve 0 mg BSA bulunan standartlar hazırlandı. Ölçüm için Pierce Biçinoninik Asit Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) ve 96 kuyucuklu pleyt kullanıldı. Her bir kuyuya 10 µl hazırlanan standartlar ve konsantrasyonu bilinmeyen örnekler pipetlendi. Kuyuların üzerine 190 µl çalışma çözeltisi (kit içeriğinde yer alan Reagent A ve Reagent B, 1:50 olacak şekilde hazırlandı) pipetlendi ve pleyt 30 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan renk şiddeti, spektrofotometrede 570nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) okundu.

3.2.15.3. SDS-PAGE ve proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılması

Örnekler istenen hacimlerde toplam protein miktarı hücre ölümü ile ilişkili proteinlerin analizleri için 30 µg olacak şekilde 0,5ml'lik tüplere pipetlendi. Sample buffer (4X, İnvitrogen, CA, USA) ve reducing agent (10X, İnvitrogen, CA, USA) 1X olacak şekilde 0,5ml'lik tüplere eklendi. Protein denatürasyonu için çözeltiler ısı banyosunda 95°C'de 7 dakika bekletildi. Bu esnada jel, elektroforez tankına yerleştirildikten sonra SDS running buffer (Nu-PAGE, 20X, İnvitrogen, CA, USA), doluluk sınırına kadar eklendi. Hazır jelde bulunan koruma sıvısı pipet yardımıyla al-ver yapılarak uzaklaştırıldıktan sonra 500 µl antioksidan (İnvitrogen, CA, USA) eklendi. Daha sonra protein ladder (10

µl) ve örnekler kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi sonunda 45 dakika 150V yürütme yapıldı. Elektroforez sonunda transfer işlemi için I-Blot jel transfer cihazına (Invitrogen, CA, USA) sırasıyla anot bakır (+), jel, filtre kağıdı (ultra saf H₂O ile ıslatılır), katot bakır (-) ve sünger yerleştirildi. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 7 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.2.15.4. Membranların bloklanması ve antikor eklenmesi

Bloklama: %5'lik süt (Santa Cruz, CA, USA) çözeltisi 1X TBS-T içerisinde hazırlandı ve membran 60 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika 1X TBS-T ile yıkama yapıldı.

Birincil Antikor: Uygun birincil antikor 1:1000 olacak şekilde %5'lik BSA veya %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat +40C'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

İkincil Antikor: Anti-Rabbit (Cell Signaling Tech., MA, USA) 1:2000, Anti-mouse (Cell Signaling Tech., MA, USA) 1:2000 olacak şekilde %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

Görüntüleme: Görüntüleme için; WesternBright ECL HRP substrate (Advansta Menlo Park ABD) kullanıldı. Membranlar hazırlanan solüsyon ile 1 dakika inkübe edildikten sonra açığa çıkan kemiluminesans sinyal, Fusion FX-7 (Vilber Lourmat, Torcy, France) cihazı kullanılarak görüntülendi. Bu şekilde nitroselüloz membran üzerine transfer edilmiş olan proteinlere bağlanan antikorlar görüntülendi.

Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması: Birincil ve ikincil antikorları membrandan uzaklaştırmak (Stripping) için üretici firmanın (Cell Signaling Tech., MA, USA) Western blot yeniden işaretleme (reprobing) protokolü kullanıldı. Stripping solüsyonu hazırlamak için; 100ml ultrasaf su içerisine 0,76g Tris-base (Scharlau, Barcelona, Spain), 2g SDS SDS (BioChemica Applicham, Almanya) ve 700µl β-merkaptoetanol (Merck, Schuchard, Germany) eklendi (1X, pH:6,8). Membran 4 kez 5 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra stripping solüsyonu eklenerek 150-300rpm, 37⁰C'de 45 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 4 kez 5 dakika 1X TBS-T ile yıkama yapılarak bloklama aşamasına geçildi.

3.2.16. Gen ekspresyon analizleri

Gen ekspresyonu analizleri için HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 2×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyon sonunda Pd(II) bileşiği $6,25 \mu\text{M}$ ve 5-FU $10,8 \mu\text{M}$ dozları $100 \mu\text{l}$ içerisinde olacak şekilde 24 saat süre ile uygulandı. Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği ortamdan çekilerek canertinib $5 \mu\text{M}$ dozu uygulandı.

3.2.16.1. RNA izolasyonu

Otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon analizlerinin gerçekleştirebilmek amacıyla öncelikle HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücrelerinden total RNA'lar elde edildi. Bu amaçla belirtilen tedavi gruplarıyla 6 kuyucuklu pleytlerde olan hücrelere uygulama yapıldı. Tedavi süresi sonunda Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience) prosedürüne uygun şekilde işlemler gerçekleştirildi.

HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri falkona toplanarak 1000 rpm 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet 1×10^6 hücre için $500 \mu\text{l}$ lizis Buffer (2-ME eklenmiş) ile sulandırıldı ve sürekli pipetaj yapılarak hücreler lize edildi. Collection tüp içine Spin Column tüp (filtreli tüp) yerleştirildi ve spin column üzerine $100 \mu\text{l}$ aktivasyon buffer eklendi, $10,000 \text{ g}$ 30 sn santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası collection tüpteki sıvı uzaklaştırıldı. Hücre lizatının 0,6 katı izopropanol, hazırlanmış hücre lizatına eklendi ve 5 sn vortex yapıldı. Tüm hacim Spin column tüpe (filtreli tüp) aktarıldı ve $10,000 \text{ g}$ 30 sn santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası collection tüpteki sıvı uzaklaştırıldı. Spin column içine $700 \mu\text{l}$ primary washing buffer (etanol eklenmiş) eklendi ve $10,000 \text{ g}$ 30 sn santrifüj yapıldı. Spin column içine bu sefer $700 \mu\text{l}$ secondary washing buffer (etanol eklenmiş) eklendi ve tekrar $10,000 \text{ g}$ 30 sn santrifüj yapıldı. Kalan etanolü uzaklaştırmak için en son olarak $10,000 \text{ g}$ 2 dk santrifüj yapıldı. Ependorfların üzerine Spin column yerleştirildi ve column membranının tam ortasına $40 \mu\text{l}$ Elution buffer eklendi. RNA'yı ayırmak için $10,000 \text{ g}$ 1 dk santrifüj yapıldı. Elde edilen RNA örnekleri hemen kullanılmayacaksa -20 veya -80 de saklandı.

3.2.16.2. cDNA sentezi

Otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon analizlerinin gerçekleştirebilmek amacıyla öncelikle HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücrelerinden elde edilen total RNA'lar kullanılarak cDNA sentezleri SCRIPPT cDNA Sentez Kiti ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, kullanılacak örnek sayısından 1 örnek fazla olacak şekilde "1 çevrim" sütunundaki hacimler (RNA hariç) bu sayı ile çarpılarak bir karışım (cDNA Sentez Mix) hazırlandı (Tablo 3.1). Etiketli PCR tüplerine bu karışım eşit şekilde dağıtıldı. Son olarak RNA konsantrasyonları eşit olacak şekilde pipetlendi ve tüpler aşağıdaki programın ayarlandığı Thermal Cyler cihazına yerleştirildi:

- 42°C'de 10 dk
- 50°C'de 60 dk

| Bileşen | Stok Konsantrasyonu | Final Konsantrasyon | 1 çevrim (20 µL) |
|--------------------|---------------------|--|--------------------------------|
| RNase-free su | - | - | 20 µl'ye tamamla |
| RNA | - | Total RNA: 10 pg- 5µg Ya da mRNA: 10 pg-500 ng | x µl |
| Primer | 100 µM | Oligo-dT: 500 pmol (300 ng) Hexamer: 50 pmol (300 ng) | 0,1-0,2 µl 0,5 µl 0,5 µl |
| SCRIPT RT Tampon | 5x | 1x | 4 µl |
| dNTP Karışımı | 10 mM (her biri) | 500 µM (her biri) | 1 µl |
| DTT Stok Çözeltisi | 100 mM | 5 mM | 1 µl |

| | | | |
|-----------------------------|--------------------|-----------|-------------|
| RNaz inhibitör | 40 ünite/ μ l | 40 ünite | 1 μ l |
| SCRIPT Reverse Transkriptaz | 200 ünite/ μ l | 100 ünite | 0,5 μ l |

Tablo 3.1. cDNA Sentez Mix Hazırlanışı

3.2.16.3. Real time PCR ile ekspresyon analizleri

ATG3, ATG5, BECN ile ilişkili sinyal yollarında etkili olan genlerin ekspresyon seviyelerini belirlemek için yukarıda açıklandığı gibi öncelikle tedaviler uygulanan HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücrelerinden total RNA'lar elde edildi. Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezinin ardından, tabloda gösterilen genlerin ekspresyon seviyeleri Real Time PCR kullanılarak araştırıldı ve sonuçlar LightCycler Software 4.0 ile değerlendirildi. Real Time PCR aşamasını gerçekleştirebilmek için öncelikle her bir gene ait primerler dizayn edildi. Primerlerin dizileri Tablo 3.2 'de verilmektedir.

| | Gen adı | Forward | Reverse |
|---------|-----------|-------------------------------------|--|
| OTOFAJI | ATG3 | 5' GCCGTTAAAGAGATCACACT GG 3' | 5' CATAGCCAAACAACCATAATCGTG G 3' |
| | ATG5 | 5'CAGCTCTTCCTTGGAACAT C 3' | 5' GGCTGTGGGATGATACTAATATG 3' |
| | BEC N1 | 5'GAAGACGTGGAAAAGA ACCGC 3' | 5'CAGCCTGAAGTTATTGATTGT GC 3' |

Tablo 3.2. Otofaji ile ilişkili Genlerin Primer Dizileri

Real Time PCR aşaması için yukarıda belirtilen genlerin primerleri kullanılarak qPCR Master Mix hazırlandı (Tablo 3.3).

| Bileşen | 20 µl mix için | 180 µl mix için (8 gen için +1 fazla örnek; 9 örnek) | Final konsantrasyon |
|----------------------------|-----------------------|---|----------------------------|
| qPCR Green-Master with UNG | 10 µl | 90 µl | 1x |
| Primer (Forward) | 0,6 µl | 5,4 µl | 300 nM |
| Primer (Reverse) | 0,6 µl | 5,4 µl | 300 nM |
| PCR-Grade Su | 7,3 µl | 65,7 µl | - |
| Toplam Mix | 18,5 µl | 166,5 µl | - |

Tablo 3.3. qPCR Master Mix'in Hazırlanışı

Hazırlanan bu Master Mix'den 18,5 µl alınarak PCR platelerinin örnek kuyucuklarına dağıtıldı. Üzerlerine ilişkili cDNA'lardan 1,5 µl pipetlendi. Plate LightCycler 480 (Roche) cihazına yerleştirildi. Aşağıda verilen program ayarlanarak PCR tamamlandı. Sonuçlar 2- $\Delta\Delta$ CT metodu kullanılarak LightCycler Software 4.0 ile değerlendirildi.

1 siklus; 50°C'de 2 dakika

45 siklus; 95°C'de 15 saniye
52°C'de 20 saniye
72°C'de 30 saniye

1 siklus (Melting Curve); 95°C'de 1 dakika
55°C'de 30 saniye
95°C'de 30 saniye

1 siklus (Cooling); 40°C'de 2 dakika

3.2.17. Akridin boyama

Otofajik veziküllerin hücre içi yıkım yerleri lizozomlar olduğu için, otofajinin aktive olduğu koşullarda otolizozomal etkinliğin uyarılması nedeniyle, hücre içi toplam lizozom etkinliği artmaktadır. Lizozomal belirteçler akridin portakal rengi ("acridin orange") kullanılabilir. Bu boya, lizozomları pH'nin asit olduğu durumlarda boyamakta ve aktif lizozomları belirlemekte kullanılmaktadır. Bu amaçla öncelikle, HCT-15 ve

HT-29 kolon kanser hücreleri 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 3×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyon sonunda Pd(II) bileşiği $6,25 \mu\text{M}$ ve 5-FU $10,8 \mu\text{M}$ dozları $100 \mu\text{l}$ içerisinde olacak şekilde 24 saat süre ile uygulandı. Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği ortamdan çekilerek canertinib $5 \mu\text{M}$, 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU ortamdan çekilerek canertinib $5 \mu\text{M}$ dozları uygulandı. İnkübasyon süresi sonunda kuyu başına $1 \mu\text{g/ml}$ olacak şekilde akridin boyası eklenerek sonuçlar floresan mikroskobu altında değerlendirildi.

3.2.18. JC-1 boyama

Mitokondriyal membran geçirgenliğindeki değişim hücrelerdeki apoptozun uyarılmasında önemli bir basamaktır. Bu süreç boyunca, mitokondri membran boyunca elektrokimyasal gradyent çöker. Bu çöküş, dimerize Bax veya aktive olmuş Bid, Bak ya da Bad proteinleri tarafından mitokondrideki porların oluşumu aracılığıyla meydana gelir. Bu pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonuna sitoplazmaya sitokrom c'nin salınımı eşlik eder (Luo ve ark. 1998, Narita ve ark. 1998, Basanez ve ark. 1999, Desagher ve ark. 1999). JC-1 analiz kiti, mitokondri membran potansiyelinin kaybını belirlemek için katyonik bir boya (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) kullanır (Smiley ve ark. 1991). Sağlıklı hücrelerde boya mitokondriyi kırmızı boyar. İntakt mitokondri membran potansiyeli ile kurulan negatif yük, lipofilik boyanın, mitokondriyal matrikse girmesine izin verir ve burada birikir. Kritik konsantrasyon aşıldığında, J-agregatları oluşur ve kırmızı ışığa verir. Apoptotik hücrelerde, mitokondri membran potansiyeli çöker ve JC-1 mitokondri içerisinde birikmez. Bu hücrelerde JC-1 sitoplazma da kalır ve yeşil floresan oluşturur.

HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 3×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyon sonunda Pd(II) bileşiği $6,25 \mu\text{M}$ ve 5-FU $10,8 \mu\text{M}$ dozları $100 \mu\text{l}$ içerisinde olacak şekilde 24 saat süre ile uygulandı. Ertesi gün kombinasyon kuyularına 24 saat süre ile Pd(II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu için Pd(II) bileşiği ortamdan çekilerek canertinib $5 \mu\text{M}$, 5-FU ve canertinib kombinasyonu için 5-FU ortamdan çekilerek canertinib $5 \mu\text{M}$ dozları uygulandı. İnkübasyon süresi sonunda kuyu başına $30 \mu\text{l}$ ($500 \mu\text{l}$ JC-1 boyama solusyonu içerisinde $25 \mu\text{l}$ JC-1 boyası konuldu) olacak şekilde JC-1 boyası eklendi ve

15dk 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonunda sonuçlar floresan mikroskobu altında değerlendirildi.

3.2.19. Tüp oluşum testi

Tüp oluşum testi, anjiyogenezde rol oynayan genleri veya yolakları belirlemek için kullanılan hızlı ve niceliksel bir yöntemdir. İlk olarak 1988 yılında temel prensip olarak endotel hücrelerinin, anjiyojenik sinyallere cevap olarak hızla bölünme ve göç etme yeteneğini koruduğu yönünde olmuştur. Daha sonraları endotel hücrelerinin membran ekstrakt matriksi üzerinde farklılaşma ve tüp yapıları oluşturmaları için uyarılabildikleri gösterilmiştir. Bu tüpler, birleşmiş kompleksler vasıtasıyla birbirine bağlanmış endotel hücreleri ile çevrelenmiş bir lümen içerir. Tüp oluşumu anjiyojenik uyarıların miktarına ve türüne bağlı olarak 2-6 saat içinde hızlı bir şekilde oluşur. Çeşitli endotel hücreler fare (3B-11, SVEC4-10 ya da primer endotel insan hücresi HUVEC) bu çalışma için kullanılabilir. Kullanılan hücre tipine ve endotel hücrelerinin transforme veya non-transforme özelliklerine göre tüp oluşum testi için uygun zaman ve koşullar optimize edilir. Bu çalışmada tüp oluşumu için insan endotel hücresi HUVEC kullanıldı.

Bu amaçla, 96 kuyucuklu pletler 50 µl/kuyucuk olacak şekilde matrijel ile kaplanarak 37°C'de 30 dakika bekletildi. Bu arada yaklaşık 4 saat %1 serum (FBS) içeren F-12K (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium) besiyeri içinde serum açlığına maruz bırakılan HUVEC hücreleri 1,5x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde %1 oranında serum içeren besiyeri içinde hazırlandı. Pd(II) bileşiği (50 µM), 5FU (86,5 µM) tek başına ve canertinib (6,25 µM) ile kombinasyon grupları yine %1 FBS içeren besiyeri içerisinde hazırlandı. Hücre süspansiyonu ve bileşikler eş zamanlı olarak matrijel ile kaplanmış olan kuyular içerisine ekildi. Tüp ağları oluşumları mikroskop altında 2-4-8-12 saat olmak üzere fotoğraflandı ve değerlendirildi. Tüm değerlendirmelerde pozitif kontrol olarak 0,125mg/ml olacak şekilde Bevacizumab kullanıldı.

3.2.20. CAM (Chorio-allantoik membran) testi

Anjiyogenez, mevcut damar sisteminden yeni kan damarlarının oluştuğu sıkı bir şekilde düzenlenen bir mekanizmadır. Bu süreç, gelişme ve yara iyileşmesi için fizyolojik açıdan önemlidir ve aynı zamanda romatoid artrit, ateroskleroz, maküler dejenerasyon ve kanser gibi birden fazla hastalıkta ortak bir mekanizmadır. Anjiyogenez çeşitli

moleküler ipuçlarına yanıt olarak oluşur. Genellikle, anjiyojenik süreç, endotel hücre proliferasyonunu, hücre dışı matris bariyeri boyunca kemotaktik endotel hücre migrasyonunu ve kapiller tüplerin oluşumunu içerir. Fizyolojik ve patolojik anjiyogenez aynı hücresel süreçlerin ve moleküler sinyal yollarını kullanır, ancak patolojik anjiyogenez sırasında oluşan yapılar genellikle işlevsel olarak anormaldir.

Anjiyogenez etkileyen faktörlerin test edilmesinde kullanılacak en iyi testlerin *in vivo* testler olduğu bilinmektedir. Bu testler arasında “chick chorioallantoic membrane” (CAM) yani “gelişmekte olan tavuk embriyosunu saran zar” testi olarak bilinir. Teknik anlamda *in vitro* bir test olarak değerlendirilmekle birlikte maddenin sistemik etkileri hakkında bilgi veren *in vivo* bir yöntemdir. Tüm bu sıralananlara ilave olarak CAM testinin son zamanlarda hayvan testlerine alternatif oluşu tercih sebebidir. CAM testinin avantajları arasında diğer testlere göre kolay uygulanması, deneysel materyalin kolay bulunabilirliği, eksplant metoduna uygunluğu, belli bir CAM üzerinde birçok testin yapılmasına olanak tanınması ve test süreci boyunca sistemik etkinin izlenebilirliği sayılabilir. Maddelerin anjiyojenik, antianjiyojenik, antiinflamatuvar, antiirritan, toksik, koagülan özellikleri hakkında bilgi veren CAM testi saf maddelere uygulanabildiği gibi kompleks bitkisel ekstraktlara ve uçucu yağlara da uygulanabilmektedir. CAM deneyi uçucu yağların da aralarında bulunduğu doğal maddelerin, kozmetiklerin veya başka kimyasalların aktivitelerinin belirlenmesinde hayvan alternatifi deneyler olarak kullanıldığı bilinmektedir (Auerbach ve ark. 2000,2003, Fent ve ark. 2001, Staton ve ark. 2004). CAM deneyinin diğer önemli bir avantajı ise modifikasyonlarla antioksidan mekanizmaların yanında, metabolizasyon çalışmaları ve çeşitli biyomühendislik uygulamalarına da olanak verebilmesidir (Wilson ve Steck 2000, . Kim ve ark.2001, Demirci ve ark. 2004,2005, Casimiro ve ark. 2004, Tong ve ark. 2004).

Numune hazırlanışı: Standart maddeler ve deneylerde kullanılan tüm kimyasallar (safılık >%97), %2.5 (a/h) agaroz kullanılarak 5-10 mg/ml (50-100 µg/ml) konsantrasyonlarda ısıtılarak (60°C<) homojen karışım veya süspansiyon halinde 10 µl alınarak 3 mm çapındaki silindir teflon desteklere uygulanarak oda sıcaklığında pellet şeklinde donmaları sağlandı.

CAM deneyinin yapılışı: Deneyde kullanılacak döllenmiş tavuk yumurtası (yaklaşık 150 adet) deneye başlanmadan önce 37°C’de ve %80 nemli bir inkübatörde 65-72 saat

bekletilerek ve bu süre içerisinde yumurtalar zaman zaman dikkatlice çevrildi. Bu inkübasyon süresinin sonunda önce enjektör yardımıyla yumurtanın alt kısmından yavaşça 10-15 ml albümin (yumurta akı) sonra da yumurtaların üst kısmındaki (daha dik ve sivri olan kısım) kabuk ve zar, yumurta açacağı veya pens yardımıyla uzaklaştırıldı. Canlı ve gelişmekte olan embriyo ve koryon allantoik membran (CAM) üzerine bir plastik folyo ile koruma altına alınıp yine 37°C’de ve %80 nemli bir inkübatörde 72 saat daha bekletildi. CAM çapının yaklaşık 2 cm’i bulunduğu tespit edildiğinde taze olarak hazırlanmış numune peleti her yumurtaya bir adet olmak üzere CAM’ın üzerindeki kapillere yerleştirildi. Her bir maddeden 10 adet pelet, eşit sayıda yumurtalardaki CAM üzerine uygulanarak, plastik folyo ile kapatılacak ve değerlendirmeler yapılmadan önce belirtilen koşullarda pelet yerleştirilmiş halde yumurtalar 24 saat daha inkübe edildi. Bu süre madde içeren pelletin kapillerler üzerindeki etkileri stereo-mikroskop yardımıyla değerlendirildi. Deneyde kullanılan bileşiklerin yanısıra standart kontrol olarak Bevacizumab 4 µg/pellet olarak kullanıldı. Test edilen maddelerin ve numunelerin CAM üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere geliştirilmiş olan bir formüle dayalı olarak değerlendirme sistemi oluşturulmuştur (Tablo3.4).

| Skor | Etki | İzlenim/Açıklama |
|------|----------|---|
| 0 | Yok | Normal embriyo oluşumu |
| 0,5 | Zayıf | Kapiller damarsız alan yok, kapillerin yoğunluğu azalmış ancak pelletten çok daha geniş değil |
| 1 | Orta | Kapillersiz alan az veya Kapiller belli bir alanda azalmış. Etkiler pellet alanının 2 katından fazla değil. |
| 2 | Kuvvetli | Pelletin etrafında en az iki kat mesafe olacak şekilde kapillersiz alan mevcut. Antianjiyojenik etki. |

Tablo 3.4. CAM üzerinde anjiyojenik etkinin değerlendirilmesi için kullanılan skor değerleri.

Değerlendirmede kullanılan formül:

$$\text{Ortalama skor} = \frac{\text{Yumurta sayısı(Skor 2)} \times 2 + \text{Yumurta sayısı (Skor 1)} \times 1}{\text{Toplam yumurta Sayısı (Skor 0, 1, 2)}}$$

3.2.21. İstatistiksel analiz

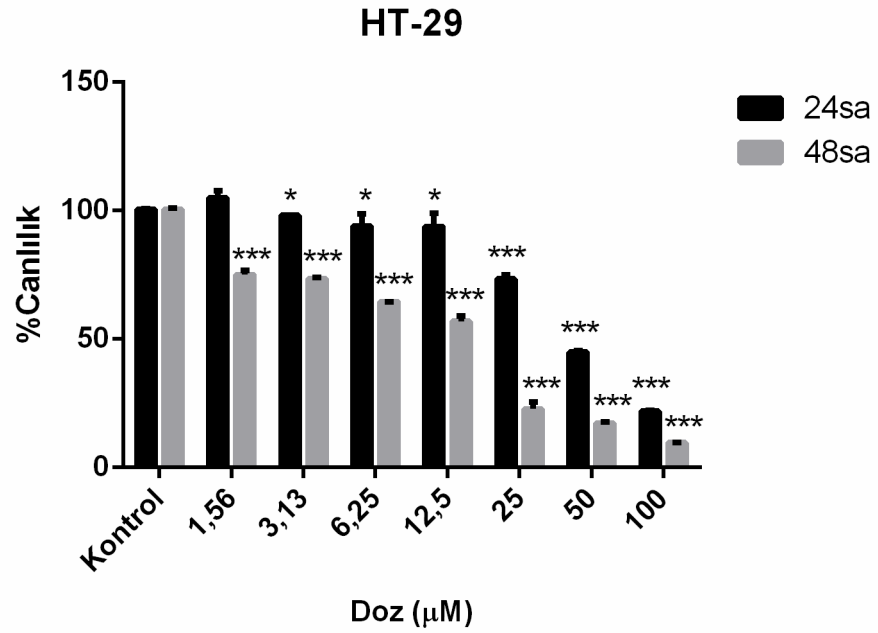
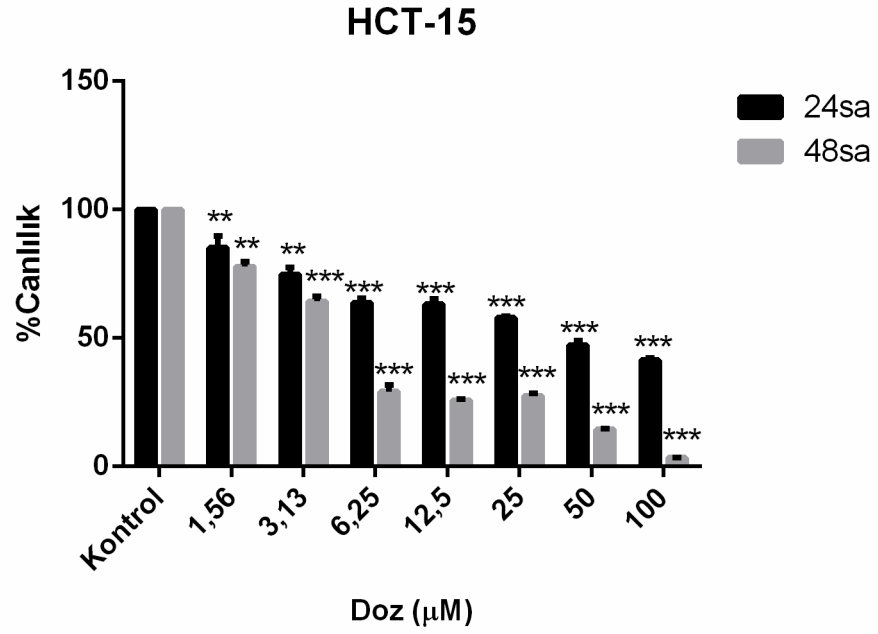
İstatistiksel analizler Graph Pad programı aracılığı ANOVA testi ile değerlendirildi. 2 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p<0,01$, $p<0,01$, $p<0,001$ değerine göre belirlendi.



4. BULGULAR

4.1. Canertinib ve Pd(II) Bileşiminin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin SRB Canlılık Metodu ile Belirlenmesi

HCT-15 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerine (Şekil 4.1) 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (1,56-100 μM) Pd (II) bileşiği uygulandı. Aynı zamanda yapılacak olan kombinasyon çalışmaları için EGFR inhibitörü olan canertinib 24-48-72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarının (0,5-100 μM) hücre canlılığı üzerine etkisi SRB testi ile belirlendi. Ayrıca pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU bileşiği (2,7-173 μM) 24-48 süresince farklı konsantrasyonlarda uygulandı. Pd (II) bileşiminin uygulandığı hücre soylarında zamana ve doza bağlı olarak konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$). Hücre soylarında 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda Pd (II) bileşiği uygulaması sonrası ortaya çıkan sonuçlar Şekil 4.1’de gösterildi.



Şekil 4.1. Pd (II) bileşiği uygulanan HCT-15 ve HT-29 hücre soylarının canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,001$) ifade etmektedir

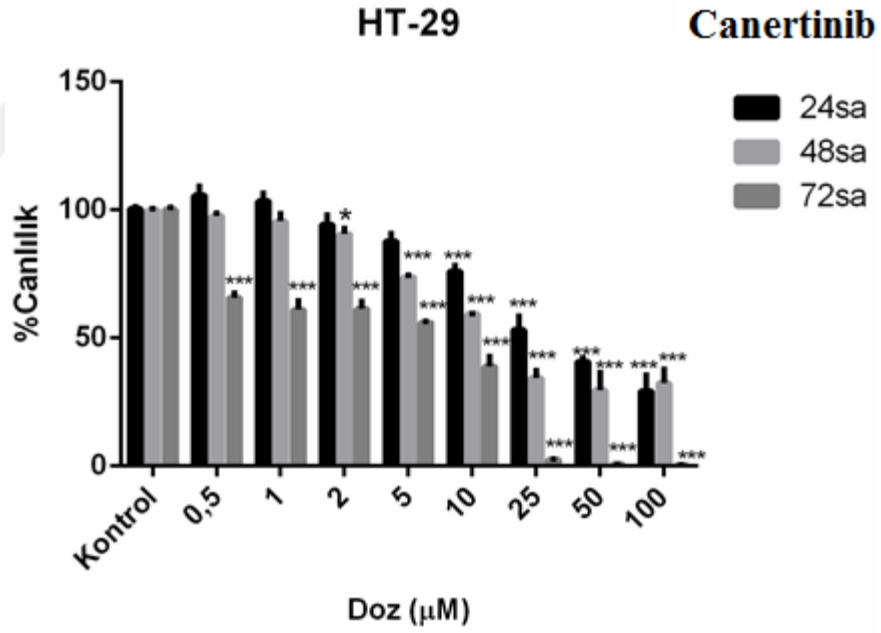
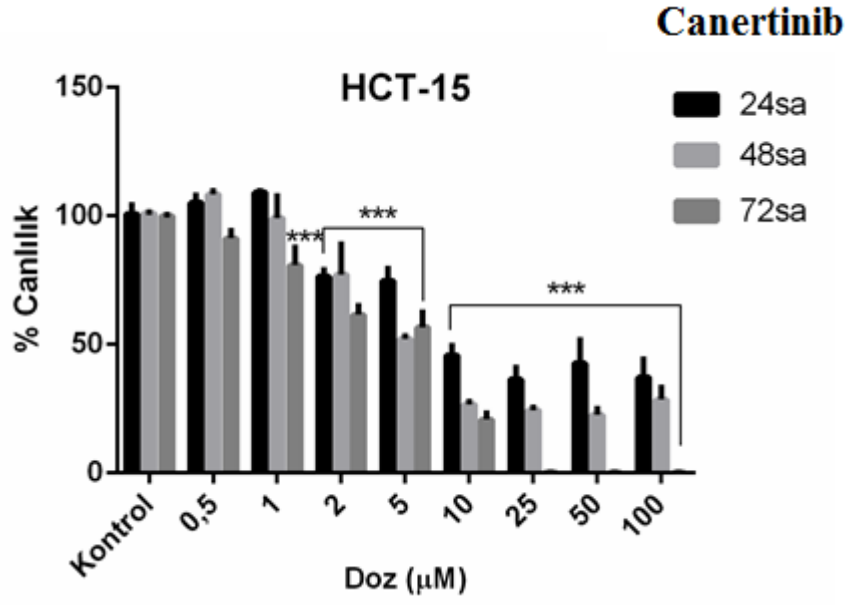
Özellikle 100, 50, 25 ve 12,5 µM Pd (II) bileşiği uygulaması sonucu; zamana bağlı olarak HCT-15, HT-29 hücrelerinde kontrole kıyasla hücre canlılığında anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p < 0,001$).

SRB verilerine göre; HCT-15, HT-29 hücre soylarında Pd (II) bileşiminin sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC₅₀ (kontrol hücrelerine kıyasla Pd (II) bileşiği ile muamele sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

| Doz(µM) | HCT-15 | HT-29 |
|-----------------------------|---------------|--------------|
| IC₅₀ 24sa | 43,7 | 45,6 |
| IC₅₀ 48sa | 4,4 | 15,0 |

Tablo 4.1. Pd (II) bileşiği uygulanan hücre soylarında SRB canlılık testi sonuçlarına göre 24-48 saat tedavi süresindeki IC₅₀ değerleri

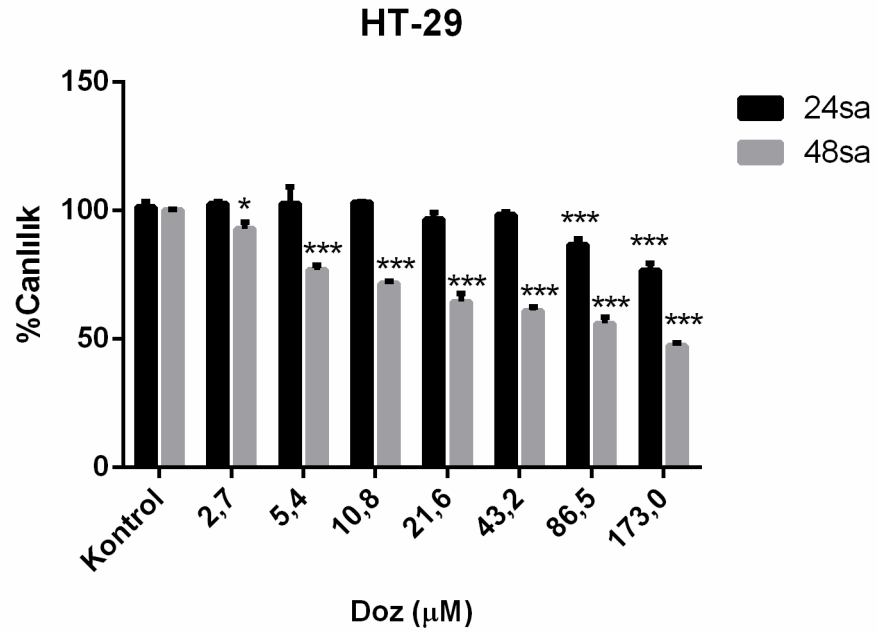
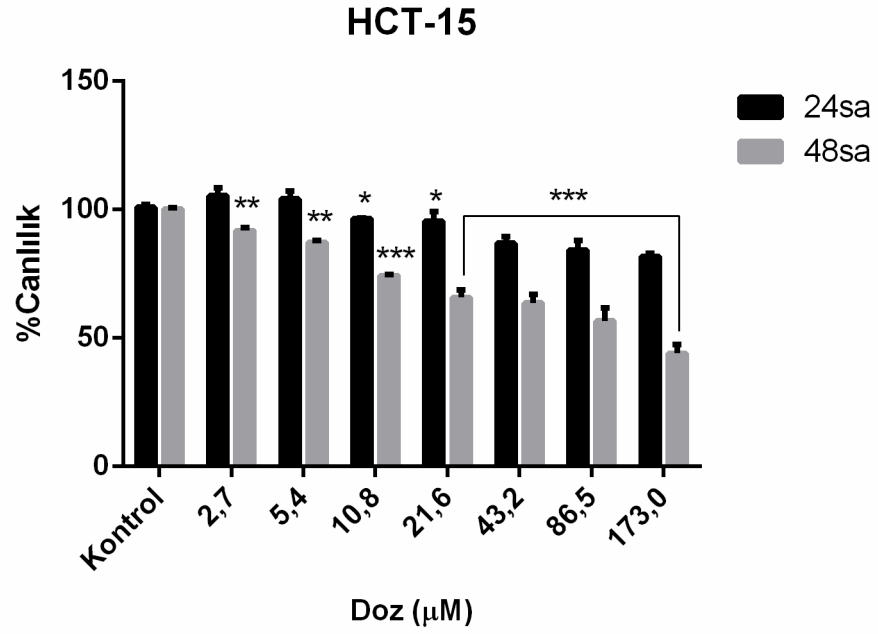
EGFR inhibitörü canertinib'in sırasıyla 24-48-72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarının (0,5-100 µM) hücre canlılığı üzerine etkisi SRB testi ile belirlendi. SRB hücre canlılığı sonuçlara göre, HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücrelerine 24, 48 ve 72 saat canertinib tedavisi sonucunda bu hücrelerde doza ve zamana bağlı olarak kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi (p<0,05; p<0,01; p<0,001). (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Otofaji inhibitörü ve EGFR inhibitörü uygulanan HCT-15, HT-29 hücre soylarının canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,001$) ifade etmektedir

HCT-15, HT-29 kanser hücrelerine 24-48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (2,7-173 μ M) deneylerde pozitif kontrol olarak kullanmak amacıyla, kemoterapötik ajan 5-FU uygulandı. 5-FU'nun HCT-15, HT-29 hücrelerinde 24 saat tedavi süresince sadece 86,5 ve 173 μ M dozlarında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenirken, 48 saat tedavi sonunda özellikle 10,8 - 21,6 - 43,2 - 86,5 ve 173 μ M dozlarında kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalara neden olduğu bulundu($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$) (Şekil 4.3).

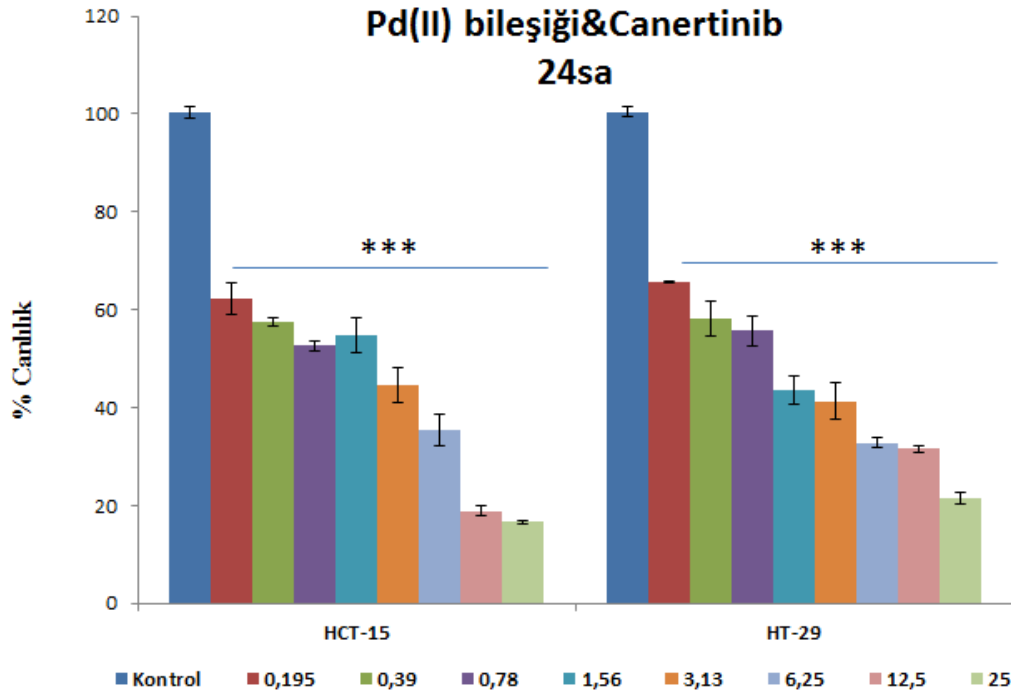




Şekil 4.3. 5-FU'nun (2,7-173µM) HCT-15 HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin canlılığa etkisinin doza bağlı olarak değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001) ifade etmektedir

EGFR inhibitörü için ise 5µM dozu ile Pd(II) bileşiği ve 5-FU ajanı ile 24 saat ön tedavi sonrasında ortamdan çekilerek 24 saat süresince uygulanmasına karar verildi. Yapılan

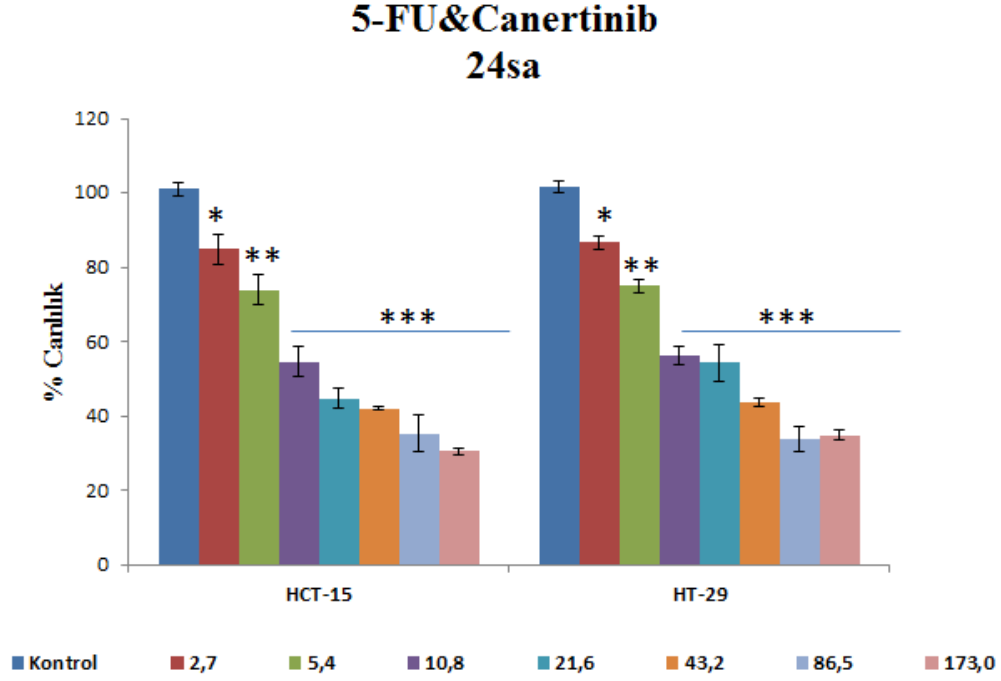
doz seçimleri sonrası canertininib (5 μ M) için belirlenen inhibitör konsantrasyonu ile Pd (II) bileşiği (1,56-25 μ M) kombinasyonun hücre canlılığına olan etkisini belirleyebilmek için 24-48 saat süresince SRB canlılık testi yapıldı. Yapılan SRB hücre canlılığı testi sonuçlarına göre; HCT-15, HT-29 kolon kanseri hücrelerinde Pd (II) bileşiğinin canertininib ile olan kombinasyonunda, 24 ve 48 saat süreyle yapılan tedavide yalnız Pd (II) bileşiğine kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,001$) (Şekil 4.4)



Şekil 4.4. Pd (II) bileşiğinin farklı konsantrasyonları ile canertininib inhibitörü kombinasyonunun 24 saat kombinasyon tedavisi sonucu HCT-15, HT-29 kanser hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (*: $p<0,05$ **: $p<0,01$ ***: $p<0,001$) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

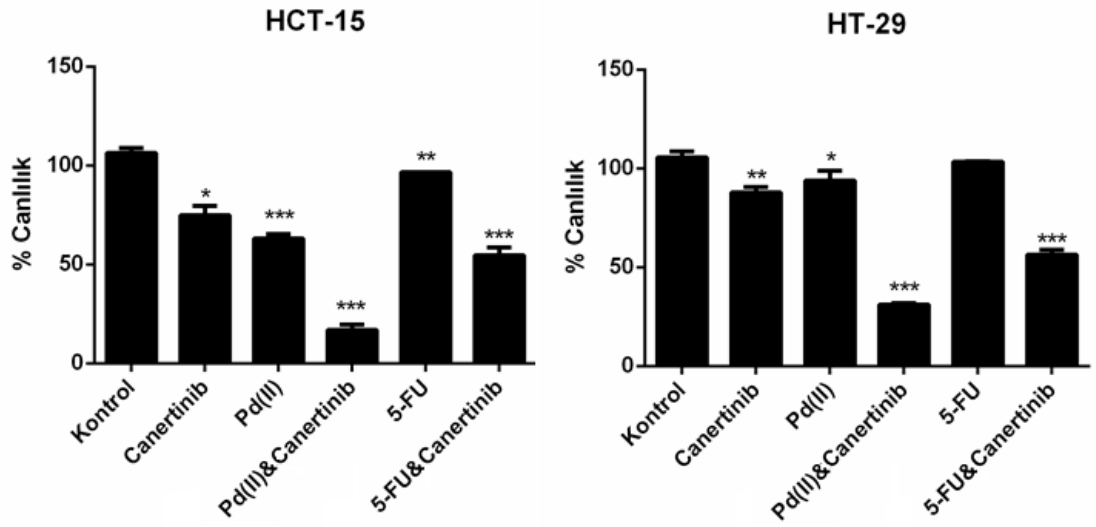
Pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU kemoterapötik ajanı (2,7-173 μ M) ile canertininib (5 μ M) kombinasyonunun 24 ve 48 saat tedavi süresince hücre canlılığı üzerine etkisi SRB canlılık testi ile belirlendi. Pd(II) bileşiği ile yapılan kombinasyonda olduğu gibi 5-FU kemoterapötik ajanı 24 saat tedavi sonunda ortamdan çekilerek 5 μ M canertininib 24 saat süresince uygulandı. HCT-15, HT-29 kolon kanseri hücrelerinde kombinasyon

tedavisi sonucunda, 5-FU kemoterapötik ajanın tek başına etkisine göre, hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. 5-FU kemoterapötik ajanı, canertinib (5 µM) inhibitörü ile 5-FU ajanının farklı konsantrasyonları ile 24 saat kombinasyon tedavisi sonucu HCT-15, HT-29 kanser hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (*: p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

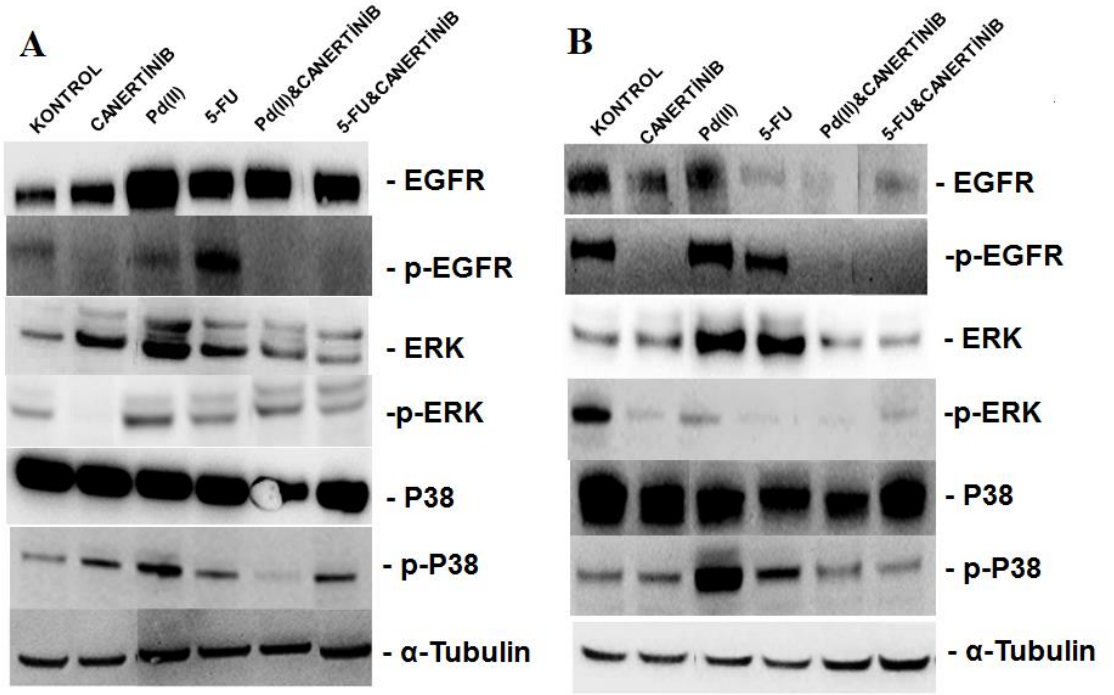
Sonuç olarak kombinasyon çalışmaları için, Pd (II) bileşiğinin her üç hücre soyunda da 48 saat tedavi sonunda yaklaşık olarak IC₅₀ değerlerine yakın olan fakat 24 saat tedavi sonunda etki görülmeyen 12,5µM dozu seçildi. EGFR inhibitörü için ise 5µM dozu ile Pd(II) bileşiği ve 5-FU ajanı ile 24 saat ön tedavi sonrasında ortamdan çekilerek 24 saat süresince uygulanmasına karar verildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Seçilen Pd(II) bileşiği (12,5 μ M), Canertinib (5 μ M), 5-FU (10,8 μ M) dozlarında kombinasyon tedavisi sonucu HCT-15 ve HT-29 hücrelerinin yüzde canlılık grafiği. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (*: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,001$) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

4.2. HCT-15 ve HT-29 Hücrelerinde Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin EGFR ve Diğer Yaşam Yolakları Üzerine Etkileri

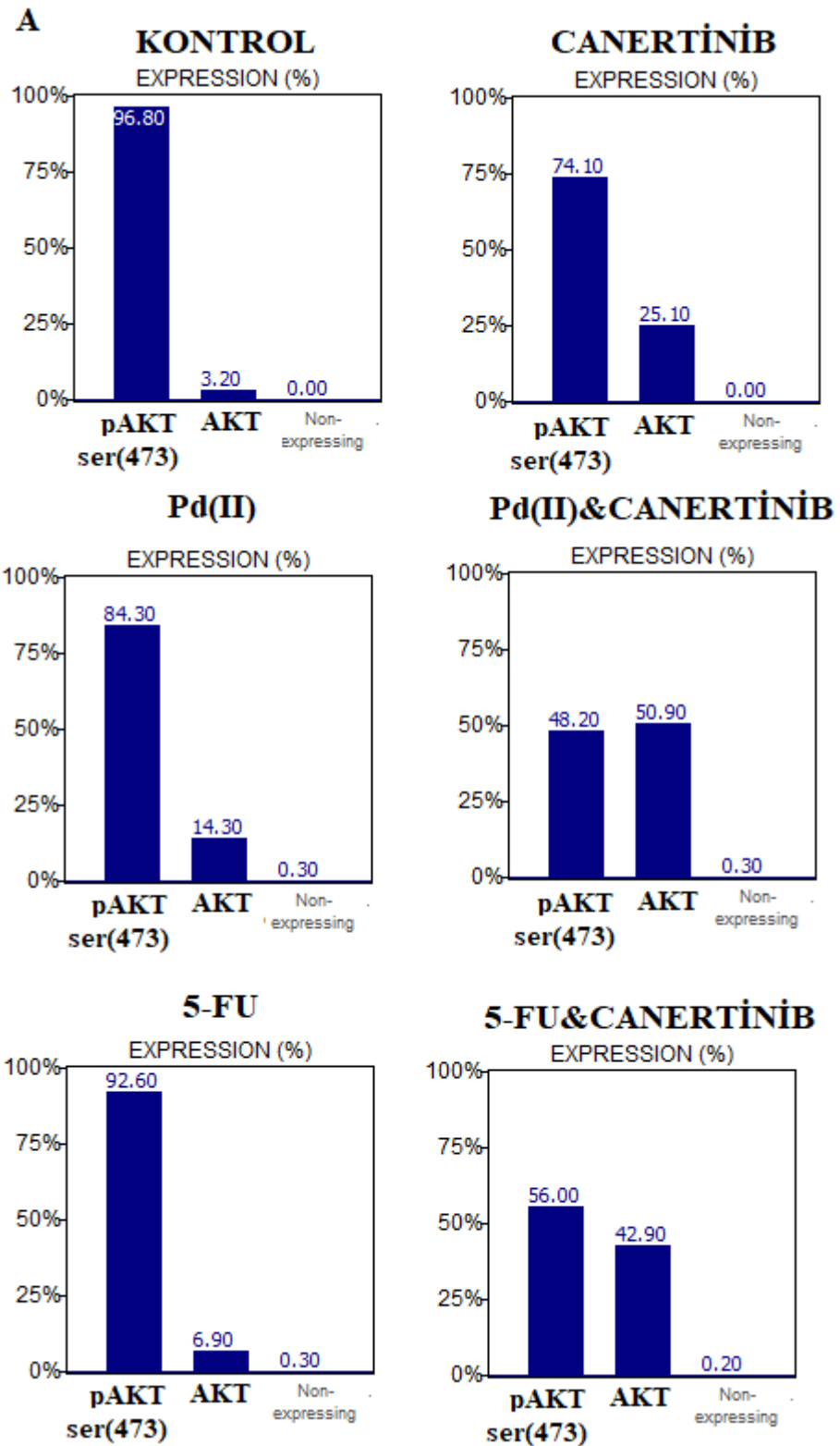
Ardından, HCT-15 kanser hücrelerinde Pd(II) bileşiği 24 saat süreyle uygulandı ve EGFR fosforilasyonunda kontrole göre azalma görüldü, canertinib ile kombinasyonunda ise yine kontrole göre azalma gözlemlendi. Canertinib tek başına uygulanmasında ise EGFR fosforilasyonunu inhibe ederken bu inhibisyon 5-FU ve canertinib kombinasyonunda daha fazla olduğu görüldü. Canertinib tek başına ERK1/2 fosforilasyonunu azaltırken Pd(II) ve 5-FU kombinasyonunda kontrole göre artış biraz fazla oldu. HT-29 kanser hücrelerinde ise canertinib tek başına ve Pd(II) ve 5-FU ile kombinasyonunda EGFR fosforilasyonunda belirgin bir azalma gözlemlendi. Bununla birlikte canertinib tek başına ve Pd(II) ile kombinasyonu aynı şekilde ERK1/2 fosforilasyonunda azalmaya neden oldu, fakat 5-FU ve canertinib kombinasyonu ERK1/2 fosforilasyonunu arttırdığı gözlemlendi. Canertinib ve Pd(II) bileşiği ile kombinasyonu p38 ekspresyonunda azalmaya neden olurken, 5-FU canertinib kombinasyonu kontrole kıyasla bir değişme göstermedi (Şekil 4.7).

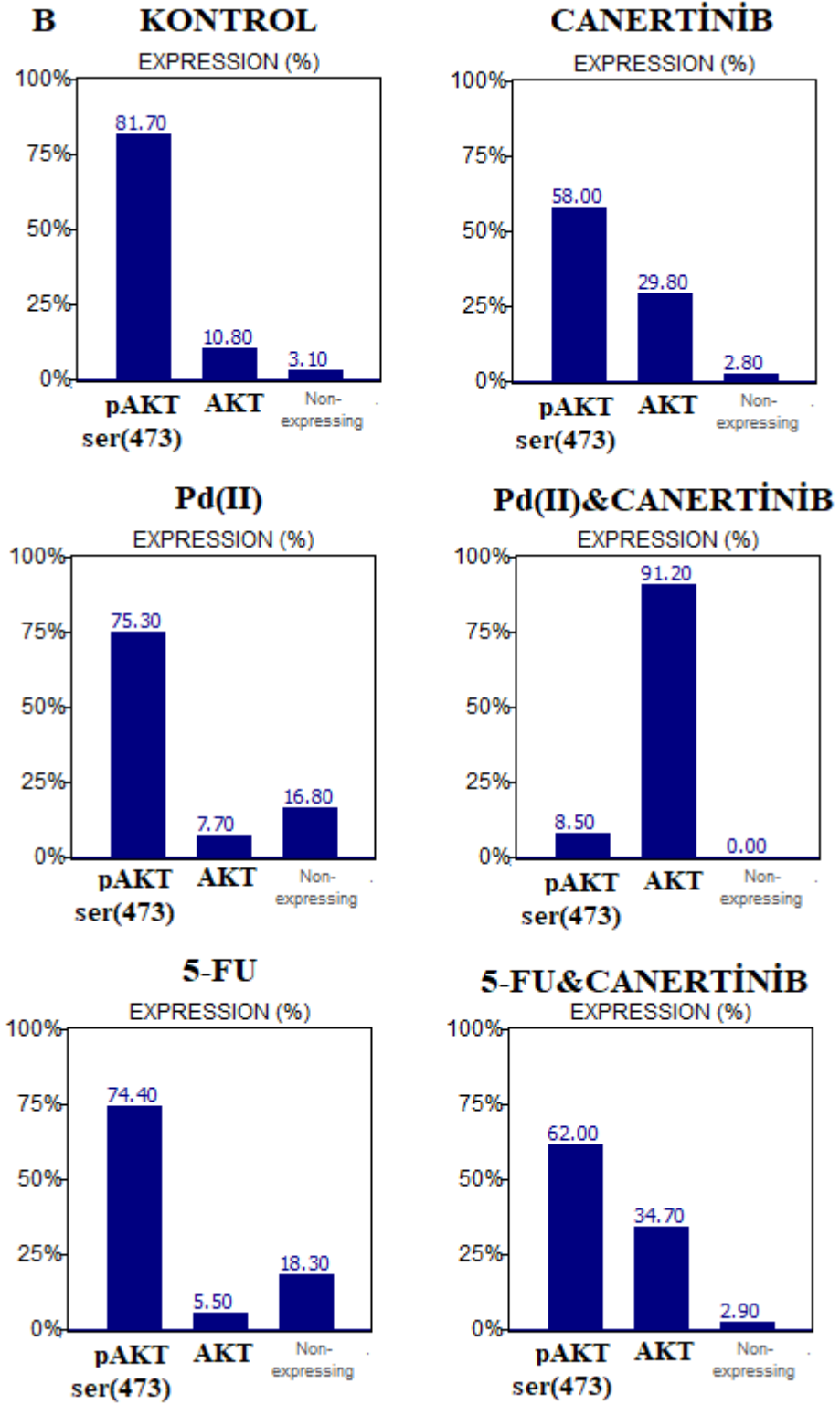


Şekil 4.7. Pd(II) bileşiğinin canertinib ile kombinasyonunun EGFR, ERK,P38 yaşam yolları üzerine etkisi

Aynı zamanda AKT ekspresyon seviyelerine Muse® PI3K Activation Dual Detection Kit ile bakıldı. Buna göre HCT-15 kolon kanser hücrelerinde canertinib tedavisi tek başına pAKT ekspresyon seviyesini az da olsa düşürürken, Pd(II) ve 5-FU tedavisi ekspresyon azalmasında belirgin bir etki göstermedi. Bununla birlikte Pd(II) ve 5-FU bileşiklerinin canertinib ile kombinasyonunda pAKT ekspresyonu önemli ölçüde azaldı (Şekil 4.8A).

HT-29 kolon kanser hücre soyunda da aynı şekilde canertinib tedavisi pAKT ekspresyonunda azalmaya neden olurken, Pd(II) ve 5-FU tek başına tedavisi pAKT ekspresyonunda artışa neden oldu. Bu iki bileşiğin canertinib ile kombinasyonunda ise önemli ölçüde pAKT ifade düzeyinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.8B).





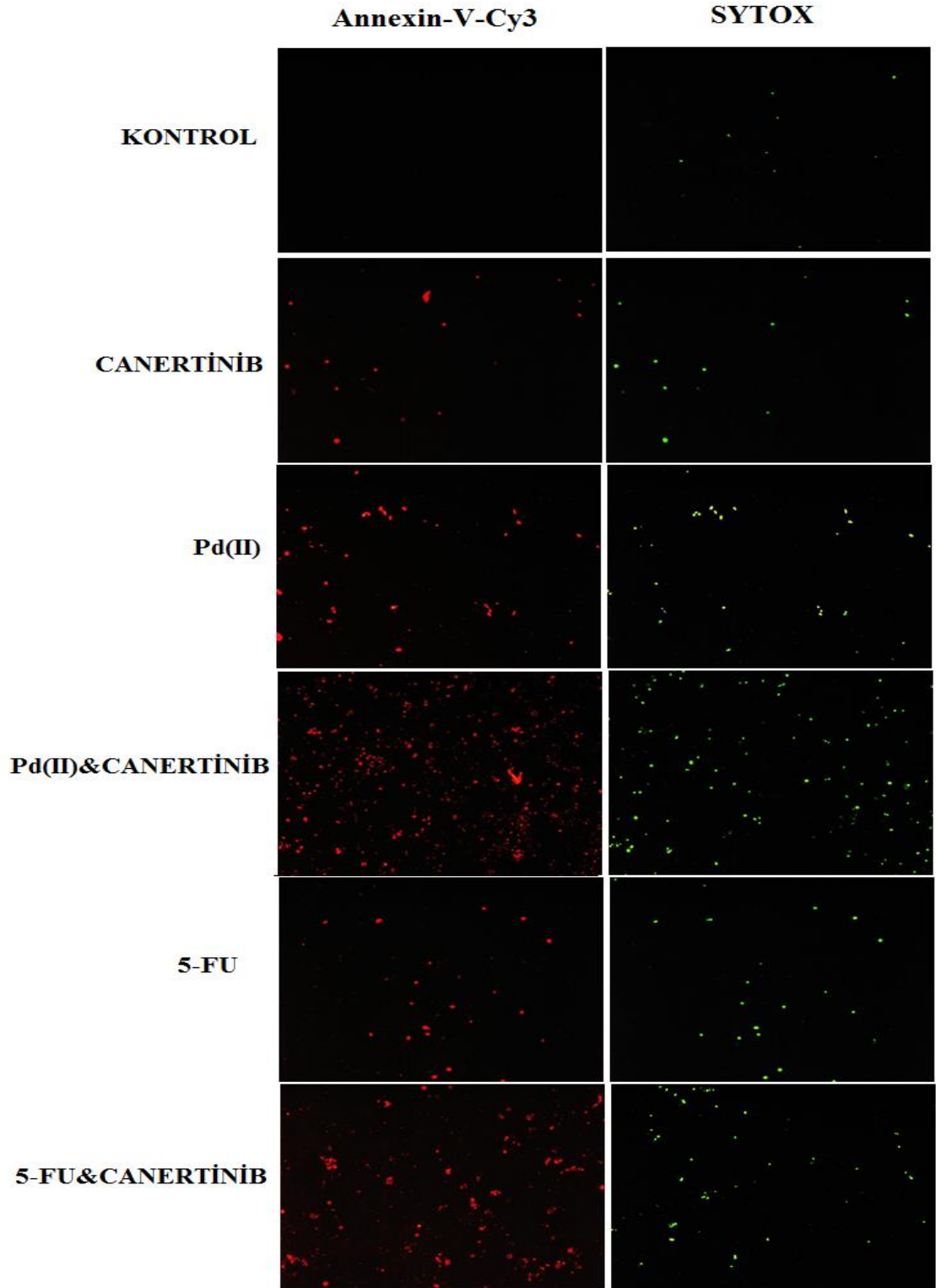
Şekil 4.8. Pd(II) bileşiğinin HCT-15 (A) ve HT-29 (B) kolon kanser hücresinde canertinib ile kombinasyonun AKT yaşam yolu üzerine etkisi

4.3. Tüm Hücre Soylarında Pd(II) Bileşigi ve Canertinib Kombinasyonunun Apoptoz mekanizması üzerine etkileri

4.3.1. Apoptozun belirlenmesine ilişkin Anneksin-V ölçülmesinin boyama ile değerlendirilmesi

Anneksin V-Cy3 apoptoz boyama/belirleme kiti, Anneksin V-Cy3, SYTOX yeşil boya ve tampon çözelti içerir. Anneksin-V, apoptozisin erken dönemlerinde hücrenin dış yüzeyine transloke olan PS'ye bağlanabilen bir proteindir ve floresan bir madde ile işaretlendiğinde (Cy3) apoptotik hücreler görünür hale getirilerek floresan mikroskopu ile incelenir. Ayrıca SYTOX yeşil boyası canlı ve apoptotik hücrelere karşı geçirimsizdir fakat hücreSEL nükleik asitlere bağlanarak yoğun yeşil floresan ile nekrotik hücreleri boyar. SYTOX yeşil boya, sadece membran hasarlı hücrelere girebilen, dolayısıyla tüm ölü hücreleri (primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik) boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Anneksin V-Cy3 ve SYTOX yeşil boya ile hücre popülasyonu boyandıktan sonra, apoptotik hücreler kırmızı floresan, ölü hücreler yeşil floresan gösterir ve canlı hücreler ise az ya da hiç floresan göstermez. Canlı hücreler; Cy3-/SYTOX-, erken apoptotik hücreler; Cy3+/SYTOX - ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler; Cy3+/SYTOX+ boyanırlar ve bu şekilde birbirlerinden ayırt edilirler. HCT-15, HT-29 hücrelerine Pd (II) bileşiginin 12,5 µM, klorokin 10 µM, Canertinib 5 µM ve 5-FU 10,8 µM dozu ve bunların kombinasyon dozları uygulandı. Her bir ajan için ayrı ayrı 24 saat ilaç uygulamasını takiben ikili boyama yöntemi (Anneksin-V- Cy3+SYTOX) uygulanarak floresan mikroskop altında değerlendirme yapıldı.

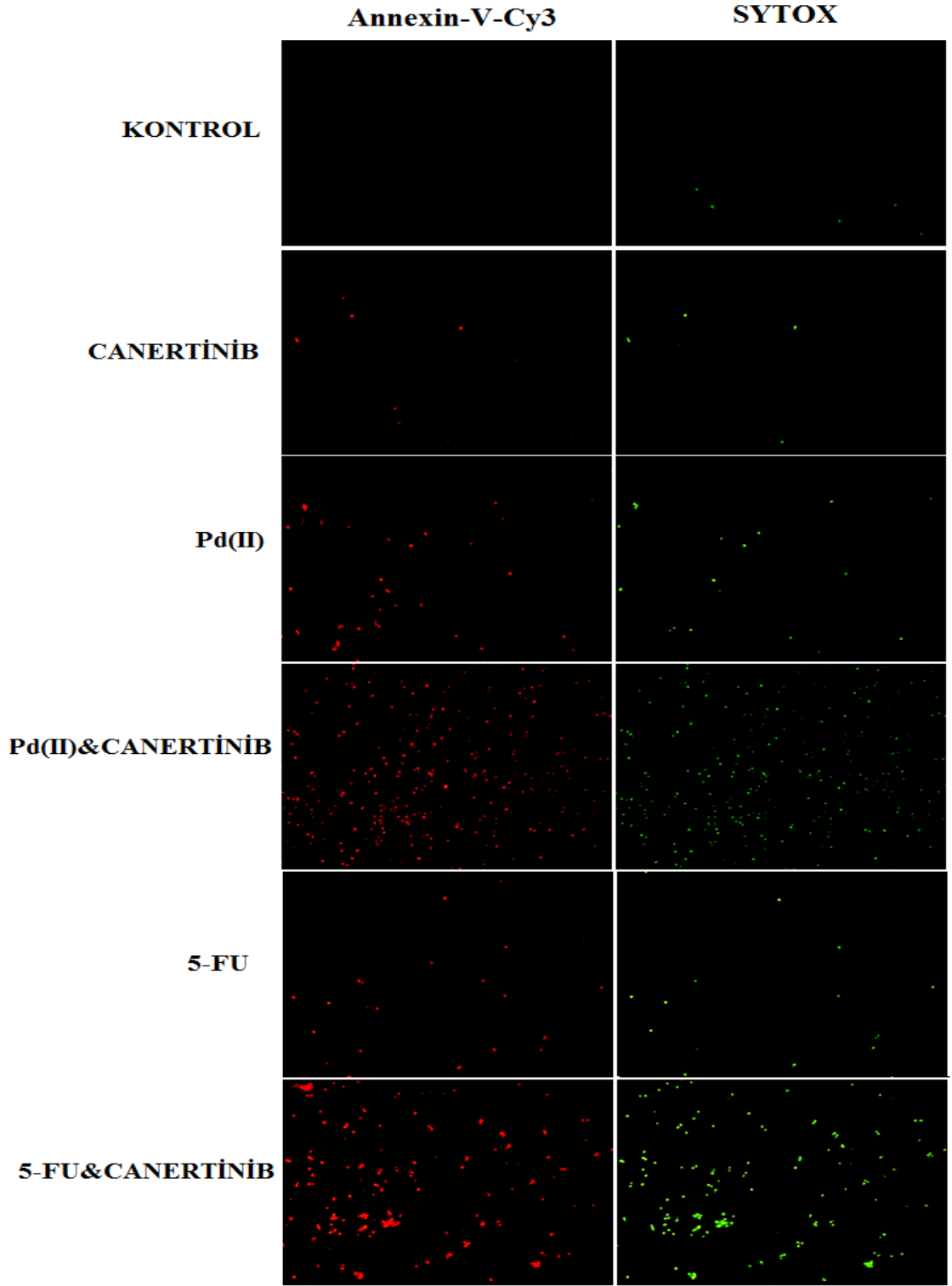
HCT-15 hücre soyunda Pd (II) bileşiginin tek başına ve inhibitörler ile kombinasyon tedavisi sonucu hücrelerin çoğunun Anneksin-V pozitif/ SYTOX pozitif olması hücrelerde geç apoptozis/sekonder nekrozis geliştiği belirlendi (Şekil 4.9). Fakat Pd(II) bileşigi ve canertinib kombinasyonu, 5-FU ve canertinib kombinasyonunda geç apoptotik hücreler gözlemlendiği gibi erken apoptoz da görülmektedir.



Şekil 4.9. Pd (II) bileşiği, 5-FU, Canertinib tek başına ve Canertinibin Pd (II) bileşiği ve 5-FU kemoterapötik ajanı ile kombinasyonunun HCT-15 kanser hücrelerinde tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri. Anneksin-V (Kırmızı), SYTOX ile boyama (Yeşil)

HT-29 hücre soyunda Pd (II) bileşğinin tek başına ve canertinib ile kombinasyon tedavisi sonucu hücrelerin çoğunun Anneksin-V pozitif/SYTOX olması hücrelerde geç apoptozis/sekonder nekrozis geliştiğı söylenebilir (Şekil 4.10). Fakat geç apoptoza giden hücre sayısı Pd(II) bileşğii ve canertinib kombinasyonu ve 5-FU ve canertinib kombinasyonunda, Pd(II) bileşğii tek başına, 5-FU tek başına kombinasyon tedavisine kıyasla daha fazladır.





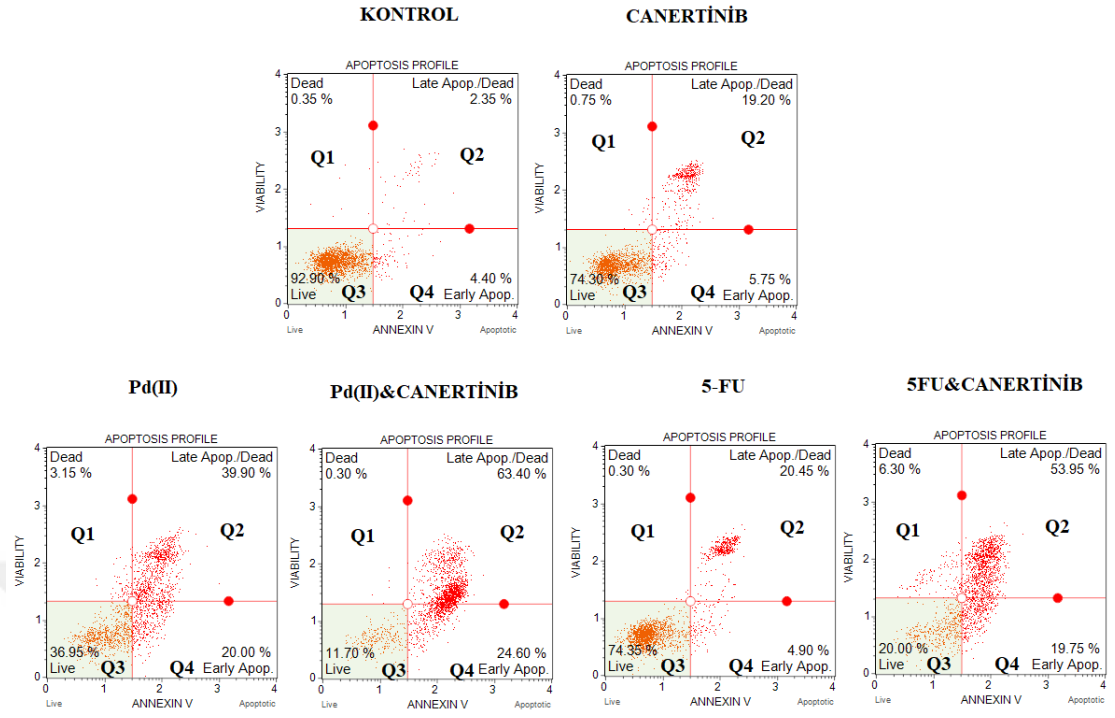
Şekil 4.10. Pd (II) bileşiği, 5-FU, Canertinib tek başına ve Canertinibin Pd (II) bileşiği ve 5-FU kemoterapötik ajanı ile kombinasyonunun HT-29 kanser hücrelerinde tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri. Anneksin-V (Kırmızı), SYTOX ile boyama (Yeşil)

4.3.2. Tüm hücre soylarında apoptozun belirlenmesine ilişkin Anneksin-V ölçülmesinin akım sitometrisi ile değerlendirilmesi

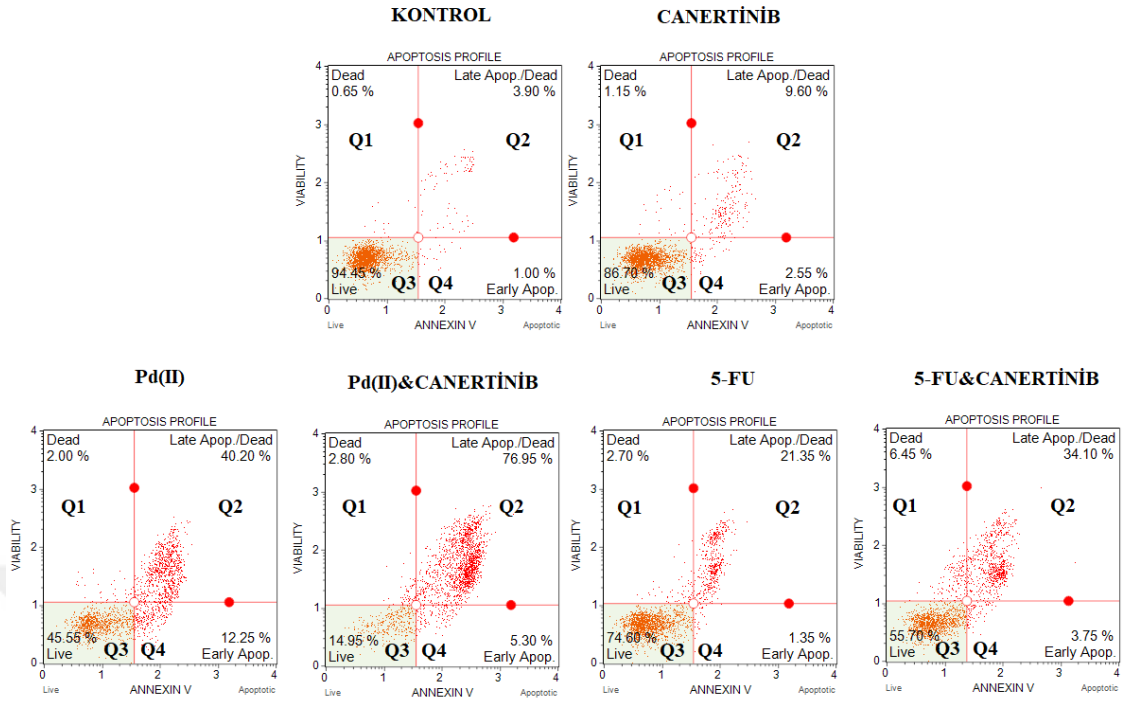
Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının boyama dışında ayrıca akım sitometrisinde Anneksin-V değerlendirilmesi sonucunda; HCT-15 hücre soyunda her bir bileşik için ayrı ayrı 24 saatlik tedaviler sonrasında, canertinib tek başına uygulandığında apoptotik oran %24,95 (Q2+Q4), Pd (II) bileşiği tek başına %59,9 (Q2+Q4), Pd(II)&canertinib kombinasyonunda apoptotik oran %88(Q2+Q4) iken pozitif kontrol grubu 5-FU uygulandığında apoptotik oran %25,35 (Q2+Q4), 5-FU&canertinib kombinasyonunda apoptotik oran %73,7(Q2+Q4) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11). Bu sonuçlara göre kombinasyon tedavisinin hücrelerinde hem Pd (II) bileşiğine hem kontrole oranla apoptotik hücrelerin sayısında artış meydana geldiği görüldü. Yapılan Anneksin-V-Cy3 floresans boyama görüntüleri de bu sonucu destekledi.

HT-29 kolon kanser hücre soyunda ise canertinib tek başına uygulandığında apoptotik oran %12,15(Q2+Q4), Pd (II) bileşiği tek başına %52,45(Q2+Q4), Pd(II)&canertinib kombinasyonunda apoptotik oran %82,25(Q2+Q4) iken pozitif kontrol grubu 5-FU uygulandığında apoptotik oran %22,7(Q2+Q4), 5-FU&canertinib kombinasyonunda apoptotik oran %37,85(Q2+Q4) olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde elde edilen sonuçlar Annexin V-Cy3 floresans boyama ile uyumludur (Şekil 4.12).

Annexin V-FITC ve 7-AAD negatif olan bölge canlı hücreleri (Q3), Annexin V-FITC ve 7-AAD pozitif olan bölge geç apoptotik hücreleri (Q2), Annexin V-FITC pozitif ve 7-AAD negatif olan bölge erken apoptotik hücreleri (Q4), Annexin V-FITC negatif ve 7-AAD pozitif olan bölge ise nekrotik hücrelerin (Q1) yüzde değerlerini göstermektedir.



Şekil 4.11. Pd (II) bileşiği (12,5 μ M) ve 5-FU (10,8 μ M) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 μ M) ile 24 saat tedavi sonrasında HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz)

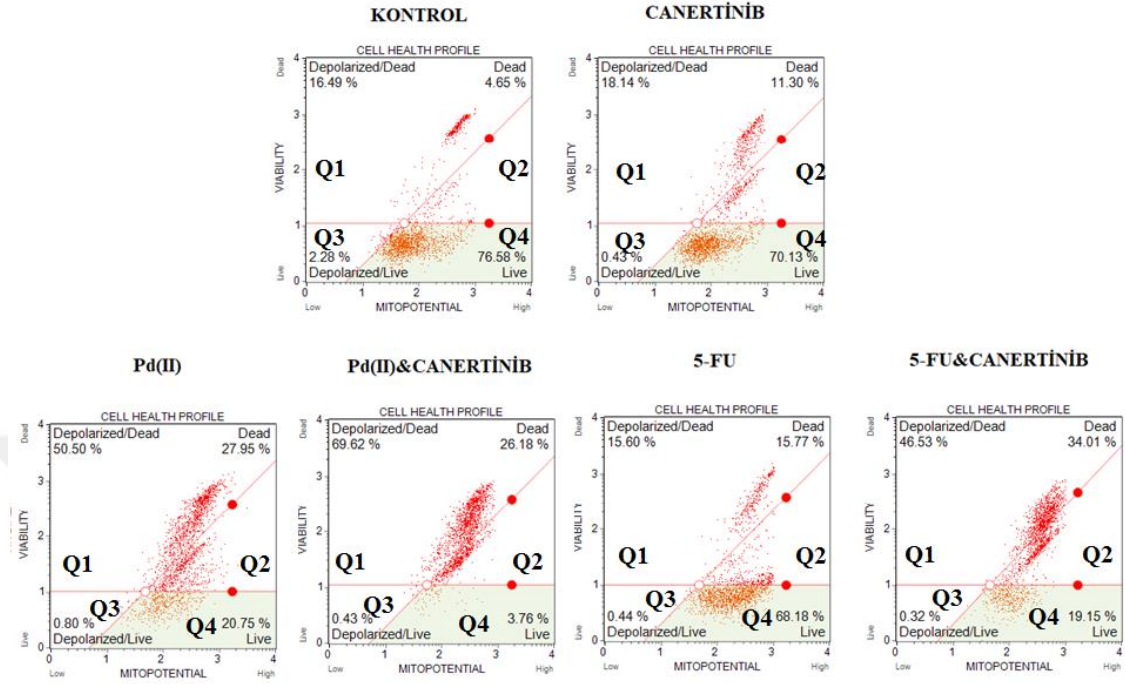


Şekil 4.12. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrasında HT-29 kolon kanseri hücrelerinde Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz)

4.3.3. Apoptotik ölüm mekanizmasının belirlenmesinde tüm hücre soylarında mitokondriyal membran potansiyeli ve JC-1 boyama sonuçlarının değerlendirilmesi

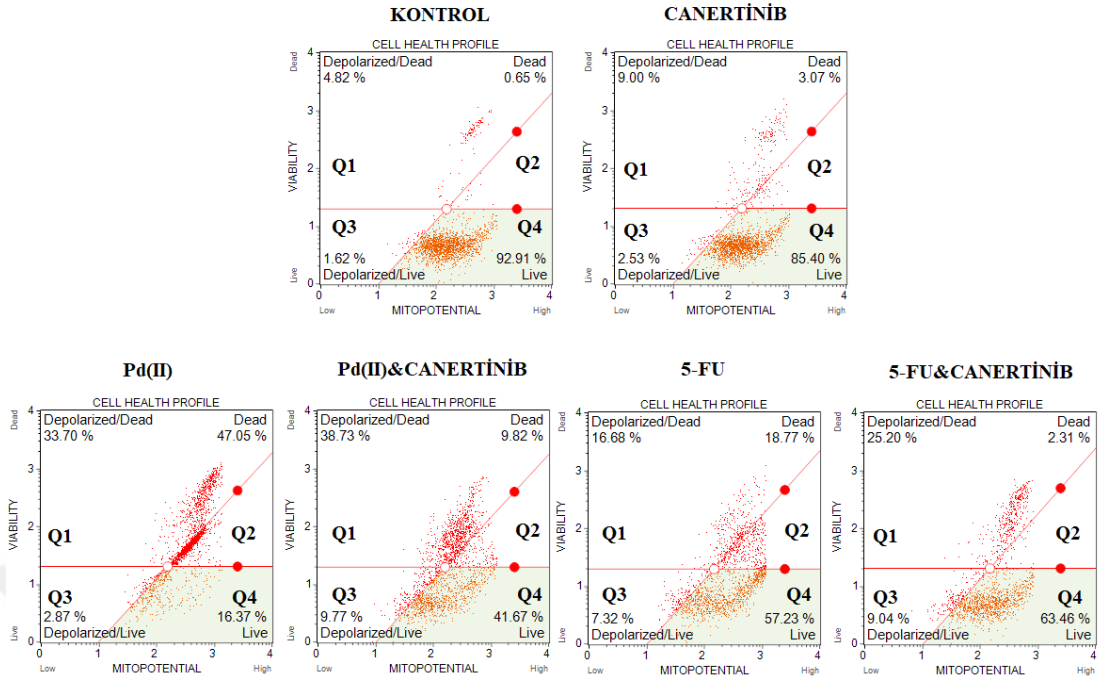
Mitokondrilerin geçirgenliğini dengeleyen pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin işlevindeki bozulmanın sonucu hücreler mitokondriyal yolak üzerinden apoptotik ölüme gider. Bu nedenle mitokondriyal membran permeabilitesinin değişimi apoptotik süreç de gözlenen önemli değişikliklerden biridir. Şekil 4.13’de görüldüğü üzere; HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde Pd(II) bileşiği tek başına mitokondri membranı depolarize olan hücrelerin total yüzdesi %51,3(Q1+Q3) iken Canertinib ile kombinasyonunda, depolarize olan hücre yüzdesi % 70,05(Q1+Q3) dir. Pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU uygulandığında mitokondri membranı depolarize hücre ve mitokondri membranı intakt hücre ölüm yüzdesi çok düşüktür, anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Canertinib ile kombinasyonunda mitokondri membranı depolarize olan hücrelerin total yüzdesi %46,85(Q1+Q3) dir (Şekil 4.13). Pd(II) bileşiğinin canertinib ile kombinasyonunda

mitokondri depolarizasyonu görülmesi, ölüm mekanizmasının intrinsik (mitokondriyal) yolak üzerinden gerçekleştiği şeklinde yorum yapılmıştır.



Şekil 4.13. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde histogramları (Q1=Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3=Depolarize/Canlı, Q4= Canlı)

HT-29 kolon kanseri hücrelerinde Pd(II) bileşiği tek başına mitokondri membranı depolarize olan hücrelerin total yüzdesi %36,57(Q1+Q3) iken, Canertinib ile kombinasyonunda, depolarize olan hücre yüzdesi %48,5(Q1+Q3) dür. Pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU uygulandığında mitokondri membranı depolarize hücre yüzdesi %24(Q1+Q3), iken Canertinib ile kombinasyonunda mitokondri membranı depolarize olan hücrelerin total yüzdesi %34,24(Q1+Q3) dür (Şekil 4.14). Pd(II) bileşiğinin canertinib ile kombinasyonunda mitokondri depolarizasyonunda artış ölüm mekanizmasının intrinsik (mitokondriyal) yolak üzerinden gerçekleştiği şeklinde yorum yapılmıştır. Bu durumda Pd(II) ve canertinib kombinasyonunda HCT-15 hücre soyu ile karşılaştırdığımızda mitokondri membranı depolarize olmuş hücre yüzdesi her ne kadar HT-29 hücre soyuna göre fazla olsa da, her iki hücre soyunda da apoptozun intrinsik yolak üzerinden gittiği kanısına varılmıştır.



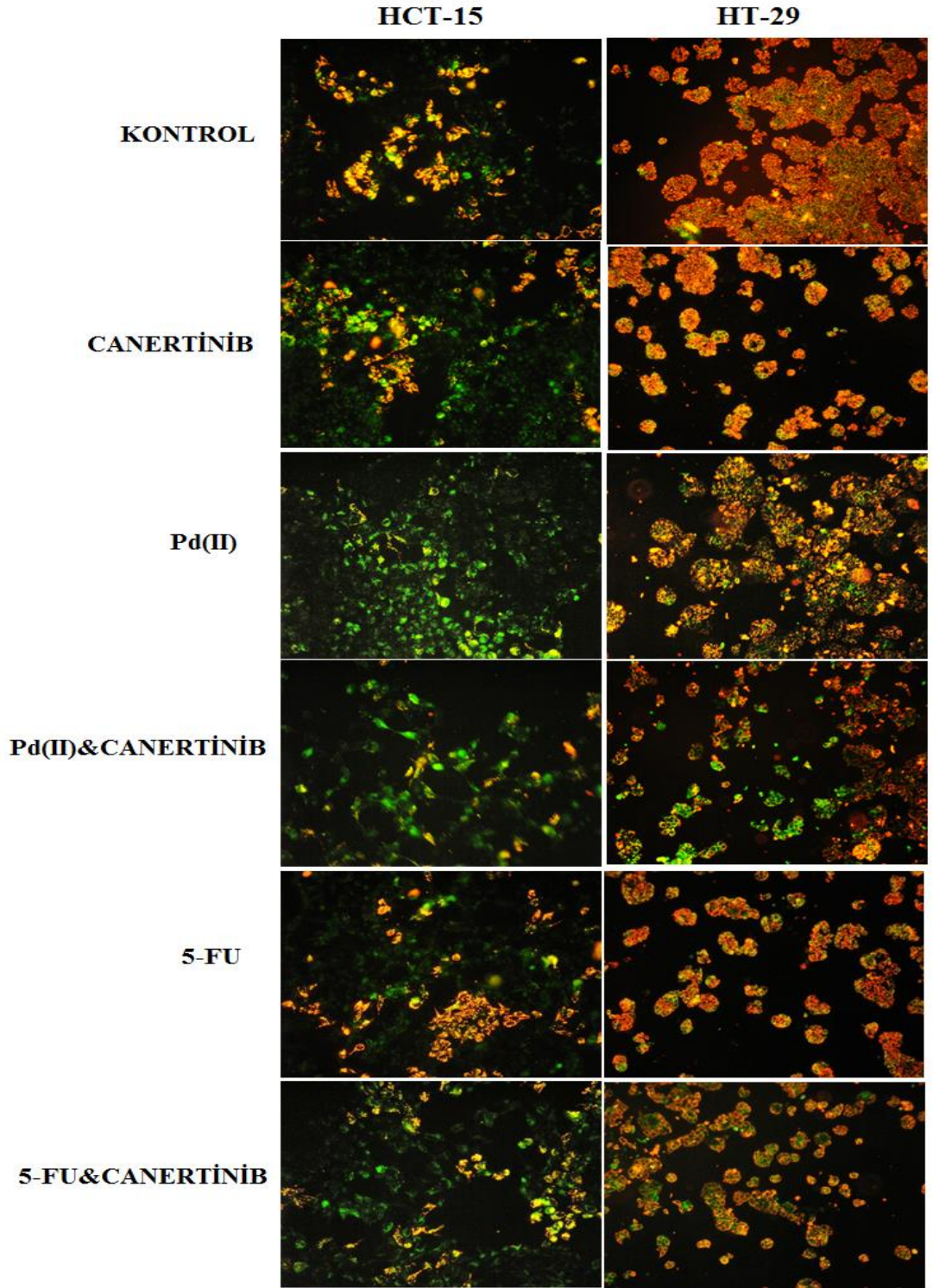
Şekil 4.14. Pd (II) bileşiği (12,5 μ M) ve 5-FU (10,8 μ M) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 μ M) ile 24 saat tedavi sonrası grubu ve klorokin (10 μ M) 24 saat ön tedavi sonrasında, Pd (II) bileşiği (12,5 μ M) ve 5-FU (10,8 μ M) 24 saat tedavi sonrası grubu ve bu bileşiklerin üçlü kombinasyon grubunun HT-29 kolon kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde histogramları (Q1=Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3=Depolarize/Canlı, Q4= Canlı)

Mitokondriyal transmembran potansiyel kaybı, apoptoz sırasında meydana gelen anahtar olaylardan bir tanesidir. Bu nedenle mitokondriyal membran potansiyelindeki($\Delta\Psi_m$) değişikliğin belirlenmesinde JC-1, en yaygın olarak kullanılan boyadır. Sağlıklı hücrelerde yani yüksek $\Delta\Psi_m$, JC-1 yoğun kırmızı floresans gösterirken, sağlıklı ya da apoptotik hücrelerde yani düşük $\Delta\Psi_m$, JC-1 sadece yeşil floresans gösterir. HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde Pd(II) tek başına tedavisinde J-agregatları azaldığı için yeşil floresans ve canertinib kombinasyonunda aynı şekilde yeşil floresans görüldü. Pozitif kontrol 5-FU'nun canertinib ile kombinasyonunda membran depolarizasyonu gözlemlendi.

HT-29 kolon kanseri hücreleri de HCT-15 kanser hücreleri ile benzer bir model sergileyerek tek başına Pd(II) bileşiğinde $\Delta\Psi_m$ kaybı canertinib ile kombinasyona benzer şekildedir ve yoğun yeşil renk gözlenmiştir. 5-FU'nun tek başına tedavisine kıyasla canertinib ile kombinasyonunda az da olsa $\Delta\Psi_m$ kaybı ile birlikte yeşil floresans gözlenirken, tedavi gruplarının genelinde membran potansiyelindeki yükseklik, kontrol

hücrelerinin kırmızı floresans ile boyanması ile net bir şekilde gözlemlenmiştir. Artmış $\Delta\Psi_m$ kaybı apoptotik hücre ölümünün mitokondriyal yolak üzerinden gittiğini gösteren önemli bir indikatör olduğundan, HCT-15 ve HT-29 hücreleri için intrinsik yolak ölüm mekanizmasını desteklediği belirlendi. Ayrıca elde edilen bu sonuçlar, akım sitometresinde mitokondriyal membran potansiyeli ölçülmesiyle elde edilen sonuçlarla uyumludur (Şekil 4.15).

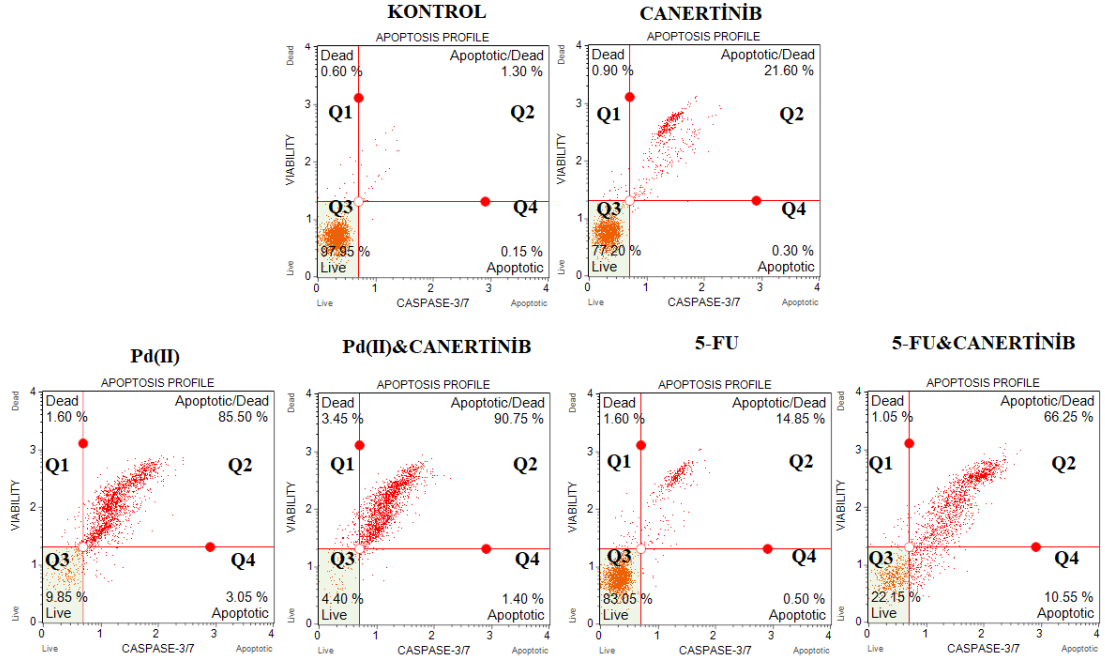




Şekil 4.15. Pd (II) bileşiği (12,5 μ M) ve 5-FU (10,8 μ M) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 μ M) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15, HT-29 kolon kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişiminin ($\Delta\Psi_m$) floresan mikroskop görüntüleri (Kırmızı floresan sağlıklı hücreleri, yeşil floresan apoptotik hücreleri göstermektedir)

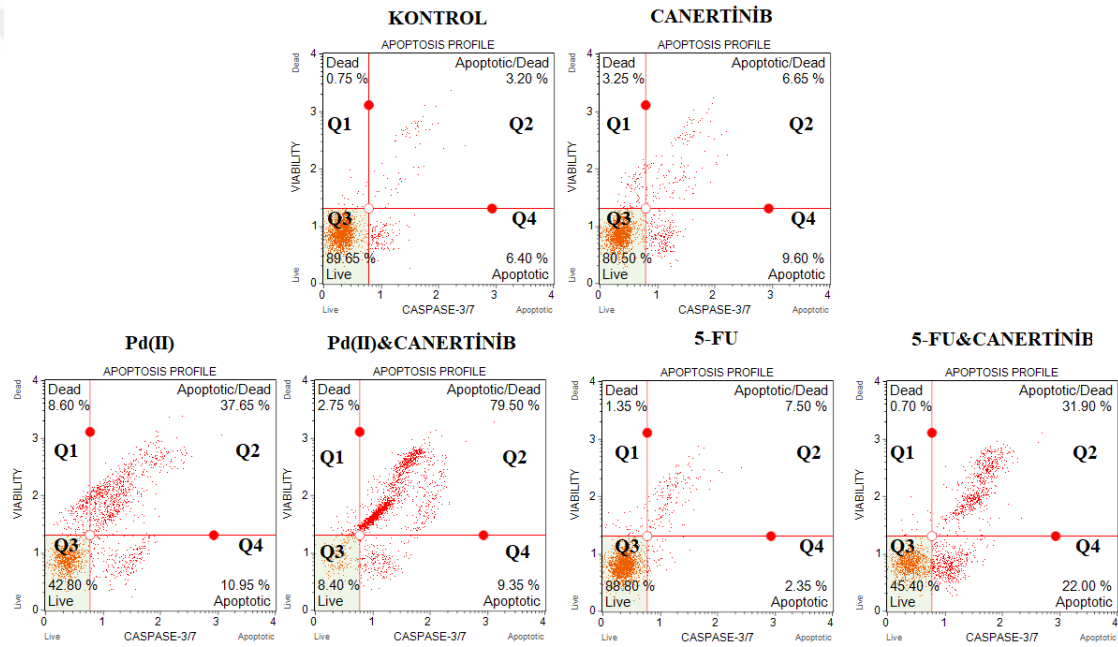
4.3.4. Tüm hücre soylarında apoptozun belirlenmesine ilişkin kaspaz3/7 ölçülmesinin akım sitometrisi ile değerlendirilmesi

Annexin V-Cy3 boyama ve akım sitometrisi sonuçlarına göre özellikle canertinib ile Pd(II) ve 5-FU ile kombinasyonunda hücrelerin apoptoz yolu ile öldüğü gözlenmiştir. Apoptotik hücre ölümü kaspazların aktivasyonu ile gerçekleştiğinden, kaspaz3/7 aktivasyonu apoptotik hücre ölümü ile ilgili daha net bir bilgi vermektedir. Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının akım sitometrisinde Kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirilmesi sonucunda; HCT-15 hücrelerinin canertinib tek başına uygulandığında apoptotik oran (kaspaz3/7 aktivitesi) %21,9 (Q2+Q4), Pd (II) bileşiği tek başına %88,55 (Q2+Q4), Pd(II)&canertinib kombinasyonunda apoptotik oran %92,15 (Q2+Q4) iken pozitif kontrol grubu 5-FU uygulandığında apoptotik oran %15,35 (Q2+Q4), 5-FU&canertinib kombinasyonunda apoptotik oran %76,8 (Q2+Q4) olarak belirlenmiştir(Şekil 4.16). Elde edilen sonuçlara göre kombinasyon tedavisinin apoptotik oranında (kaspaz 3/7 aktivitesini) Pd(II) tek başına tedavisine göre az miktarda artış görüldü. Fakat genel olarak bakılacak olursa kombinasyon tedavisinin hücrelerinde hem Pd (II) bileşiğine hem kontrole oranla kaspaz 3/7 aktivitesinde artış meydana geldiği görüldü.



Şekil 4.16. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz)

HT-29 kolon kanser hücrelerinde Pd (II) bileşiği tek başına %48,6 (Q2+Q4), Pd(II)&canertinib kombinasyonunda apoptotik oran %88,85 (Q2+Q4) iken pozitif kontrol grubu 5-FU uygulandığında apoptotik oran %9,85 (Q2+Q4), 5-FU&canertinib kombinasyonunda apoptotik oran %53,9 (Q2+Q4) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17). Elde edilen sonuçlara göre Kombinasyon tedavisinin apoptotik oranında (kaspaz 3/7 aktivitesini) Pd(II) tek başına tedavisine göre 2 katlık artış görülmüştür. Aynı zamanda 5-FU ajanının tek başına kullanımına göre canertinib ile kombinasyon tedavisinde kaspaz 3/7 aktivitesinde artış meydana geldiği görüldü.



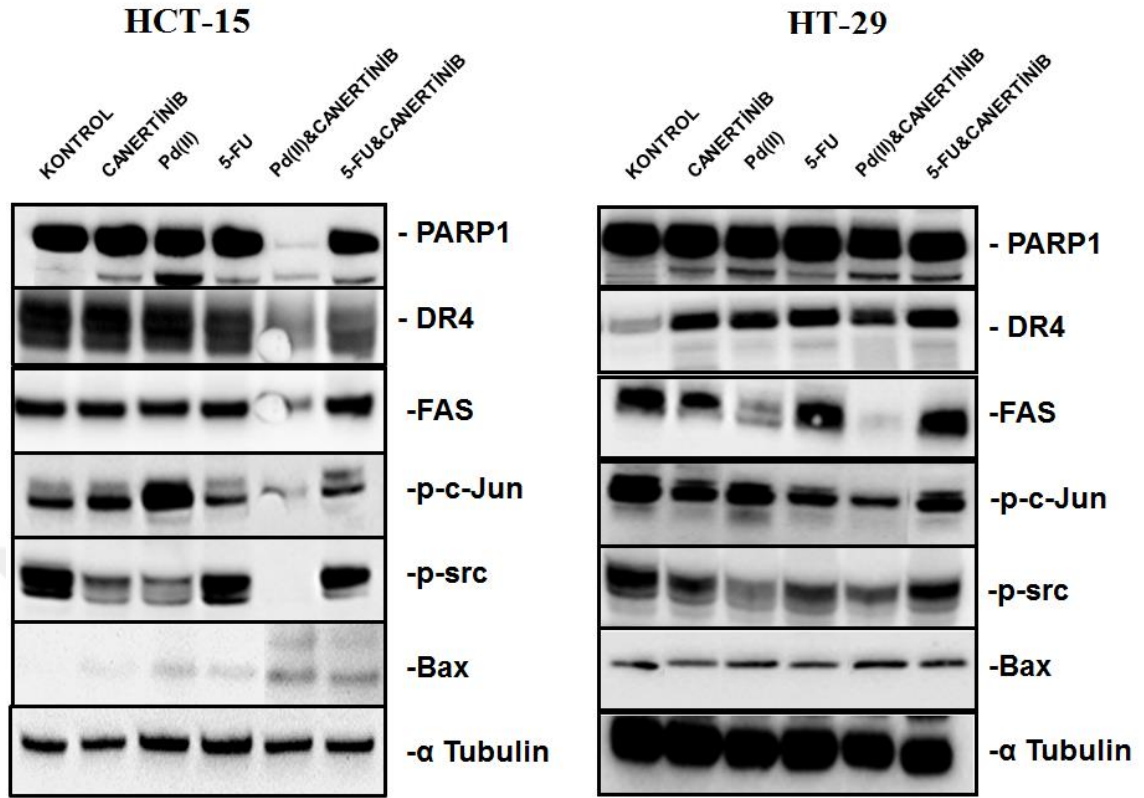
Şekil 4.17. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HT-29 kolon kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz)

4.3.5. Tüm hücre soylarında apoptoz ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

HCT-15 ve HT-29 hücre soylarının Pd(II), 5-FU ve bunların canertinib ile kombinasyon tedavisi sonucu ölüm mekanizmasının apoptoz olarak belirlendi. Buna göre apoptoz mekanizmasının intrinsik ya da ekstrinsik yoldan mı gittiğini belirlemek için apoptoz mekanizmasında görev alan bazı proteinlerin western blot ile ekspresyonlarına bakıldı.

Böylelikle HCT-15 kolon kanser hücrelerinde Pd(II) tek başına tedavisi PARP1 ekspresyon düzeyini önemli ölçüde arttırırken, FAS ve DR4 protein ekspresyon seviyeleri kontrol ile aynı kalmıştır. Fakat kombinasyon tedavisinde tam tersi yani PARP1 protein ekspresyonu belirgin bir şekilde azalırken, FAS ve DR4 protein ekspresyon seviyesi de azalmıştır. Mitokondriyal ölüm yolağı protein Bax seviyesinde Pd(II) tek başına uygulanmasına kontrole kıyasla artış gözlenirken canertinib ile kombinasyonda bu artış daha fazla belirgin hale gelmiştir. C-jun fosforilasyonu Pd(II) tedavisinde artarken kombinasyonda bariz bir azalma gözlenmiştir. Aynı şekilde p-Src ifade düzeyi Pd(II) tek başına ve canertinib kombinasyonunda azalmıştır.

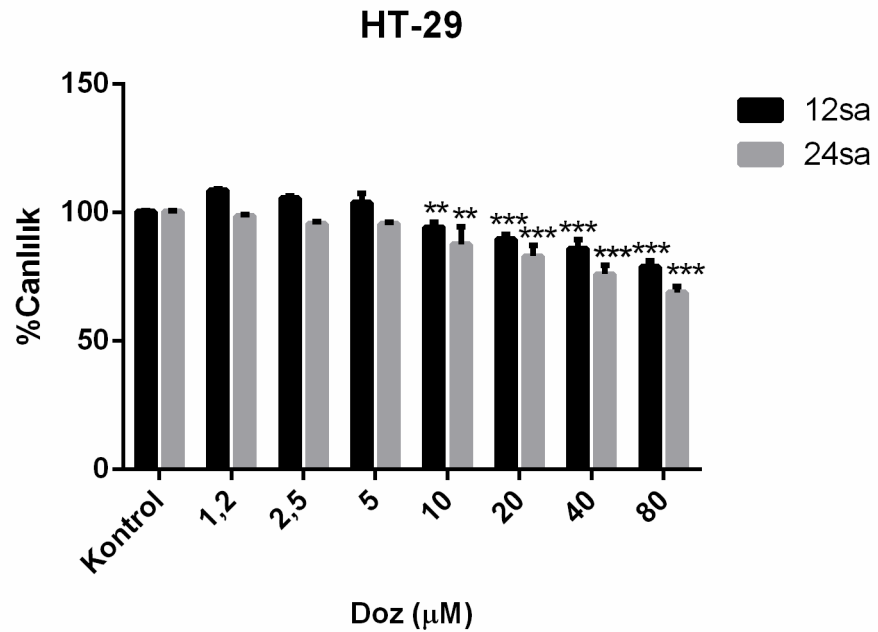
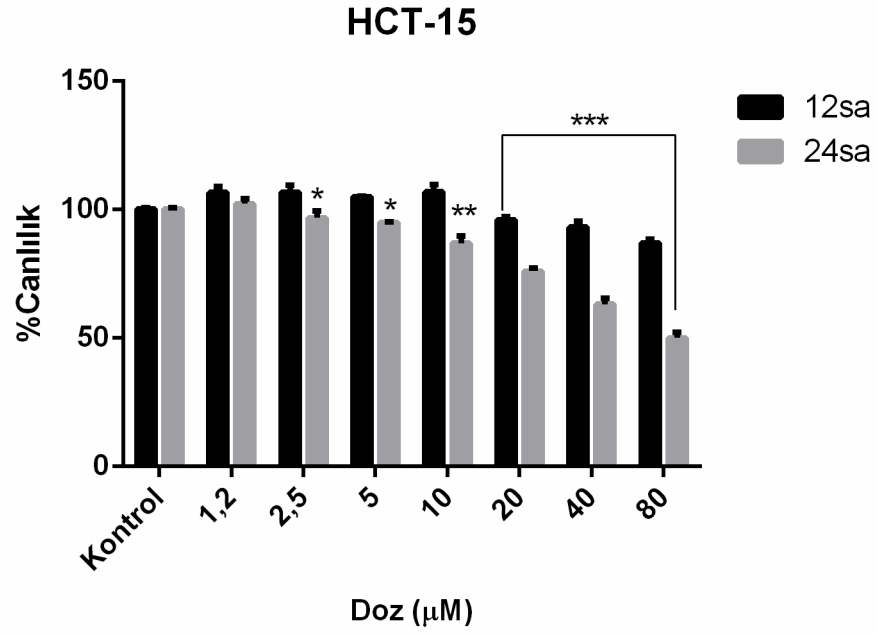
HT-19 kolon kanser hücrelerinde ise Pd(II) tek başına ve canertinib ile kombinasyon tedavisi sonucunda PARP1 kırılması gözlenirken, 5-FU ve canertinib kombinasyonunda da PAR1 kırılmıştır. FAS ekspresyon seviyesi Pd(II) tek başına ve canertinib kombinasyonunda azalırken, DR4 ekspresyon seviyesinin önemli ölçüde arttığı görüldü. Mitokondriyal yolak proteinlerinden Bax hem Pd(II) tek başına hem de canertinib ile kombinasyonunda artmıştır. p-C-jun ifade düzeyi kombinasyon tedavilerinde azalmıştır. Apoptozu inhibe eden p-Src ekspresyon seviyesi ise neredeyse tüm tedavi gruplarında azalmıştır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. HCT-15 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerinde, Pd (II) bileşiği (6,25 μ M) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 μ M) ile 24 saat tedavi sonrası grubunda PARP1, FAS, DR4,p-c-jun, p-Src, Bax protein ekspresyonlarının western blot yöntemiyle alınan sonuçları

4.4. Kullanılan Pd(II) Bileşiği ve Trozin Kinaz İnhibitörü Canertinib ile Kombinasyonunun Otofaji Üzerine Etkisi

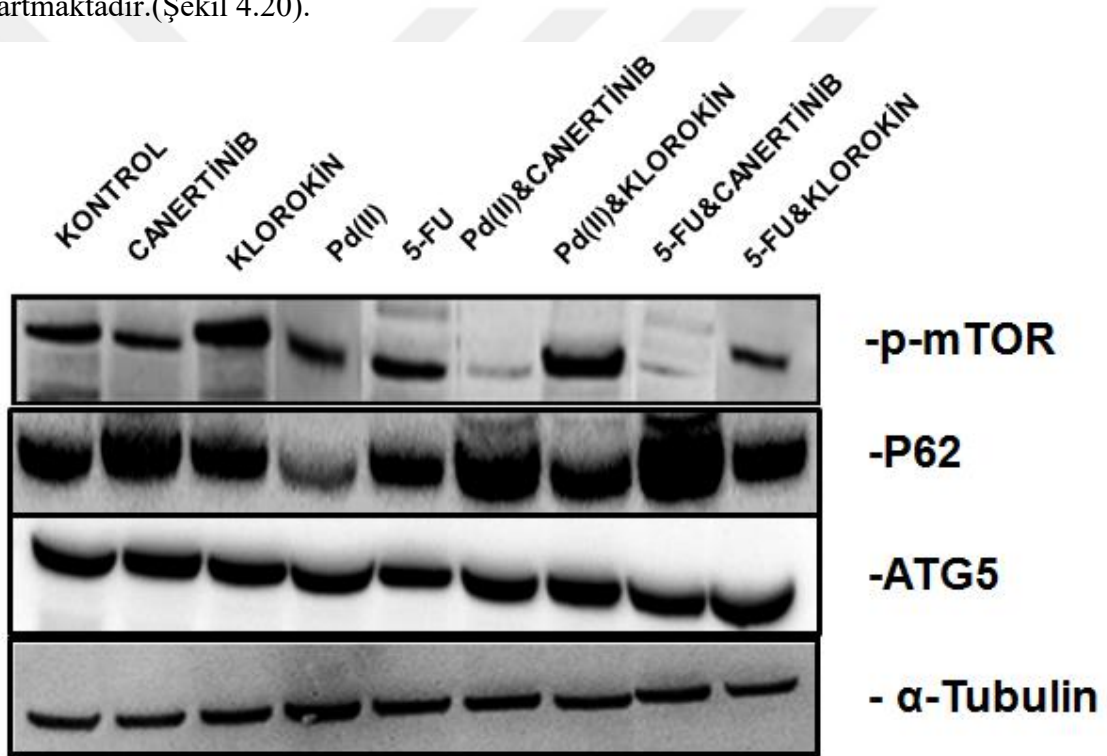
Yapılan literatür çalışmaları sonunda EGFR inhibitörü olan canertinib'in farklı hücre soylarında otofajik aktivitenin artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Canertinibin otofajideki rolünü daha iyi anlayabilmek için sadece bu başlık altında klorokin tek başına ve Pd(II) bileşiği ve 5-FU ile kombinasyonu etkisiyle karşılaştırma yapılabilmesi için kullanıldı. Diğer bir anlamda canertinib için pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bunun için öncelikle klorokin için uygun doz SRB metodu ile belirlendi. HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücrelerine uygulanan klorokinin, 12 ve 24 saat tedavi süresi boyunca hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmalara neden olduğu bulundu ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$). Buna göre otofaji inhibitörü için literatür verileri ve sonuçlarımızla uyumlu olarak toksik olmayan 10 μ M dozu 24 saat ön tedavi uygulanmasına karar verildi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Otofaji inhibitörü uygulanan HCT-15, HT-29, hücre soylarının canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,001$) ifade etmektedir

Daha sonra canertinib bileşiğinin özellikle Pd(II) bileşiği ile kombinasyonunda belirlenen dozlar ile otofajik mekanizma üzerine etkisini belirlemek amacıyla western blot yöntemi ile otofaji de görev alan önemli proteinlere bakıldı. Bu sonuçlara göre göre

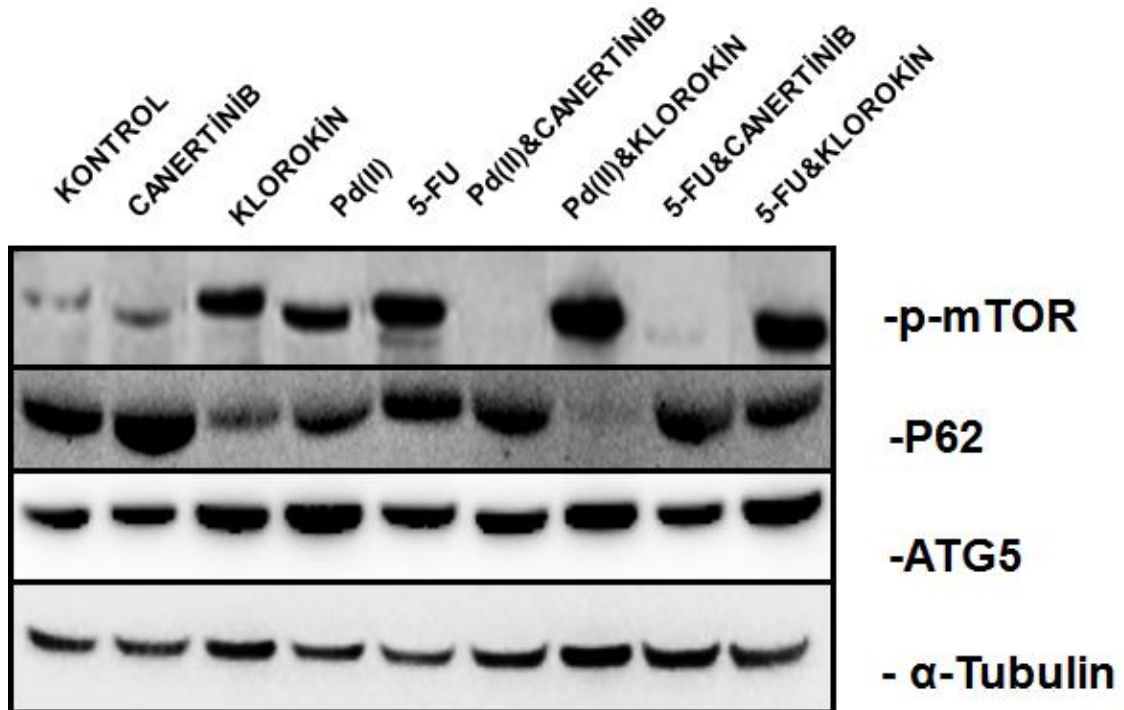
HCT-15 kolon kanser hücrelerinde Pd (II) bileşiği uygulandığında kontrole göre p62 protein seviyesi azalırken canertinib ile kombinasyonunda artış gözlemlendi. 5-FU kemoterapötik ajanı tek başına uygulandığında kontrole göre az da olsa bir azalma gözlenirken, canertinib ile kombinasyonunda protein seviyesinde belirgin bir artış gözlemlendi. Bununla birlikte canertinib tek başına p62 protein seviyesini kontrole göre arttırırken, klorokin uygulandığında az da olsa bir azalma gözlemlendi. Aynı zamanda Pd(II) bileşiği ve 5-FU kemoterapötik ajanının klorokin ile kombinasyonu sonucunda ise p62 protein seviyesinde bariz bir azalma gözlenmektedir. MTOR fosforilasyonu Pd(II), 5-FU ve canertinib tek başına ve canertinib ile kombinasyonlarda azalma gözlenirken, klorokin tek başına ve Pd(II) ve 5-FU kombinasyonlarında artmaktadır.(Şekil 4.20).



Şekil 4.20. HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde, Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubu ve klorokin (10 µM) 24 saat ön tedavi sonrasında, Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat tedavi sonrası grubunda Atg5, p62, mTOR protein ekspresyonlarının western blot yöntemiyle alınan sonuçları

HT-29 kolon kanser hücrelerinde, Pd(II) bileşiği uygulandığında kontrole göre p62 seviyesi önemli ölçüde azalırken, canertinib ile kombinasyonunda Pd(II) bileşiğine göre artış gözlemlendi. 5-FU kemoterapötik ajanı uygulandığında kontrole göre belirgin bir artış

gözlenmezken, canertinib ile kombinasyonunda p62 protein seviyesinde artış gözlemlendi. Buna göre canertinib tek başına uygulandığında kontrole göre p62 protein seviyesinde önemli bir artış gözlenirken klorokin tek başına uygulandığında ise protein seviyesi azaldı. Pd(II) bileşiği klorokin ile kombine edildiğinde protein seviyesi yok denecek kadar azalırken 5-FU ajanının klorokin ile kombinasyonunda ise kontrole göre azalma gözlemlendi. Otofaji belirteçlerinden diğer bir protein olan ATG5 proteininin ifade düzeyi ise canertinib tek başına uygulandığında değişiklik gözlenmezken, klorokin tek başına uygulandığında belirgin bir artış gözlemlendi. Pd(II) bileşiği uygulanması sonrası görülen belirgin ATG5 protein seviyesi artışı canertinib ile kombinasyonunda azalmıştır. 5-FU tek başına uygulandığında ATG5 ifade düzeyinde değişiklik gözlenmezken, canertinib ile kombinasyonunda azalma gözlemlendi. Hem 5-FU hem de Pd(II) bileşiğinin klorokin ile kombinasyonunda ise ATG5 protein seviyesi önemli ölçüde artmıştır. mTOR fosforilasyonu klorokin tek başına ve Pd(II), 5-FU ile kombinasyon tedavisinde artarken, Pd(II) tek başına ve canertinib ile kombinasyonunda azalma gözlemlendi. Fakat 5-FU tek başına uygulandığında HT-29 hücrelerinde mTOR fosforilasyonunu arttırırken, canertinib ile kombinasyonu azalmasına neden olmuştur (Şekil 4.21).

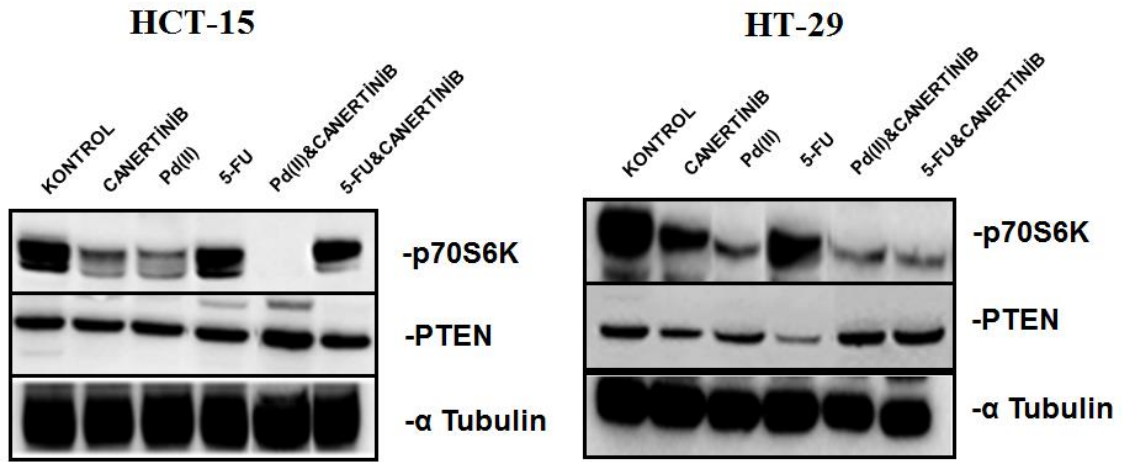


Şekil 4.21. HT-29 kolon kanseri hücrelerinde, Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubu ve klorokin (10 µM) 24 saat ön tedavi sonrasında, Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8

μM) 24 saat tedavi sonrası grubunda Atg5, p62, protein ekspresyonlarının Western blot yöntemiyle alınan sonuçları

Aynı zamanda HCT-15 ve HT-29 hücrelerinde p70S6K ve PTEN ekspresyon seviyelerine western blot ile bakıldı. Buna göre HCT-15 hücrelerinde canertinib ve Pd(II) tek başına uygulandığında p70S6K ifade düzeyi kontrole kıyasla azalırken, Pd(II) ve canertinib kombinasyonunun ekspresyon seviyeleri daha da azaldı. 5-FU tek başına ve canertinib ile kombinasyonunda ise belirgin bir değişim gözlenmedi. PTEN ekspresyonunun ise Pd(II) ve canertinib kombinasyonunda önemli ölçüde arttığı bulundu. Fakat diğer tedavi gruplarında ekspresyon seviyelerinde değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.22).

HT-29 hücrelerinde ise canertinib ve Pd(II) bileşiği tek başına uygulandığında p70S6K protein seviyesi kontrole kıyasla azalırken, 5-FU tek başına tedavisinde diğer tedavi gruplarına göre daha fazla bir ekspresyon seviyesi gözlemlendi. Kombinasyon tedavilerinde ise P70S6K ekspresyon seviyesinin önemli derecede azaldığı bulundu. PTEN ekspresyon seviyesi canertinib ve Pd(II) bileşiği tek başına uygulandığında kontrole kıyasla değişmezken, 5-FU tek başına uygulandığında azalmıştır. Kombinasyon tedavilerinde ise PTEN ifade düzeyinde kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlendi (Şekil 4.22).

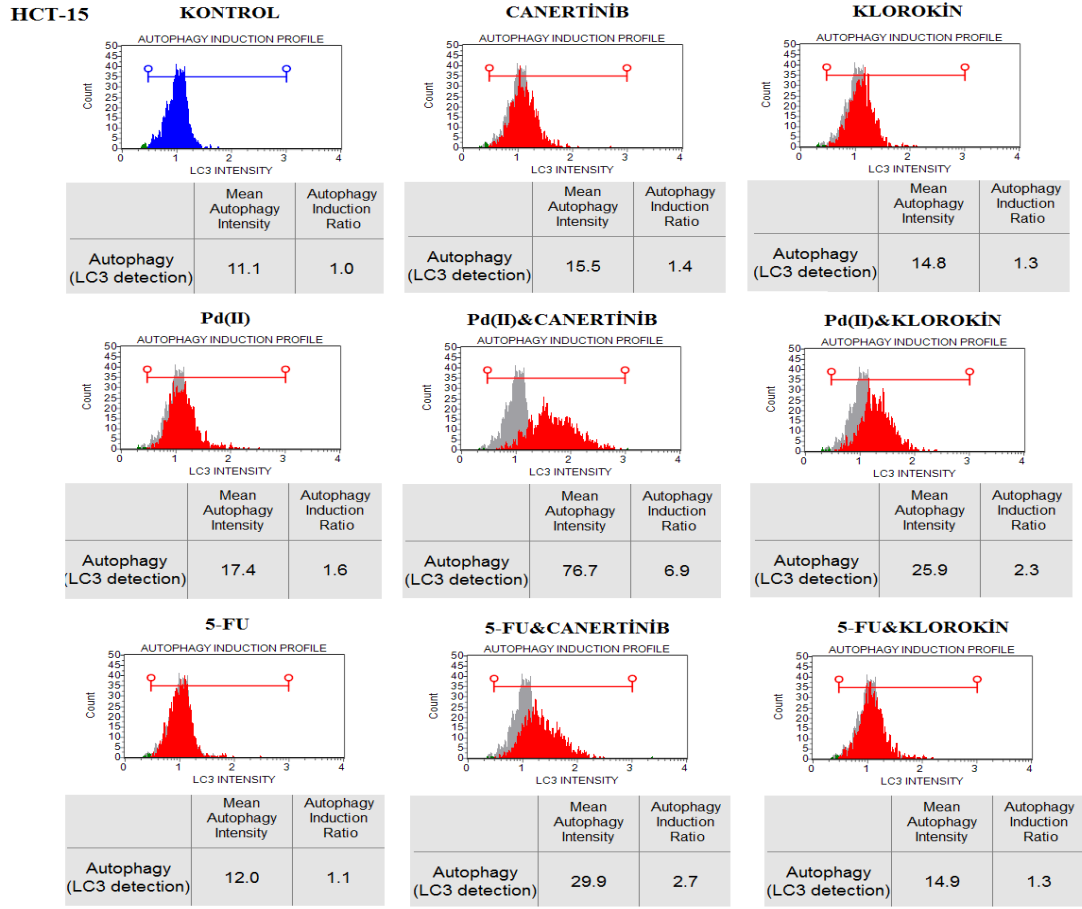


Şekil 4.22. HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücre soyunda EGFR inhibitörü uygulanmasının Pd(II) bileşiği ve 5-FU ajanının p70s6K ve PTEN proteinleri üzerine etkisinin incelenmesi

Otofajik belirteçlerin taranmasına yönelik olarak yapılan akım sitometrisinde önemli bir otofaji proteini olan LC3-II ifadesine bakıldı. Şekil 4.23.1 de görülen sonuçlara göre HCT-15 hücrelerinde klorokin ve canertinib tedavisi uygulamasının kontrole kıyasla otofagozom yapısında görev alan LC3-II proteini ifadesinde önemli bir değişiklik saptanmadı (kontrol LC3-II ifadesi: 11,1; canertinib LC3-II ifadesi: 15,5; klorokin LC3-

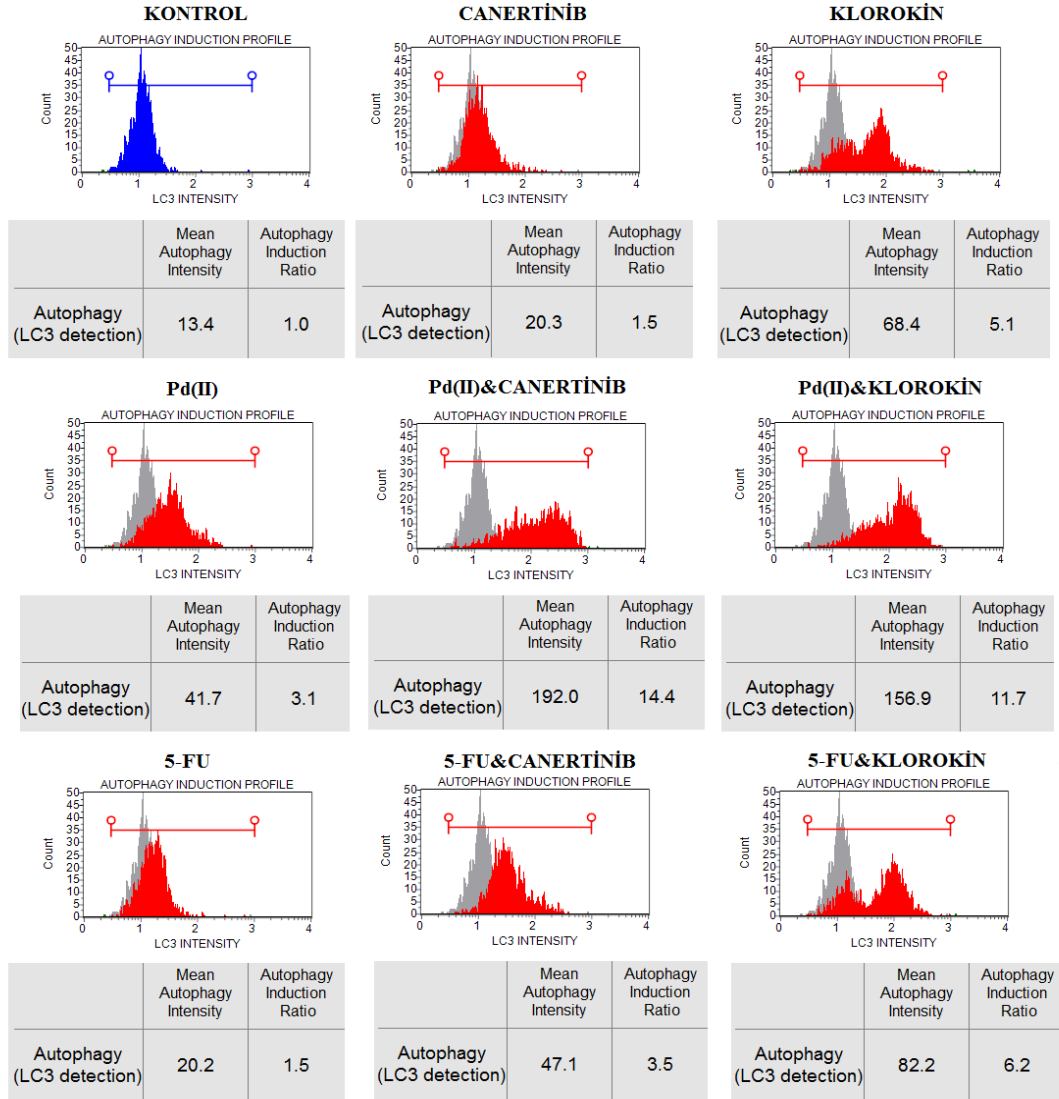
II ifadesi: 14,8). Fakat Pd(II) bileşiminin canertinib ve klorokin ile kombinasyonunda önceli derecede LC3-II ifadesi artmıştır (Pd(II) bileşimi LC3-II ifadesi: 17,4; Pd(II) bileşimi ve canertinib kombinasyonu LC3-II ifadesi: 76,7; Pd(II) bileşimi ve klorokin kombinasyonu LC3-II ifadesi: 25,9). 5-FU kemoterapötik ajanında ise tek başına tedavisine göre canertinib ve klorokin tedavisinde LC3-II seviyelerinde önemli artış gözlemlendi (5-FU LC3-II ifadesi: 12, 5-FU ve canertinib kombinasyonun LC3-II ifadesi: 29,9, 5-FU ve klorokin kombinasyonun LC3-II ifadesi: 14,9).

HT-29 hücrelerinde ise Pd (II) bileşiminin tek başına tedavisinin kontrole kıyasla LC3-II proteini ifadesinin arttırdığı görüldü (kontrol LC3-II ifadesi: 13,4; Pd (II) bileşimi LC3-II ifadesi: 41,7). Pd (II) bileşiminin canertinib ile kombinasyonu sonucu kontrole ve Pd(II) bileşimine kıyasla LC3-II proteini ifadesinin önemli derecede arttığı görüldü (Pd (II) bileşimi ve canertinib kombinasyonu LC3-II ifadesi: 192). Bununla birlikte Pd(II) bileşiminin klorokin ile kombinasyonunda da aynı şekilde artış gözlemlendi (Pd (II) bileşimi ve klorokin kombinasyonu LC3-II ifadesi 156,9) pozitif kontrol grubu 5-FU tek başına LC3-II ifadesi üzerine önemli bir etkisi olmazken canertinib ve klorokin ile kombinasyonunda önemli derecede artış gözlemlendi (5-FU ajanının LC3-II ifadesi: 20,2, 5-FU ve canertinib kombinasyonun LC3-II ifadesi: 47,1, 5-FU ve klorokin kombinasyonun LC3-II ifadesi: 83,4 (Şekil 4.23.2).



Şekil 4.23.1. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) İle kombinasyonu ve CQ 24 saat ön tedavi sonrası Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde LC3-II ifadesinin histogramı.

HT-29

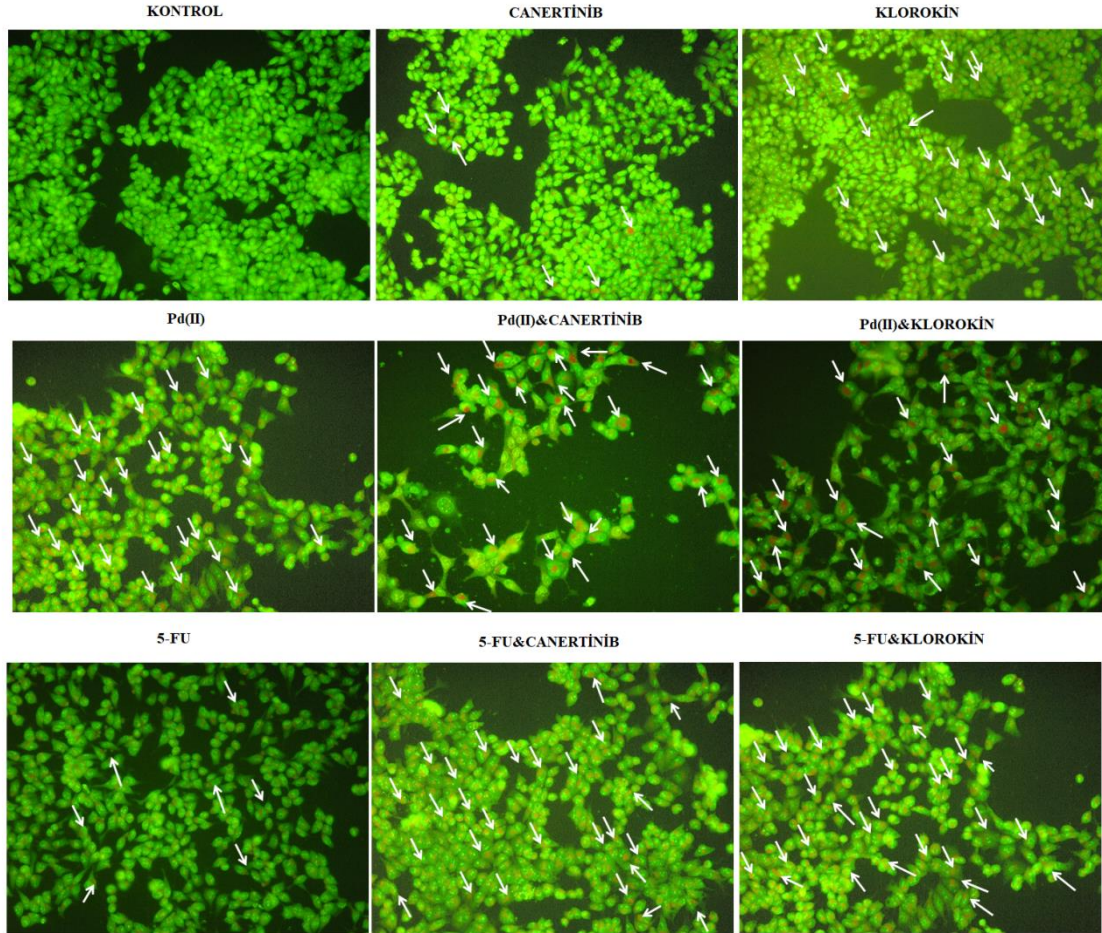


Şekil 4.23.2. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) İle kombinasyonu ve CQ 24 saat ön tedavi sonrası Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HT-29 kolon kanseri hücrelerinde LC3-II ifadesinin histogramı.

Otofajik düzenlenmenin son evresi otofajik veziküllerin lizozomlar ile birleşerek otolizozomları oluşturma evresi olduğu için hücre içi toplam lizozom etkinliğinin artmasına yönelik olarak akridin turuncu ile boyama gerçekleştirildi.

HCT-15 kanser hücrelerine Pd(II) bileşiği, klorokin tek başına uygulandığında aktif lizozomlarda artış gözlemlendi. Fakat canertinib tek başına ve Pd(II) bileşiğinin canertinib ile kombinasyonunun turuncu renkli lizozomal vesiküllerde azalmaya neden olduğu görüldü. Bununla beraber Pd(II) bileşiğinin klorokin kombinasyonunda da aktif lizozomlarda artış gözlemlendi. Ayrıca 5-FU kemoterapötik ajanının tek başına tedavisi

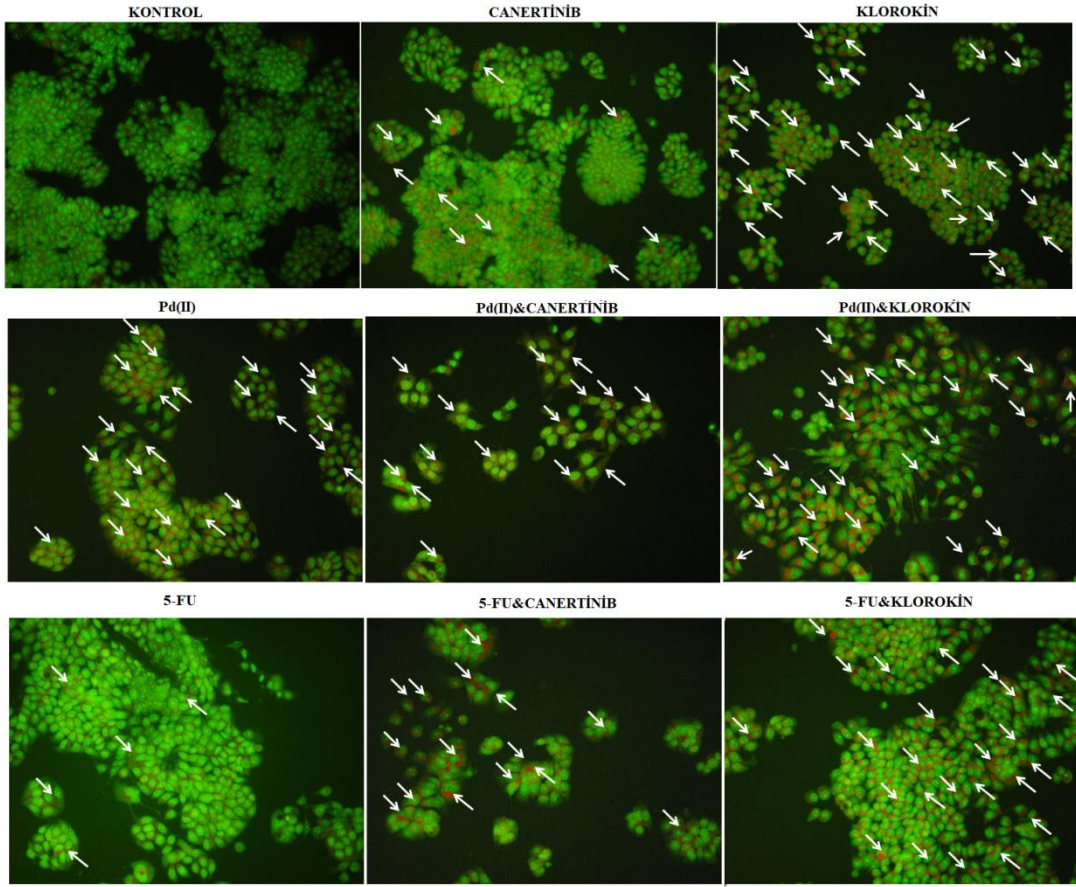
turuncu renkli lizozomları arttırırken canertinib ile kombinasyonunda azalma, klorokin ile kombinasyonunda ise daha da fazla lizozomal veziküllerde artış gözlemlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Pd (II) bileşiği (12,5 μ M) ve 5-FU (10,8 μ M) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 μ M) ile 24 saat tedavi sonrası grubu ve klorokin (10 μ M) 24 saat ön tedavi sonrasında, Pd (II) bileşiği (12,5 μ M) ve 5-FU (10,8 μ M) 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde akridin boyama sonuçlarının floresan mikroskop görüntüleri

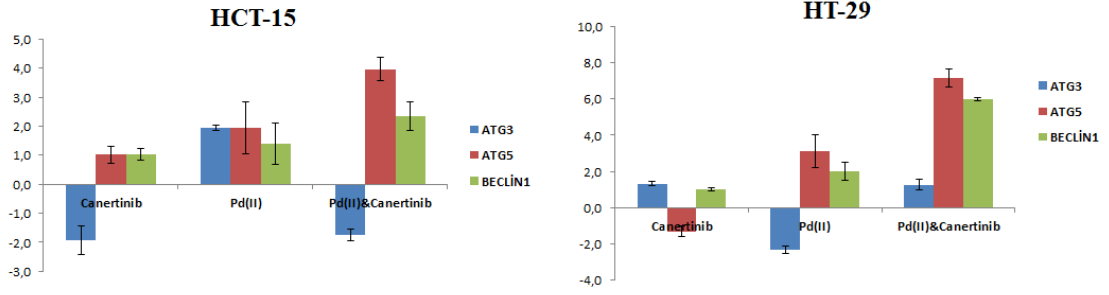
HT-29 kanser hücrelerine Pd(II) bileşiği, klorokin tek başına uygulandığında hücrelerde aktif lizozomlarda artış gözlemlendi. Canertinib tek başına tedavisi ise turuncu renkli lizozomların azalmasına neden oldu. 5-FU kemoterapötik ajanı ise kontrole benzer bir model gösterdi Bununla birlikte Pd(II) bileşiğinin canertinib ile kombinasyonu aktif lizozomlarda azalmaya neden olurken 5-FU ajanının canertinib ile kombinasyonu kontrole göre önemli bir değişim göstermedi. Pd(II) bileşiği ve 5-FU ajanının klorokin

ile kombinasyonu ise turuncu renkli lizozomal vesiküllerde artışa neden olduğu görüldü. (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Pd (II) bileşiği (12,5 μ M) ve 5-FU (10,8 μ M) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 μ M) ile 24 saat tedavi sonrası grubu ve klorokin (10 μ M) 24 saat ön tedavi sonrasında, Pd (II) bileşiği (12,5 μ M) ve 5-FU (10,8 μ M) 24 saat tedavi sonrası grubunun HT-29 kolon kanseri hücrelerinde akridin boyama sonuçlarının floresan mikroskop görüntüleri

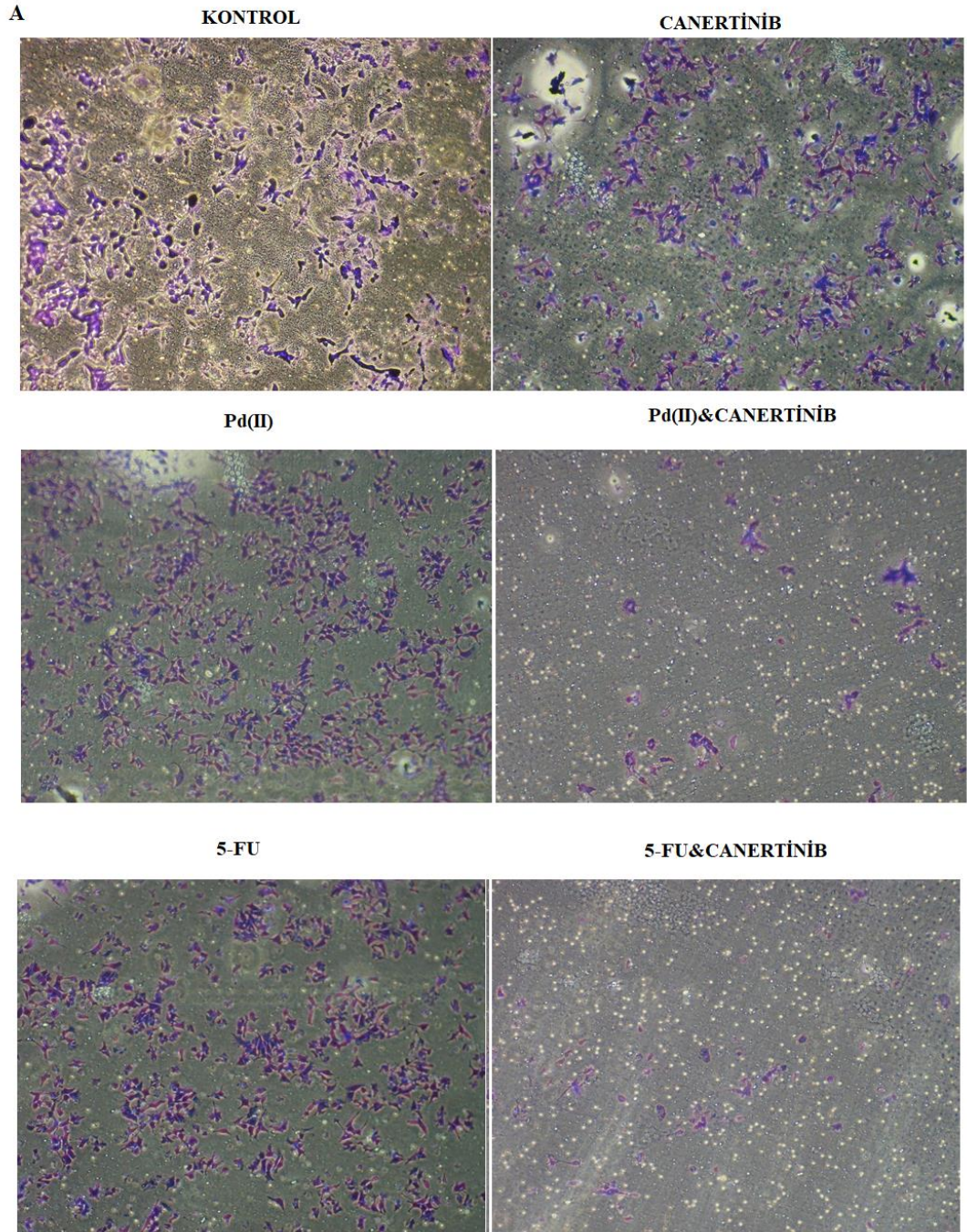
Ayrıca gen sonuçları ile de western ve boyama sonuçları desteklendi. HCT-15 kolon kanser hücresinde canertinib tek başına otofaji ilişkili genlerin ekspresyonunda azalmaya neden olurken Pd(II) bileşiği tek başına tüm genlerde artışa neden oldu. Bununla birlikte iki bileşiğin kombinasyonu da aynı şekilde gen ekspresyonlarında azalmaya neden oldu. HT-29 kanser hücrelerinde ise canertinib tedavisi ATG5 ve BECLİN1 gen ekspresyonunu azaltırken, Pd(II) bileşiğinin arttırdığı görüldü. Her iki bileşiğin kombinasyonu ise canertinib tek başına tedavisine göre birazda olsa arttırdığı fakat Pd(II) bileşiği tek başına tedavisine kıyasla azalttığı gözlemlendi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. HCT-15 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerinde, Pd (II) bileşiği (12,5µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunda Atg3,Atg5, BECLİN1, gen ekspresyonlarının RT-PCR yöntemiyle alınan sonuçları

4.5. Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin HCT-15, HT-29 Hücrelerinin İnvazyon Yetenekleri Üzerine Etkisi

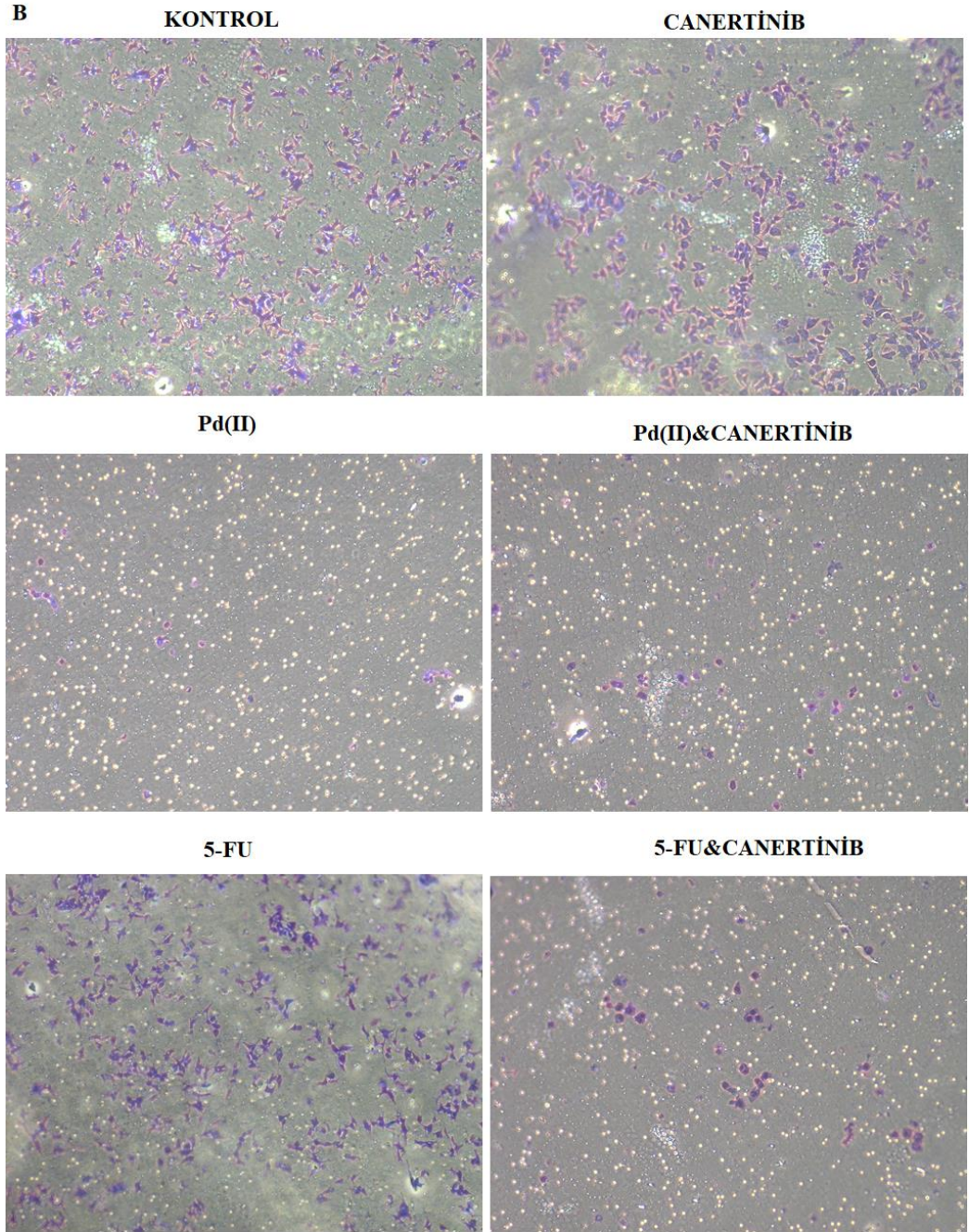
Pd(II) bileşiği ve canertinib ile kombinasyonun otofaji üzerine etkileri gösterildikten sonra bu bileşiklerin hücre invazyonu üzerine etkileri incelendi. HCT-15 kolon kanseri hücre soyunda canertinib tedavisi kontrol ile benzer invazyon yeteneğine sahipken, Pd(II) ve 5-FU ajanının uygulanması invazyonda artışa neden olurken, EGFR inhibisyonunun hücre invazyonunda azalmaya yol açtığı görüldü (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. HCT-15 kolon kanser hücre soyunda Canertinib uygulanmasının Pd(II) bileşiği ve 5-FU ajanı ile kombinasyonunda invazyon yetenekleri üzerine etkisinin incelenmesi

HT-29 kolon kanseri hücre soyunda canertinib tedavisi sonunda kontrole kıyasla artmış hücre invazyonu gözlenirken, Pd(II) bileşiğinin uygulanması invazyonda önemli ölçüde

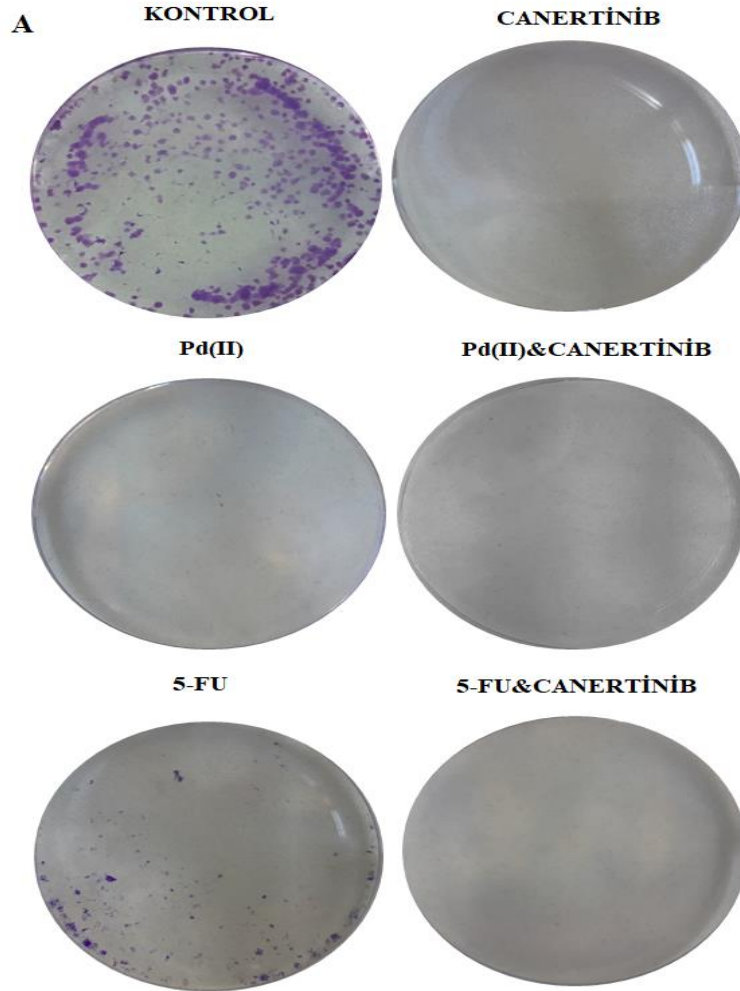
azalmaya neden oldu. Bununla birlikte 5-FU kemoterapötik ajanının kontrol ile benzer invazyon yeteneği gösterdiği bulundu. EGFR inhibisyonunun hücre invazyonunda önemli derecede azalmaya yol açtığı görüldü (Şekil 4.28).

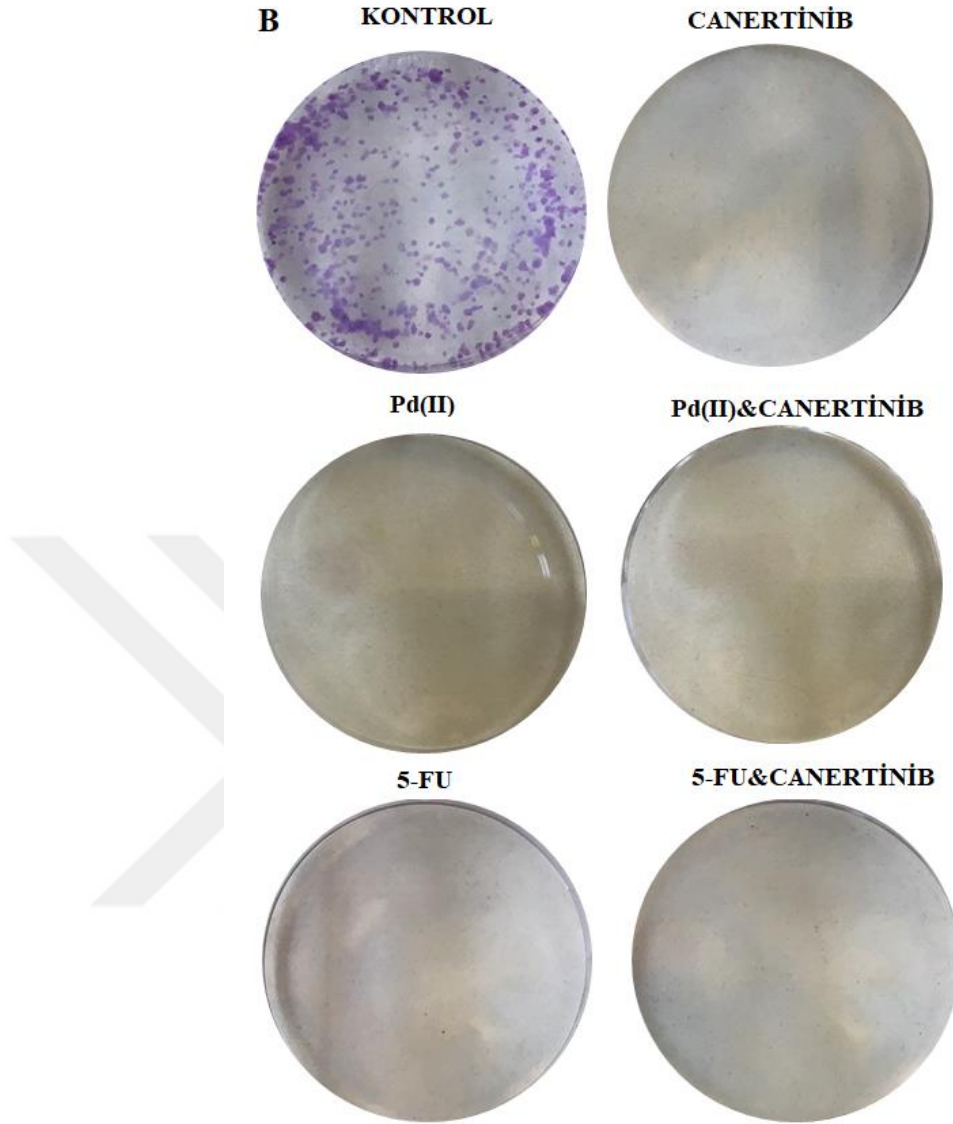


Şekil 4.28. HT-29 kolon kanser hücre soyunda Canertinib uygulanmasının Pd(II) bileşiği ve 5-FU ajanı ile kombinasyonunda invazyon yetenekleri üzerine etkisinin incelenmesi

4.6. Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin HCT-15, HT-29 Hücrelerinin Koloni Oluşturma Yetenekleri Üzerine Etkisi

HCT-15 ve HT-29 kolon kanseri hücre soylarında Pd(II) ve 5-FU bileşikleri ve canertinib ile kombinasyonların invazyon kabiliyetleri üzerine etkisi belirlendikten sonra koloni oluşturma yetenekleri üzerine etkilerine bakıldı. Buna göre HCT-15 hücre soyunda Pd(II) bileşiği ve canertinib ile kombinasyonunda belirlenen dozlarda koloni oluşturma yeteneğini azalttığı görüldü. Aynı zamanda 5-FU uygulanmasında kontrole göre koloni oluşturma yeteneğinde azalma görülürken, canertinib ile kombinasyona tamamen kolonilerin azaldığı görüldü. HT-29 kanser hücre soyunda ise uygulanan tüm bileşik gruplarında koloni oluşturma yeteneğinin yok denecek kadar azaldığı belirlendi (Şekil 4.29).



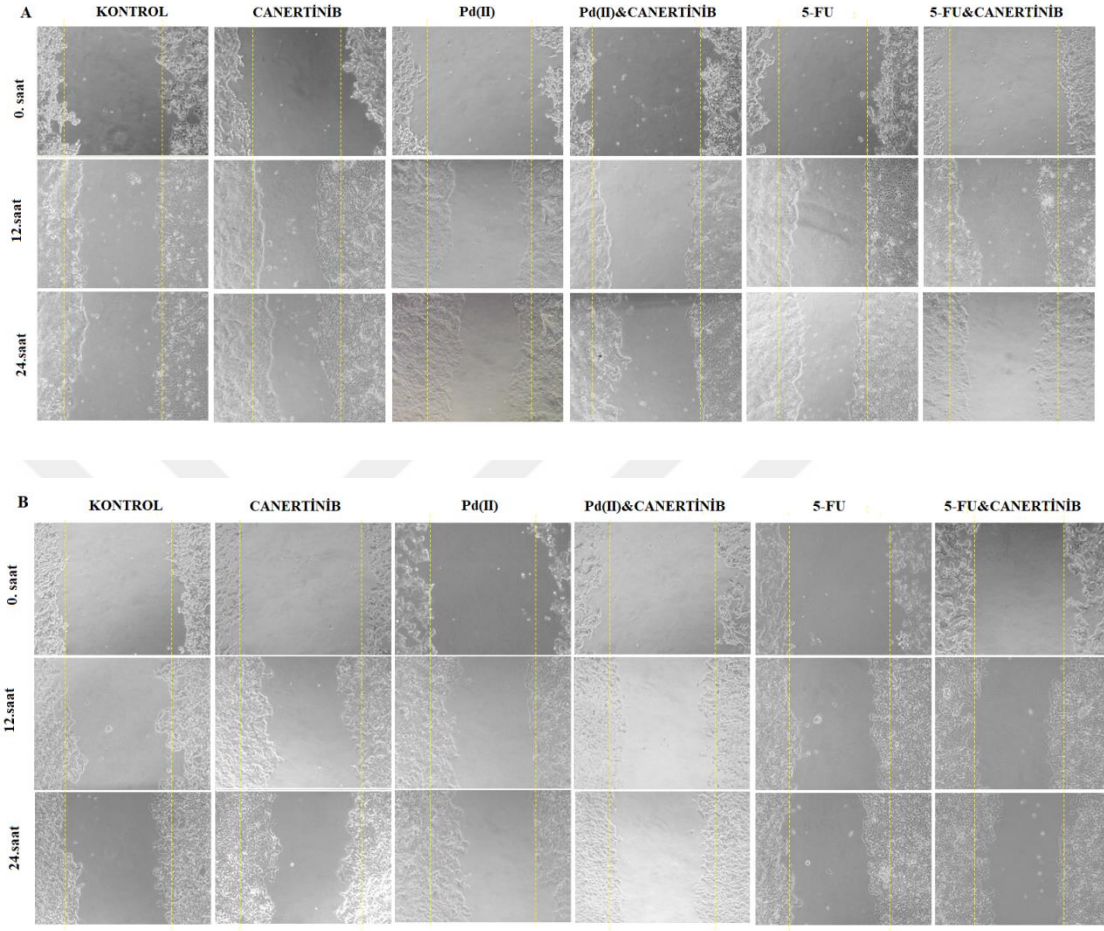


Şekil 4.29. HCT-15 (A) ve HT-29 (B) hücrelerinin canertininib, Pd(II), 5-FU ve bunların canertininib ile kombinasyonlarının uygulaması sonucu koloni oluşturabilme yetenekleri

4.7. Pd(II) ve Canertininib Bileşiklerinin HCT-15, HT-29 Hücrelerinin Göç Etme (Migrasyon) Yetenekleri Üzerine Etkisi

HCT-15 kolon kanseri hücre soyunda Pd(II) ile canertininib ve 5-FU ile canertininib kombinasyonu kontrol ile benzer migrasyon yeteneğine sahipken, Canertininib, Pd(II), 5-FU tek başına uygulanması sonucu migrasyonda kontrole göre 24 saat sonunda belli bir artış görüldü. HT-29 kanser hücresinde, Pd(II), ve Pd(II) bileşiğinin canertininib ile kombinasyon tedavisi ve 5-FU ajanının canertininib ile kombinasyonu hücrelerin migrasyon yeteneği üzerine etki etmezken, kontrol ile benzerlik gösterdi. Bununla

birlikte 5-FU ajanı ve canertinib kontrole kıyasla migrasyonda artışa nedene oldu (Şekil 4.30).

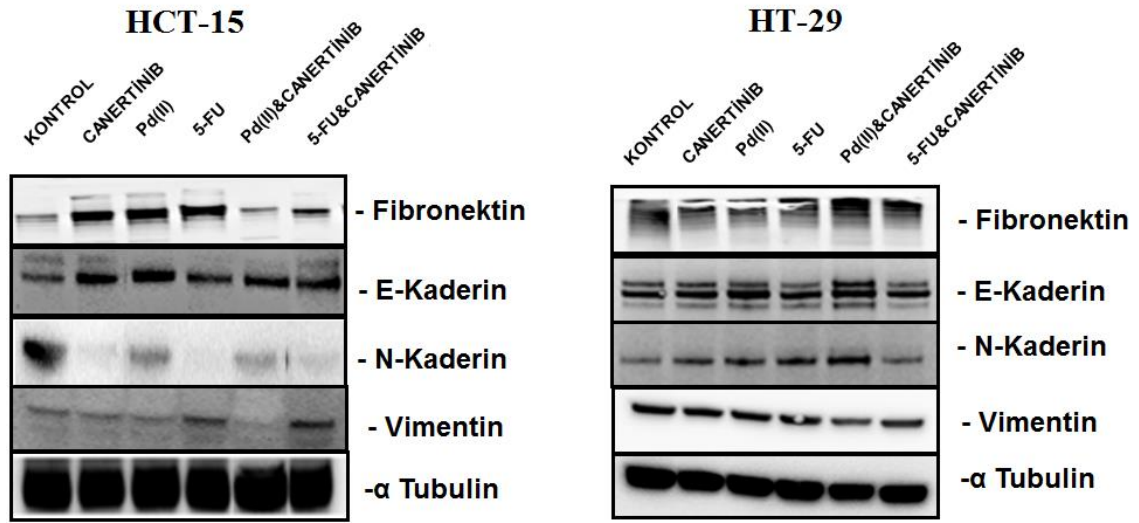


Şekil 4.30. HCT-15 (A), HT-29 (B) kanser hücre soyunda EGFR inhibitörü uygulanmasının Pd(II) bileşiği ve 5-FU ajanının migrasyon yetenekleri üzerine etkisinin incelenmesi

4.8. Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerin HCT-15, HT-29 Hücrelerinde Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMT) Süreci ile İlişkili Proteinler Üzerine Etkisi

EMT, bazal yüzeyi aracılığıyla bazal membran ile etkileşen polarize epitelyal hücrelerin, mezenkimal hücre fenotipi kazanmasını mümkün kılan çoklu biyokimyasal değişikliklere maruz kalmasını sağlayan biyolojik bir süreçtir. Bu biyokimyasal değişiklikler migrasyon, invazyon kapasitesinin artması, apoptoza karşı direnç ve ekstrasellüler matriks bileşenlerinin artması şeklindedir. EMT süreci E-kaderin ekspresyonuna bağlıdır ve EMT sürecine giren hücreler E-kaderin ekspresyonunu downregüle eder. Bu hücre-hücre adhezyon molekülü, epitelyal hücrelerin embriyo ve

yaşlı dokularında bulunan kalsiyum bağımlı transmembran proteindir. Buna göre HCT-15 hücrelerinde Pd(II) bileşiği tek başına E-kaderin ekspresyonunu artırırken, N kaderin ekspresyonu azalmış, Vimentin azalmış fakat Fibronektin ekspresyonu artmıştır. Pd(II) ve canertinib kombinasyonunda, E-kaderin ekspresyonu artarken, N-kaderin, vimentin, fibronekrin ifade düzeyi azalmıştır. Canertinib tek başına aynı şekilde E-kaderin ekspresyonunu artırırken, N-kaderin ve vimentin azalmış, Fibronektin ekspresyonu artmıştır. HT-29 hücrelerinde ise Pd(II) uygulandığında E-kaderin ekspresyonu artarken, N-kaderin ekspresyonu da artmış fakat kontrole kıyasla Fibronektin ve vimentin ifade düzeyi değişmemiştir. Canertinib tek başına tedavisinde E-kaderin ekspresyonu kontrole kıyasla değişmezlen, N-kaderin artmış, fibronektin ve vimentin ekspresyon seviyesi değişmemiştir. Pd(II) ve canertinib kombinasyonunda ise E-kaderin ekspresyon seviyesi artarken N-kaderin de artmış, vimentin azalmış fakat fibronektin ifade düzeyi değişmemiştir (Şekil 4.31).

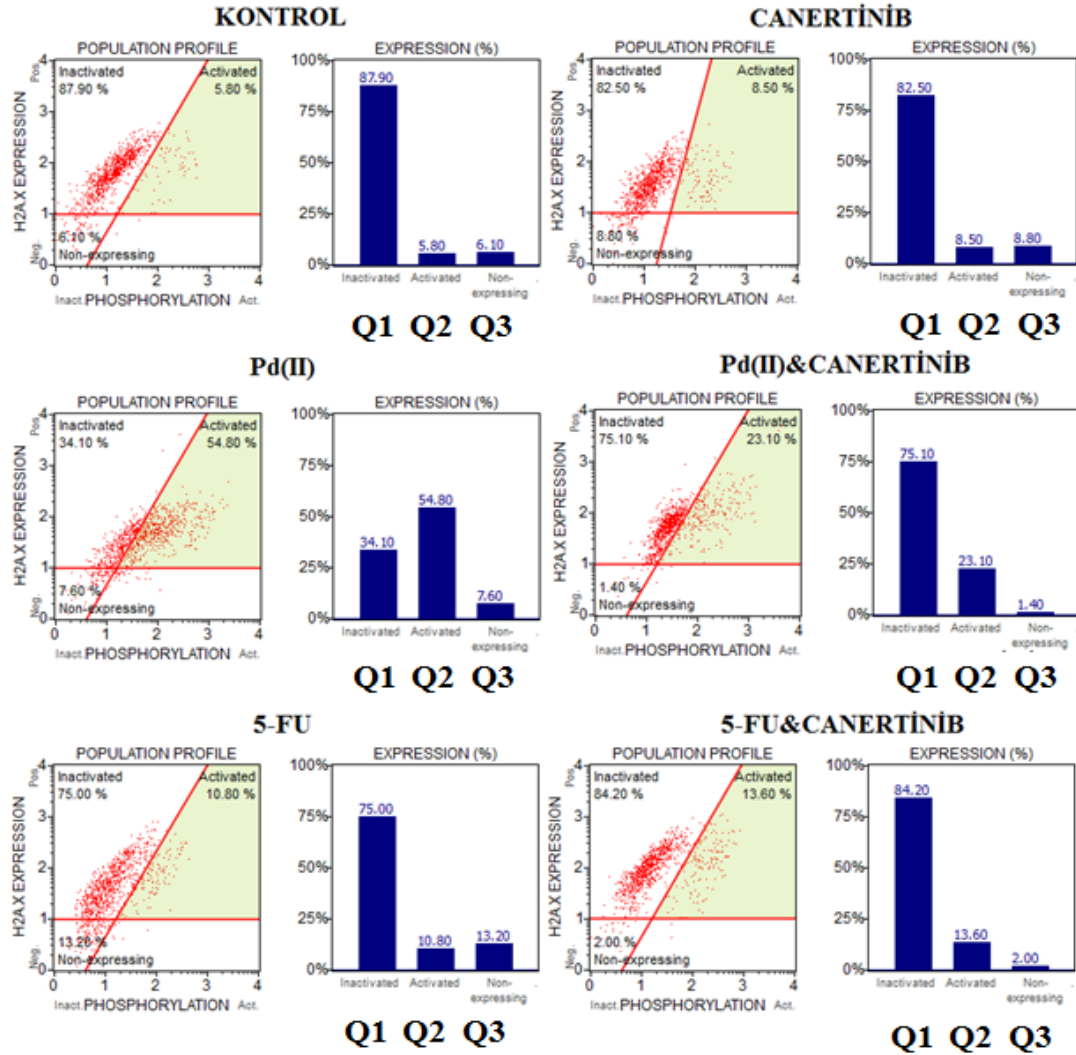


Şekil 4.31. HCT-15 ve HT-29 kanser hücre soyunda EGFR inhibitörü uygulanmasının Pd(II) bileşiği ve 5-FU ajanının EMT proteinleri üzerine etkisinin incelenmesi

4.9. Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin HCT-15, HT-29 Hücrelerinde DNA Hasarı Üzerine Etkisi

γ H2AX'nin ekspresyonu DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir belirteçdir. Akım sitometrisinde p- γ H2AX'nin değerlendirilmesi sonucu Pd (II) bileşiğinin kontrole kıyasla HCT-15 hücrelerinde %54,80 (Q2) DNA hasarına neden olduğu bulundu. canertinib tek başına uygulandığında ise %8,5 (Q2) olarak kaydedildi. Pd (II) bileşiğinin

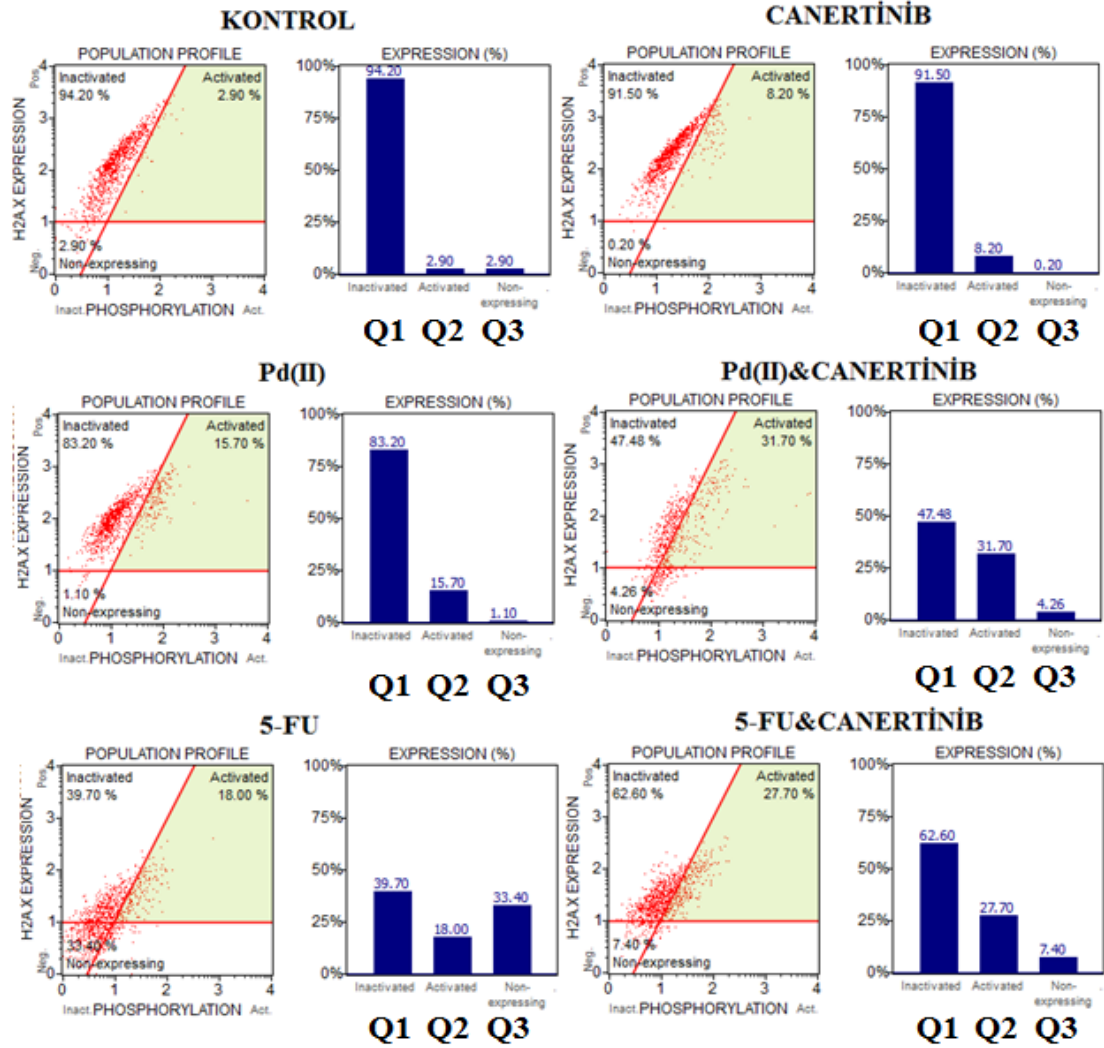
canertinib ile kombine edilmesi sonucu bu hasar %23,10 (Q2) olarak bulundu. Pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU kemoterapötik ajanında DNA hasarı %10,8 (Q2) bulundu. 5-FU ajanının canertinib ile kombinasyonunda bu hasar %13,6 (Q2) bulundu (Şekil 4.32). Sonuç olarak Pd(II) ile kombinasyon tedavisinin HCT-15 hücrelerinde DNA hasarında azalmaya neden olduğu belirlendi.



Şekil 4.32. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15 kolon kanseri hücrelerinde p-γH2AX yüzde değerlerinin histogramı (Q1= γH2AX, Q2= p-γH2AX, Q3= γH2AX ekspres etmeyen)

HT-29 hücrelerinde Pd (II) bileşiğinin %15,70 (Q2) DNA hasarına neden olduğu bulundu. Canertinib tek başına uygulandığında ise %8,20 (Q2) olarak kaydedildi. Pd (II) bileşiğinin canertinib ile kombine edilmesi sonucu bu hasar %31,70 (Q2) olarak

bulundu. Pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU kemoterapötik ajanında DNA hasarı %18 (Q2) bulundu. 5-FU ajanının canertinib ile kombinasyonunda bu hasar %27,70 (Q2) olarak bulundu (Şekil 4.33). Sonuç olarak Pd(II) ile kombinasyon tedavisinin Pd(II) bileşiğine göre HT-29 kolon kanseri hücrelerinde DNA hasarında anlamlı bir artışa neden olduğu belirlendi.

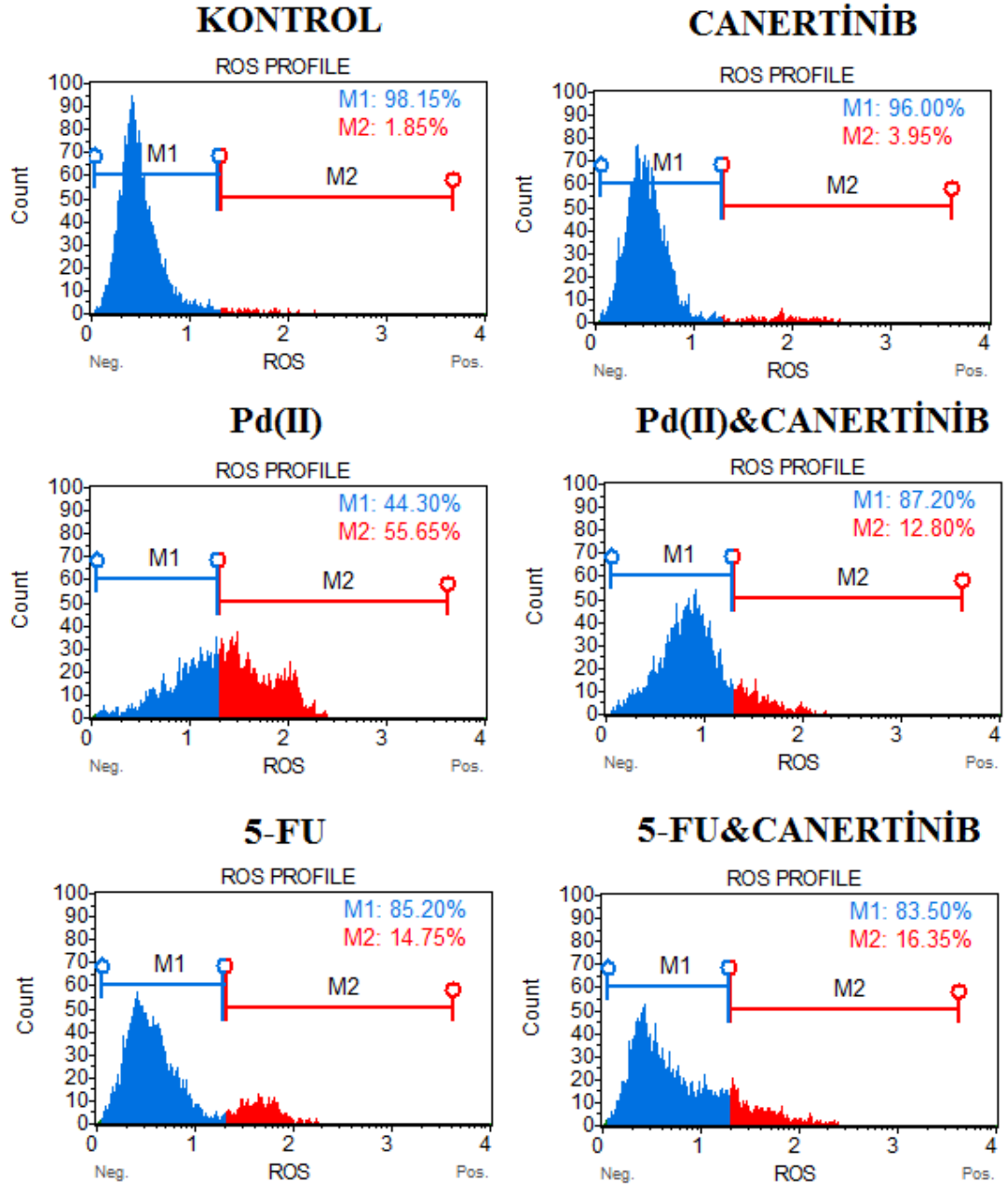


Şekil 4.33. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HT-29 kolon kanseri hücrelerinde p-γH2AX yüzde değerlerinin histogramı (Q1= γH2AX, Q2= p-γH2AX, Q3= γH2AX eksprese etmeyen)

4.10. HCT-15, HT-29 Hücrelerinde Pd(II) ve Canertinib Bileşikleri ile Tedavi Sonucu Oksidatif Stresin (ROS) Belirlenmesi

DNA hasarının ROS kaynaklı olup olmadığını belirlemek için akım sitometrisinde ROS miktarı incelendi (Şekil 4.32). HCT-15 hücrelerinde Pd(II) bileşiğinin canertinib ile kombinasyonunda Pd(II) bileşiğine kıyasla azalma meydana geldi (Pd(II) bileşiği ROS miktarı: %55,65, Pd(II)&canertinib kombinasyonu ROS miktarı: %12,8). Bununla birlikte 5-FU ajanının tek başına ve canertinib ile kombinasyon tedavisinde ROS miktarında önemli bir artış meydana gelmedi (5-FU ROS miktarı: %14,75, 5-FU&canertinib kombinasyonu ROS miktarı: 516,35,) (Şekil 4.34).

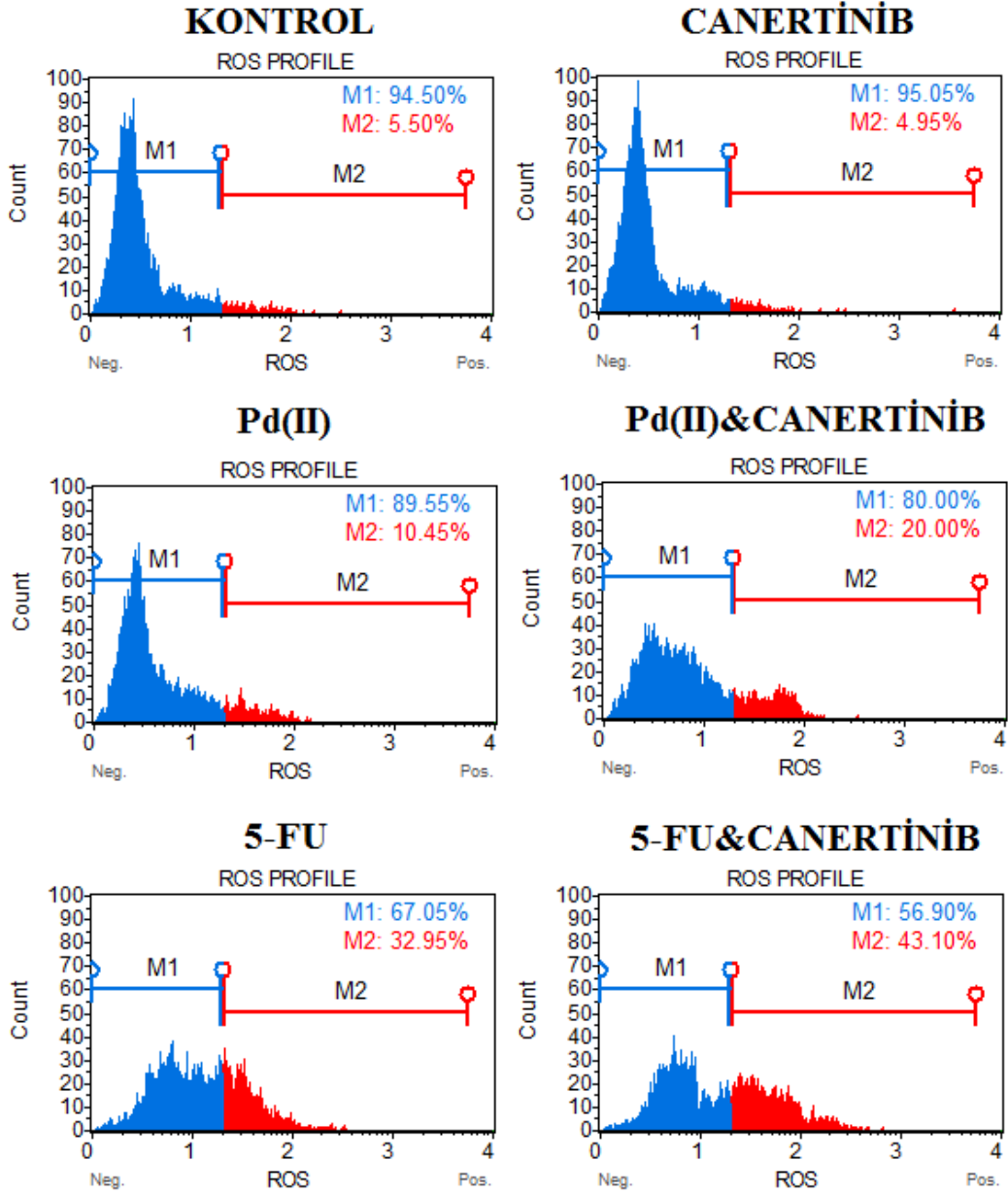




Şekil 4.34. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HCT-15 kolon kanser hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin histogramı. M1: ROS negatif hücreler(-); M2: ROS pozitif hücreler ROS(+)

HT-29 kolon kanser hücrelerinde Pd(II) bileşiğinin canertinib kombinasyon tedavisinde Pd(II) bileşiği tek başına tedavisine göre 2 katlık bir artış görüldü (Canertinib ROS miktarı: 4,95, Pd (II) bileşiği ROS miktarı: %10,45; Pd (II) bileşiği ve canertinib kombinasyonu ROS miktarı: %20). 5-FU kemoterapötik ajanı ile tedavide ise hem kontrole hem de Pd(II) bileşiğine kıyasla anlamlı artış gözlemlendi (5-FU ROS miktarı:

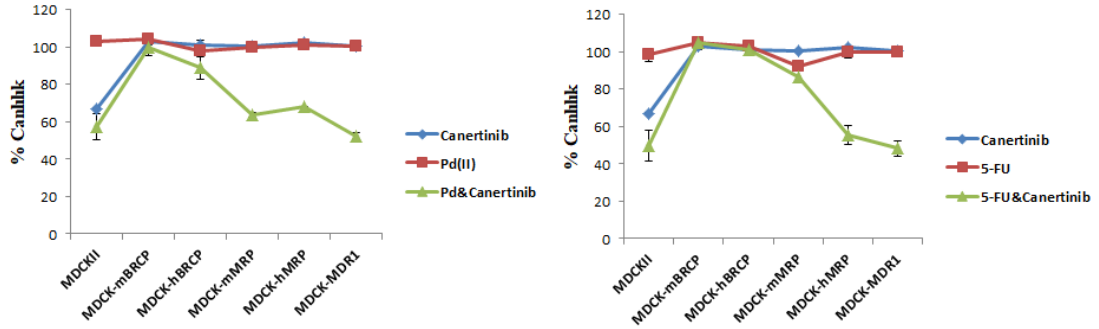
%32,95). Aynı zamanda 5-FU ajanının canertinib ile kombinasyonunda da 5-FU ajanının tek başına tedavisine göre anlamlı artış belirlendi (5-FU&canertinib kombinasyonu ROS artışı:%43,1) (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun HT-29 kolon kanser hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin histogramı. M1: ROS negatif hücreler(-); M2: ROS pozitif hücreler ROS(+)

4.11. Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin İlaç Dirençliliği Üzerine Etkileri

Pd(II) bileşiği, canertinib, 5-FU ajanının, BRCP, MRP ve MDR eksprese eden ve duyarlı hücre soyunda, belli transport genler için substrat ya da inhibitör madde olup olmadıkları yönünde fikir yürütebilmek için in vitro hücre canlılığı testi yapıldı. Genel olarak BRCP, MRP ve MDR'nin substratı olan sitotoksik bileşikler için, dirençli ve duyarlı hücre soylarında farklı sitotoksik aktivite görülür. Böylelikle eğer test edilen bileşik sitotoksik ve duyarlı hücrelere kıyasla dirençli hücrelerde daha az sitotoksik aktivite gösteriyorsa, bu bileşiklerin daha az hücre içi birikime ve daha düşük toksisiteye yol açan BRCP, MRP veya MDR tarafından taşındığı yönünde sonuca varılır. Bu bileşiklerin toksisitelerin değerlendirilmesi için, MDCK, MDCK-BRCP, MDCK-MRP, MDCK-MDR1 hücreleri kullanıldı. Pd(II) bileşiğinin tek başına hücre canlılığı üzerine etkisi görülmezken, canertinib duyarlı hücre soyu MDCK da yaklaşık %50 canlılık gösterdi. Bununla birlikte Pd(II)&canertinib kombinasyonu fare MDCK-BRCP hücresinde etki göstermezken, insan MDCK-BRCP hücre soyunda yaklaşık %70 canlılık gösterdi. Diğer dirençli hücre soyları fare MDCK-MRP, insan MDCK-MRP ve MDCK-MDR1 hücre soyunda ise yaklaşık %50'ye yakın canlılık gösterdi (Şekil 4.36). 5-FU kemoterapötik ajan tek başına bir etki göstermezken, canertinib ile kombinasyonu insan MDCK-MRP ve MDCK-MDR1 dirençli hücre soyunda duyarlı hücre soyu kadar canlılık yani %50'ye varan canlılık gösterdi (Şekil 4.36). Bu sonuçlara dayanarak özellikle Pd(II) ve 5-FU ajanının canertinib ile kombinasyonun MRP ve MDR taşıyıcılar için substratı/inhibitörü olup olmadığı yönünde kesin bir çıkarım yapılamasa da bu ajanların özellikle MRP ve MDR1 taşıyıcılarının neden olduğu ilaç dirençliliğinin üstesinden gelme yetenekleri olduğu yönünde yorum yapıldı. Düşük dozlar da dahil bu bileşiklerin direnci tersine çevirebilme yeteneğine sahip olduğu gösterildi.

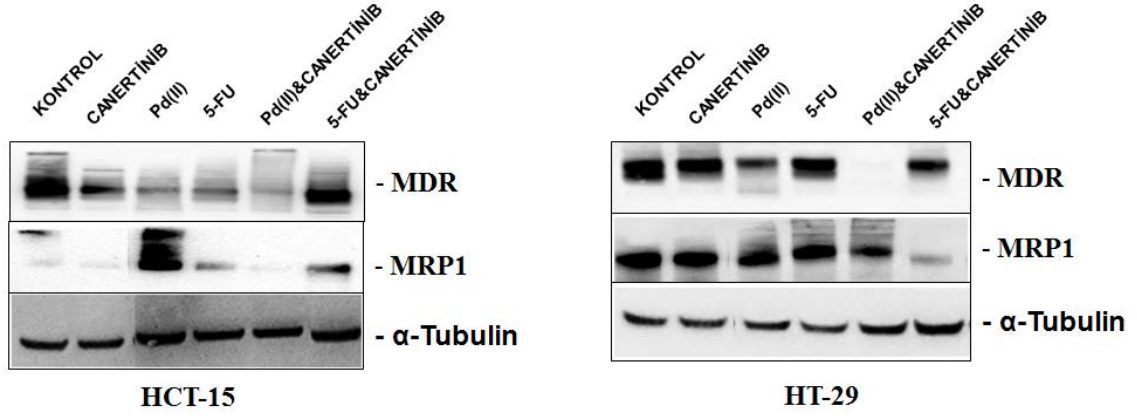


Şekil 4.36. Pd(II) bileşiği (12,5 μ M) ve 5-FU (10,8 μ M) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 μ M) ile 24 saat tedavi sonrası grubu ve klorokin (10 μ M) 24 saat ön tedavi sonrasında, Pd(II) bileşiği (12,5 μ M) ve 5-FU (10,8 μ M) 24 saat tedavi sonrası grubunun MDCK dirençli ve duyarlı hücreler üzerine etkisinin SRB yöntemi ile belirlenmesi

Ayrıca ilaç dirençliliğinde rol olan taşıyıcı moleküllerden biri olan MRP1 ve MDR'nin ekspresyon seviyesi HCT-15, HT-29 kanser hücrelerinde western blot ile bakıldı. Bu amaçla HCT-15, HT-29 hücrelerine Pd (II) bileşiğinin 12,5 μ M, Canertinib 5 μ M ve 5-FU 10,8 μ M dozu ve bunların kombinasyon dozları uygulandı. Buna göre MRP ekspresyon seviyesi HCT-15 kanser hücrelerine Pd(II) bileşiği uygulandığında kontrole kıyasla MRP1 protein ekspresyonu artarken, canertinib ile kombinasyonda değişim gözlenmedi. 5-FU kemoterapötik ajanı tek başına uygulandığında kontrole kıyasla hafif bir artış gözlenirken, canertinib ile kombinasyonunda MRP1 proteinin ifade düzeyinin daha da arttığı gözlemlendi. MDR ekspresyon seviyeleri ise canertinib, Pd(II) ve 5-FU bileşiği tek başına uygulandığında ve Pd(II)&canertinib kombinasyonunda kontrole kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlendi. Fakat 5-FU ve canertinib kombinasyonunda MDR protein ekspresyon seviyesi kontrole göre değişmemiştir (Şekil 4.37).

HT-29 kanser hücresinde ise tek başına uygulanan canertinib, ve Pd(II) bileşiği MRP1 protein ekspresyon düzeyinin değişmesine neden olmazken 5-FU tek başına protein ifade düzeyinde hafif azalmaya neden oldu. Bununla birlikte 5-FU ve Pd(II) bileşiğinin canertinib ile kombinasyon tedavi grubunda belirgin bir azalma MRP1 protein seviyesinde gözlemlendi. MDR protein ekspresyonu ise Pd(II) bileşiği tek başına ve canertinib ile kombinasyonunda anlamlı bir şekilde azalırken, canertinib ve 5-FU tek başına uygulandığında MDR protein ifade düzeyinde kontrole kıyasla bir değişim

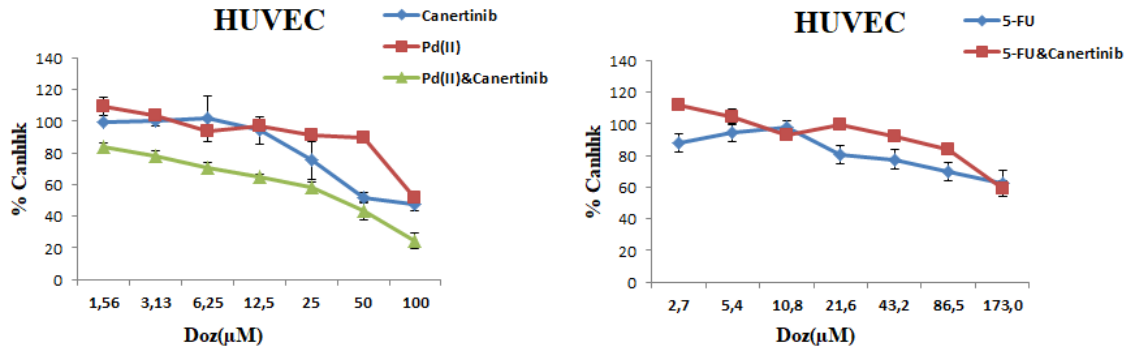
gözlenmedi. Fakat 5-FU&canertinib kombinasyonunda MDR ifade düzeyinin kontrole kıyasla azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. Pd(II) bileşiği (12,5µM) ve 5-FU (10,8 µM) 24 saat ön tedavi sonrası Canertinib (5 µM) ile 24 saat tedavi sonrası grubunun MRP1, MDR protein ekspresyon seviyesi üzerine etkisinin HCT-15 ve HT-29 kanser hücrelerinde western blot yöntemi ile belirlenmesi

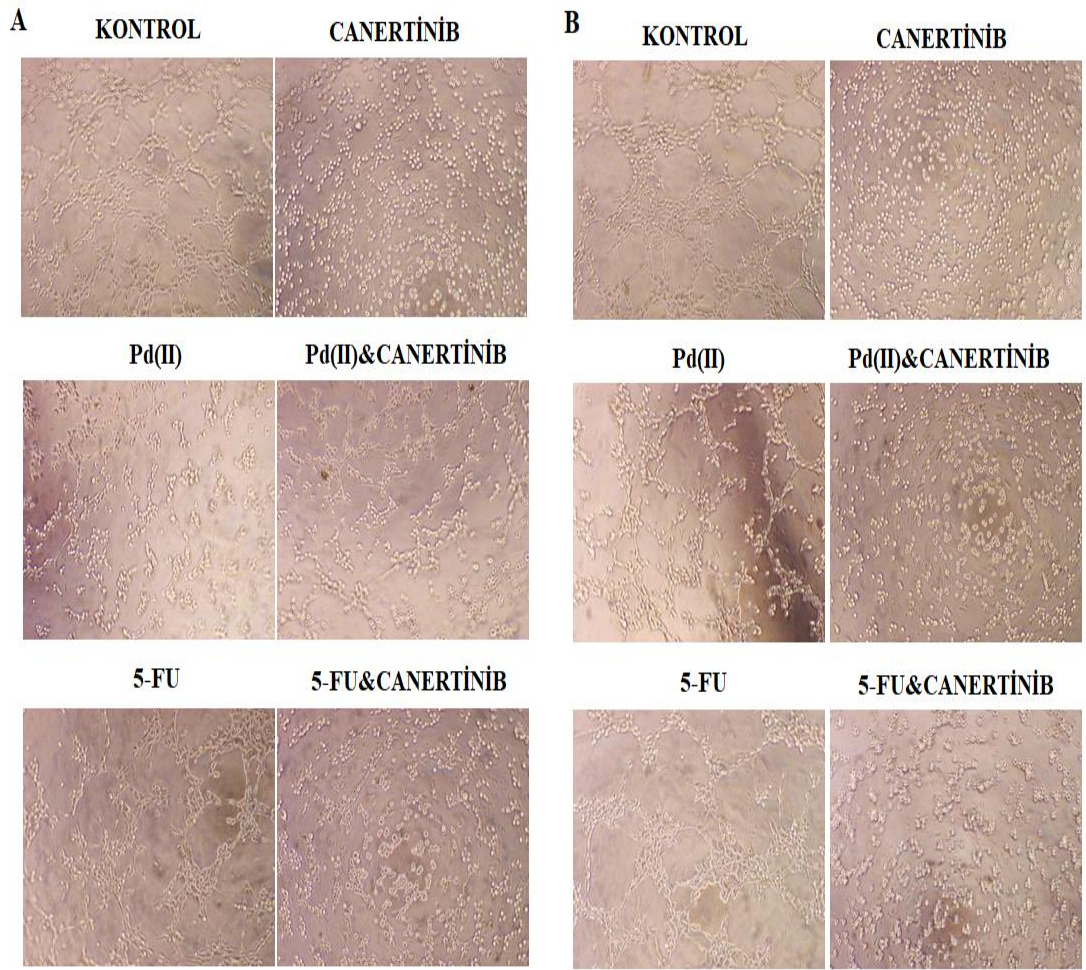
4.12. HCT-15, HT-29 Hücrelerinde Pd(II) ve Canertinib Bileşiklerinin Anjiyogenez Üzerine Etkileri

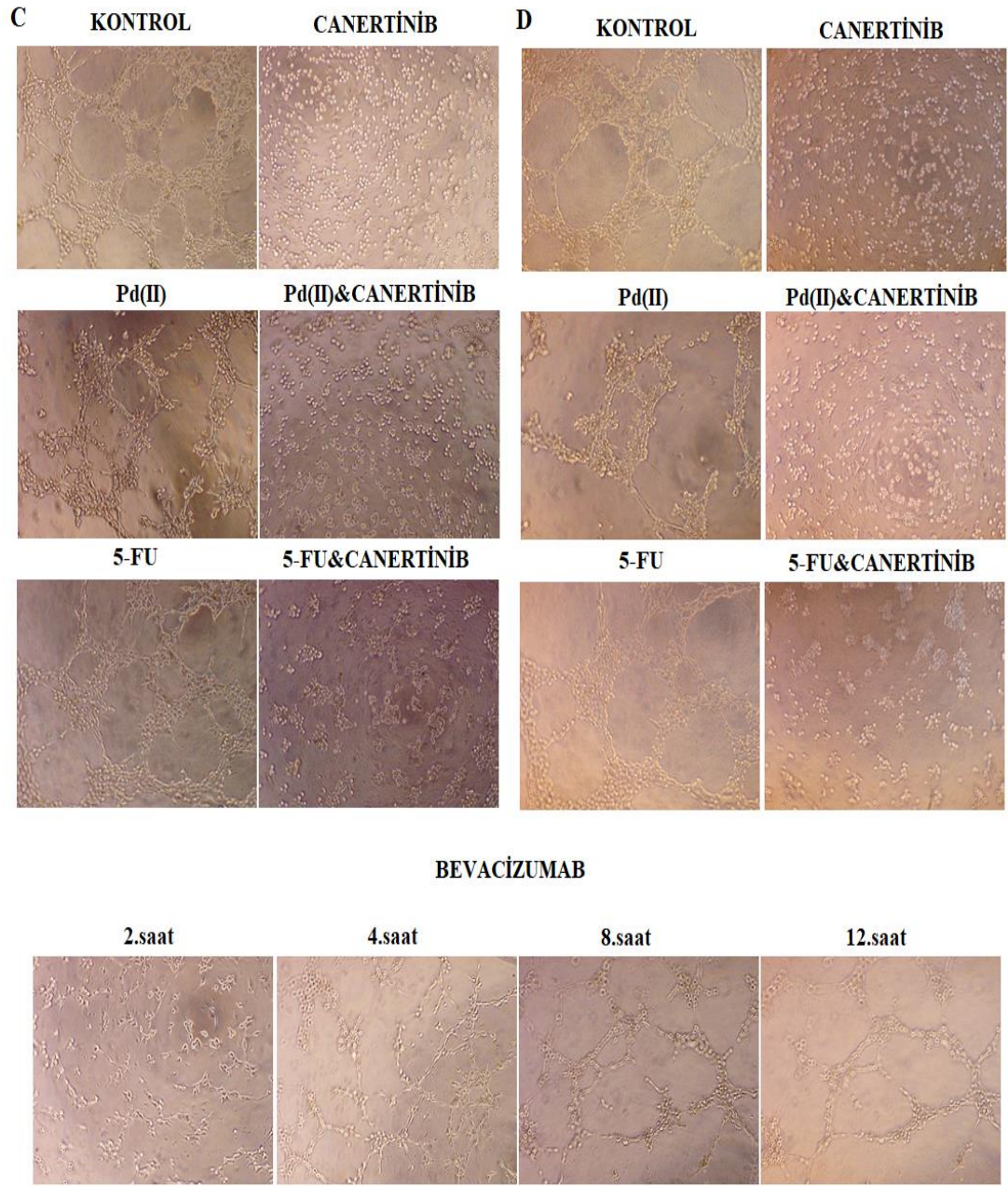
Kanserde anjiyogenez hastalığın ilerlemesinde son derece önemli bir süreçtir. Anjiyogenezi baskılayarak tümörlerin gerilemesini sağlamaya yönelik tedavi yaklaşımları üzerinde uzun zamandan beri araştırmalar devam etmektedir. Buna göre bu çalışma da öncelikle HUVEC hücrelerinde canertinib, Pd(II) ve 5-FU tek başına tedavi grubu, Pd(II) doz cevap tedavi grubunun canertinib ile kombinasyonu ve aynı şekilde 5-FU doz cevap tedavi grubunun canertinib ile kombinasyonu şeklinde tedavi grupları oluşturuldu ve SRB yöntemi ile canlılık tespit edildi. Elde edilen sonuçlara göre her bir bileşik için, in-vivo CAM çalışması ve in-vitro tüp oluşum testi için uygun doz belirlendi (Şekil 4.38). Buna göre tüp oluşum testi için canertinib için 6,25 µM, Pd(II) bileşiği için 50 µM, 5-FU için 86,5 µM dozları seçildi.



Şekil 4.38. Canertinib (1,56-100 µM), Pd(II) bileşiği (1,56-100 µM) ve kombinasyonları ve 5-FU (2,7-173µM) ve kombinasyon dozlarının HUVEC hücrelerinin canlılığa etkisinin doza bağlı olarak değişiminin SRB canlılık metodu ile belirlenmesi

Dozlar belirlendikten sonra tüp oluşum testi için öncelikle kuyular matrijel ile kaplandıktan sonra $1,5 \times 10^4$ hücre kuyulara ekildi ve belirlenen dozlarda 2-4-8-12 saat olmak üzere tüp oluşumu faz mikroskopu altında görüntülendi. HUVEC hücrelerinde uygulanan canertinib'in tüm saatlerde hücrenin tüp oluşturmasını engellediği görüldü. Tek başına canertinib tedavisi tüp oluşumunu engellediği gibi Pd(II) ve 5-FU ajanı ile kombinasyonunda da aynı etkiyi gösterdi. Bunun dışında Pd(II) bileşiği tek başına kontrole kıyasla tüp oluşumunu önemli ölçüde bozduğu gibi pozitif kontrol olarak kullanılan bevacizumab'a benzer bir model sergiledi. Bunun dışında 5-FU tek başına 12. Saatin sonunda dahi kontrole benzerlik gösterirken, pozitif kontrol olarak kullanılan bevacizumab'a kıyasla etki anlamlı değildir (Şekil 4.39).





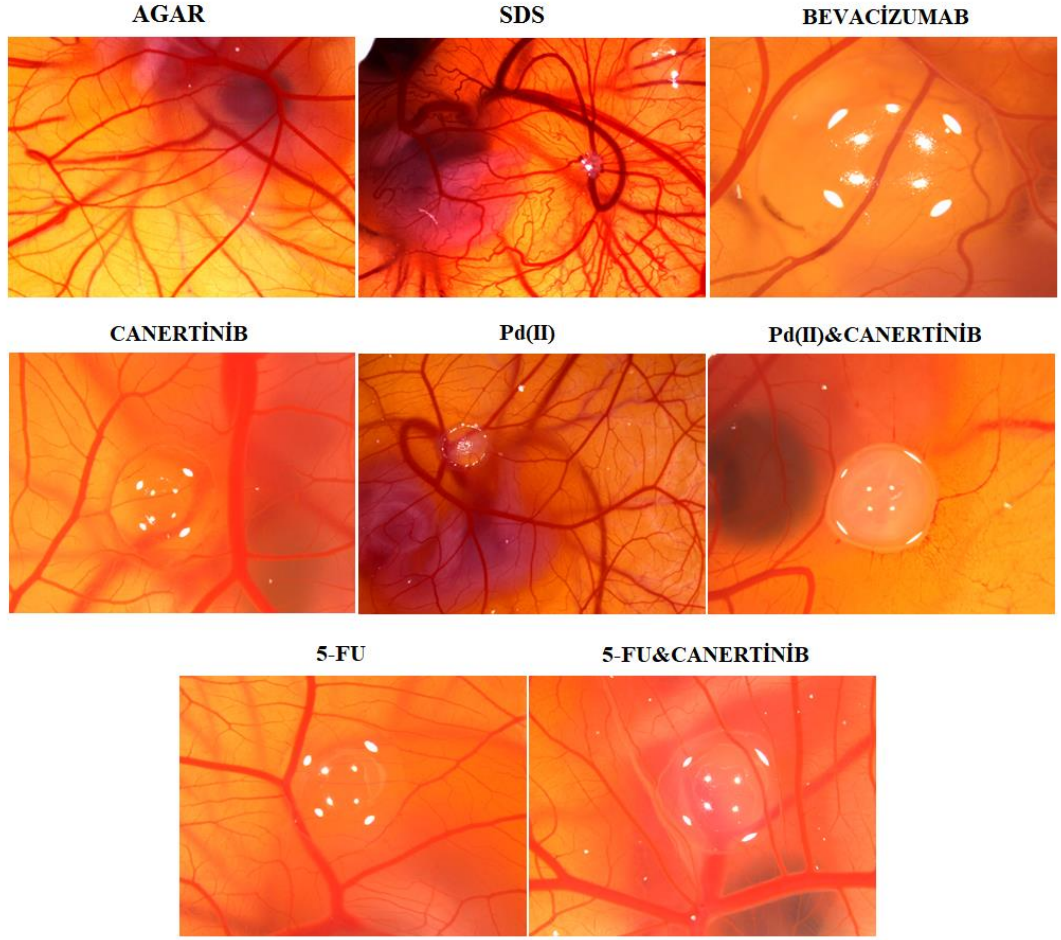
Şekil 4.39. Canertinib (6,25 μ M), Pd(II) bileşiği (50 μ M) ve kombinasyonları ve 5-FU (86,5 μ M) ve kombinasyon dozları ve pozitif kontrol olarak kullanılan bevacizumab'ın (0,125mg/ml) 2 (A)-4 (B)-8 (C)-12 (D) zaman diliminde HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma yetenekleri üzerine etkisinin belirlenmesi

Pd(II) bileşiği, 5FU, canertinib, bunların kombinasyonunun anti-anjiyogenik aktiviteleri CAM testi kullanılarak incelendi. Pozitif kontrol olarak ise Bevacizumab kullanıldı. Standart kontrol maddeleri olarak sodyum dodesil sülfat (SDS), kör olarak agar kullanılmıştır Elde edilen sonuçlar tablo da verildi (Tablo 4.2). Döllenmiş yumurtanın

CAM'ı üzerine uygulanan pelletin alt yüzeyinde ve etrafındaki kapiler gelişiminde hiçbir değişim yok ise skor 0 olarak ifade edilmiş ve bu durum normal embriyo gelişimi olarak değerlendirilmiştir. CAM üzerine uygulanan pelletin alt yüzeyinde ve etrafında pelletten çok daha geniş olmamak üzere kapiler yoğunluk azalmış ancak kapiler damarsız alan yok ise skor 0.5 olarak ifade edilmiş ve bu durum zayıf antianjiyojenik etki olarak, kapilersiz alan az veya kapiler yoğunluk belirli bir alanda azalmış ve etki pellet alanının iki katından fazla değilse skor 1 olarak ifade edilmiş ve bu durum kuvvetli antianjiyojenik etki olarak, pelletin etrafında en az iki kat mesafe olacak şekilde kapilersiz alan mevcut ise skor 2 olarak ifade edilmiş ve bu durum çok kuvvetli antianjiyojenik etki olarak değerlendirilmiştir. Eğer pellet CAM yüzeyinde kanamaya yada tahrişe yol açmışsa bu durum iritasyon olarak değerlendirilmiştir. Mikroskopik görüntülerden elde edilen sonuçlara göre Pd(II) bileşiği (skor 0.9 ± 0.2), pozitif kontrol olarak kullanılan bevacizumab'a (skor 1.0 ± 0.3) göre yaklaşık eşdeğer bir anti-anjiyojenik etki gösterirken, canertinib ile kombinasyonu (skor 1.9 ± 0.2) 2 katı anti-anjiyojenik etki gösterdi. Bununla birlikte tek başına canertinib tedavisi de orta derecede anti-anjiyojenik etki gösterdi (skor 0.7 ± 0.1). 5-FU kemoterapötik ajan uygulandığında zayıf etki (skor 0.4 ± 0.2) gösterirken, canertinib ile kombinasyonu (skor 1.4 ± 0.2) bevacizumab'a kıyasla anlamlı bir anti-anjiyojenik etki gösterdi (Şekil 4.42). Agarın sonuç skoru 0.2 ± 0.2 bulundu. Dolayısıyla kapillerlerin ve embriyonun gelişimi üzerine bu konsantrasyonda hiçbir etkisinin olmadığı görülmüştür. Negatif kontrol maddesi SDS'nin bu konsantrasyonda CAM üzerinde 0.1 ± 0.1 skorla $\% 87 \pm 5$ oranında iritasyona neden olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak kullanılan Pd(II) bileşiği ve 5-FU kemoterapötik ajanı tek başına kullanımlarına göre özellikle canertinib ile kombinasyon tedavisinde güçlü anti-anjiyojenik etki gösterdi. Maddelerin test edilmesi sırasında önemli gözlemlerden biri de test edilen maddelerin membran iritasyonu ve toksisiteye neden olmadığı şeklinde oldu.

| Test Maddeleri | Skor | İrritasyon (%) | Konsantrasyon |
|-----------------------------|-----------|----------------|--------------------------------|
| Canertinib | 0.7 ± 0.1 | - | 0.5 µg/pellet |
| Pd(II) | 0.9 ± 0.2 | - | 50 µg/pellet |
| Pd(II)&Canertinib | 1.9 ± 0.2 | - | 50 µg/pellet + 0.5 µg/pellet |
| 5-Florourasil | 0.4 ± 0.2 | - | 5 µg/pellet |
| 5-FU&Canertinib | 1.4 ± 0.2 | - | 5 µg/pellet + 0.5 µg/pellet |
| Bevacizumab | 1.7 ± 0.3 | - | 4 µg/pellet |
| Agar | 0.2 ± 0.2 | - | Kör (% 2.5, a/h) |
| Sodyum dodesil sülfat (SDS) | 0.1 ± 0.1 | 87 ± 5 | Negatif kontrol (50 µg/pellet) |

Tablo 4.2. Canertinib, Klorokin, Pd(II) bileşği ve kombinasyonları ve 5-FU ve kombinasyon dozları ve pozitif kontrol olarak kullanılan bevacizumab'ın Anti-anjiyogenik etkileri



Şekil 4.40. Canertinib, Pd(II) bileşiği ve kombinasyonları ve 5-FU ve kombinasyon dozları ve pozitif kontrol olarak kullanılan bevacizumab'ın CAM testi ile anyiyogenez üzerine etkisinin belirlenmesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kolorektal kanser, kanserin en yaygın üçüncü türüdür ve batı dünyasında kanser aracılığıyla ölümlerin başında ikinci sırada gelmektedir. Kolon kanseri yılda yaklaşık 650.000 ölümlle sonuçlanmaktadır (Jemal ve ark. 2010). Kolon kanserinin erken tanısı, kolorektal histolojik faktörlerin ve cerrahi tedavisinin kemoterapi veya radyasyon terapisi ile kombine edilip edilmediği bilinmesi etkilenen hastaların tedavilerine katkıda bulunur. Sağkalım için, tıkanıklık veya perforasyon, tümör seviyesi, venöz invazyon, perinöral invazyon, yaş, cinsiyet veya allelik kromozom 18q kaybı gibi bağımsız bazı faktörler saptanmıştır, fakat çok azının prognoz ve sağkalıma etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu durumda kolon kanseri hastaları için ek prognostik biyobelirteçlerin gereksinimine neden olmuştur.

Son zamanlarda, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) çok çeşitli kanserlerde tespit edilmiş ve aşırı ekspresyonu, akciğer, göğüs, yumurtalık, mesane, özofagus, servikal ve baş-boyun kanserlerinde olduğu gibi, daha agresif bir klinik ilerleme ile ilişkili olarak kötü prognoz faktörü olarak önerilmiştir (Neal ve ark. 1985, Sainsbury ve ark.1987, Bauchnecht ve ark. 1989, Ozawa ve ark.1989, Pfeiffer ve ark. 1989, Salomon ve ark. 1995). İnsan kolorektal karsinoma hücrelerinde EGFR'nin mRNA'nın tümör ilerlemesi sırasında önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir ve ayrıca kolorektal kanser numunelerinin malign bölgelerinde EGF ve EGFR düzeylerinin çevresindeki mukozadan daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Tong ve ark. 1998, Messa ve ark. 1998). Bunun dışında yapılan bir klinik bir çalışmada, EGFR ekspresyonunun, dördüncü evrede olan kolon kanseri hastalarında kötü sonuç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle kolon kanserinde spesifik EGFR hedefli tedavi uygulanması son zamanlarda yaygın olarak yapılan çalışmalardan biridir.

Bu amaçla bu çalışmada canertinib, ErbB aile reseptörlerine spesifik sistein rezidülerini alkilemek için tasarlanmış yeni nesil tirozin kinaz inhibitörü (TKI) kullanılmıştır. Canertinib, karbon 6 daki akrilamid yan zincirine ve ATP bağlanma cebine bağlanır ve EGFR'nin sistein rezidüsü 773 ve HER2 ve HER3'ün 784 ve 778 rezidüleriyle yakından ilişkili olup kalıcı olarak inaktivasyonlarına neden olur. Bu TKI, reseptörlerin geri döndürülmez inhibisyonu ve MAPK sinyal yolaklarının downregülasyonunu sağlar. Yapılan çalışmalar canertinibin bu karakteristik özelliklerinden dolayı daha fazla etkinlik

ve daha geniş bir anti-proliferatif etkinlik alanı olduğunu göstermektedir. EGFR ve HER2'nin aktif formlarının birlikte eksprese edildiği kolon ve baş-boyun kanserinde canertinib'in hücre büyümesini bloke ettiği ve in vivo neoplastik hücre transformasyonu için önemli olduğu düşünülen hedeflenmiş spesifik genlerin downregülasyonunu sağladığı bulunmuştur. Ako ve diğerleri tarafından 2007'de yapılan bir araştırmada, EGFR ve HER2'yi aynı anda eksprese eden özafagus kanser hücrelerinde, canertinibin hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Ako ve ark. 2007).

DNA, antikanser ilaçlarının ana biyolojik hedefidir. Bu nedenle, potansiyel sitotoksikite gösteren ve DNA'yı hedef alan metal bazlı antikanser ajanlarının dizaynı ve sentezi son yıllarda önem kazanmıştır (He ve ark. 2000, Zamble ve ark. 2002). Son zamanlarda yeni Pd(II) bileşikleri, sisplatinin toksik etkisini azaltmak veya potansiyel antikanser ilacı olarak kullanımlarının önünü açmak için sentezlenmektedir (Torshizi ve ark. 2011). Pd (II) kompleksinin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre soylarına etkisi incelenmiş, doz ve zamana bağlı olarak Pd (II) kompleksinin güçlü anti-büyüme etkisi in vitro olarak gösterilmiştir (Ulukaya ve ark. 2011). Meme (MCF-7), kolon (HT-29) ve prostat (DU-145) kanser hücrelerinde, Pd bileşikleri, klinik olarak kullanılan metalo ilaçlar olan sisplatin, karboplatin ve okzaliptatin kıyasla önemli derecede sitotoksik aktivite göstermiştir (Icel ve ark. 2015). Kısacası yapılan birçok çalışma Pd (II) bileşiklerinin, farklı kanser hücrelerinde DNA'da yüksek düzeyde hasarlar oluşturarak neden oldukları sitotoksikite nedeniyle apoptotik hücre ölümünü uyardığını göstermiştir (Abu-Surrah ve ark. 2010, Güney ve ark. 2011). Metal bileşiklerin dışında Floropirimidin 5-fluorourasil (5-FU) baş, boyun, göğüs ve kolorektal kanseri gibi çeşitli katı kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ilaçtır. 5-FU, Thymidylate sentetaz enziminin aktivitesine müdahale eden bir ilaçtır, fakat 5-FU metabolitlerinin DNA ve RNA'ya dahil edilmesinin, sitotoksikiteye önemli ölçüde katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, öncelikle tirozin kinaz inhibitörü canertinib ile Kimya Bölümü Anorganik Kimya Araştırma Grubu tarafından sentezlenen bir Pd (II) bileşiğinin [PdCl(terpy)](sac).2H₂O] insan kolon kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisi araştırılmıştır. HCT-15 ve HT-29 kolon kanser soyunda Pd(II) bileşiği 24-48 saat süresince uygulaması sonucunda doza bağımlı anlamlı azalmalar gözlemlendi (p<0,001).

HCT-15 kolon hücrelerinde 6,25-100 µM dozları 24 saat tedavi sonunda yaklaşık % 50 canlılık gösterirken, 48 saat tedavi sonunda bu canlılık önemli derecede azalmıştır. HT-29 kolon kanser hücrelerinde ise Pd(II) bileşiğinin uygulanması 24 saat sonra tedavide canlılıkta azalma 25-100 µM dozlarında istatistiksel olarak anlamlıyken, 48 saat tedavi sonrasında 1,56-100 µM dozlarında anlamlıdır ($p<0,001$). HCT-15 kolon kanserinde IC50 değeri 24 saat tedavi sonunda 43,7 iken, 48 saat tedavi sonunda 4,4'tür. HT-29 kolon hücrelerinde ise IC50 değeri 24 saat tedaviden sonra 45,6 iken, 48 saat tedavi sonunda IC50 değeri 15 olarak belirlenmiştir. Farklı bir çalışmada yine Pd(II) bileşiğinin 48 saat tedavisi sonunda IC50 değeri; A-549 için 2.1 µM, H-1299 için 1.8 µM, ve PC-3 için 1.8 µM olarak bulunmuştur (Ulukaya ve ark. 2011). Farklı bir palladyum bileşiği Pd (II) bis(2-piridilmetil) amin, farklı hücre hatlarında belirlenen farklı IC50 değerleri ile sitotoksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir. (Güney ve ark. 2011b). HeLa hücrelerinde ise Pd(II) bileşiğinin IC50 değeri 86,1 iken, tedavide kullanılan diğer kemoterapötik ajanların IC50 değerleri sisplatin 94,3 µM, karboplatin 104,3 µM ve oksaliptin 71,3 µM olarak bulunmuştur (Abu-Surrah ve ark. 2008). IC50 değerleri arasındaki farklılık, çalışmalarda kullanılan farklı hücre soyları ve farklı Pd(II) bileşik yapısından kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada ayrıca Pd(II) bileşiğinin kolon hücreleri üzerine etkinliğini karşılaştırmak için kolon kanseri tedavisinde kullanılan 5-FU kemoterapötik ajanın 24-48 saat tedavi süresince HCT-15, HT-29 kolon kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkileri SRB canlılık testi ile araştırıldı. HCT-15 kolon kanserinde 24 saat tedavi sonunda hücre canlılığında belirgin bir azalma gözlenmezken 48 saat tedavi sonunda istatistiksel olarak 10,8-173 µM doz aralığında canlılıkta anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0,001$). HT-29 kolon kanserinde ise aynı şekilde 24 saat tedavide canlılıkta azalma gözlenmezken, 48 saat tedavi sonunda 5,4-173 µM doz aralığında istatistiksel olarak azalma belirlendi ($p<0,001$). Farklı bir çalışmada yine HCT-15 ve HT-29 kolon hücre soyları kullanılarak hücreler 10 µM-10mM doz 48 saat süresince tedavi edilmiştir. Buna göre 48 saat sonunda 10 µM dozda HCT-15 kolon hücrelerinde canlılık %83,6 iken, HT-29 kolon hücrelerinde %89 olarak bulunmuştur (Lim ve ark. 2007). Farklı bir çalışmada HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücreleri 6 gün süreyle 5-FU ile tedavi edildikten sonra IC50 değerleri sırasıyla 1 ve 4 µM olarak bulunmuştur (Russo ve ark. 2002). Ikehatai ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada HT-29 kanser hücreleri 5-FU ile 72sa tedavi edildi ve IC50 değeri 10 µM olarak bulunmuştur.

Farklı doz ve saatlerde uygulanan 5-FU kemoterapötik ajanının canlılık üzerine etkisi tüm çalışmalarda benzerlik göstermektedir. Ayrıca tirozin kinaz inhibitörü olarak kullanılan canertinib 24 saat tedaci sonunda HCT-15 kolon kanserinde 5 µM dozunda yaklaşık %80 canlılık gösterirken, HT-29 kolon kanserinde bu canlılık %100'e yakındır. Literatürde kullanılan doz ile uygun olması ve en önemlisi yapılan bu çalışmaya özgü olarak toksik olmayan dozun seçilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın amacına uygun olarak hem Pd(II) bileşiği (12,5 µM), hem 5-FU (10,8 µM) hem de canertinib (5 µM) için ilerleyen çalışmalar için 24 saat tedavi sonunda toksik olmayan dozlar seçildi. Seçilen dozlar sonucunda Pd(II) bileşiği ile canertinib, 5-FU ile canertinib kombine edildi. Buna göre her iki hücre soyunda da tek başına Pd(II) bileşiği ve tek başına 5-FU kemoterapötik ajanına kıyasla kombinasyon grubunda canlılık önemli ölçüde azaldığı bulundu. Farklı bir çalışmada DiFi ve Caco-2 kolon kanser hücrelerine 0,1 µM canertinib 24-48-72 saat süreyle uygulanarak, canlılığın etkili olarak azaldığı 72 saatte her bir hücre hattı için canlılık sırasıyla %31.04 ve %53.71 olarak bulunmuştur (Skvortsov ve ark. 2005). SKOV3 ovaryum kanserinde ise 4 µM canertinib tedavisi, EGF ve FGF uygulanan ortamda dahi canlılığı %50 den daha fazla azalttığı gözlenmiştir (Hassan ve ark. 2016).

Hücrenin hayatta kalması ile hücre ölümü arasındaki denge karmaşık bir konudur ve tümör hücrelerinin bu kritik yollar arasındaki karar noktalarını nasıl düzenlediğini anlamak için büyük çaba gerekir. Bu çalışma, hem sağkalım hem de stresle aktive edilmiş yolakların modülasyonunun, tümör hücrelerinde artmış apoptoz açısından Pd(II) bileşiği ve canertinib arasındaki kuvvetli sinerjik etkileşimde rol oynadığını göstermektedir. Canertinib reseptör tirozin kinazların ErbB ailesinin spesifik bir inhibitörüdür ve kanser tedavisinde uygulanabilir hedef olduğu gösterilmiştir (Fry 1999). HT-29 ve HCT-15 kolon hücrelerinde EGFR inhibitörü canertinibin, EGFR fosforilasyonunu düzgün bir şekilde inhibe ettiğini göstermek için, her iki hücre soyunda 24sa süre boyunca canertinib (5µM) ile tedavi edildi. Her iki hücre soyunda da canertinib 5µM dozu etkili bir şekilde EGFR fosforilasyonunu inhibe ettiği görüldü. Bu inhibasyon aynı zamanda Pd(II) ve 5-FU kombinasyonlarında da gözlendi. Bu durum da EGFR inhibisyonu için canertinibin uygun dozunun seçildiğini göstermektedir. Farklı çalışmalarda canertinibin EGFR fosforilasyonunu inhibe ettiği akciğer, ovaryum, osteosarkoma, özafagus kanser hücrelerinde farklı dozlarda da gösterilmiştir (Hughes ve

ark. 2006, Ako ve ark. 2007, Li ve ark. 2008, Grunta ve ark. 2009). EGFR fosforilasyonu, yaşam sinyal yolağında, AKT ve MAPK/p38 ve ERK1/2 proteinlerini uyarak aktive eder. Bu durum da birçok transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu sağlar. Bu yüzden canertinin bu proteinler üzerine etkisi ayrıca değerlendirildi. Her iki hücre soyunda da p38 ve ERK1/2 fosforilasyonunun canertinin ve Pd(II) ve 5-FU ile kombinasyon tedavisinde azaldığı gözlemlendi. EGFR tarafından aktive edilen 2 ana hücre içi yolak bulunmaktadır; mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolağı ve fosfotidilinositol 3 kinaz (PI3K-) protein kinaz B (AKT) yolağı. Elde edilen sonuçlar ErbB ailesi üyelerinin ERK1/2, P38/MAPK yolağı ve bununla birlikte PI3K-AKT yolağını uyardığını göstermektedir. Bu yollar, proliferasyon, migrasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi hücresel cevabı etkileyen transkripsiyon faktörlerin aktivasyonuna neden olur (Citri ve Yarden 2006). Malign tümörlerin yaklaşık %40'ı PI3K/AKT yolağını aktive eden değişimler göstermektedir, klinik olarak bu yolağın hedeflenmesi önem taşımaktadır (Danielsen ve ark. 2015). Sürekli aktive reseptör tirozin kinazlar (IGF/IGFR, ErbB, FGF/FGFR) PI3K, Akt, P70S6K yolağının sürekli aktivasyonuna neden olur. Bu değişimler, hücre büyümesi, proliferasyon, yaşam, tümör progresyonu gibi biyolojik yaşam kaskadını tetikler (Faber ve ark. 2009). Bu nedenle HCT-15 ve HT-29 hücrelerinde tirozin kinaz inhibitörü p-Akt ekspresyonunu azaltırken Pd(II) ve 5-FU artmasına neden olmuştur. Her iki bileşiğin canertinin ile kombinasyonunda ise p-Akt seviyesi önemli derecede azalmıştır.

ERK2/ERK1 (p42/p44MAPK, olarakta bilinir), MAPK ailesine ait ekstrasellular sinyal düzenleyici kinazın iki izoformudur. Bunun dışında ERK5, c-jun NH2 terminal kinaz (JNK1/2/3) VE P38 MAP kinaz ailesini içerir. Birçok çalışma, bu yaşam yollarının onkogenik potansiyellerinin antiapoptotik proteinler Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, IAP ve proapoptotik proteinler Bad ve Bim'in baskılanmasında görev aldığını göstermiştir (Balmanno ve Cook 2009). RAS/RAF/MEK/MAPK kaskadı ve STAT3 gibi birçok sinyal iletim yolağı, EGFR aracılı hücre yaşamı ile ilişkilidir. EGFR bağımlı MAPK aktivasyonu, Bcl-2 aile üyelerinin dengesini etkiler ve sürekli olarak apoptozu kontrol eder. EGFR bağımlı Bcl-xL ekspresyonu, glioblastoma hücrelerinde sisplatinin uyardığı apoptozu EGFRvIII ekspresyonu ederek koruma sağlar (Nagane ve ark. 1998). Sonuç olarak EGFR bağımlı MAPK sinyali, apoptozu, sadece Bcl-2 ailesinin düzenleyicilerinin ekspresyonunu hedef alarak değil aynı zamanda post-translasyon

modifikasyonlarında hedef alır. Aynı şekilde, fibroblastlarda tümör ilişkili EGFRvIII varyantının fazla ekspresyonu, PI3K'in güçlü aktivasyonu ile sonuçlanır (Moscatello ve ark. 1998). Bu nedenle bu çalışmada EGFR inhibitörü canertinib'in tek başına ve diğer ajanlarla kullanıldığında apoptoz üzerine etkileri incelenmiştir. Anneksin V-Cy3, SYTOX boyaması sonucu elde edilen sonuçlara göre HCT-15 hücrelerinde, tek başına Pd(II) ve 5-FU ajanlarına kıyasla apoptoz belirteci anneksin seviyesinde önemli derece artış görülürken, aynı şekilde anneksin V-Cy3 pozitif boyanan bölgelerde SYTOX'da pozitif sonuç verdiği gözlenmiştir. Bu durum hücrelerde membran hasarına bağlı olarak sekonder nekrozis geliştiğini düşündürmektedir. Ayrıca iki hücre grubunda da hücrelerin kombinasyon tedavisi sonrası ile tek başına Pd (II) bileşiği ve 5-FU ajanına kıyasla hücre yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir. Bunun için ayrıca floresan mikroskobu dışında hücrelerdeki anneksin ekspresyonu Muse akım sitometrisi ile değerlendirildi. Buna göre her iki hücre soyunda da anneksin seviyesi 2 katlık artışlar şeklinde kombinasyon tedavilerinde artış göstermektedir. Bu da floresan mikroskobu ile elde edilen sonuçları destekler niteliktedir. Bu ayrımı daha net yapabilmek açısından bu hücrelerde aynı zamanda kaspaz3/7 ekspresyonu ve mitokondri depolarizasyonuna bakılmıştır. HCT-15 hücrelerinde Pd(II) tek başına tedavisine göre canertinib ile kombinasyonunda ve 5-FU ve canertinib ile kombinasyonunda mitokondri membran potansiyeli kaybının arttığı gözlenmiştir. Aynı şekilde HT-29 kanser hücrelerinde de Pd(II) ve 5-FU ajanının tek başına tedavilerine göre kombinasyon tedavilerinde mitokondri depolarizasyonu artış göstermektedir. Bu sonuçlar apoptozun mitokondriyal yolak üzerinden gerçekleştiği görülmektedir. Farklı çalışmalar metal bileşiklerin hem ekstrinsik hem de intrinsik yolak aracılığı ile apoptozu uyardığını göstermiştir (Tan ve ark. 2010, Arı ve ark. 2013). Bu sonuçları desteklemek için hücreler JC-1 ile boyandı. Her iki hücre soyunda da kontrol hücreleri, sahip oldukları intakt membranları ile yüksek mitokondri membran potansiyel gösterirken, matriklerinde J-agregatları oluşturmak için çok sayıda JC-1 birikimi gözlenir. Fakat Pd(II) ve 5-FU ile tedavi edilen hücrelerde ve bu hücrelerin canertinib ile kombinasyon tedavilerinde mitokondrieleri düşük ψ_m ve matrikste daha az JC-1 birikimi gözlenmiştir. Daha az JC-1 birikimi daha az J-agregatı oluşturması anlamına gelmektedir. Sonuçlar göstermektedir ki, bileşikler ve canertinib ile kombinasyonları mitokondri membran potansiyel kaybına neden olmaktadır. Bilindiği üzere mitokondri membran potansiyel kaybı, apoptotik

süreçte önemli bir süreçtir. Bu süreç mitokondriden sitoplazmaya farklı apoptojenik faktörlerin salınımını artırır (Zou ve ark. 2015). Ayrıca ölüm şeklini kesinleştirmek amacıyla aynı zamanda HCT-15 ve HT-29 kolon kanser hücrelerinde akım sitometrisi ile kaspaz3/7 aktivitesi araştırıldı. Buna göre her iki hücre soyunda da Pd(II) ve 5-FU tek başına tedavisine göre kombinasyon tedavilerinde önemli derecede kaspaz3/7 artışı gözlemlendi (Şekil 4.17). Bilindiği üzere intrinsik yolda, proapoptotik sinyal sonucu mitokondri membran bozulması ve sitoplazmaya sitokrom c salınımı gözlenir. Burada sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 ile (APAF1) ve kaspaz 9'un inaktive formu ile apoptozom oluşturur. Bu kompleks, kaspaz 9'u aktive eden adenosin trifosfatı hidrolize eder. Başlatıcı kaspaz 9 kesilir ve hücre apoptozunu başlatan kaspaz 3,6 ve 7'yi aktive eder. Hücrede apoptotik sinyaller artınca, BH3 proteinleri dramatik bir şekilde artar. Bu durumda pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengeyi bozar ve dengeyi apoptotik hücre ölümüne doğru kaydırır. Bu kritik durumda mitokondri aracılı sinyal kaskadı hücre içerisinde başlar ve pro-apoptotik faktör Bax sitozolden mitokondri dış membranına yerleşir. Bax proteini konformasyonel değişikliğe uğrar ve mitokondri dış membranına yerleşir. Bax'ın mitokondri dış membranı ile birleşmesi, dış membranda protein kanalları veya porları oluşmasına neden olur. Bu porlardan sitokrom c mitokondriden sitozole geçiş yapar. Bu nedenle HCT-15 kanser hücrelerinde Bax ekspresyonuna bakıldığında, kontrol ve Pd(II) bileşimine kıyasla, Pd(II) ve canertinib kombinasyonunda ifadesi önemli ölçüde artmıştır. Fakat ekstrinsik yoldaki bileşenlerinden olan FAS reseptör ve DR4 ekspresyonlarının azaldığı gözlenmiştir. Pd(II) tek başına tedavisinde ise Bax ekspresyonuna hafif artış ile birlikte, FAS reseptör ve DR4 ifadesinde değişiklik gözlenmedi. Bununla birlikte tek başına Pd(II) tedavisinde parp kırılması belirgin iken canertinib ile kombinasyonda inhibe olmuştur. Bu sonucu açıklayabilmek için c-jun, ROS, PARP1 ekspresyon seviyelerine birlikte bakmak gereklidir. HCT-15 hücrelerinde c-jun fosforilasyonu tek başına Pd(II) tedavisinde önemli derecede artarken PARP1 de kırılmıştır. Bilindiği üzere PARP1 DNA hasar tamirinde posttranslasyonel düzenleyici bir mekanizmadır ve aynı zamanda hücre ölüm mekanizmasında yer alır. C-jun N-terminal protein kinaz ise MAPK ailesinin önemli bir üyesi olup, oksidatif stresin uyardığı apoptotik ölümden önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Lei ve ark. 2002). Farklı bir çalışmada da c-jun fosforilasyonunun ROS aracılı PARP1'i aktive ettiği

gösterilmiştir(Zhang ve ark. 2007). Yapılan bu çalışmalar elde edilen bulguları desteklemektedir. Aksine Pd(II) ve canertinib kombinasyonunda c-jun fosforilasyonu azalırken, PARP1 kırılması da azalmıştır. PARP1 ekspresyonunun MAPK yolağını yani ERK1/2, p38, c-jun ifade düzeylerini etkilediği bilinmektedir (Ethier ve ark. 2007). Kullanılan tirozin kinaz inhibitörü nedeniyle EGFR sinyal yolağı aracılığı ile ERK1/2, p38 sinyal yolağının inhibisyonunun aynı şekilde PARP1 kırılmasını da etkilediği düşünülmektedir. HT-29 hücrelerinde ise aynı şekilde Bax ekspresyonu Pd(II) tek başına ve Pd(II) canertinib kombinasyonu ve 5-FU canertinib kombinasyonunda artmıştır. Fakat FAS reseptöründe hem Pd(II) hem de kombinasyon tedavisinde azalma gözlenirken, DR4 kontrole kıyasla Pd(II) tek başına tedavisinde artarken kombinasyon tedavisinde ifade düzeyinde hafif bir artış belirlendi. HT-29 hücrelerinde de Pd(II) bileşiği uygulandığında PARP1 proteini kırılırken, HCT-15 hücrelerinden farklı olarak kombinasyonda da parp kırılması gözlenmiştir. Fakat c-jun fosforilasyonu kombinasyon tedavisinde kontrole kıyasla azalmıştır. Karşılaştıracak olursak HCT-15 hücrelerinde c-jun ve parp ifade düzeyi yok denecek kadar azalırken, HT-29 hücrelerinde belirgin bir ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. C-jun fosforilasyonunun açıklandığı gibi PARP1 ilişkili olduğundan HT-29 hücrelerinde c-jun proteininin belirgin bir ekspresyonun varlığı PARP kırılmasının da gerçekleşmesine neden olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma da Akt ve Erk1/2 inhibisyonu nedeniyle kaspaz 9'un aktive olup apoptozu başlattığı düşünülmektedir. Çünkü bu hücre içi sinyal proteinleri kaspaz aktivesi oluşmadan önce inhibe olmuşlardır. Ayrıca inaktive olmuş Akt'nin Bid ve prokaspaz 9'un aktivasyonu ve sonuç olarak kaspaz 3 aktivasyonu ve artmış apoptozla sonuçlandığına çalışmalar bulunmaktadır (Stiles 2009). Ayrıca bu hücrelerde, mitokondri membran depolarizasyonunun ROS üretimi ile ilişkisi incelendi. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, tamamlanmamış depolarizasyon, her halükarda ROS üretimi ile sonuçlanmaz, aynı kaspaz 9 inhibisyonunun ROS üretimini uyardığı gibi (Cepero ve ark. 2005). Bu da ROS üretimi ile $\Delta\Psi_m$ kaybının birbirinden bağımsız olduğunu göstermektedir. Kaspaz 9'un Bid'i kırarak ROS üretimine neden olduğu bilirse de, ROS üretiminin kaspaz 3 ya da kaspaz 7'nin inhibisyonu ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bu nedenle, intrinsik hücre ölümü boyunca ROS üretiminde kaspaz 3 ya da kaspaz 7 nin rolü olup olmadığını belirlemek için yapılan çalışmada kaspaz 3'ün ROS üretimini kısıtladığı fakat kaspaz 7'nin ROS üretimine katkı sağladığı

gösterilmiştir (Brentnall ve ark. 2013). Buna göre HCT-15 hücrelerinde Pd(II) tedavisi ile artan ROS miktarı, canertinib ile kombinasyonunda önemli derecede azalmıştır. Kaspaz 3/7 miktarında, kaspaz 3 aktivasyonunun fazla olması nedeniyle ROS üretimindeki azalma ile açıklanabilir. Aynı zaman bu hücrelerde, ROS üretimindeki azalma ile korele bir şekilde DNA hasarı da azalmıştır. İntrinsik yolak her ne kadar ROS üretimi ve DNA hasarına neden olsa da, DNA hasarının ayrıca FAS-FADD yolağı ile ilişkili olduğuna dair çalışmalar yer almaktadır. DNA hasarı FAS birikimini arttırdığı ve FAS birikiminin ayrıca genotoksik DNA hasarına yol açarak apoptotik ölüm yolunu tetiklediği belirlenmiştir. FAS ölüm yolu, kanser hücrelerinin FAS ekspresyon seviyeleri bakımından, mitokondriyal ölüm yolundan belirgin bir şekilde ayrılmaktadır. Yüksek FAS ekspresyonuna sahip kanser hücreleri, FAS-FADD yolağını kullanarak, DNA hasarına neden olmaktadır. Bu çalışmada ise HCT-15 hücrelerinde Pd(II) tek başına tedavisinde artan DNA hasarının birikmiş FAS ile ilişkili olduğu ya da fazla kaspaz 7 aktivasyonu sonucunda artmış ROS ile korele olduğu şeklinde yorum yapılabilir. Kombinasyon tedavisinde ise trozin kinaz inhibitörünün fas reseptör degradasyonu nedeniyle DNA hasarında ve dolayısıyla ROS üretiminde azaldığı gözlenmiştir. DNA hasarı ve ROS üretimi HT-29 hücrelerinde Pd(II) tedavisi ile kıyaslandığında canertinib ile kombinasyon tedavisinde az da olsa, artış gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak artmış kaspaz 7 aktivasyonu olduğu düşünülmektedir. Her ne kadar Fas birikimi hem Pd(II) tedavisi hem de kombinasyon tedavisinde inhibe olsa da kontrole kıyasla artmış DR4 miktarı, DNA hasarını tetiklediği bilindiğinden, bu şekilde parp1'in kırılmasına neden olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmanın başlıca amaçlarından biri, pan ErbB reseptör trozin kinaz inhibitör canertinibin kolon kanser hücrelerinde antineoplastik etkisini Pd(II) bileşiği ile birlikte kullanarak belirlemektir. Daha önce gefitinib ve erlotinib gibi EGFR inhibitörlerinin malign myeloid hücrelerinde farklılaşma ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Stegmaier ve ark. 2005, Behrer ve ark. 2008). Ayrıca akciğer kanserlerinde canertinibin apoptozu uyardığı ve hücrelerin G1 fazında birikmesine neden olarak HER2 aile üyeleri ve STAT3, Akt, ERK gibi sinyal yollarının fosforilasyonunu inhibe ettiği görülmüştür.

Otofaji bilindiği üzere, protein ve organellerin degradasyonunda görev alan katabolik bir süreçtir, hücrel homeostazın sağlanmasında kritik bir rol oynar. Otofaji uyarılması,

kanser tedavisi ile ilişkili kemoterapörlere karşı direnç geliştirilmesinde önemli bir rol oynar. Tersine bir şekilde otofaji aynı zamanda hücre ölümüne destek verirken, radyoterapiye karşı duyarlılığın artmasını sağlar. Bunun için otofajinin kanserdeki rolü karmaşık ve tümör orijini, tedavi tipi ve tümör seviyesine bağlı olarak değişiklik gösterir. Anti-EGFR antikoru cetuximabın, birçok kanser hücresinde otofajiyi uyardığı, mTOR ve Hif1- α nın downregülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir ve sitoprotektif etki gösterdiği bulunmuştur (Li ve Fan 2010, Li ve ark. 2010). Buna rağmen bazı araştırmacılar bazı kanser hücrelerinde, EGFR sinyali inhibe olduğu zaman, otofajinin ölümü geciktirdiği ve otofajinin bloklanması EGFR hedefli terapilerin etkinliğini arttığını göstermiştir (Mathew ve White 2007). Ayrıca erlotinib ve gefitinibin otofajiyi arttığı, LC3-II birikimiyle belirlenmiştir (Fung ve ark. 2012). Fakat her ne kadar otofajinin rolü sitoprotektif olarak bilinse de bir çalışmada otofaji kaybının erlotinibe karşı direnç geliştirmesi yönünde sonuçlar elde etmişlerdir ve otofajiyi uyarıcı rapamisin aracılığıyla tekrar, erlotinibin duyarlılığını artırarak apoptozu uyardığı gösterilmiştir. Buna göre bu çalışmada HCT-15 kolon kanser hücrelerinde Pd (II) bileşiği uygulandığında kontrole göre p62 protein seviyesi azalırken canertinib ile kombinasyonunda artış gözlemlendi. Fakat Atg5 seviyesinde belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Aynı zamanda hücrelerde LC3-II lipidasyon birikimi akım sitometrisi ile belirlenmiştir. HCT-15 hücrelerine Pd(II) bileşiği uygulanması sonucu kontrole kıyasla LC3-II seviyesinin belirgin derecede arttığı gözlemlenmiştir. Canertinib ile kombinasyon tedavisi durumunda LC3-II seviyesinde kontrole göre belirgin bir artış bulunmuştur. Ayrıca pozitif kontrol olarak kullanılan Pd(II) ve klorokin kombinasyonu tedavisinde de LC3-II birikimi artmıştır. HT-29 hücrelerinde de Pd(II) tek başına tedavisi, klorokin ve canertinib ile kombinasyon tedavisinde Atg5 protein seviyesinin arttığı gözlemlendi. P62 seviyesi tek başına canertinib ve kombinasyon tedavilerinde artarken, tek başına klorokin ve kombinasyon tedavilerinde azalma belirlendi. LC3-II seviyesi ise özellikle Pd(II)-canertinib ve Pd(II)-klorokin kombinasyonunda muazzam bir artış göstermektedir. Bu durum otofajinin inhibe edilmediği anlamına gelmemektedir. Klorokin, otofaji sürecinde daha geç dönemde rol oynayan bir inhibitördür. Otofagazom ve lizozom kaynaşmasını önlemektedir. Nitekim bu durumda ortamda halen otofagazom yapılarının bulunması ve bu yapılarda önemli rol oynayan LC3-II proteinlerinin Pd (II) ve klorokin kombinasyonunda saptanması doğru bir

sonuçtur. Klorokin ile HT-29 hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada da LC3-II seviyesinin kemoterapötik ajanla kombine edilmesi durumunda da artış gösterdiği bunun nedeninin klorokinin otofagozom oluşumunu inhibe etmediği bu yapıların lizozomla kaynaşmasını inhibe etmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Sasaki ve ark. 2010). Bu sonuçlar HCT-15 ve HT-29 hücrelerinde kombinasyon tedavilerinde asidik veziküllere sahip hücrelerin saptanması ile doğrulanmıştır. Pd(II) bileşiğine kıyasla canertinib ve klorokin ile kombinasyonunda daha fazla asidik vezikül belirlenmiştir. Burada, canertinibin Pd(II) ile kombinasyonunda klorokin gibi davrandığı düşünülse de, klorokinin aksine otofajiyi inhibe etmek yerine, otofajiyi uyardır. Her iki kombinasyon grubunda da LC3 II birikimi artsada, mTOR fosforilasyonu bize kesin bilgi vermektedir. Buna göre Pd(II) ve canertinib kombinasyonunda mTOR fosforilasyonu azalırken klorokin ile kombinasyonunda artmıştır. Daha önceki çalışmalar PI3K/Akt/mTOR/p70S6K yolağının otofaji inhibisyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir (Codogno ve Meijer 2005, Cao ve ark. 2006). Bu nedenle HCT-15 hücrelerinde AKT, mTOR ve p70S6K fosforilasyonu canertinib tek başına ve Pd(II) kombinasyon tedavisinde inhibe olmuştur. Aslında p70S6K fosforilasyonu otofaji uyarılması için gereklidir fakat mTOR'un downstream yolağı olan p70S6K downregülasyonu aynı zamanda aşırı otofajiden kaçınmak için de gereklidir. Fakat sonuçlar her ne kadar otofaji aktivasyonunu gösterse de, otofajinin uyarılmasının bu hücrelerde canertinib ve Pd(II) tedavisine karşı hücreleri apoptoza karşı duyarlı hale getirdiği düşünülmektedir. Çünkü daha önce otofajinin sitoprotektif mi yoksa apoptoza karşı duyarlılığı arttırıcı bir rol mü üstlendiğini belirlemek için otofajiyi uyardığı bilinen tirozin kinaz inhibitörü ile EGFR-TKI dirençli hücre soyu kullanılarak bir çalışma yapılmıştır. Buna göre bu hücre soyu önce rapamisin ile tedavi edilerek otofaji uyarılmış daha sonra tirozin kinaz inhibitörü ile tedavi edilidğinde, otofaji uyarılmasının hücreleri apoptoza karşı duyarlı hale getirdiği gözlenmiştir (Fung ve ark. 2012). Aynı durumun bu tez çalışmasında da geçerli olduğu düşünülmektedir. Çünkü HCT-15 ve HT-29 hücre soyunda Pd(II) canertinib ve 5-FU canertinib kombinasyonunda otofaji aktivasyonu klorokin ile inhibe edildiğinde, canlılığın yaklaşık 3 kat arttığı gözlendi. Bu da otofajinin varlığının hücrelerin apoptozla ölmesi için gerekli olduğunu göstermektedir. Ayrıca c-Jun fosforilasyon her iki hücre soyunda da canertinib tek başına ve Pd(II) ile kombinasyonda ekspresyon seviyesi azaldığı

görüldü. C-Jun hücre yaşamı, proliferasyon ve farklılaşma da kritik rol oynamaktadır. C-Jun fazla ekspresyonu birçok karsinomanın gelişmesine katkı sağlar ve sitokinler, büyüme faktörleri, adhezyon molekülerine cevapta JNK, ERK1/2 tarafından aktive edilir (Kappelmann ve ark. 2014). Ayrıca bir çalışma da özellikle EGFR dirençli akciğer kanserine c-Jun fosforilasyonunun arttığı belirtilmiştir (Li ve ark. 2016). Bu sonuçta daha önce akciğer kanserinde c-Jun fosforilasyonu ve ERK1/2 fosforilasyonu ile EGFR-TKI direci arasındaki korelasyonu gösteren çalışmayı destekler niteliktedir (Shiozawa ve ark. 2004). PI3K/AKT yi de içeren downstream sinyal yolağının aktivasyonu genellikle PTEN kaybı ile gerçekleşir (Yamamoto ve ark. 2010) ve MAPK aktivasyonu genellikle ERK1/2 aktivasyonu ile gerçekleşir. PTEN ekspresyonu HCT-15 kanser hücrelerinde Pd(II) ve canertinib ile tedavisinde kontrole göre değişmezken, Pd(II) ve canertinib kombinasyonunda artış gözlemlendi. HT-29 hücresinde ise Pd(II) ve canertinib tedavisi PTEN ekspresyonunun azalmasına neden olurken, Pd(II) ve canertinib kombinasyonu ifade düzeyinde artışa neden oldu. Elde edilen sonuçlar PI3K/AKT fosforilasyonu ve PTEN ifade düzeyindeki artışla koreledir. Src tirozin kinaz hücre içinde, proliferasyon, yaşam, hareketlilik ve adhezyon yollarını düzenler. Bu düzenlemeye MAPK, PI3K/Akt and STAT3 bağımlı sinyal yolları dahil olur. Kolon kanserlerinin % 80 ninden fazlasında yeniden düzenlenir ve tümör progreseyonu için kritik rol oynar (Talamonti ve ark. 1993). Src, şu anki tedavilere dirençte önemli rol oynar ve önemli terapötik hedeflerin başında gelmektedir. Src hücre içi içeriğe bağlı olarak, Myc, E2F-1, Ras ya da c-Jun gibi sahip olduğu onkogenik potansiyel ile hücre çoğalması, senesans, apoptozu uyarır (Evan ve ark. 1992, Shan ve Lee 1994, Clark ve Gillespie 1997, Ries ve ark. 2000). Src'nin proapoptotik genlerin downregülasyonu (Reginato ve ark. 2005) ya da anti-apoptotik genlerin up regülasyonu ile apoptozu inhibe ettiğine dair birçok çalışma bulunmaktadır (Gillet ve ark. 1995, Bonni ve ark. 1999, Webb ve ark. 2000, Johnson ve ark. 2000). Ayrıca Src, Bad, Bax kaspaz 9 gibi ölüm sürecini başlatıcı bileşenlerin inaktivasyonunu ve proapoptotik uyarılara karşı gerçekleştirdiği fosforilasyonu ile PI3K/Akt yolağının potent aktivatörüdür (Yamaguchi ve Wang 2001). Src bağımlı P38-MAPK aktivasyonu, kaspaz 8 aktivasyonuna neden olur (Alvarado-Kristensson ve ark. 2004). HCT-15 ve HT-29 hücrelerin Src fosforilasyonu hem Pd(II) tek başına tedavi hem de canertinib ile kombinasyon tedavi grubunda önemli ölçüde azalmıştır. Ayrıca hücrelerde Bax ekspresyonunun artarak ölüm

mekanizmasının instrinsik yoldan gitmesi ve PI3K/Akt downregülasyonu Src fosforilasyonunun inhibisyonu ile koreledir. Ayrıca Src trozin kinaz, proapoptotik protein Bik'in degradasyonu aracılığıyla ERK1/2 aktivitesinin yeniden düzenlenmesinden sorumludur ve tümör progresyonunda önemli rol oynar. Ayrıca Src kinazın sürekli aktivasyonunun, PI3K/Akt aracılığıyla mTOR'un aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Elde edilen sonuçlarla karşılaştırılınca canertinib, otofajinin aktivasyonunu uyardığı için, Src kinaz inhibisyonu ve dolayısıyla PI3K/Akt fosforilasyonunun inhibisyonu, LC3-II lipit birikimine neden olmaktadır.

Çalışmalar, hücrelerin epitelyal karakterini kaybedip mezenkimal fibroblastoid fenotip kazandığı epitelyal mezenkimal dönüşüm sürecinde hücrelerin hareket ve invazyon yeteneğini arttırdığını göstermiştir ve ayrıca EGFR-TKI'lerine karşı direnç kazanılmasında önemli rol oynamaktadır. PI3K-AKT yolağı hücre hareketliliğinin düzenlenmesinde önemli rol oynamakla birlikte, kanser metastazındaki rolü halen bilinmemektedir. Ayrıca erlotinib tarafından EGFR aktivitesinin inhibisyonunun iyi bir şekilde hücre invazyonu ve proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Khajah ve ark. 2012). EGF ve reseptörlerinin fazla ekspresyonu birçok kanser hücresinde uzak bölgelere metastaz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kanser de EMT, invaziv, metastaz yeteneği tedaviye direnç ve kök hücre benzeri kanser hücrelerinin oluşumu gibi özellikleri uyararak tümör progresyonunu uyarır. EGFR sinyali, EMT'nin başlangıç basamağını oluşturur ve EGFR inhibisyonu bazı hücre içi kısımlarda EMT'yi kısıtlar. Özellikle ligand bağımsız, sürekli aktif EGFR formu tümör hücrelerinin hareket ve invazyon yeteneğini artırır ve EGFR inhibitörleri in vitro hücre migrasyonunu bloke eder. EMT programı, E-kaderin kaybı ve N-kaderin artışı ile bir kaderin dönüşüm süreci içerir. E-kaderin, hücre hücre adhezyonuna aracılık eden transmembran proteindir, ve EMT'nin karakterizasyonunda en bilinen tümör süpresördür. Kolon kanserinde E-kaderin kaybı, yaşam oranı üzerine negatif etki gösterir (He ve ark. 2013). N-kaderin, E-kaderin ile benzer olarak birçok tümörde anormal olarak eksprese edildiği bildirilmiştir (Huang ve ark. 2014). N-kaderin fazla ekspresyonu hastalarda zayıf prognoz ile koreledir (Yi ve ark. 2014). N-kaderin proliferasyon, invazyon metastaz ve kemoterapiye direnç gibi kanser belirteçlerinden çoğunun artmasına neden olur. Birçok çalışmaya rağmen, N-kaderinin kolon kanserinde rolü henüz tam olarak anlaşılammıştır (Zhang ve ark. 2013). Buna göre HCT-15 hücrelerinde Pd(II), 5-FU,

canertinib tedavilerinin tek başına hücrelerin invazyon yeteneği üzerine etkisi olmazken, Pd(II) ve canertinib, 5-FU ve canertinib kombinasyon tedavisinin hücrelerin invazyon yeteneğini kısıtladığı gözlemlendi. Aynı şekilde Pd(II), 5-FU, canertinib tek başına tedavileri kontrole kıyasla hücrelerin migrasyon yeteneğinde artışa neden olurken, kombinasyon tedavilerinin hücre migrasyonunu azalttığı gözlemlendi. Kombinasyon tedavilerin E-kaderin artışı ve N-kaderin ekspresyon düzeylerinin azalmasının hücrelerin migrasyon ve invazyon yeteneklerinin de azaldığını göstermektedir. Bu bulgularla korele bir şekilde diğer EMT belirteçlerinden fibronektin ve vimentin ekspresyonunda azalma gözlemlendi. HT-29 kanser hücrelerinde ise 5-FU ve canertinib tek başına uygulandığında kontrole kıyasla hücre invazyonunda değişim gözlenmezken, Pd(II) tek başına ve canertinib ile kombinasyonu ve 5-FU ve canertinib kombinasyonunda hücrenin invazyon kapasitesi önemli ölçüde azalmıştır. Bunun yanı sıra HT-29 hücrelerinin migrasyon yeteneği aynı şekilde Pd(II), 5-FU ve canertinib tek başına uygulandığında kontrole kıyasla kısmen artarken, kombinasyon tedavilerinde değişim göstermemiştir. Fakat Pd(II) ve canertinib kombinasyonunda EMT belirteçlerinden E-kaderin ekspresyonu artarken, N-kaderin ekspresyonunda artış göstermiştir. Fibronektin ifade düzeyi değişmezken, vimentin de azalma gözlemlendi. Daha önce açıklandığı üzere E-kaderin artışı epitelyal karakterin devamı yani iyi prognoz olarak değerlendirilirken, aynı şekilde N-kaderin azalışı beklenmektedir. Fakat HT-29 hücre soyunda N-kaderinde de artış gözlemlendi. Buna rağmen vimentin ekspresyonun azalması, EMT sürecinin inhibe olabileceğini düşündürdü. Bununla birlikte HCT-15 ve HT-29 hücre soyunda tüm tedavi gruplarında kontrole göre koloni oluşturma yeteneklerinin önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi. Yapılan çalışmalarda tirozin kinaz inhibitörlerinin hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerini kısıtladığı gösterilmiştir (Perez-Pinera ve ark. 2007, Zhang ve ark. 2013).

TKI'lere karşı direnç, klinik çalışmalarda aşamalı olarak kullanıldığı ve hastalara uygulandığı için iyi belgelenmiştir (Janne ve ark. 2009). Tirozin kinaz inhibitörlerine daha az duyarlı olmasına neden olan tirozin kinaz domaini içindeki nokta mutasyonlar, TKI'lerine karşı dirençte en çok çalışılan mekanizmalardan biridir. Tirozin kinazlardaki mutasyonların dışında TKI'lerine karşı klinik direnç neden olan mekanizmalarda bulunmaktadır. TKI'lerine karşı varolan ve sonradan kazanılmış direnç için tanımlanan ABC taşıyıcıların neden olduğu direnç bu mekanizmalardan biridir.

ABCB1/Pgp/MDR1, ABCC1/MRP1 ve ABCG2/BCRP taşıyıcılar tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde önemli bir role sahiptir. İmatinib, nilotinib, dasatinib, gefitinib, danusertib ve canertinib, ABCG2/BCRP transportere yüksek affinite ile bağlanan substratlarıdır ve bu transporterın substrat bağlayıcı bölgeleri ile etkileşirler (Erlichman ve ark. 2001, Burger ve ark. 2004, Brendel ve ark. 2007, Hiwase ve ark. 2008, Hegedus ve ark. 2009, Huang ve ark. 2011, Balabanov ve ark. 2011). ABCG2/BCRP kanser hücrelerinden bu tirozin kinaz inhibitörlerinin efluksını artırır ve dirence neden olur. ABCB1/P-gp/MDR1 ayrıca imatinib, nilotinib, dasatinib karşı dirence neden olur (Mahon ve ark. 2003, Illmer ve ark. 2004, Mahon ve ark. 2008, Hegedus ve ark. 2009). Bu tez çalışmasında polarize böbrek hücre soyu Madin-Darby köpek böbrek hücre soyu (MDCK)-II ve MDR1 (*ABCB1*), BCRP (*ABCG2*), MRP1 (*ABCC1*) transfekte edilmiş Madin-Darby köpek böbreği hücreleri ilaç transport deneyleri için kullanılmıştır. SRB sonuçlarına göre Canertinib, 5-FU ve Pd(II), *MDR1*, BCRP, MRP1'in substratı olabileceği öne sürülmüştür. Pd(II) ve canertinib kombinasyonunda ise MDCK-MRP ve MDCK-MDR transfekte hücrelerde, bileşik hücre içerisine daha fazla girebilmiş ve canlılık %50 azalmıştır. Bu durumda canertinib Pd(II)'nin neden olduğu direnci ortadan kaldırmaktadır. Aynı şekilde 5-FU ve canertinib kombinasyonu da MRP ve MDR1'in substratı olan 5-FU bileşiğinin etkinliğini artırarak hücre içerisine girmesine olanak sağlamıştır. Tek başına kullanıldıklarında ilaç taşıyıcılar tarafından hücre dışına atılan bu ilaçlar kombinasyon tedavisi ile hücre içerisine girmeyi başarmıştır. Bu sonuçlar MDR1 ve MRP protein ekspresyon seviyelerinde bakılarak da değerlendirilmiştir. HCT-15 hücrelerinde Pd(II) ve 5-FU bileşiği kontrole kıyasla MRP1 protein ifade düzeyini artırırken canertinib ile kombinasyonu MRP1 proteininin downregülasyonuna neden olmuştur. HT-29 hücrelerinde ise Pd(II) ve 5-FU tedavisinde ekspresyon düzeyleri kontrole göre değişmezken kombinasyon tedavisinde azalma gözlemlendi. HCT-15 hücrelerinde canertinib, Pd(II), 5-FU ve Pd(II) ile canertinib kombinasyonu MDR ekspresyonunda azalmaya neden olurken, 5-FU ile canertinib kombinasyonunda ekspresyon düzeyi kontrole kıyasla değişim göstermemiştir. HT-29 hücrelerinde ise Pd(II) tek başına ve canertinib ile kombinasyonu ve 5-FU ve canertinib kombinasyon tedavisinde MDR ekspresyon düzeylerinde önemli bir azalma gözlemlendi. Farklı çalışmalar EGFR inhibisyonu ABCB1, ABCC1, ABCC2 ve ABCC3 mRNA ekspresyonlarını

baskıladığını göstermiştir (Hoffmann ve ark. 2011). Bunun yanı sıra MEK inhibitörleri U0126 ya da AZD6244'ün *in vitro* MRP1 ve MRP3 ekspresyonlarının downregülasyonuna neden olduğu belirtilmiştir (Lin ve ark. 2013). Dolayısıyla bu çalışmada EGFR inhibisyonu MDR ve MRP1 ekspresyonunu downregüle ederek hücreleri kullanılan bileşiklere karşı daha duyarlı hale getirmiştir.

EGF, VEGF ve ilişkili reseptörlerinin ekspresyonunun anjiyogenez ve kolon hücrelerinde karsinomanın gelişmesine katkı sağlar. Dahası EGFR, VEGFR ve bunların reseptörlerinin fosforilasyonunun, tümör ilişkili endotelial hücrelerde ekspresyon seviyeleri yüksek bulunmuştur. Preklinik modeller, cetuximab ile EGFR bloklanması, VEGF ve IL-8 gibi proanjiyogenik faktörlerin downregülasyonuna neden olduğunu göstermiştir (Ellis 2004). Kolorektal kanserli hastalarda cetuximab ve bevacizumab'ın etkinliği faz 2 çalışmalarında gösterilmiştir (Saltz ve ark. 2007) ve metastatik kolorektal kanserlerinde bevacizumab tedavisinin diğer terapötik rejimlerin terapötik etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir. Bunun dışında EGFR ve VEGF'e karşı monoklonal antikörlerin kombinasyonu kullanılarak faz 3 çalışmaları yapılmış ve bevacizumab, cetuximab ve kemoterapi ajanı şeklinde folfox tedavi yöntemi kullanılmış fakat kemoterapi ajanı tek başına tedavisi ile karşılaştırılınca tedaviye yanıtta hiçbir fark görülmemiştir. Bu nedenle kemoterapi ile birlikte bu ajanların kolorektal kanserine sahip hastalara verilmemesi önerilmiştir (Punt ve ark. 2008). Bu çalışmada da EGFR inhibitörü tek başına ve Pd(II) bileşiği ve 5-FU kemoterapötik ajanı ile birlikte kombinasyon halinde tedavisinin HUVEC hücrelerinde tüp oluşturma yetenekleri bakımından incelendi. Buna göre canertinib erken saatlerden itibaren tüp oluşumuna izin vermezken kombinasyon gruplarında da aynı etkisini devam ettirmiştir. Pd(II) bileşiği tek başına saate bağımlı şekilde tüp oluşumunu bozarken, 5-FU ajanının tek başına tüp oluşturma yeteneği üzerine önemli bir etkisi olmamıştır. Ayrıca bu bileşikler ve EGFR inhibitörü kombinasyon tedavisinin antianjiyogenik etkileri CAM testi ile belirlendi. Buna göre Pd(II) bileşiği tek başına pozitif kontrol olarak kullanılan bevacizumab kadar kapillerin gelişimi üzerine etki gösterirken canertinib ile kombinasyonu kan damarlarının oluşumunu 2 katından fazla şekilde baskılamıştır. Canertinib tek başına doza bağımlı bir şekilde orta derece bir antianjiyogenik etki gösterirken, 5-FU ajanı tek başına tedavisi kapillerin oluşumu üzerine önemli bir etkisi olmamıştır. Fakat aynı şekilde 5-FU ve canertinib kombinasyonu, EGFR yolağının inhibisyonundan kaynaklanan bir etki ile

kan damarlarını baskılayıcı bir etki göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre EGFR yolağı, VEGF fosforilasyonunu arttırdığı için, bu yolağın inhibisyonu ile tümör hücrelerinin damar oluşturarak uzak dokulara metastasının engellenebileceği şeklinde yorum yapılmıştır. Aynı zamanda farklı bir TKI'ü imatinib'in de damar oluşumu üzerine benzer etki gösterdiği bulunmuştur (Özçetina ve ark. 2013). VEGF ligandı Src kinazı aktive ederek, FAK'ın (fokal adhezyon kinaz) sürekli fosforilasyonuna neden olur ve dolayısıyla endotelial hücre migrasyonu ve yaşamına katkı sağlar. Endotelial FAK ekspresyonu, embriyonik gelişim sırasında yeni kan damarlarının oluşumunda gereklidir.

Bu nedenle bu çalışmada kombinasyon gruplarında Src fosforilasyonun azalması dolayısıyla downstream yolağındaki FAK ekspresyonunun azalmasına neden olduğu düşünülmektedir. EGFR yolağının ve downstream yolakların inhibisyonu ve yeni kan damar oluşumu arasında sıkı bir ilişki olduğundan bu yolakların inhibisyonu yeni kan damarlarının oluşumu ve mevcut kan damarlarının gelişimin engellenmesi açısından önem taşımaktadır.

Tüm bu bulguların doğrultusunda, kolon kanserinde EGFR inhibisyonunun Pd(II) bileşiği ile birlikte ilaç direnci, anjiyogenez ve yaşamı kısıtladığı gösterilmiştir. Bu yaklaşımın, gelecek çalışmalar adına tedavi seçenekleri oldukça sınırlı ve başarısız olan kolon kanseri için umut verici olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abolhoda, A., Wilson, A., Ross, H., Danenberg, P.V., Burt, M., Scotto, K.W. 1999.** Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin. Cancer Res*, 5, 3352–3356.
- Abu-Surrah, A.S., Al-Sa'doni, H.H., Abdalla, M.Y. 2008.** Palladium-based chemotherapeutic agents: Routes toward complexes with good antitumor activity. *Cancer Therapy*, 6: 1-10.
- Achen, M.G., Jeltsch, M., Kukk, E., Mäkinen, T., Vitali, A., Wilks, A.F., Alitalo, K., Stacker, S.A. 1998.** Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:548- 53.
- Ahnen, D.J., Macrae, F. 2010.** Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. *UpToDate* 41.
- Airley, R.E., Mobasher, A. 2007.** Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: Novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy*, 53(4): 233–256.
- Ako, E., Yamashita, Y., Ohira, M., Yamazaki, M., Hori, T., Kubo, Sawada, N.T., Hirakawa, K. 2007.** The pan-erbB tyrosine kinase inhibitor CI-1033 inhibits human esophageal cancer cells in vitro and in vivo. *Oncology reports*, 17: 887-893.
- Alberts, S.R., Horvath, W. L., Sternfeld, W.C., Goldberg, R.M., Mahoney, M.R., Dakhil, S.R., Donohue, J.H. 2005.** Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin for patients with unresectable liver-only metastases from colorectal cancer: A North Central Cancer Treatment Group phase II study. *Journal of Clinical Oncology*, 23(36), 9243–9249.
- Allen, L.F., Lenehan, P.F., Eiseman, I.A., Elliott, W.L., Fry, D.W. 2002.** Potential benefits of the irreversible pan-erbB inhibitor, CI-1033, in the treatment of breast cancer. *Semin Oncol*, 29:11–21.
- Alvarado-Kristensson, M., Melander, F., Leandersson, K., Rönnstrand, L., Wernstedt, C., Andersson, T. 2004.** p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils. *J Exp Med*, 199: 449–458.
- Amersi, F., Agustin, M., & Ko, C.Y. 2005.** Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and health services. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 18(3), 133–140.
- Anderson, J.C. 2011.** Risk factors and screening for colorectal cancer. *Colorectal Cancer Screening Springer*, 7–23.
- Annick, N., Lionel, L., Carine, M. 2011.** Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 82(5): 427–434.

Anonim, 2002. World Health Organization. Cancer Incidence in Five Continents 2002. The World Health Organization and The International Agency for Research on Cancer Lyon.

Anonim, 2006. National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology: colorectal cancer, version: 2. United States.

Anonim, 2006. National Institutes of Health. Department of Health and Human Services & National Institutes of Health. What You Need To Know About Cancer of the Colon and Rectum. 2006. Bethesda, U.S.

Anonim, 2007. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective 2007. American Institute for Cancer Research Washington, DC.

Anonim, 2009. American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures Special Edition 2005. Oklahoma City, http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0.asp Erişim tarihi: 26.05.2009.

Anonim, 2013a. Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2015.

Anonim, 2013b. Muse™ Mitopotential Kit El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2015.

Anonim, 2013c. Muse™ Caspase-3/7 Kit El Kitapçığı. Almanya, Erişim tarihi: 30.10.2015.

Anonim, 2013d. Muse™ H2A.X Activation Dual Detection Kit El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:20.07.2015

Anonim, 2013e. Muse™ Oxidative stress El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2015.

Anonim, 2013f. Muse™ PI3K Activation Dual Detection El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2015.

Anonim, 2013g. Muse™ Cell Cycle detection El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2015.

Anonim, 2013h. Muse™ LC3-II El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2015.

Anonim, 2014. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014. Atlanta, GA.

Ari, F., Ulukaya, E., Sarimahmut, M., Yilmaz, V. T. 2013. Palladium (II) saccharinate complexes with bis (2-pyridylmethyl) amine induce cell death by apoptosis in human breast cancer cells in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(11): 3016-3021.

Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4):683-691.

- Arteaga, C.L. 2001.** The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol*, 19:32S-40S
- Ashkenazi A. 2008.** Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19(3): 325-331.
- Assef, Y., Rubio, F., Coló, G., del Mónaco, S., Costas, M.A., Kotsias, B.A. 2009.** Imatinib resistance in multidrugresistant K562 human leukemic cells. *Leuk. Res*, 33:710, 716.
- Auerbach, R., Lewis, R.L., Shanners, B.L. 2000.** Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev*, 19:167-72.
- Auerbach, R., Lewis, R.L., Shanners, B.L., Kubai, L., Akhtar, N. 2003.** Angiogenesis Assays: A Critical Overview, *Clin Chem*, 49:32-40.
- Balabanov, S., Gontarewicz, A., Keller, G., Raddrizzani, L., Braig, M., Bosotti, R., Moll, J., Jost, E., Barrett, C., Rohe, I. 2011.** ABCG2 overexpression represents a novel mechanism for acquired resistance to the multi-kinase inhibitor Danusertib in BCR-ABL-positive cells in vitro. *PLoS One*, 6: 19164.
- Baldwin, M.E., Catimel, B., Nice, E.C., Roufail, S., Hall, N.E., Stenvers, K.L., Karkkainen, M.J., Alitalo, K., Stacker, S.A., Achen, M.G. 2001.** The specificity of receptor binding by vascular endothelial growth factor-D is different in Mouse and man. *J Biol Chem*, 276:19166-71.
- Balmanno, K., Cook, S.J. 2009.** Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ*, 16: 368–377.
- Bardou, M., Barkun, A. N., & Martel, M. 2013.** Obesity and colorectal cancer. *Gut*, 62(6): 933–947.
- Basanez, G., Nechushtan, A., Drozhinin, O., Chanturiya, A., Choe, E., Tutt, S., Wood, K. A., Hsu, Y. T., Zimmerberg, J., and Youle, R. J. 1999.** Bax, but not Bcl-XL decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 96:5492-5497.
- Bauchnecht, T., Kohler, M., Janz, I., Pfliederer, A. 1989.** The occurrence of epidermal growth factor receptors and the characterization of EGF-like receptors and the characterization of EGF-like factors in human ovarian, endometrial, cervical and breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 115: 193–199.
- Behrer S., Adès, L., Braun, T., Galluzzi, L., Grosjean, J., Fabre, C., Le Roux, G., Gardin, C., Martin, A., de Botton, S., Fenaux, P., Kroemer, G. 2008.** Erlotinib exhibits antineoplastic off-target effects in AML and MDS: a preclinical study. *Blood*, 111(4): 2170-80.
- Bellomo, D., Headrick, J.P., Silins, G.U., Paterson, C.A., Thomas, P.S., Gartside, M., Mould, A., Cahill, M.M., Tonks, I.D., Grimmond, S.M., Townson, S., Wells, C., Little, M., Cummings, M.C., Hayward, N.K., Kay, G.F. 2000.** Mice lacking the

vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res*, 86:29-35.

Bennett, M.R., Gibson, D.F., Schwartz, S.M. and Tait, J.F. 1995. Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine. *Circ. Res*, 77:1136 ± 1142

Bevan, S., Woodford-Richens, K., Rozen, P., Eng, C., Young, J., Dunlop, M., Neale, K., Phillips, R., Markie, D., Rodriguez-Bigas M, Leggett B, Sheridan E, Hodgson, S, Iwama T, Eccles D, Bodmer W, Houlston R, Tomlinson, I. 1999. Screening SMAD1, SMAD2, SMAD3, and SMAD5 for germline mutations in juvenile polyposis syndrome. *Gut*, 45:406-8.

Boardman, L.A., Morlan, B.W., Rabe, K.G., et al 2007. Colorectal cancer risks in relatives of young-onset cases: is risk the same across all first-degree relatives? *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5(10):1195–1198

Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A., Greenberg, M.E. 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*, 286: 1358–1362.

Borst, P., Elferink, O. 2002. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem*, 71, 537–592.

Bottaro, D.P., Liotta, L.A. 2003. Cancer: Out of air is not out of action. *Nature*, 423:593-5.

Boyle, P., Langman, J.S. 2000. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*, 321(7264):805–808

Brendel, C., Scharenberg, C., Dohse, M., Robey, R.W., Bates, S.E., Shukla, S., Ambudkar, S.V., Wang, Y., Wennemuth, G., Burchert, A. 2007. Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. *Leukemia*, 21: 1267–1275.

Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara R.L., Cepero, E., Boise L.H. 2013. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*, 14:32.

Buja, L.M., Eigenbrodt, M.L., Eigenbrodt, E.H. 1993. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med*, 117(12):1208-14.

Burger, H., van Tol, H., Boersma, A.W., Brok, M., Wiemer, E.A., Stoter, G., Nooter, K. 2004. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*, 104: 2940–2942.

Burgess, A.W., Cho, H.S., Elgenblot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P.J., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Siwkowski, M.X., Ward, C.W. & Yokoyama, S., 2003. An open-and -shut case? Recent insights into the activation of EGF/ ErbB receptors. *Mol Cell*, 12: 541–552.

- Cadigan, K.M., Liu, Y.I. 2006.** Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci*, 119:395-402.
- Cao, C., Subhawong, T., Albert, J.M., K.W., Geng, L. 2006.** Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells. *Cancer Res*, 66: 10040–10047.
- Casimiro, C., Ana, R. 2004.** Quesada and Miguel Angel Medinab, Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. *Biochem Biophys Res Commun*, 23(320): 402-8.
- Center, M. M., Jemal, A., & Ward, E. 2009.** International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 18(6): 1688–1694.
- Center, M. M., Jemal, A., Smith, R. A., & Ward, E. 2009.** Worldwide variations in colorectal cancer. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 59(6): 366–378.
- Cepero, E., King, A.M., Coffey, L.M., Perez, R.G., Boise, L.H. 2005.** Caspase-9 and effector caspases have sequential and distinct effects on mitochondria. *Oncogene*, 24(42): 6354–6366.
- Chang, G., Roth, C. 2001.** Structure of MsbA from E. coli: A homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science*, 293:1793–1800.
- Chao, A., Thun, M. J., Connell, C. J., McCullough, M. L., Jacobs, E. J., Flanders, W. D., Calle, E. E. 2005.** Meat consumption and risk of colorectal cancer. *Journal of the American Medical Association*, 293(2): 172–182.
- Cheng, L., Lai, M.D 2003.** Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 9:2642-9.
- Cho, S., Shin, A., Park, S. K., Shin, H.R., Chang, S.-H., Yoo, K.-Y. 2015.** Alcohol drinking, cigarette smoking and risk of colorectal cancer in the Korean multi-center cancer cohort. *Journal of Cancer Prevention*, 20(2): 147–152.
- Choi, S.-W., Stickel, F., Baik, H. W., Kim, Y.-I., Seitz, H. K., Mason, J. B. 1999.** Chronic alcohol consumption induces genomic but not p53-specific DNA hypomethylation in rat colon. *The Journal of Nutrition*, 129(11): 1945–1950.
- Chua, D.T., Sham J.S., Kwong, D.L., Choy, D.T., Au, G. K., Wu P.M. 1996.** Prognostic value of paranasopharyngeal extension of nasopharyngeal carcinoma. A significant factor in local control and distant metastasis. *Cancer*, 78: 202–210.
- Chung, K. Y., Shia, J., Kemeny, N. E. Shah, M., Schwartz, G.K., Tse, A., Hamilton, A., Pan, D., Schrag, D., Schwartz, L., Klimstra, D.S., Fridman, D., Kelsen, D.P., Saltz, L.B. 2005.** Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology*, 23(9):1803–1810.
- Ciardiello, F. 2000.** Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs*, 60(1):25–32.

- Citri, A., Yarden, Y. 2006.** EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7): 505–516.
- Clark, W., Gillespie, D.A. 1997.** Transformation by v-Jun prevents cell cycle exit and promotes apoptosis in the absence of serum growth factors. *Cell Growth Differ*, 8: 371–380.
- Codogno, P., Meijer, A.J. 2005.** Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.*, 2: 1509–1518.
- Cohen G.M. 1997.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, 326(1): 1-16.
- Cohen, R.B. 2003.** Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 2: 246-251.
- Conn, G., Bayne, M.L., Soderman, D.D., Kwok, P.W., Sullivan, K.A., Palisi, T.M., Hope, D.A., Thomas, K.A. 1990.** Amino acid and cDNA sequence of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:2628- 32.
- Cunningham, D., Humblet Y., Siena S., Khayat, D., Bleiberg H., Santoro A., Bets, D., Mueser M., Harstrick A., Verslype A., Chau I., Van Cutsem, E. 2004.** Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 351: 337–345.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena S. Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I., Van Cutsem, E. 2004.** Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecanrefractory metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 351(4):337–345.
- Dameron, K.M., Volpert, O.V., Tainsky, M.A., Bouck N. 1994.** Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*, 265:1582-4.
- Danielsen, S.A., Eide, P.W., Nesbakken, A., Guren, T., Leithe, E., Lothe R.A. 2015.** Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1855(1): 104–121.
- Davies, R.J., Miller, R., Coleman, N. 2005.** Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat Rev Cancer*, 5:199–209.
- de Jong, A.E., Morreau, H., Nagengast, F.M., Mathus-Vliegen, E.M., Kleibeuker, J.H., Griffioen, G., Cats, A., Vasen, H.F. 2005.** Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*, 100(1):139–143.
- de Jong, J.S., van Diest, P.J., van der Valk, P., Baak, J.P. 1998.** Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol*, 184: 53-57.

- Demirci, B., Demirci, F., Dönmez, A. A. , Franz, G., Paper, D. H., Başer, K.H.C. 2005.** Effects of Salvia Essential Oils on the Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay. *Pharmaceutical Biology*, 43: 666–671.
- Demirci, F., Paper, D.H., Franz, G., Baser, K.H.C. 2004.** Investigation of the Origanum onites L. essential oil using the chorioallantoic membrane (CAM) assay. *J Agric Food Chem*, 52: 251-4.
- Denekamp, J. 1993.** Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol*, 66:181- 96.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., Martinou, J.C. 1999.** Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J. Cell Biol*, 144 (5): 891-901.
- Djerf Severinsson, E.A., Trinks, C., Gréen, H., Abdiu, A., Hallbeck, A.L., Stål, O., Walz, T.M. 2011.** The pan-ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor canertinib promotes apoptosis of malignant melanoma in vitro and displays anti-tumor activity in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 414(3): 563-8.
- Djerf, E.A., Trinks, C., Abdiu, A., Thunell, L.K., Hallbeck, A.L., Walz, T.M. 2009.** ErbB receptor tyrosine kinases contribute to proliferation of malignant melanoma cells: inhibition by gefitinib (ZD1839). *Melanoma Res*, 19(3): 156-66.
- Dolatkhah, R., Somi, M. H., Kermani, I. A., Ghojzadeh, M., Jafarabadi, M. A., Farassati, F., & Dastgiri, S. 2015.** Increased colorectal cancer incidence in Iran: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, 15(1): 997.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., Ross, D.D. 1998.** A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 15665–15670.
- Dvorak, H.F. 2002.** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clinl Oncol*, 20: 4368-80
- Ellis, L.M. 2004.** Epidermal growth factor receptor in tumor angiogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am*, 18: 1007–1021.
- Ellis, L.M. 2004.** Epidermal growth factor receptor in tumour angiogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am*, 18:1007–21.
- Elmore, S. 2007.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 35(4): 495–516.
- Enholm, B., Paavonen, K., Ristimäki, A., Kumar. V., Gunji, Y., Klefstrom, J., Kivinen, L., Laiho, M., Olofsson, B., Joukov, V., Eriksson, U., Alitalo, K.1997.** Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene*, 14: 2475-83.

- Erlichman, C., Boerner, S.A., Hallgren, C.G., Spieker, R., Wang, X.Y., James, C.D., Scheffer, G.L., Maliepaard, M., Ross, D.D., Bible, K.C., 2001.** The HER tyrosine kinase inhibitor CI1033 enhances cytotoxicity of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and topotecan by inhibiting breast cancer resistance protein-mediated drug efflux. *Cancer Res*, 61: 739–748.
- Ethier, C., Labelle, Y., Poirier, G.G. 2007.** PARP-1-induced cell death through inhibition of the MEK/ERK pathway in MNNG-treated HeLa cells. *Apoptosis*, 12: 2037–2049.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M. 1992.** Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 69: 119–128.
- Faber, A.C, Li, D., Song, Y., Liang, M.C., Yeap, B.Y., Bronson, R.T., Lifshits, E., Chen, Z., Maira, S.M., Garcia-Echeverria, C., Wong, K.K., Engelman, J.A. 2009.** Differential induction of apoptosis in HER2 and EGFR addicted cancers following PI3K inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 19503–19508.
- Fader, C.M., Sánchez, D.G., Mestre, M.B., Colombo, M.I. 2009.** TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1793:1901–16.
- Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.E., Campbell, P.A., Henson, P.M. 1992.** Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J. Immunol*, 149: 4029 ± 4035.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M. 1992.** Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol*. 148: 2207 ± 2216.
- Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Negri, E., Straif, K., Romieu, I., La Vecchia, C., Boffetta, P., Jenab, M., Jenab, M. 2011.** Alcohol drinking and colorectal cancer risk: An overall and dose-response metaanalysis of published studies. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 22(9): 1958–1972.
- Fent, K. 2001.** Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro*, 15: 477-488.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F. 2015.** Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5): 359–386.
- Ferrara, N. 2004.** Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25: 581–611.

Ferrara, N., Jakeman, L., Houck, K., Leung, D.W. 1992. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*, 13: 18-32.

Ferraz, K. O., Cardoso, G. M., Bertollo, C. M., Souza-Fagundes, E. M., Speziali, N., Zani, C. L., Beraldo, H. 2011. N (4)-tolyl-2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their palladium (II) and platinum (II) complexes: Cytotoxicity against human solid tumor cells. *Polyhedron*, 30(2): 315-321.

Ferraz, K. S., Ferandes, L., Carrilho, D., Pinto, M. C., de Fátima Leite, M., Souza Fagundes, E. M., Beraldo, H. 2009. 2-Benzoylpyridine-N (4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium (II) complexes: cytotoxicity against leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(20): 7138-7144.

Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J.H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R.H., Clevers, H. 2001. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol*, 3:433-8.

Folkman, J. 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*, 82: 4-6.

Folkman, J. 1995a. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1: 27-31.

Folkman, J. 1995b. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*, 333:1757-63.

Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285:1182-6.

Freeman, D.J., Norrie, J., Sattar, N., Neely, R.D., Cobbe, S.M., Ford, I., Isles, C., Lorimer, A.R., Macfarlane, P.W., McKillop, J.H., Packard, C.J., Shepherd, J., Gaw, A. 2001. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation*, 103:357-62

Frezza, E. E., Wachtel, M. S., Chiriva-Internati, M. 2006. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut*, 55(2): 285–291.

Fry, D.W. 1999. Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor Family of Tyrosine Kinases as an Approach to Cancer Chemotherapy: Progression from Reversible to Irreversible Inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, 82(2): 207–218.

Fry, D.W. 1999. Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor Family of Tyrosine Kinases as an Approach to Cancer Chemotherapy: Progression from Reversible to Irreversible Inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, 82(2): 207–218.

Fry, D.W. 2000. Site-directed irreversible inhibitors of the erbB family of receptor tyrosine kinases as novel chemotherapeutic agents for cancer. *Anticancer Drug Des*, 15:3–16.

- Fry, D.W., Bridges, A.J., Denny, W.A., Doherty, A., Greis, K.D., Hicks, J.L., Hook, K.E., Keller, P.R., Leopold, W.R., Loo, J.A., McNamara, D.J., Nelson, J.M., Sherwood, V., Smaill, J.B., Trumpp-Kallmeyer, S., Dobrusin, E.M. 1998.** Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:12022–7.
- Fukuyo, Y., Hunt, C.R., Horikoshi, N. 2010.** Geldanamycin and its anticancer activities. *Cancer Lett.*, 290: 24–35.
- Fulda, S., Debatin, K.M. 2006.** Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25: 4798–4811.
- Fung, C., Chen X., Jennifer R. Grandis, J.R., Duvvuri, U. 2012.** EGFR tyrosine kinase inhibition induces autophagy in cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 13(14):1417–1424.
- Garoufis, A., Hadjikakou, S.K., Hadjiliadis N. 2009.** "Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents", *Coordination Chemistry Reviews*, 253: 1384–1397.
- Gatalica, Z., Torlakovic, E. 2007.** Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Fam Cancer*, 7(1):15-26.
- Gerhardsson de Verdier, M., Hagman, U., Peters, R. K., Steineck, G., Övervik, E. 1991.** Meat, cooking methods and colorectal cancer: A case-referent study in Stockholm. *International Journal of Cancer*, 49(4): 520–525.
- Gille, J., Swerlick, R.A., Caughman, S.W. 1997.** Transforming growth factor α -induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *EMBO J*, 16: 750-759.
- Gillet, G., Guerin, M., Trembleau, A., Brun, G. 1995.** A Bcl-2-related gene is activated in avian cells transformed by the Rous sarcoma virus. *EMBO J*, 14: 1372–1381.
- Giovannucci, E. 2001.** An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, 10(7): 725–731.
- Giovannucci, E. 2004.** Should smokers be considered a high-risk group for colorectal cancer? *Digestive and Liver Disease*, 36(10): 643–645.
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Ascherio, A., Kearney, J., Willett, W. C. 1994.** A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in U.S. men. *Journal of the National Cancer Institute*, 86(3): 183–191.
- Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E. 2002.** Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer*, 2: 48–58.

Grady, W.M. 2004. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23:11-27.

Grande, M., Milito, G., Attina, G.M., Cadeddu, F., Muzi, M.G., Nigro, C., Rulli, F., Farinon, A.M. 2008. Evaluation of clinical, laboratory and morphologic prognostic factors in colon cancer. *World J Surg Oncol*, 6:98

Green, J.B., Timmcke, A.E., Mitchell, W.T., Hicks, T.C., Gathright, J.B. Jr., Ray J.E. 1993. Mucinous carcinoma: just another colon cancer? *Dis Colon Rectum*, 36:49–54.

Gribovskaja-Rupp, I., Kosinski, L., Ludwig, K. A. 2011. Obesity and colorectal cancer. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 24(4): 229–243.

Grimberg, A., Cohen, P. 2000. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 183(1): 1–9.

Gross, M.E., Zorbas, M.A., Daniels, Y.L. Garcia, R., Gallick, G.E., Olive, M., Brattain, M.G., Boman, B.M., Yeoman, L.C. 1991. Cellular growth response to epidermal growth factor in colon carcinoma cells with an amplified epidermal growth factor receptor derived from a familial adenomatous polyposis patient. *Cancer Res*, 51: 1452–1459.

Grunta, T.W., Wagnera ,R., Gruschd, M., Bergerd,W., Singere, C.F., Mariand, B., Zielinskib, C.C., Lupu R. 2009. Interaction between fatty acid synthase- and ErbB-systems in ovarian cancer cells. 385(3): 454–459.

Gryfe, R. 2006. Clinical implications of our advancing knowledge of colorectal cancer genetics: inherited syndromes, prognosis, prevention, screening and therapeutics. *Surg Clin North Am*, 86:787–817

Gump, J.M., Thorburn, A. 2011. Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends in Cell Biology*, 21: 7

Gunter, M.J., Leitzmann, M. F. 2006. Obesity and colorectal cancer: Epidemiology, mechanisms and candidate genes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(3): 145–156.

Güney, E., Kaya, Y., Yilmaz, V.T. ve Gumus, S. 2011a. “Synthesis, experimental and theoretical characterization of palladium(II) and platinum(II) saccharinate complexes with 2-(2-pyridyl)benzimidazole,” *Spectrochimica Acta Part A*, 79: 1171– 1178.

Güney, E., Yilmaz, V. T., Ari, F., Buyukgungor, O., Ulukaya, E. 2011. Synthesis, characterization, structures and cytotoxic activity of palladium (II) and platinum (II) complexes containing bis (2-pyridylmethyl) amine and saccharinate. *Polyhedron*, 30(1): 114-122.

Güney, E., Yilmaz, V. T., Ari, F., Buyukgungor, O., Ulukaya, E. 2011b. Synthesis, characterization, structures and cytotoxic activity of palladium (II) and platinum (II)

complexes containing bis (2-pyridylmethyl) amine and saccharinate. *Polyhedron*, 30(1): 114-122.

Güney, E., Yilmaz, V. T., Ari, F., Buyukgungor, O., Ulukaya, E. 2011b. Synthesis, characterization, structures and cytotoxic activity of palladium (II) and platinum (II) complexes containing bis (2-pyridylmethyl) amine and saccharinate. *Polyhedron*, 30(1): 114-122.

Haber, M., Smith, J., Bordow, S., Flemming, C., Cohn, S., London, W., Marshall, G., Norris, M. 2006. Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of neuroblastoma. *J. Clin. Oncol*, 24: 1546–1553.

Hale N.A., Ledbetter, D.J.,Gawriluk T.R., Rucke E.B.3rd. 2013. Autophagy Regulation and role in development. *Autophagy*, 9(7): 951–972.

Hassan, C., Zullo, A., Risio, M., Rossini, F.P., Morini, S. 2005. Histologic risk factors and clinical outcome in colorectal malignant polyp: a pooled-data analysis. *Dis Colon Rectum*, 48:1588–96.

Hassan, W., Kenny Chitcholtan, K., Sykes, P., Garrill, A. 2016. A Combination of Two Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors, Canertinib and PHA665752 Compromises Ovarian Cancer Cell Growth in 3D Cell Models. *Oncol Ther* 4: 257–274.

Hassan, W., Kenny Chitcholtan, K., Sykes, P., Garrill, A. 2016. A Combination of Two Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors, Canertinib and PHA665752 Compromises Ovarian Cancer Cell Growth in 3D Cell Models. *Oncol Ther* 4: 257–274.

He, Q., Liang, C.H., Lippard, S.J. 2000. Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 97: 5768.

He, X., Chen, Z., Jia, M. Zhao, X. 2013. Downregulated E-cadherin expression indicates worse prognosis in asian patients with colorectal cancer: Evidence from meta-analysis. *PLoS One*. 8: 70858

Heerboth, S., Lapinska, K., Snyder, N., Leary, M., Rollinson, S., Sarkar, S. 2014. The use of epigenetic drugs in diseases: An overview. *Genet. Epigenet*, 2014(6): 9–19.

Hegedus, C., Ozvegy-Laczka, C., Apati, A., Magocsi, M., Nemet, K., Orfi, L., Keri, G., Katona, M., Takats, Z., Varadi, A., 2009. Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: Implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *Br. J. Pharmacol*, 158: 1153–1164.

Herbst, R.S., Shin, D.M. 2002. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer*, 94:1593-611

Hilgendorf, C., Ahlin, G., Seithel, A., Artursson, P., Ungell, A., Karlsson, J. 2007. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab. Dispos*, 35: 1333–1340.

Hippert, M.M., O'Toole, P.S., Thorburn, A. 2006. Autophagy in Cancer: Good, Bad, or Both? *Cancer Res*, 66:9349-9351.

Hirayama, C., Watanabe, H., Nakashima, R., Nanbu, T., Hamada, A., Kuniyasu, A., Nakayama, H., Kawaguchi, T., Saito, H. 2008. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. *Pharm. Res*, 25:827–835.

Hiwase, D.K., Saunders, V., Hewett, D., Frede, A., Zrim, S., Dang, P., Eadie, L., To, L.B., Melo, J., Kumar, S., 2008. Dasatinib cellular uptake and efflux in chronic myeloid leukemia cells: Therapeutic implications. *Clin. Cancer Res*, 14: 3881–3888.

Hoffmann, K., Xiao, Z., Franz, C., Mohr, E., Serba, S., Büchler, M.W., Schemmer, P. 2011. Involvement of the epidermal growth factor receptor in the modulation of multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Cancer Cell Int*, 11: 40.

Holmgren, L., O'Reilly, M.S., Folkman, J. 1995. Dormancy of micrometastases: balance proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*, 1:149-53.

Holohan, C., van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., Johnston, P.G. 2013. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nat. Rev*, 13: 714–726.

Homburg, C.H., de Haas, M., von dem Borne, A.E., Verhoeven, A.J., Reutelingsperger, C.P., Roos, D. 1995. Human neutrophils lose their surface FcγRIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*, 85: 532 ± 540

Horst, D., Chen, J., Morikawa, T., Ogino, S., Kirchner, T., Shivdasani, R.A. 2012. Differential WNT activity in colorectal cancer confers limited tumorigenic potential and is regulated by MAPK signaling. *Cancer Res*, 72: 1547–1556

Houghton, P., Fang R., Techatanawat, I, Steventon G., Hylands, P.J., Lee C.C. 2007. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, 42(4):377-87.

Howe-Grant, M., Wu, K. C., Bauer, W. R., Lippard, S. J. 1976. Binding of platinum and palladium metallointercalation reagents and antitumor drugs to closed and open DNAs. *Biochemistry*, 15(19): 4339-4346.

Hu, F.B., Manson, J.E., Liu, S., Hunter, D., Colditz, G.A., Michels, K.B., Speizer, F.E., Giovannucci, E. 1999. Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(6): 542–547.

Hu, J.C., Sadeghi, P., Pinter-Brown, L.C., Yashar, S., Chiu, M.W. 2007. Cutaneous side effects of epidermal growth factor receptor inhibitors: clinical presentation, pathogenesis, and management. *J Am Acad Dermatol*, 56:317–26.

Huang, W.C., Chen, Y.J., Li, L.Y., Wei, Y.L., Hsu, S.C., Tsai, S.L., Chiu, P.C., Huang, W.P., Wang, Y.N., Chen, C.H. 2011. Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells. *J. Biol. Chem*, 286: 20558–20568.

Huang, Z., Zhang, N., Zha, L. 2014. Aberrant expression of the autocrine motility factor receptor correlates with poor prognosis and promotes metastasis in gastric carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15: 989–997.

Hughes, D.P.M., Thomas, D.G., Giordano, T.J., McDonagh, K.T., Baker, L.H. 2006. Essential erbB Family Phosphorylation in Osteosarcoma as a Target for CI-1033 Inhibition. *Pediatr Blood Cancer*, 46: 614–623.

Hynes, N. E., Lane H. A., 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 5(5):341–354.

Icel, C., Yilmaz, V.T., Kaya Y., Samli, H., Harrison, W.T.A, Buyukgungor, O. 2015. New palladium(II) and platinum(II) 5,5-diethylbarbiturate complexes with 2-phenylpyridine, 2,2'-bipyridine and 2,2'-dipyridylamine: synthesis, structures, DNA binding, molecular docking, cellular uptake, antioxidant activity and cytotoxicity. *Dalton Trans.* 44: 6880–6895.

Ikehatai, M., Ogawa, M., Yamada, Y., Tanaka,S., Ueda, K., Iwakawa S. 2014. Different Effects of Epigenetic Modifiers on the Cytotoxicity Induced by 5-Fluorouracil, Irinotecan or Oxaliplatin in Colon Cancer Cells. *Biol. Pharm. Bull*, 37(1): 67-73.

Ikehatai, M., Ogawa, M., Yamada, Y., Tanaka,S., Ueda, K., Iwakawa S. 2014. Different Effects of Epigenetic Modifiers on the Cytotoxicity Induced by 5-Fluorouracil, Irinotecan or Oxaliplatin in Colon Cancer Cells. *Biol. Pharm. Bull*, 37(1): 67-73.

Illmer, T., Schaich, M., Platzbecker, U., Freiberg-Richter, J., Oelschlagel, U., von Bonin, M., Pursche, S., Bergemann, T., Ehninger, G., Schleyer, E. 2004. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia*, 18: 401–408.

Imai, Y., Ishikawa, E., Asada, S., Sugimoto, Y. 2005. Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2. *Cancer Res*, 65: 596–604.

Imamura, Y., Morikawa, T., Liao, X., Lochhead, P., Kuchiba, A., Yamauchi, M., Qian, Z.R., Nishihara, R., Meyerhardt, J.A., Haigis, K.M., Fuchs, C.S., Ogino, S. 2012. Specific mutations in KRAS codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 BRAF wild-type colorectal cancers. *Clin. Cancer Res*, 18:4753–4763.

Issa, J.P. 2008. Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clin Cancer Res*, 14:5939-40.

- Jackson-Thompson, J., Ahmed, F., German, R.R., Lai, S.M., Friedman, C. 2006.** Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998-2001. *Cancer*, 107(5): 1103–1111.
- Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., Eskelinen, E.L. 2004.** Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci.* 117:4837–48.
- Janne P.A., von Pawel, J., Cohen, R.B., Crino, L., Butts, C.A., Olson, S.S., Eiseman, I.A., Chiappori, A.A., Yeap, B.Y., Lenehan, P.F., Dasse, K., Sheeran, M., Bonomi, P.D. 2007.** Multicenter, randomized, phase II trial of CI-1033, an irreversible pan-ERBB inhibitor, for previously treated advanced non smallcell lung cancer. *J Clin Oncol*, 25(25):3936-44
- Janne, P.A., Gray, N., Settleman, J. 2009.** Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 8:709–723.
- Janne, P.A., Gray, N., Settleman, J. 2009.** Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov*, 8: 709–723.
- Janout, V., Kolla'rova', H. 2001.** Epidemiology of colorectal cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacku Olomouc Czech Repub*, 145:5–10.
- Jass, J.R., Whitehall, V.L., Young, J., Leggett, B.A. 2002.** Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology*. 123:862-76.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. 2010.** Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J. Clin*, 60: 277–300.
- Johnson, D., Agochiya, M., Samejima, K., Earnshaw, W., Frame, M., Wyke, J. 2000.** Regulation of both apoptosis and cell survival by the v-Src oncoprotein. *Cell Death Differ*, 7: 685–696.
- Jonjic, N., Kovac, D., Krasevic, M. et al. 1997.** Epidermal growth factor-receptor expression correlates with tumor cell proliferation and prognosis in gastric cancer. *Anticancer Res*, 17: 3883–3888.
- Joukov, V., Kumar, V., Sorsa, T., Arighi, E., Weich, H., Saksela, O., Alitalo, K. 1998.** A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. *J Biol Chem*, 20:6599-602.
- Kambara, T., Simms, L.A., Whitehall, V.L., Spring, K.J., Wynter, C.V., Walsh, M.D., Barker, M.A., Arnold, S., McGivern, A., Matsubara, N., Tanaka, N., Higuchi, T., Young, J., Jass, J.R., Leggett, B.A. 2004.** BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*, 53:1137–1144.
- Kang, H., O'Connell, J.B., Maggard, M.A., Sack, J., Ko, C.Y. 2005.** A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum*, 48: 1161–8.

Kappelmann, M., Bosserhoff, A., Kuphal, S. 2014. AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma. *Eur J Cell Biol*, 93(1-2):76-81.

Katayama, K., Yoshioka, S., Tsukahara, S., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y. 2007. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein. *Mol. Cancer Ther*, 6: 2092–2102.

Keter, F. K., Kanyanda, S., Lyantagaye, S. S., Darkwa, J., Rees, D. J. G., Meyer, M. 2008. In vitro evaluation of dichloro-bis (pyrazole) palladium (II) and dichloro-bis (pyrazole) platinum (II) complexes as anticancer agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(1): 127-138.

Khajah, M.A., Al Saleh, S., Mathew, P.M., Luqmani Y.A. 2012. Differential Effect of Growth Factors on Invasion and Proliferation of Endocrine Resistant Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 7(7): 41847

Kiba, A., Sagara, H., Hara, T., Shibuya M. 2003. VEGFR-2-specific ligand VEGF-E induces non-edematous hyper-vascularization in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 301:371-7

Kim, M.S., Baek, J.H., Park, M.T., Sohn, T.K., Kim, S.E., Lee, J.J., Kim, K.W. 2001. Anti-invasive activity of torilin, a sesquiterpene compound isolated from *Torilis japonica*. *Oncol Rep*. 8: 359-64.

Kluftinger, A.M., Robinson, B.W., Quenville, N.F. Finley, R.J., Davis, N.L. 1992. Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancers. *Surg Oncol*, 1: 97–105.

Kuhnert, F., Davis, C.R., Wang, H.T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R., Kuo, C.J. 2004. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:266-71.

Kune, G. A., Vitetta, L. 1992. Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer: A review of the scientific evidence from 1957 to 1991. *Nutrition and Cancer*. 18(2): 97–111.

Larsson, S. C., Orsini, N., Wolk, A. 2005. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: A meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(22): 1679–1687.

Lee, I.-M., Shiroma, E. J., Lobelo, F., Puska, P., Blair, S. N., Katzmarzyk, P. T., the Lancet Physical Activity Series Working Group. 2012. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: An analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet*, 380(9838):219–229

Lei, K., Nimnual, A., Zong, W.X., Kennedy, N.J., Flavell, R.A., Thompson, C.B. 2002. The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol*, 22: 4929–4942.

Leslie, A., Carey, F.A., Pratt, N.R., Steele, R.J. 2002. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*, 89:845-60.

Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., Ferrara, N. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246:1306-9.

Li, D., L Ambrogio, L., Shimamura, T., Kubo, S., Takahashi, M., Chirieac, L.R., RF Padera, R.F., GI Shapiro, G.I., Baum, A., Himmelsbach, F., WJ Rettig, W.J., Meyerson, M., Solca, F., Greulich, H., Wong, K.K. 2008. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene*, 27: 4702–4711.

Li, T., Perez-Soler, R. 2009. Skin toxicities associated with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Target Oncol*, 4:107–19.

Li, X, Fan, Z.. 2010. The epidermal growth factor receptor antibody cetuximab induces autophagy in cancer cells by downregulating HIF-1alpha and Bcl-2 and activating the beclin 1/hVps34 complex. *Cancer Res.*, 70: 5942-52.

Li, X., Lu, Y., Pan, T., Fan, Z. 2010. Roles of autophagy in cetuximab-mediated cancer therapy against EGFR. *Autophagy*, 6: 1066-77.

Li, Y., Yang, Z., Li, W., Xu, S., Wang, T., Wang, T., Niu, M., Zhang, S., Jia, L., Li, S. 2016. TOPK promotes lung cancer resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors by phosphorylating and activating c-Jun. *Oncotarget*, 7(6): 6748–6764.

Lillie, R.H.J. 1997. Conn's Biological Stains 9th edn. Ed: Williams, Wilkins, Baltimore.

Lim, Y.J, Rhee J.C., Bae Y.M., Chun W.J. 2007. Celecoxib attenuates 5-fluorouracil-induced apoptosis in HCT-15 and HT-29 human colon cancer cells. *World J Gastroenterol*, 13(13): 1947-1952.

Lim, Y.J, Rhee J.C., Bae Y.M., Chun W.J. 2007. Celecoxib attenuates 5-fluorouracil-induced apoptosis in HCT-15 and HT-29 human colon cancer cells. *World J Gastroenterol*, 13(13): 1947-1952.

Lin, O.S. 2009. Acquired risk factors for colorectal cancer. *Cancer Epidemiology: Modifiable Factors*, 361-72.

Lin, S., Hoffmann, K., Xiao, Z., Jin, N., Galli, U., Mohr, E., Büchler, M.W., Schemmer, P. 2013. MEK inhibition induced downregulation of MRP1 and MRP3 expression in experimental hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int*, 13: 3.

Liu, W.J., Ye, L., Huang, W.F., Guo L.J., Xu, Z.G., Wu, H.L., Yang, C., Liu, H.F. 2016. links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett*, 21(29):62

Longnecker, M. P., Orza, M. J., Adams, M. E., Vioque, J., Chalmers, T. C. 1990. A meta-analysis of alcoholic beverage consumption in relation to risk of colorectal cancer. *Cancer Causes & Control*, 1(1): 59–68.

Lorina, S., Hamaib, A., Mehrpourb, M., Codognob, P. 2013. Autophagy regulation and its role in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 23(5):361–379.

- Luo, S.E. 2015.** Diabetes mellitus increase the risk of colorectal neoplasia: an updated a metaanalysis. *Clinics and research in hapathology and gastroenterology*, 5(21):1679-87.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. 1998.** Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94: 481-490.
- Lynch, H.T., Lynch, J.F., Lynch, P.M., Attard, T. 2008.** Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer*, 7(1):27-39.
- Mahon, F.-X., Belloc, F., Lagarde, V., Chollet, C., Moreau-Gaudry, F., Reiffers, J., et al. 2003.** MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*, 101:2368-2373.
- Mahon, F.X., Belloc, F., Lagarde, V., Chollet, C., Moreau-Gaudry, F., Reiffers, J., Goldman, J.M., Melo, J.V. 2003.** MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*, 101, 2368-2373.
- Mahon, F.X., Hayette, S., Lagarde, V., Belloc, F., Turcq, B., Nicolini, F., Belanger, C., Manley, P.W., Leroy, C., Etienne, G. 2008.** Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res*, 68: 9809-9816.
- Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D. 1997.** Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277:55- 60.
- Mandriota, S.J., Jussila, L., Jeltsch, M., Compagni, A., Baetens, D., Prevo, R., Banerji, S., Huarte, J., Montesano, R., Jackson, D.G., Orci, L., Alitalo, K., Christofori, G., Pepper, M.S. 2001.** Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J*, 20:672-82.
- Mansouri-Torshizi, H., Mahboube, I., Divsalar, A., Saboury, A. A. 2008.** 2, 2'-Bipyridinebutyldithiocarbamatoplatinum (II) and palladium (II) complexes: synthesis, characterization, cytotoxicity, and rich DNA-binding studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(21): 9616-9625.
- Mao, Y., Pan, S., Wen, S. W., Johnson, K. C., the Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. 2003.** Physical inactivity, energy intake, obesity and the risk of rectal cancer in Canada. *International Journal of Cancer*, 105(6): 831-837.
- Martin, S.J., Finucane, D.M., Amarante-Mendes, G.P., O'Brien, G.A., Green, D.R. 1996.** Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J. Biol. Chem*, 271: 28753 ± 28756.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P.M., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie R.C.A.A., LaFace, D.M., Green, D.R. 1995.** Early redistribution of plasma membrane

phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of bcl-2 and abl. *J. Exp. Med.*, 182: 1545 ± 1556.

Martínez, M. E., Jacobs, E. T., Ashbeck, E. L., Sinha, R., Lance, P., Alberts, D. S., Thompson, P. A. 2007. Meat intake, preparation methods, mutagens and colorectal adenoma recurrence. *Carcinogenesis*, 28(9): 2019–2027.

Mathew, R., White, E. 2007. Role of autophagy in cancer. *Autophagy* 7:28-3.

Messa, C., Russo, F., Caruso, M.G. et al. 1998. EGF, TGF α and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncologica*, 37: 285–289.

Meyerhardt, J. A., Giovannucci, E. L., Holmes, M. D., Chan, A. T., Chan, J. A., Colditz, G. A., Fuchs, C. S. 2006. Physical activity and survival after colorectal cancer diagnosis. *Journal of Clinical Oncology*, 24(22): 3527–3534.

Michels, K. B., Giovannucci, E., Joshipura, K. J., Rosner, B. A., Stampfer, M. J., Fuchs, C. S., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Willett, W. C. 2000. Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(21): 1740–1752.

Miklasova, N., Fischer-Fodor, E., Lönnecke, P., Schrepler, M. P., Virag, P., Tatomir, C., Silaghi-Dumitrescu, L. 2009. Antiproliferative effect and genotoxicity of novel synthesized palladium complexes with organoarsenic ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(12): 1739-1747.

Mills, A.A. 2005. p53: link to the past, bridge to the future [comment]. *Genes Dev*, 19:2091-9.

Mitsudomi, T., Yatabe Y. 2010. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer *FEBS Journal*, 277: 301–308.

Mitsudomi, T., Yatabe, Y. 2010. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS Journal*, 277(2):301–308.

Mizejewski, G.J. 1999. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222:124-38.

Morikawa, T., Kuchiba, A., Liao, X., Imamura, Y., Yamauchi, M., Qian, Z.R., Nishihara, R., Sato, K., Meyerhardt, J.A., Fuchs, C.S., Ogino, S. 2012. Tumor TP53 expression status, body mass index and prognosis in colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 131: 1169–1178.

Moroni, M., Veronese, S., Benvenuti, S., Marrapese, G., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Gambacorta, M., Siena, S., Bardelli, A. 2005. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol*, 6:279–86.

Moscatallo, D. K., Holgado-Madruga, M., Emlet, D. R., Montgomery, R. B., Wong, A. J. 1998. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, 273: 200-206.

- Mower, D.A., Peckham, D.W., Illera, V.A., Fishbaugh, J.K., Stunz, L.L., Ashman, R.F. 1994.** Decreased membrane phospholipid packing and decreased cell size precede DNA cleavage in mature mouse B cell apoptosis. *J. Immunol*, 152: 4832 ± 4842.
- Moyer, J.D., Barbacci, E.G., Iwata, K.K., Arnold, L., Boman, B., Cunningham, A., DiOrion, C., Doty, J., Morin, M.J., Moyer, M.P., Neveu, M., Pollack, V.A., Pustilnik, L.R., Reynolds, M.M., Sloan, D., Theleman, A., Miller, P. 1997.** Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res*, 57:4838–48.
- Murphy, C. C., Harlan, L. C., Lund, J. L., Lynch, C. F., Geiger, A. M. 2015.** Patterns of colorectal cancer care in the United States: JNCI. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(10).
- Muthukkaruppan, V.R., Kubai, L., Auerbach, R. 1982.** Tumor-induced neovascularization in the mouse eye. *J Natl Cancer Inst*, 69:699-708.
- Mutoh, K., Tsukahara, S., Mitsuhashi, J., Katayama, K., Sugimoto, Y. 2006.** Estrogen-mediated post transcriptional downregulation of P-glycoprotein in MDR1-transduced human breast cancer cells. *Cancer Sci*, 97, 1198–1204.
- Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W. K., Huang, H. J. 1998.** Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 5724-5729.
- Nakae, S., Shimada, E., Urakawa, T., 1993.** Study of c-erbB-2 receptor expression and DNA ploidy pattern in colorectal carcinoma. *J Surg Oncol*, 54: 246–251.
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. Bax, 1998** Interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 14681-14686.
- Neal, D.E., Marsh, C., Bennett, M.K., et al. 1985.** Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparisons of invasive and superficial tumors. *Lancet*, 1: 366–368.
- Neal, D.E., Sharples, L., Smith, K., Fennelly, J., Hall, R. R., Harris, A.L., 1990.** The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer*, 65: 1619–1625.
- Nelson, A.R., Fingleton, B., Rothenberg, M.L., Matrisian, L.M. 2000.** Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol*, 18:1135-49.
- Nelson, J.M., Fry, D.W., 2001.** Akt, MAPK (Erk1/2), and p38 act in concert to promote apoptosis in response to ErbB receptor family inhibition. *J Biol Chem*, 276:14842–7.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 13:9-22.

Nicholson, S, Richard, J., Sainsbury, C., Halcrow, P., Kelly, P., Angus, B., Wright, C., Henry, J., Farndon, J.R., Harris, A.L. 1991. Epidermal growth factor receptor [EGFR]-results of a 6-year follow-up study in operable breast cancer with emphasis on the node negative group. *Br J Cancer*, 63: 146–150.

Norat, T., Bingham, S., Ferrari, P., Slimani, N., Jenab, M., Mazuir, M., Overvad, K., Olsen, A., Tjønneland, A., Clavel, F., Boutron-Ruault, M. C., Kesse, E., Boeing, H., Bergmann, M. M., Nieters, A., Linseisen, J., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Tountas, Y., Berrino, F., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., Bueno-de-Mesquita, H. B., Peeters, P. H., Engeset, D., Lund, E., Skeie, G., Ardanaz, E., González, C., Navarro, C., Quirós, J. R., Sanchez, M. J., Berglund, G., Mattisson, I., Hallmans, G., Palmqvist, R., Day, N. E., Khaw, K. T., Key, T. J., San Joaquin, M., Hémon, B., Saracci, R., Kaaks, R., Riboli, E. 2005. Meat, fish, and colorectal cancer risk: The European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(12): 906–916.

Nyati, M. K., Maheshwari, D., Hanasoge, S., Sreekumar, A., Rynkiewicz, S. D., Chinnaiyan, A. M., Leopold, W. R., Ethier, S. P., Lawrence, T. S., 2004. Radiosensitization by pan ErbB inhibitor CI-1033 in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 10:691–700.

Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A., Yamaguchi, S., Yazaki, Y., Shibuya, M. 1998. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem*, 273:31273-82.

Ogino, S., Noshio, K., Kirkner, G. J., Kawasaki, T., Meyerhardt, J. A., Loda, M., Giovannucci, E. L., Fuchs, C. S., 2009 CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*, 58: 90–96.

Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R.F., Alitalo, K., Eriksson, U. 1996. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:2576-81.

Orlandini, M., Marconcini, L., Ferruzzi, R., Oliviero, S. 1996. Identification of a cfos- induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/ vascular endothelial factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:11675- 80.

Ozawa, S., Ueda, M., Ando, N., Shimizu, N., Abe, O. 1989. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer*, 63:2169–2173.

Özçetina, A., Aigner, A., Bakowsky, U. 2013. A chorioallantoic membrane model for the determination of anti-angiogenic effects of imatinib. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3): 711–715.

- Pai, R., Soreghan, B., Szabo, I.L., et al. 2002.** Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med*, 8(3):289-93
- Papadopoulos, N., Nicolaides, N.C., Wei, Y.F., et al. 1994.** Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*, 263(5153):1625–1629
- Parangi, S., O'Reilly, M., Christofori, G., Holmgren, L., Grosfeld, J., Folkman, J., Hanahan, D. 1996.** Angiogenesis therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:2002-7.
- Parkin, B., Ouillette, P., Li, Y., Keller, J., Lam, C., Roulston, D., Li, C., Shedden, K., Malek, S.N. 2013.** Clonal evolution and devolution after chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*, 121, 369–377.
- Perez-Pinera, P., Hernandez, T., García-Suárez, O., de Carlos, A., Germana, M., del Valle, A., Astudillo, J.A.V. 2007.** The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 295(1–2): 19–26.
- Petit, A.M., Rak, J., Hung, M.C., Rockwell, P., Goldstein, N., Fendly, B., Kerbel, R.S. 1997.** Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumour cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumours. *Am J Pathol*, 151:1523–30.
- Petrovic, D., Stojimirović, B., Petrović, B., Bugarčić, Z. M., Bugarčić, Ž. D. 2007.** Studies of interactions between platinum (II) complexes and some biologically relevant molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(12): 4203-4211.
- Pfeiffer, D., Stellwag, B., Pfeiffer, A. Borlinghaus, P., Meier, W., Scheidel, P. 1989.** Clinical implications of the epidermal growth factor receptor in the squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 33: 146–150.
- Punt, C.J., Tol, J., Rodenburg, C.J. 2008.** Randomized phase III study of capecitabine, oxaliplatin, and bevacizumab with or without cetuximab in advanced colorectal cancer (ACC), the CAIRO2 study of the Dutch Colorectal Cancer Group (DCCG). *J Clin Oncol*, 26.
- Radinsky, R., Risin, S., Fan, D., Dong, Z., Bielenberg, D., Bucana, C.D., Fidler, I.J. 1995.** Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res*, 1: 19–31.
- Rafii, S., Skobe, M. 2003.** Splitting vessels: Keeping lymph apart from blood. *Nature Med*, 9:166-8.
- Rajagopalan, H., Lengauer, C. 2004.** Aneuploidy and cancer. *Nature*, 432:338-41.
- Reginato, M.J., Mills, K.R., Becker, EBE., Lynch, D.K., Bonni, A., Muthuswamy, S.K. 2005.** Bim regulation of lumen formation in cultured mammary epithelial acini is targeted by oncogenes. *Mol Cell Biol*, 25: 4591–4601.

- Ries, S., Biederer, C., Woods, D., Shifman, O., Shirasawa, S., Sasazuki, T. 2000.** Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell*, 103: 321–330.
- Ritter, C.A., Arteaga, C.L. 2003.** The epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase: a promising therapeutic target in solid tumors. *Semin Oncol*, 30:3-11.
- Rixe, O., Franco, S.X., Yardley, D.A., Johnston, S.R., Martin, M. Arun, B.K., Letrent, S.P., Rugo, H.S. 2009.** A randomized, phase II, dose-finding study of the pan-ErbB receptor tyrosine-kinase inhibitor CI-1033 in patients with pretreated metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 64(6):1139-48.
- Russo, P., Malacarne, D., Falugi, C., Trombino, S., O’connor P.M. 2002.** Rpr-115135, a farnesyltransferase inhibitor, increases 5-FU- cytotoxicity in ten human colon cancer cell lines: role of p53. *Int. J. Cancer*, 100: 266–275.
- Russo, P., Malacarne, D., Falugi, C., Trombino, S., O’connor P.M. 2002.** Rpr-115135, a farnesyltransferase inhibitor, increases 5-FU- cytotoxicity in ten human colon cancer cell lines: role of p53. *Int. J. Cancer*, 100: 266–275.
- Sainsbury, J.R.C., Farndon, J.R., Needham, G.K. et al. 1987.** Epidermal growth factor receptor as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet*, 1: 1398–1402.
- Salomon, D., Brandt, R., Ciardiello, F., Normanno, N. 1995.** Epidermal growth factor– related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 19: 183–232.
- Saltz, L. B., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., Koski, S., Lichinitser, M., Yang, T.S., Rivera, F., Couture, F., Sirzén, F., Cassidy, J. 2008.** Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: A randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology*, 26(12): 2013–2019.
- Saltz, L. B., Meropol, N. J., Loehrer, P. J. Sr., Needle, M. N., Kopit, J., Mayer R. J. 2004.** Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *Journal of Clinical Oncology*, 22(7):1201–1208, 2004
- Saltz, L.B., Lenz, H.J., Kindler, H.L. 2007.** Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. *J Clin Oncol*, 25: 4557–4561.
- Sandhu, M. S., Dunger, D. B., Giovannucci, E. L. 2002.** Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(13): 972–980.
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., Longacre, M. 2013.** Cancer development, progression and therapy: An epigenetic overview. *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 21087–21113.

Sarkar, S., Longacre, M., Tatur, N., Heerboth, S. Lapinska, K. 2014. Histone deacetylases (HDACs): Function, mechanism, & inhibition. *In Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–9.

Sauna, Z., Ambudkar, S. 2001. Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *J. Biol. Chem*, 276: 11653–11661.

Schinkel, A., Smit, J., van Tellingen, O., Beijnen, J., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P. 1994. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77: 491–502.

Schlegel, R.A., Stevens, M., Lumley-Sapanski, K., Williamson, P. 1993. Altered lipid packing identifies apoptotic thymocytes. *Immunol. Letts*, 36: 283 ± 288.

Shan, B., Lee, W.H. 1994. Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol Cell Biol*, 14: 8166–8173.

Shiozawa, T., Miyamoto, T., Kashima, H., Nakayama, K., Nikaido, T., Konishi, I. 2004. Estrogen-induced proliferation of normal endometrial glandular cells is initiated by transcriptional activation of cyclin D1 via binding of c-Jun to an AP-1 sequence. *Oncogene*, 23(53): 8603-10.

Shiratsuchi, A., Umeda, M., Ohba, Y., Nakanishi, Y. 1997. Recognition of phosphatidylserine on the surface of apoptotic spermatogenic cells and subsequent phagocytosis by Sertoli cells of the rat. *J. Biol. Chem*, 272: 2354 ± 2358.

Siena, S., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Balfour, J., Bardelli, A. 2009. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101:1308-24.

Sierra, J.R., Cepero, V., Giordano, S. 2010. Molecular mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase targeted therapy. *Mol Cancer*, 2010(9):75.

Sierra-Honigmann, M. R., Nath, A. K., Murakami, C., García-Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W. C., Madge, L.A., Schechner, J.S., Schwabb, M.B., Polverini, P.J., Flores-Riveros, J. R. 1998. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*, 281(5383): 1683–1686.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst*, 82: 1107–1112.

Skvortsov, S., Skvortsova, I., Sarg, B., Loeffler-Ragg, J., Lindner, H., Lukas, P., Tabernero J., Zwierzina, H. 2005. Irreversible pan-ErbB tyrosine kinase inhibitor CI-1033 induces caspase-independent apoptosis in colorectal cancer DiFi cell line. *Apoptosis*, 10:1175–1186.

- Skvortsov, S., Skvortsova, I., Sarg, B., Loeffler-Ragg, J., Lindner, H., Lukas, P., Taberero J., Zwierzina, H. 2005.** Irreversible pan-ErbB tyrosine kinase inhibitor CI-1033 induces caspase-independent apoptosis in colorectal cancer DiFi cell line. *Apoptosis*, 10:1175–1186.
- Slamon, D., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram M., Baselga, J., Norton, L. 2001.** Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med*, 344: 783–792.
- Slattery, M. L., Boucher, K. M., Caan, B. J., Potter, J. D., Ma, K.-N. 1998.** Eating patterns and risk of colon cancer. *American Journal of Epidemiology*, 148(1), 4–16.
- Slichenmyer, W.J., Elliott, W.L., Fry, D.W. 2001.** CI-1033, a pan-erbB tyrosine kinase inhibitor. *Semin Oncol*. 2001; 28:80–5.
- Slichenmyer, W.J., Fry, D.W. 2001.** Anticancer therapy targeting the erbB family of receptor tyrosine kinases. *Semin Oncol*, 28:67–79.
- Small, J.B., Palmer, B.D., Rewcastle, G.W., Denny, W.A., McNamara, D.J., Dobrusin, E.M., Bridges, A.J., Zhou H, Showalter HD, Winters RT, Leopold WR, Fry DW, Nelson JM, Slintak V, Elliot WL, Roberts BJ, Vincent PW, Patmore SJ. 1999.** Tyrosine kinase inhibitors. 15. 4-(Phenylamino)quinazoline and 4-(phenylamino)pyrido[d]pyrimidine acrylamides as irreversible inhibitors of the ATP binding site of the epidermal growth factor receptor. *J Med Chem*, 42(10):1803-15.
- Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G.D., Chen, L. B. 1991.** Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate forming lipophilic cation JC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:3671-3675.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., Klagsbrun, M. 1998.** Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92:735-45.
- Spano, J. P., Fagard R., Soria J. C., Rixe O., Khayat D., Milano G. 2005.** Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Annals of Oncology*, 16(2): 189–194.
- Spierings, D., McStay, G., Saleh, M., Bender, C., Chipuk, J., Maurer, U., Green, D.R. 2005.** Connected to Death: The (Unexpurgated) Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Science*, 310(5745): 66-67.
- Spring, K.J., Zhao, Z.Z., Karamatic, R., Walsh, M.D., Whitehall, V.L., Pike, T., Simms, L.A., Young, J., James, M., Montgomery, G.W., Appleyard, M., Hewett, D., Togashi, K., Jass, J.R., Leggett, B.A. 2006.** High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: A prospective study of patients undergoing colonoscopy. *Gastroenterology*, 131:1400–1407.
- Stadler, J., Yeung, K. S., Furrer, R., Marcon, N., HIMAL, H. S., Bruce, W. R. 1988.** Proliferative activity of rectal mucosa and soluble fecal bile acids in patients with

normal colons and in patients with colonic polyps or cancer. *Cancer Letters*, 38(3):315–320.

Stalmans, I., Ng, Y.S., Rohan, R., Fruttiger, M., Bouché, A., Yuce, A., Fujisawa, H., Hermans, B., Shani, M., Jansen, S., Hicklin, D., Anderson, D.J., Gardiner, T., Hammes, H.P., Moons, L., Dewerchin, M., Collen, D., Carmeliet, P., D'Amore, P.A. 2002. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest*, 109:327-36.

Staton, C.A., Stribbling, S.M., Tazzyman, S., Hughes, R., Brown, N.J., Lewis, C.E. 2004. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *International Journal of Experimental Pathology*, 85: 233-248.

Stegmaier, K., Corsello, S.M., Ross, K.N., Wong, J.S., DeAngelo, D.J., Golub, T.R. 2005. Gefitinib induces myeloid differentiation of acute myeloid leukemia. *Blood*, 106(8): 2841-8.

Stiles, B.L. 2009. PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev*, 61(14): 1276-82.

Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D. 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87:1171-80.

Szakas, G., Annereau, J., Lababidi, S., Shankavaram, U., Arciello, A., Bussey, K., Reinhold, W., Guo, Y., Kruh, G., Reimers, M., et al. 2004. Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell*, 6:129–137.

Tait, W.G.S., Ichim, G., Green, D.R. 2014. Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci*, 127: 2135-2144.

Talamonti, M.S., Roh, M.S., Curley, S.A., Gallick, G.E. 1993. Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. *J Clin Invest*, 91: 53–60.

Tan, C., Lai, S., Wu, S., Hu, S., Zhou, L., Chen, Y., Ji, L. 2010. Nuclear permeable ruthenium (II) β -carboline complexes induce autophagy to antagonize mitochondrial-mediated apoptosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(21): 7613-7624.

Tateishi, M., Ishida, T., Mitsudomi, T., Kaneko, S., Sugimachi, K. 1990. Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res*, 50: 7077–7080.

Terry, P., Giovannucci, E., Michels, K. B., Bergkvist, L., Hansen, H., Holmberg, L., Wolk, A. 2001. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(7): 525–533.

Tong, W.M., Ellinger, A., Sheinin, Y. et al. 1998. Epidermal growth factor receptor expression in primary cultured human colorectal carcinomas cells. *Br J Cancer*, 77: 1792–1798.

Tong, Y., Zhang, X., Zhao, W., Zhang, Y., Lang, J., Shi, Y., Tan, W., Li, M., Zhang, Y., Tong, L., Lu, H., Lin, L., Ding, J. 2004. Anti-angiogenic effects of Shiraiachrome A, a compound isolated from a Chinese folk medicine used to treat rheumatoid arthritis. *Eur J Pharmacol*, 28:101-9.

Torshizi, H.M., Saeidifar, M., Khosravi, F., Divsalar, A., Saboury, A.A., Hassani, F. 2011. DNA binding and antitumor activity of α -diimineplatinum(II) and palladium(II) dithiocarbamate complexes. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2011: 11.

Tournaire, R., Simon, M.P., le Noble, F., et al. 2004. A short synthetic peptide inhibits signal transduction, migration and angiogenesis mediated by Tie2 receptor. *EMBO Rep*, 5:262-7.

Ulukaya, E., Ari F., Dimas, K., Sarimahmut, M., Guney E., Sakellaridis N., Yilmaz V.T. 2011. Cell death-inducing effect of novel palladium(II) and platinum(II) complexes on non-small cell lung cancer cells in vitro. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 137:1425.

Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Ikitimur, E. I., Guney, E., Yilmaz, V. T. 2011b. Anti-cancer activity of a novel palladium (II) complex on human breast cancer cells in vitro and in vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10): 4957-4963.

Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Sarimahmut, M., Guney, E., Sakellaridis, N., Yilmaz, V. T. 2011a. Cell death-inducing effect of novel palladium (II) and platinum (II) complexes on non-small cell lung cancer cells in vitro. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(10): 1425-1434.

Wakeling, A.E., Barker, A.J., Davies, D.H., Brown, D.S., Green, L.R., Cartlidge, S.A., Woodburn, J.R. 1996. Specific inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by 4-anilinoquinazolines. *Breast Cancer Res Treat*, 38:67-73.

Webb, B.L., Jimenez, E., Martin, G.S. 2000. v-Src generates a p53-independent apoptotic signal. *Mol Cell Biol*, 20: 9271-9280.

Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., Koh, H., Simms, L., Barker, M., Leggett, B., Levine, J., Kim, M., French, A.J., Thibodeau, S.N., Jass, J., Haile, R., Laird, P.W. 2006. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38:787-93.

Will, J. C., Galuska, D. A., Vinicor, F., Calle, E. E. 1998. Colorectal cancer: Another complication of diabetes mellitus? *American Journal of Epidemiology*, 147(9): 816-825.

Willett, W. C., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Rosner, B. A., Speizer, F. E. 1990. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *The New England Journal of Medicine*, 323(24): 1664-1672.

Wilson, T.D., Steck, W.F. 2000. A modified HET-CAM assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plant extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 867-872.

Yamaguchi, H., Wang, H.G. 2001. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene*, 20: 7779–7786.

Yamamoto, C., Basaki, Y., Kawahara, A., Nakashima, K., Kage, M., Izumi, H., Kohno, K., Uramoto, H., Yasumoto, K., Kuwano, M., Ono, M. 2010. Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of *egr1* in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res.* 70: 8715–8725.

Yanase, K., Tsukahara, S., Asada, S., Ishikawa, E., Imai, Y., Sugimoto, Y. 2004. Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Mol. Cancer Ther.*, 3:1119–1125.

Yarden, Y., Sliwkoski, M.X. 2001. Untangling the *erbB* signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 127–136.

Yen, L., Benlimame, N., Nie, Z.R., Xiao, D., Wang, T., Al Moustafa, A.E., Esumi, H., Milanini, J., Hynes, N.E., Pages, G., Alaoui-Jamali, M.A. 2002. Differential regulation of tumor angiogenesis by distinct ErbB homo- and heterodimers. *Mol Biol Cell*, 13:4029–44.

Yi, S., Yang, Z.L., Miao, X. 2014. N-cadherin and P-cadherin are biomarkers for invasion, metastasis and poor prognosis of gallbladder carcinomas. *Pathol Res Pract*, 210: 363–368.

Yonekura, H., Sakurai, S., Liu, X., Migita, H., Wang, H., Yamagishi, S., Nomura, M., Abedin, M.J., Unoki, H., Yamamoto, Y., Yamamoto, H. 1999. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes: implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *J Biol Chem*, 274:35172-8.

Yong Jeong S., Wu Seol D. 2008. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB reports*, 41(1): 11-22.

Zamble, D.B., Mikata, Y., Eng, C.H., Sandman, K.E., Lippard, S.J. J. 2002. Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin. *Inorg. Biochem*, 91: 451

Zhang, B., Li, M., McDonald, T., Holyoake, T.L., Moon, R.T., Campana, D., Shultz, L., Bhatia, R. 2013. Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt- β -catenin signaling. *Blood*, 121(10): 1824–1838.

Zhang, S., Lin, Y., Kim, Y.S., Hande, M.P., Z-G Liu, Z.G., H-M Shen, H.M. 2007. c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation. *Cell Death and Differentiation*, 14: 1001–1010

Zhang, X., Liu, G., Kang, Y., Dong, Z., Qian, Q., Ma, X. 2013. N-cadherin expression is associated with acquisition of EMT phenotype and with enhanced invasion in erlotinib-resistant lung cancer cell lines. *PLoS One*, 8: 57692.

Zhou, S., Zhao, L., Kuang, M., Zhang, B., Liang, Z., Yi, T., Wei, Y., Zhao, X. 2012. Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Cancer Letters*, 323:115–127.

Zhu, J., Lin, M., Fan, D., Wu, Z., Chen, Y., Zhang, J., Guo, Z. 2009. The role of bridging ligands in determining DNA-binding ability and cross-linking patterns of dinuclear platinum (II) antitumour complexes. *Dalton Transactions*, (48): 10889-10895.

Zou, Y.M., Xiong, H., Xiong, H.H., Lu, T., Zhu, F., Luo, Z.Y., Yuan X L., Wang, Y.H. 2015. A polysaccharide from *Andrographis paniculata* induces mitochondrial-mediated apoptosis in human hepatoma cell line (HepG2). *Tumor Biol.*, 36: 5179–5186.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Şeyma AYDINLIK

Doğum Yeri ve Tarihi: İsviçre/Lachen, 31 Aralık 1985

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Bursa Kız Lisesi (2000-2004)

Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2004-2008)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Bölümü, (2008-2010)

İletişim (e-posta): seymaaydinlik@gmail.com

Yayınları:

Ariksoysal, D.O., Akgül, O., Aydinlik S., Topkaya, S.N., Aladag,N., Ozsoz, M. 2010. New electroactive hybridization indicators“2-phthalimido-N substitutedphenylethanesulfonamide derivatives” for biosensor applications: Ring substituent effect on interaction between compound and DNA. *Electroanalysis*, 22(19): 2225 – 2234.

Topkaya, S.N., Aydinlik S., Aladag,N., Ozsoz, M. Ariksoysal, D.O. 2010. Different DNA Immobilization Strategies For The Interaction Of Anticancer Drug Irinotecan with DNA Based On Electrochemical DNA Biosensors. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 13: 582-589.

Aydinlik S., Ariksoysal, D.O. Kara,P., Sayiner,A.A., Ozsoz, M. 2011. Nucleic Acid Based Electrochemical Biosensor for the Detection of Influenza B Virus from PCR Samples Using Gold Nanoparticles Adsorbed Disposable Graphite Electrode and Meldola’s Blue as an intercalator. *Anal. Methods*, 3: 1607.

Özkaya, F.C. Engin, S., Tanrikul, T.T., Aydinlik S., Ulukaya, E. 2015. In vitro antibacterial activity of sponge-associated fungi against bacterial aquaculture pathogens. *Fresenius environmental bulletin*, 24(6): 158-2166.

Armutak, E.I.I., Gurevin,E.G., Kiyan, H.T., Aydinlik S., Yılmaz, V.T., Ulukaya, E. 2017. The in vivo angiogenic evaluation and cytotoxicity of Complex 1. *Microvascular Research* 109: 26–336.

Aydinlik S., Erkisa, M., Cevatemre, B., Sarimahmut, M., Dere, E., Ari, F., Ulukaya, E. 2017. Enhanced cytotoxic activity of doxorubicin through the inhibition of autophagy in triple negative breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1861: 49–57.

Yilmaz, V.T., Iysel, C., Batur, J., Aydinlik S., Cengiz M., Büyükgüngör, O. 2017. Synthesis, structures and biomolecular interactions of new silver(I) 5,5-diethylbarbiturate complexes of monophosphines targeting Gram-positive bacteria and breast cancer cells. *Dalton Trans*, 46: 8110–8124

Yilmaz, V.T., Iysel, C., Batur, J., Aydinlik S., Cengiz M., Sahinturk, P., Aygun, M. 2017. Structures and biochemical evaluation of silver(I) 5,5-diethylbarbiturate complexes with bis(diphenylphosphino)alkanes as potential antimicrobial and anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139:901-916.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

| | |
|--------------------------------|--|
| Yazar Adı Soyadı | Şeyma Aydınlık |
| Tez Adı | Palladyum (II) bileşiği ve canertinibin kolon kanser hücrelerinde sitotoksisite, anjiyogenez, ilaç dirençliliği ve otofaji mekanizmaları üzerine etkileri |
| Enstitü | Fen Bilimleri Enstitüsü |
| Anabilim Dalı | Moleküler Biyoloji |
| Tez Türü | Doktora Tezi |
| Tez Danışman(lar)ı | Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE |
| Çoğaltma (Fotokopi Çekim) izni | <input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum |
| Yayımlama izni | <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin Veriyorum |

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih : 29.12.2017

İmza : 