T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜÇ BOYUTLU KOLOREKTAL KANSER MODELİNDE BÜTİRAT VE MELATONİN'İN KEMOTERAPİ ETKİNLİĞİNDEKİ ROLÜ

Tolga SEVER
ORCID: 0000-0002-0135-0243

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Translasyonel Onkoloji Bütünleşik Doktora Programı
DOKTORA TEZİ

İZMİR
NİSAN 2024

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2018970207

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜÇ BOYUTLU KOLOREKTAL KANSER MODELİNDE BÜTİRAT VE MELATONİN'İN KEMOTERAPİ ETKİNLİĞİNDEKİ ROLÜ

Tolga SEVER
ORCID: 0000-0002-0135-0243

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Translasyonel Onkoloji Bütünleşik Doktora Programı
DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL
ORCID: 0000-0002-3201-4752
İkinci Danışman: Doç.Dr. Ömer HIDIR YILMAZ
ORCID: 0000-0002-7577-4612

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından TDK-2021-2610 proje numarası ile desteklenmiştir. Ayrıca TÜBİTAK 2211A Yurt İçi Doktora Burs Programı, 2214 Yurt Dışı Doktora Araştırma Burs Programı ve Yükseköğretim Kurulu 100/2000 Öncelikli Alan Programı Bursu kapsamında desteklenmiştir

İZMİR
NİSAN 2024

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimeleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "Üç Boyutlu Kolorektal Kanser Modelinde Bütirat ve Melatonin'in Kemoterapi Etkinliğindeki Rolü" başlıklı doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri, akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tolga SEVER
06.03.2024

TEŞEKKÜR

Translasyonel Onkoloji doktora eğitimim sürecinde tüm sabrı ve iyi niyetiyle gerek bilimsel gerekse de manevi desteği ile yardımcı olan değerli tez danışmanım Doç.Dr. Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL'a;

Eğitimimin tez aşamasında Massachusetts Teknoloji Enstitüsünde bulunan laboratuvarında, tez çalışmamın deneysel aşamalarını destekleyen ve ayrıca bilimsel doygunluğumda büyük emeği olan değerli ikinci tez danışmanım Doç.Dr. Ömer H. YILMAZ'a;

İlk tez danışmanım olarak birlikte uzun bir süre geçirdiğimiz, araştırmacı vizyonunu ve akademisyen ruhunu aşılayan Prof.Dr. Yasemin BAŞBINAR'a,

Yurtdışı deneyimimi gerçekleştirmemdeki en büyük pay sahiplerinden olan Prof.Dr. Ender Berat ELLİDOKUZ'a;

Eğitim sürecinde desteğini esirgemeyen ve yoğun programlarına rağmen, ihtiyacımız olduğunda yanımızda olan sayın Prof.Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a;

Çalışmalarımızı büyük bir özveriyle destekleyen, enstitü müdürümüz Prof.Dr. Nur OLGUN'a;

Tüm doktora sürecim boyunca en değerli kazançlarımdan olan, hiçbir süreçte yalnız bırakmayan arkadaşlarım başta Asım LEBLEBİCİ, Hasan KURTER, Özge BAYRAK olmak üzere tüm öğrenci arkadaşlarıma;

Doktora öğrencisi olarak; TÜBİTAK 2211A Yurt İçi Doktora Burs Programı, 2214 Yurt Dışı Doktora Araştırma Burs Programı ve Yükseköğretim Kurulu 100/2000 Öncelikli Alan Programı Bursu ile desteklenerek gerçekleştirdiğim bu doktora tez çalışmamda ilgili makamlara katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, hayallerimin peşinde koşarken hiçbir destekten kaçınmayan ve olduğum konuma gelmemde en büyük pay sahibi olan annem Serengül ve babam Binal SEVER'e;

Son olarak eğitim sürecimde yaşadığım tüm zorluklara karşı beni yalnız bırakmayan, her zaman destekleyen hayat arkadaşım, nişanlım Büşra KARACAAĞAÇLI'ya sonsuz teşekkürler.

Tolga SEVER

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ i
ŞEKİLLER DİZİNİ ii
SİMGELER VE KISALTMALAR iii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1 Kolorektal Kanser 4
2.2 Kolorektal Kanser Risk Faktörleri 6
2.3 Kolorektal Kanser Oluşumu 7
2.3.1 Kolorektal Karsinogenezinin Moleküler Mekanizması 9
2.3.2 Kolorektal Kanser ve Enerji Metabolizması 13
2.3.3 Kolorektal Kanser Enerji Metabolizması ve Warburg Etkisi 16
2.4 Yeni İlaç Hedefi Olarak Kanser Enerji Metabolizması 23
2.5 Bağırsak Homeostazında Bütirat 26
2.6 Bağırsak Homeostazında Melatonin 29
2.7 Organoid Teknolojisi ve *In vitro* Kanser Modellemesi 31
3. GEREÇ VE YÖNTEM 34
3.1 Araştırmanın Tipi 34
3.2 Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı 34
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi 34
3.4 Çalışma Materyali 35
3.5 Araştırmanın Değişkenleri 35
3.6 Veri Toplama Araçları 35
3.7 Verilerin Değerlendirilmesi 43
3.8 Araştırmanın Kısıtlılıkları 43
3.9 Etik Kurul Onayları 43
4. BULGULAR 44
5. TARTIŞMA 62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 66
7. KAYNAKLAR 67
8. EKLER 90
9. KATKI 106
10. ÖZGEÇMİŞ 107

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Somatik Genetik Değişiklikler için Önerilen Testler..... 34

Tablo 2. Tez çalışmasındaki sarf malzemeleri…….……...36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Kolorektal karsinogenezinin moleküler mekanizması. 12
Şekil 2. Normal hücrelerdeki (A) ve kanser hücrelerindeki (B) metabolizmanın karşılaştırılması. 18
Şekil 3. Warburg etkisinin kanser hücrelerine sağladığı avantajlar 22
Şekil 4. ROS'un kaynakları ve sınıflandırılması 20
Şekil 5. Farklılaşmış ve farklılaşmamış kolonositlerdeki karakteristik özellikler 32
Şekil 6. Organoid hatlarının büyüme fazları.. 50
Şekil 7. Melatoninin sağlıklı kolon organoidleri üzerine etkisi 51
Şekil 8. BOHB'nin sağlıklı kolon organoidleri üzerindeki etkisi. 52
Şekil 9. Oksaliplatinin KRK organoidleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi. 53
Şekil 10. Ajanların kombine uygulamalarının oksaliplatin sitotoksisitesine etkisi… 54
Şekil 11 Uygulanan ajanların apoptotik ölüm yolağı aktivasyonuna etkisi 56
Şekil 12. Uygulanan ajanların DNA hasarı üzerindeki etkisi. 58
Şekil 13. Enerji metabolizması proteinlerinin ajan uygulamaları altında değerlendirilmesi. 59
Şekil 14. Histon asetilasyonunun apoptotik yolak üzerindeki rolü 61
Şekil 15. Akış sitometrisinde kapılama stratejisi. 53
Şekil 16. Melatoninin oksaliplatin ile indüklenen apoptotik hücre ölüm mekanizmasına etkisi. 64
Şekil 17. Kolorektal kanserde BOHB'ın oksaliplatinin sitotoksik etkisini attırma mekanizması. 70

SİMGELER VE KISALTMALAR

%: yüzde

µL: mikrolitre

µM: mikromolar

5-FU: 5-Fluorourasil

APC: Adenomatöz Polipozis Koli (Adenomatous Polyposis Coli)

ATP: Adenozin trifosfat (Adenosine Triphosphate)

BAX: BCL 2 Associated X

BCL 2: B hücresi lenfoma 2 **(**B Cell Lymphoma 2)

BOHB: Beta-hidroksibütirat

BRAF: Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf

CAP: Capecitabine

CC3: Ayrılmış Kaspaz 3 **(**Cleaved Caspase-3)

CDC4: Hücre Bölünmesi Kontrol Proteini 4 **(**Cell Division Control Protein 4)

CIN: Kromozomal Dengesizlik (Chromosomal Instability)

CO_2: Karbondioksit (Carbon dioxide)

DCC: Kolon Kanserinde Silinen (Deleted in Colon Cancer)

DCA: Dikloroasetat (Dichloroacetate)

DMSO: Dimetil Sülfoksit

EGFR: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor)

ERK: Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz (Extracellular Signal−Regulated Kinase)

FBS: fötal sığır serum

HDAC: Histon Deasetilaz (Histone Deacetylase)

HIF1α: Hipoksi İle İndüklenebilir Transkripsiyon Faktörü 1α (Hypoxia Inducible Factor 1α)

İBH: İnflamatuar Bağırsak Hastalığı

IC10: İnhibitör konsantrasyon 10

IC50: İnhibitör konsantrasyon 50

IGFR2: İnsülin Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (Insulin Growth Factor Receptor 2

IRI: İrinotekan

KRAS: Kirsten Sıçan Sarkomu Virüsü (Kirsten Rat Sarcoma Virus)

KRK: Kolorektal kanser

LDHA: Laktat Dehidrogenaz A

LGR5: Lösin Bakımından Zengin Tekrar İçeren Reseptör 5 (Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5)

LOH 17P: 17. Kromozomun Kısa Kolunda Heterozigotluk Kaybı (Loss of Heterozygosity on The Short Arm of Chromosome 17p)

LOH 18q: DCC Lokusunda 18q Kromozomunun Heterozigotluğu Kaybı (Loss of Heterozygosity of Chromosome 18q in DCC Locus)

MAPK: Mitojenle-Aktive Olan Protein Kinaz (Mitogen-Activated Protein Kinase)

mM: milimolar

MPC1: Mitokondriyel pirüvat taşıyıcısı 1 (Mitochondrial Pyruvate Carrier 1)

MPC2: Mitokondriyel pirüvat taşıyıcısı 2 (Mitochondrial Pyruvate Carrier 2)

MSI: Mikro uydu dengesizliği (Microsatellite Instability)

MSS: Mikro uydu stabilitesi (Microsatellite Stability)

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

mTORC1: Mammalian Target of Rapamycin Complex 1

OX: Oksaliplatin (Oxaliplatin)

OXPHOS: Oksidatif Fosforilasyon (Oxidative Phosphorylation)

PDK: Piruvat Dehidrogenaz Kinaz

PI3K: Fosfoinozitid 3-Kinaz (Phosphoinositide 3-Kinase)

RTK: Reseptör Tirozin Kinaz

ROS: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)

TCA: Tricarboxylic Acid

TGF-β: Transforme Edici Büyüme Faktörü- β (Transforming Growth Factor- β)

TGFβR2: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta Reseptörü 2 (Transforming Growth Factor Beta Receptor 2)

Wnt: Kanatsızla ilgili entegrasyon sitesi (Wingless-related integration site)

WRN: Wnt-3a, RSPO1 ve Noggin

ÜÇ BOYUTLU KOLOREKTAL KANSER MODELİNDE BÜTİRAT VE MELATONİN'İN KEMOTERAPİ ETKİNLİĞİNDEKİ ROLÜ

Doktora Tezi

Tolga SEVER

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Onkoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Hücresel metabolizmanın düzensizliği kanserin temel özelliklerinden bir haline gelmiştir ve bu değişiklikler tümör büyümesini desteklemek için metabolik yolların yeniden programlanmasına yol açar. Bu nedenle, kanser metabolizmasını hedef almak, kolorektal kanser (KRK) tedavisinde önemli bir potansiyel sunmaktadır. Beta-hidroksibütirat (BOHB), trikarboksilik asit (TCA) döngüsü için bir asetil-KoA kaynağı olarak işlev gördüğü için enerji metabolizması yolunu TCA döngüsüne doğru yönlendirme potansiyelini taşıyabilir. Bu çalışmanın amacı, BOHB'nin KRK'de enerji metabolizmasını değiştirerek oksaliplatinin sitotoksik etkisini artırma potansiyelini araştırmaktır. Organoid teknolojisi kullanılarak yapılan çalışmada, BOHB ve oksaliplatin uygulamalarının etkinliği hücre canlılığı ile değerlendirilmiştir. Enerji metabolizması, apoptotik yollar, DNA hasar belirteçleri ve histon asetilasyonunda yer alan anahtar proteinlerin seviyeleri Western Blot ile analiz edilmiştir. ROS seviyeleri akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir. KRK organoidlerinde, sitotoksik etki göstermeyen en yüksek BOHB konsantrasyonunun oksaliplatin ile kombinasyonu, oksaliplatinin tek başına uygulanmasına göre sitotoksisiteyi anlamlı bir şekilde artırmıştır. BOHB ve/veya melatonin ile muamele edilmesi, laktat dehidrojenaz A azalması ve mitokondriyal taşıyıcı protein 2 artışı yoluyla aerobik glikoliz inhibitör etkisi ve oksidatif fosforilasyonun artışına yol açtığı ve bu değişikliklerin de oksaliplatin aracılı artmış apoptotik hücre ölümüyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma, BOHB'nin KRK tedavisinde oksaliplatin ve oksaliplatin ile benzer etki mekanizmasına sahip kemoterapötiklerin etkinliğini artırabileceğini gösterirken; KRK tedavisinde metabolik hedefli kombinasyon tedavilerinin potansiyel etkisini vurgulamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Kolorektal kanser; organoid; beta-hidroksibütirat; oksaliplatin; reaktif oksijen türleri; metabolik hedefli tedavi

Tezin Sayfa Adedi: 107

Danışman: Doç.Dr. Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL

THE ROLE OF BUTYRATE AND MELATONIN IN CHEMOTHERAPY EFFICACY IN A THREE-DIMENSIONAL COLORECTAL CANCER MODEL

Ph.D. Thesis

Tolga SEVER

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Department of Oncology

ABSTRACT

Dysregulation of cellular metabolism has become a hallmark of cancer and these changes lead to reprogramming of metabolic pathways to promote tumor growth. Therefore, targeting cancer metabolism offers significant potential in the treatment of colorectal cancer (CRC). Beta-hydroxybutyrate (BOHB) may hold the potential to redirect the energy metabolism pathway as it functions as a source of acetyl-CoA for the tricarboxylic acid (TCA) cycle. The aim of this study was to investigate the potential of BOHB to enhance the cytotoxic effect of oxaliplatin by altering energy metabolism in CRC. The efficacy of BOHB and oxaliplatin treatment was evaluated by cell viability assay. Levels of key proteins involved in energy metabolism, apoptotic pathways, DNA damage markers and histone acetylation were analyzed by Western Blotting. ROS levels were evaluated by flow cytometry. In CRC organoids, the combination of the highest concentration of BOHB, which showed no cytotoxic effect, with oxaliplatin significantly increased cytotoxicity compared to oxaliplatin alone. Treatment with BOHB and/or melatonin had an inhibitory effect on aerobic glycolysis and increased oxidative phosphorylation through decreased lactate dehydrogenase A and increased mitochondrial transporter protein 2, and these changes were associated with oxaliplatin-mediated increased apoptotic cell death. This study demonstrates that BOHB may improve the efficacy of oxaliplatin and chemotherapeutics with a similar mechanism of action as oxaliplatin in the treatment of CRC and emphasizes the potential impact of metabolically targeted combination therapies in CRC treatment.

Keywords: Colorectal cancer; organoid; beta-hydroxybutyrate; oxaliplatin; reactive oxygen species; metabolic targeted therapy

Page number: 107

Advisor: Assoc. Prof. Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yayınlanan GLOBOCAN verilerine göre, 2020 yılında yaklaşık 1,9 milyon yeni kolorektal kanser (KRK) vakası teşhis edilmiş ve yaklaşık 935.000 ölümle sonuçlanmıştır. Dikkat çekici bir şekilde, KRK insidans açısından üçüncü, mortalite açısından ise ikinci en yaygın kanserdir (1). Karsinogenez, bu sürecin önemli itici güçleri olarak tanımlanan belirli anahtar mutasyonlarla birlikte çoklu mutasyonları içerir. KRK'nin başlaması ve ilerlemesi bağlamında, P53 ve adenomatöz polipozis koli (APC) gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve Kirsten sıçan sarkomu viral onkogen homologu (KRAS) gibi onkogenlerin aktivasyonu çok önemlidir (2). KRK tedavisi, cerrahi, radyasyon ve kemoterapiyi birleştiren multidisipliner bir yaklaşımı entegre eder. Platin bazlı bir kemoterapi ilacı olan oksaliplatin, KRK tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Üçüncü nesil bir diaminosiklohekzan platin bileşiği olan oksaliplatin, iplikçik içi eklentiler oluşturarak DNA transkripsiyonunu ve replikasyonunu bozar ve sonuçta apoptotik hücre ölümünü tetikler (3). Oksaliplatinin cerrahi sonrası neoadjuvan kullanımı, faz çalışmalarında yaklaşık %20-24'lük bir etkinlik ile mütevazı tek ajan aktivitesi göstermiştir. Bununla birlikte, 5-FU ve lökovorin ile kombine edildiğinde, oksaliplatinin progresyonsuz sağkalımı ve genel sağkalımı iyileştirdiği ve tek başına 5-FU ve lökovorin kullanan rejimlerden daha iyi performans gösterdiği gösterilmiştir (4–6). Birincil etki mekanizması DNA hasarını indükleyerek apoptotik hücre ölümüne yol açmak olmasına rağmen, oksaliplatinin tüm etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca, oksaliplatinin seçici olmayan bir kemoterapötik ajan olduğu göz önüne alındığında, normal hücreler de sitotoksik etkilerine maruz kalmaktadır. Özellikle, klinik olarak kullanıldığında, oksaliplatin periferik nörotoksisite olarak bilinen nörotoksik bir yan etkiye yol açabilir (7). Kolorektal kanserli hastalarda bu tür advers reaksiyonları önlemek için doz azaltımını göz önünde bulundurmak zorunludur.

Çok sayıda hücresel değişiklik, karsinogenez sırasında kanser hücrelerine dönüşümü işaret eder ve her değişiklik benzersiz bir kanser ayırt edici özelliği olarak hizmet eder (7). Bu özelliklerden biri, genellikle ilk olarak Otto Warburg tarafından tanımlanan Warburg etkisi ile karakterize edilen enerji metabolizmasının modifikasyonudur. Bu etki, oksijen varlığında bile kullanılan bir glikolitik yol olan aerobik glikoliz için birçok kanser türünün tercih edildiğini gösterir. Bunun aksine,

normal hücreler mitokondride enerji üretimi için tipik olarak oksidatif fosforilasyona başvurur. Bununla birlikte, kanser hücreleri genellikle enerji metabolizmalarını glikolize yönlendirerek glikoz alımının ve laktat üretiminin artmasına neden olur. Bu değişim, kanser hücrelerine gelişmiş besin kullanılabilirliği, ilaç direnci ve hızlandırılmış hücre çoğalması gibi çeşitli avantajlar sağlar (8).

Kanser hücrelerindeki metabolik değişiklikler genellikle normal muadillerine göre daha yüksek seviyelerde ROS'a yol açar (9). Orta düzeydeki ROS seviyeleri DNA mutasyonlarını ve enflamasyonu tetikleyerek karsinogenezi teşvik edebilirken, aşırı yüksek ROS seviyeleri kanser hücresi ölümünü tetikleyebilir. Özellikle, KRK hücreleri tipik olarak sağlıklı hücrelerden daha yüksek ROS seviyelerine sahiptir, bu da ROS indüksiyonunun KRK'de apoptozu indüklemek için uygun bir strateji sunabileceğini düşündürmektedir.

Mitokondriyal aktivite genellikle KRK'de baskılanır ve elektron taşıma zinciri bileşenleri tarafından ROS üretimini sınırlar. Bununla birlikte, mitokondri, asetil-KoA'ya dönüşen ve mitokondriyal matris içinde katabolizmaya uğrayan ketonlara yanıt verir. Bu nedenle, dolaşımdaki ana keton gövdesi olan beta-hidroksibütirat (BOHB), glikolitik yolu inhibe etmek ve trikarboksilik asit (TCA) (10) döngüsünü güçlendirmek için seçilmiştir. ROS'a bağlı hücre ölümünü incelemek için, yüksek oksidatif stres koşulları altında koruyucu rolü ile bilinen melatonini ek bir yardımcı madde olarak ajan uygulama gruplarına dahil edilmiştir. (11).

Organoid teknolojisi, *in vivo* dokuların karmaşık hücresel mimarisini ve fizyolojisini yeniden taklit etme konusundaki üstün yeteneği nedeniyle kullanılmıştır. Hücresel ortamı aşırı basitleştirebilen geleneksel iki boyutlu kültür sistemlerinin aksine, organoidler orijinal dokunun morfolojisi, işlevselliği ve genetik özelliklerinin temel yönlerini korur. Bu, tümör davranışını ve tedaviye yanıtı anlamak için çok önemli olan karmaşık hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri ağını içerir. Bu nedenle, organoid teknolojisinin kullanımı kanser araştırmalarında daha derin içgörüler ve klinik olarak daha uygun veriler sağlayabilir (12).

Bu çalışmada, birincil amaç BOHB kullanarak kanser hücrelerinin enerji metabolizmasını modüle etmekti. TCA döngüsünü destekleyerek, BOHB uygulamasının kemoterapötik ajan olan oksaliplatinin etkinliğini potansiyel olarak artırabileceği varsayılmıştır. Bu yaklaşım, geleneksel kemoterapi tedavilerini

desteklemek için yeni bir strateji sağlayarak kanser hücrelerinin değişen metabolik durumundan yararlanmayı amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kolorektal Kanser

Kolon ve/veya rektum kanserini kapsayan kolorektal kanser (KRK), dünyada en sık teşhis edilen üçüncü ve en ölümcül ikinci kanser olarak önemli bir sağlık sorunudur. 2020'de kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %9,4'ü KRK'ye bağlı gerçekleşmiştir (1). Bununla birlikte, yaşlı popülasyonda tespit edilen vaka sayısındaki önemli artışın ışığında, küresel KRK insidansının 2035 yılına kadar günümüzdekinin iki katından fazla olacağı ve en önemli artışın daha az gelişmiş ülkelerde meydana geleceği tahmin edilmektedir (13). KRK, yalnızca kolon veya rektumda meydana gelen ve kolonun glandüler epitel hücrelerinin anormal proliferasyonundan kaynaklanan bir hastalıktır. Üç ana KRK tipi vardır, sporadik, kalıtsal ve kolit ile ilişkilidir. KRK vakalarının sayısı dünya çapında her geçen gün artmaktadır. Hem çevresel hem de genetik faktörler, KRK olma riskini belirler. Ek olarak, uzun süreli ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olan hastalarda KRK gelişme riski yaşla birlikte artmaktadır (14). Çok sayıda çalışma, KRK için risk faktörlerinin diyet ve yaşam tarzı, aile öyküsü ve kronik inflamasyonu içerdiğini göstermiştir. Bununla birlikte, popülasyon genelinde KRK'yi önlemenin ve KRK'ye bağlı ölümleri azaltmanın en etkili yöntemi, ortalama riskli bireylerin taranmasıdır (15). Bu nedenle, çoğu Avrupa ülkesi, Kanada, Kuzey ve Güney Amerika'daki belirli bölgeler, Asya ve Okyanusya nüfusa dayalı tarama programları başlatmıştır (16). KRK taramasına katılmaya uygunluk yaşa ve ikamet edilen bölgeye göre belirlenir. Mikrosimülasyon modellemesinin sonuçları, tarama programlarının uygulanmasına başlayan Amerika Birleşik Devletleri'nde KRK'ye bağlı morbidite ve mortalitesinde düşüş eğilimi göstermiştir (14). Ek olarak, popülasyona dayalı tarama, erken evre müdahalelere olanak tanıyarak ve bireylere ve/veya topluluklara yönelik tehdidi azaltarak, ortalama riskli popülasyondaki henüz semptom göstermeyen hastalığı ortaya çıkarmayı amaçlar (16). KRK taramaya özellikle uygundur, çünkü bu sadece yaygın bir hastalık değil, aynı zamanda adenom-karsinom sekansının kademeli gelişimi ile karakterize olmasıyla bilinmektedir (17). Erken bir adenomun yerleşmiş bir KRK'ye ilerlemesi için geçen süre henüz bilinmemekle birlikte, mevcut kanıtlar bunun on yıldan az

olmadığını öne sürüyor (18). Bu uzun adenom-karsinom süreci, tarama ve ardından tedavi yoluyla tespit için fırsat sunmaktadır. Ayrıca, kolorektal adenomların cerrahi müdahale ile alınması yoluyla KRK önlenebilir (19). KRK ne kadar erken teşhis edilirse, hastanın ölme olasılığı o kadar düşmektedir (20). Dolayısıyla adenom-karsinom geçişi sürecinde yapılan müdahalelerle olumlu sonuçlar elde edilmesi muhtemeldir. Diğer etkili stratejiler, enflamatuar barsak hastalığı olan bireyler, kalıtsal KRK sendromu olan aileler, aile geçmişinde KRK'ye genetik yatkınlık olduğunu düşündüren ancak saptanabilir genetik belirteçleri olmayan kişiler ve fenotipik görünümü yüksek risk gösteren kişiler dahil olmak üzere yüksek riskli popülasyonların belirlenmesi ve izlenmesini kapsamaktadır. Metabolomik analizler, genetik varyasyondan etkilenen önemli biyolojik aktivitelerin belirlenmesine yardımcı olmuştur (21). En sık kullanılan KRK tarama yöntemleri gaitada gizli kan (GGK) testleri ve kolonoskopidir (22). Erken aşamada poliplerin düzenli olarak taranması, saptanması ve rezekte edilmesi çok önemlidir; böylece KRK oluşumu önlenebilir. Mevcut tanı, KRK vakalarının yalnızca %40'ını erken evrelerde saptayabilir. Ayrıca, ameliyat ve ameliyat sonrası tedaviyi takiben KRK tekrarlayabilir (23). Yan tedavi olarak verilen kemoterapötik ilaçlar, kanser hücrelerini hedef alırken çevredeki sağlıklı hücrelere de zarar verir. Modern kemoterapiler, neredeyse tüm KRK hastalarında direnç kazanarak antikanser ilaç etkinliğini azaltmasıyla kemoterapi başarısızlığına yol açmıştır.

Uzun yıllardır kanser hastaları, hastalığa karşı ilk savunma hattı olarak cerrahi ve kemoterapi kullanılmaktadır. Tedavi seçeneklerindeki gelişmeler, KRK hastalarının hayatta kalma süresini iyileştirmiştir. Kanser hastalarında, tümörü tamamen uzaklaştırmak ameliyat ile mümkündür. KRK vakalarının yaklaşık dörtte biri ileri evrede teşhis edilir ve bu vakaların %20'si metakron metastazlar edinir; bu nedenle, küratif cerrahi tek başına genellikle mümkün değildir ve tümörle ilişkili mortalite ile sonuçlanır (21). Özellikle kemoterapi veya radyoterapi, tümörü küçültmek veya stabilize etmek için ameliyattan önce veya sonra kullanılabilir (24). Mevcut kemoterapi, tek ajan tedavisini (öncelikle floropirimidin (5-FU)) ve oksaliplatin (Oxaliplatin, OX), irinotekan (IRI) ve kapesitabin (Capacitabin, CAP) dahil olmak üzere bir çok ajan bulunmaktadır. Kombine tedavi rejimleri FOLFOX (5-FU + OX + Leucovorin), FOLFIRI (5-FU + IRI+ Leucovorin), XELOX veya CAPOX (CAP +

OX) ve CAPIRI (CAP + IRI) birinci basamak tedavide ana tedavi yaklaşımları olmaya devam etmektedir. Kötüleşme riski düşük olan hastalara tek ajan tedavisi önerilir. Kombine tedavilerde kullanılan yan maddelerinin seçilmesi, tedavi etkinliği açısından benzerlik gösterirken yan etkiler açısından farklılık görülmüştür (25). Bununla birlikte, sistemik toksisite, tatmin edici olmayan tedavi yanıtları, doğal ve kazanılmış direnç ve tümöre özgü seçicilikteki düşüklük gibi birkaç geri döndürülemez dezavantajı vardır.

2.2 Kolorektal Kanser Risk Faktörleri

Bilindiği gibi KRK'nin gelişimi, değiştirilemeyen risk faktörleri ve değiştirilebilir risk faktörleri ile olarak ikiye ayrılır. Cinsiyet, yaş, ırk, adenomatöz polip ve inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) ve aile öyküsü değiştirilemeyen risk faktörleridir. Değiştirilebilir faktörler, bireysel alışkanlıklar veya yaşam tarzları ile ilgilidir. Değiştirilebilir faktörlerden uzaklaşıldığında KRK oluşumu riski azaltılabilir.

Genç yetişkinlerde KRK görülebilir ancak, çoğu malignite 50 yaş üzerinde ortaya çıkar. Erkeklerde kolon kanseri teşhisi ortalama 68 yaşında görülürken, kadınlarda ortalama 72 yaşındadır. Hem erkek hem de kadınlarda rektal kanser teşhisi ortalama yaşı 63'tür. (26,27). İlerleyen yaş, KRK'nin değiştirilemeyen risk faktörlerinden biridir. Steele ve diğerleri tarafından yürütülen bir çalışmada, 7948 KRK hastasının %77'sinin 50 ile 79 yaşları arasında olduğunu ortaya konulmuştur (27).

Erkeklerin KRK geliştirme olasılığı kadınlardan daha fazladır (28). Yakın tarihli bir çalışmada, kontrollerle karşılaştırıldığında, erken yaşta başlayan KRK'li (18-49 yaş) hastaların erkek olma olasılığı kadınlarınkinden daha yüksek bulunmuştur. Hastalık Kontrolü ve Önlenmesi Merkezi raporuna göre, 2020'de KRK insidansı ve ölüm oranı cinsiyet, ırk ve etnik kökene göre farklılık gösteriyor. Genel olarak, siyah erkekler ve kadınlar ırklar arasında en yüksek insidans ve ölüm oranlarına sahipken, bunu beyaz erkekler ve kadınlar, Asyalı veya Pasifik Adalılar, ve Amerikan Kızılderilileri veya Alaska Yerlileri izlemiştir. Hispanik olmayan erkek ve kadınlar, Hispanik erkek ve kadınlara göre daha yüksek insidans ve ölüm oranına sahiptir. Geç evre KRK insidansı birkaç Asyalı Amerikalı grupta (Koreli ve Güney Asyalı erkekler ve kadınlar ve Çinli kadınlar) %30 ila 60 daha düşük olduğunu gösteren çalışmalar

mevcuttur (29). Beyaz ırka göre, siyah ırk rektal kanseri açısından önemli ölçüde düşük insidansa sahiptir, ancak distal ve proksimal bölgelerde KRK insidansi daha yüksektir (30). Afrikalı Amerikalıların kolon tümörlerine sahip olma olasılığı daha yüksek bulunmuştur. Proksimal tümör insidansına baktığımızda ise yine siyah ırkta daha yüksek görülmüştür (28,31).

Ülseratif kolit veya Crohn hastalığı gibi İBH de KRK ile bağlantılıdır. Bu mekanizma kronik mukozal inflamasyona, artan hücre döngüsüne ve artan sporadik mutasyon oranlarına sebep olur (32). İBH'si olan yaklaşık 45.000 hastayı içeren 13 çalışmanın meta-analizinde, KRK riskinin, İBH'si olan kişilerde, İBH'si olmayan kişilere göre yaklaşık üç kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (33). Epidemiyolojik çalışmalar, tip 2 diabetli bireylerin KRK geliştirme riskinin arttığını göstermiştir.

ABD'de yaklaşık 22.000 KRK hastasıyla yapılan bir çalışma, diyabet prevalansının proksimal kanserde distal veya rektal kanserlerden daha güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir (34). Hiperinsülineminin kolon üzerindeki etkisi, proksimal kolon kanseri riskinin artmasını açıklayabilen altta yatan bir mekanizmadır. Büyüme ve gelişmede işlev gören ve kanser hücrelerinde spesifik insülin benzeri büyüme faktörü (insulin-like growth factor, IGF) reseptörleri ile birlikte aşırı eksprese edilen IGF'ler birçok malignitenin gelişiminde rol oynar. IGF bunu, hücre döngüsü ilerlemesini arttırırken aynı zamanda apoptozu baskılayarak yapar. İnsülin, insülin reseptörlerini uyararak ve vücuttaki IGF bağlayıcı proteinlerin miktarını düşürerek kanseri teşvik eder (35).

2.3 Kolorektal Kanser Oluşumu

Çoğu kanser tipinde olduğu gibi KRK hücreleri de genetik olarak heterojeniteye sahiptir ve çeşitli birbirinden farklı mekanizmalarla gelişebilir. Örneğin, birçok KRK hücresinin, farklı gen ekspresyon profilleri seviyesinden kaynaklanan düzinelerce somaklonal mutasyon sergilediği görülmüştür. KRK'nin diğer malignitelere oranla en yüksek mutasyon yüklerinden birine sahip olduğu düşünülmektedir. Somatik mutasyonların sayısına bağlı olarak, KRK geniş bir şekilde hipermutasyona uğramış (10^6 bazda 12'den fazla mutasyon) veya hipermutasyona uğramamış (10^6 bazda 8.24'ten az mutasyon) olarak sınıflandırılabiliriz (36). Ek olarak, KRK'yi gen

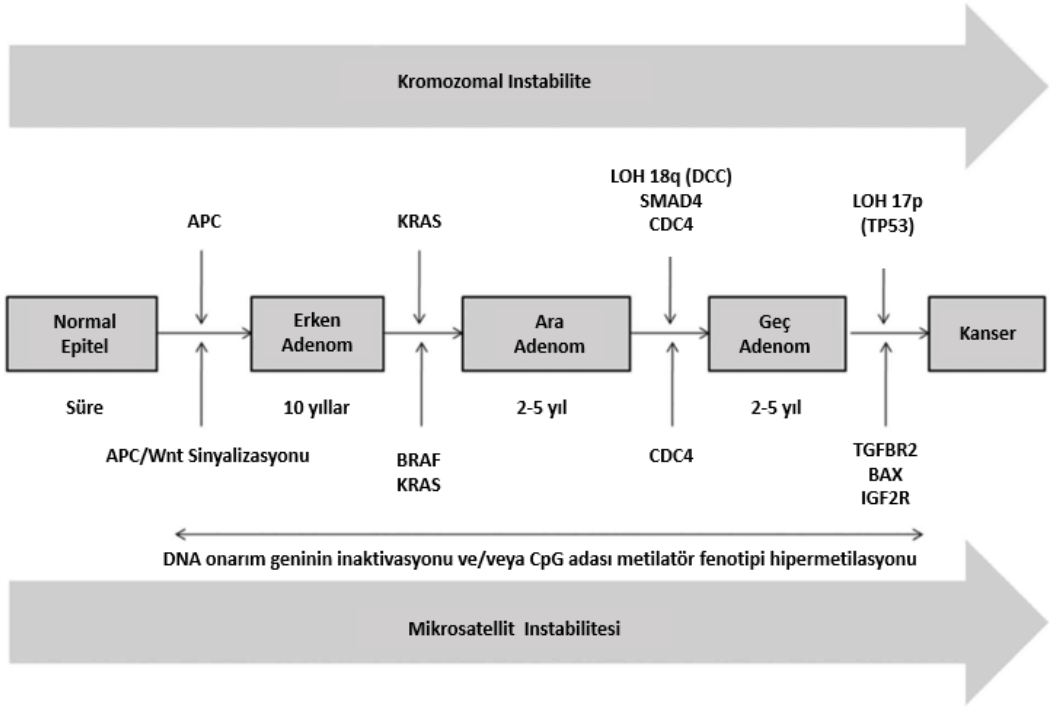
ekspresyon profillerine dayalı olarak kategorize etmeye yönelik çalışmaların bir sonucu olarak, KRK için yeni bir sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir. Bu sınıflandırmalar, gen ekspresyon profilleri hakkındaki verilerin tümör genotipleri ile bütünleştirilmesi nedeniyle güncellenmiş ve değiştirilmiştir.

Bilindiği üzere KRK, epitel hücrelerinin hiperproliferatif olmalarını sağlayan bir dizi genetik veya epigenetik değişiklik kazandığında gelişimi başlar (37). Bu hızla bölünen hücreler, kansere ilerleyebilen ve mikro uydu dengesizliği (microsatelltite instability, MSI), kromozomal dengesizlik (chromosomal instability, CIN) ve tırtıklı (serrated) neoplazi (38–40) dahil olmak üzere birkaç farklı yolla iyi huylu bir adenom oluşturur. Adenom-karsinom sekansı, kanserin ilerlemesini tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Sporadik KRK vakalarının büyük çoğunluğu geleneksel karsinogenez yolağıyla gerçekleşir. Kanser, küçük bir adenoma ve sonrasında büyük bir adenoma oluşumunu takiben karsinomaya dönüşümüyle sonlanır. Yukarıda sözü geçen karsinogenez yolu ile CIN-pozitif alt tipin gelişimi arasında güçlü bir ilişki vardır. Ulusal Kanser Enstitüsüne göre, bu model sporadik KRK'nin %10-15'ini oluşturmaktadır. Bu yol tipik olarak, enflamasyonda yer alan CpG ada metilatör fenotipi, CIMP, yüksek alt tipinin geliştirilmesinde yer alır. Uzun süreli yaşanan inflamasyon, normal hücrelerin belirsiz displazi geliştirmesine neden olur, bu da düşük dereceli displaziye doğru ilerler, daha sonra yüksek dereceli displaziye ve son olarak da kanser oluşumu gerçekleşir (19). İBH ve profilaktik kolektominin yaygın kullanımı, dünya çapında KRK vakalarının %2'sinden daha azından sorumludur. Adenoma-karsinom ve tırtıklı yolaklarda daha belirgin olmakla birlikte, tüm yolaklarda erişilebilen ve çıkarılabilen iyi huylu öncü lezyonlar vardır (19). Kansere dönüşmeleri yıllar aldığından, bu lezyonların rezeke edilmesiyle KRK'nin önlenmesi muhtemeldir.

Adenokarsinomlar tüm KRK'lerin kabaca %96'sını oluşturur. Bir adenokarsinom invazif hale geldiğinde, kan ve lenfatik arterler yoluyla diğer vücut bölgelerine yayılabilir (38). Bununla birlikte, bir polip geliştirmek ile invaziv kanser arasında ortalama 18 yıla kadar bir süre geçebilir. Bu süre metastaz oluşturmak için ortalama dokuz yıldır (39). Diğer herhangi bir kanser gibi, KRK de evre 0'dan evre IV'e kadar sınıflandırılır.

2.3.1 Kolorektal Karsinogenezinin Moleküler Mekanizması

Bahsedildiği gibi, KRK gelişimi, sıralı mutasyonların dahil olduğu karmaşık, çok aşamalı bir süreçtir. Hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, apoptozu ve hayatta kalmayı düzenleyen birkaç hücresel sinyal yolu, KRK başlangıçlarında yer alır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)/mitojenle aktive olan protein kinaz (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK), kanatsız ilişkili entegrasyon bölgesi (Wingless-related integration site, Wnt)/β-katenin, fosfoinositid 3-kinaz (Phosphoinositide 3-Kinase, PI3K), dönüştürücü büyüme faktörü-β (Transforming Growth Factor-B, TGF)-β, Nörojenik lokus çentik homolog proteini (Neurogenic Locus Notch Homolog Protein, Notch) ve nükleer faktör (Nuclear Factor, NF)-κB bunlardan en önemlileridir (41). Kolorektal kanser multistep karsinogenezinin moleküler mekanizması Şekil 1'de özetlenmiştir.



Şekil 1. Kolorektal karsinogenezinin moleküler mekanizması. Bu şekilde, sağlıklı epitelden başlayıp, erken adenoma, ara adenoma, geç adenoma ve son olarak kanser oluşumuna kadar olan süreçte, hücrede gerçekleşen mutasyonları ve bu geçişlerdeki ortalama süre gösterilmektedir. Erken adenomaya geçiş on yıllar alırken, ara ve geç adenomaya geçiş iki-beş yıl sürmektedir**.** Adenomatöz polipozis koli (Adenomatous

Polyposis Coli, APC), kirsten sıçan sarkomu virüsü (Kirsten Rat Sarcoma Virus, *KRAS*), kolon kanserinde silinen lokus için 18q kaybı ve homozigotluk (Loss of heterozygosity of chromosome 18q in DCC locus, *LOH 18q (DCC)*), 17. kromozomun (17p) kısa kolunda heterozigotluk kaybı (Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 17 (17p), *LOH 17p*), kanatsızla ilgili entegrasyon sitesi (Wingless-related integration site, *Wnt*), serin/treonin-protein kinaz B-Raf (serine/threonine-protein kinase B-Raf, *BRAF*) hücre bölünmesi kontrol proteini 4 (cell division control protein 4, *CDC4*), dönüştürücü büyüme faktörü beta reseptörü 2 (transforming growth factor beta receptor 2, *TGFBR2*), *BCL 2* ilişkili X (B hücreli lenfoma 2, (B-cell lymphoma 2, *BCL 2*) associated X, BAX), insülin büyüme faktörü reseptörü 2 (insulin growth factor receptor 2, *IGFR2*) (38)**.**

EGFR/MAPK Sinyal Yolu

Bir katalitik reseptör tirozin kinaz (RTK) olan EGFR, hücre dışı bir ligand bağlama alanı içeren bir transmembran proteindir. Ligand bağlanmasından sonra, EGFR aktive edilir ve dimerize olur, bu da hücreler arası alanda birkaç tirozin kalıntısının otofosforilasyonuyla sonuçlanır. Ayrıca, büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2'yi ve yedisizin oğlunu (Son of Sevenless) içeren EGFR adaptör protein kompleksi, guanozin difosfatın, guanozin trifosfata dönüştürülmesiyle fare sarkoma virüsünün (Rat Sarcoma Virus, RAS) aktivasyonunu fosforile tirozin kalıntılarına bağlanımı yoluyla gerçekleştirir. RAS aktive edildiğinde, kinaz kaskadı başlar. Bu kaskad, mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz kinaz-Raf (MAPKKK), mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz-MEK (MAPKK), MAPK ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (Extracellular Signal−Regulated Kinase, ERK)'ı içerir (42). ERK sinyal yolunun hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve hayatta kalmasını düzenlediği ortaya konulmuştur. Düzensiz EGFR/MAPK sinyal yolu, çeşitli insan kanserlerinde yer almaktadır. Bu durum artan hücre proliferasyonu ve sağkalım, anjiyogenez, anti-apoptoz, invazyon ve metastaz yoluyla malign transformasyona ve tümör ilerlemesine yol açabilir (43). Önceki çalışmalar, EGFR/MAPK sinyal yolunun doğrudan KRK onkojenik süreçleriyle ilişkili olduğunu, tümör büyümesinde ve hastalık ilerlemesinde

çok önemli roller oynadığını göstermiştir (44). Bu nedenle, bu yol ve aşağı akış sinyal kaskadları, KRK terapötik müdahalesi için hedefler olarak bildirilmiştir (45,46).

Wnt/β-Katenin Yolu

Glikoprotein yapılı Wnt ailesinden 19 üyenin tamamının, hücre çoğalması, göçü ve bölünmesi gibi birçok gelişimsel ve karsinogenez sürecinde düzenleyici rol oynadığı bilinmektedir. Ek olarak, Wnt/β-katenin sinyali doku, saç, deri ve bağırsak yenilenmesinde önemli rol oynar. Bu sinyal yolundaki mutasyonlar, KRK'de sıklıkla gözlenir. Wnt ligandı salgılanıp biriktiğinde, Frizzled (Fz) reseptörlerine bağlanır. Daha sonra, çok işlevli glikojen sentaz kinaz-3β inaktive edilir ve E-kadherin hücre-hücre yapışma proteini ve transkripsiyonel bir aktivatör olarak işlev gören β-katenin stabilize edilir, biriktirilir ve nükleusta akümile olur. Böylece lenfoid güçlendirici faktör (Lymphoid Enhancer Factor, LEF) veya T-hücresi transkripsiyon faktörü (T-cell Transcription Factor, TCF) ile, çoğalma ve iletimde yer alan spesifik hedef genleri aktive eder. Wnt sinyalinin yokluğunda β-katenin, kazein kinaz 1 ve APC-nükleus proteinleri Axin-glikojen sentaz kinaz-3β kompleksi tarafından ubikuitinasyon ve fosforilasyonu yoluyla proteasomal bozunmaya uğrar. Wnt sinyal hiperaktivasyonu, tümör hücresi proliferasyonuna katkıda bulunur ve aktivasyonu, özellikle KRK'de olmak üzere ileri kanser evresinde tümör büyümesi için gereklidir (41,47)

PI3K Sinyal Yolu

Önemli bir protein olan PI3K, hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, göçü ve hayatta kalması gibi çeşitli hücresel aktiviteleri düzenleyen önemli bir hücre içi lipid kinazdır (48). PI3K, p85 (bir düzenleyici alt birim) ve p110 (bir katalitik alt birim) olmak üzere iki alt birim içeren heterodimerik bir moleküldür. Bir serin/treonin-protein kinaz ve PI3K'nın aşağı akış efektörü olan protein kinaz B (Protein kinase B, AKT/PKB), PI3K'nın tümör büyümesi ve ilerlemesi üzerindeki etkilerini düzenler (49). AKT fosforilasyonunun, KRK hücre proliferasyonu ve apoptoz inhibisyonunda yer aldığı bildirilmiştir. Bu nedenle PI3K/Akt yolunun inhibisyonu birçok kanserde tedavi amaçlı kullanılmıştır. PI3K, ligandın reseptör tirozin kinazlara (RTK) bağlanmasıyla aktive edilir. Ardından, aktive edilmiş PI3K, fosfatidilinositol 4,5-

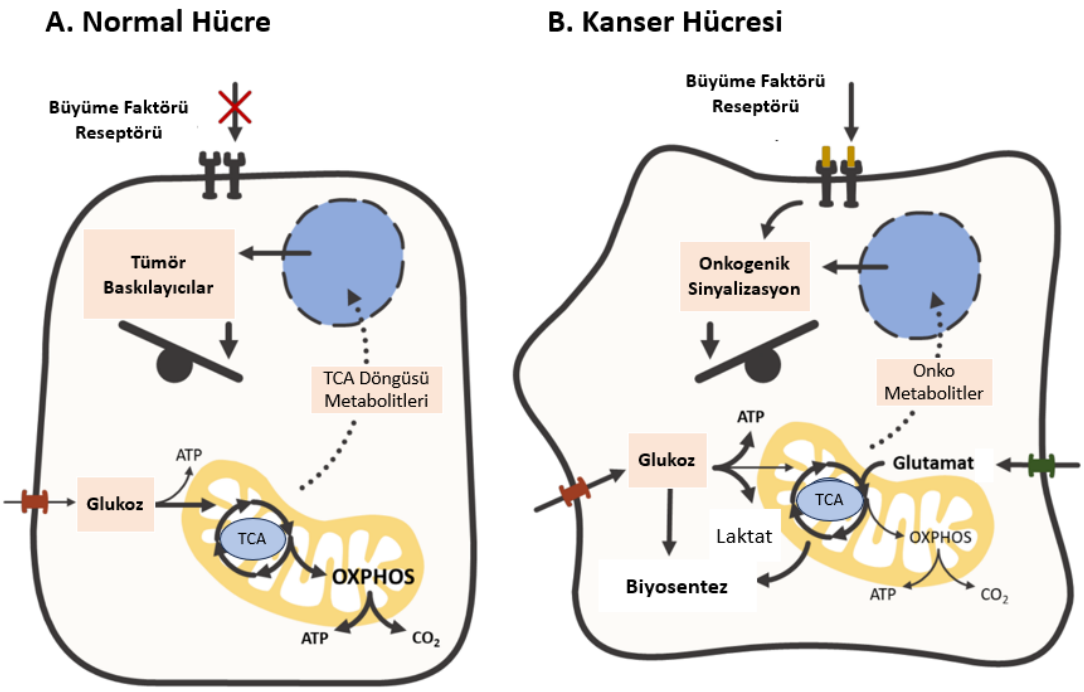
bisfosfatı fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfata fosforile eder. Daha sonra, fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfat, AKT'yi serin ve treonin bölgeleri üzerinden aktive ederek hücre proliferasyonu ve hücre hayatta kalmasıyla sonuçlanır. AKT, hücre döngüsü, proliferasyon, anjiyogenez, protein translasyonu ve büyüme ve hayatta kalmaya aracılık eden rapamisinin memeli hedefi (Mammalian Target of Rapamycin, mTOR) gibi aşağı akış proteinlerini düzenler. Bir tümör baskılayıcı ve bir PI3K yolu aşağı düzenleyici protein olan fosfataz ve tensin homolog, fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfatı fosforile eder. Yolun bu değiştirilmiş ifadesi, genellikle hücrelerin sürekli büyümesiyle sonuçlanan ve kansere yol açan KRK'de gözlenir. Genel olarak, PI3K sinyal yolunun, KRK'nin başlamasında ve gelişmesinde onkojenik bir rol oynadığı ortaya konulmuştur (50)

TGF-β Sinyal Yolu

Bir TGF-β sinyal yolu, hücre proliferasyonu, büyümesi, farklılaşması, bölünmesi, göçü ve yapışmasında yer alır. TGF-β sinyali, 2 heterodimer reseptörün, reseptör dimerizasyonu yoluyla bir kompleks oluşturmak üzere bir araya geldiği reseptörlerine ligand bağlanması üzerine başlatılır. Daha sonra, bu reseptörlerin kinaz alanı, fosforilasyon ile aktive edilir ve aşağı akış transkripsiyon faktörleri aktive edilir. Spesifik olarak, SMAD2 ve SMAD3, fosforile heterodimerler oluşturarak aktive edilir ve bu heterodimer kompleksi, bir heterotrimer oluşturmak üzere SMAD4'e bağlanır. Daha sonra heterotrimerler, TGF-β hedef genlerine bağlanmak ve transkripsiyonu düzenlemek için çekirdeğe yerleşir. Yakın zamanda yapılan araştırmalar, bir tümör baskılayıcı olarak TGF-β'nın kolon epitel hücrelerinde hücre bölünmesine, çoğalmasına, apoptoza ve farklılaşmaya aracılık ettiğini bildirmiştir (51). TGF-β, KRK hücrelerinde erken aşamalardan itibaren kaybolur, bu nedenle büyüme inhibisyonuna direnç sıklıkla gözlenir. KRK'nin geç evrelerinde, TGF-β ekspresyonu artarak epitelden mezenkimal geçişe (Epithelial-to-Mesenchymal Transition, EMT) yol açar. Sonuç olarak, artan invazyon ve metastaz nedeniyle normal hücresel bağışıklık tepkisi azalır. TGF-β ayrıca Ras homolog aile üyesi A (Ras Homolog Family Member A, RhoA) sinyal yolu (52) aracılığıyla SMAD4'ten bağımsız bir yol aracılığıyla EMT'yi indükleyebilir.

2.3.2 Kolorektal Kanser ve Enerji Metabolizması

Malign transformasyon sürecinde, ya değişen tümör mikroçevresine ve buna karşılık gelen biyoenerjetik taleplere bir yanıt olarak ya da değişen hücresel büyüme sinyalinin bir sonucu olarak bir dizi metabolik adaptasyon meydana gelir. Bu farklanan metabolik durum Şekil 2'de gösterilmiştir. Tartışmasız, kanser biyoenerjetiklerinin en kapsamlı şekilde incelenen değişikliği Warburg etkisi olarak adlandırılan durumdur. Bu terim adını, yaklaşık 100 yıl önce kanser hücrelerinde birincil enerji kaynağı olarak aerobik glikolize doğru metabolik kaymayı ilk kez tanımlayan Otto Warburg'dan almıştır (53). Transforme olmamış hücrelerin aksine, çoğu kanser hücresi hücresel süreçlere enerji sağlamak için oksidatif fosforilasyon (Oxidative Phosphorilation, OXPHOS) kullanmaz. Bunun yerine, oksijen varlığında bile laktat üretiminin eşlik ettiği glikolize yönelirler (54).



Şekil 2. Normal hücrelerdeki (A) ve kanser hücrelerindeki (B) metabolizmanın karşılaştırılması. Normal hücrelerin çoğunda, büyüme faktörü sinyalinin yokluğu, sınırlı besin kaynağı ve tümör baskılayıcıların aktivitesi, enerji verimini en üst düzeye çıkarmak için OXPHOS'a teşvik eder. Kanser hücrelerinde, büyüme faktörü sinyali ve onkogenler, lipidlerin, nükleotidlerin ve proteinlerin biyosentezine doğru metabolik bir kayma sağlamak için besin maddelerinin (örn. glukoz, glutamat) taşıyıcı aracılı

alımını kolaylaştırır. TCA döngüsü, ara ürünler üreterek ve sağlayarak anabolik ve katabolik süreçleri birbirine bağlayan ana merkez olarak hizmet eder. TCA döngüsünün metabolitleri ve onkometabolitleri sinyal molekülleri olarak işlev görür (55). *Bu görsel ingilizce (orijinal) dilinden Türkçeye çevrilmiştir.

Birçok çalışma Warburg etkisinin ötesinde metabolik adaptasyonların öneminin altını çizmiş ve kanser hücrelerindeki enerji karmaşıklığının yanı sıra tümörlerin metabolik heterojenliğini ortaya koymuştur (56–58). Warburg etkisinin kusurlu mitokondriden kaynaklanmadığı görüşü yeni değildir (59). Onkojenik sinyalizasyon ve hipoksik koşulların bir sonucu olduğu yaygın olarak anlaşılmaktadır. Yine de, metabolik dinamiklerin KRK'nin kemorezistansı, metastazı ve agresifliğinde oynadığı rolü yeni yeni anlamaya başlıyoruz (60,61).

Hücresel enerjinin düzensizliği, kanserin ortaya çıkan ayırt edici özelliklerinden biri olarak kabul edilmektedir, ancak bu değişikliklerin kanser hücrelerinin temel bir özelliğinden ziyade proliferasyona neden olan onkogenlerin bir sonucu olduğu henüz tam olarak anlaşılamamıştır (62).

Bir kanser hücresinin metabolik fenotipi, tümör mikroçevresi adaptasyonlar ve metabolik enzimlerin mutasyonları dahil olmak üzere malign dönüşümün çeşitli yönlerine atfedilebilir. Ayrıca onkojenik sinyalizasyonun bir sonucu olarak da ortaya çıkabilir, böylece hücresel büyüme hızının artmasını ve biyosentetik yollar için substratların sağlanmasını mümkün kılar. Bu gözlemler metabolik yeniden programlama kavramına yol açmıştır: metabolizmada kanserle ilişkili değişiklikler hasarlı mitokondri, hücre çoğalması veya hayatta kalma sinyallerine pasif bir yanıt değil, onkojene yönelik metabolik yeniden programlamanın bir sonucudur (63). Ayrıca, α-ketoglutarat, süksinat ve fumarat gibi TCA döngüsü metabolitleri onkojenik sinyale katılabilir (64).

Büyüyen bir tümör kısa süre içinde difüzyonun yeterli oksijen kaynağı sağladığı boyutu aşarak tümörde hipoksik koşullara ve glikolize doğru bir kaymaya yol açar. Bu değişim, hipoksik stresten kaçınmayla ilişkili çeşitli genlerin ekspresyonuna yol açan ve pirüvat dehidrojenaz kinazı (PDK) aktive ederek mitokondriyal metabolizmayı inhibe eden hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörü 1α (Hypoxia Inducible Factor 1α, HIF1α) tarafından düzenlenir (65,66). Ayrıca HIF1α, anjiyogenetik büyüme

faktörleri VEGF ve PDGFβ'nın ekspresyonunu indükleyerek tümöre oksijen ve besin sağlayan yeni kan damarlarının oluşumunu uyarır (67,68). KRK'de HIF1α ekspresyonu, kansere özgü mortalite ve nüksün yanı sıra vasküler invazyon ile de ilişkilidir (69). HIF1α tarafından düzenlenen genlerin KRK'da kemorezistans ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Prolil hidroksilaz domain proteini (prolyl hydroxylase, PHD) (70) tarafından katalize edilen HIF-1α hidroksilasyonunun indüksiyonu ve ardından zebularin ile protein degradasyonu, azoksimetan (AOM)/dekstran sodyum sülfat (DSS) ile indüklenen bir KRK fare modelinde oksaliplatin direncinin tersine çevrilmesine ve anjiyogenezin inhibisyonuna yol açmıştır (60). Mitokondriyel pirüvat taşıyıcısı 1 ve 2 (Mitochondrial Pyruvate Carrier 1, MPC1 ve Mitochondrial Pyruvate Carrier 1, MPC2) alt birimlerinden oluşan mitokondriyal pirüvat taşıyıcılarının KRK'deki metabolik kader için bir başka önemli faktör olduğu gösterilmiştir. MPC, pirüvatın mitokondriyal alımından sorumlu olduğundan, trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde sonraki oksidasyonunu sağlar (71). MPC1 ve MPC2'nin silinmesi veya aşağı regülasyonu hem kolorektal dokuda hem de hücre hatlarında gözlenmiş ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. MPC'nin ekspresyonu Warburg etkisinin ortadan kalkmasına ve KRK hücrelerinde oksidatif metabolizmanın yeniden kurulmasına yol açarken, fare ksenograft deneylerinde büyümeyi ve köklülük belirteçlerinin ekspresyonunu bozmuştur (72).

Aynı zamanda, bir dizi çalışma OXPHOS'un KRK'deki rolünün altını çizmektedir. KRK biyopsi materyali ve çevresindeki sağlıklı kolon dokusunun işlevsel karşılaştırmalı analizi, KRK hücrelerinde neredeyse değişmeyen bir glikolitik aktivite ve OXPHOS'un yukarı regülasyonunu ortaya çıkarmıştır (73). Hasta kaynaklı mikrosatellit-stabil (MSS) KRK doku örneklerinde, özellikle evre I ve II kanserlerde mitokondriyal DNA (mtDNA) kopya sayısında artış gözlenmiştir (74). MSS KRK hücre hatlarında artmış mtDNA kopya sayısının, mitokondriyal OXPHOS indüksiyonunun neden olduğu daha yüksek bir proliferasyon ve apoptozun inhibisyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (75). OXPHOS'un kemorezistans gelişimi ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. OXPHOS'un yukarı regülasyonu, oksaliplatin ve 5-FU ile kemoterapiden sonra KRK'li hastaların karaciğer metastazlarında meydana gelmiş ve kemorezistans gelişimiyle bağlantılı olmuştur. Hasta kaynaklı kolonosfer kültürlerinin kemoterapötik uygulaması, mitokondriyal biyokütlede ve solunum

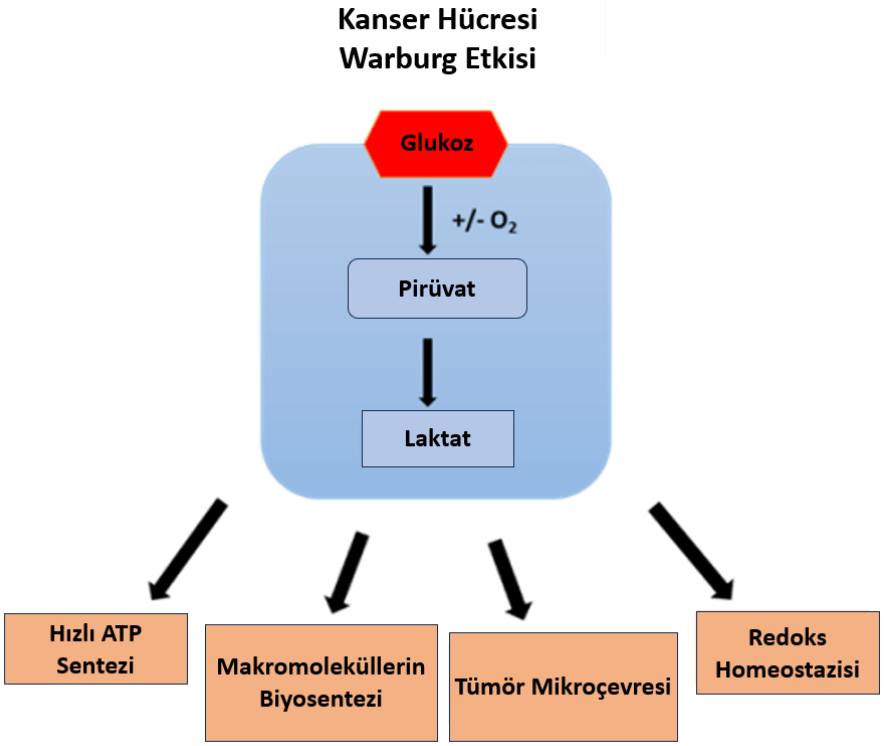
zinciri enzimlerinin ekspresyonunda bir artışa ve ayrıca histon deasetilaz sirtuin-1 (SIRT1) ve substratı olan transkripsiyonel koaktivatör PGC1α'nın aracılık ettiği daha yüksek oksijen tüketimi oranlarına yol açmıştır (76). KRK hücre hatlarında 5-FU'ya karşı direnç, OXPHOS'a doğru metabolik bir kayma ile ilişkilendirilmiştir. Dirençli hücreler kök benzeri özellikler sergilemiş ve 5-FU ile kombinasyon halinde OXPHOS inhibitörü metformine karşı yüksek hassasiyet göstermiştir (77). OXPHOS'a metabolik yeniden programlamanın, EGFR inhibitörü gefitinib ve BRAF inhibitörü vemurafenib ile *in vitro* hedefli kemoterapötik ajanlara karşı kemorezistans mekanizmasına dahil olduğu gözlenmiştir (78).

Onkogenlerin ve mutasyona uğramış tümör baskılayıcıların KRK'nin metabolik durumuna ilişkin önemli rolü gösterilmektedir. Sağlıklı adenom ve KRK hastalarının karsinom dokusunda mtDNA kopya sayısının araştırılması, malign tümörlerde bir azalma olduğunu ortaya koymuştur. *BRAF* mutasyonlu ve MSI tümörlerde mtDNA kopya sayısının önemli ölçüde düşük, *KRAS* mutasyonlu tümörlerde ise yüksek olduğu gösterilmiştir (79). Buna uygun olarak, adenozin difosfat (ADP) ile aktive edilen solunum hızının (Vmax) ve mitokondriyal dış membran (MOM) geçirgenliğinin hasta kaynaklı *KRAS-/BRAF* mutasyonlu ve yabanıl tip (Wild Type ,WT) tümör örneklerinde işlevsel olarak incelenmesi, KRAS mutasyonlarının oksidatif bir fenotiple, *BRAF* mutasyonlarının ise glikolitik bir fenotiple bağlantılı olabileceğini göstermektedir (80). Bu gözlem, *KRAS* mutasyonlu KRK hücrelerinde glikoliz indüksiyonunu, laktik asit birikimini ve glikolitik inhibisyona duyarlılığı ortaya koyan başka bir çalışmadaki bulgularla çelişebilirken, *BRAF* mutasyonlu KRK hücreleri glikoz kaynağı değişikliklerine veya metabolik inhibitörlere karşı dirençli kalmıştır (81)

2.3.3 Kolorektal Kanser Enerji Metabolizması ve Warburg Etkisi

Kanser hücrelerinin benzersiz metabolik fenotipi ilk olarak 1924 yılında Otto Warburg tarafından, oksijen varlığında bile kanser hücrelerinin metabolizmalarını tercihen OXPHOS yerine glikolize ve ardından laktik asit fermantasyonuna kaydırdıklarını kaydettiğinde gözlemlenmiştir. Bu aerobik glikoliz durumu "Warburg etkisi" olarak bilinir (82,83). OXPHOS glikoz molekülü başına daha fazla ATP

üretirken, glikoliz daha hızlı ATP üretir. Ayrıca, artan glikoliz, hızlı çoğalmayı desteklemek için gereken makromolekülleri sentezlemek için glikolitik ara maddelerin hücresel kullanımını kolaylaştırır (84). Örneğin, glikolitik ara ürünler glukoz-6-fosfat, fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat, DNA replikasyonu için gerekli nükleotidleri sentezlemek üzere pentoz şekerler ve riboz-5-fosfat üreten pentoz fosfat yolunda riboz-5-fosfata dönüştürülür (84). Gliseraldehit-3-fosfat ayrıca hücre membranlarını oluşturmak üzere fosfolipid sentezlemek için kullanılır ve 3-fosfogliserat, serin ve glisin sentezi için bir substrattır. OXPHOS'taki azalmanın ayrıca hücreleri hızlı çoğalma sırasında oluşabilecek sitotoksik ROS ve oksidatif stresten koruduğu düşünülmektedir (84). Aerobik glikoliz sırasında biriken pirüvat, laktat dehidrojenaz 5 tarafından laktata indirgenerek NAD+ yeniden üretilir ve ardından monokarboksilat taşıyıcı 4 tarafından hücreden salgılanır (85). Yukarıda bahsedilen değişimlerin kanser hücresine sağladığı avantajlar Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Warburg etkisinin kanser hücrelerine sağladığı avantajlar (86)**.** *Bu görsel ingilizce (orijinal) dilinden Türkçeye çevrilmiştir.

Bugüne kadar elde edilen veriler, çoğu KRK hücresinin "Warburg" metabolik fenotipini gösterdiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, primer ve metastatik KRK

tümörleri genellikle çevreleyen normal bağırsak dokusundan daha yüksek glukoz tüketimi sergiler ve bu durumdan 18F-deoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi ile tümör görüntülemede yararlanılır (87,88). Ayrıca, KRK tümörleri artmış intratümöral laktat sergilemektedir. Glikoz alımı ve glikoliz için önemli olan çok sayıda gen ve protein de KRK'da hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α)(89), glikoz taşıyıcı 1 dahil olmak üzere yukarı doğru düzenlenir, hekzokinaz 1 (HK1), hekzokinaz 2 (90), monokarboksilat taşıyıcı 4 (91), pirüvat kinaz M2 (92), laktat dehidrojenaz A (LDHA, bir LDH monomeri) ve laktat dehidrojenaz 5 (93). Yukarıdaki genlerin çoğunun yukarı regülasyonu, KRK'da tümör agresifliği ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (94).

Warburg Etkisinin İlaç Direncine Katkısı

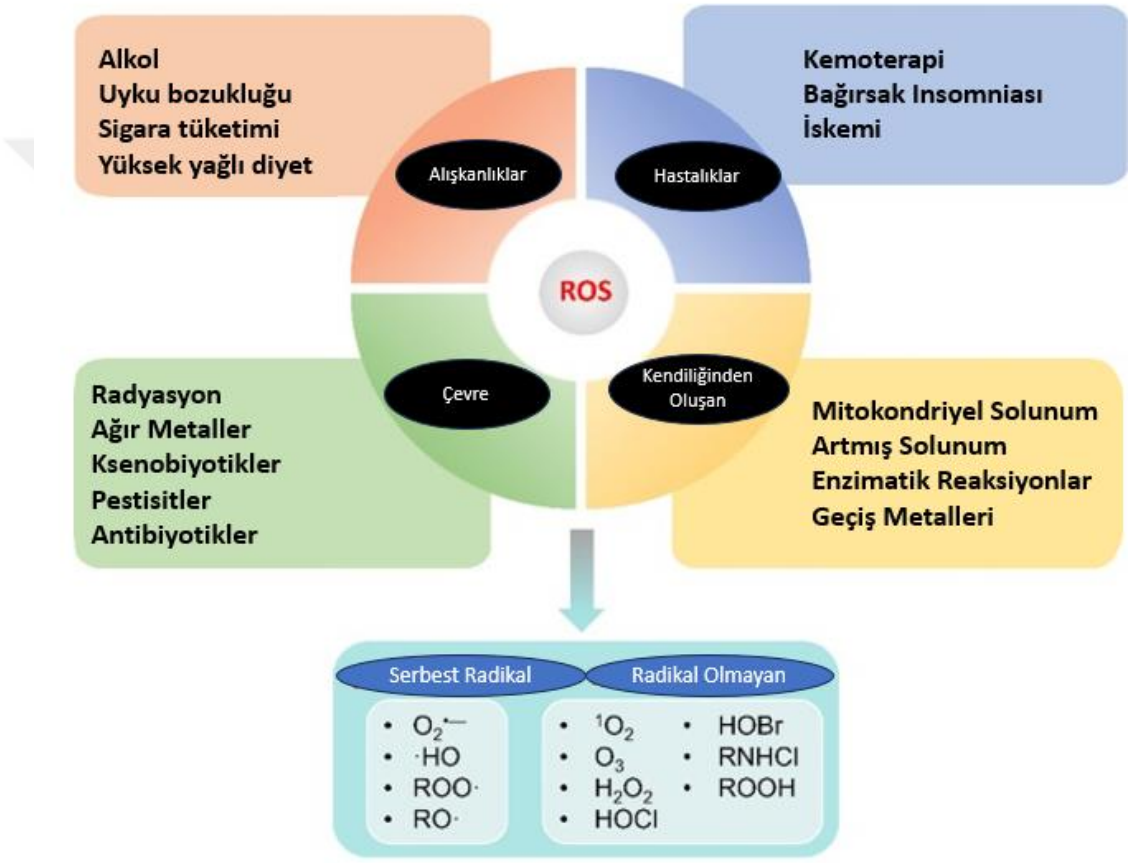
Kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve bağışıklık tedavisi gibi terapötiklerin uygulanması hastaların sağkalımını önemli ölçüde iyileştirmesine rağmen, çok sayıda hasta hala ilaç dirençli nedeniyle hastalığın ilerlemesi durumuyla karşılaşmaktadır (95,96) İlaç direnci mekanizmaları arasında artan ilaç akışı, ilaç inaktivasyonu, ilaç hedeflerindeki değişiklikler, gelişmiş DNA hasarı onarımı, hücre ölümünden kaçma, epigenetik modifikasyonlar, hayatta kalma sinyalinin aktivasyonu, kanser köklülüğü ve EMT yer almaktadır (97). Ortaya çıkan kanıtlar, tümör hücrelerinde Warburg etkisinin artmasının anti-tümör ilaçlara karşı KRK hücre direncini artırabileceğini ve anti-tümör ilaçlara karşı daha dirençli olan tümörlerin daha glikolitik olma eğiliminde olduğunu göstermiştir (98,99). Oksaliplatin veya irinotekan ile 5-florourasil bazlı terapötikler KRK hücrelerini belirgin şekilde öldürse de, tümör hücrelerinin bir kısmı hala hayatta kalarak ilaç direncine ve hastalığın ilerlemesine yol açmaktadır (95). Glikolitik metabolizma kemoterapiye karşı dirence katkıda bulunur. Araştırmalar, Glukoz taşıyıcı 1, 4 ve SGLT1 gibi glukoz taşıyıcılarının, 5-FU'ya yanıt veren hastalara kıyasla yanıt vermeyen hastalardan elde edilen KRK'de daha yüksek bir ekspresyonunun bulunduğunu göstermiştir. Glukoz taşıyıcılarının yukarı regülasyonu, ROS kaynaklı nekroptozla mücadele etmek ve hücre döngüsünü hızlandırılmış bir duruma getirmek için daha fazla pirüvat üretmek üzere aerobik glikolizi artırabilir. Bir başka çalışmada da yüksek glukozun insan kolon kanseri hücrelerinde 5-Fluorourasil'in antiproliferatif etkisini ve sitotoksisitesini zayıflattığı bulunmuştur (100). Warburg etkisinin bir özelliği olarak, asidik tümör mikroçevresinin kanser

tedavisi üzerinde güçlü olumsuz etkileri vardır. Bir çalışma, laktat akışının engellenmesinin tümör hücrelerini sisplatin tedavisine karşı hassaslaştırdığını göstermiştir (101). Önerildiği gibi, Warburg etkisi de tümör hücrelerine önemli miktarda enerji sağlar. Yüksek glikolitik metabolizmaya sahip tümör hücreleri, ATP-bağlayıcı kaset (ABC) ailesinin efluks fonksiyonunu desteklemek için yeterli ATP üretebilir ve ilaç efluks pompalarının aktivitesini teşvik eden asidik bir mikro çevre oluşturabilir (102,103). 5-FU dirençli KRK hücre hatlarında, ilaç efluks taşıyıcılarının, özellikle ABC taşıyıcı ailesinin ekspresyonunun, anti-tümör ilaçların hücre içi kullanılabilirliğini azaltan yukarı doğru düzenlendiği gözlenmiştir (104). Ayrıca Warburg etkisinin apoptozu inhibe ederek hücre ölümünün indüklenmesine de direnç gösterdiği ortaya çıkmıştır (105). Gelişmiş glikolitik metabolizma, apoptozu indükleyen önemli bir faktör olarak kabul edilen ROS'un hücre içi seviyesini azaltabilir (106,107). Glikolitik enzimler de apoptoz sürecini doğrudan düzenleyerek ROS kaynaklı apoptozu kurtarabilir (108). Örneğin, pirüvat kinaz M2'nin mitokondriye translokasyon yaptığı ve Bcl2'yi fosforile ettiği, bunun da apoptozu inhibe etmek için Bcl2 ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (108). Benzer şekilde, HK2 de mitokondriye translokasyon yapabilir ve tümör hücrelerini apoptozdan koruyabilir (109). Tersine, insan KRK hücre hattında glikolizin inhibisyonu apoptoz oranlarının artmasına ve 5-Fu'ya karşı direncin azalmasına yol açar (110). Azalan aerobik glikoliz her zaman apoptozun ilgili yukarı regülasyonuna eşlik eder. Bu nedenle, kanser hücresinin ilaçlara direnç gösterme kabiliyeti ölçülürken, apoptoz derecesinin tespiti yaygın olarak dikkate alınmaktadır (111). Çok sayıda bulgu, KRK'de glikoliz kaynaklı ilaç direncinin varlığını göstermiştir. Bununla birlikte, DNA hasarı onarımı, EMT ve köklülük gibi diğer mekanizmaların direnci indüklemedeki rolü KRK'de büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu nedenle, ilaç direncindeki ayrıntılı mekanizmaları ve merkez genleri ortaya çıkarmak için daha derinlemesine çalışmalara ihtiyaç vardır; bu da KRK'de ilaç direncinin üstesinden gelmek için potansiyel terapötik hedefler bulmamıza yardımcı olacaktır.

Kolorektal Kanserde Oksidatif Stres

Oksidatif stres, ROS üretim ve eliminasyon süreci arasındaki dengesizlik durumudur (112). Serbest radikal ROS ve radikal olmayan ROS dahil olmak üzere

ROS, eşleşmemiş değerlik kabuğu elektronları içeren kararsız ve aktif oksijen merkezli moleküllerdir. Önemli sinyal molekülleri olarak ROS, insan metabolizması sürecinde ve bağışıklık sisteminde normal fizyolojik işlevleri yerine getirir (113). Normal şartlar altında, organizmalar ROS üretimi ve ortadan kaldırılması konusunda etkili yeteneklere sahiptir. Bununla birlikte, endojen kaynaklardan bağımsız olarak, kirleticiler, radyasyon, diyet ve yaşam tarzı ROS'un yükselmesine katkıda bulunabilir ve bu etkenler Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. ROS'un kaynakları ve sınıflandırılması. Alışkanlıklar ve çevre faktörleri, öznel farkındalık ve yardımcı ekipmanlarla etkili bir şekilde azaltılabilecek dışsal kaynaklardır. Kendi kendine üretilen ROS, ROS dengesi açısından önemli bir rol oynarken, genellikle daha fazla hastalığı ağırlaştıran bir kısır döngü oluşturur (114). *Bu görsel ingilizce (orijinal) dilinden Türkçeye çevrilmiştir.

Hücre içi ROS'un yükselmesi sadece proteinler, yağlar ve DNA gibi hücre bileşenleriyle sık sık reaksiyona girmekle kalmaz, aynı zamanda ilgili sinyal yollarını

da tetikler (115,116). Orantısız ROS üretiminin neden olduğu oksidatif stres, birçok bağırsak, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalığa katkıda bulunur ve hatta insan ömrü ile ilişkilidir.

Bağırsak, gıda sindirimi, emilimi ve metabolizması için birincil organdır ve aynı zamanda temel fiziksel ve immünolojik bariyerler görevi görür. Fizyolojik işlevleri arasında besin emilimi, patojen algılama ve bağırsak homeostazı yer almaktadır. Yabancı maddelere ve mikrobiyal patojenlere kaçınılmaz maruziyet olarak, bağırsak sistemi de ROS'un önemli bir kaynağı olarak kabul edilir (115). Bağırsak oksidatif stresi, bağırsak hasarının erken evresinde önemli bir rol oynar. Bağırsak bariyeri işlev bozukluğu için aktive edici faktör olarak işlev görür, böylece bağışıklık dengesizliğini ve iltihabı tetikler. İBH, enterik enfeksiyonlar, iskemik bağırsak hasarı ve KRK gibi birçok bağırsak hastalığı oksidatif stres tarafından başlatılır ve teşvik edilir. Bununla birlikte, İBH'yi hafifletmek ve bağırsak bariyeri işlevlerini eski haline getirmek için çok az etkili tedavi stratejisi mevcuttur (117). İBH tedavisi için kullanılan sentetik ilaçlar bulantı, yorgunluk, ishal ve baş ağrısı gibi bazı yan etkilere neden olabilir (118). İlişkili bağırsak hastalıklarının tedavisinde ROS dengesinin korunmasına acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Proteinler, yağlar, vitaminler ve minerallerden oluşan temel besinler, metabolik süreç ve doku ve organların işlevinin sürdürülmesi için vazgeçilmezdir. Besin takviyeleri ise temel besinlerin ve bitki, bakteri ve hayvanlardan elde edilen biyoaktif doğal ürünlerin bir entegrasyonudur. Bunlar bağırsak sağlığı için umut verici adaylardır, ancak ilgili mekanizmanın hala daha fazla araştırılması gerekmektedir. Bununla birlikte, bağırsak oksidatif tedavisi olarak hizmet eden doğal ürünler hakkında çok az sistematik makale bulunmaktadır. Mohammad Hosein ve arkadaşları, oksidatif stres koruyucu etkilerle ilgili perspektiflerden birinden IDB tedavisi potansiyeline sahip diyet takviyeleri olarak bitki kaynaklı doğal bileşiklere odaklanmış olsa da (118), Bjattacharyya ve arkadaşlarının çalışması, kısmen oksidatif strese bağlı olarak çeşitli gastrointestinal mukozal hastalıkların patogenezinin yanı sıra ROS'un arka planına ve bağırsakta oksidatif stres hasarına odaklanmıştır (115). Bununla birlikte, besin takviyelerinin sınıflandırılması yeterince açık değildir ve bağırsak mikroflorasının büyük rolü önceki çalışmalarda vurgulanmamıştır. Doğal ürünlerin bağırsak oksidatif stresine ilişkin önceki özetleri yeterince kapsamlı değildir.

Klinik öncesi ve klinik araştırmalar, serbest radikallerin KRK gelişimine katkıda bulunduğu birincil mekanizmaları tanımlamıştır. KRK gelişimi, sağlıklı bir bağırsak hücresini anormal bir hücreye dönüştüren çok aşamalı bir süreçtir ve KRK'ye neden olmak için tek bir mutasyon yeterli değildir. DNA ile ilişkili bazların, şeker bileşenlerinin ve proteinlerin doğrudan oksitlenmesi, serbest radikallerin transkripsiyon faktörleri Nrf2 ve NF-κB aracılığıyla inflamasyon ve karsinogenez ile etkileşime girdiği mutasyonlara neden olur (119–121). Serbest radikaller tarafından aktive edilen nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2'nin (Nrf2) aktivasyonu/inhibisyonunun KRK önleme ve tedavisinde etkili olduğu düşünülmektedir (119). Aktivasyonu oksidatif stres ve inflamasyonu inhibe ederek KRK gelişiminin önlenmesini sağlar (119). Nfr2'nin birincil işlevi sitoprotektif ve antioksidan gen ekspresyonunun düzenlenmesidir. Normal koşullar altında Nrf2, ETBE ve DLG alanları aracılığıyla inhibitör proteinler Keap1 ile bir kompleks halindedir. Keap1 proteinleri, Nrf2 proteininin ubikitinasyonunu ve ardından proteazomda parçalanmasını sağlar. Keap1 proteinleri, hücre sitoplazmasındaki Nrf2 miktarının düzenlendiği bir düzenleyici mekanizmayı temsil eder. Protein modifikasyonları, ROS metabolizmasına karşı koymak için antioksidan veya metabolik programları aktive ederek oksidatif strese adaptasyonda önemli bir rol oynar (122,123).

Normal koşullar altında, ROS birçok sinyal iletim yolunu düzenler. Genel olarak, tümör hücreleri sağlıklı hücrelere göre daha yüksek ROS seviyesine sahiptir. Öte yandan, kanser hücreleri ROS'un zararlı etkilerine karşı koymak için daha yüksek seviyelerde antioksidan üretme eğilimindedir. Bu durum, belirli bir ROS seviyesinin korunmasının kanser hücrelerinin düzgün çalışması için gerekli olduğunu göstermektedir (124). Dolayısıyla, düşük ROS seviyeleri hücre çoğalmasını ve istilasını teşvik edebilirken, aşırı ROS seviyeleri proteinlerde, lipidlerde, RNA ve DNA'da oksidatif hasara neden olarak hücre ölümünü tetikler (125–127). Metabolik anormallikler ve onkojenik sinyalizasyonun bir sonucu olarak, tümör hücresinin kalıcı oksidatif strese karşı koruyucu mekanizması aktive olur. Kanser hücrelerinin bu redoks adaptasyon reaksiyonu ilaç direnciyle sonuçlanır (128).

KRK hastalarında oksidatif stres belirteçlerinin ve antioksidanların taranması, tümör hücresi için koruyucu bir mekanizmanın varlığını göstermektedir. Burwaiss ve

arkadaşlarının (129) çalışması, KRK hastalarından ve komşu normal dokulardan alınan komşu çevre tümör dokularındaki tümör hücrelerinde ROS'u analiz etmiştir. Tümörün oksidan ve antioksidan seviyelerinin, çevredeki tümör dokusundan ve kontrol sağlıklı dokusundan önemli ölçüde daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuçlar doğrultusunda ROS metabolizmasındaki değişimlerin kanser hücresinin karakteri üzerinde etkin bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.

2.4 Yeni İlaç Hedefi Olarak Kanser Enerji Metabolizması

Geleneksel kemoterapinin çeşitli yan etkileri göz önünde bulundurulduğunda, kanser zayıflıklarının keşfedilmesi ve kullanılması, daha etkili ve daha tolere edilebilir kemoterapötik tedavinin geliştirilmesine yol açabilir (130–133). Son yıllarda, kansere özgü metabolizma hakkındaki bilgilerin sürekli artması, bazıları şu anda klinik çalışmalarda kullanılan küçük moleküllü terapötiklerin geliştirilmesi için yeni hedefler sağlamıştır. Aynı zamanda, tümörijenik metabolizmanın karmaşıklığı ve uyarlanabilirliği, terapötik bir müdahalenin öngörülemeyen sonuçlarına neden olabilir. Kanser metabolizmasını hedef alan ilk girişimler, tümör hücrelerindeki en belirgin değişiklik olarak aerobik glikolizi hedeflerken, son araştırmalar TCA döngüsü ve OXPHOS'a odaklanmaktadır (134,135) Araştırılmakta olan çok sayıda ilaç mitokondriyi ve işlevlerini hedef almaktadır, örneğin metformin, 3-bromopirüvat veya 2-deoksiglukoz (136,137). Bunlar arasında, antidiyabetik ilaç metformin mitokondriyal metabolizmayı modüle eder ve çeşitli metabolik ve metabolik olmayan sinyal yollarıyla etkileşime giren pleiotropik bir etki şekli gösterir (138)(139). Öncelikle, enerji algılama yolları (örn. AMPK) ve diğer hedefler aktive edilir ve mitokondriyal kompleks I inhibe edilir, bunun üzerine mitokondriyal solunum azalır ve aerobik glikoliz artar (139,140). TCA döngüsü ve OXPHOS yoluyla metabolizma engellenir, bu da kanser hücrelerini aç bırakır ve bu gözleme dayanarak metformin kanser gelişimi riskini azaltan ilaç olarak tanımlanır (140). Metforminin hücre kültüründe ve KRK fare modellerinde, epidemiyolojik çalışmalarda ve klinik deneylerde antikanser etkileri olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, tümör hücrelerinde, TCA döngüsü anabolik ve katabolik reaksiyonlar için ana merkez görevi görür ve onkojenik sinyallemenin yanı sıra yukarı/aşağı düzenlenmiş veya mutasyona

uğramış enzimler nedeniyle düzensizleşebilir (141). Bu nedenle, TCA döngüsünün farklı enzimleri, tek bir ilaç olarak veya sitostatik bir ajanla kombinasyon halinde yeni tümör terapötiklerinin geliştirilmesi için umut verici bir hedef olarak hizmet edebilir (142).

Dikloroasetat (dichloroacetate, DCA), pirüvatın TCA döngüsüne girişini kolaylaştırarak dolaylı olarak aerobik glikolizi hedef alır: PDK enzimini inhibe ederek, HIF-sinyali nedeniyle tümör hücrelerinde tükenebilen daha yüksek aktif pirüvat dehidrogenaz kompleksi seviyelerini indükler. Aktif pirüvat dehidrogenaz kompleksi pirüvatı asetil-KoA'ya dönüştürür ve böylece tümörijenik laktat üretimini azaltır (143). Hematolojik maligniteler, baş ve boyun karsinomları, glioblastoma, meme kanseri ve akciğer kanserinin tedavisi için DCA 2007'nin sonlarında klinik denemelere girmiş ancak Faz III'e ulaşamamış ve birkaç yıl sonra göz ardı edilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, DCA'nın 5-FU ile kombinasyonunun umut verici etkileri kemorezistan KRK'da gözlenmiştir. DCA, miR-149 ve miR-149-3p'nin p53'e bağlı ekspresyonuna yol açarak PDK2 aktivitesini azaltmış ve Warburg etkisini ortadan kaldırmıştır (144).

Mutasyona uğramış izositrat dehidrogenaz 1 ve 2 (isocitrate dehydrogenase, IDH 1 ve 2)'nin çeşitli inhibitörleri şu anda geliştirilme aşamasındadır ve ön denemelerde umut verici bir antitümörijenik potansiyel göstermektedir. Mutasyona uğramış IDH 1 ve 2'nin aktivitesini seçici olarak inhibe ederek, onkometabolit 2-HG birikimi önlenir. Bu, IDH 1/2 mutasyonlu tümörlerde 2-HG sinyalizasyonunun ve ilgili geri bildirim mekanizmalarının zararlı etkilerini ortadan kaldırarak sağkalım oranının artmasına yol açar (145). Mutant IDH 2 spesifik inhibitörü AG-221 (Enasidenib®) şu anda çeşitli çalışmalarda akut miyeloid lösemi dahil hematolojik malignitelerin tedavisi için test edilmektedir. IDH 2 mutasyonuna sahip solid tümörlerde kullanım için bir Faz I/II çalışması 3 yıl önce tamamlanmıştır, ancak sonuçlar yayınlanmamıştır. Kan-beyin bariyerini geçebilen mutant IDH 1 ve IDH2 inhibitörü AG-881, şu anda IDH mutasyonlu glioma hastalarını tedavi etmek için klinik çalışmalarda bağımsız bir ilaç olarak kullanılmaktadır ve hematolojik maligniteleri (AML, miyelodisplastik sendrom) olan hastalarda Faz I çalışmasında kullanılmıştır. Özetlemek gerekirse, 2013'ten bu yana akut miyeloid lösemi, miyelodisplastik sendrom veya diğer hematopoetik malignite türleri olan kanser hastalarında AG-221 tedavisini içeren

20'den fazla klinik çalışma yapılmış ve bunlardan bazıları Faz III'e geçmiştir. 2014 yılında Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA), akut miyeloid lösemi için AG-221'e yetim ilaç statüsü verdi ve bunu 2019 yılında Avrupa İlaç Ajansı izledi. AG-881 ile glioblastom ve hematopoetik malignitelerin tedavisine yönelik bir avuç çalışma, 2020'nin başında glioblastom hastalarında bir Faz III denemesiyle zirveye ulaştı. Gelecekte IDH inhibitörleri, IDH 1 mutasyon oranı sırasıyla %7 (İBH ile ilişkili KRK) ve %11 (kolit ile ilişkili KRK) olan İBH ile ilişkili KRK'nin tedavisi için ek bir terapötik seçenek sağlayabilir.

Spesifik ve güçlü glutaminaz (glutaminase, GLS) inhibitörü CB-839'un geliştirilmesi, glutamat yoluyla anaplerozu durdurarak TCA döngüsünün hedeflenmesini sağlamıştır. TCA döngüsü ara ürünleri biyosentez için giderek daha fazla kullanıldığından, tümör hücreleri GLS ve glutamat dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla αKG sentezlemek için glutamin kullanmaktadır (146). CB-839'un solid tümörlerin ve hematolojik malignitelerin tedavisinde uygulanabilirliğine ilişkin ilk Faz I denemeleri tamamlanmıştır ve Kapesitabin ile kombinasyon halinde KRK tedavisi de dahil olmak üzere daha fazla çalışma şu anda işe alınmaktadır. Bugüne kadar CB-839, hematopoetik malignite koşullarının yanı sıra çeşitli solid tümörlerde yaklaşık 20 çalışmada test edilmiştir, ancak bugüne kadarki çalışma tasarımlarının hiçbiri Faz III'e ulaşmamıştır. Bununla birlikte, FDA 2017 yılında metastatik renal hücreli karsinom için CB-839'un hızlı takip (fast track) olarak tanımlanmasına izin vermiştir. CB-839 ve GLUT-1/-3 seçici inhibitörü Glutor'un birlikte uygulanması, yüksek glutamin ve glikoz koşullarında bile HCT116 KRK hücrelerinde kanser hücresi büyümesinin inhibisyonuna yol açmıştır (147). Bu nedenle, GLS inhibitörlerinin ek metabolik modülatörlerle birlikte sinerjik etkileri gelecekteki araştırmaların konusu olabilir. Yakın zamanda geliştirilen CB-839 türevleri CPD-20 ve CPD-23, daha güçlü bir GLS inhibisyonu ve daha iyi tümör birikimi sergileyerek gelişmiş antitümörijenik etkilere neden olmaktadır (148,149).

Endojen kofaktör α-lipoik asit temel alınarak, çok amaçlı metabolik inhibitör ve LA türevi CPI-613 geliştirilmiştir. CPI-613, pirüvat dehidrojenaz ve α-ketoglutarat dehidrojenaz enzim komplekslerini inhibe ederek kanser hücrelerinin düzensiz TCA döngüsünü hedef alır (150,151). CPI-613 ile ilk klinik çalışmalar 2008'in başlarında başlatılmış ve tedavi edilen koşullar arasında hem solid tümörler hem de 20'den fazla

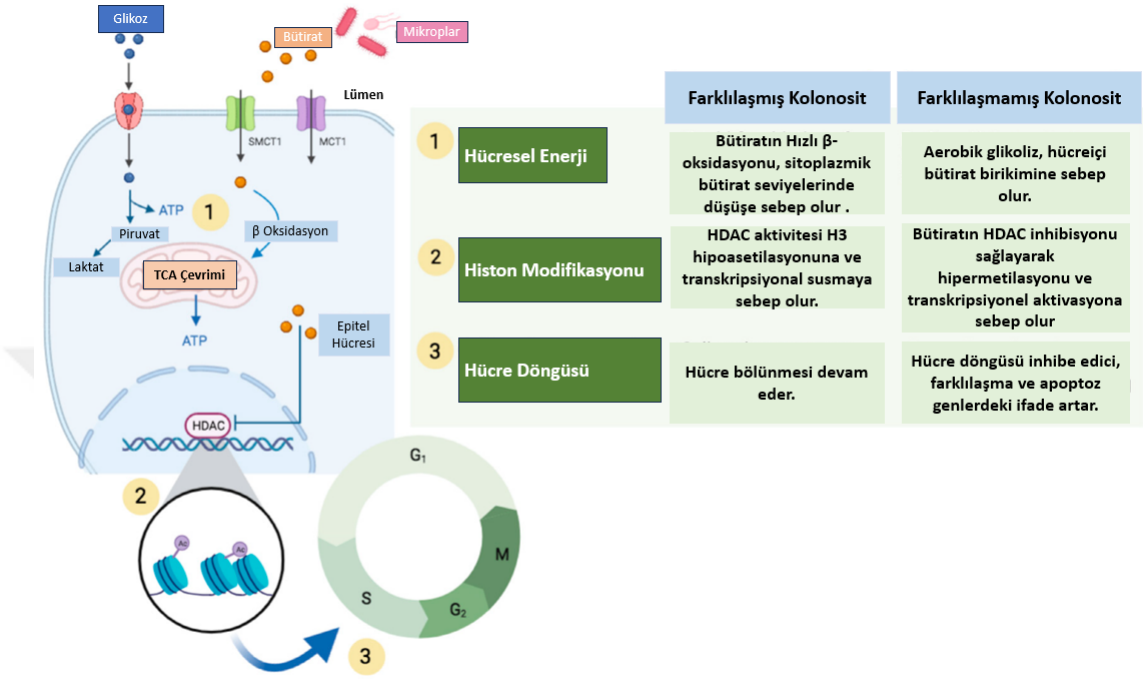
ilgili klinik çalışmada ilerlemiş, metastatik veya tekrarlayan ve refrakter hastalıklara odaklanan hematopoetik maligniteler yer almıştır. Bugüne kadar birçok Faz II ve iki Faz III çalışmasında CPI-613'ün güvenlik ve etkinliği değerlendirilmiş ve CPI-613'e FDA ve Avrupa İlaç Ajansı tarafından akut miyeloid lösemi ve pankreas kanseri gibi durumlar için yetim ilaç (orphan drug) statüsü verilmiştir.

2.5 Bağırsak Homeostazında Bütirat

Çok sayıda çalışma, yüksek lifli bir diyet ile kolon kanseri riskinin azalması arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (152–154). Bu veriler doğal olarak diyet lifi ve bütirat üretimi arasındaki bağlantıya dayalı olarak bütiratın kolonosit bölünmesi üzerindeki etkilerinin araştırılmasına yol açmıştır. Whitehead ve ark. bütiratın kolon kanseri hücre hattında proliferasyonu yavaşlattığını ve farklılaşmayı indüklediğini göstermişlerdir (155). Bu bulgular daha sonra çeşitli kanser hücre hatlarında tekrarlanmıştır. Buna çalışmaların aksine, *in vivo* çalışmalar bağırsak epiteli üzerinde eşdeğer etkiler gösterememiştir ve hatta bütirata yanıt olarak arttırılmış epitel proliferasyonu ortaya konulmuştur. Tümör olmayan hücre hatları ile yapılan deneyler, bütiratın kültürde proliferasyonu uyardığını ve farklılaşmayı inhibe ettiğini göstermiştir. Molekülün sağlıklı ve kanserli kolonositler üzerindeki farklı etkiler göstermesine bütirat paradoksu adı verilmiştir (156,157)**.**

Epigenetik çalışmalar, bu paradoksa bir açıklama getirmektedir. Bütiratın histon modifikasyonu yoluyla kromatin yapısını değiştirdiği uzun zamandır bilinmektedir (158). Whitlock, bütiratın histon deasetilaz (histon deacetylases, HDAC) inhibitörü özelliklerini hücre döngüsü inhibisyonu ile ilk kez ilişkilendiren kişi olarak kabul edilir (159). Farklılaşmış bağırsak epitel hücrelerinde bütirat, yakıt için hızla metabolize edilir ve bu nedenle HDAC'yi inhibe edemez. Buna karşılık, kolon kanseri hücreleri, hücresel işlev için yakıt olarak SCFA yerine tercihen glukoz kullanır. Bu, Warburg etkisi olarak adlandırılan neoplastik hücrelerin hayatta kalmasını ve proliferasyonunu kolaylaştıran bir adaptasyondur. Glikolitik metabolizmanın kanserli kolonositlerde oksidatif fosforilasyona tercih edilmesi, bütiratın birikmesine ve bir HDAC inhibitörü olarak hareket etmesine izin vererek, değiştirilmiş gen ekspresyonu yoluyla hücre döngüsü ilerlemesini durdurur (160). Bütiratın ayrıca kolon kanseri hücrelerinde

metabolik enzimlerin aktivitesini doğrudan değiştirdiğine, böylece Warburg etkisinin tersine çevrilmesi yoluyla koruyucu bir anti-neoplastik etki sağladığını gösteren bir çok çalışma mevcuttur (161–163). Bütiratın kolon homeostazındaki etkisi Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. Farklılaşmış ve farklılaşmamış kolonositlerdeki karakteristik özellikleri. Hücresel enerji için farklı metabolik yollar, "bütirat paradoksu"ndan sorumludur. Kolonik lümendeki mikrobiyal olarak türetilen bütirat, diğer zara bağlı taşıma proteinlerinin yanı sıra sodyum bağlı monokarboksilat taşıyıcı 1 ve monokarboksilat taşıyıcı 1 tarafından hücre içi olarak taşınır. Sitoplazmik bütiratın kaderi, hücrenin farklılaşma durumuna bağlıdır.[1] Farklılaşmış kolonositlerde bütirat hızla oksitlenir ve hücresel enerji üretimi için kullanılır. Neoplastik hücreler gibi farklılaşmamış kolonositlerde, hücresel yakıt tercihen hücre içi bütirat birikimine yol açan glikolitik yollardan türetilir.[2] Bütirat, histon H3'ün hiperasetilasyonu ile sonuç olarak kromatin gevşemesi ve aksi halde HDAC aktivitesi tarafından susturulan genlerin ekspresyonu ile sonuçlanan bir histon deasetilaz (Histone deacetylase, HDAC) inhibitörüdür.[3] Spesifik olarak, bütiratın neden olduğu histon modifikasyonu, hücre döngüsü inhibisyonu ve apoptozda yer alan genlerin transkripsiyonel aktivasyonu ile ilişkilidir (164). *Bu görsel ingilizce (orijinal) dilinden Türkçeye çevrilmiştir. (MCT1: Monokarboksilat Taşıyıcı 1, SMCT1: Sodyum Bağlı Monokarboksilat Taşıyıcı 1)

Aerobik glikoliz, tümörigenezi teşvik etmenin yanı sıra, genellikle ilaç direncini artıran veya müdahale için bir fırsat sağlayan bir ortam sağlar. Kanser hücrelerinin, artan hücre büyümesi ve çoğalmasının katabolik ve anabolik talepleri göz önüne alındığında, normal hücrelere kıyasla farklı metabolik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Kanser hücrelerindeki bu değişmiş metabolizma, farklı bağımlılıklar doğurur ve bu potansiyel zayıflıklardan faydalanmak için terapötik stratejiler geliştirmeye büyük çaba harcanmıştır. Bu çabalara paralel olarak, kayda değer intratümöral metabolik heterojenitenin varlığına dair artan bir takdir söz konusudur. Birçok yeni ajan spesifik metabolik süreçleri hedeflemede bazı umut verici sonuçlar gösterse de, ileriye dönük zorluk, yukarıda bahsedilen metabolik heterojenliği ve bunun tümör mikroçevresindeki hem epigenetik hem de immün faktörlerle etkileşimini ele almak için kombinasyon stratejileri geliştirmek olacaktır (165). Son zamanlarda yapılan çalışmalardan olan Chen W. ve ark. uzun süreli ve tekrarlanan oksaliplatin tedavisi, klinik uygulamasını engelleyen ilaç direncine ve ciddi yan etkilere yol açmakta olduğundan, oksaliplatin direnci ve toksisitesinin üstesinden gelmek için kemosensitizatörlere acilen ihtiyaç duyulması konusu üzerine odaklanmıştır. Çalışmalarında, KRK'de ROS oluşumunu teşvik eden bir molekül olan piperlongumine ile kombine edilen oksaliplatinin antikanser etkileri değerlendirilmiştir. Oksaliplatinin hücresel ROS miktarını artırdığını ve KRK hücrelerinde PL ile sinerjik antikanser etkiler gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Bu antikanser etkilere mitokondriyal disfonksiyon ve endoplazmik retikulum stresi apoptotik-ilişkili ağlar aracılık etmiştir. ROS üretiminin engellenmesiyle, apoptozun baskılandığı ve oksaliplatin/ piperlongumine kombinasyonuyla ilişkili mitokondriyal disfonksiyonu ve endoplazmik retikulum stresini tamamen tersine çevirdiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca, fare modellerindeki ksenograft deneyleri *in vitro* verileri büyük ölçüde desteklemiştir (166).

Buna paralel çıktısı olan diğer bir çalışma da Wu J, ve ark. tarafından beslenmenin bir parçası olan sistein aminoasitinin KRK üzerindeki etkinliğine bakmışlardır. Sistein alan KRK hastalarında genel sağkalım sürelerinin ($P < 0.001$) almayanlara göre daha kısa olduğunu ortaya koymuşlardır. Sistin (dimerik sistein formu) gerçekten de *in vitro* ortamda ve immün yetmezliği olan farelerde kolon kanseri hücre büyümesini güçlü bir şekilde desteklemektedir, bunun başlıca nedeni *GCN2*-

ATF4 ekseni üzerinden *SESN2* transkripsiyonunu inhibe ederek mTORC1 aktivasyonuna yol açmasıdır. mTORC1 inhibitörleri Rapamycin ve Everolimus sistin kaynaklı kanser hücre proliferasyonunu bloke etmektedir. Ayrıca sistin, glutatyon sentezi yoluyla kemoterapinin neden olduğu ROS'u azaltarak oksaliplatin ve irinotekan kemoterapisine direnç kazandırır. Diyetle sistin yoksunluğunun farelerde kilo kaybı olmaksızın kolon kanseri ksenograft büyümesini baskıladığını ve oksaliplatinin antitümör etkisini artırdığını göstermişlerdir (167).

2.6 Bağırsak Homeostazında Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksi-triptamin) endojen bir hormon olup 1958 yılında Lerner ve arkadaşları tarafından sığır pineal dokusunda keşfedilmiştir (168). Daha sonra melatoninin farklı bitkilerde, bakteriler gibi tek hücreli organizmalarda ve omurgasızların kladlarında bulunduğu bildirilmiştir (169–171). Epifiz bezi melatonini üçüncü ventriküle ve kana salgılar. Ayrıca, melatonin biyosentezi kemik iliği ve lenfositlerde, gastrointestinal sistemde ve gözlerde, vb. ve belki de her hücrede gerçekleşir (172). Melatonin biyosentezi ökaryotik hücrelerin mitokondrilerinde gerçekleşir (173). Başlangıçta, hücreler dolaşımdaki temel amino asit olan triptofanı alır ve daha sonra sırasıyla triptofan hidroksilaz ve 5-hidroksitriptofan dekarboksilaz tarafından katalize edilen iki ardışık reaksiyonda 5-hidroksitriptofan ve serotonine dönüştürür. Aralkilamin N-asetiltransferaz tarafından katalize edilen bir reaksiyondan sonra, serotonin N-asetil-5-hidroksitriptamine dönüşür ve bunu asetilserotonin-O-metiltransferaz tarafından melatonine metilasyonu izler (174).

Hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeğinde bulunan "ana biyolojik saat", pineal melatoninin ritmik üretimini belirlemede temel düzenleyici eylemlere sahiptir; bu ana sirkadiyen düzenleyici, insan dahil tüm memelilerin beyninde mevcuttur (175). Retinanın fotoreseptör hücreleri, optik sinirde bulunan retinohipotalamik yol aracılığıyla hipotalamik suprakiazmatik çekirdeğine aktarılan nöral sinyal ile ışık bilgisine yanıt verir. Suprakiazmatik çekirdeğinde efferent nöronlar aracılığıyla bu bilgiyi intermediolateral kolon yoluyla superior servikal ganglionlara gönderir ve postganglionik sempatik lifler daha sonra melatonin sentezini baskılamak için pineal beze projekte olur. Geceleri ışık olmadığında, pinealde sonlanan sempatik nöronlar

noradrenalin salgılar, bu da Aralkilamin N-asetiltransferaz aktivasyonuna yol açar ve ardından melatonin üretimini ve salınımını artırır. Beyin omurilik sıvısı ve kana salındıktan sonra melatonin yukarıda sayılan çok sayıda biyolojik etki gösterir (176).

Melatonin sadece epifiz bezi tarafından değil, aynı zamanda diğer organlar ve dokular tarafından, özellikle de melatonin konsantrasyonunun epifiz bezinden yaklaşık 400 kat daha fazla olduğu tahmin edilen gastrointestinal sistemde üretilen her yerde bulunan bir hormondur (177). Melatonin, reaktif ürünlerin temizleyicisi olarak antioksidan aktivitesi, antioksidan enzimlerin aktivitesini modüle etmesi ve bağışıklık sistemi yanıtını uyarması yoluyla çeşitli gastrointestinal fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan ve ayrıca farklı klinik durumlarda doku onarım mekanizmalarında rol oynayan bir hormondur (178).

Ayrıca, sirkadiyen ritmin düzensizliğinin kolon mukozasının motor değişiklikleri ve hücre yıkım mekanizmaları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu özellikler, fonksiyonel ve organik gastrointestinal bozuklukları olan hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla düşük melatonin seviyelerinin (plazma, idrar, tükürük sıvıları) klinik kanıtlarıyla ilişkili olarak melatoninin patogenezde rol oynadığını desteklemektedir. Bu nedenle, irritabl bağırsak sendromu, İBH ve nekrotizan enterokolit gibi çeşitli gastrointestinal hastalıklarda adjuvan tedavi olarak çalışılmıştır (179). Hem üst hem de alt gastrointestinal yol ile ilgili ön veriler 5HT depolayan enterokromafin hücrelerinin (mukozal astar hücrelerinin yüzdesi olarak ifade edilir) gastrik antrumdan rektuma kadar mevcut olduğunu, en yüksek konsantrasyonun midede bulunduğunu göstermiştir (%7,3 ± 3,37). Enterokromafin hücre varlığı ileumda sabit kalmış (4.03 ± 0.91), kolonda azalmış (2.57 ± 1.4) ve rektumda tekrar artmıştır (3.8 ± 1.8). Melatonin immünoreaktivitesi ise 5HT immünoreaktif enterokromafin hücrelerinde hiçbir zaman açıkça görülmemiştir ancak mukoza yüzeyini ve bağırsak bezlerinin lümenini kaplamıştır. Bu durumda, 5HT'den farklı olarak melatoninin depolanmadığı, biyosentezin hemen ardından hücre dışı sıvıya ve dolaşıma salındığı anlaşılmaktadır (180).

Melatonin ve metabolitleri antioksidatif etkiler gösterir. ROS'un doğrudan temizlenmesinin yanı sıra, melatonin antioksidan enzimleri uyarır, pro-oksidan enzimleri baskılar ve mitokondriyal işlevi iyileştirir, böylece fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonlarda radikal oluşumunu azaltır. *İn vitro* çalışmalar,

melatoninin kanser hücresi büyümesiyle ilişkili olan hücre içi antioksidan glutatyon seviyelerinin korunmasında rol oynadığını göstermiştir (181). Yüksek ROS/RNS seviyeleri, tümör gelişimi ve ilerlemesinin yönlerini destekledikleri hemen hemen tüm kanser oluşumlarında tespit edilmiştir (124). Örneğin, normal kolon epitel hücreleri ve fibroblastlara kıyasla kolon kanseri hücre hatlarında kararlı durum süperoksit seviyeleri önemli ölçüde daha yüksektir (5 ila 20 kat) (182). İlginç bir şekilde, birkaç *in vivo* çalışma melatoninin tümör hücrelerinde farmakolojik konsantrasyonlarda (µM ila mM aralığı) ROS oluşumunu indüklediğini bulmuş ve bu da melatoninin koşullu bir pro-oksidan olabileceği varsayımına yol açmıştır (183).

2.7 Organoid Teknolojisi ve *In vitro* Kanser Modellemesi

Organoid gelişimiyle ilgili en eski çalışmalar 1907 yılına kadar uzanmaktadır. Profesör H. V. Wilson, mekanik olarak ayrılmış sünger hücrelerinin yeniden bir araya gelebileceğini ve normal işlevlere sahip yeni sünger organizmalarına dönüşebileceğini keşfetmiştir. Bu araştırma, yetişkin organizmaların dışarıdan yardım almadan ve belirli bir anatomik aşamadan başlamadan başarılı bir şekilde yeni organizmalara dönüşebileceğini göstermiştir (184). Bu, organoid teknolojisinin gelişiminin kaynağı olarak kabul edilebilir. 1960 yılında Profesör Taylor, A. C. izole edilmiş amfibi pronefrozlarından ve tavuk embriyolarından farklı türde organlar üretmek için izolasyon-rejenerasyon deneyleri gerçekleştirmiştir (185). 1961 yılında Verney, E. L. embriyoid cisimlerin *in vitro* farklılaşmasını gözlemlemiştir (186). 1981 yılında bilim insanları ilk olarak fare embriyolarından pluripotent kök hücreleri izole etmişlerdir. Kök hücre araştırmaları o zamandan beri hızla büyümüştür (187,188). 1987 yılında, bilim insanları *in vivo* mikroçevreyi simüle ederek hücre kültürü koşullarını iyileştirmeye başladılar. Li ve arkadaşları, Engelbreth-Holm-Swarm fare sarkomunun hücre dışı matris özütlerinde kültürlendiğinde meme epitel hücrelerinin üç boyutlu kanallar ve lümenler oluşturduğunu göstermiştir (189). Aynı yıl yapılan bir çalışmada, alveolar tip II epitel hücrelerinin hücre dışı matris stroması varlığında farklılaşma kapasitelerini koruyabildikleri tespit edilmiş ve doku bakımı ve farklılaşmasında hücre-matriks etkileşimlerinin önemi vurgulanmıştır (190). 1987 yılında A. J. Friedenstein mezenkimal kök hücreleri keşfetmiştir.

Bilim insanları 1998 yılında ilk kez insan blastokistlerinden embriyonik kök hücreleri izole etmiş ve kültürlemişlerdir (191). 2006'dan 2007'ye kadar Thomson ve arkadaşları, kök hücre ve organoid araştırmaları için büyük önem taşıyan insan kaynaklı pluripotent kök hücreleri başarıyla hazırladılar. Günümüzde, tümör kaynaklı olmayan insan organoidlerinin çoğu embriyonik kök hücrelerden mezenkimal kök hücrelerden veya pluripotent kök hücrelerinden geliştirilebilmektedir (192). Kök hücre araştırmalarındaki hızlı ilerleme organoid araştırmalarına yeni bir canlılık getirmiştir.

Dönüm noktası, 2009 yılında Hollanda'daki Hans Clevers ekibinin tek bir lösin bakımından zengin tekrar içeren reseptör 5 (Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5, LGR5) pozitif bağırsak kök hücresini kullanarak hücreleri *in vitro* olarak kültürleyip bağırsak kript-villus yapısına sahip bir bağırsak organoidi oluşturması ve böylece organoid teknolojisi gelişiminde yeni bir çağ açması olmuştur. 2007 gibi erken bir tarihte Hans Clevers, ince bağırsak ve kolonun kök hücrelerinin LGR5 pozitif hücreler olduğunu keşfetmiştir (193). 2009 yılında deney ekibi, fare bağırsaklarından izole edilen kript hücrelerini ENR (EGF, Noggin, R-spondin) içeren bir üç boyutlu Matrigel kültür sisteminde kültürledi. Bu kültür sisteminin ekimi altında, kript hücrelerinin bağırsakların kript-villi benzeri komplekslerine benzer mikro yapılar oluşturabildiğini buldular. Daha önce izole edilen ve tanımlanan tek bir LGR5 pozitif bağırsak kök hücresini kültürlemek için bu kültür sistemi kullanılarak, yukarıda belirtilen özel yapıya sahip organoidlerin de oluşturulabileceği ve organoidin hala LGR5 pozitif bağırsak kök hücrelerine sahip olduğu bulunmuştur (194). Bu nedenle model, ince bağırsağın morfolojisini, yapısını ve işlevini *in vivo* olarak iyi bir şekilde simüle edebilmiştir. İnce bağırsak organoid sisteminin başarılı bir şekilde kurulması organoid araştırmalarında yeni bir sayfa açmıştır.

Mide, retina, beyin, karaciğer, böbrek, pankreas, meme ve fallop tüpleri organoidleri 2009'dan bu yana başarıyla büyütülmüştür (195–199). 2011 yılında Hans Clevers organoid teknolojisini kullanarak tümör organoidleri oluşturmuştur. Fare kolon kriptlerinin kültür koşullarına dayanarak, kültür ortamını ayarlayarak insan ince bağırsağı ve kolon organoidlerini yetiştirmişlerdir. Daha fazla optimizasyon ve ayarlamadan sonra, kolon adenomu ve adenokarsinomu ve Barrett özofagusundan tümör organoid modelleri oluşturulmuştur (200). 2014 yılında, metastatik prostat

kanseri olan hastalardan alınan tümör örnekleri kullanılarak altı prostat kanseri organoidini başarıyla büyüten ilk çalışma yapılmıştır. Tümör örnekleri, ilgili organoidlerin genetik imzasıyla büyük ölçüde tutarlıydı. Buna ek olarak, organoidler bir hastanın dolaşımdaki tümör hücrelerinden başarıyla büyütülmüştür (201). 2015 yılında Hans Clevers'in ekibi KRK organoidleri oluşturmak için CRISPR/Cas9 teknolojisini kullanmıştır. Aynı yıl, 20 KRK hasta örneğinden oluşturulan tümör organoidlerini de rapor etmiştir. Yüksek verimli dizileme analizi, organoidlerin gen değişim profilinin, KRK'nin büyük ölçekli mutasyon analizinin sonuçlarıyla olukça tutarlı olduğunu ortaya koymuştur (202). Bu organoidler, bireyselleştirilmiş hassas tıp için büyük önem taşıyan ilaç duyarlılığı ile ilişkili bazı genetik değişiklikleri tespit etmek için büyük ölçekli ilaç taraması için kullanılabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Çalışma, tanımlayıcı araştırma özelliğindedir.

3.2 Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Bu tez çalışması 2020-2024 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Translasyonel Onkoloji AD' de gerçekleştirilmiştir. Araştırma planı Tablo 1'de sunulmaktadır.

Tablo 1. Araştırma planı

Şubat 2020-Ekim 2020	Tez projesi literatür taraması
Haziran 2020	Etik kurul onayı
Temmuz 2020	Tez önerisi başvuru ve onay
Kasım 2021	BAP proje desteği
Kasım 2021-Şubat 2022	Üç boyutlu kolorektal kanser modeli oluşturma
Şubat 2022-Şubat 2023	Üç boyutlu kolorektal kanser modelinde ilaç deneyleri ve canlılık analizleri
Temmuz 2022- Temmuz 2023	Üç boyutlu kolorektal kanser modelinde moleküler teknikler ile metabolik değişikliklerin incelenmesi
Temmuz 2023–Şubat 2024	Makale ve tez yazımı

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmada herhangi bir hasta kaynaklı veri veya biyolojik materyal kullanılmamıştır. Araştırmada, önceden oluşturulan ve arşivlenen fare kaynaklı kolorektal kanser organoid ve normal kolon organoid hatları kullanılmıştır.

3.4 Çalışma Materyali

Bu tez kapsamında sağlıklı kolon ve kolorektal kanser organoid hatları kullanılmıştır. Organoid hatları, Massachusetts Institute of Technology- MIT (ABD)'de görev yapan Doç.Dr. Ömer H. Yılmaz'ın 'organoid ve hücre hattı arşivinden' temin edilmiştir. Söz konusu fare kaynaklı sağlıklı kolon ve kolorektal kanser organoid hatları, Doç.Dr. Ömer Yılmaz ve laboratuvar ekibinin önceki çalışmaları sırasında 'Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)' ve 'Massachusetts Institute of Technology' onayıyla 1219-076-22 protokol numarası altında deney hayvanı kullanım izini alınarak oluşturulmuş ve saklanarak arşivlenmiştir.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Bu tez kapsamında bağımsız değişkenler oksaliplatin, melatonin ve BOHB iken; bağımlı değişkenler ise hücre canlılığı, apoptotik yolak aktivasyonu, mitokondriyal protein miktarları, ROS miktarı olarak belirlenmiştir.

3.6 Veri Toplama Araçları

Bu tez kapsamında kullanılacak olan organoid hatları üzerine uygulanan tekli ve kombine ilaç uygulamalarının etkinliği sitotoksisite testi ile belirlenmiştir. Sitotoksisite deney sonucuna göre elde edilen etkinin mekanizması araştırılmıştır. Bu amaçla ajanların organoid hatlarında uygulanması sonucu oluşabilecek enerji metabolizması, histon asetilasyonu, DNA hasarı ve apoptotik hücre ölümü yolaklarındaki protein ifade düzeylerindeki değişimleri Western Blot tekniği kullanarak ölçülmüştür. Son olarak uygulanan ajanların ROS miktarındaki değişim akış sitometrisinde ölçülmüştür.

Tablo 2. Tez çalışmasındaki sarf malzemeleri

Malzeme	Marka	Katalog Numarası
Novex NuPage MES SDS Running Buffer 20x	Life Technology	NP0002
Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa)	New England Biolabs	NB7719S
Laemmli SDS Sample Buffer, Reducing (6X)	Thermo Fisher	J61337-AD
NuPage 4-12% Bis-Tris, 1.0-1.5mm 10 Well, Mini Protein Gel	Thermo Fisher	NP0335Box
BCA	Thermo Fisher	PI23228
RIPA Buffer (10X)	Cell Signalling	9806S
Halt	Thermo Fisher	PI78420
PBS	Corning	10243646
TrypLE Express Enzimi	Thermo Fisher	12604039
FBS	Thermo Fisher	26140079
Resazurin	Thermo Fisher	14322
Oksaliplatin	Sigma-Aldrich	Y0000271
Melatonin	Sigma-Aldrich	M5250-250MG
BOHB	Sigma-Aldrich	303410-100G
ADMEM F12	Thermo Fisher	12634028
Glutamax	Thermo Fisher	35050079
Pen/Strep	Thermo Fisher	15140122
96-Well Non-Treated Plates	Genesee Scientific	25-104
WesternBright Sirius HRP Substrate	Advansta	K-12043-D20
WesternBright ECL	Advansta	K-12045-D20
Tris BAZI	Sigma-Aldrich	93362
Tris HCL	Research Product International	T60050-1000.0
NaCl	Sigma-Aldrich	59222C
Glycine	Sigma-Aldrich	G7126
Tween-20	Sigma-Aldrich	p1379
Tween 80	Sigma-Aldrich	p1754
VectaShield Plus Antifade Mounting Medium + DAPI	Vector Lab	H-2000-10
Matrigel	Corning	354234

3.6.1 Sağlıklı Kolon Organoid Kültürü

Sağlıklı kolon organoid hattı, Massachusetts Institute of Technology- MIT (ABD)'de görev yapan Doç.Dr. Ömer H. Yılmaz'ın 'organoid ve hücre hattı arşivinden' temin edilmiştir. Kültürü oluşturmak için tek hücreler 48 kuyulu düz tabanlı bir plakaya 10µl, 1:2 Matrigel (Corning, Somerville, MA, ABD, #356231) oranında ekilmiştir. Matrigelin jelleşmesi için 37°C'de 30 dakika inkübasyon ardından, kuyucuklara 300 µl organoid büyüme ortamı eklenmiştir. Ortam hazırlamak için L-WRN hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücreler büyüme ortamına Wnt-3a, RSPO1 ve Noggin (WRN) büyüme faktörlerini sekrete eder. L-WRN hücreleri antibiyotiksiz olarak %10 fötal sığır serum (Fetal Bovine Serum, FBS) içeren ADMEM/F12 besiyerinde %70 konfluensi sağlanana kadar çoğaltıldıktan sonra besiyeri toplanmıştır. Toplanan WRN ortamı 300G'de 5 dakika santrifüj edilmiş bu şekilde ortam hücrelerden tamamen temizlenerek 4°C'de saklanmıştır. Bu besiyeri %50 ADMEM/F12 ile karıştırılmıştır ve daha sonra bu ortama %1 Penisilin/Streptomisin eklenerek büyüme ortamı tamamlanmıştır. Büyüme ortamı her üç günde bir yenilenmiş, organoid büyümesi 5 gün boyunca mikroskop altında gözlemlenmiştir. Organoidler yeterli büyüklüğe ulaştıklarında dondurulmuş ve/veya pasajlanarak kültür devamlılığı sağlanmıştır. Pasajlama sırasında plate üzerinden pipet yardımı ile alınan organoidler 5 dk 300G'de çöktürüldükten sonra, süpernatant pelleti bozmadan atılmıştır. Organoidler, %10 DMSO (Tocris, Bristol, UK, #3176) ve %90 FBS (Thermofisher Scientific, ABD, Waltham, MA, #A3160501) içeren bir dondurma ortamında süspanse edilmiş ve kriyo tüplere alınarak, bir gece -80°C'deki inkübasyonları ardından, uzun süreli saklama için sıvı nitrojene aktarılmıştır. Kültürün devamlılığı için pasajlama yapılmıştır. Bu işlem organoidleri 5dk 37C'de TrypLE Express enzimi (Thermofisher Scientific, ABD, Waltham, MA, # 12604013) içinde inkübe ederek tek hücrelere ayrıştırıldıktan sonra 1000 hücre/10µl olacak şekilde 1:2 oranında matrijel içinde 48 kuyucuklu plakalara ekilmiştir (203).

3.6.2 Kolorektal Kanser Organoid Kültürü

Karsinogenez yolağındaki ana sürücü mutasyonlarını ($Apc^{-/-}$, $KRAS^{G12D}$, TP53) içeren KRK organoid hattı, Massachusetts Institute of Technology- MIT (ABD)'de görev yapan Doç.Dr. Ömer Yılmaz'ın 'organoid ve hücre hattı arşivinden' temin edilmiştir. KRK organoid hattı, Doç.Dr. Ömer H. Yılmaz'ın önceki çalışmaları kapsamında normal kolon organoid hattında KRK gelişiminde rol oynayan APC, KRAS, TP53 genlerindeki değişikliklerin Crispr/CAS9 teknolojisi kullanılarak *in vitro* koşullarda düzenlenmesi ile elde edilmiştir. Organoid kültürü oluşturmak için 1000 tek hücre 48 kuyulu düz tabanlı doku kültürü plakasına 10µl, 1:2 Matrigel (Corning, Somerville, MA, ABD, #356231) oranında ekilmiştir. 37°C'de 30 dakika inkübasyondan sonra kuyucuklara 300 µl organoid büyüme ortamı eklenmiştir. Büyüme ortamı her üç günde bir yenilenmiştir. Kültür ortamı ADMEM/F12 (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, ABD, #12634028) bazal ortamına 1X B27 (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, ABD, #17504001), %1 Pen/Strep (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, ABD, #15140122) ve 1X Glutamax (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, ABD, #35050079) eklenerek oluşturulmuştur. Organoidler yeterli büyüklüğe ulaştıklarında dondurulmuş ve/veya pasajlanarak kültür devamlılığı sağlanmıştır. Organoidler 5 dk 300G'de çüktürüldükten sonra, süpernatant pelleti bozmadan çıkarıldı. Organoidler, %10 DMSO (Tocris, Bristol, UK, #3176) ve %90 FBS (Thermofisher Scientific, ABD, Waltham, MA, #A3160501) içeren bir dondurma ortamında yeniden süspanse edilmiş ve kriyo tüplere alınarak gece boyunca -80°C'de bırakılarak dondurulmuştur. Ardından uzun süreli saklama için kriyo tüpler sıvı nitrojene aktarılmıştır (203).

3.6.3 Üç Boyutlu Organoid Modellerde İlaç Denemeleri

Organoid hatlarına ait tekli hücreler matrijel içine gömüldükten sonra 48 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. İlaç uygulamaları, matrijel jelleşmesi tamamlandıktan (30 dk) sonra belirlenen konsanstrasyonların büyüme ortamı içerisinde ilgili kuyucuklara eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Oksaliplatinin inhibitor konsantrasyon 10 (Inhibitory Concentration 10, IC10) ve inhibitor konsantrasyon 50 (Inhibitory

Concentration 50, IC50) değerleri, KRK organoid kültüründe 0-1.5-3-6-9-12-15-18-21µM konsantrasyonlarının 3 tekrarlı olarak uygulanmasıyla belirlenmiştir. BOHB ve melatoninin sitotoksik olmayan en yüksek konsantrasyonlarının belirlenmesi için; BOHB 0-5-10-20-30-40-50-60µM, melatonin de 0-200-400-600-800-1000µM konsantrasyonlarında normal kolon organoid hattına uygulanmıştır. Oksaliplatinin IC10 ve IC50 değerlerini, BOHB'nin sitotoksik olmayan en yüksek konsantrasyonlarının 0.25, 0.50, 0.75, 1 katlarını ve melatoninin sitotoksik olmayan en yüksek konsantrasyonunu içeren büyüme ortamı ile tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlar halinde KRK organoid hattı üzerinde test edilmiştir (204,205).

Tüm çalışma boyunca 1'den 12'ye kadar numaralandırılan toplam üç ajanın tekli, ikili ve üçlü kombinasyonu ile çalışılmıştır. Bunlar sırasıyla; 1) Kontrol, 2) IC10 oksaliplatin, 3) IC50 oksaliplatin, 4) Melatonin, 5) BOHB, 6) Melatonin+BOHB, 7) Melatonin+IC10 oksaliplatin, 8) Melatonin+IC50 oksaliplatin, 9) BOHB+IC50 oksaliplatin, 10) BOHB+IC10 oksaliplatin, 11) Melatonin+BOHB+IC50 oksaliplatin, 12) Melatonin+BOHB+IC10 oksaliplatin.

3.6.4 Canlılık Analizi

Hücre canlılığını değerlendirmek için organoid kültür üzerinde bir hücre canlılığı deneyi gerçekleştirilmiştir. Resazurin, hücre canlılığı testi ajanı, canlı hücrelerdeki metabolik aktivasyon sonucu, oksitlenmiş (floresan olmayan mavi) resazurinin kırmızı floresan boyaya (resorufin) indirgenmesine dayanır. Üretilen resorufin miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Ajan uygulamalarından sonra kuyucuklara 1X Resazurin (Cayman, MI, ABD #14322) eklenmiş, 37°C'de 4 saat inkübe edilmiş ve floresan Varioskan Lux Plate Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) plaka okuyucuda 530-560 / 590 nm Ek/Em olacak şekilde ölçülmüştür. Hücre canlılığı referans olarak alınan kontrol grubunda %100 olarak kabul edilmiş ve diğer gruplar bu referansa göre değerlendirilmiştir. Tüm deneyler 3 biyolojik 5 teknik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir (206).

3.6.5 Western Blot

Ajan uygulamalarından sonra organoidler matrijelden uzaklaştırılıp toplanmıştır. Organoidler 3 kez PBS ile yıkanıp, ardından 1X Halt proteaz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD, #78429) inhibitörü içeren RIPA tamponunda (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD, #89901) hücre lizatı oluşturmak için 15 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Organoidler 4°C'de en yüksek hızda 15 dakika santrifüj işlemi ardından ve süpernatant toplanmıştır. Total protein özütlerinin elde edilmesinden sonra eşit hücre içeriğiyle çalışmak için total protein tahlili yapılmıştır. BCA protein tahlili (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD, #23228) üreticinin önerdiği protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir. 48 kuyucuklu plakada gerçekleştirilen BCA protein tahlili analizi için kit içinde gelen A solüsyonundan ve B solüsyonundan 50:1 oranında çalışma tamponu elde edilmiştir. Standart grafiği oluşturmak adına kit içerisinde gelen 2mg/ml BSA 20-2000µg/ml aralığında konsantrasyonlara seyreltilerek 10µl hacminde kuyucuklara eklenmiştir. Daha sonra, her bir ajan uygulaması için elde edilen total protein özütlerinden 10µl; çalışma tamponundan 200µl kuyucuklara eklendikten sonra 30 dk 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra absorbans değerleri Varioskan Lux Plate Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD)'da 562nm ayarında spektrofotometrik ölçümü alınmıştır. Elde edilen standart grafiğinden yola çıkılarak, protein tayini tamamlanan total protein özütleri, her bir ajan uygulaması için 50µg protein olacak şekilde hesaplanmıştır. Eşit protein özütleri, 1X Laemmli örnek tamponu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD, #J61337-AC) eklenerek jele yüklemeye hazır hale getirilmiştir. 80V sabit akım altında MES SDS çalıştırma tamponunda (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD, #NP0335Box) NuPage Bis-Tris jelde (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD, #NP0002) yürütülmüştür. Transfer işlemi sırasında proteinler transfer tamponu kullanılarak immobilize polivinil diflorid membrana (Millipore Sigma, Burlington, MA, ABD, #IPVH00010) aktarılmıştır. Transfer tamponu distile su içerisine 25 mM Trisbase (St. Louis, MI, ABD, #93362) konsantrasyonunda eklenmiştir. Daha sonra 192 mM Glisin (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, ABD, #G7126) konsantrasyonunda yavaşça eklenir. Son olarak %10 metanol (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, ABD, #646377 (vol/vol))

çözeltiye eklenerek transfer tamponu hazırlanmış olur. Transfer işlemi 4°C'de sabit akımla 90 dakika boyunca 80V'de gerçekleştirilmiştir. İlgilenilen proteinin kDa değerlerine göre membran kesilmiştir. Kesilmiş membranlar 1 saat oda sıcaklığında bloklama tamponunda primer antikorlar ile 4°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bloklama tamponu TBST içinde %5 sığır serum albumin, (Bovine serum albumin, BSA) (Research Product International, Mount Prospect, IL, ABD, #A30075) eklenerek hazırlanmıştır. Antikorlar üretici firmanın protokolü dahilinde hepsi 1:1000 oranında bloklama tamponunda seyreltilerek kullanılmıştır. LDHA (Abcam, Cambridge, MA, ABD, #ab101562) ve MPC2 (Proteintech, Rosemont, IL, ABD #20049-1-APCC3) enerji metabolizması bağlamında değerlendirilmiştir; apoptotik yolak belirteci ayrılmış kaspaz-3 (Cleaved Caspase-3, CC3) (Cell Signaling Tech, Danvers, MA, ABD, #9664S), DNA hasar belirteci γH2AX (Millipore Sigma, Burlington, MA, ABD # PLA0294), histon asetilasyon belirteci H3K27ac (Cell Signaling Tech., Danvers, MA, ABD, #8173) ölüm yolu bağlamında değerlendirilmiştir. Membranlar, ilgili sekonderlerden önce 1X Tween 20 içeren Tris Tamponu (TBST) (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, ABD, #T9039-10PAK) ile 5 dakika boyunca 3 kez yıkanmıştır. Tavşan anti-antikoru (Abcam, Cambridge, MA, ABD, #ab6721) ve fare anti-antikoru (Abcam, Cambridge, MA, ABD, #ab150113) 1:7500 konsantrasyonda kullanılmış ve 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sekonder antikorlarla inkübasyon ardından, membranlar TBST ile 3 kez 5 dk oda sıcaklığında yıkanmıştır. Görüntüleme amacıyla, membranlar ECL horse rabbish detection kit (Advansta, San Jose, CA, ABD, #K-12045-D20) ile 3 dakika muamale edilmiş ve görüntüleme cihazında (iBright CL1500 Imaging System, Thermofisher, ABD) bant görüntüleri alınmıştır. Görüntülerdeki bantlar ImageJ 1.53 programında incelenmiştir (166).

3.6.6 Reaktif Oksijen Türleri Miktarsal Analizi

KRK organoidlerinin ajanlarla muamelesini takip eden 96. saat sonrasında, mikrofüj tüplerinde toplanan organoidlerin 1000 x g'de 5 dakika santrifüj edilmesi ardından süpernatanın atılması ile ortamdaki Matrigel kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Organoidler, 37°C'de 5 dakika boyunca TrypLE Express enzimi ile tek hücre haline getirilmiştir. ROS analizi, üreticinin protokolü izlenerek CellROX Orange Reagent

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD, #C10443) ile yapılmıştır. Her bir kuyucuğa kit içerisinde gelen FITC-Annexin V (apoptotik hücre belirteci) ve PE (hücre ölümü belirteci) ajanları, 100µl hücre süspansiyonu üzerine, 2.5µl eklenmiştir. Daha sonra hücreler 15 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Son olarak her örneğin üzerine 200µl bağlama tamponu (binding buffer) eklenmiştir. Analiz için akış sitometri cihazında Alexa Fluor 680 ve PE lazerleri kullanılarak önce PE için kapılama yapılmıştır. PE ile canlı ve ölü hücrelerin ayrımı gerçekleştirilmiştir. Alexa Fluor 680 ile de negatif ve pozitif kontroller eşliğinde ROS pozitif hücrelerin ayrımlanması gerçekleştirilmiştir. Pozitif ve negatif kontrol için TBHP ve N-asetil-L-sistein kullanılmıştır. Örnekler, ayrı ayrı 10000 hücre olacak şekilde, akış sitometrisinde (BD Bioscience, California, ABD, BD FACSAria III) analiz edilmiştir. Elde edilen ham veri FlowJo yazılımı (BD Bioscience, California, ABD) ile analiz edilmiştir. Tüm deneyler 3 biyolojik 5 teknik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.7 Immunofloresan Boyama

Ajan uygulaması tamamlanan KRK organoidleri toplandıktan sonra PBS ile nazikçe yıkanmıştır ve matrijel kalıntılarından uzaklaştırılmıştır. Ardından, organoidlerin yapısal bütünlüklerini korumak ve protein lokalizasyonunu sürdürmek amacıyla %4 paraformaldehit ile 30dk karanlık ortamda oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Fikse edilen organoid yapılar, antikorların hücre içi bölgelere nüfuzunu kolaylaştırmak için %1 Triton X-100 ile permeabilize edilmiştir. Non-spesifik bağlanmayı önlemek için organoidler daha sonra %1 BSA, %3 eşek serum albumin (donkey serum albumin, DSA) %0,2 TritonX-100 ile 1saat inkübe edilmiştir. Primer antikorlar; anti-CC3 (1:1000) ve anti-γH2AX (1:500) gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Bağlanmamış birincil antikorları temizlemek için PBS yıkaması gerçekleştirildikten sonra, floresan bağlı ikincil antikorlar kullanılarak CC3 ve γH2AX işaretlenmiştir. Nükleus 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile 15dk karanlıkta inkübe edilerek boyanmıştır. Yıkama işlemleriyle boya kalıntıları uzaklaştırıldıktan sonra Konfokal LSM 800 mikroskobu kullanılarak görüntüler alınmıştır. Görüntüler ImageJ 1.53 programı ile analiz edilmiştir. Tüm deneyler 3 biyolojik 5 teknik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

3.7 Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi ve görselleştirilmesi GraphPad V9 (Kalifornia, ABD) ile değerlendirilmiştir. Metodolojik olarak elde edilen değişkenler ortalama±standart sapma, medyan, ortanca, minimum-maksimum olarak ve sayımla belirtilen değişkenler göreceli yüzde dağılımı olarak özetlenmiştir. Hücre kültüründeki 2 deney grubu arasındaki anlamlılığı değerlendirmek için parametrik olmayan Mann Whitney U testi uygulanmıştır. Ayrıca, çoklu analizler için ANOVA varyans analizi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

3.8 Araştırmanın Kısıtlılıkları

Araştırmada kullanılan *in vitro* modelimiz, organoid, üç boyutlu bir model olarak birçok avantaj sunarken her modelde olduğu gibi kısıtlılıklara sahiptir. *In vivo* tümör dokusuna en yakın model olarak gösterilen organoid modellerde tümör mikroçevresi ve ilaç detoksifiye edici metabolik aktiviteler açısından kısıtlamalar mevcuttur. Kanser hücrelerinin karakteristiği üzerinde önemli role sahip olan bu kısıtlamalar daha kompleks modeller kullanılarak aşılabilir. Ayrıca, BOHB ve melatoninin DNA onarımı ve otofaji, nekroz ve ferroptoz yolları gibi diğer hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkilerinin analiz edilmemesi de dahil olmak üzere çeşitli sınırlamalar getirmektedir.

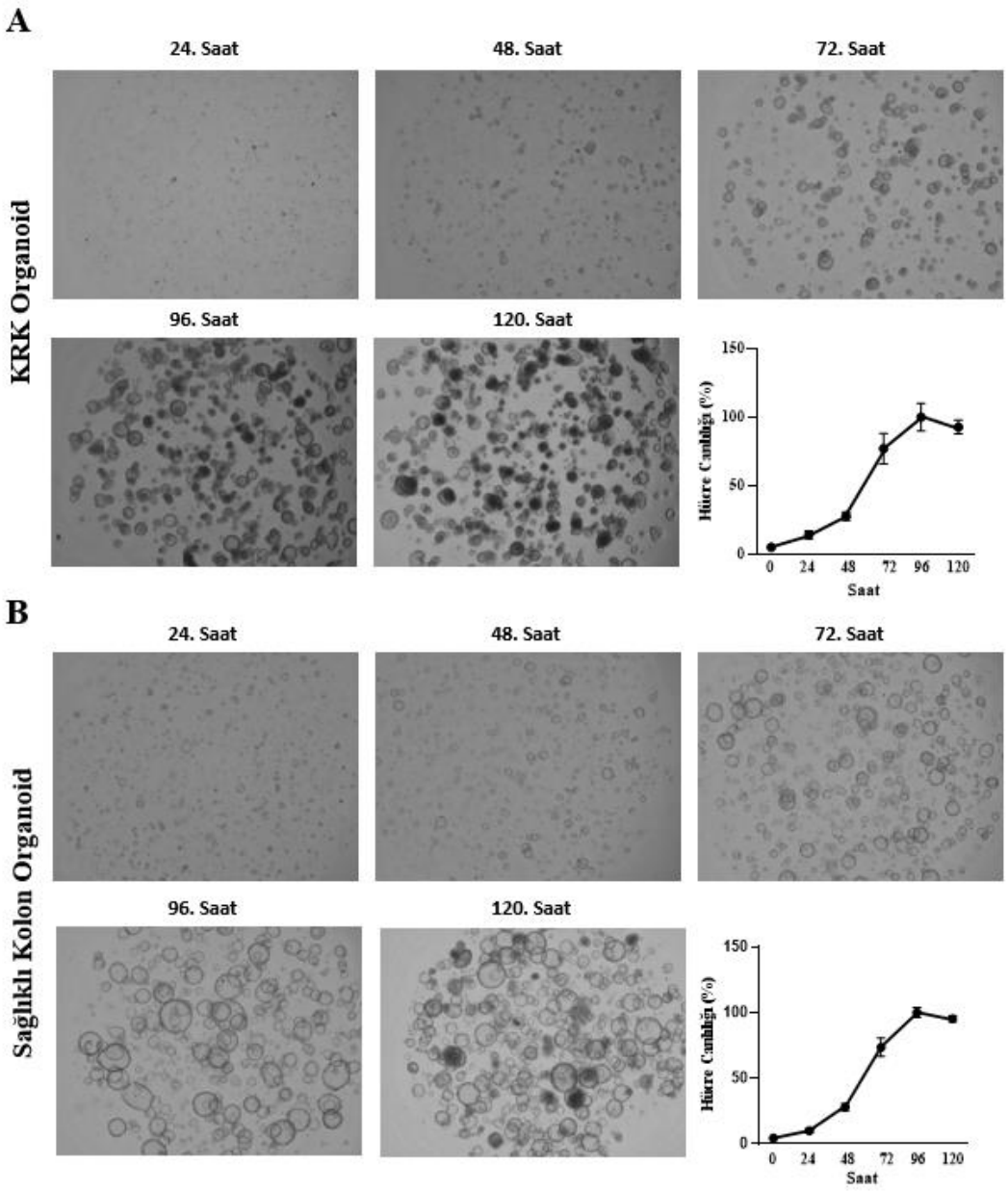
3.9 Etik Kurul Onayları

Bu tez çalışması, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 3 Kasım 2020 tarihinde 2020/14-30 protokol numarasıyla onaylanmıştır. Ayrıca, çalışma revizyonları da kurul tarafından onaylanmış olup, bu revizyonlar 2021/31-24 ve 2023/35-01 protokol numaraları altında gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Sağlıklı Kolon ve Kolorektal Kanser Organoid Kültür Optimizasyonu

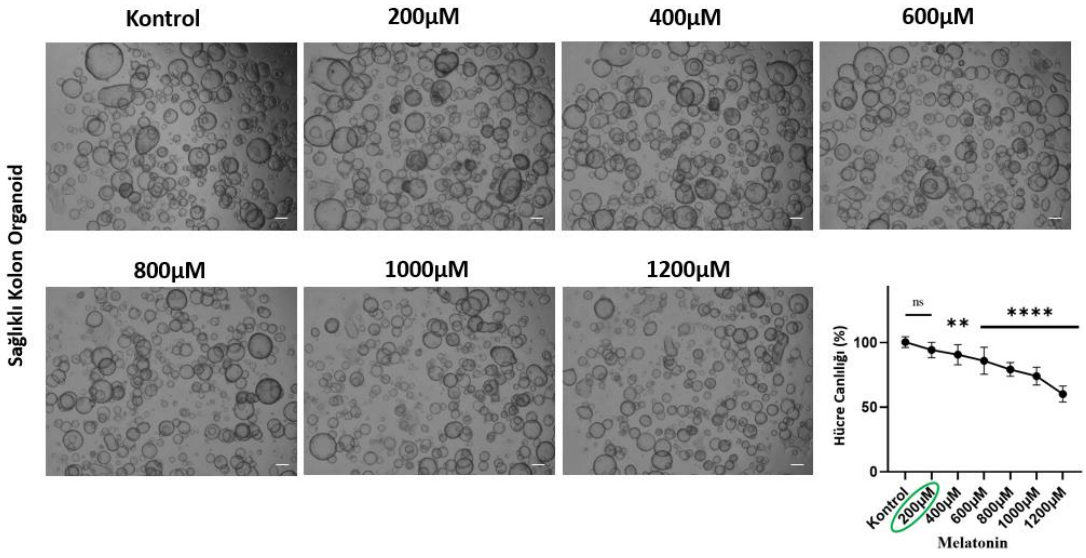
Her *in vitro* kültürde olduğu gibi organoid kültürde de büyüme üç fazdan oluşur; logaritmik büyüme fazı, durgun faz, ölüm fazı. Ajanların gösterdiği sitotoksisite analizinde oluşabilecek herhangi bir yanlılığı engellemek için organoidlerin ölüm fazı içinde olmaması gerekmektedir. Uygulanan ajanların organoid kültürler üzerindeki sitotoksik etkilerinin doğru bir biçimde değerlendirilebilmesi için optimal büyüme gösterebildiği süre belirlenmiştir. Böylece görülen hücre canlılığı azalışının uygulanan ajanlardan kaynaklı olması sağlanmıştır. Bu sebeple organoid kültürün en yüksek canlılık kapasitesine ulaştığı zamanın belirlenmesi için 1000 tek hücre matrijel içerisinde ekilip ilgili büyüme ortamları verilerek 24 saat aralıklarla 120.saate kadar mikroskop altında görüntülenmiştir. Organoidler 96. saatte maksimum kapasiteye ulaşmışlardır. Daha sonra 120. saatte alınan görsellerde gösterildiği gibi organoid yapılarının iç kısımlarında oluşan karanlık alan (nekrotik alan) hücre ölümünün başladığını göstermiştir. Görsellerden yola çıkılarak belirlenen organoid büyüme fazlarını doğrulamak adına her 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde canlılık analizi gerçekleştirilmiştir. En yüksek canlılık görsellerle paralel olarak 96. saatte belirlenmiştir. Yapılan canlılık analizi sonuçları ve ilgili görseller KRK organoid hattı için Şekil 6A'da, sağlıklı organoid hattı için Şekil 6B'de grafik olarak verilmiştir.



Şekil 6. Organoid hatlarının büyüme fazları. A. KRK ve B. sağlıklı kolon organoidlerden izole edilmiş 1000 tek hücre matrijel içinde ekilmiştir. Organoidlerin büyümelerini gösteren bu görseller 24, 48, 72, 96 ve 120. konfokal mikroskobisi ile z-stack özelliğinde alınıp arttırılmış derin fokuslama (Extended Deep Focus, EDF) metodu kullanılarak format düzenlemesi yapılmıştır. Canlılık sonuçları GraphPad V9 uygulaması ile grafik haline getirilmiştir. Deneyler 3 biyolojik 5 teknik tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.2 Üç Boyutlu Organoid Modellerinde Tekli Ajan Uygulamaları

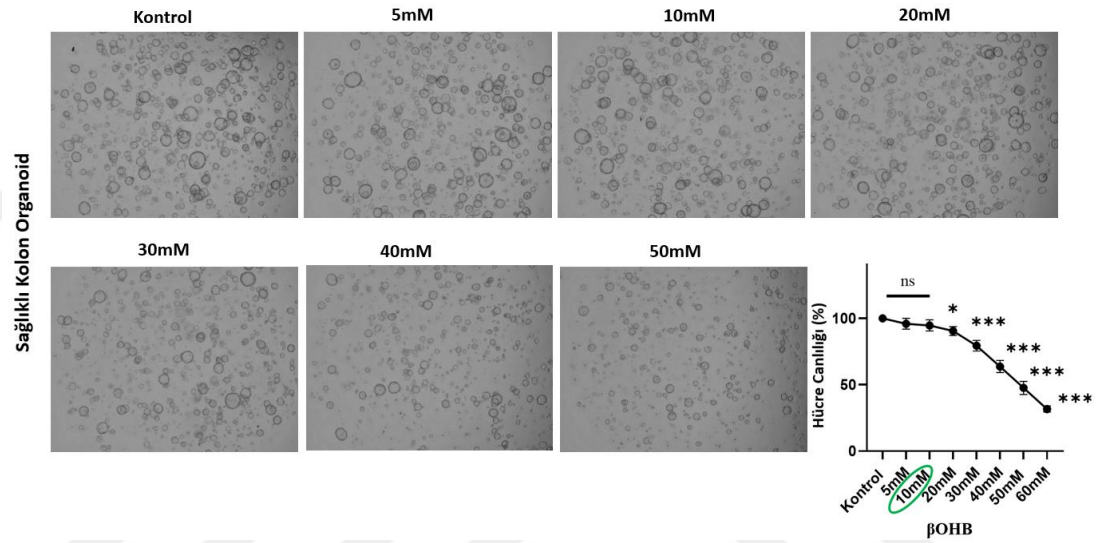
İlaç denemeleri kapsamında melatonin ve BOHB için sağlıklı kolon organoid hattında sitotoksisite yaratmayan en yüksek konsantrasyon değerleri belirlenmiştir. Bunun amacı, halihazırda oksaliplatinin seçici bir ajan olmaması sebebiyle sağlıklı hücrelerde de yüksek sitotoksik etki gözlemlenmektedir. Bu deney, kullanılacak ajanların sağlıklı hücrede sitotoksisite oluşturmaması ve oksaliplatinle kombine kullanımında oluşturabileceği ek sitotoksisiteyi ortadan kaldırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 96 saat boyunca sağlıklı kolon organoid hattına melatonin ve BOHB uygulanmasının ardından, canlılık analizi ve buna paralel olarak mikroskobik görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Şekil 7 de görüldüğü gibi, melatonin 200 µM ve üzerinde uygulanan konsantrasyonlarda sağlıklı kolon organoid hattında sitotoksisite yaratmıştır.



Şekil 7. Melatoninin sağlıklı kolon organoidleri üzerine etkisi. Sağlıklı kolon organoidlerinden ayrılan tek hücreler 48 kuyulu plakalara Matrijel içinde ekilmiş ve artan melatonin (0-1200 µM) konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. 96 saat boyunca uygulanan ajanlardan sonra, mikroskobik görüntüleme ve hücre canlılık analizi gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler hem teknik hem de biyolojik olarak 4 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ajanın sitotoksik etkisi, kontrol grubu %100 canlılık kabul edilerek buna göre hesaplanmıştır. Sitotoksisite göstermeyen en yüksek konsantrasyon yeşil eliptik çember ile işaretlenmiştir. Yıldız işaretleri ajan

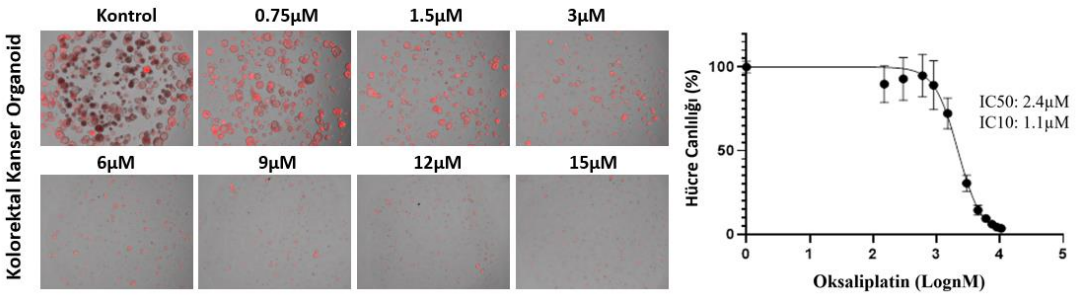
uygulamalarının istatistiksel anlamlılığını göstermektedir (****p<0,0001, **p<0,01, kontrole kıyasla).

BOHB'ın sağlıklı kolon organoidleri üzerindeki sitotoksisitesini değerlendirmek için yapılan analiz sonuçlarına göre en yüksek sitotoksisite göstermeyen konsantrasyon 10mM olarak belirlenmiştir. İlgili veriler Şekil 8'de sunulmuştur.



Şekil 8. BOHB'nin sağlıklı kolon organoidleri üzerindeki etkisi. Normal kolon organoidlerinden ayrılan tek hücreler 48 kuyulu plakalara ekilmiş ve artan BOHB (0-60mM) konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. 96 saatlik ajan uygulamasından sonra, canlılık analizi gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler hem teknik hem de biyolojik olarak dörderli olarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ajanın sitotoksik etkisi, kontrol grubu %100 canlılığa sahip olduğu kabul edilerek diğer gruplar bu referansa göre hesaplanmıştır. Sitotoksisite göstermeyen en yüksek konsantrasyon yeşil eliptik çember ile işaretlenmiştir. Yıldız işaretleri, elde edilen canlılık değerlerinin istatistiksel anlamlılığını göstermektedir (p<0.05, kontrole kıyasla).

Oksaliplatinin IC10 ve IC50 değerlerini belirlemek için, KRK organoid hattı 96 saat boyunca artan konsantrasyonlarda oksaliplatin konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Deney sonunda yapılan canlılık ve mikroskobik görüntüleme analizleri Şekil 9' da sunulmuştur.



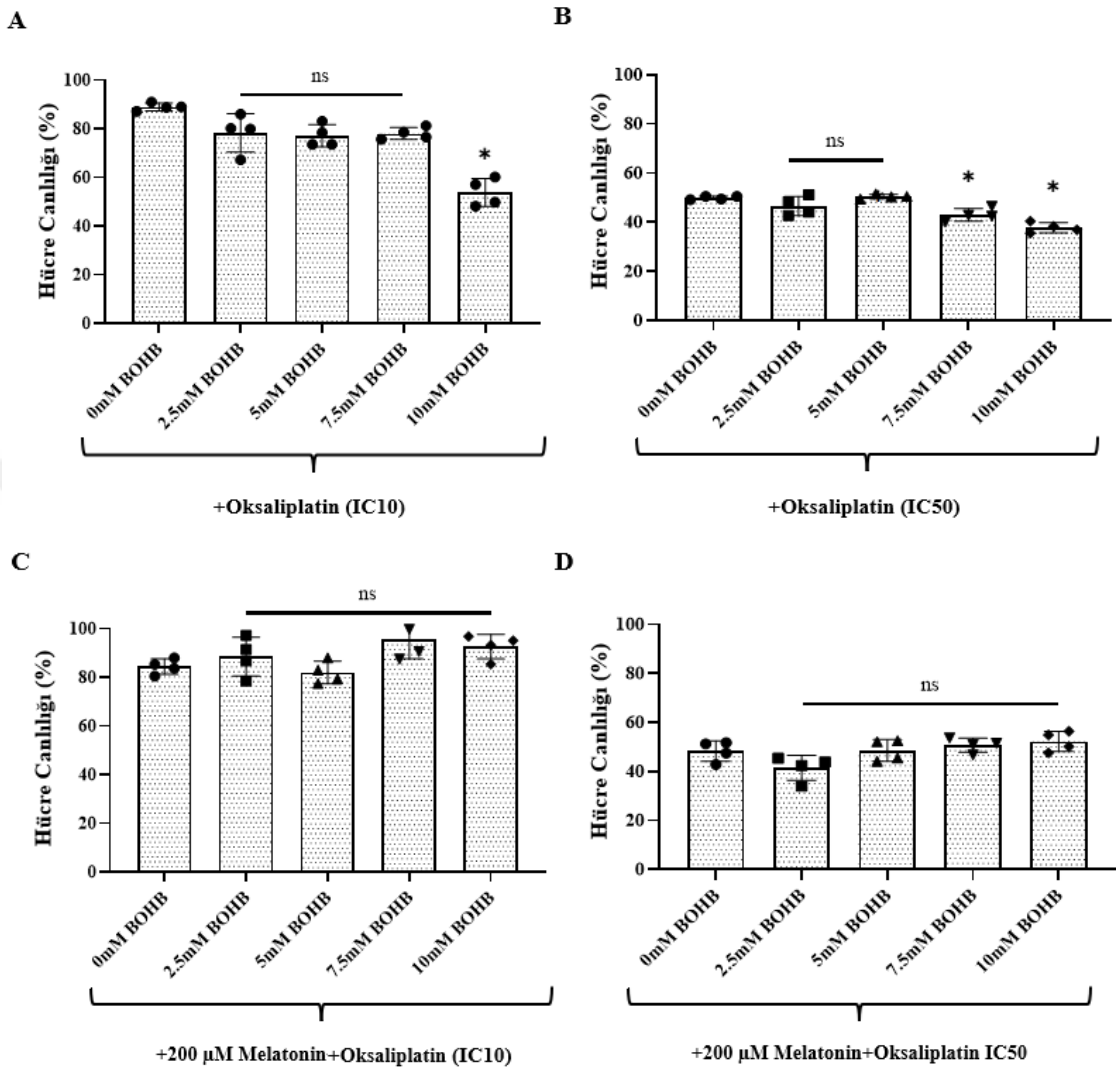
Şekil 9. Oksaliplatinin KRK organoidleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi. Organoidlerden ayrıştırılan tek hücreler, 48 oyuklu plakalarda kültürlendikten sonra, artan konsantrasyonlarda oksaliplatin (0-15 µM) büyüme ortamı içinde kültüre eklenmiştir. 96 saatlik ajan uygulanmasının ardından hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Tüm deneyler hem teknik hem de biyolojik olarak dört tekrar ile gerçekleştirildi. Kullanılan ajanın sitotoksik etkisi, kontrol grubu %100 canlılık kabul edilerek buna göre hesaplanmıştır. Grafik logaritmik (10 tabanında) hesaplanarak oluşturulmuştur.

Sonuç olarak, oksaliplatinin KRK organoidleri üzerindeki inhibitör etkisi yaratan konsantrasyonlarının bulunması için yapılan deneyler sonucu, oksaliplatin IC10 değeri 1,1 µM, IC50 değeri ise 2,4 µM olarak bulunmuştur.

4.3 Ajanların Kolorektal Kanser Organoidlerine Uygulanması

Sağlıklı kolon organoidlerinde belirlenen sitotoksisite göstermeyen en yüksek konsantrasyonlar dahilinde tekli ikili ve üçlü kombinasyon uygulamaları oluşturulup KRK organoidlerinde denenmişlerdir. IC10 ve IC50 oksaliplatin değerleri, BOHB'nin 0-2,5-5-7,5-10mM konsantrasyonlarında denenmiştir. BOHB'nin sadece en yüksek konsantrasyonda deneme yapılmamasının sebebi ara konsantrasyonlarda oluşabilecek herhangi bir kombine uygulama etkinliğindeki farklanmanın kaçırılmamasıdır. Bu iki ajana ek olarak 200 µM melatonin de kombine uygulamalara eklenmiştir. Hazırlanan tekli, ikili ve üçlü ajan içeren büyüme ortamları ile KRK organoidleri 96 saat boyunca muamele edilmiştir. Uygulamaların ardından, hücre canlılığını değerlendirmek için

canlılık deneyi gerçekleştirilmiştir. Canlılık verileri Şekil 10'da grafik halinde sunulmuştur.

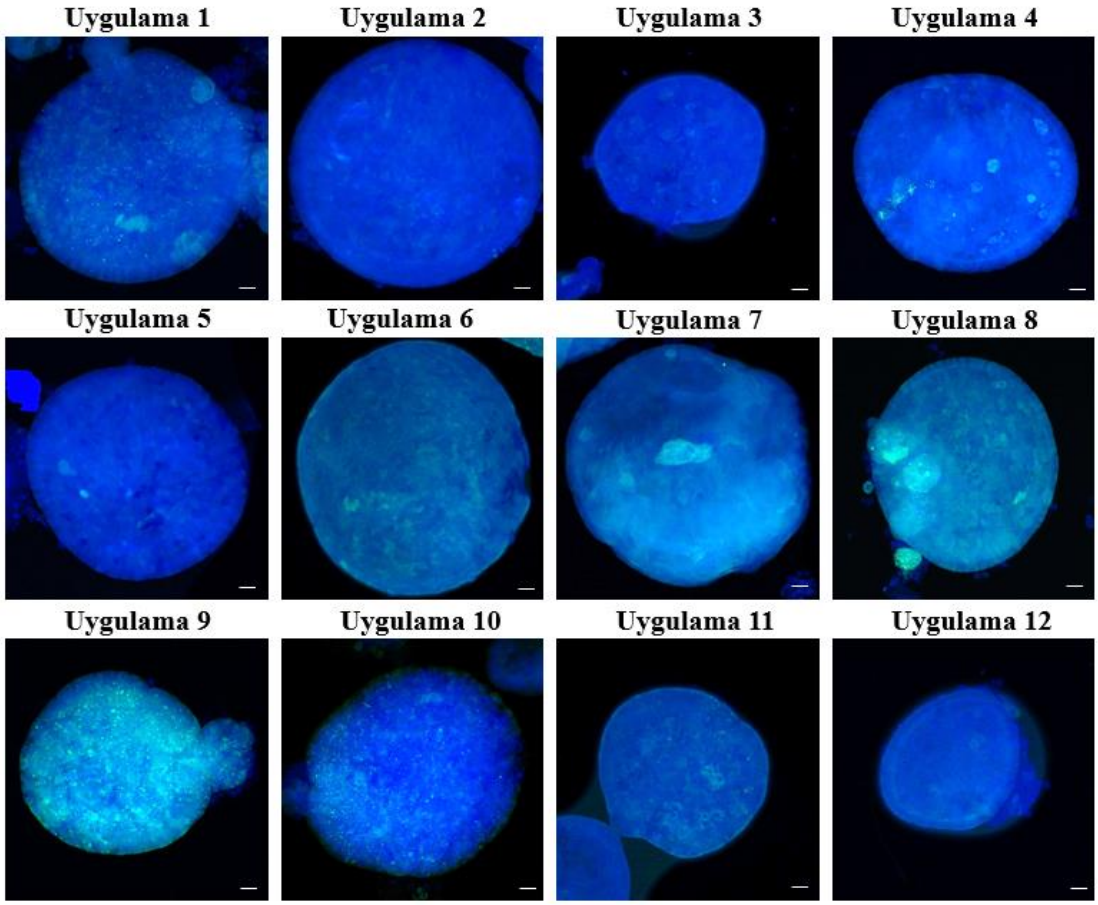


Şekil 10. Ajanların kombine uygulamalarının oksaliplatin sitotoksisitesine etkisi. KRK organoidlerinden ayrılan tek hücreler 48 kuyulu plakalara ekilmiş ve Panel A ve B'de gösterildiği gibi IC10 ve IC50 oksaliplatin değerlerinde artan BOHB konsantrasyonlarına (0-10mM) maruz bırakılmıştır. Bu ikili kombine ajan rejimine Panel C ve D'de gösterildiği gibi 200µM melatonin de eklenmiştir. 96 saatlik tedaviden sonra hücre canlılığı testi kullanılarak ölçülmüştür. Tüm deneyler hem teknik hem de biyolojik olarak dört tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ajan uygulamalarından sonra canlılıklar değerlendirilirken, kontrol grubu %100 canlı kabul edilip, diğer gruplar buna göre hesaplanmıştır. Yıldız işaretleri hücre canlılığı farklılıklarının istatistiksel anlamlılığını göstermektedir ($p < 0.05$, kontrole kıyasla).

KRK organoidlerine 96 saatlik bir süre boyunca sabit konsantrasyonda 200µM melatonin+ oksaliplatin (IC10 ve IC50 değerlerinde) ve BOHB (0 ila 10 mM arasında değişen konsantrasyonlarda) kombinasyon ajanlar uygulanmıştır. Uygulama sonrası yapılan canlılık testi sonuçlarına göre KRK organoidleri canlılık miktarında azalmaya sebep olmuştur. Oksaliplatin+BOHB kombine uygulamasıyla sitotoksik etkinin arttığı görülmüştür. Şekil 10A'da görüldüğü gibi IC10 oksaliplatin+10mM BOHB kombine ajan uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksisite artışı gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Buna ek olarak, Şekil 10B'de görüldüğü gibi, IC50 değerinde oksaliplatinin 7,5 ve 10mM BOHB ile kombine edilmesi sitotoksisiteyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırmıştır ($p<0.05$). IC10 oksaliplatin ve 10 mM BOHB'den oluşan kombine ajanların uygulanması ile gözlenen hücre canlılığı %53 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, IC50 oksaliplatin uygulaması, 7,5 mM ve 10 mM BOHB ile birleştirildiğinde, sırasıyla %42,99 ve %37,83 hücre canlılığı yüzdeleri ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte, Şekil 10C, D'de gösterildiği gibi, uygulamaya 200µM melatoninin dahil edilmesiyle, BOHB'nin arttırdığı oksaliplatinin sitotoksik etkisinin oksaliplatinin tekli uygulamalarındaki sitotoksisite seviyesine geri çektiği gösterilmiştir.

4.4 Immunofloresan Boyama ile Apoptotik Yolak ve DNA Hasarının İncelenmesi

Ajan uygulamalarının tamamlanması sonrası yapılan CC3 ve gH2AX immunofloresan boyamalar gerçekleştirilmiştir. Bu boyamalar incelendiğinde BOHB+oksaliplatin uygulamalarının CC3 ve gH2AX miktarındaki artış gözlenmiştir. CC3 için gerçekleştirilen immunofloresan boyanmış organoidlerin görüntüleri Konfokal LSM 800 (Confocal LSM 800, Zeiss) mikroskobisinde alınmış ve Şekil 11'de sunulmuştur.



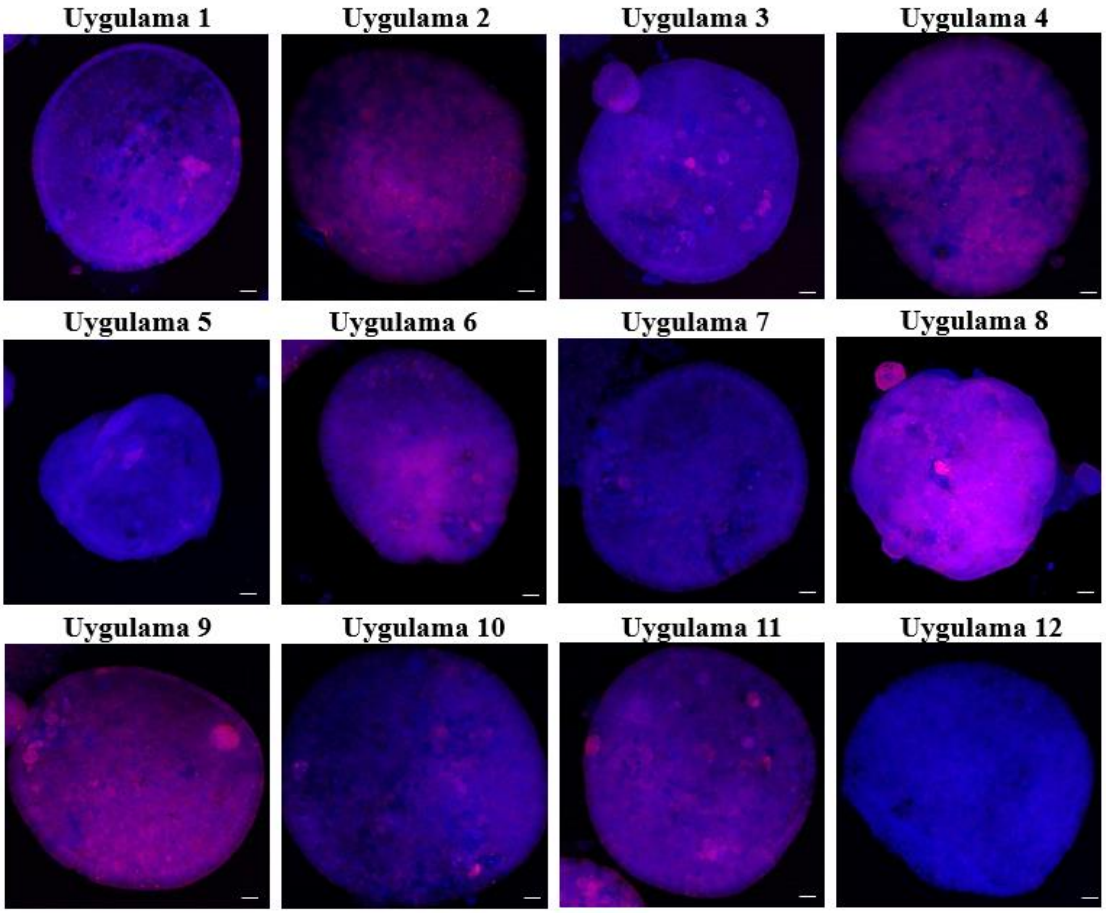
Şekil 11. Uygulanan ajanların apoptotik ölüm yolağı aktivasyonuna etkisi. Ajanlar 96 saat uygulandıktan sonra organoidler CC3 (yeşil) apoptoz belirteci ve nükleus boyası DAPI (mavi) ile boyanmıştır. 10mM BOHB, 200 µM melatonin ve IC10-IC50 oksaliplatin içeren farklı ajanların uygulamaları, 1'den 12'ye kadar tanımlanan gruplar şeklinde KRK organoidlerinde denenmiştir: 1) Melatonin+IC10 Ox, 2) Melatonin+IC50 Ox, 3) Melatonin, 4) BOHB, 5) Melatonin+BOHB, 6) Melatonin+BOHB+IC50 Ox, 7) Melatonin+BOHB+IC10 Ox, 8) BOHB+IC50 Ox, 9) BOHB+IC10 Ox, 10) IC10 Ox, 11) IC50 Ox, 12) Kontrol. Görüntüler üzerinde konfokal mikroskobisi (Confocal LSM 800, Zeiss, Almanya) ile z-stack özelliği ile alınıp arttırılmış derin fokuslama (Extended Deep Focus, EDF) özelliği kullanılarak format düzenlemesi yapılmıştır. (Ölçek çubuğu: 20µm)

Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler apoptotik yolak aktivasyonunun BOHB aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Görüntüler analiz edildiğinde apoptoz belirteci CC3 ifade miktarının IC50 ve IC10 değerlerinde oksaliplatin ajanında

kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sırasıyla 3,95 ve 3,05 kat arttığı görülmüştür ($p<0.01$). En yüksek CC3 ifadesi ise BOHB+oksaliplatin ajanlarının ikili kombinasyon uygulamalarına maruz kalan organoidlerde olduğu belirlenmiştir. IC50 ve IC10 oksaliplatinin tekli uygulamalarına oranla oksaliplatin+10mM BOHB kombine uygulamalarıyla elde edilen CC3 ifade miktarı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sırasıyla 2,05 ve 2,15 kat artış göstermiştir ($p<0.05$).

Apoptotik yolak aktivasyonunun sebebini araştırmak için DNA hasar belirteci olan gH2AX ile floresan boyama gerçekleştirilmiştir. gH2AX için gerçekleştirilen immunofloresan boyanmış organoidlerin görüntüleri Konfokal LSM 800 (Confocal LSM 800, Zeiss) mikroskopisinde alınmış ve Şekil 12'de sunulmuştur.

Görüntüler analiz edildiğinde DNA hasar belirteci olan gH2AX ifade miktarının IC50 ve IC10 değerlerinde oksaliplatin ajanı uygulamasında, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sırasıyla 1,85 ve 1,55 kat arttığı görülmüştür ($p<0.05$). En yüksek gH2AX ifadesi ise BOHB+oksaliplatin ajanlarının ikili kombinasyon uygulamalarına maruz kalan organoidlerde olduğu belirlenmiştir. IC50 ve IC10 oksaliplatinin tekli uygulamalarına oranla oksaliplatin+10mM BOHB kombine uygulamalarıyla elde edilen gH2AX ifade miktarı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sırasıyla 3.05 ve 3,45 kat artış göstermiştir ($p<0.01$).

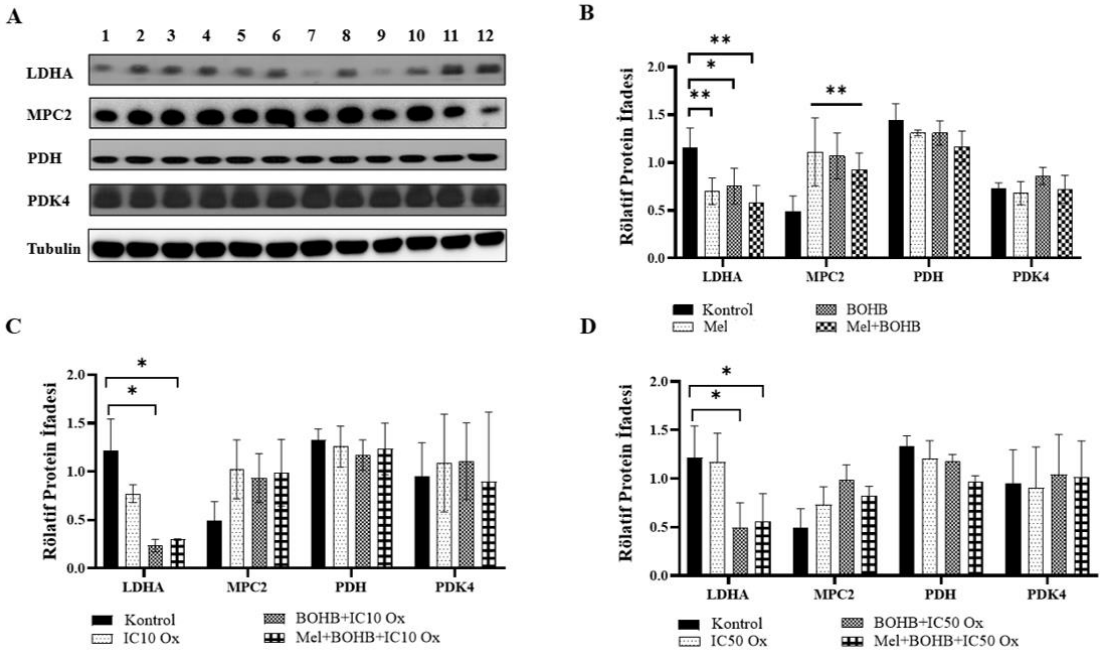


Şekil 12. Uygulanan ajanların DNA hasarı üzerindeki etkisi. Ajanlar 96 saat uygulandıktan sonra immunofloresan boyanmış gH2AX (kırmızı) ve nükleus boyası DAPI (mavi) organoid görselleri. 10 mM BOHB, 200 µM melatonin ve IC10-IC50 oksaliplatin içeren farklı ajan uygulamaları, 1'den 12'ye kadar tanımlanan gruplar şeklinde KRK organoidlerine uygulanmıştır: 1) Melatonin+IC10 Ox, 2) Melatonin+IC50 Ox, 3) Melatonin, 4) BOHB, 5) Melatonin+BOHB, 6) Melatonin+BOHB+IC50 Ox, 7) Melatonin+BOHB+IC10 Ox, 8) BOHB+IC50 Ox, 9) BOHB+IC10 Ox, 10) IC10 Ox, 11) IC50 Ox, 12) Kontrol. Görüntüler konfokal lsm 800 mikroskobu ile genişletilmiş derin fokuslama (extended deep focus, EDF) özelliği kullanılarak alınmıştır. (Ölçek çubuğu: 20µm)

Sonuçlar, BOHB'ın oksaliplatinin oluşturduğu DNA hasarını arttırarak apoptoza yol açtığını ve böylece sitotoksik etkiyi arttırdığını göstermiştir.

4.5 Western Blot ile Enerji Metabolizması Enzimlerin Miktarsal Analizi

Kullanılan ajanlardan BOHB'ın potansiyel bir TCA döngüsü ara metaboliti olan asetik-KoA'ya dönüşüp, KRK'de baskılanmış olan mitokondriyel aktiviteyi arttırabileceği düşünülmüştür. Böylece artmış aerobik glikolizi de inhibe ederek, bu enerjetik yolağın kanser hücrelerine kazandırdığı avantajları ortadan kaldırılabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla, BOHB'nin enerji metabolizmasında oluşturabileceği düşünülen değişiklikler protein düzeyinde analiz edilmiştir. LDHA, MPC2, PDH ve PDK4 gibi kilit proteinlerin ifade seviyeleri farklı ajan uygulamaları altında ölçülmüştür. Bu proteinlerin düzeyindeki değişimler doğrultusunda, BOHB'ın kanser hücresinin enerji metabolizması üzerinde aerobik glikoliz yolağından TCA döngüsüne doğru bir kayma yaratıp yaratmayacağı incelenmiştir. Her bir ajanın tekli ikili ve üçlü kombinasyonları KRK organoidlerine uygulanmasından 96 saat sonra gerçekleştirilen Western Blot analizi yoluyla protein ifade miktarları değerlendirilmiştir.



Şekil 13. Enerji metabolizması proteinlerinin ajan uygulamaları altında değerlendirilmesi. A) 1'den 12'ye kadar numaralandırılan toplam üç ajanın tekli, ikili ve üçlü kombinasyonu ile çalışılmıştır. 10mM BOHB, 200µM melatonin ve IC10-IC50 oksaliplatin içeren farklı uygulamalar, 1'den 12'ye kadar tanımlanan gruplar şeklinde KRK organoidlerinde denenmiştir: 1) Melatonin+IC10 Ox, 2) Melatonin+IC50 Ox, 3) Melatonin, 4) BOHB, 5) Melatonin+BOHB, 6)

Melatonin+BOHB+IC50 Ox, 7) Melatonin+BOHB+IC10 Ox, 8) BOHB+IC50 Ox, 9) BOHB+IC10 Ox, 10) IC10 Ox, 11) IC50 Ox, 12) Kontrol. B) Bar grafik, 3, 4 ve 5 numaralı uygulamalar altında LDHA, MPC2, PDH ve PDK4 proteinlerinin seviyelerini göstermektedir. C) Bar grafik 7, 9 ve 10 numaralı uygulamalar altında LDHA, MPC2, PDH ve PDK4 proteinlerinin seviyelerini göstermektedir (IC10 oksaliplatin içeren uygulamalar için). D) Bar grafik, 6, 8 ve 11 numaralı uygulamalar altında LDHA, MPC2, PDH ve PDK4 proteinlerinin seviyelerini temsil etmektedir (IC50 oksaliplatin içeren uygulamalar için). Protein seviyeleri ImageJ 1.53'de ölçülmüş ve normalizasyon için tubulin seviyeleri kullanılmıştır. Tüm deneyler üç biyolojik ve beş teknik tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Yıldız işaretleri ajan uygulamaların istatistiksel anlamlılığını göstermektedir (*$p<0.05$, **$p<0.01$ kontrole kıyasla). (LDHA: Laktat Dehidrogenaz A, MPC2: Mitokondriyel Pirüvat Taşıyıcısı 2, PDH: Pirüvat Dehidrogenaz PDK4: Pirüvat Dehidrogenaz Kinaz 4)

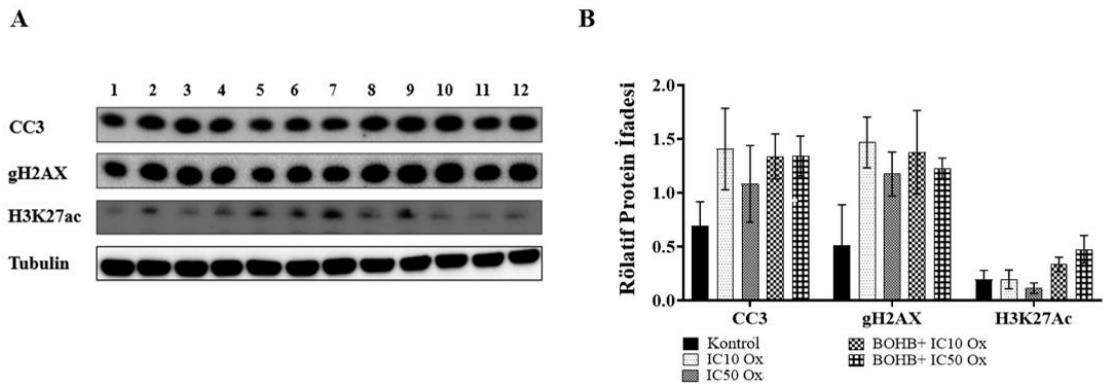
Kontrol grubundaki LDHA protein seviyeleri 1,22 olarak verilmiştir. BOHB, melatonin ve bunların kombinasyonu uygulamaları altındaki KRK organoidlerinin bağıl protein seviyeleri sırasıyla 0,75 ($p<0.05$), 0,70 ve 0,58 ($p<0.01$) olarak ölçülmüştür. Bağıl LDHA protein seviyeleri BOHB+IC10 oksaliplatin ve Melatonin+BOHB+IC10 oksaliplatin gruplarında kontrol grubuna kıyasla dört kattan daha düşüktür, sırasıyla 0,23 ve 0,30 ($p<0.05$). MPC2 protein seviyeleri BOHB, Melatonin ve kombinasyon ajanı uygulamalarında gruplarında sırasıyla 1,07, 1,11 ve 0,93 ($p<0.01$), kontrol grubuna (0,49) kıyasla anlamlı bir artış göstermiştir. PDH4 protein seviyeleri Melatonin+BOHB+IC10 oksaliplatin grubunda diğer gruplara kıyaslandığında anlamlı bir farklanma göze çarpmamıştır. Son olarak, PDK4 protein seviyeleri tüm ajan uygulamalarında benzer sonuçlar sergilemiştir. IC50 oksaliplatin için aynı deneysel tasarım, göreceli LDHA protein seviyeleriyle ilgili benzer sonuçlar sergilemiştir. Spesifik olarak, BOHB+IC10 oksaliplatin ve Melatonin+BOHB+IC10 oksaliplatin uygulamaları altındaki LDHA protein seviyeleri, kontrol gruplarına kıyasla üç kat daha düşük ifade seviyeleri göstermiştir. Bu değerler sırasıyla 0,50 ve 0,56 ($p<0.05$) olarak belirlenmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, BOHB ajanının uygulanan KRK organoidlerindeki azalmış LDHA ifade seviyesi ve artmış MPC2 ifade seviyesi, enerji

metabolizmasını artmış aerobik glikolizden TCA döngüsüne doğru kaydırdığı ortaya konulmuştur.

4.6 Western Blot ile Histon Asetilasyonun Miktarsal Analizi

Histon deasetilaz inhibitörü olarak işlev gören BOHB, H3K27ac protein seviyeleri Western Blotlama yoluyla değerlendirilmiştir. Histon asetilasyonu açık bir kromatin formuna yol açarak oksaliplatinin DNA eklentilerini potansiyel olarak artırabilir. Histon asetilasyon oranı ile DNA hasarına bağlı apoptoz yolu arasındaki ilişkiyi araştırmak için, CC3 ve gH2AX protein seviyeleri incelenmiştir. Western Blot sonuçları Şekil 14'te verilmiştir.



Şekil 14. Histon asetilasyonunun apoptotik yolak üzerindeki rolü. Çeşitli ajan uygulamaları altında hücre ölüm mekanizması ve histon asetilasyonu ile ilgili protein ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler analiz edilmiştir. A) 10 mM BOHB, 200 µM melatonin ve IC10-IC50 oksaliplatin içeren farklı ajan uygulamaları, 1'den 12'ye kadar tanımlanan gruplar şeklinde KRK organoidlerine uygulanmıştır: 1) Melatonin+IC10 Ox, 2) Melatonin+IC50 Ox, 3) Melatonin, 4) BOHB, 5) Melatonin+BOHB, 6) Melatonin+BOHB+IC50 Ox, 7) Melatonin+BOHB+IC10 Ox, 8) BOHB+IC50 Ox, 9) BOHB+IC10 Ox, 10) IC10 Ox, 11) IC50 Ox, 12) Kontrol. CC3, gH2AX ve H3K27ac protein seviyeleri Western Blotlama ile analiz edilmiştir. B) Bar grafikler T8, T9, T10 ve T11 uygulamaları altında CC3, gH2AX ve H3K27ac protein seviyelerini göstermektedir. Protein seviyeleri ImageJ 1.53 kullanılarak ölçülmüş ve normalizasyon tubulin seviyelerine bölünerek elde edilmiştir. Tüm deneyler üç

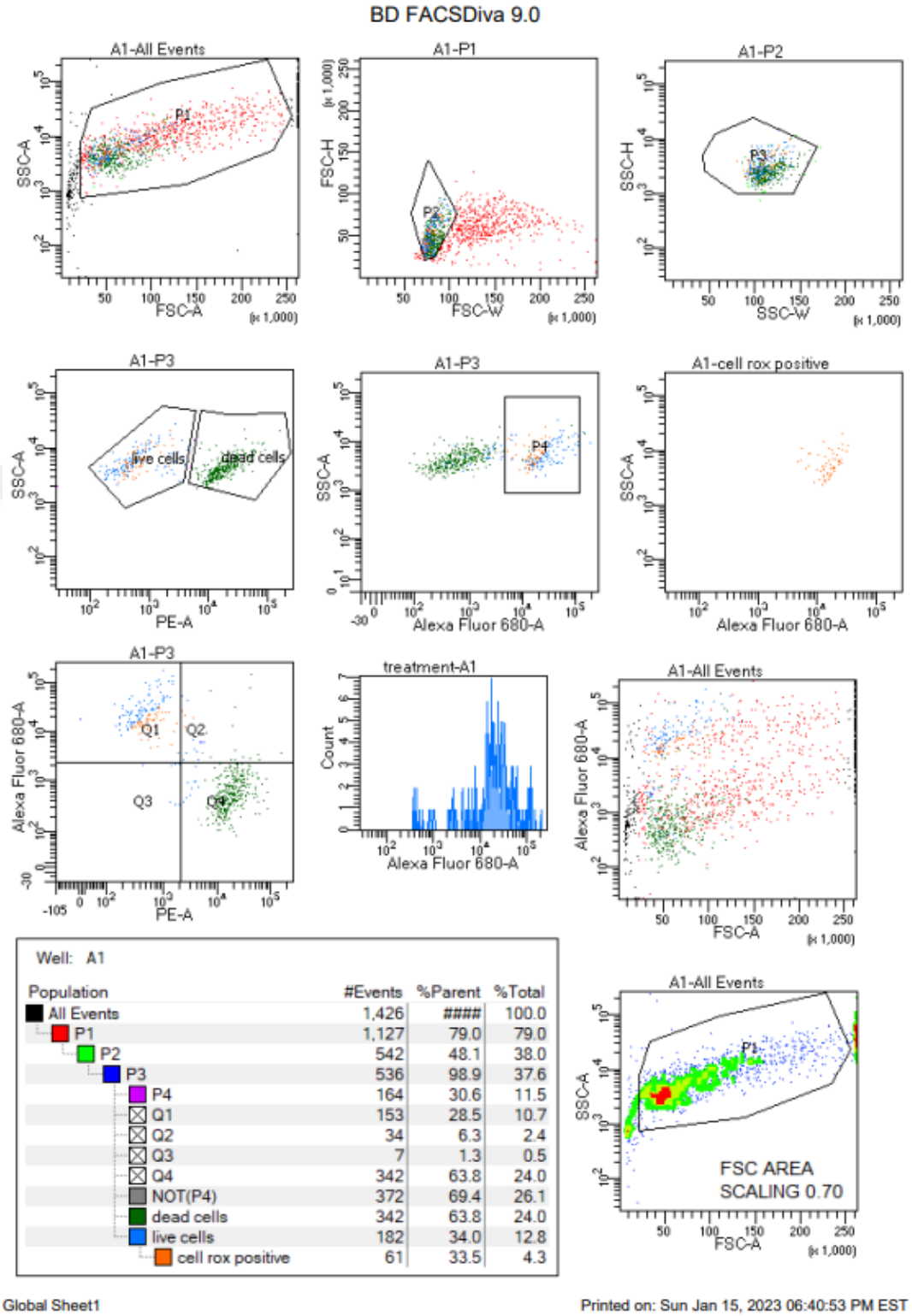
biyolojik ve beş teknik kopya ile gerçekleştirilmiştir. Yıldız işaretleri ajan uygulamalarının istatistiksel önemini göstermektedir (kontrole kıyasla $p < 0.05$).

Veriler incelendiğinde, BOHB+ IC10 ve IC50 oksaliplatin ile muamele edilen KRK organoidlerindeki H3K27ac seviyeleri, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sırasıyla 2,1 ve 2,9 kat artış göstermiştir, ancak bu farklılıklar istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($p > 0.05$). Benzer şekilde, BOHB+ IC10 ve IC50 oksaliplatin ile tek başına IC10 ve IC50 oksaliplatin uygulamaları karşılaştırıldığında CC3 ve gH2AX protein seviyelerinde belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Özellikle, BOHB+oksaliplatin kombine ajan uygulamasında gözlenen en yüksek gH2AX protein seviyelerine yol açmıştır.

Sonuç olaarak, bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı olmadığından, BOHB'nin histon asetilasyonunu arttırarak açık kromatin yapı sunmasıyla oksaliplatin DNA hasarı oluşumu ile apoptotik ölüm yolağını aktive etmediği sonucuna varılmıştır.

4.7 Akış Sitometrisi ile Reaktif Oksijen Türlerinin Miktarsal Analizi

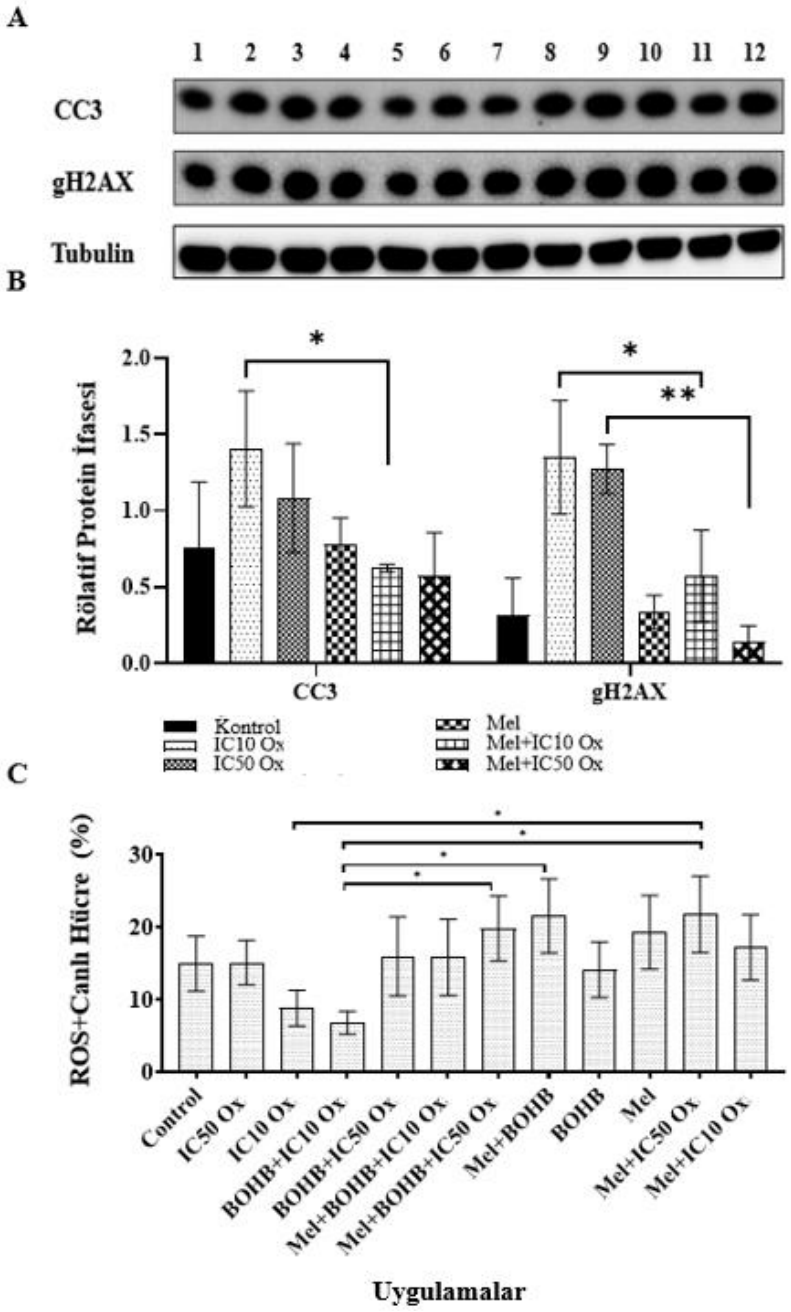
Melatonin, üçlü ajan uygulama gruplarında, BOHB tarafından indüklenen artmış oksaliplatin sitotoksisitesine karşı inhibe edici bir etki yaratmaktadır. Melatoninin kanser hücreleri üzerindeki koruyucu mekanizmasını ve apoptotik yolaktaki potansiyel modülatör rolünü araştırmak için, çalışmada apoptotik belirteç CC3, DNA hasarı belirteci gH2AX ve ROS'un değişen ajan uygulamaları koşulları altındaki miktarı incelenmiştir. Kapılama (gating) stratejisi ve akış sitometrisi sonuçları Şekil 15'te gösterilmiştir. Öncelikle forward ve side scatter kanallarında çalışılmıştır. Belirli boyutlar arasındaki hücre atıkları dışlandıktan sonra (P1-P2-P3) PE kanalı aktifleştirilerek canlı ve ölü hücreler ayrıştırılmıştır. Şekil 15'te yeşil olarak işaretlenmiş hüceler ölü (şekil üzerinde 'dead cells'); diğer hücreler ise canlı (şekil üzerinde 'live cells') olarak işaretlenmiştir. Daha sonra sadece canlı hücrelerin incelendiği panelde (P4) Alexa Fluor 680 kanalı açılarak ROS pozitif hücrelerin olduğu kısım işaretlenmiştir. Böylece sadece canlı hücrelerdeki ROS miktarsal analizi mümkün kılınmıştır.



Şekil 15. Akış sitometrisinde kapılama stratejisi. Organoidlere 96 saat boyunce tekli ve kombine ajanlar uygulandıktan sonra, tek hücre formunda Cytox (PE-A) canlılık ajanı kullanılmıştır. Pozitif hücreler ölü, negatif hücreler canlı olacak şekilde kapılama

gerçekleştirilmiştir. ROS pozitif canlı hücreler Q2 kısmında gösterilecek şekilde ayarlanmıştır.

Apoptoz ve DNA hasarı için yapılan Western Blot analizi sonuçları Şekil 16A'da ve ilgili verilerin grafik gösterimi Şekil 16B'de verilmiştir. Yapılan ROS analizi sonrası, ROS pozitif canlı hücrelerin yüzdeleri bar grafiğe dönüştürülmüştür. Elde edilen veriler üzerinden istatistiksel analizler yapılmıştır. Şekil 16C'de veriler bar grafik formuna çevrilerek gösterilmiştir.



Şekil 16. Melatoninin oksaliplatin ile indüklenen apoptotik hücre ölüm mekanizmasına etkisi. A) 1'den 12'ye kadar numaralandırılan KRK organoidlerine çeşitli ajanlar uygulanmıştır. 10 mM BOHB, 200 μM melatonin ve IC10-IC50 oksaliplatin içeren farklı ajan uygulamaları, 1'den 12'ye kadar tanımlanan gruplar şeklinde KRK organoidlerine uygulanmıştır: 1) Melatonin+IC10 Ox, 2) Melatonin+IC50 Ox, 3) Melatonin, 4) BOHB, 5) Melatonin+BOHB, 6) Melatonin+BOHB+IC50 Ox, 7) Melatonin+BOHB+IC10 Ox, 8) BOHB+IC50 Ox, 9) BOHB+IC10 Ox, 10) IC10 Ox, 11) IC50 Ox, 12) Kontrol. CC3 ve gH2AX protein seviyeleri Western Blotlama ile analiz edilmiştir. B) T1, T2, T3, T10 ve T11 uygulamaları altındaki CC3 ve gH2AX protein seviyeleri bar grafiklerde gösterilmiştir. Protein seviyeleri ImageJ 1.53'de ölçülmüş ve normalizasyon tubulin seviyelerine bölünerek gerçekleştirilmiştir. C) 96 saatlik bir muameleden sonra, toplanan KRK organoidleri tek hücreli bir forma ayrıştırılmış ve hücreler bir ROS tespit kiti ile muamele edilmiştir. Grafik, ROS-pozitif canlı hücrelerin yüzdesini temsil etmektedir. Her muamele, muamele başına on bin olayla bir akış sitometrisi ile ayrı ayrı analiz edilmiştir. Tüm deneyler üç biyolojik ve beş teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Uygulamaların istatistiksel önemi yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*p <0.05, **p <0.01, kontrole kıyasla).

Tüm kombinasyonların ve tekli ajan uygulamalarının canlılık analizine göre, veriler melatoninin BOHB ile arttırılmış oksaliplatin sitotoksisitesinde antagonistik bir rol oynadığı daha önce Şekil 10C ve D'de sunulmuştur. Oksaliplatin+BOHB uygulamalarının tümünde eklenen melatoninin uygulamadan kaynaklı sitotoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir. Canlılık verilerine göre gruplar arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılığa sahip fark saptanmamıştır. Çok sayıda çalışma melatoninin ROS uzaklaştırıcı bir ajan olduğuna işaret etmiştir ve melatonin uygulamasıyla gözlenen azalmış oksaliplatin sitotoksisitesinin altında yatan mekanizmanın bu olduğu düşünülmüştür. Alternatif olarak, melatonin DNA hasarı ve apoptoz yolunu bloke ederek kanser hücrelerinin hayatta kalma kapasitesini artırabilme durumu da değerlendirilmiştir. Apoptotik belirteç CC3'ün göreceli ifade düzeyleri melatonin uygulanan gruplarda 0,78 iken, kontrol grubunda 0,75'tir, ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklanma yoktur (p>0.05). Benzer şekilde, DNA hasarı belirteci gH2AX,

melatoninle muamele edilen ve kontrol gruplarında sırasıyla 0,33 ve 0,31 değerleriyle karşılaştırılabilir rölatif ifade seviyeleri sergilemiştir ve elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. DNA hasarı yoluyla apoptozu indüklediği bilinen oksaliplatin hem IC10 hem de IC50 uygulanan gruplarda yüksek CC3 ve gH2AX rölatif ifade seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir. Şekil 16B'de görüldüğü gibi IC10 oksaliplatin uygulamasıyla CC3 rölatif ifade seviyesi 1,46'ya gH2AX rölatif protein ifade seviyesi ise 1,35'e yükselmiştir. IC50 oksaliplatin uygulamasıyla bu değerler sırasıyla 1,12 ve 1,28'e yükselmiştir. Ajan uygulamasına melatonin eklenmesiyle IC10 oksaliplatin uygulanan gruplardaki CC3 ve gH2AX rölatif protein ifadeleri sırasıyla 0,65 ve 0.52'seviyelerine gerilemiştir ($p<0,05$). IC50 oksaliplatine ek melatonin uygulanan grupta ise bu değerler sırasıyla 0,53 ve 0,20'ye düşerek istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar yakalanmıştır ($p<0,001$). Bu sonuçlar, melatoninin oksaliplatin sitoksisitesine karşı gözlenen koruyucu etkisi için mekanistik bir açıklama sağlamaktadır.

Her uygulama grubunda ROS seviyeleri bir akış sitometresi kullanılarak değerlendirilmiştir. Melatonin ile muamele edilen canlı hücrelerde diğer uygulama gruplarına kıyasla ROS pozitif hücre oranında artış gözlenmiştir. Şekil 16C'de gösterilmiş olan akış sitometrisi çubuk grafiğinden elde edilen sonuçlara göre, en yüksek ROS pozitif canlı hücre oranı sırasıyla %21,77, %21,53 ve %19,80 değerleriyle melatonin+IC50 oksaliplatin, melatonin+BOHB ve melatonin+BOHB+IC50 oksaliplatin ajanlarını içeren uygulamalarda elde edilmiştir. Buna karşılık, BOHB+IC10 oksaliplatin ile muamele edilen grup %6,80 ile en düşük ROS-pozitif canlı hücre oranını sergilemiştir ve bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir ($p<0,05$).

Sonuç olarak, veriler değerlendirildiğinde, melatonin hücreyi ROS etkilerine karşı koruyarak DNA hasar aracılı apoptotik ölüm yolağını inhibe eder ve hücreyi oksaliplatinin sitotoksisitesine karşı korur. Buna ek olarak, BOHB aracılı artmış oksaliplatin sitotoksisitesini de engelleyerek KRK organoidlerini koruduğu gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Tümör hücrelerinin değişen metabolizmasını ele almanın terapötik potansiyeli, kanser tedavisinde önemli ve umut verici bir yoldur. (137,207) Bu çalışma, sağlıklı kolon organoidleri üzerinde neo-adjuvanların sitotoksik olmayan en yüksek konsantrasyonlarını belirlemeyi ve böylece etkin bulunan kombine ajan uygulamasının kliniğe translasyonu gerçekleştiği durumda kanser hastasında herhangi bir ek toksik etkiyi önlemek amaçlanmıştır. Bu amaçla, BOHB için sitotoksik olmayan maksimum 10mM, oksidatif stres koşulları altında güçlü bir hücre koruyucu ajan olan melatonin için ise 200µM olarak bulunmuştur.

Tipik olarak BOHB dolaşımda 0,5mM civarında bulunurken, iki günlük açlığın ardından 2mM' ye (208,209) ve uzun süreli açlık sırasında 8mM'ye kadar yükseldiği bilinmektedir (210). BOHB'nin 10mM'de bile sağlıklı kolon organoidleri üzerinde sitotoksisite göstermemesi dikkat çekicidir. Bu, Dmitrieva-Posocco, O. ve arkadaşları tarafından yakın zamanda yapılan ve BOHB'nin bu konsantrasyonlarda güvenliğini daha da doğrulayan bir çalışma ile uyumludur. Çalışmada 0 ila 25mM arasında değişen BOHB konsantrasyonları uygulanmış ve 10 mM'a kadar sağlıklı kolon organoidleri üzerinde sitotoksik etki gözlenmemiştir. Bununla birlikte, 15 mM ve daha yüksek konsantrasyonlar sağlıklı kolon organoidleri üzerinde sitotoksisiteye neden olmuştur. Bu bulgu, mevcut araştırmanın sonuçlarıyla uyumludur (205).

Bu çalışmada apoptoza yol açan BOHB aracılı oksidatif stresi aydınlatmak için melatonin kullanılmıştır. Melatonin, kombinasyon uygulamasında kullanılan 200µM'a kadar olan konsantrasyonlarda sağlıklı kolon organoidleri üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir. Guangyu Ji. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, melatonin çok çeşitli kolon kanseri hatlarında 1 mM'de sitotoksisite sergilemiştir. Daha önceki çalışmalar iki boyutlu kültür sistemlerinde ve kanser hücre hatları üzerinde gerçekleştirilmiştir; bu nedenle, bu araştırmada ilk kez üç boyutlu ve sağlıklı kolon organoid kültürlerinde melatoninin sitotoksik olmayan konsantrasyonu belirlenmiştir (211–213). Tekli ve kombinasyon uygulamalarında, 10mM BOHB+IC10 oksaliplatin ve 7,5mM ve 10mM BOHB+IC50 oksaliplatin, KRK organoid kültürü üzerinde yalnızca oksaliplatin ile yapılan muameleye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir gelişmiş sitotoksik etki göstermiştir.

Melatonin ve oksaliplatin ile ikili ajan uygulanan gruplarda sitotoksik etkide anlamlı bir fark oluşmazken, melatonin BOHB'nin aracılık ettiği oksaliplatinin artmış sitotoksisitesini nötralize etmiştir. Toplu olarak, bu bulgular BOHB'nin oksaliplatin ile kombinasyon uygulamalarında kullanılma potansiyeline ışık tutmaktadır ve bu da daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir. Bu çalışma, bu kombine ajan uygulamalarının KRK üzerindeki etkilerini araştırmak için zemin hazırlayarak terapötik potansiyellerini anlamada önemli bir adım oluşturmaktadır. Bu çalışma, BOHB'nin oksaliplatin ile birlikte KRK üzerindeki etkisini değerlendiren ilk çalışmadır.

Oksaliplatin sitotoksisitesinin gözlenen artışına birden fazla faktör katkıda bulunabilir. Bir olasılık, BOHB'nin glikolitik yolu baskılaması ve böylece Warburg etkisini engellemesidir. Ayrıca, BOHB bir asetil-KoA kaynağı olarak kullanıldığından, potansiyel olarak TCA döngüsünde bir artışa neden olabilir ve böylece elektron taşıma zinciri bileşenleri tarafından üretilen ROS hacmini artırabilir. Bu da yüksek ROS seviyelerine katkıda bulunarak oksaliplatin toksisitesini artırmış olabilir. Son olarak, BOHB'nin bir histon deasetilaz inhibitörü olarak bilinen rolü göz önüne alındığında, açık bir kromatin yapısının oluşumu yoluyla oksaliplatinin DNA bağlanma potansiyelini teşvik ederek kanser hücrelerini apoptoza doğru itebilir.

Aerobik glikoliz veya Warburg etkisindeki kilit unsurlardan biri, elektron alıcısı NAD+'yi yeniden üreten ve kanser terapötikleri için cazip bir hedef olarak kabul edilen LDHA'dır (82). Bu çalışma, BOHB'nin LDHA ve MPC2 protein seviyelerini kontrol grubuna kıyasla azalttığını göstermiş, bu da BOHB'nin enerji metabolizmasını TCA döngüsü yoluyla yönlendirebileceğini düşündürmüştür.

Bader D. A ve arkadaşları tarafından prostat kanserinde TCA döngüsü ve MPC proteininin işlevi arasında bir bağlantı sunulmasına rağmen, daha önce hiçbir araştırma BOHB ve LDHA-MPC2 proteinleri arasındaki ilişkiyi incelememiştir (214). BOHB'nin enerji yollarını etkileyebileceğine dair belirtilere rağmen, önceki araştırmalar meme kanseri hücre hatlarında terapötik etkinliği etkilediğine dair hiçbir kanıt bulamamıştır (215). Başka bir araştırma, LDHA'nın inhibe edilmesinin belirli lenfoma hücre hatlarında tümör ilerlemesinin oksidatif stres aracılı baskılanmasına yol açtığı yönünde ilişkili sonuçlar göstermiştir (216).

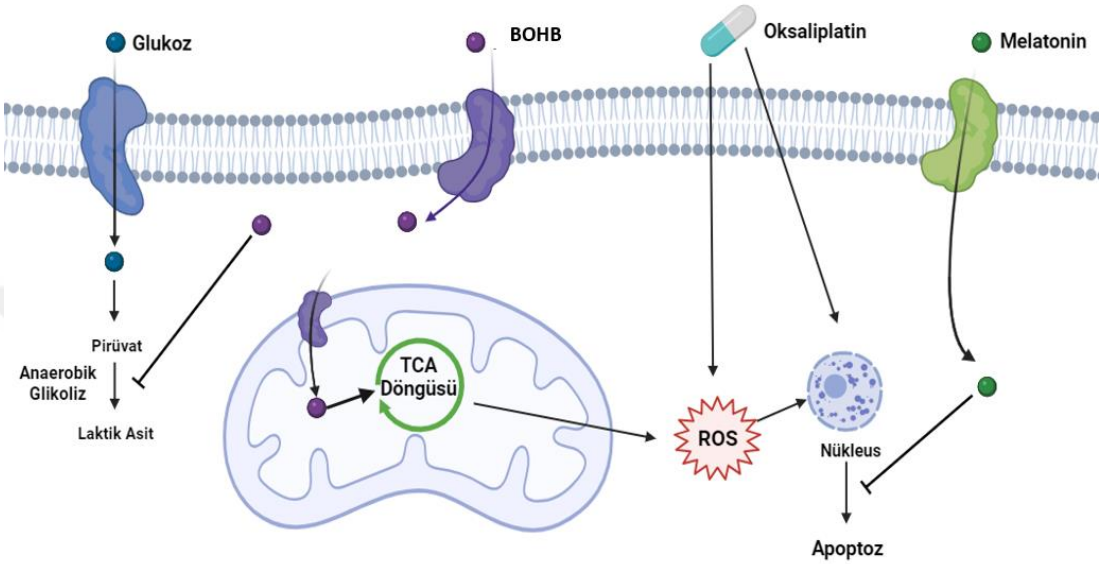
Bu çalışmadaki ROS ölçümleri, BOHB ile muamele edilen grupların uygulama sonunda en düşük ROS seviyelerine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Hücre canlılığı sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, artan toksisitenin ROS'a bağlı olabileceği görülmektedir. Chen W. ve arkadaşları tarafından yakın zamanda yayınlanan bir çalışma, oksaliplatin sitotoksik etkisinin *in vitro* ve *in vivo* olarak piperlongumine ile oksidatif stresin arttırılmasıyla yükseldiğini göstermiştir. Bu çalışma, mekanik olarak oksidatif stresin KRK hücrelerinde oksaliplatin sitotoksisitesine katkıda bulunduğu yönündeki araştırmamızla ilişkilidir (166).

Çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışma melatoninin proteinler, lipidler ve DNA'da oksidatif strese bağlı hasarı azaltabildiğini göstermiştir (183). Bu çalışmada melatoninin bu antioksidatif özelliğinden yararlanılarak, melatonin ile muamele edilen grupların ROS pozitif canlı hücrelerin en yüksek yüzdelerini gösterdiği bulunmuştur. Bu bulgu, melatoninin yüksek oksidatif stres altında hücreleri ölüm mekanizmalarından koruyarak koruyucu bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu düşünceyi daha da destekleyen DNA hasarı belirteci gH2AX ve apoptotik belirteç CC3 seviyeleri, melatonin ve oksaliplatin ile muamele edilen hücrelerde, sadece oksaliplatin ile muamele edilenlere kıyasla daha düşüktü. Bu, melatoninin DNA hasarı aracılı apoptozu inhibe etme ve oksaliplatin toksisitesine karşı koruma potansiyelinin göstergesidir.

Buna paralel olarak, Waseem, M ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, melatoninin insan SYSY-5Y nöroblastoma hücre hattında oksaliplatin kaynaklı mitokondriyal stres ve apoptotik hücre ölümüne karşı koruyucu bir etki gösterdiği bulunmuştur (217). Başka bir araştırmada, melatoninin 5-florourasil ile kombinasyon halinde, hücresel prion proteini-Oct4 ekseni düzenlemesi yoluyla kolon kanserinde kök hücreleri baskıladığı ortaya konmuştur (218). Birkaç çalışma melatoninin KRK hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini belgelemiştir, ancak bunların oldukça yüksek olan ve hücre canlılığı üzerinde hedef dışı etkilere neden olabilecek 1-5 mM arasında değişen konsantrasyonlar kullandığına dikkat edilmelidir (204).

Ayrıca, BOHB bir histon deasetilaz inhibitörü olarak tanınmaktadır. Bu özellik, asetillenmiş DNA'nın genellikle daha açık bir kromatin formu sergilediği göz önüne alındığında, oksaliplatinin DNA eklentisi oluşumunu potansiyel olarak artırabilir (219). H3K27ac protein seviyelerinde üç kat artış gözlemlenmesine rağmen,

istatistiksel anlamlılık yakalanamamıştır. İlginç bir şekilde, mevcut araştırmalar BOHB'nin bir insan hepatoselüler karsinom hücre hattı olan HEPG2 hücre hattında HDAC/survivin eksenini inhibe ederek sisplatin sitotoksisitesini nasıl artırabileceğini göstermektedir (220).



Şekil 17. Kolorektal kanserde BOHB'ın oksaliplatinin sitotoksik etkisini attırma mekanizması. (TCA: Trikarboksilik Asit, ROS: Reaktif Oksijen Türleri, BOHB: Beta hidroksibütirat)

Sonuç olarak, Şekil 17'de özetlendiği gibi, BOHB uygulamasının neden olduğu enerji metabolizmasındaki değişiklik, ROS seviyelerinde bir artışa yol açarak oksaliplatin uygulamasının KRK organoidleri üzerindeki etkinliğini artırmıştır. Melatonin, BOHB uygulaması ile indüklenen yüksek oksidatif stres koşulları altında DNA hasarını inhibe ederek ve apoptotik yolları teşvik ederek bu gelişmiş oksaliplatin sitotoksisitesine karşı koymuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kolorektal kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak kanser hücrelerinin mitokondriyal metabolizmasının hedeflenmesi son zamanlarda ilgi odağı haline gelmiştir. Kolorektal kanser hücreleri, Warburg etkisi olarak bilinen aerobik glikolize artan bağımlılık da dahil olmak üzere hücresel metabolizmalarında değişiklikler sergiler. Bu yaklaşımlardan biri ketojenik diyet ve keton cisimcikleri ile artmış aerobik glikolizin kanser hücrelerine sunduğu avantajları ortadan kaldırmaktır. Bu keton cisimciklerinden en yaygın bulunanı BOHB'nin son zamanlarda KRK'yi baskılayıcı özellikler ortaya koyduğu bildirilmiştir ancak enerji metabolizması üzerine olabilecek etkisi araştırılmamıştır. Bu çalışmanın nihai amacı KRK tedavisinde yaygın kullanıma sahip olan oksaliplatin kemoterapötik ajanının kanser hücreleri üzerinde yarattığı sitotoksik etkiyi sağlıklı hücrelere ek bir sitotoksisite yaratmadan arttırmaktır.

Oksaliplatin ajanı ile kombine olarak uygulanan BOHB, KRK organoidleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksisite artışıyla sonuçlanmıştır. Bu sitotoksisite artışından sorumlu mekanizmanın, aerobik glikolizdeki azalış ve artmış mitokondriyal aktivite sebebiyle üretilen ROS miktarındaki değişim olduğu bu tezde kanıtlanmıştır.

BOHB ve oksaliplatin arasındaki sinerjistik etkileşimleri tanımlayan bu çalışma, terapötik sonuçları en üst düzeye çıkarmak ve potansiyel yan etkileri en aza indirmek için yeni ilaç kombinasyonlarını keşfetmenin önemini vurgulamaktadır. Bu, KRK hastaları için daha kişiselleştirilmiş ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yol açabilir ve sonuçta genel prognozlarını ve yaşam kalitelerini iyileştirebilir.

BOHB'nin enerji metabolizması üzerindeki etkisinin arkasındaki mekanizmaları ve klinik ortamlarda potansiyel uygulanabilirliğini tam olarak aydınlatmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulsa da sunulan çalışma kanser tedavisinde gelecekteki araştırmalara kaynak olacaktır. Bu çalışmanın sonuçları, BOHB'nin KRK için mevcut terapötik protokollere dahil edilmesini araştırmak için zorlayıcı bir gerekçe sağlamakta ve kansere karşı devam eden mücadelede yenilikçi ilaç kombinasyonlarını keşfetmenin önemini vurgulamaktadır. Kanser biyolojisi ve metabolizmasının inceliklerini çözmeye devam ederken, bu keşifler onkolojinin geleceğini şekillendirmek ve hasta sonuçlarını iyileştirmek için umut vadetmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, vd. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-249.

2. Hsieh JS, Lin SR, Chang MY, Chen FM, Lu CY, Huang TJ, vd. APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: Correlation to clinicopathologic features and postoperative surveillance. Am Surg. 2005;71(4):336-43.

3. Fink D, Zheng H, Nebel S, Norris PS, Aebi S, Lin TP, vd. In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. Cancer Res. 1997;57(10):1841-5.

4. Senesse P, Leichtnam-Dugarin L, Bécouarn Y, Bey P, Brusco S, Carretier J, vd. Comprendre le cancer du rectum information à l'usage des personnes malades et de leurs proches. Bulletin du Cancer. 2006;93(2):179-91.

5. Díaz-Rubio E, Sastre J, Zaniboni A, Labianca R, Cortés-Funes H, De Braud F, vd. Oxaliplatin as single agent in previously untreated colorectal carcinoma patients: A phase II multicentric study. Ann Oncol. 1998;9(1):105-8.

6. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, vd. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. J Clin Oncol. 2000;18(16):2938-47.

7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.

8. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? Trends Biochem Sci. 2016;41(3):211-218.

9. El Sayed SM, Mahmoud AA, El Sawy SA, Abdelaal EA, Fouad AM, Yousif RS, vd. Warburg effect increases steady-state ROS condition in cancer cells through decreasing their antioxidant capacities (Anticancer effects of 3-bromopyruvate through antagonizing Warburg effect). Med Hypotheses.

2013;81(5):866-70.

10. Parker BA, Walton CM, Carr ST, Andrus JL, Cheung ECK, Duplisea MJ, vd. β-hydroxybutyrate elicits favorable mitochondrial changes in skeletal muscle. Int J Mol Sci. 2018 ;19(8):2247.

11. Reiter RJ, Ma Q, Sharma R. Melatonin in mitochondria: Mitigating clear and present dangers. Physiology. 2020;35(2):86-95.

12. Corrò C, Novellasdemunt L, Li VSW. A brief history of organoids. Am J Physiol Cell Physiol. 2020;319(1):C151-C165.

13. Papamichael D, Audisio RA, Glimelius B, de Gramont A, Glynne-Jones R, Haller D, vd. Treatment of colorectal cancer in older patients: International Society of Geriatric Oncology (SIOG) consensus recommendations. Ann Oncol. 2015;26(3):463-76.

14. Triantafillidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: Epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. Anticancer Res. 2009;29(7):2727-37.

15. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Eheman C, Zauber AG, Anderson RN, vd. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. Cancer. 2010;116(3):544-73.

16. Navarro M, Nicolas A, Ferrandez A, Lanas A. Colorectal cancer population screening programs worldwide in 2016: An update. World J Gastroenterol. 2017;23(20):3632-3642.

17. Morson BC. The evolution of colorectal carcinoma. Clin Radiol. 1984;35(6):425-31.

18. Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD, vd. Colorectal cancer screening: Clinical guidelines and rationale. Gastroenterology. 1997;112(2):594-642.

19. Ciccolallo L, Capocaccia R, Coleman MP, Berrino F, Coebergh JWW, Damhuis RAM, vd. Survival differences between European and US patients with colorectal cancer: Role of stage at diagnosis and surgery. Gut. 2005;54(2):268-73.

20. Garcia-Etxebarria K, Clos-Garcia M, Telleria O, Nafría B, Alonso C, Iruarrizaga-Lejarreta M, vd. Interplay between genome, metabolome and microbiome in colorectal cancer. Cancers (Basel). 2021;13(24):6216.

21. Keum NN, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. 2019;16(12):713-732.

22. Viale PH. The American Cancer Society's Facts & Figures: 2020 Edition. J Adv Pract Oncol. 2020;11(2):135-136.

23. Willett CG, Chang D, Czito B, Meyer J, Wo J. Oncology scan--gastrointestinal cancers. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2013;87(5):861-3.

24. Messersmith WA. NCCN Guidelines Updates: Management of Metastatic Colorectal Cancer. J Natl Compr Canc Netw. 2019;17(5.5):599-601

25. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. Signal Transduct Target Ther. 2020;5(1):22.

26. Driver JA, Gaziano JM, Gelber RP, Lee IM, Buring JE, Kurth T. Development of a Risk Score for Colorectal Cancer in Men. Am J Med. 2007;120(3):257-63.

27. Steele SR, Park GE, Johnson EK, Martin MJ, Stojadinovic A, Maykel JA, vd. The impact of age on colorectal cancer incidence, treatment, and outcomes in an equal-access health care system. Dis Colon Rectum. 2014;57(3):303-10.

28. Irby K, Anderson WF, Henson DE, Devesa SS. Emerging and widening colorectal carcinoma disparities between Blacks and Whites in the United States (1975-2002). Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;15(4):792-7.

29. Ellis L, Abrahão R, McKinley M, Yang J, Somsouk M, Le Marchand L, vd.

Colorectal Cancer Incidence Trends by Age, Stage, and Racial/Ethnic Group in California, 1990-2014. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2018;27(9):1011-1018.

30. Demb J, Earles A, Martínez ME, Bustamante R, Bryant AK, Murphy JD, vd. Risk factors for colorectal cancer significantly vary by anatomic site. BMJ Open Gastroenterol. 2019;6(1):e000313.

31. Thornton JG, Morris AM, Thornton JD, Flowers CR, McCashland TM. Racial variation in colorectal polyp and tumor location. J Natl Med Assoc. 2007;99(7):723-8.

32. Y Peterson C. Risk Factors for Colorectal Cancer. MOJ Surg. 2015;2(2):37-42.

33. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, vd. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. Cancer Causes Control. 2013;24(6):1207-22.

34. Katsidzira L, Gangaidzo IT, Makunike-Mutasa R, Manyanga T, Matsena-Zingoni Z, Thomson S, vd. A case-control study of risk factors for colorectal cancer in an African population. Eur J Cancer Prev. 2019;28(3):145-150.

35. Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. Metabolism. 2019;92:121-135.

36. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. Med Sci (Basel). 2018;6(2):31.

37. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. Int J Mol Sci. 2020;22(1):130.

38. Nguyen HT, Duong HQ. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. Oncol Lett. 2018;16(1):9-18.

39. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, vd. Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med. 1988;319(9):525-32.

40. Pickhardt PJ, Kim DH, Pooler BD, Hinshaw JL, Barlow D, Jensen D, vd. Assessment of volumetric growth rates of small colorectal polyps with CT colonography: a longitudinal study of natural history. Lancet Oncol. 2013;14(8):711-20.

41. Koveitypour Z, Panahi F, Vakilian M, Peymani M, Seyed Forootan F, Nasr Esfahani MH, vd. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. Cell Biosci. 2019;9:97.

42. Ahmad R, Singh JK, Wunnava A, Al-Obeed O, Abdulla M, Srivastava SK. Emerging trends in colorectal cancer: Dysregulated signaling pathways (Review). Int J Mol Med. 2021;47(3):14.

43. Barbosa R, Acevedo LA, Marmorstein R. The MEK/ERK Network as a Therapeutic Target in Human Cancer. Mol Cancer Res. 2021;19(3):361-374.

44. Jeong WJ, Ro EJ, Choi KY. Interaction between Wnt/β-catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of β-catenin and RAS by targeting the Wnt/β-catenin pathway. NPJ Precis Oncol. 2018;2(1):5.

45. Saletti P, Molinari F, De Dosso S, Frattini M. EGFR signaling in colorectal cancer: a clinical perspective. Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy. 2015;5:21-38

46. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. Int J Mol Sci. 2020;22(1):130.

47. Świerczyński M, Szymaszkiewicz A, Fichna J, Zielińska M. New insights into molecular pathways in colorectal cancer: Adiponectin, interleukin-6 and opioid signaling. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2021;1875(1):188460.

48. Narayanankutty A. PI3K/ Akt/ mTOR Pathway as a Therapeutic Target for Colorectal Cancer: A Review of Preclinical and Clinical Evidence. Curr Drug

Targets. 2019;20(12):1217-1226.

49. Kaya Temiz T, Altun A, Turgut NH, Balcı E. Investigation of the effects of drugs effective on PI3K-AKT signaling pathway in colorectal cancer alone and in combination. Cumhur Med J. 2014; 36: 167-177

50. Castel P, Toska E, Engelman JA, Scaltriti M. The present and future of PI3K inhibitors for cancer therapy. Nat Cancer. 2021;2(6):587-597.

51. Jung B, Staudacher JJ, Beauchamp D. Transforming Growth Factor β Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. Gastroenterology. 2017;152(1):36-52.

52. Levy L, Hill CS. Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF-{beta}) target genes and distinguishes TGF-{beta}-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. Mol Cell Biol. 2005;25(18):8108-25.

53. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. J Gen Physiol. 1927;8(6):519-30.

54. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? Nat Rev Cancer. 2004;4(11):891-9.

55. Neitzel C, Demuth P, Wittmann S, Fahrer J. Targeting Altered Energy Metabolism in Colorectal Cancer: Oncogenic Reprogramming, the Central Role of the TCA Cycle and Therapeutic Opportunities. Cancers (Basel). 2020;12(7):1731.

56. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. Genes Dev. 2009;23(5):537-48.

57. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. Cell Metab. 2008;7(1):11-20.

58. Lyssiotis CA, Kimmelman AC. Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment. Trends in Cell Biology. 2017;27(11):863-875.

59. Weinhouse S. The Warburg hypothesis fifty years later. Zeitschrift für Krebsforschung und Klinische Onkologie. 1976;87(2):115-26.

60. Wei TT, Lin YT, Tang SP, Luo CK, Tsai CT, Shun CT, vd. Metabolic targeting of HIF-1α potentiates the therapeutic efficacy of oxaliplatin in colorectal cancer. Oncogene. 2020;39(2):414-427.

61. La Vecchia S, Sebastián C. Metabolic pathways regulating colorectal cancer initiation and progression. Seminars in Cell and Developmental Biology. 2020;98:63-70.

62. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.

63. Ward PS, Thompson CB. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. Cancer Cell. 2012;21(3):297-308.

64. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. Nat Commun. 2020;11(1):102.

65. Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. Mini Rev Med Chem. 2009;9(9):1084-101.

66. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. Cell Metab. 2006;3(3):187-97.

67. Nagao A, Kobayashi M, Koyasu S, Chow CCT, Harada H. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. Int J Mol Sci. 2019;20(2):238.

68. Manzat Saplacan RM, Balacescu L, Gherman C, Chira RI, Craiu A, Mircea PA, vd. The Role of PDGFs and PDGFRs in Colorectal Cancer. Mediators Inflamm. 2017;17:4708076.

69. Rasheed S, Harris AL, Tekkis PP, Turley H, Silver A, McDonald PJ, vd.

Hypoxia-inducible factor-1α and -2α are expressed in most rectal cancers but only hypoxia-inducible factor-1α is associated with prognosis. Br J Cancer. 2009;100(10):1666-73.

70. Jokilehto T, Jaakkola PM. The role of HIF prolyl hydroxylases in tumour growth. J Cell Mol Med. 2010;14(4):758-70.

71. Bricker DK, Taylor EB, Schell JC, Orsak T, Boutron A, Chen YC, vd. A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, Drosophila, and humans. Science. 2012;337(6090):96-100.

72. Schell JC, Olson KA, Jiang L, Hawkins AJ, VanVranken JG, Xie J, vd. A role for the mitochondrial pyruvate carrier as a repressor of the Warburg effect and colon cancer cell growth. Mol Cell. 2014;56(3):400-413.

73. Chekulayev V, Mado K, Shevchuk I, Koit A, Kaldma A, Klepinin A, vd. Metabolic remodeling in human colorectal cancer and surrounding tissues: alterations in regulation of mitochondrial respiration and metabolic fluxes. Biochem Biophys Rep. 2015;4:111-125.

74. Sun X, Zhan L, Chen Y, Wang G, He L, Wang Q, vd. Increased mtDNA copy number promotes cancer progression by enhancing mitochondrial oxidative phosphorylation in microsatellite-stable colorectal cancer. Signal Transduct Target Ther. 2018 Mar 30;3:8.

75. Feng S, Xiong L, Ji Z, Cheng W, Yang H. Correlation between increased copy number of mitochondrial DNA and clinicopathological stage in colorectal cancer. Oncol Lett. 2011;2(5):899-903.

76. Vellinga TT, De Boer VCJ, Fatrai S, Van Schelven S, Trumpi K, Verheem A, vd. SIRT1/PGC1α-Dependent Increase in Oxidative Phosphorylation Supports Chemotherapy Resistance of Colon Cancer. Clin Cancer Res. 2015;21(12):2870-9.

77. Denise C, Paoli P, Calvani M, Taddei ML, Giannoni E, Kopetz S, vd. 5-fluorouracil resistant colon cancer cells are addicted to OXPHOS to survive and enhance stem-like traits. Oncotarget. 2015;6(39):41706-21.

78. Hirpara J, Eu JQ, Tan JKM, Wong AL, Clement MV, Kong LR, vd. Metabolic reprogramming of oncogene-addicted cancer cells to OXPHOS as a mechanism of drug resistance. Redox Biol. 2019;25:101076.

79. van Osch FHM, Voets AM, Schouten LJ, Gottschalk RWH, Simons CCJM, van Engeland M, vd. Mitochondrial DNA copy number in colorectal cancer: between tissue comparisons, clinicopathological characteristics and survival. Carcinogenesis. 2015;36(12):1502-10.

80. Rebane-Klemm E, Truu L, Reinsalu L, Puurand M, Shevchuk I, Chekulayev V, vd. Mitochondrial Respiration in *KRAS* and *BRAF* Mutated Colorectal Tumors and Polyps. Cancers (Basel). 2020;12(4):815.

81. Fritsche-Guenther R, Zasada C, Mastrobuoni G, Royla N, Rainer R, Roßner F, vd. Alterations of mTOR signaling impact metabolic stress resistance in colorectal carcinomas with BRAF and KRAS mutations. Sci Rep. 2018;8(1):9204.

82. Warburg O. On the origin of cancer cells. Science. 1956;123(3191):309-14.

83. BURK D, SCHADE AL. On respiratory impairment in cancer cells. Science. 1956;124(3215):270-2.

84. Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. Science. 2010;330(6009):1340-4.

85. Fisel P, Schaeffeler E, Schwab M. Clinical and Functional Relevance of the Monocarboxylate Transporter Family in Disease Pathophysiology and Drug Therapy. Clin Transl Sci. 2018;11(4):352-364.

86. Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. J Physiol. 2021;599(6):1745-1757.

87. Maffione AM, Lopci E, Bluemel C, Giammarile F, Herrmann K, Rubello D. Diagnostic accuracy and impact on management of (18)F-FDG PET and PET/CT in colorectal liver metastasis: a meta-analysis and systematic review. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2015;42(1):152-63.

88. Chung JK, Lee YJ, Kim C, Choi SR, Kim M, Lee K, vd. Mechanisms related to [18F]fluorodeoxyglucose uptake of human colon cancers transplanted in nude mice. J Nucl Med. 1999;40(2):339-46.

89. Furlan D, Sahnane N, Carnevali I, Cerutti R, Uccella S, Bertolini V, vd. Up-regulation and stabilization of HIF-1alpha in colorectal carcinomas. Surg Oncol. 2007 Dec;16 Suppl 1:S25-7.

90. Ho N, Coomber BL. Hexokinase II expression is correlated with colorectal cancer prognosis. Cancer Treat Commun. 2016;6(1):11-16.

91. Martins SF, Amorim R, Viana-Pereira M, Pinheiro C, Costa RFA, Silva P, vd. Significance of glycolytic metabolism-related protein expression in colorectal cancer, lymph node and hepatic metastasis. BMC Cancer. 2016;16:535.

92. Graziano F, Ruzzo A, Giacomini E, Ricciardi T, Aprile G, Loupakis F, vd. Glycolysis gene expression analysis and selective metabolic advantage in the clinical progression of colorectal cancer. Pharmacogenomics J. 2017;17(3):258-264.

93. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Simopoulos C, Polychronidis A, Sivridis E. Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. Clin Exp Metastasis. 2005;22(1):25-30.

94. Fang S, Fang X. Advances in glucose metabolism research in colorectal cancer. Biomed Rep. 2016;5(3):289-295.

95. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. Lancet. 2019;394(10207):1467-1480.

96. Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. Nature. 2019;575(7782):299-309.

97. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. Nat Rev Cancer. 2013;13(10):714-26.

98. Wang Y, Zhang D, Li Y, Fang F. MiR-138 Suppresses the PDK1 Expression to

Decrease the Oxaliplatin Resistance of Colorectal Cancer. Onco Targets Ther. 2020;13:3607-3618.

99. Li H, Chen JH, Liu J, Lai Y, Huang S, Zheng L, vd. CPT2 downregulation triggers stemness and oxaliplatin resistance in colorectal cancer via activating the ROS/Wnt/β-catenin-induced glycolytic metabolism. Exp Cell Res. 2021;409(1):112892.

100. Ma YS, Yang IP, Tsai HL, Huang CW, Juo SH, Wang JY. High glucose modulates antiproliferative effect and cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colon cancer cells. DNA Cell Biol. 2014;33(2):64-72.

101. Draoui N, Schicke O, Seront E, Bouzin C, Sonveaux P, Riant O, vd. Antitumor activity of 7-aminocarboxycoumarin derivatives, a new class of potent inhibitors of lactate influx but not efflux. Mol Cancer Ther. 2014;13(6):1410-8.

102. Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. Dysregulated pH: Antitumor activity of 7-aminocarboxycoumarin derivatives, a new class of potent inhibitors of lactate influx but not efflux. Mol Cancer Ther. 2014 Jun;13(6):1410-8.

103. Breedveld P, Pluim D, Cipriani G, Dahlhaus F, Van Eijndhoven MAJ, De Wolf CJF, vd. The effect of low pH on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, methotrexate diglutamate, folic acid, mitoxantrone, topotecan, and resveratrol in in vitro drug transport models. Mol Pharmacol. 2007 Jan;71(1):240-9.

104. Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P, Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. Pharmacol Ther. 2020;206:107447.

105. Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, vd. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. Cancer Res. 2005;65(2):613-21.

106. Liu X, Zhang Y, Lu W, Han Y, Yang J, Jiang W, vd. Mitochondrial TXNRD3 confers drug resistance via redox-mediated mechanism and is a potential therapeutic target in vivo. Redox Biol. 2020;36:101652.

107. Xu H, Zeng Y, Liu L, Gao Q, Jin S, Lan Q, vd. PRL-3 improves colorectal cancer cell proliferation and invasion through IL-8 mediated glycolysis metabolism. Int J Oncol. 2017;51(4):1271-1279.

108. Liang J, Cao R, Wang X, Zhang Y, Wang P, Gao H, vd. Mitochondrial PKM2 regulates oxidative stress-induced apoptosis by stabilizing Bcl2. Cell Res. 2017;27(3):329-351.

109. Roberts DJ, Miyamoto S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Akting on mitochondria and TORCing to autophagy. Cell Death Differ. 2015;22(2):248-57.

110. Wang T, Ning K, Sun X, Zhang C, Jin L fang, Hua D. Glycolysis is essential for chemoresistance induced by transient receptor potential channel C5 in colorectal cancer. BMC Cancer. 2018;18(1):207.

111. Barnes EME, Xu Y, Benito A, Herendi L, Siskos AP, Aboagye EO, vd. Lactic acidosis induces resistance to the pan-Akt inhibitor uprosertib in colon cancer cells. Br J Cancer. 2020;122(9):1298-1308.

112. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:7432797.

113. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chem Biol Interact. 2014;224:164-75.

114. Wang Y, Chen Y, Zhang X, Lu Y, Chen H. New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. Journal of Functional Foods. 2020;75:104248

115. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. Physiol Rev. 2014;94(2):329-54.

116. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000;408(6809):239-47.

117. Vargas-Robles H, Castro-Ochoa KF, Citalán-Madrid AF, Schnoor M. Beneficial effects of nutritional supplements on intestinal epithelial barrier functions in experimental colitis models *in vivo*. World J Gastroenterol. 2019;25(30):4181-4198.

118. Hossen I, Hua W, Ting L, Mehmood A, Jingyi S, Duoxia X, Yanping C, Hongqing W, Zhipeng G, Kaiqi Z, Fang Y, Junsong X. Phytochemicals and inflammatory bowel disease: a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2020;60(8):1321-1345.

119. He F, Antonucci L, Karin M. NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer. Carcinogenesis. 2020;41(4):405-416.

120. He F, Antonucci L, Yamachika S, Zhang Z, Taniguchi K, Umemura A, vd. NRF2 activates growth factor genes and downstream AKT signaling to induce mouse and human hepatomegaly. J Hepatol. 2020;72(6):1182-1195.

121. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. Int J Mol Sci. 2020;21(13):4777.

122. Harris IS, DeNicola GM. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. Trends Cell Biol. 2020;30(6):440-451.

123. Lee DY, Song MY, Kim EH. Role of Oxidative Stress and Nrf2/KEAP1 Signaling in Colorectal Cancer: Mechanisms and Therapeutic Perspectives with Phytochemicals. Antioxidants (Basel). 2021;10(5):743.

124. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. Free Radic Res. 2010;44(5):479-96.

125. Georgieva E, Ivanova D, Zhelev Z, Bakalova R, Gulubova M, Aoki I. Mitochondrial dysfunction and redox imbalance as a diagnostic marker of “free radical diseases”. Anticancer Research. 2017;37 (10) 5373-5381;

126. Meng Y, Chen CW, Yung MMH, Sun W, Sun J, Li Z, vd. DUOXA1-mediated

ROS production promotes cisplatin resistance by activating ATR-Chk1 pathway in ovarian cancer. Cancer Lett. 2018;428:104-116.

127. Zaidieh T, Smith JR, Ball KE, An Q. ROS as a novel indicator to predict anticancer drug efficacy. BMC Cancer. 2019;19(1):1224.

128. Basak D, Uddin MN, Hancock J. The Role of Oxidative Stress and Its Counteractive Utility in Colorectal Cancer (CRC). Cancers (Basel). 2020;12(11):3336.

129. Burwaiss A, Ammar M, Alghazeer R, Eljamil A, Alarbie D, Elghmasi S, vd. Tissue levels of oxidative stress markers and antioxidants in colorectal cancer patients. Main Gr Chem. 2022;21(2):1-9

130. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2003 Oct;3(10):721-32.

131. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. Nat Rev Drug Discov. 2010;9(6):447-64.

132. Tennant DA, Durán RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2010;10(4):267-77.

133. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2011;11(6):393-410.

134. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. Nat Rev Drug Discov. 2011;10(9):671-84.

135. Anderson RG, Ghiraldeli LP, Pardee TS. Mitochondria in cancer metabolism, an organelle whose time has come? Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2018;1870(1):96-102.

136. Jones NP, Schulze A. Targeting cancer metabolism--aiming at a tumour's sweet-spot. Drug Discov Today. 2012;17(5-6):232-41.

137. Luengo A, Gui DY, Vander Heiden MG. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. Cell Chem Biol. 2017;24(9):1161-1180.

138. Sośnicki S, Kapral M, Węglarz L. Molecular targets of metformin antitumor

action. Pharmacol Rep. 2016;68(5):918-25.

139. Jara JA, López-Muñoz R. Metformin and cancer: Between the bioenergetic disturbances and the antifolate activity. Pharmacol Res. 2015;101:102-8.

140. Kamarudin MNA, Sarker MMR, Zhou JR, Parhar I. Metformin in colorectal cancer: molecular mechanism, preclinical and clinical aspects. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):491.

141. Ciccarone F, Vegliante R, Di Leo L, Ciriolo MR. The TCA cycle as a bridge between oncometabolism and DNA transactions in cancer. Semin Cancer Biol. 2017;47:50-56.

142. Anderson NM, Mucka P, Kern JG, Feng H. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. Protein Cell. 2018;9(2):216-237.

143. Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, vd. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. Sci Transl Med. 2010;2(31):31-34.

144. Liang Y, Hou L, Li L, Li L, Zhu L, Wang Y, vd. Dichloroacetate restores colorectal cancer chemosensitivity through the p53/miR-149-3p/PDK2-mediated glucose metabolic pathway. Oncogene. 2020;39(2):469-485.

145. Liu X, Gong Y. Isocitrate dehydrogenase inhibitors in acute myeloid leukemia. Biomark Res. 2019;7:22.

146. Gross MI, Demo SD, Dennison JB, Chen L, Chernov-Rogan T, Goyal B, vd. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. Mol Cancer Ther. 2014;13(4):890-901.

147. Reckzeh ES, Karageorgis G, Schwalfenberg M, Ceballos J, Nowacki J, Stroet MCM, vd. Inhibition of Glucose Transporters and Glutaminase Synergistically Impairs Tumor Cell Growth. Cell Chem Biol. 2019 Sep 19;26(9):1214-1228.e25.

148. Li L, Meng Y, Li Z, Dai W, Xu X, Bi X, vd. Discovery and development of

small molecule modulators targeting glutamine metabolism. Eur J Med Chem. 2019;163:215-242.

149. Chen Z, Li D, Xu N, Fang J, Yu Y, Hou W, vd. Novel 1,3,4-Selenadiazole-Containing Kidney-Type Glutaminase Inhibitors Showed Improved Cellular Uptake and Antitumor Activity. J Med Chem. 2019;62(2):589-603.

150. Stuart SD, Schauble A, Gupta S, Kennedy AD, Keppler BR, Bingham PM, vd. A strategically designed small molecule attacks alpha-ketoglutarate dehydrogenase in tumor cells through a redox process. Cancer Metab. 2014;2(1):4.

151. Zachar Z, Marecek J, Maturo C, Gupta S, Stuart SD, Howell K, vd. Non-redox-active lipoate derivates disrupt cancer cell mitochondrial metabolism and are potent anticancer agents in vivo. J Mol Med (Berl). 2011;89(11):1137-48.

152. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, vd. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. Lancet. 2003;361(9368):1496-501.

153. McIntyre A, Gibson PR, Young GP. Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. Gut. 1993;34(3):386-91.

154. Peters U, Sinha R, Chatterjee N, Subar AF, Ziegler RG, Kulldorff M, vd. Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. Lancet. 2003;361(9368):1491-5.

155. Whitehead RH, Young GP, Bhathal PS. Effects of short chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM1215). Gut. 1986;27(12):1457-63.

156. Comalada M, Bailón E, De Haro O, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A, vd. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. J Cancer Res Clin Oncol. 2006;132(8):487-97.

157. Mariadason JM, Velcich A, Wilson AJ, Augenlicht LH, Gibson PR.

Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco-2 cell differentiation. Gastroenterology. 2001;120(4):889-99.

158. Vidali G, Boffa LC, Bradbury EM, Allfrey VG. Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978;75(5):2239-43.

159. Whitlock JP Jr, Augustine R, Schulman H. Calcium-dependent phosphorylation of histone H3 in butyrate-treated HeLa cells. Nature. 1980;287(5777):74-6.

160. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. Mol Cell. 2012;48(4):612-26.

161. Li Q, Cao L, Tian Y, Zhang P, Ding C, Lu W, vd. Butyrate Suppresses the Proliferation of Colorectal Cancer Cells via Targeting Pyruvate Kinase M2 and Metabolic Reprogramming. Mol Cell Proteomics. 2018;17(8):1531-1545.

162. Geng HW, Yin FY, Zhang ZF, Gong X, Yang Y. Butyrate Suppresses Glucose Metabolism of Colorectal Cancer Cells *via* GPR109a-AKT Signaling Pathway and Enhances Chemotherapy. Front Mol Biosci. 2021;8:634874.

163. Blouin JM, Penot G, Collinet M, Nacfer M, Forest C, Laurent-Puig P, vd. Butyrate elicits a metabolic switch in human colon cancer cells by targeting the pyruvate dehydrogenase complex. Int J Cancer. 2011;128(11):2591-601.

164. Salvi PS, Cowles RA. Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease. Cells. 2021;10(7):1775.

165. Punekar S, Cho DC. Novel Therapeutics Affecting Metabolic Pathways. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2019 Jan;39:e79-e87.

166. Chen WQ, Lian WS, Yuan YF, Li MQ. T The synergistic effects of oxaliplatin and piperlongumine on colorectal cancer are mediated by oxidative stress. Cell

Death Dis. 2019 Aug 8;10(8):600.

167. Wu J, Yeung SCJ, Liu S, Qdaisat A, Jiang D, Liu W, vd. Cyst(e)ine in nutrition formulation promotes colon cancer growth and chemoresistance by activating mTORC1 and scavenging ROS. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):188.

168. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. I Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. J Biol Chem. 1960;235:1992-7

169. Tan DX, Zheng X, Kong J, Manchester LC, Hardel R, Kim SJ, vd. Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions. Int J Mol Sci. 2014;15(9):15858-90.

170. Paredes SD, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Reiter RJ. Phytomelatonin: a review. J Exp Bot. 2009;60(1):57-69.

171. Reiter R, Tan D, Manchester L, Simopoulos A, Maldonado M, Flores L, vd. Melatonin in edible plants (phytomelatonin): Identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. World Rev Nutr Diet. 2007;97:211-230.

172. Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, Andersen LPH, Zhou Z, Galano A, vd. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. J Pineal Res. 2015;59(4):403-19.

173. Suofu Y, Li W, Jean-Alphonse FG, Jia J, Khattar NK, Li J, vd. Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(38):E7997-E8006.

174. Zhao D, Yu Y, Shen Y, Liu Q, Zhao Z, Sharma R, vd. Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. Front Endocrinol (Lausanne). 2019;10:249.

175. Zisapel N. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. Br J Pharmacol. 2018;175(16):3190-

3199.

176. Blume C, Garbazza C, Spitschan M. Effects of light on human circadian rhythms, sleep and mood. Somnologie (Berl). 2019;23(3):147-156.

177. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, Pawlik M, Sliwowski Z, Cześnikiewicz-Guzik M, vd. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). J Physiol Pharmacol. 2007;58(3):381-405.

178. Bang CS, Yang YJ, Baik GH. Melatonin for the treatment of gastroesophageal reflux disease; protocol for a systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2019;98(4):e14241.

179. Çekmez F, Çetinkaya M, Tayman C, Canpolat FE, Kafa IM, Uysal S, vd. Evaluation of melatonin and prostaglandin E1 combination on necrotizing enterocolitis model in neonatal rats. Regul Pept. 2013;184:121-5.

180. Vaccaro R, Casini A, Severi C, Lamazza A, Pronio A, Palma R. Serotonin and Melatonin in Human Lower Gastrointestinal Tract. Diagnostics (Basel). 2023;13(2):204.

181. Blask DE, Wilson ST, Zalatan F. Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth in vitro: evidence for a glutathione-mediated pathway. Cancer Res. 1997;57(10):1909-14.

182. Bakalova R, Zhelev Z, Shibata S, Nikolova B, Aoki I, Higashi T. Impressive Suppression of Colon Cancer Growth by Triple Combination SN38/EF24/Melatonin: "Oncogenic" *Versus* "Onco-Suppressive" Reactive Oxygen Species. Anticancer Res. 2017;37(10):5449-5458.

183. Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. J Pineal Res. 2014;57(2):131-46.

184. Wilson HV. A New Method By Which Sponges May Be Artificially Reared. Science. 1907;25(649):912-5.

185. Weiss P, Taylor AC. Reconstitution of Complete Organs From Single-Cell

Suspensions Of Chick Embryos in Advanced Stages Of Differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1960;46(9):1177-85.

186. Pierce GB, Verney EL. An in vitro and in vivo study of differentiation in teratocarcinomas. Cancer. 1961;14:1017-29.

187. Evans M. Origin of mouse embryonal carcinoma cells and the possibility of their direct isolation into tissue culture. J Reprod Fertil. 1981;62(2):625-31.

188. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;78(12):7634-8.

189. Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(1):136-40.

190. Shannon JM, Mason RJ, Jennings SD. Functional differentiation of alveolar type II epithelial cells in vitro: effects of cell shape, cell-matrix interactions and cell-cell interactions. Biochim Biophys Acta. 1987;931(2):143-56.

191. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, vd. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998;282(5391):1145-7.

192. Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, vd. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. Cell Stem Cell. 2008;3(5):519-32.

193. Barker N, Van Es JH, Kuipers J, Kujala P, Van Den Born M, Cozijnsen M, vd. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature. 2007;449(7165):1003-7.

194. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, Van De Wetering M, Barker N, Stange DE, vd. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature. 2009;459(7244):262-5.

195. Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, vd. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. Cell Stem Cell. 2010;6(1):25-36.

196. Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, vd. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. Nature. 2011;472(7341):51-6.

197. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, vd. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. Nature. 2011;470(7332):105-9.

198. Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, vd. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. Cell Stem Cell. 2012;10(6):771-785.

199. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, vd. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Nature. 2013;501(7467):373-9.

200. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, Van Es JH, Van Den Brink S, vd. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. Gastroenterology. 2011;141(5):1762-72.

201. Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquinta PJ, Karthaus WR, Gopalan A, vd. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. Cell. 2014;159(1):176-187.

202. Van De Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, vd. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. Cell. 2015;161(4):933-45.

203. Cheng CW, Biton M, Haber AL, Gunduz N, Eng G, Gaynor LT, vd. Ketone Body Signaling Mediates Intestinal Stem Cell Homeostasis and Adaptation to Diet. Cell. 2019;178(5):1115-1131.e15.

204. Zhao Y, Wang C, Goel A. A combined treatment with melatonin and

andrographis promotes autophagy and anticancer activity in colorectal cancer. Carcinogenesis. 2022;43(3):217-230.

205. Dmitrieva-Posocco O, Wong AC, Lundgren P, Golos AM, Descamps HC, Dohnalová L, vd. β-Hydroxybutyrate suppresses colorectal cancer. Nature. 2022;605(7908):160-165.

206. Cavarzerani E, Caligiuri I, Bartoletti M, Canzonieri V, Rizzolio F. 3D dynamic cultures of HGSOC organoids to model innovative and standard therapies. Front Bioeng Biotechnol. 2023;11:1135374.

207. Amoêdo ND, Valencia JP, Rodrigues MF, Galina A, Rumjanek FD. How does the metabolism of tumour cells differ from that of normal cells. Biosci Rep. 2013;33(6):e00080.

208. Cahill GF, Herrera MG, Morgan AP, Soeldner JS, Steinke J, Levy PL, vd. Hormone-fuel interrelationships during fasting. J Clin Invest. 1966;45(11):1751-69.

209. Robinson AM, Williamson DH. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. Physiol Rev. 1980;60(1):143-87.

210. Cahill GF Jr. Fuel metabolism in starvation. Annu Rev Nutr. 2006;26:1-22.

211. Pariente R, Bejarano I, Espino J, Rodríguez AB, Pariente JA. Participation of MT3 melatonin receptors in the synergistic effect of melatonin on cytotoxic and apoptotic actions evoked by chemotherapeutics. Cancer Chemother Pharmacol. 2017 Nov;80(5):985-998.

212. Wenzel U, Nickel A, Daniel H. Melatonin potentiates flavone-induced apoptosis in human colon cancer cells by increasing the level of glycolytic end products. Int J Cancer. 2005;116(2):236-42.

213. Meng ZY, Feng CT, Zhang L, Yang Q, Chen DX, Xu K. Regioselective C-H Phosphorothiolation of (Hetero)arenes Enabled by the Synergy of Electrooxidation and Ultrasonic Irradiation. Org Lett. 2021;23(11):4214-4218.

214. Bader DA, Hartig SM, Putluri V, Foley C, Hamilton MP, Smith EA, vd.

Mitochondrial pyruvate import is a metabolic vulnerability in androgen receptor-driven prostate cancer. Nat Metab. 2019;1(1):70-85.

215. Bartmann C, Janaki Raman SR, Flöter J, Schulze A, Bahlke K, Willingstorfer J, vd. Beta-hydroxybutyrate (3-OHB) can influence the energetic phenotype of breast cancer cells, but does not impact their proliferation and the response to chemotherapy or radiation. Cancer Metab. 2018;6:8.

216. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, vd. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(5):2037-42.

217. Waseem M, Sahu U, Salman M, Choudhury A, Kar S, Tabassum H, vd. Melatonin pre-treatment mitigates SHSY-5Y cells against oxaliplatin induced mitochondrial stress and apoptotic cell death. PLoS One. 2017;12(7):e0180953.

218. Lee JH, Yun CW, Han YS, Kim SM, Jeong D, Kwon HY, vd. Melatonin and 5-fluorouracil co-suppress colon cancer stem cells by regulating cellular prion protein-Oct4 axis. J Pineal Res. 2018;65(4):e12519.

219. Carrier F. Chromatin Modulation by Histone Deacetylase Inhibitors: Impact on Cellular Sensitivity to Ionizing Radiation. Mol Cell Pharmacol. 2013;5(1):51-59.

220. Mikami D, Kobayashi M, Uwada J, Yazawa T, Kamiyama K, Nishimori K, vd. β-Hydroxybutyrate enhances the cytotoxic effect of cisplatin via the inhibition of HDAC/survivin axis in human hepatocellular carcinoma cells. J Pharmacol Sci. 2020;142(1):1-8.

8. EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Doç.Dr. Gizem Çalıbaşı Koçal

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**etikkurul@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	5508-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☒	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Üç Boyutlu Kolorektal Kanser Modelinde Bütirat ve Melatonin'in Kemoterapi Etkinliğindeki Rolü**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr. Gizem Çalıbaşı Koçal Onkoloji Enstitüsü	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ☒

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

BİLGİLERİ	Karar No:2023/35-01	Tarih:01.11.2023
	Doç.Dr. Gizem Çalıbaşı Koçal'ın sorumlusu olduğu "Üç Boyutlu Kolorektal Kanser Modelinde **Bütirat ve Melatonin'in Kemoterapi Etkinliğindeki Rolü"** isimli klinik araştırmaya ait araştırmacı dilekçesine ilişkin; -Çalışma materyalinde yapılan değişiklikler ile ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Şükran Köse (Başkan Yardımcısı)	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Özgür Er	Endodonti A.D.	Diş Hekimliği Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Hatice Şimşek Keskin	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Gamze Tuna	Tıbbi Biyokimya	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2021/31-24	Tarih:03.11.2021
	Prof.Dr.Yasemin Başpınar'ın sorumlusu olduğu **"Üç Boyutlu Kolorektal Kanser Modelinde Bütirat ve Melatonin'in Kemoterapi Etkinliğindeki Rolü"** isimli klinik araştırmaya ait araştırmacı dilekçesine ilişkin; -Sorumlu araştırmacı görevinin Doç.Dr. Gizem Çalıbaşı Koçal'a devredilmesi ile ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Emel Çalıkoğlu (Başkan Yardımcısı)	Prevantif Onkoloji	Onkoloji Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Suna Asilsoy	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Aliye Akcalı	Periodontoloji	Diş Hekimliği Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç Yüksel	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2020/14-30	Tarih:22.06.2020
	Prof.Dr.Yasemin Başpınar'ın sorumlusu olduğu **"Üç Boyutlu Kolorektal Kanser Modelinde Bütirat ve Melatonin'in Kemoterapi Etkinliğindeki Rolü"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

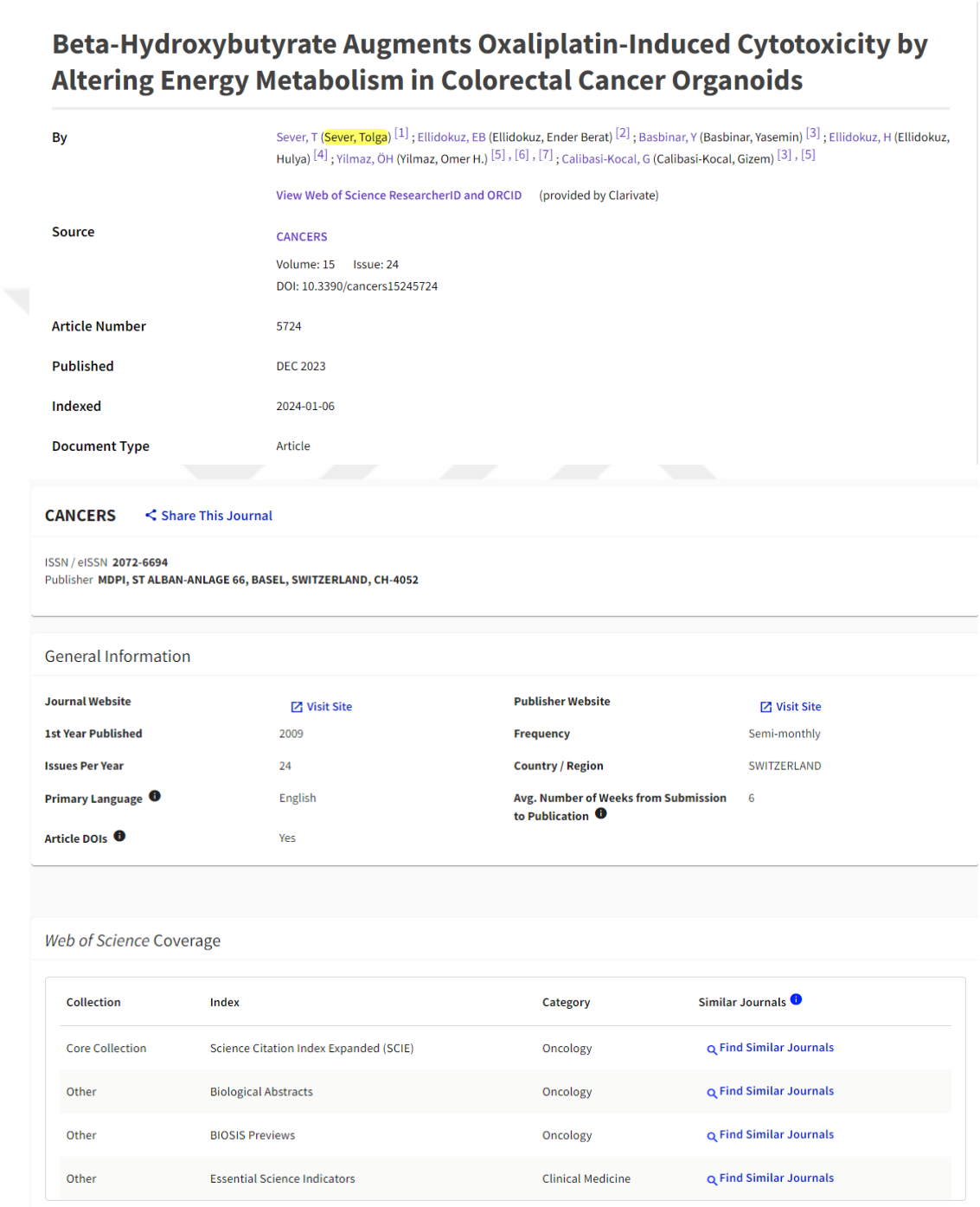
ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL (Başkan Yardımcısı)	Tıbbi Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Arzu GENÇ	Nörolojik Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

EK-2. Tez ile ilişkili yayınlar

1- SCIE kapsamındaki dergide (MDPI, Cancers) basılmış, tez sahibinin ilk isim olduğu teze ilişkin araştırma makalesi.



Beta-Hydroxybutyrate Augments Oxaliplatin-Induced Cytotoxicity by Altering Energy Metabolism in Colorectal Cancer Organoids

By	Sever, T (Sever, Tolga) [1] ; Ellidokuz, EB (Ellidokuz, Ender Berat) [2] ; Basbinar, Y (Basbinar, Yasemin) [3] ; Ellidokuz, H (Ellidokuz, Hulya) [4] ; Yilmaz, OH (Yilmaz, Omer H.) [5] , [6] , [7] ; Calibasi-Kocal, G (Calibasi-Kocal, Gizem) [3] , [5]
	View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)
Source	CANCERS
	Volume: 15 Issue: 24
	DOI: 10.3390/cancers15245724
Article Number	5724
Published	DEC 2023
Indexed	2024-01-06
Document Type	Article

CANCERS Share This Journal

ISSN / eISSN **2072-6694**
Publisher **MDPI, ST ALBAN-ANLAGE 66, BASEL, SWITZERLAND, CH-4052**

General Information

Journal Website	Visit Site	Publisher Website	Visit Site
1st Year Published	2009	Frequency	Semi-monthly
Issues Per Year	24	Country / Region	SWITZERLAND
Primary Language	English	Avg. Number of Weeks from Submission to Publication	6
Article DOIs	Yes		

Web of Science Coverage

Collection	Index	Category	Similar Journals
Core Collection	Science Citation Index Expanded (SCIE)	Oncology	Find Similar Journals
Other	Biological Abstracts	Oncology	Find Similar Journals
Other	BIOSIS Previews	Oncology	Find Similar Journals
Other	Essential Science Indicators	Clinical Medicine	Find Similar Journals

2- SCI kapsamındaki dergide (Turkish Journal of Medical Sciences) basılmış tez sahibinin yer aldığı, teze ilişkin araştırma makalesi.

Carvacrol alters soluble factors in HCT-116 and HT-29 cell lines

By	Pakdemirli, A (Pakdemirli, Ahu) [1] ; Karaca, C (Karaca, Caner) [2] ; Sever, T (Sever, Tolga) [3] ; Daskin, E (Daskin, Ezgi) [3] ; Leblebici, A (Leblebici, Asim) [3] ; Yigitbasi, T (Yigitbasi, Turkan) [4] ; Basbinar, Y (Basbinar, Yasemin) [5]
	View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)
Source	TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES Volume: 50 Issue: 1 Page: 271-276 DOI: 10.3906/sag-1907-173
Published	2020
Indexed	2020-03-23
Document Type	Article

TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES Share This Journal

ISSN / eISSN **1300-0144 / 1303-6165**
Publisher **TUBITAK SCIENTIFIC & TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL TURKEY, ATATURK BULVARI NO 221, KAVAKLIDERE, ANKARA, Turkiye, TR-06100**

General Information

Journal Website	Visit Site	**Publisher Website**	Visit Site
1st Year Published	1976	**Frequency**	Bi-monthly
Issues Per Year	6	**Country / Region**	TURKIYE
Primary Language	English		

Web of Science Coverage

Collection	Index	Category	Similar Journals
Core Collection	Science Citation Index Expanded (SCIE)	Medicine, General & Internal	Find Similar Journals
Other	Essential Science Indicators	Clinical Medicine	Find Similar Journals

3- SCI-E kapsamındaki dergide (Journal of Balkan Union of Oncology) basılmış, teze ilişkin konulardaki araştırma makalesi.

Curcumin effects on cell proliferation, angiogenesis and metastasis in colorectal cancer

By	Calibasi-Kocal, G (Calibasi-Kocal, Gizem) [1] ; Pakdemirli, A (Pakdemirli, Ahu) [2] ; Bayrak, S (Bayrak, Serdar) [3] ; Ozupek, NM (Ozupek, Nazli Men) [4] ; Sever, T (Sever, Tolga) [4] ; Basbinar, Y (Basbinar, Yasemin) [1] ; Ellidokuz, H (Ellidokuz, Hulya) [5] ; Yigitbasi, T (Yigitbasi, Turkan) [6]
	View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)
Source	JOURNAL OF BUON
	Volume: 24 Issue: 4 Page: 1482-1487
Published	JUL-AUG 2019
Indexed	2019-09-04
Document Type	Article

JOURNAL OF BUON

Publisher name: IMPRIMATUR PUBLICATIONS

Journal Impact Factor ™

2020	Five Year
2.533	1.987

JCR Category	Category Rank	Category Quartile
ONCOLOGY *in SCIE edition*	204/242	Q4

Source: Journal Citation Reports 2020. Learn more

Journal Citation Indicator ™

2020	2019
0.41	0.38

JCI Category	Category Rank	Category Quartile
ONCOLOGY *in SCIE edition*	241/310	Q4

4- ESCI kapsamındaki dergide (Biomedical Reports) basılan teze ilişkin konulardaki yayın.

EGFR mutation status in a series of Turkish non-small cell lung cancer patients

By	Calibasi-Kocal, G (Calibasi-Kocal, Gizem) [1] ; Amirfallah, A (Amirfallah, Arsalan) [2] , [3] , [4] ; Sever, T (Sever, Tolga) [1] ; Unal, OU (Unal, Olcun Umit) [5] ; Gurel, D (Gurel, Duygu) [6] ; Oztop, I (Oztop, Ilhan) [7] ; Ellidokuz, H (Ellidokuz, Hulya) [8] ; Basbinar, Y (Basbinar, Yasemin) [1] , [9]
	View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)
Source	BIOMEDICAL REPORTS Volume: 13 Issue: 2 DOI: 10.3892/br.2020.1308
Article Number	2
Published	AUG 2020
Indexed	2020-09-17
Document Type	Article

BIOMEDICAL REPORTS Share This Journal

ISSN / eISSN **2049-9434 / 2049-9442**
Publisher **SPANDIDOS PUBL LTD, POB 18179, ATHENS, GREECE, 116 10**

General Information

Journal Website	Visit Site	**Publisher Website**	Visit Site
1st Year Published	2013	**Frequency**	Bi-monthly
Issues Per Year	6	**Country / Region**	GREECE
Primary Language	English		

Web of Science Coverage

Collection	Index	Category	Similar Journals
Core Collection	Emerging Sources Citation Index (ESCI)	Medicine, Research & Experimental	Find Similar Journals
Other	Biological Abstracts	Medicine, Research & Experimental	Find Similar Journals
Other	BIOSIS Previews	Medicine, Research & Experimental	Find Similar Journals

5- ESCI kapsamındaki dergide (Journal of Basic and Clinical Health Sciences) basılan teze ilişkin konulardaki yayın.,

TISSUE PROCESSING AND ISOLATION OF TUMOR CELLS FROM HUMAN COLORECTAL CANCER TISSUE

By Ellidokuz, EB (Ellidokuz, Ender Berat) [1] ; Sever, T (Sever, Tolga) [2] ; Kocal, GC (Kocal, Gizem Calibasi) [3] ; Canda, AE (Canda, Aras Emre) [4] , [5] ; Sarioglu, S (Sarioglu, Sulen) [6] ; Kurter, H (Kurter, Hasan) [2] ; Oztop, I (Oztop, Ilhan) [7] ; Tuncok, Y (Tuncok, Yesim) [8] ; Basbinar, Y (Basbinar, Yasemin) [3]

View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)

Source JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES

Volume: 6 Issue: 3 Page: 872-876

DOI: 10.30621/jbachs.1154867

Published 2022

Indexed 2022-11-11

Document Type Article

JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES Share This Journal

ISSN / eISSN **2458-8938 / 2564-7288**

Publisher **DOKUZ EYLUL UNIV INST HEALTH SCIENCES, DEPT MEDICAL BIOCHEMISTRY, FAC MEDICINE, DOKUZ EYLUL UNIV, IZMIR, Turkiye, 00000**

General Information

Journal Website	Visit Site	**1st Year Published**	2017
Frequency	Tri-annual	**Issues Per Year**	3
Country / Region	TURKIYE	**Primary Language**	English

Web of Science Coverage

Collection	Index	Category	Similar Journals
Core Collection	Emerging Sources Citation Index (ESCI)	Health Care Sciences & Services	Find Similar Journals

6- ESCI kapsamındaki dergide (Journal of Basic and Clinical Health Sciences) basılan teze ilişkin konulardaki yayın.

TARGETING THE TUMOR METABOLISM BY OXAMATE POTENTIATES THE IMPACT OF CHEMOTHERAPEUTICS IN COLORECTAL CANCER CELLS

By Calibasi-Kocal, G (Calibasi-Kocal, Gizem) [1] ; Cakici, C (Cakici, Cagri) [2] ; Toksoz, F (Toksoz, Feriha) [1] ; Inanc-Surer, S (Inanc-Surer, Seniz) [3] ; Sever, T (Sever, Tolga) [4] ; Basbinar, Y (Basbinar, Yasemin) [1] ; Yigitbasi, T (Yigitbasi, Turkan) [2]

View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)

Source JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES

Volume: 5 Issue: 3 Page: 205-212

DOI: 10.30621/jbachs.988996

Published 2021

Indexed 2021-11-21

Document Type Article

JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES Share This Journal

ISSN / eISSN **2458-8938 / 2564-7288**

Publisher **DOKUZ EYLUL UNIV INST HEALTH SCIENCES, DEPT MEDICAL BIOCHEMISTRY, FAC MEDICINE, DOKUZ EYLUL UNIV, IZMIR, Turkiye, 00000**

General Information

Journal Website	Visit Site	**1st Year Published**	2017
Frequency	Tri-annual	**Issues Per Year**	3
Country / Region	TURKIYE	**Primary Language**	English

Web of Science Coverage

Collection	Index	Category	Similar Journals
Core Collection	Emerging Sources Citation Index (ESCI)	Health Care Sciences & Services	Find Similar Journals

7- ESCI kapsamındaki dergide (Journal of Basic and Clinical Health Sciences) basılan teze ilişkin konulardaki yayın.

Repositioning of Metformin: Anticancer Agent for Hypoxic Neuroblastoma Cells

By Surer, SI (Surer, Seniz Inanc) [2] ; Toksoz, F (Toksoz, Feriha) [6] ; Bayrak, S (Bayrak, Serdar) [5] ; Meco, HE (Meco, Hanife Ecenur) [3] ; Sever, T (Sever, Tolga) [3] ; Basbinar, Y (Basbinar, Yasemin) [1] ; Olgun, HN (Olgun, Hatice Nur) [4]

View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)

Source JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES

Volume: 4 Issue: 3 Page: 384-390

DOI: 10.30621/jbachs.2020.1373

Published 2020

Indexed 2020-11-02

Document Type Article

JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES Share This Journal

ISSN / eISSN **2458-8938 / 2564-7288**

Publisher **DOKUZ EYLUL UNIV INST HEALTH SCIENCES, DEPT MEDICAL BIOCHEMISTRY, FAC MEDICINE, DOKUZ EYLUL UNIV, IZMIR, Turkiye, 00000**

General Information

Journal Website	Visit Site	**1st Year Published**	2017
Frequency	Tri-annual	**Issues Per Year**	3
Country / Region	TURKIYE	**Primary Language**	English

Web of Science Coverage

Collection	Index	Category	Similar Journals
Core Collection	Emerging Sources Citation Index (ESCI)	Health Care Sciences & Services	Find Similar Journals

8- ESCI kapsamındaki dergide (Journal of Basic and Clinical Health Sciences) basılan teze ilişkin konulardaki yayın.

ORGANOID AS A NOVEL TECHNOLOGY FOR DISEASE MODELING

By Sever, T (Sever, Tolga) [1] ; Cevik, I (Cevik, Ilgin) [2] , [3] ; Calibasi-Kocal, G (Calibasi-Kocal, Gizem) [4] ; Basbinar, Y (Basbinar, Yasemin) [4] ; Ellidokuz, EB (Ellidokuz, Ender Berat) [5]

View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)

Source JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES

Volume: 5 Issue: 1 Page: 94-101

DOI: 10.30621/jbachs.868837

Published 2021

Indexed 2021-10-06

Document Type Article

JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES

Share This Journal

ISSN / eISSN **2458-8938 / 2564-7288**

Publisher **DOKUZ EYLUL UNIV INST HEALTH SCIENCES, DEPT MEDICAL BIOCHEMISTRY, FAC MEDICINE, DOKUZ EYLUL UNIV, IZMIR, Turkiye, 00000**

General Information

Journal Website	Visit Site	**1st Year Published**	2017
Frequency	Tri-annual	**Issues Per Year**	3
Country / Region	TURKIYE	**Primary Language**	English

Web of Science Coverage

Collection	Index	Category	Similar Journals
Core Collection	Emerging Sources Citation Index (ESCI)	Health Care Sciences & Services	Find Similar Journals

9- ESCI kapsamındaki dergide (Journal of Basic and Clinical Health Sciences) basılan teze ilişkin konulardaki yayın.

New Insight of Tumor Microenvironment in Non-Small Cell Lung Cancer

By Sever, T (Sever, Tolga) [1] ; Leblebici, A (Leblebici, Asim) [1] ; Koc, A (Koc, Altug) [1] , [2] ; Binicier, C (Binicier, Cilem) [1] ; Olgun, A (Olgun, Aybuke) [1] , [3] ; Edizer, DT (Edizer, Deniz Tuna) [1] , [4] ; Özdemir, TR (Ozdemir, Taha Resid) [5] , [6] ; Serin, G (Serin, Gurdeniz) [5] , [7] ; Erdem, M (Erdem, Melek) [5] , [8] ; Basbinar, Y (Basbinar, Yasemin) [9]

View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)

Source JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES

Volume: 3 Issue: 2 Page: 113-120

DOI: 10.30621/jbachs.2019.625

Published 2019

Indexed 2019-10-16

Document Type Review

JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES Share This Journal

ISSN / eISSN **2458-8938 / 2564-7288**

Publisher **DOKUZ EYLUL UNIV INST HEALTH SCIENCES, DEPT MEDICAL BIOCHEMISTRY, FAC MEDICINE, DOKUZ EYLUL UNIV, IZMIR, Turkiye, 00000**

General Information

Journal Website	Visit Site	**1st Year Published**	2017
Frequency	Tri-annual	**Issues Per Year**	3
Country / Region	TURKIYE	**Primary Language**	English

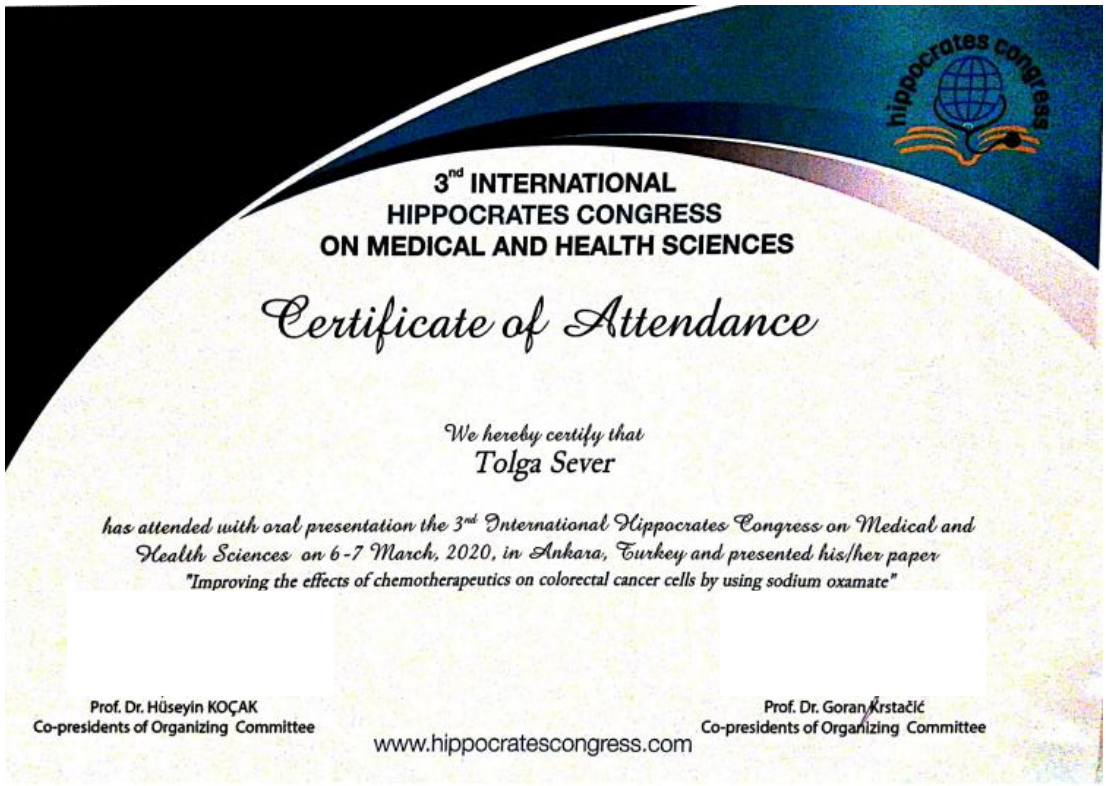
Web of Science Coverage

Collection	Index	Category	Similar Journals
Core Collection	Emerging Sources Citation Index (ESCI)	Health Care Sciences & Services	Find Similar Journals

10- Tez ile ilişkili ulusal kongrede yapılan sunum ve özet bildirimi, ilk isim



11- Tez ile ilişkili ulusal kongrede yapılan sunum ve özet bildirimi, ilk isim



12- Tez ile ilişkili ulusal kongrede yapılan sunum ve özet bildirimi, ilk isim



2nd INTERNATIONAL
CANCER AND ION CHANNELS
CONGRESS

September 22 – 24, 2019
Wyndham Grand Ozdilek Izmir / Turkey
"Ion Channels, Cancer Metabolism, and Translation To Therapy"

Certificate of Attendance

This is to certify that

TOLGA SEVER

has participated in the "2nd International Cancer and Ion Channels Congress"
which is held on September 22-24, 2019 in Izmir-TURKEY

Prof. Dr. Gülgün OKTAY
Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine
Department of Medical Biochemistry, Izmir, TR

Prof. Dr. Yasemin BAŞBINAR
Dokuz Eylul University, Institute of Oncology,
Department of Translational Oncology, Izmir, TR

Prof.Dr. Mustafa B.A. DJAMGOZ
Imperial College, London UK,
Cyprus International University TRNC

13- Tez ile ilişkili ulusal kongrede yapılan sunum ve özet bildirimi, ilk isim



CERTIFICATE ATTENDANCE

hippocrates congress

We hereby certify that

Tolga Sever

has attended the International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences on 1-3 March 2019, in Ankara, Turkey and presented his/her paper

"Taraxacum and Metformin Anti-cancer Feature"

Prof. Nermina HADŽIGRAHIĆ, MD.
Chair of Organizing Committee

14- Tez ile ilişkili ulusal kongrede yapılan poster sunumu, ilk isim



CERTIFICATE ATTENDANCE

hippocrates congress

We hereby certify that

Tolga Sever

has attended the International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences on 1-3 March 2019, in Ankara, Turkey and presented his/her paper

"Nöroblastom 3D Modellerinde Normoksik/Hipoksik Mikroçevrenin Hipoksii İndüklenebilir faktör 1 Mekanizmasına Etkisi"

Prof. Nermina HADŽIGRAHIĆ, MD.
Chair of Organizing Committee

9. KATKI

Bu tez çalışması **Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi** tarafından desteklenen TDK-2021-2610 numarası ile doktora tez projesi kapsamında bütçelendirilmiştir. Ayrıca **TÜBİTAK 2211A Yurt İçi Doktora Burs Programı, 2214 Yurt Dışı Doktora Araştırma Burs Programı ve Yükseköğretim Kurulu 100/2000 Öncelikli Alan Programı Bursu** kapsamında desteklenmiştir

Daha önce oluşturularak arşivlenmiş organoid kültür hatlarını cömertçe sağladığı için Prof.Dr. Ömer H. Yılmaz'a içten şükranlarımı sunarım. Ayrıca, Massachusetts Teknoloji Enstitüsü, Cambridge, ABD'deki Koch Bütünleştirici Kanser Araştırmaları Enstitüsü'ndeki Yılmaz Laboratuvarı'nda çalışan Jessica E.Shay, Jonathan Braverman, Shinya Imada ve Saleh Khawaled'e paha biçilmez yardımları için teşekkür ederim.

10. ÖZGEÇMİŞ

TOLGA SEVER

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

26 Şubat 2019 - Şu Anda (5 yıl)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TRANSLASYONEL ONKOLOJİ (DR)
Diploma Numarası: -

01 Eylül 2012 - 01 Mayıs 2018 (5 yıl 9 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOKİMYA BÖLÜMÜ
Diploma Numarası: 2017/04/0174
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.43 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İSPANYOLCA (Okuma: Orta, Yazma: Orta, Konuşma: Orta)

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

T. SEVER, E. B. ELLİDOKUZ, Y. BASBİNAR, H. ELLİDOKUZ, O. H. YİLMAZ & G. CALİBASİ-KOCAL, Beta-Hydroxybutyrate Augments Oxaliplatin-Induced Cytotoxicity by Altering Energy Metabolism in Colorectal Cancer Organoids, CANCERS, 2023, 2072-6694, 15, 24, 14.

E. B. ELLİDOKUZ, T. SEVER, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, A. E. CANDA, S. SARIOĞLU, H. KURTER, İ. ÖZTOP, Y. TUNÇOK & Y. BAŞBİNAR, Tissue Processing and Isolation of Tumor Cells from Human Colorectal Cancer Tissue, Journal of Basic and Clinical Health Sciences, 2022, 2564-7288, 6 , 3, 872 - 876.

T. SEVER, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, E. B. ELLİDOKUZ & Y. BAŞBINAR, Organoid As a Novel Technology for Disease Modeling, JBACHS, 2021, 2458-8938/2564-7288, 5, 1, 94-101.

G. CALİBASİ-KOCAL, C. CAKİCİ, F. TOKSOZ, S. INANC-SURER, T. SEVER, Y. BASBİNAR & T. YİGİTBASİ, TARGETING THE TUMOR METABOLISM BY OXAMATE POTENTIATES THE IMPACT OF CHEMOTHERAPEUTICS IN COLORECTAL CANCER CELLS, JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES, 2021, 2458-8938, 5, 3, 8.

T. SEVER, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, A. AMİRFALLAH, O. Ü. Ü. (. K. O. KULLANICI), D. GÜREL, H. ELLİDOKUZ & Y. BAŞBINAR, EGFR mutation status in a series of Turkish non-small cell lung cancer patients, BIOMEDİCAL REPORTS , 2020, 2049-9434, 13, 2, -.

S. I. SURER, F. TOKSÖZ, S. BAYRAK, H. E. MEÇO, T. SEVER, Y. BAŞBINAR & H. N. OLGUN, Repositioning of Metformin: Anticancer Agent for Hypoxic Neuroblastoma Cells, Journal of Basic and Clinical Health Sciences, 2020, 2564-7288, 4, 3, 384-390.

A. PAKDEMİRLİ, C. KARACA, T. SEVER, E. DAŞKIN, A. LEBLEBİCİ, T. YİĞİTBAŞI & Y. BAŞBINAR, Carvacrol Alters Soluble Factors in HCT-116 and HT-29 Cell Lines, TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES, 2019, 1300-0144, 50, 1, 271-276.

G. ÇALIBAŞI KOÇAL, A. PAKDEMİRLİ, S. BAYRAK, N. MERT ÖZÜPEK, T. SEVER, Y. BAŞBINAR, H. ELLİDOKUZ & T. YİĞİTBAŞI, Curcumin effects on cell proliferation, angiogenesis and metastasis in colorectal cancer, Journal of BUON, 2019, 1107-0625, 24, 4, 1482-1487.

T. SEVER, A. LEBLEBİCİ, A. KOÇ, Ç. BİNİCİER, A. OLGUN, D. T. EDİZER, T. R. ÖZDEMİR, G. SERİN, M. ERDEM & Y. BAŞBINAR, New Insight of Tumor Microenvironment in Non-Small Cell Lung Cancer, Journal of Basic and Clinical Health Sciences, 2019, 2458-8938, 3, 2, 113-120.

Bildiriler

T. SEVER, E. B. ELLİDOKUZ, Y. BAŞBINAR, H. ELLİDOKUZ & G. ÇALIBAŞI KOÇAL, Combination Therapy of Beta-Hydroxybutyrate and Oxaliplatin Augments the Treatment Efficacy in Colorectal Cancer Organoids, Özet Bildiri, MOKAD Congress, 07 Eylül 2023, 10 Eylül 2023.

T. SEVER, E. DAŞKIN, H. K. MISIRLIOĞLU, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, S. SARIOĞLU, Y. TUNÇOK, İ. ÖZTOP, E. B. ELLİDOKUZ, Ö. H. YILMAZ & Y. BAŞBINAR, Optimization of Patient-Derived Colorectal Cancer Organoids Protocols for Personalized Drug Screenings, Tam Metin Bildiri, 2nd Cancer and Ion Channel Congress , 22 Eylül 2019, 24 Eylül 2019.

B. DEMİRİZ, E. DAŞKIN, Z. ELLİDOKUZ, T. SEVER, S. DURDAĞI & Y. BAŞBINAR, Anticancer Properties of Curcumin and Genistein on Hormone-Dependent Cancers Related NF-KB Pathway, Poster Sunumu, International Molecular Medicine by the Bosphorus, 16 Mayıs 2019, 18 Mayıs 2019.

F. TOKSÖZ, T. SEVER, Ş. İNANÇ SÜRER, H. KURTER, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, Y. BAŞBINAR & H. N. OLGUN, Nöroblastom 3d Modelllerinde Normoksik/hipoksik Mikroçevrenin Hipoksi İ?ndüklenebilir Faktör 1 Alfa Mekanizmasına Etkisi, Tam Metin Bildiri, International Hippocrates Congress On Medical And Health Sciences, 01 Mart 2019, 03 Mart 2019.

T. SEVER, A. PAKDEMİRLİ, K. B. KOÇYİĞİT, B. P. KUTLUAY, S. TÜRKMEN, C. KARACA, H. ELLİDOKUZ & Y. BAŞBINAR, Taraxacum And Metformin Anti-cancer Feature, Tam Metin Bildiri, International Hippocrates Congress On Medical And Health Sciences, 01 Mart 2019, 03 Mart 2019.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

117S241, Glioblastoma Tedavisine Yönelik Katı Lipid Taşıyıcılar İle Nanoteknolojik Yeni Bir Yaklaşım, Burslu, Sonuçlandı, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, 1001 - Araştırma, ARDEB, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 15.03.2018 - 25.05.2018, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.12.2017 - 01.12.2019.

BİDEB Destekleri

TOLGA SEVER, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Doktora öğrencileri için), Türkiye'ye Döndü, 2020 - 2, 01.06.2021 - 31.05.2022.
TOLGA SEVER, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, Destekleniyor, 2019 - 2, 01.06.2019 - 31.05.2024.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0