



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Biyoloji

[Yüksek Lisans Tezi]

**KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE KOLEKALSİFEROL/D3 VİTAMİN
UYGULAMASININ OTOFAJİ VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ
ÜZERİNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Esra TANRIVERDİ
ORCID: 0000-0001-6833-5489

Danışman
Prof. Dr. Hasibe VURAL
ORCID: 0000-0003-2564-7807

Bu tez çalışması BAP tarafından 221318002 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya – 2023



ÖN SÖZ (TEŞEKKÜR)

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisiyle, tecrübeleriyle, bana ilham kaynağı olan maddi ve manevi desteğini her an hissettiğim, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışmanım Prof. Dr. Hasibe VURAL'a,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN'a ve Prof. Dr. Ercan KURAR'a,

Bu süreçte her zaman yanımda olan, eksik yönlerimi tamamlayan, beni her konuda cesaretlendiren yol göstericim Dr. Öğretim Üyesi Ebru GÜÇLÜ'ye,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlileri sayın Dr. İlknur ÇINAR AYAN'a ve Dr. Canan EROĞLU GÜNEŞ'e,

221318002 numaralı BAP proje desteği ile tez çalışmama destek sağlayan, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Yaşamım boyunca bilgisiyle destek olan biricik ablam Öğretim Görevlisi Dr. Fatma Zehra GENÇ'e ve tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, her zaman yanımda destek olduklarını bildiğim kıymetli aileme,

Bana bu yolda eşlik eden, yorulduğumda her zaman beni ayağa kaldıran ve yüreklendiren değerli eşim Sedat TANRIVERDİ'ye,

Teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını sağlıklı doğmasını beklediğim canım kızım Meyra'ya ithaf ediyorum.

Esra TANRIVERDİ

Haziran 2023

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	vii
BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ	viii
KISALTMALAR.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kolorektal Kanser (KRK)	3
2.1.1. KRK'nin risk faktörleri	5
2.1.2. KRK'nin moleküler patogenezi	9
2.1.3. KRK'nin belirtileri	11
2.1.4. KRK'nin tanı ve evrelendirilmesi	11
2.1.5. KRK'nin tedavisi.....	14
2.2. Kolekalsiferol (Vit D3)	15
2.3. KRK ve D vitamini	16
2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi.....	17
2.5. Otofaji.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Hücre Kültürü.....	23
3.1.1 Hücre hattının dondurulması	23
3.1.2. Dondurulmuş hücre hatlarının çözündürülmesi	23
3.1.3. Hücre hattının pasajlanması	23

3.2. Sitotoksisite analizi	24
3.3. Koloni formasyon analizi	24
3.4. Otofaji analizi	24
3.5. GRP78 seviyesinin belirlenmesi	25
3.6. Apoptoz, ER stresi ve otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi.	25
3.6.1. Hücrelerden total RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi	25
3.6.2. RNA miktarının ve kalitesinin belirlenmesi	26
3.6.3. cDNA sentezi	26
3.6.4. qRT-PZR analizi	26
3.7. İstatistiksel analiz	27
4. BULGULAR	29
4.1. Kolekalsiferolün kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi	29
4.2. Kolekalsiferolün kolon kanseri hücrelerinde otofaji üzerine etkisi	31
4.3. Kolekalsiferolün kolon kanseri hücrelerinde ER stresi üzerine etkisi	31
4.4. Kolekalsiferolün kolon kanseri hücrelerinde apoptoz, ER stresi ve otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi	32
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
7. KAYNAKLAR	45
8. EKLER	53

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **ESRA TANRIVERDİ**'nin "**Kolon Kanseri Hücrelerinde Kolekalsiferol/D3 Vitamin Uygulamasının Otofaji ve Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerinden Değerlendirilmesi**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

KONYA/ 19.06.2023

Tez Danışmanı	Prof. Dr. Hasibe VURAL Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.
Jüri Üyesi	Doç. Dr. H. Gül DURSUN Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Ebru GÜÇLÜ Yozgat Bozok Üniversitesi Kenevir Araştırmaları Enstitüsü Temel Bilimler ve Sağlık A.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 20/06/2023 tarih ve 15/11 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasibe VURAL
Enstitü Müdürü

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

‘Kolon Kanseri Hücrelerinde Kolekalsiferol/D3 Vitamin Uygulamasının Otofaji ve Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerinden Değerlendirilmesi’ başlıklı tez çalışmamın toplam 40 sayfalık kısmına ilişkin, 15.05.2023 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %6 olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Tez kabul sayfası hariç
2. Tez çalışması orijinallik raporu sayfası hariç
3. Bilimsel etik beyannamesi sayfası hariç
4. Önsöz hariç
5. İçindekiler hariç
6. Simgeler ve kısaltmalar hariç
7. Materyal ve metot hariç
8. Kaynaklar hariç
9. Alıntılar dâhil
10. 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve tez çalışmamın, bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranının (%30) altında olduğunu ve intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

15.05.2023

Esra TANRIVERDİ

Prof. Dr. Hasibe VURAL

BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez hazırlama kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını ve bu kaynakların kaynaklar listesine eklendiğini beyan ederim.

15.05.2023

Esra TANRIVERDİ

KISALTMALAR

AIP	: Anterior intestinal portal
AJCC	: Amerikan Kanser Komitesi
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
AP	: Anteroposterior eksen
APC	: Tümör baskılayıcı gen
ATF4	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
ATF6	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
BKI	: Beden kitle indeksi
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CEA	: Karsinoembriyonik antijen
CIP	: Kaudal/posterior intestinal portal
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ER	: Endoplazmik retikulum
FAP	: Ailesel adenomatöz polipozis koli
GIS	: Gastrointestinal sistem
HIF-1	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1
HNPCC	: Kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IRE1	: İnozitol gerektiren kinaz 1
IRE1 α	: İnositol gerektiren enzim 1 α
KRK	: Kolorektal kanser
miRNA	: mikroRNA
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PERK	: Protein kinaz benzeri ER kinaz
PKR	: Protein kinaz RNA
qPZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RAD	: Radyal eksen
TME	: Tümör mikro çevresi
UPR	: Katlanmamış protein yanıtı
VDR	: D vitamini reseptörü
WCRF	: Dünya Kanser Araştırma Fonu
XBP1	: X-box bağlayıcı protein 1
5FU	: 5 Fluorouracil

TABLULAR LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2. 1. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2020 verilerine göre erkeklerde en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı (http://gco.iarc.fr/today/home)	5
Tablo 2. 2. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2020 verilerine göre kadınlarda en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı (http://gco.iarc.fr/today/home)	5
Tablo 3. 1. qRT-PZR analizi ile ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş genler.....	27



ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2. 1. 2020’de tahmini yaşa göre standardize edilmiş insidans oranları.....	4
Şekil 2. 2. Kolorektal duvarda büyüyen polipler.....	12
Şekil 2. 3. KKK evreleri	14
Şekil 2. 4. ER stresi ve kanser.	18
Şekil 2. 5. Tümör mikro çevresinde endoplazmik retikulum stresinin indükleyicileri	19
Şekil 2. 6. Otofaji aşamalarının şematik gösterimi.....	21
Şekil 4. 1. Kolekalsiferol uygulamasının HCT 116 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi....	29
Şekil 4. 2. Kolekalsiferol uygulamasının HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	29
Şekil 4. 3. Kolekalsiferol uygulamasının HCT 116 hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisi.....	30
Şekil 4. 4. Kolekalsiferol uygulamasının HT-29 hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisi.....	30
Şekil 4. 5. Kolon kanseri hücrelerine kolekalsiferol uygulamasının otofaji üzerine etkisi...31	
Şekil 4. 6. Kolon kanseri hücrelerine kolekalsiferol uygulamasının GRP78/BiP seviyesi üzerine etkisi.....	32
Şekil 4. 7. Kolon kanseri hücrelerine kolekalsiferol uygulamasının apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi	33
Şekil 4. 8. Kolon kanseri hücrelerine kolekalsiferol uygulamasının ER stresi ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi	33
Şekil 4. 9. Kolon kanseri hücrelerine kolekalsiferol uygulamasının otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi	34

ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalını
Tıbbi Biyoloji
[Yüksek Lisans Tezi]

KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE KOLEKALSİFEROL/D3 VİTAMİN UYGULAMASININ OTOFAJİ VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

Esra TANRIVERDİ

Konya-2023

D vitamini, vücut üzerinde yaygın etkileri olan güçlü bir steroid hormon kolekalsiferolün öncüsüdür. Antikanser etkiye de sahip olan D vitamini, yetersiz güneş ışınlarına maruz kalma ve kanserli bireylerde görülebilecek çeşitli sebeplerden dolayı bu etkisini gösteremez. Ayrıca bazı kanser hastalarında D vitamini eksikliği ile de karşılaşmaktadır. Kolekalsiferol vücudu besleyen en önemli D vitamini formudur. Yapılan çalışmalar kolekalsiferolün çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü, invazivliğini ve anjiyogenezini inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca kolekalsiferol, bağırsaktaki bağışıklık hücrelerinin biyolojisini düzenleyerek bağırsak mikrobiyotasını olumlu yönde etkilemektedir. Bu çalışmada kolekalsiferol uygulamasının kolon kanseri hücrelerinde otofaji ve endoplazmik retikulum (ER) stresi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Kolekalsiferolün HT-29 ve HCT 116 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi XTT analizi ile araştırılmıştır. Sitotoksisite sonuçları dikkate alınarak, sonraki analizde hücreler 48 saat boyunca 150 ve 250 μ M kolekalsiferol ile muamele edilmiştir. Ardından kontrol ve doz gruplarından RNA izolasyonu yapılmış, cDNA sentezlenmiş ve apoptoz, ER stresi ve otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri qRT-PZR ile analiz edilmiştir. Kolekalsiferolün kolon kanseri hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri üzerine etkisi, koloni formasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca florometrik tabanlı otofaji kiti ve GRP78/BiP ELISA kiti kullanılarak kolekalsiferolün otofaji ve ER stresi üzerine etkisi araştırılmıştır. qRT-PZR sonuçlarına göre, kolekalsiferol uygulaması kolon kanseri hücrelerinde apoptoz ve ER stresi ile ilişkili genlerin ekspresyonunu artırırken, otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyonunu azaltmıştır. Benzer şekilde kolekalsiferol uygulaması sonrasında otofaji azalırken ER stresi belirteci GRP78/BiP miktarında artış saptanmıştır. Ek olarak, kolekalsiferol, kolon kanseri hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini önemli ölçüde azaltmıştır. Tüm sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde, kolekalsiferolün kolon kanseri hücrelerinde otofajiyi baskılayarak, ER stresi ile apoptozu arttırarak antikanser etkiye neden olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Endoplazmik retikulum stresi, Kolekalsiferol, Kolon kanseri, Otofaji

ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biology
Medical Biology
[Master Thesis]

EVALUATION OF CHOLECALCIFEROL/VITAMIN D3 TREATMENT IN COLON CANCER CELLS THROUGH AUTOPHAGY AND ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS

Esra TANRIVERDİ

KONYA-2023

Vitamin D is the precursor to cholecalciferol, a powerful steroid hormone with widespread effects on the body. Vitamin D, which also has an anticancer effect, can not show this effect due to insufficient exposure to sunlight and various reasons that can be seen in individuals with cancer. In addition, some cancer patients are faced with vitamin D deficiency. Cholecalciferol is the most important form of vitamin D that nourishes the body. Studies have shown that cholecalciferol inhibits proliferation, migration, invasiveness and angiogenesis of various cancer cells. In addition, cholecalciferol positively affects the intestinal microbiota by regulating the biology of immune cells in the intestine. In this study, the effect of cholecalciferol treatment on autophagy and endoplasmic reticulum (ER) stress in colon cancer cells was evaluated. The cytotoxic effect of cholecalciferol on HT-29 and HCT 116 cells was evaluated by XTT analysis. Considering cytotoxicity results, cells were treated with 150 and 250 μ M cholecalciferol for 48 hours in subsequent analyzes. Then, RNA was isolated from the control and dose groups, cDNA was synthesized, and expression levels of genes associated with apoptosis, ER stress and autophagy were analyzed by qRT-PCR. The effect of cholecalciferol on colony-forming abilities in colon cancer cells was evaluated by colony formation analysis. In addition, the effect of cholecalciferol on autophagy and ER stress was investigated using the fluorometric-based autophagy kit and the GRP78/BiP ELISA kit. According to the qRT-PCR results, cholecalciferol treatment increased the expression of genes associated with apoptosis and ER stress, while decreasing the expression of autophagy-related genes in colon cancer cells. Similarly, while autophagy decreased after cholecalciferol treatment, the amount of ER stress marker GRP78/BiP increased. In addition, cholecalciferol significantly reduced the colony-forming ability of colon cancer cells. When all the results are evaluated together, it is thought that cholecalciferol causes an anticancer effect by suppressing autophagy and increasing apoptosis with ER stress in colon cancer cells

Keywords: Autophagy, Cholecalciferol, Colon cancer, Endoplasmic reticulum stress



1. GİRİŞ VE AMAÇ

En sık görülen gastrointestinal kanser türü olan kolon kanseri genetik faktörler, diyet gibi çevresel faktörler ve sindirim sisteminin inflamatuvar koşullarını kapsayan etiyolojisi ile çok faktörlü bir hastalıktır. Kolon kanserine bazen kolon kanseri ve rektumda başlayan rektum kanserini birleştiren bir terim olan kolorektal kanser (KRK) de denilmektedir (Li ve ark., 2021). Yapılan araştırmalar bağırsak mikrobiyotasının, KRK'nin oluşumunda, ilerlemesinde ve tedaviye yanıtında rol oynadığını göstermektedir. KRK hastalarında bağırsak mikrobiyomunu oluşturan spesifik bakterilerin sayısal artışı ile önemli değişiklikler tespit edilebilmiş ve hastalık taraması, prognoz ve tedavi yanıtının tahmini için mikrobiyom profili biyolojik belirteç olarak kullanılabilmiştir (Devenport ve Shah, 2019). D vitamini reseptörü (VDR); bağırsak bariyer bütünlüğünü düzenler ve bağırsakta doğuştan gelen adaptif bağışıklığı kontrol eder. Bağırsak mikrobiyotasından gelen metabolitler ayrıca VDR ekspresyonunu düzenleyebilirken, D vitamini bağırsak mikrobiyotasını etkileyebilir ve anti-inflamatuvar ve bağışıklık düzenleyici etkiler gösterebilir (Markotic ve ark., 2019). Bağırsak hastalıklarının patogenezinde D vitamininin altında yatan mekanizma tam olarak anlaşılammıştır, ancak optimal bir D vitamini durumunun korunması bağırsak sağlığı için faydalı görünmektedir. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar beslenme/diyet ve D vitamini ile prevelansı giderek artan kanser türleri arasındaki ilişkiler üzerine odaklanmıştır (Thanikachalam ve Khan, 2019). D vitamini reseptörlerinin aktive olmaması, yetersiz güneş ışınlarına maruz kalma ve kanserli bireylerde görülebilecek çeşitli sebeplerden dolayı, D vitamini sahip olduğu antikanser etkisini gösteremez. Bu sebepler kanserli bireylerde D vitamininin mekanizmalarının aksamasına bağlı olarak D vitamini eksikliğine kanıt olarak gösterilebilmektedir (Al-Ghafari ve ark., 2019). D vitamini vücutta yaygın etkilere sahip güçlü bir steroid hormon olan kolekalsiferolün öncüsüdür. Yapılan çalışmalar kolekalsiferolün kolon karsinomu hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu, invazivliğini ve anjiyogenezini inhibe ettiğini, kolon karsinomu hücrelerinin farklılaşmasını desteklediğini ve onları apoptoza duyarlı hale getirdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca kolekalsiferol bağırsaktaki bağışıklık hücrelerinin biyolojisini düzenleyerek bağırsak mikrobiyotasını olumlu olarak etkilemektedir (Negri ve ark., 2020).

Bu tez projesinde KRK hücrelerinde kolekalsiferol uygulamasının, otofaji ve endoplazmik retikulum stresi üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Kolekalsiferolün KKK hücre proliferasyonu üzerine etkisi sitotoksisite ve koloni formasyon analizleri ile belirlenmiştir. Ardından kolekalsiferol uygulamasının otofaji ve endoplazmik retikulum stresi ile ilişkisi florometrik/kolorimetrik tabanlı kitler kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca bu mekanizmalarda görevli önemli genlerin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) ile araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser (KRK)

Kanser hücreleri, kontrolsüz çoğalma, programlanmış hücre ölümünden kaçınarak hayatta kalma ve ana metabolik yakıt olarak laktat kullanma yeteneğine sahip olma gibi birçok özellik gösterir. Ayrıca genom kararsızlığı, bağışıklık saldırısından ve büyüme baskılayıcılardan kaçınma, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, hücre ölümüne direnme, inflamasyonu teşvik etme, proliferatif sinyalleme sürdürme, anjiyogenezi indüklemeye, metastazı aktive etme ve hücresel enerjiyi düzensizleştirme kanser hücrelerinin başlıca özellikleridir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Gastrointestinal sistemin (GIS) bir parçası olan kolon, sırasıyla epitel, düz kas katmanlarını ve enterik sinir sistemini oluşturan endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere üç germ katmanından oluşur. Gastrulasyondan bu yana, bu katmanlar embriyogenez sırasında eş zamanlı olarak gelişir ve yetişkin yaşa kadar sürekli olarak birbirleriyle sinyalleşir. İki invajinasyon, anterior intestinal portal (AIP) ve kaudal/posterior intestinal portal (CIP) uzar ve kaynaşarak ilkel bağırsak tüpünü oluşturur, bu tüp daha sonra sol-sağ asimetrisi bağlamında anteroposterior (AP) eksen ve radyal (RAD) eksen boyunca şekillenir. Bu olaylar ön bağırsak, orta bağırsak ve arka bağırsak olmak üzere üç farklı bölgenin oluşmasına yol açar. Yukarıda bahsedilen tüm olaylar, normal bağırsak gelişimi ve işlevi için kritik olan çeşitli moleküler yolların sıkı kontrolü altındadır (Kostouros ve ark., 2020).

KRK kolon veya rektumda başlayan bir kanserdir. KRK genellikle mukozal epitel hücrelerinin kanserli olmayan proliferasyonu ile başlar. Bu büyümeler polip olarak bilinir ve kansere dönüşmeden önce 10-20 yıl içinde kademeli olarak büyüyebilir. En yaygın şekli, işlevi kalın bağırsağı kaplayan mukus üretmek olan granüler hücrelerden kaynaklanan bir adenom veya poliptir (Stryker ve ark., 1987). Polip büyüdükçe kanser riski artmasına rağmen, tüm adenomların yaklaşık %10'u invaziv kansere ilerler. Bu tür poliplerden kaynaklanan invaziv kanser, adenokarsinom olarak bilinir ve tüm KRK'lerin %96'sını oluşturmaktadır (Stewart ve ark., 2006).

KRK, dünya genelinde en sık görülen ikinci kanser olup kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır (GLOBOCAN, 2020a). Çoğu vaka Batı ülkelerinde tespit edilmektedir. Yaş, kronik hastalık öyküsü, yaşam tarzı ve alışkanlıklar hastalığın gelişiminde etkili

olmaktadır (Mármol ve ark., 2017). GLOBOCAN verileri kolon ve rektum kanserlerini kolorektal olarak birlikte vermekte olup Rawla ve ark. (2019) epidemiyolojik çalışmasında ayrı ayrı ele almıştır. Rawla ve ark. (2019) yaptığı epidemiyolojik çalışmasında kolon kanserinin 2018 için öngörülen 551.000 ölümle tüm kanser ölümlerinin %5,8'ini oluşturan beşinci en ölümcül kanser olduğunu, rektum kanserinin tüm kanser ölümlerinin %3,2'sini oluşturan 310.000 ölümle en ölümcül 10. kanser olduğunu saptamıştır (Rawla ve ark., 2019).



Şekil 2. 1. 2020'de tahmini yaşa göre standardize edilmiş insidans oranları (<http://gco.iarc.fr/today/home>).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2020 verilerine göre erkeklerde en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı Tablo 2.1'de sunulmuştur. Buna göre erkeklerde Dünya'da, Asya'da, Kuzey Amerika'da en sık görülen kanser türü prostat kanseri olup ikinci sırada KRK yer almaktadır. Ülkemizde ise erkeklerde en sık görülen kanser türleri sırası ile prostat kanseri, akciğer kanseri ve KRK şeklindedir (Tablo 2.1). Kadınlarda ise en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı Tablo 2.2'de sunulmuştur. Buna göre kadınlarda Dünya'da, Asya'da, Kuzey Amerika'da en sık görülen kanser türü meme kanseri olup ikinci sırada KRK yer almaktadır. Ülkemizde ise kadınlarda en yaygın görülen kanser türleri sırası ile meme kanseri, tiroit kanseri ve KRK'dir (Tablo 2.2). Ülkemizde Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı (2020) verilerine göre KRK hem kadınlarda hem de erkeklerde GLOBOCAN verileri ile paralel şekilde görülme sıklığı bakımından üçüncü sırada yer almaktadır. Sıklığı erkeklerde yüz binde 25,1 iken kadınlarda yüz binde 14,7'dir (Sağlık Bakanlığı, 2020).

Tablo 2. 1. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2020 verilerine göre erkeklerde en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı (<http://gco.iarc.fr/today/home>)

	Dünya	Türkiye	Asya	Avrupa	Kuzey Amerika
1	Prostat	Prostat	KRK	Prostat	Prostat
2	KRK	Akciğer	Prostat	KRK	KRK
3	Akciğer	KRK	Akciğer	Mesane	Mesane
4	Mide	Mesane	Karın	Akciğer	Deri Melanomu
5	Mesane	Mide	Karaciğer	Deri Melanomu	Akciğer

Tablo 2. 2. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2020 verilerine göre kadınlarda en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı (<http://gco.iarc.fr/today/home>)

	Dünya	Türkiye	Asya	Avrupa	Kuzey Amerika
1	Meme	Meme	Meme	Meme	Meme
2	KRK	Tiroit	KRK	KRK	KRK
3	Tiroit	KRK	Serviks Uteri	Korpus Uteri	Korpus Uteri
4	Serviks Uteri	Korpus Uteri	Tiroit	Deri Melanomu	Tiroit
5	Korpus Uteri	Over	Akciğer	Tiroit	Akciğer

KRK'nin küresel yükünün 2030 yılına kadar %60 artarak 2,2 milyon yeni vakaya ve 1,1 milyon yıllık ölüme ulaşması beklenmektedir. Bu büyümenin ve geçiş döneminin, düşükten orta seviyeye ekonomik kalkınmanın bir ürünü olduğu tahmin edilmektedir. Gelişmiş ülkelerdeki nesilsel değişiklikler ve ekonomik gelişmeler KRK insidansındaki artış ile paralellik göstermektedir. Bu artışın daha yerleşik yaşam tarzı, daha fazla işlenmiş gıda, alkol ve et tüketimi ve sonuçta obezitede artışın bir ürünü olduğu belirtilmektedir (Arnold ve ark., 2017). Sawicki ve ark. (2021) KRK'nin risk faktörlerine odaklanan sağlık eğitimine kaynak ayırmanın ve halk sağlığı açısından en son bilimsel raporları kullanarak tarama programlarının formüle edilmesinin gerekliliğini vurgulamaktadır (Sawicki ve ark., 2021).

2.1.1. KRK'nin risk faktörleri

KRK oluşumu, yaş ve kalıtsal faktörlerin yanı sıra değiştirilebilir çevresel ve yaşam tarzı faktörleri ile ilişkilidir (Cronin ve ark., 2018; Lewandowska ve ark., 2022). Kanser vakalarının yaklaşık olarak %80-90'ı çevresel veya davranışsal faktörler tarafından meydana gelir ve önlenibilme potansiyeli vardır. Kalıtım yoluyla kanser meydana gelme olasılığı çevresel faktörlere oranla çok daha azdır (%10). Önlenibilir davranışsal faktörler sigara, yanlış beslenme, spor yapmama, alkol kullanımı, aşırı kilo, bağışıklık sistemi yetersizliği ve strestir. Önlenibilir çevresel riskler olarak hava kirliliği, asbest radon gibi kimyasallar, UV ışınları,

iyonlaştırıcı radyasyon ile bazı bakteri ve virüsler örnek olarak gösterilebilir. Önlenemez faktörler ise yaş, cinsiyet, ırk, hormonlar ve ailede kanser hastalığı öyküsüdür (Türk Kanser Derneği, 2018).

Kolorektal neoplazmaların etiyojisi tam olarak açıklanamamıştır ve nedenleri hala bilinmemektedir ancak uzun yıllar süren araştırmalar birçok risk faktörünü ayırt etmemizi sağlamaktadır. Hastanın yaşı ana neden olarak kabul edilir. Kanser gençlerde de görülse de 50 yaşından sonra kansere yakalanma olasılığı artmaktadır ve kansere yakalanan her 10 kişiden 9'u 50 yaşın üzerindedir. En yüksek insidans, 70 yaşından sonra ortaya çıkar. Geçmişteki inflamatuvar hastalıklar, KRK için başka bir risk faktörüdür. Hastalığa yakalanma riski ülseratif kolitte 20 kat, Crohn hastalığında 3 kat artmaktadır. Birçok risk faktörü yaşam tarzıyla ilişkilidir. Sigara, alkol, kırmızı ve işlenmiş et tüketiminin fazla olması, inflamatuvar bağırsak hastalığı, obezite, diyabet, ailede KRK öyküsü, yaş ve cinsiyet, potansiyel enfeksiyon ajanları KRK için önemli bazı risk faktörleri olarak kabul edilir (Sawicki ve ark., 2021). Bilimsel araştırmalar, düşük fiziksel aktivite, yağ açısından zengin, kalori açısından yüksek, kırmızı et açısından zengin, aynı zamanda kalsiyum veya folik asit açısından düşük bir diyetin KRK gelişiminde etkili olduğunu göstermektedir (Safiri ve ark., 2019).

Sigara

Tütün dumanı, KRK de dâhil olmak üzere birçok kanser türünün gelişimi için yerleşik bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmalar sigara içen kişilerde içmeyenlere kıyasla KRK gelişme riskinin 2-3 kat arttığını, bu riskin doz ve maruz kalma süresi ile de paralelik gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca sigara kullanımının KRK ölümlerinin %12'ye varan bir kısmından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Ettarh, 2015). Tütün dumanı, DNA'ya zarar verdiği bilinen 60'tan fazlası yerleşik kanserojen (örneğin, N-nitrozaminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, aldehitler ve metaller) olan binlerce kimyasalın bir karışımını içerir. Kolorektal epitel hücrelerindeki mutasyonlar, sırayla invaziv adenokarsinomaya dönüşebilen polipoz gelişimine yol açmaktadır (Ahmed ve ark., 2014).

Alkol tüketimi

Dünya Kanser Araştırma Fonu (WCRF) günde yaklaşık 30 gramın üzerinde alkol tüketmenin KRK riskini artırdığını belirtmiştir. Yapılan meta analizde, günlük alkol tüketiminde 10 gramlık bir artışın, KRK riskini toplamda %7, erkeklerde %8 ve kadınlarda %4

arttırdığı rapor edilmiştir. Alkol tüketimi ile KKK riski artmakta olup, KKK riski coğrafi bölgelere (Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya), tümörün anatomik alt bölgelerine (kolon ve rektum) ve alkollü içecek türlerine (şarap, bira ve alkollü içkiler) göre değişkenlik göstermektedir (Park ve ark., 2019).

Uluslararası Araştırma Ajansına göre insanlar için kanserojen olarak değerlendirilen ilk metabolit olan asetaldehit ile her türlü alkollü içeceklerde bulunan etanol, KKK için belirlenmiş bir risk faktörüdür. 2018’de yayınlanan Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya’dan 14 kohort çalışmasının meta-analizinde, hafif içki içme (günde ≤ 1 alkollü içki) bile hiç veya ara sıra alkol içmeye kıyasla KKK riskinde hafif ama önemli ölçüde artışla ilişkilendirilmiştir (Choi ve ark., 2018). Genel olarak bu ilişkinin erkeklerde, muhtemelen daha fazla alkol alımı nedeniyle, kadınlara göre daha güçlü olduğu saptanmıştır (Cho ve ark., 2004).

Obezite

Güçlü bilimsel kanıtlar, obez bireylerde KKK gelişme riskinin daha yüksek olduğunu ve bu riskin artan beden kitle indeksi (BKI) ile artış gösterdiğini belirtmektedir. BKI>30 olan yaşlı bireylerde, BKI<23 olan bireylere kıyasla %5-100 daha fazla hastalığa yakalanma riski olduğu belirtilmiştir. Böyle bireylerde genetik arka plana, özellikle yaşam boyu %100 KKK gelişme riski ile ilişkili olan ailesel adenomatöz polipozis koli (FAP) ve riskin %70–80 olduğu Lynch sendromu olarak da bilinen kalıtsal nonpolipozis KKK’ye (HNPCC) dikkat etmek önemlidir (Safiri ve ark., 2019).

Aile öyküsü ve genetik yatkınlık

Ailede KKK öyküsü olması, KKK gelişme riskini önemli ölçüde artırmaktadır. Bu olay hem kalıtsal yatkınlık hem de yaşam tarzı faktörleri ile ilişkilidir. Aile öyküsü bulunan bireylerde aşağıda verilen noktalar önemlidir:

- i. Akrabalar ile risk altındaki bireyler arasındaki kuşaksal uzaklık,
- ii. Birinci derece akrabalarda KKK’nın geliştiği yaş,
- iii. KKK teşhisi konan aile üyelerinin sayısı,
- iv. Diğer neoplazmaların (örneğin, endometrial, yumurtalık ve idrar yolu, pankreas) ailesel birlikteliği ve
- v. Kişisel kanser öyküsü.

Önceki çalışmalar, etkilenen birinci derece akrabası (ebeveynler, kardeşler ve çocuklar) olan kişilerin, aile öyküsü olmayanlara kıyasla ortalama olarak iki kat daha yüksek KRK riskine sahip olduğunu göstermiştir. Bireyin bir akrabasına 60 yaşından önce teşhis konulmuş ise KRK gelişme riski daha yüksektir. Ayrıca, bireyin etkilenen akraba sayısı (sadece birinci derece değil, aynı zamanda ikinci ve üçüncü derece) arttıkça hastalık riski artmaktadır (Sawicki ve ark., 2021).

KRK vakalarının %2-8'inin kalıtsal sendromların bir sonucu olarak ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. KRK gelişimi için yatkınlık oluşturan en yaygın iki kalıtsal sendrom, HNPCC ve FAP'tır. HNPCC, DNA onarımında görevli genlerdeki mutasyonların neden olduğu otozomal dominant bir hastalıktır. Çoğu HNPCC vakası, MLH1 ve MSH2 genlerindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Bununla birlikte, HNPCC'ye yol açan başka gen mutasyonları da vardır (örn. MSH6, MLH3, TGBR2, PMS1 ve PMS2). HNPCC'li hastalarda 50 yaşında KRK gelişme riski yaklaşık %20 ve 85 yaşında KRK gelişme riski yaklaşık %80'dir (Valle ve ark., 2019).

Otozomal dominant kalıtım modeline sahip FAP ise, tümör baskılayıcı olarak görev yapan APC geni mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. APC geni, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesinin düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir proteini kodlamaktadır. FAP'li bireylerde, ortalama onlu yaşlarda yüzlerce hatta binlerce kolon polipleri gelişmeye başlamakta ve yüksek olasılıkla bu kolon poliplerinin çoğu kansere dönüşmektedir. Daha önce tanınmayan ve tedavi edilmeyen FAP sendromu olan hemen hemen tüm hastalara 35-40 yaşından önce KRK teşhisi konmaktadır (Yang ve ark., 2020).

Cinsiyet ve Yaş

KRK, her iki cinsiyet için en yaygın görülen üçüncü ve en ölümcül ikinci malignitedir. Yeni vaka insidansı ve ölüm oranı, muhtemelen kanser taramasındaki artış ve daha iyi tedavi yöntemleriyle ilişkili olarak, 50 yaşından genç bireyler dışında son yıllarda istikrarlı bir şekilde azalmaktadır. Tüm KRK'lerin yaklaşık %5'i, FAP ve HNPCC sendromuna dayanmaktadır. Normal kolonik epitelyumun kanser öncesi bir lezyona ve nihayetinde invaziv bir karsinoma dönüşmesi, yaklaşık 10 ile 15 yıllık bir süre içinde somatik (kazanılmış) ve/veya germ hattı (kalıtsal) genetik mutasyonların birikmesini gerektirmektedir (Xiao ve ark., 2019).

Herhangi bir yaşta, kalıtsal kanser sendromlarından etkilenen bireyler, genel popülasyona göre daha yüksek KRK riski altındadır. Risk altında olma sebebinin çoğunlukla otozomal dominant modeli izleyen yüksek penetrasyon genlerinde germ hattı mutasyonlarının varlığı olduğu düşünülmektedir (Rahner ve Steinke, 2008). Bu durumda muhtemelen ebeveynler ilgili mutasyonları sadece eşey hücrelerinde (yumurta veya sperm) taşımaktadır, somatik hücrelerde taşımamakta veya mutasyonlar döllenmeden kısa bir süre sonra ortaya çıkmaktadır (Mork ve ark., 2015).

Yetersiz de olsa mevcut kanıtlar, erken başlangıçlı KRK için önemli bir risk faktörünün çocuklar ve ergenler arasında artan obezite prevalansı olduğunu belirtmiştir (Nimptsch ve Wu, 2018). Erken başlangıçlı kanserdeki artış eğilimi, rektal kanser için kolon kanserinden daha belirgin olsa da obezite geç başlangıçlı vakalarda kolon kanseri için rektum kanserinden daha güçlü bir risk faktörü olarak saptanmıştır (Dong ve ark., 2017).

2.1.2. KRK'nin moleküler patogenezi

KRK'nin patogenezi çok karmaşık ve çeşitlidir. Normal kolonik mukozanın adenokarsinomaya dönüşmesine yol açan genetik ve epigenetik değişikliklerin ilerleyici birikiminden kaynaklanır (Yamagishi ve ark., 2016). Çoğu KRK, yaygın heterozigot kaybı ve büyük kromozomal anormallikler ile karakterize edilen kromozomal kararsızlık ile ilişkilidir (Leary ve ark., 2008). KRK'nin yaklaşık %15'i ise DNA yanlış eşleşme tamir (MMR) sisteminin düzensizliğinden ve bunun sonucunda ortaya çıkan genomik kararsızlıktan kaynaklanmaktadır. Son yıllarda, anormal DNA metilasyonu, iltihaplanma ve daha yakın zamanda mikroRNA'nın (miRNA) kanserojen sürece aktif olarak katkıda bulunabileceğinin keşfi dâhil olmak üzere KRK patogenezinde başka sistem ve yolların da yer aldığı tespit edilmiştir (Colussi ve ark., 2013).

Onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki genetik değişiklikler, adenom-karsinom sürecinde normalden displastik epitel tabakasına doğru sırayla gerçekleşmektedir. Bu da KRK gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Hem genetik hem de epigenetik genomik değişiklikler biriktiğinde normal glandüler epiteli karsinomaya dönüştürmektedir (Müller ve ark., 2016).

KRK, üç ana yol dâhil olmak üzere çok sayıda moleküler yol içermektedir: Kromozomal instabilite (CIN), mikrosatellit instabilite (MSI) ve epigenetik instabilite (CIMP). Bu moleküler yolların hepsi genetik ve epigenetik değişiklikler nedeniyle KRK gelişiminde önemli bir rol

oynamaktadır. Bu moleküler yollar tümör gelişimini ve metastatik zamanı belirleyebilir, çünkü hastalığın epidemiyolojisi, mutasyonel denemeler ve bağışıklık tepkisi bilgileri yolağa göre değişmektedir (Aghagolzadeh ve ark., 2016). CIN, pek çok KRK için ayırt edici bir yoldur ve vakaların %80-85'ini oluşturmaktadır. CIN, apoptotik yolların aktivitesini azaltmakta, büyümeyi teşvik eden yolların aktivasyonunu arttırmaktadır. Bu tümörler, WNT yolağı efektörü adenomatöz polipozis koliyi (APC) kodlayan APC geninin deaktivasyon mutasyonu nedeniyle adenomatöz polipler olarak başlamaktadır (Raskov ve ark., 2020).

Ayrıca, KRAS'taki mutasyonları aktive ederek ve SMAD4'teki mutasyonları deaktive ederek adenokarsinomlara ilerlemektedir. İlk olay nedeniyle, bu yolak bazen APC yolağı olarak adlandırılmaktadır. CIN yolağında MSI, MLH1, metilasyon veya BRAF mutasyonları yoktur. Bununla birlikte Lynch sendromuna MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 dâhil olmak üzere MMR genlerindeki germ hattı mutasyonları neden olmaktadır. MSI'nin, MLH1, MSH2 ve MSH6 MMR genlerinde mutasyonlara neden olan MMR DNA'sının eksikliği ile başlatıldığı düşünülmektedir (Boland ve ark., 2018).

CIMP olarak bilinen ve birden fazla tümör baskılayıcı genin promotörü etrafında önemli oranda CpG adası hipermetilasyonu ile tanımlanan KRK'nin bir alt kümesi, CIN veya MSI yerine epigenetik ile tanımlanmaktadır. Kolorektal karsinogenezin yolu, MLH1 promotörünün hipermetilasyonu ile yakın ilişkisinin yanı sıra kadın cinsiyet, ileri yaş ve kötü histoloji ile ilişkisi nedeniyle CIMP, önemli bir riske sahiptir (Mehta ve ark., 2017). Kanseri gelişimi sırasında lezyonlar kadar erken dönemdeki gen değişikliklerinin de kanser oluşumu ve ilerlemesinde rolü vardır. Anormal kript oluşumunun, KRK gelişimiyle bağlantılı ilk histolojik bulgu olduğu saptanmıştır (Szyberg ve ark., 2015).

Polip kanseri oluşum sekansını başlatmak için sistematik bir yaklaşım olan APC'nin inhibe edilmesiyle Wntless/Wnt yolağı aktive edilmektedir. Wnt sinyal yolu, KRAS veya TP53 gibi genlerdeki mutasyonlar nedeniyle polip hücrelerinin kansere dönüşmesini sağlamaktadır. Dönüştürücü büyüme faktörü b (TGFB1) aracılı hücre sinyal yolu da KRAS ve TP53 mutasyonları tarafından modüle edilerek KRK gelişimini daha çok hızlandırmaktadır (Novellademunt ve ark., 2015).

Onkogen aktivasyonu KRK gelişimi sırasında meydana gelen genetik ve epigenetik değişikliklere bağlanmaktadır. B-Raf, EGFR sinyallerini MAPK yolunu aktive eden bir proto-

onkogen olan KRAS'a yönlendirmektedir (Amodio ve ark., 2020). Tüm KKK'lerin yarısından fazlasında KRAS veya B-Rafta MAPK sinyal yolunu tetikleyen ve hücre ölümünü durdururken proliferasyonu artıran mutasyonlar vardır. PI3K, WNT-APC-CTNNB1 ve TGFB1-SMAD sinyal yolları da KKK'nin bir kısmını oluşturmaktadır. Ayrıca RAS-RAF-MAPK yolağını da kapsamaktadır (Ahronian ve ark., 2015).

Kanserdeki epigenetik değişikliklerin incelenmesi, bu spesifik yollarda yaygın olarak değiştirilen genlerin tanımlanmasına yol açarak KKK biyolojisinin derinlemesine araştırılmasına imkan sağlamaktadır. Bu bulgulara dayanarak KKK için yeni tanı ve prognostik testleri ve yeni tedaviler geliştirilmelidir.

2.1.3. KKK'nin belirtileri

Gastrointestinal (GI) semptomlarından bazıları mevcut olduğunda KKK'den şüphelenilmektedir. Şüpheli KKK'nin tanınması ve gelecekteki tanı için yönlendirmenin olabilmesi rektal kanama, karında kitle, karın ağrısı, bağırsak alışkanlığında değişiklik, açıklanamayan kilo kayıpları ve demir eksikliği anemisi belirtilerinin ortaya çıkmasıyla ilişkilendirilmektedir (NICE, 2023). İshal, kabızlık veya dışkı kıvamında değişiklik dâhil olmak üzere bağırsak alışkanlıklarındaki kalıcı değişiklik, dışkıda rektal kanama, kramplar, gaz, ağrı gibi kalıcı karın rahatsızlığı, güçsüzlük ya da yorgunlukla beraber açıklanamayan kilo kaybı KKK'nin belirti ve semptomlarıdır (Mayo Clinic, 2022).

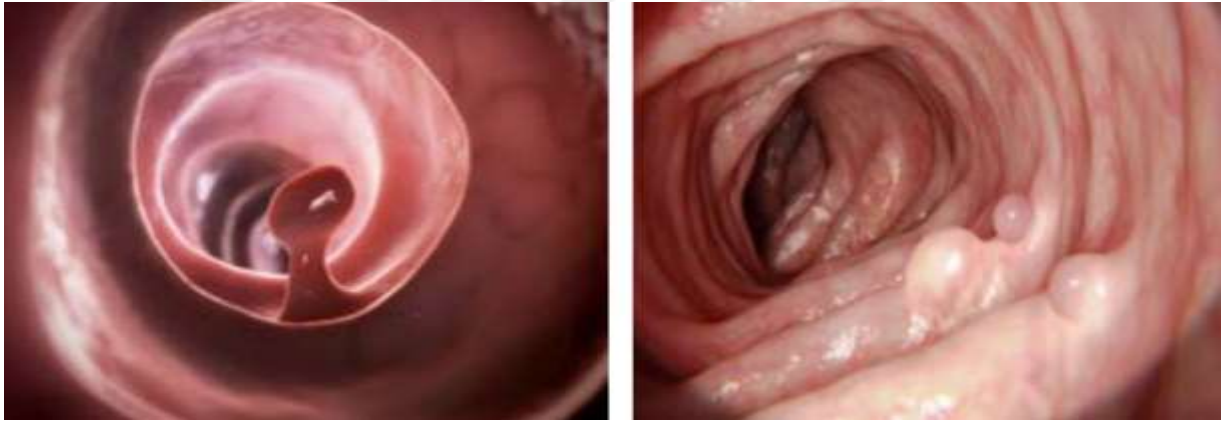
Bireylerde görülen bazı semptomların ortaya çıkmasıyla birlikte klinik değerlendirme de önemlidir. KKK'den şüphelenilen kalın bağırsak belirti ve semptomları olan hastalarda uzman tarafından klinik muayene ve kolonoskopi yapılmaktadır. Kolonoskopi aracılığıyla bireylerin bağırsaklarının skopi cihazı ile incelenmesinin KKK için tanısal duyarlılığı ve özgüllüğü artırabileceği belirtilmektedir. KKK semptomları görülmeden önce teşhis konulan ve hastalığın erken bir evresinde tespit edilen hastaların prognozu daha iyidir. Bu nedenle, KKK'yi düşündürebilecek tüm semptomlar, hastayı acilen bir uzmana görünmeye ve KKK tanı testleri yaptırmaya teşvik etmelidir (Sawicki ve ark., 2021).

2.1.4. KKK'nin tanı ve evrelendirilmesi

Prognostik KKK tanısında en önemli evre başvuru anındaki patolojik evredir. Tüm yeni KKK vakaları, kemoterapi etkinliğinin prognostik ve öngörülmesi düşünüldüğünde,

RAS/BRAF mutasyon testi için taranmaktadır. Hemen hemen tüm hastalarda, kolon karsinomunun doku biyopsisi patolojik doğrulaması için tanısal veya tarama kolonoskopisinin gerekli olduğu vurgulanmıştır. Karsinoembriyonik antijen (CEA) ile göğüs, karın ve pelvisin bilgisayarlı tomografisi (BT), cerrahi rezeksiyondan önce tercih edilen, uygun maliyetli, KRK evreleme çalışmalarıdır.

Evreleme sistemi, kanserleri büyümelerine ve yayılmalarına göre derecelendirilmektedir. KRK'nin evreleri, evre 0'dan evre IV'e kadar değişmektedir. Kanser büyümeye ve yayılmaya ne kadar fazla ise, evre o kadar yüksektir. Kanser büyüdükçe bireylerde çeşitli semptomlara neden olabilmektedir. Bireylerde semptomlar görüldüğünde KRK genellikle ilerlemiş ve tedavisinin daha zor olduğu gözlenmektedir. Tedavi işe yaramazsa, kanser hücreleri büyümeye devam ederek organların çalışmamasına neden olabilmektedir (American Cancer Society, 2023a).



Şekil 2. 2. Kolorektal duvarda büyüyen polipler (NCCN Guidelines For Patients, 2021)

Bir polip, kolon duvarının iç yüzeyindeki hücrelerin aşırı büyümesidir. Poliplerin birçok farklı türleri vardır. Bazı polip türlerinin kansere dönüşme olasılığı diğer polip türlerine göre daha fazladır. En yaygın polip türü adenom olarak adlandırılmaktadır. Adenomlar kanser öncesi polip olarak kabul edilmektedir ve uzun yıllar sürse de adenomlar invaziv KRK'ye dönüşebilmektedir. Bir adenomda oluşan kanser, adenokarsinom olarak tanımlanmaktadır. Adenokarsinom KRK'nin en yaygın türüdür. KRK'ye dönüşen bu polipler, hiperplastik ve enflamatuar polipleri içermektedir. Poliplerin kolon yüzeyinden çıkarılması kanseri başlamadan önleyebilmektedir. Kanser gelişmeye başlayıp başlamadığından emin olmak için polipler de test edilebilmektedir. Çoğu polip kansere dönüşmezken, hemen hemen tüm KRK'ler bir polipte başlamaktadır (Meseha ve Attia, 2023).

Kanser evrelendirilmesi, vücuttaki kanserin derecesini tanımlamakla beraber hangi testlerin gerekli olabileceğini planlamak için kullanılmaktadır. Kolon duvarının yapısı hakkında genel bir fikire sahip olmak, KRK'nin nasıl evrelendirildiğini anlamak için önemlidir. Evrelemenin, kanserin kolon içine veya vücudun diğer bölgelerine yayılıp yayılmadığını saptamak için kullanılan süreç olduğu belirtilmektedir. Evrelendirmenin önemi en iyi tedavi planının belirlenmesine yardımcı olmaktadır (American Cancer Society, 2023b).

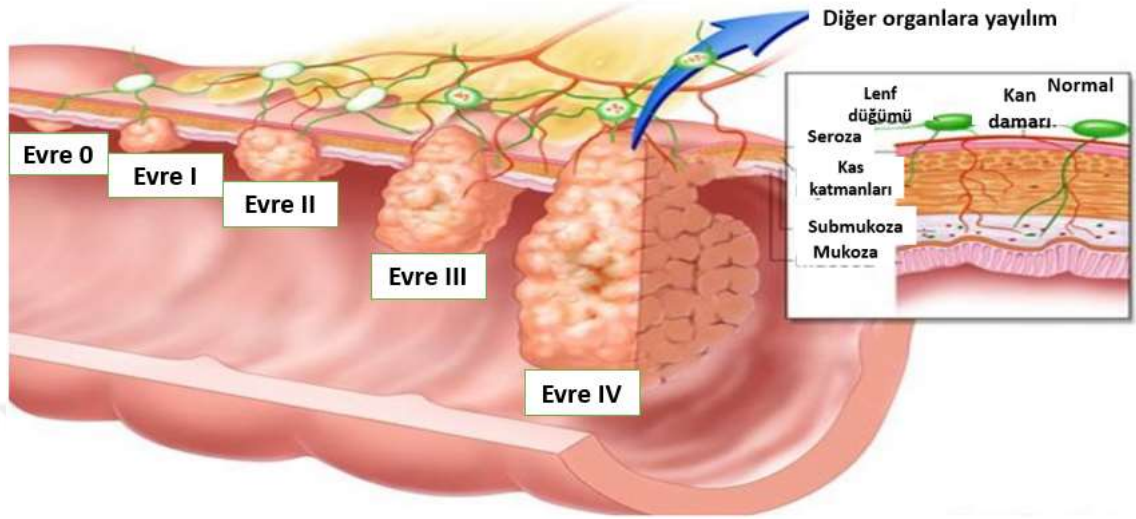
Amerikan Kanser Komitesi (AJCC) KRK'yi evrelendirmek için tümör, nod, metastaz (TNM) sistemini kullanmıştır. TNM sisteminde, kanserin hangi evrede olduğunu saptamak için aşağıdaki bilgiler kullanılmaktadır:

- T: Tümörün kolon duvarına ne kadar büyüdüğü
- N: Herhangi bir lenf düğümünün kanser olup olmadığı
- M: Kanser kolon dışındaki bölgelere veya organlara yayılıp yayılmadığı

Kanserin evrelerini belirlemek için T, N ve M skorları birlikte ele alınmaktadır. KRK'nin 0, I, II, III ve IV olarak numaralandırılan beş evresi vardır.

- Evre 0: Kolon duvarının en iç tabakasında anormal hücreler vardır. Bu anormal hücreler kansere dönüşebilmekte ve kolon duvarının daha derin katmanlarına yayılabilmektedir. Evre 0 KRK, kolon karsinoma in situ olarak da adlandırılmaktadır.
- Evre I: Kanser, kolon duvarının ikinci veya üçüncü tabakasına büyümektedir.
- Evre II: Kanser, kolon duvarının dördüncü tabakasına veya ötesine büyümektedir. Bu evrede kolon duvarının yakınındaki lenf düğümlerinde veya kolon dışındaki alanlarda kanser görülmemektedir.
- Evre III: Kanser kolonun yakınındaki lenf düğümlerine yayılmaktadır veya çoklu tümörler vardır. Çoklu tümörler, kolon çevresindeki yağda bulunan küçük poliplerdir.

- Evre IV: Kanser, kolonun dışındaki bölgelere ve yakındaki lenf düğümlerine yayılmaktadır. KRK, en sık karaciğer ve/veya akciğerlere metastaz yapmaktadır (NCCN Guidelines For Patients, 2022).



Şekil 2. 3. KRK evreleri (American Cancer Society, 2023).

2.1.5. KRK'nin tedavisi

Cerrahi, kemoterapi, radyasyon ve immünoterapi, KRK'yı tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan tedavi stratejilerinden bazılarıdır. Cerrahi rezeksiyon, özellikle kanser ileri veya olgun evrede olduğunda, kanser ilerlemesini kontrol etmek için kritik bir adımdır (Khan ve ark. 2021). Cerrahi rezeksiyonun dezavantajlarından biri, ameliyat sırasında kanserli tümörü çıkarırken sağlıklı kolonun bir kısmının da alınabilmesidir (Lotfollahzadeh ve ark., 2022).

Kemoterapik ilaçlar, kanser hücresi çoğalmasını engelleyerek veya hücre bölünmesini durdurarak kanser hücrelerini öldürmek için kullanılan bir diğer KRK tedavi yöntemidir (Khan ve ark., 2021). Ancak mide bulantısı, ishal, nöropati veya ağız yarası benzeri yan etkilere de neden olmaktadır. Kemoterapik ilaçlar, kansere neden olan genleri bloke ederek veya devre dışı bırakarak KRK'yi tedavi etmektedir (Khan ve ark., 2021). Başlıca kemoterapik ajan olarak 5 fluorourasil (5FU), oksaliptin, lökovorin ve irinotekan (FOLFIRI) kullanılmaktadır (Gupta ve ark., 2019).

KRK'nin tedavisinde bir başka yöntem olan radyasyon, kötü huylu hücrelerin kontrol altına alınmasında iyonize radyasyonunun kullanılmasıdır. Radyasyon tedavisinin yan etkilerinden bazıları yorgunluk, cilt reaksiyonları, gastrointestinal rahatsızlıklardır ancak bazı durumlarda hem erkek hem de kadın hastalarda kanlı dışkı ve infertilite sorunlarına da neden olmaktadır (Krishnamurty ve ark., 2018).

İmmünoterapi günümüzde kanser hücrelerini önlemek için vücudun kendi savunma sistemini kullanan yeni bir tedavi yöntemidir. İmmünoterapinin ilaç veya tedavide beklenen birçok yan etkisi vardır. Bunlar artrit, üşüme, kabızlık, iştah azalması, yorgunluk, grip gibi ciddi olmayan yan etkiler olabileceği gibi kolit, hepatit, akciğer iltihabı, böbrek yetmezliği, tip 1 diyabet gibi ciddi yan etkiler de olmaktadır. Bu yöntemin uzun vadeli yan etkileri olabileceği bilinmekle birlikte nispeten yeni olduğu için bu yan etkilere ilişkin çok fazla net bir bilgiye rastlanmamaktadır (Lavier, 2023). İmmünoterapinin ilerlemiş ve metastatik kanserli hastalarda hayatta kalma oranlarını iyileştirdiği, ancak KRK hastalarında bu tedavi yöntemi ile hayatta kalma oranının sadece %12 olduğu bulunmuştur (Kalyan ve ark., 2018).

2.2. Kolekalsiferol (Vit D3)

D vitamini reseptörü (VDR), kalsiyum ve fosfat metabolizmasında ayrıca homeostazda önemli bir rol oynadığı için son yirmi yılda artan bir önem kazanmıştır. Diğer yandan, diyabet, kalp-damar hastalıkları ve kanser gibi kayda değer klinik sorunlara etkisi ortaya çıktıkça VDR'nin yanı sıra D vitamini de dikkat edilmesinin önemi artmıştır. Son zamanlarda, farklı hastalıklarda ve kanser mortalitesinde D vitamini rolü, epidemiyolojik ve prelinik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Dolaşımdaki yüksek D vitamini seviyesi, çeşitli kanser türlerinin (mesane, meme, kolorektal, mide, yumurtalık, böbrek, hematolojik, akciğer, prostat, baş ve boyun, pankreas karaciğeri ve ayrıca cilt) ilerleme riskini azaltmakla ilişkilendirilmiştir (Al-Ghafari ve ark., 2019).

D vitamini tümör hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını engelleyebileceği saptanmıştır. Yağda çözünen metabolitin aktif formu olan $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, nükleer D vitamini reseptörüne (VDR) bağlanarak çeşitli dokularda performansını göstermektedir. Ayrıca, bazı malign tümör dokularında VDR ekspresyonunun varlığı, VDR'nin kanser etiolojisindeki rolünü yansıtmaktadır. VDR-D vitamini aktivitesinin VDR polimorfizmleri tarafından değiştirilebileceği gösterilmektedir (Fathi ve ark., 2019).

D vitamini takviyesi bağlamında kullanılması amaçlanan spesifik bileşik genellikle belirsizdir. “Takviye” terimi, kolekalsiferolü, ergokalsiferolü, kalsidiolü ve kalsitriolü içermektedir. Doğada, vücudu besleyen en önemli D vitamini formunun kolekalsiferol olduğu gözlenmiştir (Mousavi ve ark., 2023). Tersine, ergokalsiferol birincil olarak sentetik ve daha az kararlı bir üründür ve kolekalsiferolden mikrogram doz başına daha az etkili olduğu belirtilmiştir. Kalsidiol, kolekalsiferolün dolaşımdaki ana metabolitidir. Kalsitriol ise kalsiyumun bağırsaktan aktif taşınmasını düzenleyen ve paratiroid hormonu salgılanmasını baskılayan hormondur. Son veriler, ergokalsiferolün depolama ile stabil olmadığını ve kolekalsiferole göre parçalanmaya karşı çok daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, kolekalsiferolün takviye gibi beslenme işlevleri bağlamında değerlendirilmesi gereken tek D vitamini formu olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Vieth, 2020).

1970’den önce, “D vitamini” terimi yalnızca ergokalsiferol veya kolekalsiferol anlamına gelmekte olup günümüzde ise sırasıyla vitamin D2 ve vitamin D3 olarak bilinmektedir. D2 vitamini (ergokalsiferol) ve metabolitleri normalde dolaşımda saptanamadığından ve ergokalsiferolün kolekalsiferol ile aynı yararları göstermediği için, takviyede sadece kolekalsiferol kullanmanın uygunluğu belirlenmiştir (Vieth, 2020).

2.3. KRK ve D vitamini

KRK’nin önemli risk faktörlerinden biri de düşük D vitamini düzeyidir. D vitamini eksikliği dünyada artış gösteren bir halk sağlığı sorunudur. D vitaminin aktif formu kolekalsiferol olarak bilinen 1,25-Dihidroksikolekalsiferoldür. Bu form bazı biyolojik süreçler ve immün sistem düzenlenmesinde görev almaktadır (Peixoto ve ark., 2022).

D vitamini aynı zamanda kalsiyum homeostazı, doğal ve adaptif bağışıklık gibi çeşitli fizyolojik süreçlerin etkili bir düzenleyicisidir. Moleküler düzeyde D vitamininin etkilerine VDR aracılık eder. D vitamininin kanser hastalığı üzerindeki etkileri bazı yolaklar aracılığıyla gösterilmektedir. VDR, KRK’de daha iyi prognoz ile ilişkilidir. VDR bir transkripsiyon faktörü ve nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesidir (Byers ve ark., 2012).

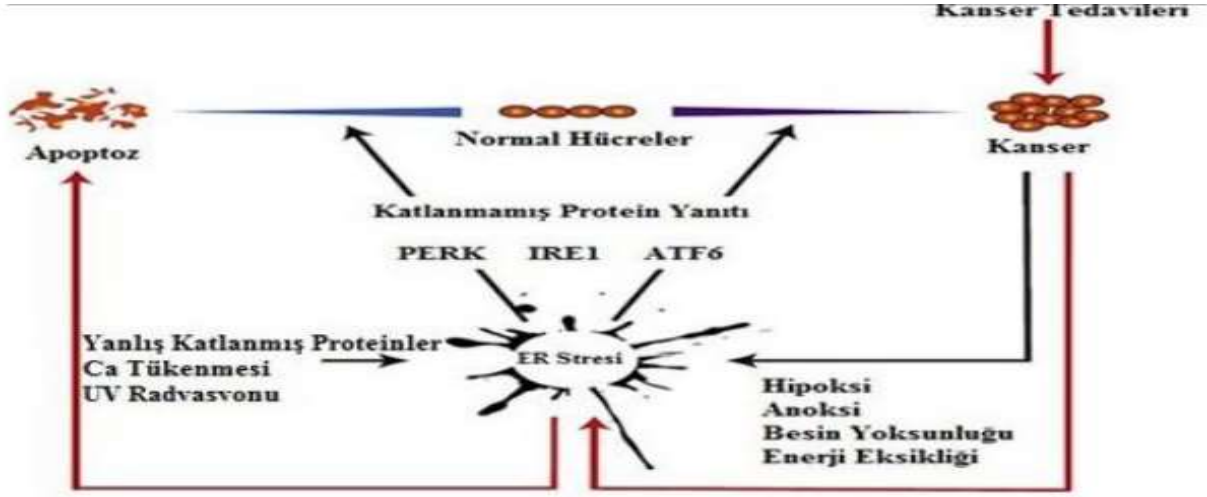
Vitamin D, KRK gelişimi üzerine etkisini; hücre proliferasyonunu azaltarak, anjiyogenezisi inhibe ederek, hücre diferansiyasyonunu destekleyerek, apoptozu stimüle ederek göstermektedir. 1,25-(OH)2D3, majör etkisini; hücre siklus fazlarından G1/S’i inhibe ederek göstermektedir. Tümör invazyon ve metastazını inhibe edici etkisini ise serin proteinazı,

metalloproteinazı ve anjiyogenezisi inhibe ederek göstermektedir. VDR ve 1,25-(OH)2D3; KKK hücrelerinde proliferatif etkiyi azaltırken diferansiyasyonu arttırmakta ve karsinogenezisi inhibe eden genlerin transkripsiyonunu değiştirmektedir. Özellikle in vitro hücre kültürü çalışmalarında kolekalsiferolün VDR'ye bağlanarak hücre proliferasyonunu inhibe eden çeşitli genleri regüle ederek kanserli hücrelerin büyümesini engellediği belirlenmiştir (Fleet ve ark., 2012).

2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi

Hücre içinde birçok görevi bulunan endoplazmik retikulumun (ER) en önemli görevi protein katlanmasının sağlanmasıdır. ER'de protein katlanmasının gerçekleşmesini sağlayan şeker bağlayan protein 78, şeker bağlayan protein 94, lektin benzeri proteinler ve foldazlar bulunmaktadır (Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021).

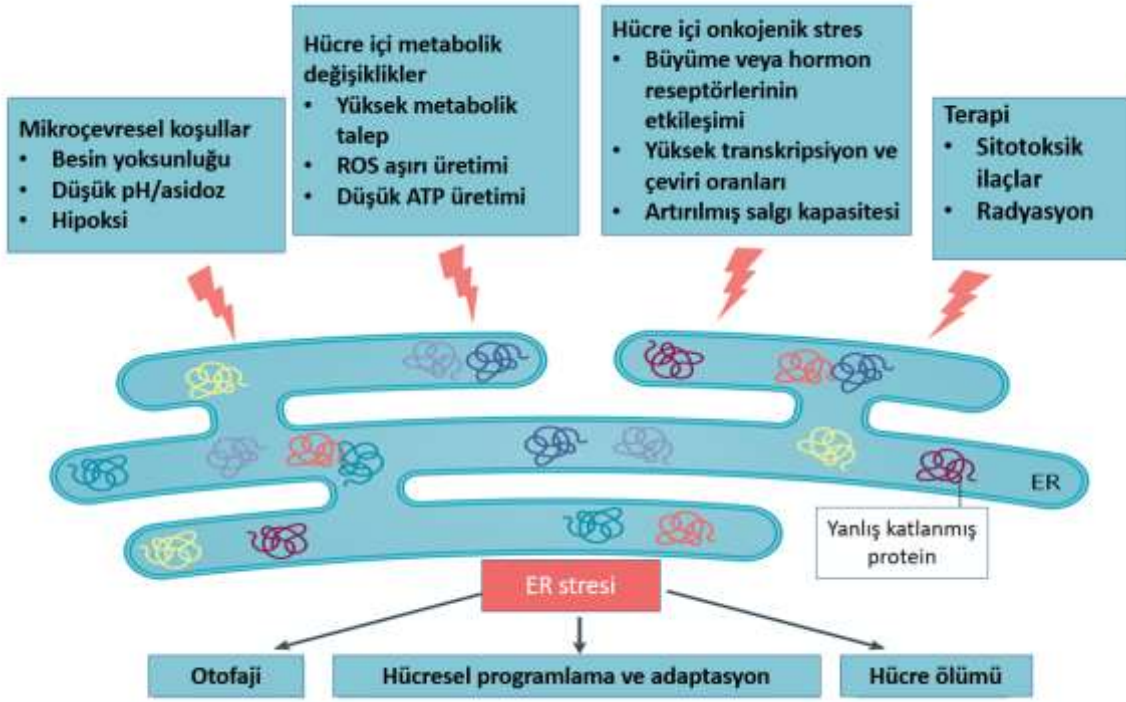
ER, salgılanan ve transmembran proteinlerin sentezlendiği, katlandığı ve değiştirildiği merkezi bir organdır. Bu süreç kusursuz şekilde düzenlenmiş olsa da, çok sayıda dış faktör ve hücreye özgü olaylar, bu organelin protein katlama kapasitesini bozabilmekte, yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesiyle karakterize edilen bir ER stres durumunu tetikleyebilmektedir. Tümörlerde zenginleştirilmiş çeşitli genetik, transkripsiyonel ve metabolik anormallikler, tümör hücrelerinde kalıcı ER stresine neden olan ve sonuçta işlevlerini ve hayatta kalmalarını etkileyen olumsuz mikro ortamlar yaratmıştır (Huang ve ark., 2021). Memeli hücrelerinde, üç ER transmembran proteini, ER stresi sensörleri olarak çalışmaktadır: aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6), inositol gerektiren enzim 1 α (IRE1 α) ve protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinazdır (PERK) (Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021). Proteostaz koşulları altında, moleküler şaperon bağlama-immünoglobulin proteini (BiP; GRP78 olarak da bilinir) bu sensörlere bağlanır ve onları aktif olmayan bir durumda tutar (Walter ve Ron, 2011).



Şekil 2. 4. ER stresi ve kanser (Tatar ve Tatar, 2018).

Anormal ER stresi seviyeleri, kanser, diyabet, otoimmünite gibi farklı hastalıklarla kapsamlı bir şekilde bağlantılıdır. İnsanlarda terapötik etkilere yönelik çalışmaları yönlendirmek için bireysel UPR yolaklarını spesifik olarak inhibe eden veya aktive eden küçük moleküllere ihtiyaç olduğu bilinmektedir. Hücreye özgü ve hastalığa özgü durumlarda benzersiz patofizyolojik süreçler için farklı UPR yolakları aktive edilmektedir. Örneğin, PERK inhibisyonu nörodejenerasyonu hafifletmektedir ancak aynı zamanda pankreatik β -hücre yetmezliğine bağlı diyabete neden olmaktadır (Hughes ve Mallucci, 2019). IRE1 α inhibisyonu üçlü negatif meme kanserini baskılamaktadır ancak kolorektal kansere neden olmaktadır (Spaan ve ark., 2019).

ER stres seviyelerini azaltmak için terapötik yolları göz önünde bulundurmak önemlidir. Kimyasal şaperonlar protein birikmesini önleyerek proteinlerin yanlış katlanmasını ve UPR aktivasyonunu azaltmaktadır. Tauroursodeoksikolik asitin, ER stresini azaltmak için en yaygın kullanılan kimyasal şaperon olduğu bilinmektedir. Proteozom inhibitörleri kanser tedavisinde yoğun olarak çalışılmaktadır. Özellikle, oldukça seçici ve geri dönüşümlü bir proteozom inhibitörü olan bortezomib (Velcade), multipl miyeloma karşı klinik kullanım için onaylanmıştır ve tek bir ajan olarak veya diğer tümör malignitelerine karşı kemoterapötiklerle kombinasyon halinde klinik çalışmalarda yer almaktadır (Richardson ve ark., 2006). İlerlemelere rağmen, kanser tedavisi için UPR'yi hedef alma çabaları hala büyük zorluklarla karşı karşıyadır.



Şekil 2. 5. Tümör mikro çevresinde endoplazmik retikulum stresinin indükleyicileri (Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021).

Kötü huylu transformasyon ve tümör ortamı, ER stresini arttırmaktadır. Tümör iskemisi, önerilen bir mekanizmadır çünkü ER’de protein katlanması ATP gerektirir ve hücre içi glikozun azalmasına duyarlı olduğu bilinmektedir. Kanserdeki yüksek mutasyon yükü, protein katlanmasını etkileyerek ER stresine neden olmaktadır ve tümörün hayatta kalmasının, bu genetik kusurları en aza indirmek için şaperon seviyelerini koruyan sinyal yollarına bağlı olduğu düşünülmektedir (Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021).

Elde edilen son bulgulara göre, bozulmuş ER proteostazının kanserin ayırt edici bir özelliği olduğunu göstermektedir. Kanser hücreleri glikozu hızla metabolize ederek çoğalmaktadır. Bu da tümör kütesinin daha az damarlanmasına, düşük oksijen kaynağına ve besin yoksunluğuna yol açabilmektedir. Ek olarak, onkogenlerin aşırı ekspresyonu protein sentezini ve salgı taleplerini uyarmaktadır. Bu onkojenik koşullar tipik ER stres tetikleyicileridir ve UPR aktivasyonu, tüm UPR sinyal dallarının tümör büyümesine, anjiyogeneze ve bağışıklıktan kaçınmaya katkıda bulunduğu onkojenik dönüşüm sürecini teşvik etmektedir (Urrea ve ark., 2016). Kanser hücrelerindeki yüksek bazal UPR aktivasyon seviyeleri hayatta kalma avantajı sağlamakla birlikte, aynı zamanda hücreleri hayatta kalma-ölüm geçişinin oluşturduğu sıkı bir eşikte tutmaktadır. Kanser hücrelerinin hayatta kalmak için

optimal UPR mekanizmasına ihtiyaç duyması ve UPR yanıtını inhibe etmenin ya da ER stres seviyelerini artırmanın onkogenezi baskılamak için etkili bir yaklaşım olması muhtemeldir.

2.5. Otofaji

Otofaji, hücrel ve organizma homeostazının korunması için temel moleküler bir yoldur (Klionsky ve ark., 2021). Otofaji dokularda hareketsiz ve çoğalan hücrelerin genomik bütünlüğünü korumaktadır (Hewitt ve Korolchuk, 2017). Genellikle sağlıklı hücrelerin neoplastik dönüşümünü engellemektedir. Otofaji, gereksiz veya işlevsiz hücrel bileşenleri ortadan kaldıran ve metabolik substratları geri dönüştüren düzenlenmiş bir mekanizmadır. Tümör mikro çevresindeki stres sinyallerine yanıt olarak, tümör hücrelerinde ve bağışıklık hücrelerinde otofaji yolu değiştirilmektedir. Böylece tümör ilerlemesini, bağışıklığı ve tedaviyi farklı şekillerde etkilemektedir (Xia ve ark., 2021).

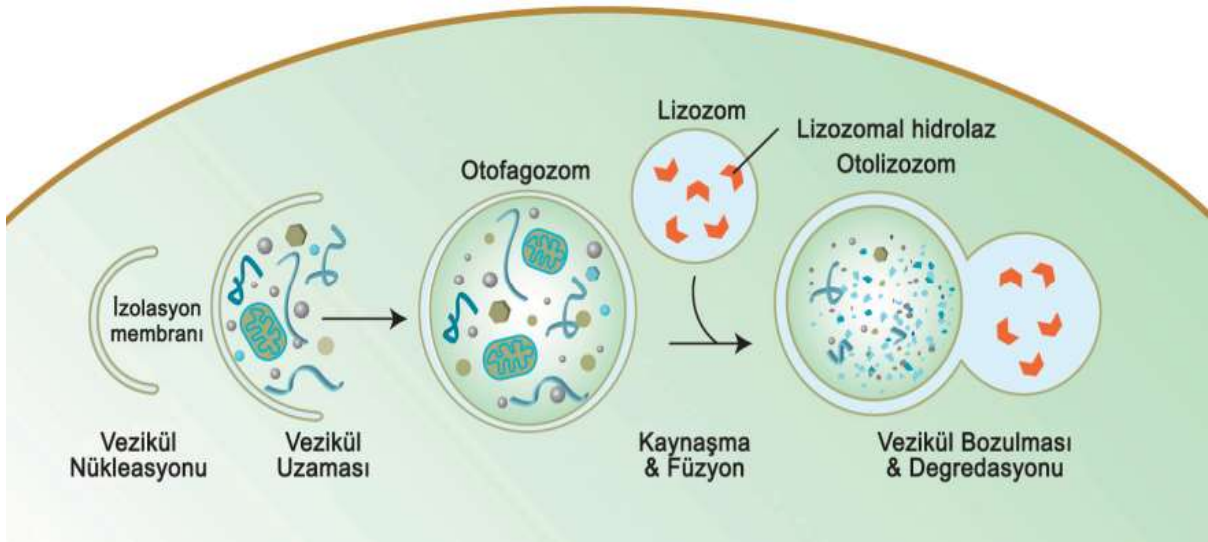
Ayrıca otofajik akışı engelleyen farmakolojik veya genetik müdahaleler, çeşitli prelinik tümör modellerinde erken neoplastik poliplerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Galluzzi ve ark., 2015). Bu nedenle, sağlıklı hücrelerde otofajinin, pro-onkojenik uyarıların etkilerine karşı koymak için bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak çalışması bilinmektedir. Otofajinin aktivasyonu, onkojen kaynaklı yaşlanma programının aktivasyonu için önemli bir adım olarak görülmektedir ve bununla birlikte, otofajinin kanser biyolojisine gerçek katkısının, tümör tipi, hastalık evresi ve konak faktörleri dahil olmak üzere çeşitli yönlerle bağlı olduğu bilinmektedir (Rybstein ve ark., 2018).

Otofaji, lizozomlardaki hücre içi proteinleri ve organelleri tutmak, parçalamak ve geri dönüştürmek için besin yoksunluğu ve stres tarafından indüklenmektedir (Kimmelman ve White, 2017). Hücre büyümesinin ana düzenleyicisi, Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), otofajiyi inhibe ederken enerji sınırlamasının ana sensörü olan AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), otofajiyi aktive etmektedir. Buna karşılık, hipoksi ile indüklenebilir faktörler (HIF) tarafından kontrol edilenlere benzer olarak strese duyarlı yollar otofajiyi aktive etmektedir. Bu pozitif ve negatif düzenleyicilerin uyumu, homeostazı sürdürmek için hücre içi ve hücre dışı ortam ile otofajik bozunmanın kontrolünü düzenlemektedir (Mizushima ve Levine, 2020).

Otofajik bozunmanın ana işlevleri, metabolitlerin geri dönüşümü ve sağlanması yoluyla metabolizmayı sürdürmek, protein ve organel kalitesini kontrol etmek ve hücre içi bakterileri

ortadan kaldırmaktır (Mizushima, 2020). Temel otofaji gen(ler)i (Atg), çift zarlı otofagozom oluşumunun ve zar genişlemesinin başlatılmasını düzenlerken, zara bağlı proteinler organeller gibi yükleri bağlayarak tutmaktadır (Morishita ve Mizushima, 2019). Otofagozomlar daha sonra yükün parçalandığı lizozomlarla birleşerek parçalanma ürünleri, metabolizma ve biyosentez için substrat olarak kullanılabilirler sitoplazmaya salınmaktadır. Hücrel proteinlerin kabaca yarısı, açlık sırasında otofaji tarafından seçici olarak parçalanmak üzere hedeflenmektedir (Mathew ve ark., 2014). Bu nedenle otofaji, hücre içi protein döngüsü için sağlam bir mekanizma olarak bilinmektedir.

Otofaji yoluyla proteinler ve organeller bozulmaktadır. Otofaji ile hasarlı proteinler ve organeller ubiquitin ile tanımlanarak yok edilmekte, böylece toksik olan birikimler önlenmektedir. Otofaji fonksiyonunun yokluğunda hasarlı organeller, özellikle mitokondrilerin ve ayrıca protein kümelerinin biriktiği saptanmıştır. Otofaji substratlarını parçalayamazsa, proinflatuar olduğu için yıkıcıdır ve mitotik sonrası hücrelerde hücrel fonksiyonun bozulmasına yol açmaktadır. Otofajideki kusurlar, seçici doku hasarına ve hastalığa yol açmaktadır ve altta yatan mekanizmaları anlamak, otofajiyi terapötik bir yaklaşım olarak modüle etmenin anahtarı olarak görülmektedir (Mizushima ve Levine, 2020).



Şekil 2. 6. Otofaji aşamalarının şematik gösterimi (Meléndez ve Levine, 2009).

İn vivo deneyler, otofajinin, T hücrelerinin tümör hücrelerini öldürme yeteneğini baskıladığını göstermiştir ve bu durum daha az tip II İnterferon-gama (Ifn γ) ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (DeVorkin ve ark., 2019). Bunun aksine farelerde otofajinin etkisizleştirilmesi, çeşitli antijenik tümörlerin T hücreleri tarafından tanınmasını ve reddedilmesini desteklemektedir (Poillet-Perez ve ark., 2020). Otofaji, tümörün bağışıklıktan kaçması ve büyümesine sebep olan ve doğuştan gelen adaptif bağışıklık tepkilerinin önemli bir inhibitörüdür.

Kanser hücrelerini otofajiye hedeflemek, giderek artan şekilde ilgi görmüş ve otofaji inhibitörlerinin hedefe yönelik tedavi, radyoterapi ve immünoterapi tedavisiyle kombinasyon halinde kullanılmasını güçlü bir şekilde desteklemektedir (Amaravadi ve ark., 2019). Farklı kemoterapötik ilaçlar otofaji üzerinde ters etkiler göstererek hücre ölümüne veya hücrenin hayatta kalmasını sağlamaktadır. Stres sırasında kanser hücrelerinde oluşan otofaji, gen mutasyonları/epigenetik modifikasyonlar nedeniyle olumsuz koşullarda kanser hücrelerinin büyümesinin kontrolünü sağlamaktadır. Böylece hücresel kapasitedeki dengesizlikle otofaji kendiliğinden ortaya çıkabilmektedir (Devenport ve Shah, 2019). Ribozomal stres, ER stresi veya UPR otofajiyi tetikleyebilmektedir. Otofajinin rolü, kemoterapi sırasında hücre sağkalımına aracılık etmekte ve hücre sağkalımının koruyucu mekanizmasını güçlendirmektedir (Alvarez-Meythaler ve ark., 2020). Bu tez projesinde, antikanser etkiye sahip olduğu bilinen kolekalsiferolün kolon kanseri hücrelerindeki olası antikanser etkinliğinin otofaji ve ER stresi ile ilişkili olarak araştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Tez projesinde kullanılan insan kolon kanser hücre hatları HCT 116 (CCL-247™) ve HT-29 (HTB-38™) ATCC'den elde edilmiştir. HCT 116 ve HT-29 kolon kanseri hücreleri %10 fetal sıgır serumu ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren yüksek glikoz DMEM besiyeri ile T75 flasklara ekilmiş ve hücreler 37°C'de %95 nem ortamında, %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

3.1.1 Hücre hattının dondurulması

Flask yüzeyine yapışmış hücelere, yapıştıkları yüzeyden kalkmaları için 1000 µl Tripsin-EDTA uygulanmıştır. Flask 37°C'de 5 dk bekletildikten sonra inverted mikroskop ile hücrelerin kalktığı gözlemlenmiş ve ardından üzerlerine yeni besiyeri eklenmiştir. Hücre-besiyeri içeriği bir falkon tüpe alınmış ve 1500 rpm'de 4 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra pellet 10:1 oranında dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiş besiyeri ile çözdürülmüş ve hücreler kriyotüplere konulmuştur. Ardından hücreler -20°C'de 4 saat bekletildikten sonra -80°C'ye dondurulmak üzere kaldırılmıştır.

3.1.2. Dondurulmuş hücre hatlarının çözdürülmesi

Dondurulmuş hücreler 37 °C'ye alınmış ve hızlı bir şekilde çözdürüldükten sonra içerisinde 5 ml DMEM besiyeri olan falkon tüpe aktarılmıştır. 1500 rpm'de 4 dk santrifüj işleminden sonra süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve pellet besiyeri ile çözdürüldükten sonra HT-29 ve HCT 116 hücreleri flasklara alınarak 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücreler flask yüzeyinin %80-%85'ini doldurana kadar 48 saatte bir besiyeri değiştirme işlemi yapılarak çoğaltılmıştır. Hücreler flask yüzeyinin tamamını kapladığında canlılıklarını korumak için pasajlama işlemi yapılmıştır.

3.1.3. Hücre hattının pasajlanması

Hücreler flask yüzeyinin %80-85'ini doldurduğunda eski besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından flaska hücrelerin kalkması için 1-2 ml Tripsin-EDTA eklenmiştir. Bu işlemden sonra hücreler 3-4 dk boyunca 37 °C'de inkübe edilmiş ve ardından

inverted mikroskopta hücrelerin kalkıp kalkmadığı incelenmiştir. Sonrasında flaska Tripsin-EDTA miktarının iki katı olacak şekilde yeni besiyeri eklenmiş ve hücre-besiyeri içeriği falcon tüpe aktarılmıştır. 1500 rpm'de 4 dk boyunca santrifüj işlemi yapılmış ve süpernatant kısmı otamdan uzaklaştırılmıştır. Pellet yeterli miktarda besiyeri ile homojenize edildikten sonra içerisinde teze besiyeri bulunan flaslara eklenmiş ve hücreler 37 °C'de kültüre edilmiştir.

3.2. Sitotoksisite analizi

Kolekalsiferolün HT-29 ve HCT 116 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) testi kullanılmıştır. Bunun için hücreler 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiş ve plate yüzeyine yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki besiyerleri çekilerek kontrol grupları hariç kuyucuklara 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 750 ve 1000 μM konsantrasyonlarında kolekalsiferol eklenmiştir. Hücreler 24, 48 ve 72 saat süresince inkübe edilmiş ve inkübasyonun sonunda kuyucuklara 150 μl XTT solüsyonu eklenmiştir. 4 saatlik inkübasyonun ardından her bir kuyucuktaki absorbans değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm ve 630 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile % hücre canlılıklarını saptanmıştır.

3.3. Koloni formasyon analizi

Koloni formasyon analizi için 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş kontrol ve doz grubu hücreleri (2×10^3 hücre/kuyucuk) 10 gün boyunca kültüre edilmiş ve 10 günün sonunda hücreler soğuk metanol ile fikse edildikten sonra kristal viyole boyası ile boyanmıştır. Yıkama işleminin ardından plakalar kurumaya bırakılmış ve sonrasında koloniler sayılmıştır.

3.4. Otofaji analizi

Kontrol ve doz gruplarında otofaji analizi hücrelerin perinükleer bölgesindeki küresel vakuollerde, sitoplazma boyunca dağılmış odaklarda veya her ikisinde de birikme özelliği gösteren yeşil bir floresan boya olan CYTO-ID® içeren kit (Enzo Life Sciences, ENZ-51031-0050) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 96-kuyucuklu plakalara ekimi yapılmış kontrol ve doz grubu hücrelerinin (1×10^4 hücre/kuyucuk) besiyerleri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara kit içeriğinde bulunan bufferdan 100 μL koyularak yıkama işlemi yapılmıştır.

Ardından her bir kuyucuğa içerisinde CYTO-ID® ve Hoechst 33342 boyası bulunan bufferdan 100 µl koyulmuştur. 37°C’de 30 dk inkübasyonun ardından kuyucuklar buffer ile yıkanmış ve son olarak her kuyucuğa 100 µL buffer konduktan sonra CYTO-ID® boyası için Ex/Em = 480/530 nm ve Hoechst 33342 boyası için Ex/Em = 340/480 nm dalga boylarında fluoresan mikropate okuyucuda okuma yapılmıştır. Hoechst 33342 boyasından gelen sinyale göre yapılan normalizasyon sonrası belirlenen CYTO-ID® sinyali miktarı otofajik vezikül varlığı ile doğru orantılı olarak değerlendirilmiştir.

3.5. GRP78 seviyesinin belirlenmesi

Kontrol ve doz gruplarında endoplazmik retikulum stresi ile ilişkili olarak GRP78/BiP seviyesi ELISA tabanlı kit (Enzo Life Sciences, ADI-900-214) kullanılarak belirlenmiştir. 6-kuyucuklu plakalara ekimi yapılmış kontrol ve doz grubu hücreleri kit içeriğinde bulunan ekstraksiyon buffer ile liziz edilmiştir. Hücre lizatları ependorf tüplere aktarılmış ve santrifüj sonrası supernatantlar toplanmıştır. Analiz için kit içeriğinde bulunan GRP78 standardı ile dilüe standartlar oluşturulmuştur. Örnek kuyularına 100 µl supernatant, standart kuyularına 100 µl standart koyulmuş ve üzerlerine 50 µl antikor solüsyonu ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyonun ardından kuyucuklara 50 µl konjugat solüsyonu eklenmiş ve tekrar oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda kit içeriğinde bulunan yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi yapılmış ve ardından her kuyucuğa 200 µL 3,3',5,5' tetrametilbenzidin (TMB) ve hidrojen peroksitten oluşan TMB solüsyonu konulmuştur. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyonun ardından kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiş ve 450 nm dalga boyunda mikropate okuyucuda absorbans değerleri belirlenmiştir.

3.6. Apoptoz, ER stresi ve otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Kontrol ve doz gruplarında apoptoz, ER stresi ve otofajide önemli genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri qRT-PZR kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, ardından cDNA sentezlenmiştir.

3.6.1. Hücrelerden total RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi

RNA izolasyonu için 500 µl Trizol 6 kuyucuklu plakalara aktarılmış ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyonun ardından örnekler ependorf tüplere aktarılmıştır. Örnekler faz oluşturmaları için 200 µl kloroform koyulmuş ve ardından 15 dk 12000 rpm’de santrifüj yapılmıştır.

Santrifüjden sonra üst fazları başka ependorf tüplere aktarılmış ve üzerlerine 250 µl izopropanol eklenmiştir. 15 dk 12000 rpm’de santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve pellet 750 µl %70’lik etanol ile yıkanmıştır. 5 dk 12000 rpm’de santrifüj işleminden sonra pellet kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminin sonunda pellet 30 µl nükleaz içermeyen su ile çözülerek -80°C’e kaldırılmıştır.

3.6.2. RNA miktarının ve kalitesinin belirlenmesi

RNA’ların kalite ve miktarının belirlenmesi için RNA örneklerinin nanodrop cihazında ölçümleri yapılmıştır. UV ölçümleri A260/A230 için 2,0-2,4 ve A260/A280 için 2±0,1 arasında olan RNA örnekleri analizlerde kullanılmıştır. DNA kontaminasyonunu önlemek amacı ile RNA örneklerine üretici firmanın (Thermo Scientific, #EN0521) protokolü doğrultusunda DNase-I enzimi eklenerek DNase işlemi uygulanmıştır. Bu nedenle, 2 µg RNA örneğine 2 µl 10X buffer ve 2 µl 1U/µl DNase-I enzimi ilave edilmiştir. 37°C’de 30 dk inkübasyondan sonra örnekler 2 µl 50 mM EDTA eklenmiş ve 65°C’de 10 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. DNase uygulanmış RNA örneklerinin tekrar ölçümleri yapılmış ve aynı gün cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.6.3. cDNA sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi üretici firmasının talimatlarına göre (iScript™ cDNA sentez kiti, Bio-Rad, 170-8891) yapılmıştır. Bu amaçla 1µg total RNA örneğine 4 µl 5X iScript reaksiyon karışımı ve 1 µl Reverse Transkriptaz enzimi eklenmiştir. Ardından 25°C’de 5 dk, 46°C’de 20 dk ve 95°C’de 1 dk şeklindeki cDNA sentez protokolü uygulanmıştır.

3.6.4. qRT-PZR analizi

qRT-PZR kullanılacak hedef genlere yönelik primerler Primer Quest (<http://eu.idtdna.com/home/home.aspx>) programı kullanılarak tasarlanmıştır. Ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş olan genler Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Reaksiyon için tüp içerisine 5 µl SYBRGreen 2X qPZR MasterMix (ABM, MasterMix-R), 5 pMol ileri primer, 5 pMol geri primer, 2 µl cDNA konmuş ve toplam hacim nükleaz içermeyen su ile 10 µl’ye tamamlanmıştır. Ardından 95°C’de 10 dk, 95°C’de 15 dk ve 60°C’de 60 saniye olacak şekilde 40 döngü halinde PZR protokolü oluşturulmuş ve reaksiyon Gerçek zamanlı PZR Sistemi (Bio-Rad, CFX Connect)’nde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca primer dimeri/yanlış bağlanmayı

değerlendirmek amacı ile erime eğrisi analizi de gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 40 döngünün sonunda 95°C’de 10 saniye inkübasyonun ardından sıcaklık 65°C’ye düşürülmüş, 0,5°C’lik artışlar ile sıcaklık 95°C’ye kademeli olarak yükseltilmiştir. Analiz için eşik döngü değerleri (Ct) kaydedilmiştir. Gen ekspresyonlarının kantitatif analizi ise $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile web tabanlı “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” programı kullanılarak belirlenmiştir. *ACTB* referans gen olarak kullanılmıştır.

Tablo 3. 1. qRT-PZR analizi ile ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş genler

Gen	Gen
<i>CASP3</i> ; Kaspaz 3	<i>ATF6</i> ; Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
<i>CASP7</i> ; Kaspaz 7	<i>ERN1</i> ; ER-nukleus sinyali 1
<i>CASP8</i> ; Kaspaz 8	<i>EIF2A</i> ; Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2A
<i>CASP9</i> ; Kaspaz 9	<i>ATG5</i> ; Otofaji ilişkili 5
<i>BAX</i> ; BCL2 ile ilişkili X, apoptoz düzenleyici	<i>ATG7</i> ; Otofaji ilişkili 7
<i>BCL2</i> ; BCL2 apoptoz düzenleyici	<i>ATG12</i> ; Otofaji ilişkili 12
<i>CYCS</i> ; Sitokrom c	<i>BECLIN</i> ; Beclin
<i>FADD</i> ; Ölüm domaini ile ilişkilendirilen FAS	<i>MAP1LC3A</i> ; Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 alfa
<i>ATF4</i> ; Aktive edici transkripsiyon faktörü 4	<i>MAP1LC3B</i> ; Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 beta
<i>GRP78</i> ; Isı şoku protein ailesi A (Hsp70) üye 5	<i>ATG16L1</i> ; Otofaji ile ilgili 16 benzeri 1
<i>CHOP</i> ; DNA hasarı indüklenebilir transkript 3	<i>SQSTM1</i> ; Sekestozom 1
<i>PERK</i> ; Ökaryotik transkripsiyon başlatma faktörü 2 alfa kinaz 3	

3.7. İstatistiksel analiz

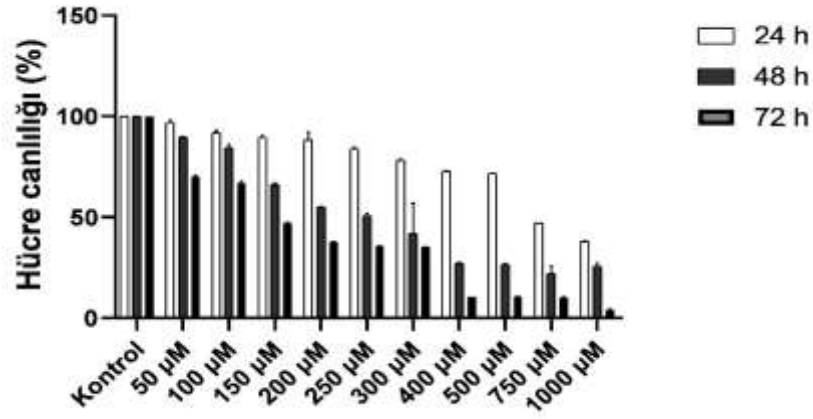
Gruplar arası karşılaştırma GraphPad Prism yazılımı (Sürüm 8.0.2, San Diego, CA) kullanılarak tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile yapılmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



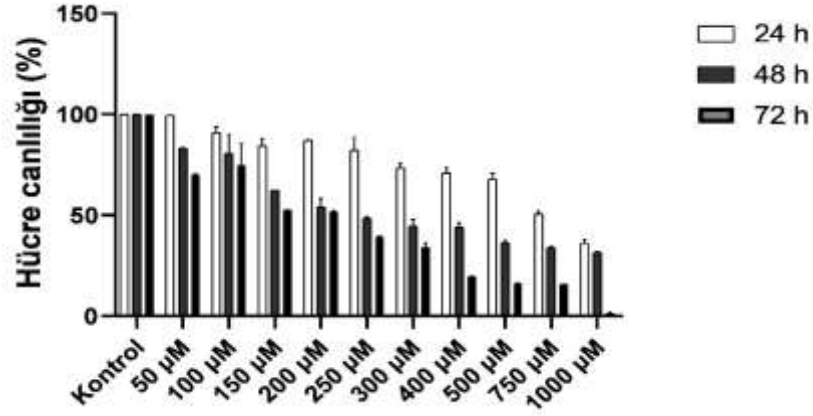
4. BULGULAR

4.1. Kolekalsiferolün kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi

HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde kolekalsiferol uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi XTT analizi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla hücreler 24, 48 ve 72 saat süresince 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 ve 1000 μM konsantrasyonlarında kolekalsiferol ile muamele edilmiştir. XTT analizi sonuçlarına göre kolekalsiferol uygulaması kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı şekilde inhibe etmiştir (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2).



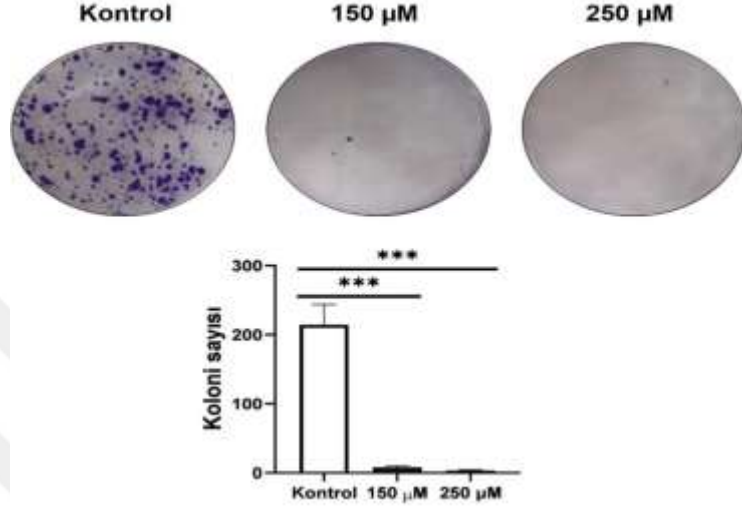
Şekil 4. 1. Kolekalsiferol uygulamasının HCT 116 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi



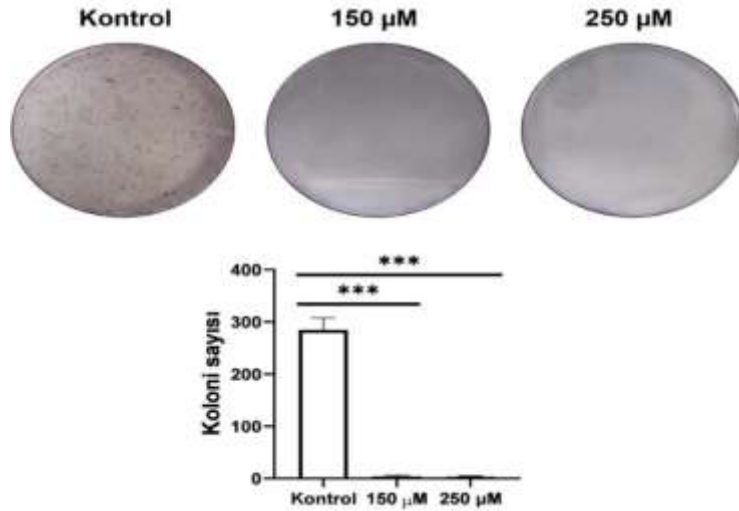
Şekil 4. 2. Kolekalsiferol uygulamasının HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi

Devam eden analizlerde hücreler HCT 116 hücreleri için sırası ile %66,26 ve %50,78; HT-29 hücreleri için ise sırası ile %62,38 ve %48,42 canlılık değerlerini veren 150 ve 250 μM konsantrasyonlarında kolekalsiferol ile 48 saat süresince muamele edilmiştir.

HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde kolekalsiferol uygulamasının hücre proliferasyonu üzerine etkisi koloni formasyon analizi ile de değerlendirilmiştir. Buna göre her iki hücre hattında da 150 ve 250 μM konsantrasyonlarında kolekalsiferol uygulaması sonrasında hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4) ($p < 0,05$).



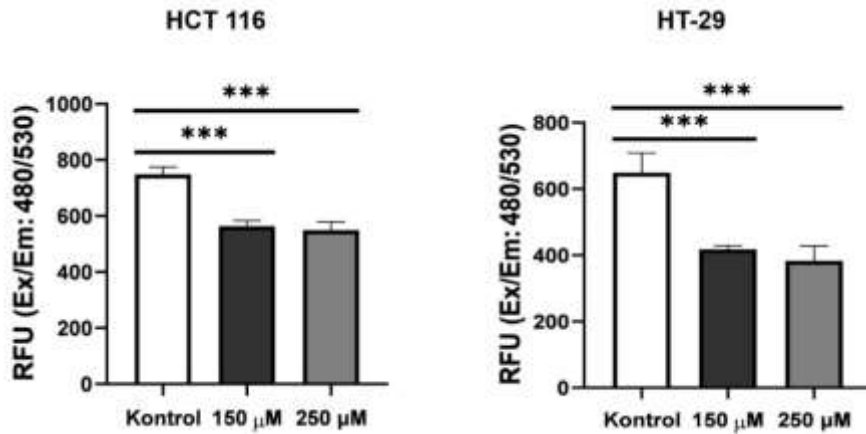
Şekil 4. 3. Kolekalsiferol uygulamasının HCT 116 hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisi *** $p < 0,001$



Şekil 4. 4. Kolekalsiferol uygulamasının HT-29 hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisi *** $p < 0,001$

4.2. Kolekalsiferolün kolon kanseri hücrelerinde otofaji üzerine etkisi

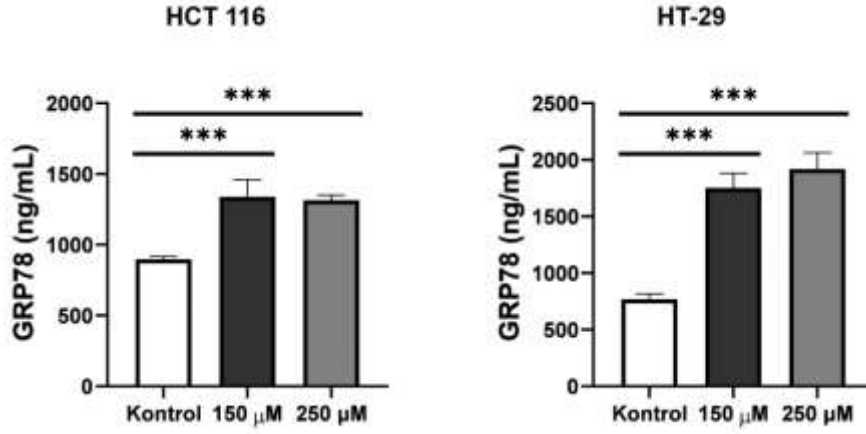
Kolon kanseri hücrelerinde kolekalsiferol uygulamasının otofaji üzerine etkisi otofajik kompartmanların Cyto-ID boyası ile boyanması esasına dayanan floresan temelli kit kullanılarak değerlendirilmiştir. Otofaji analizi sonuçlarına göre HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde 48 saat süresince 150 ve 250 µM konsantrasyonlarında kolekalsiferol uygulaması sonrasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında otofajide anlamlı şekilde azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.5) ($p<0,05$).



Şekil 4. 5. Kolon kanseri hücrelerine kolekalsiferol uygulamasının otofaji üzerine etkisi *** $p<0,001$

4.3. Kolekalsiferolün kolon kanseri hücrelerinde ER stresi üzerine etkisi

Kolekalsiferolün kolon kanseri hücrelerinde ER stresi üzerine etkisi ER stresinin önemli belirteçlerinden biri olan GRP78/BiP seviyesinin belirlenmesini sağlayan ELISA tabanlı kit ile belirlenmiştir. Buna göre her iki hücre hattında da 150 ve 250 µM konsantrasyonlarında kolekalsiferol uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GRP78/BiP anlamlı şekilde artmıştır (Şekil 4.6) ($p<0,05$).

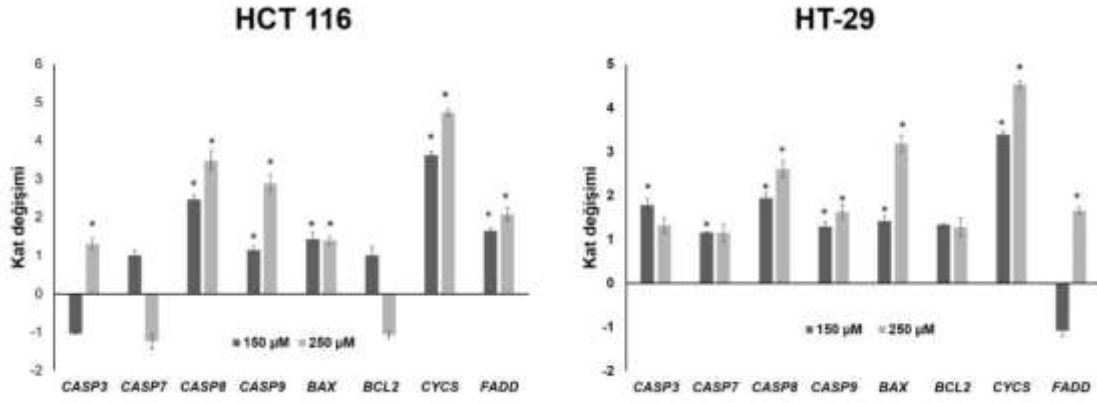


Şekil 4. 6. Kolon kanseri hücrelerine kolekalsiferol uygulamasının GRP78/BiP seviyesi üzerine etkisi
***p<0,001

4.4. Kolekalsiferolün kolon kanseri hücrelerinde apoptoz, ER stresi ve otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi

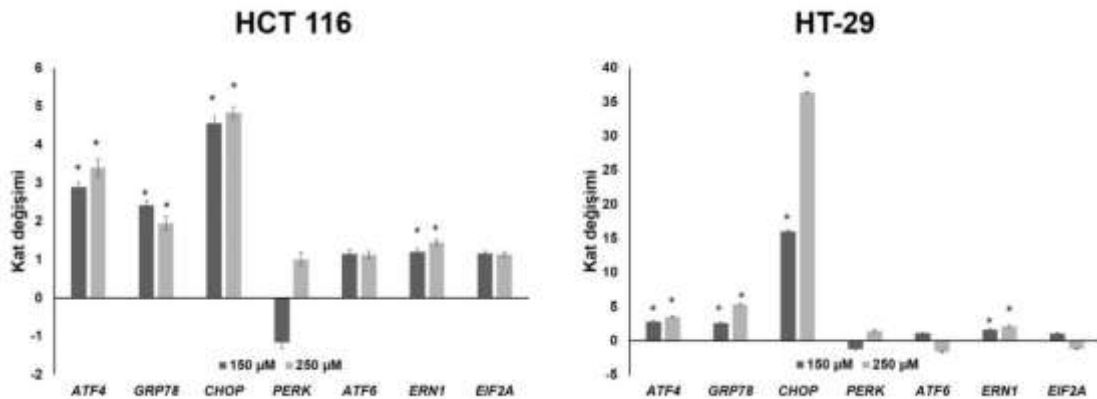
Kolon kanseri hücrelerinde 48 saat süresince 150 ve 250 µM konsantrasyonlarında kolekalsiferol uygulamasının apoptoz, ER stresi ve otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi qRT-PZR analizi ile değerlendirilmiştir. Buna göre HCT 116 hücrelerinde 150 µM konsantrasyonunda kolekalsiferol uygulaması sonrası apoptoz ile ilişkili *CASP8*, *CASP9*, *BAX*, *CYCS* ve *FADD* genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 2,47, 1,15, 1,43, 3,62 ve 1,65 kat anlamlı artış meydana gelmiştir. 250 µM konsantrasyonunda kolekalsiferol uygulaması sonrasında ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BAX*, *CYCS* ve *FADD* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırası ile 1,31, 3,48, 2,89, 1,4, 4,74 ve 2,08 kat anlamlı artış tespit edilmiştir (Şekil 4.7) (p<0,05).

HT-29 hücrelerinde ise 150 µM konsantrasyonunda kolekalsiferol uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *CASP3*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9* ve *CYCS* genlerinin ekspresyon seviyelerini sırasıyla 1,78, 1,16, 1,94, 1,29, 1,42 ve 3,39 kat anlamlı şekilde artırmıştır. HT-29 hücrelerine 150 µM konsantrasyonunda kolekalsiferol uygulaması sonrasında ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *CASP8*, *CASP9*, *BAX*, *CYCS* ve *FADD* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırası ile 2,6, 1,63, 3,19, 4,53 ve 1,66 kat anlamlı artış tespit edilmiştir (Şekil 4.7) (p<0,05).



Şekil 4. 7. Kolon kanseri hücrelerine kolekalsiferol uygulamasının apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi * $p < 0,05$

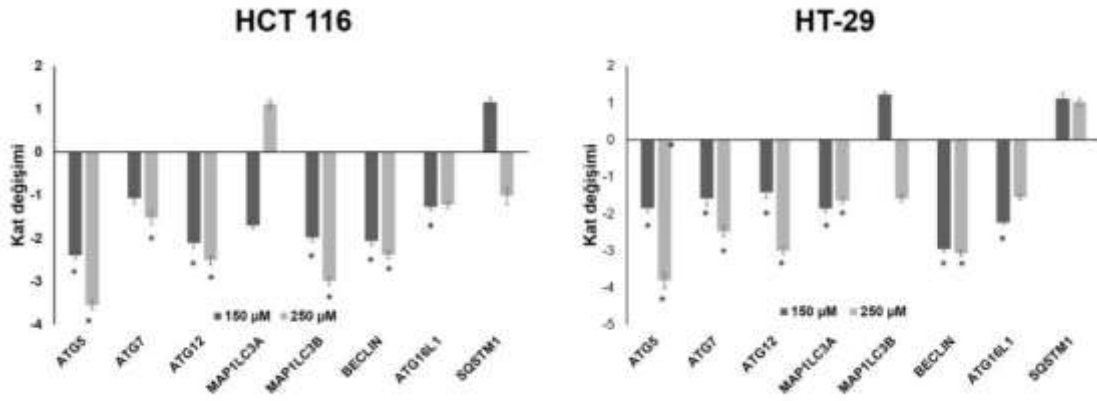
ER stresi ile ilişkili genlere bakıldığında ise HCT 116 hücrelerinde 150 µM konsantrasyonunda kolekalsiferol uygulaması sonrasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *ATF4*, *GRP78*, *CHOP* ve *ERN1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırası ile 2,89, 2,42, 4,56 ve 1,2 kat anlamlı artış tespit edilmiştir. 250 µM konsantrasyonunda kolekalsiferol uygulaması ise bu genlerin ekspresyon seviyelerini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3,4, 1,95, 4,84 ve 1,45 kat anlamlı şekilde artırmıştır (Şekil 4.8) ($p < 0,05$). HT-29 hücrelerinde ise 150 µM konsantrasyonunda kolekalsiferol uygulaması *ATF4*, *GRP78*, *CHOP* ve *ERN1* genlerinin ekspresyon seviyelerini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 2,78, 2,62, 16,03 ve 1,65 kat anlamlı şekilde artırmıştır. 250 µM konsantrasyonunda kolekalsiferol uygulaması sonrasında ise bu genlerin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3,53, 5,31, 36,38 ve 2,11 kat anlamlı artış tespit edilmiştir (Şekil 4.8) ($p < 0,05$).



Şekil 4. 8. Kolon kanseri hücrelerine kolekalsiferol uygulamasının ER stresi ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi * $p < 0,05$

HCT 116 hücrelerinde 150 µM konsantrasyonunda kolekalsiferol uygulaması otofaji ile ilişkili *ATG5*, *ATG12*, *MAP1LC3B*, *BECLIN* ve *ATG16L1* genlerinin ekspresyon seviyelerini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 2,39, 2,1, 1,98, 2,06 ve 1,27 kat anlamlı şekilde azaltmıştır. 250 µM konsantrasyonunda kolekalsiferol uygulaması sonrasında ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *ATG5*, *ATG7*, *ATG12*, *MAP1LC3B* ve *BECLIN* genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3,55, 1,52, 2,51, 2,99 ve 2,38 kat anlamlı azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.9) ($p<0,05$).

HT-29 hücrelerinde ise 150 µM konsantrasyonunda kolekalsiferol uygulaması sonrasında *ATG5*, *ATG7*, *ATG12*, *MAP1LC3A*, *BECLIN* ve *ATG16L1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1,84, 1,59, 1,42, 1,85, 2,95 ve 2,23 kat anlamlı azalma tespit edilmiştir. 250 µM konsantrasyonunda kolekalsiferol uygulaması ise *ATG5*, *ATG7*, *ATG12*, *MAP1LC3A* ve *BECLIN* genlerinin ekspresyon seviyelerini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırası ile 3,8, 2,48, 3, 1,64 ve 3,06 kat anlamlı şekilde azaltmıştır (Şekil 4.9) ($p<0,05$).



Şekil 4. 9. Kolon kanseri hücrelerine kolekalsiferol uygulamasının otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi * $p<0,05$

5. TARTIŞMA

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğünde, vücudun hemen hemen her organında veya dokusunda başlayabilen, normal sınırlarını aşarak vücudun bitişik kısımlarına ve/veya diğer organlara yayılabilen geniş bir hastalık grubudur (WHO, 2023). Sonraki süreç metastaz olup, metastaz kanserden ölümlerin önemli bir nedenidir (Sung ve ark., 2021; WHO, 2023). Dünyada 2020 yılında tahmini yaşa göre standardize edilmiş ölüm oranları kanserden her iki cinsiyet içinde sırasıyla 18,0 ile akciğer, 13,6 ile meme, 9,0 KRK ve 8,7 karaciğer kanseridir (GLOBOCAN, 2020a). Kanserden ölümlerin üçüncü sırasında KRK yer almaktadır.

KRK, kolon veya rektumdaki hücrelerin kontrolden çıktığı geniş bir hastalık grubu olarak tanımlanmaktadır. GLOBOCAN verilerine göre son beş yıllık tahmini yaygın vaka sayısı (prevelans) Dünya’da tüm yaş erkekler için KRK prostat kanserinden hemen sonra görülen en sık ikinci kanser, kadınlarda da aynı şekilde KRK meme kanserinden hemen sonra görülen ikinci malignitedir (GLOBOCAN, 2020b). Hem ölümcül hem de görülme sıklığı fazla olan KRK için erken tanı ve teşhis günümüzde önem kazanmaktadır. Ülkemizde KRK için gaitada gizli kan testi ve ardından kolonoskopiden oluşan kolorektal karsinom tarama programları yürütülmektedir (Sağlık Bakanlığı, 2017). Bu yürütülen programlara rağmen, hastaların %25’inde tanı anında metastaz vardır ve hastaların %10-20’sinde takip sırasında metastaz geliştiği gözlemlenmiştir (Mendoza-Moreno ve ark., 2022).

1,25(OH)2D (D vitamini), spesifik reseptörlere bağlanarak gerçekleştirilen çok çeşitli fizyolojik işlevlere sahip bir steroid hormondur. D vitamininin genomik ve genomik olmayan etkilerine sırasıyla klasik nükleer ve klasik olmayan membranöz VDR aracılık etmektedir (Bikle, 2014). VDR sadece kalsiyum regülasyonunda yer alan hücrelerde ve dokularda bulunmaz, aynı zamanda malign hücrelerde de eksprese edilir, bu da D vitamininin kanser büyümesi ve ilerlemesinde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. (Zheng ve ark., 2017).

Çoğu dokuda 1-alfa hidroksilaz enzimi sayesinde aktif vitamin D sentezi D vitamininin reseptör düzeyindeki etkisi aktif vitamin D sayesinde olmaktadır. Dokular üzerinde D vitamininin etkinliği hormon sekresyonunun düzenlenmesi, immün fonksiyonların düzenlenmesi ve özellikle tez konusu olan bağırsak kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyon ve farklılaşmasının düzenlenmesi şeklindedir. İn vivo ve in vitro olarak kanser üzerinde yapılan

çalışmalarla aktif D vitamininin muhtemel antikanser etkisi ispatlanmıştır. D vitamini; kolekalsiferol, kalsidiol, kalsiferol, ergokalsiferol (vitamin D2), kolekalsiferol (vitamin D3), dihidrokskolekalsiferol, 25 hidrokskolekalsiferol, 1,25 dihidroksivitamin D Vitamin D2 (kalsiferol) ve D3 (kolekalsiferol) şeklinde isimlendirilmiştir (Byers ve ark., 2012). Önemli organlardan olan karaciğer, D2 ve D3'ü kalsidiale (=25 hidroksivitamin D =25 hidrokskolekalsiferol) çevirmekte, daha sonra böbrekler kalsidiolü aktif kasitriole (=1,25 dihidroksivitamin D) dönüştürmektedir. Kolekalsiferol, kemik mineralizasyonuna yardım ederek kalsiyum ve fosforun barsaktan daha fazla emilmesini sağlamaktadır.

Düşük D vitamini seviyeleri solid ve non-solid kanser riski, gelişimi ve büyümesi ile ilişkilendirilmiştir (Yuan ve ark., 2019). Kanser hastalarında D vitamini takviyesi olumlu prognoz ile bağdaştırılmıştır (Yonaga ve ark., 2019). D vitamini antikanser etkileri, proliferasyonun inhibisyonu, apoptoz ve otofajik hücre ölümünün indüksiyonu ve anjiyogenezin baskılanması gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirilir ve D vitamininin tümör baskılanmasında önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir (Fleet ve ark., 2012). Bu güçlü antitümör etki muhtemelen hücre içi kalsiyum salınımları üzerindeki D vitamini etkisinden kaynaklanmaktadır ve hücre büyüme ve apoptoz mekanizmalarını etkileyebilmektedir, ancak sistemik kalsiyum emilimiyle ilgisi olmayan diğer birçok klasik olmayan D vitamini etkisinin de tümör büyüme inhibisyonunda rolü vardır (Fathi ve ark., 2019).

Birçok sayıda gözlemsel çalışma, D vitamini durumunun değerlendirilmesinde bir belirteç olarak kullanılan dolaşımdaki 25(OH)D (hidroksi vitamin D) seviyelerinin kanser riski ve prognoz ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (Song ve ark., 2018). Dolaşımdaki düşük 25(OH)D seviyeleri ile kolorektal, prostat ve meme kanseri riski arasında güçlü bir ilişki olduğu saptanmıştır (Markotic ve ark., 2019). KKK, özellikle geç evrelerde, D vitamini eksikliği ile ilişkilidir (Skender ve ark., 2017). Ayrıca kanser şiddeti ile güçlü bir şekilde ilişkili olan 1 α -hidroksilaz downregüle ekspresyonu ile de bağlantılıdır ve dolaşımdaki daha yüksek 25(OH)D seviyeleri hem Asya hem de Batı popülasyonlarında KKK riskinde azalma ile ilişkilendirilmektedir (Fedirko ve ark., 2019).

D vitamininin prostat kanserindeki rolüne ilişkin farklı olan bulgular, prostat kanseri etiyojisi ve ilerlemesinde rol oynadığı bilinen insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) eksenini bileşenlerinin, D vitamininin antiproliferatif etkisini tehlikeye atabilecek etkileşimiyle

açıklanabilmektedir. Miles ve arkadaşları, insülin benzeri büyüme faktörü 2 (IGF2) varlığında yüksek 25(OH)D seviyelerinin prostat kanseri riskini artırabileceğini gösterilmiştir (Miles ve ark., 2017).

Prostat modeline benzer şekilde, meme kanseri için de farklı veriler rapor edilmiştir. Büyük ölçüde açıklandığı gibi, dolaşımdaki yüksek 25(OH)D seviyeleri ile meme kanseri riski arasında ters bir korelasyon bildirilmiş ve postmenopozal kadınlarda da doğrulanmıştır (Estébanez ve ark., 2018; Machado ve ark., 2019). Buna karşılık, gözlemsel ve vaka-kontrol çalışmalarının meta-analizlerini içeren çeşitli çalışmalarda 25(OH)D düzeyleri ile meme kanseri riski arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır (Dimitrakopoulou ve ark., 2017). Mevsimselliğe göre düzeltilmesi gereken D vitamini durumunun zamanlamasının farklı karıştırıcı faktörlerle birlikte değerlendirilmesi, D vitamininin meme kanseri riskindeki rolüne ilişkin çelişkili verileri potansiyel olarak açıklayan bir alternatif sağlayabilir. Bununla birlikte, bazı araştırmacılar yaz mevsiminde D vitamini eksikliği olan kadınların, sadece kış mevsiminde D vitamini eksikliği olanlara kıyasla, tüm yıl boyunca eksikliği sürdürme olasılığının daha yüksek olduğunu ve meme kanseri riskinin daha yüksek olduğunu düşünmektedir (Welsh, 2018). D vitamininin kanser riskindeki önemini yanı sıra, mevcut veriler tam olarak açıklanmamış olsa da, kanser gelişimi ve tümör gelişimi ile potansiyel ilişkisini araştırmak için D vitamini düzeyleri daha fazla çalışılmalıdır.

D vitamini seviyelerinin fizyolojik aralığın üst sınırında olması faydalı olabilir. Bununla birlikte, D vitamininin, özellikle de 1,25(OH)2D3'ün antikanser aktiviteleri, hiperkalsemiye neden olan farmakolojik dozlar gerektiriyor gibi görünmektedir. 1,25(OH)2D3 için 0.1 µg/kg kadar düşük bir dozda, kalsiyum birikimleri hayati organlarda hasara neden olmaktadır (Akkoyun ve ark., 2014). Bu nedenle, 1,25(OH)2D3'ün terapötik dozlardaki hiperkalsemik etkileri, bir anti-kanser ajanı olarak kullanımını ciddi şekilde sınırlamaktadır.

Skobowiat ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada yeni hidroksillenmiş vitamin D₃ türevi olan 20(OH)D₃'ün NSG farelerinde insan melanomunun büyümesini engellediğini göstermiştir. SKMel-188 insan melanom hücrelerinin deri altından enjekte edildiği yirmi bağışıklık sistemi baskılanmış hayvandan yalnızca tümör gelişen fareler daha ileri çalışma ve analizler için dâhil edilmiştir. İlk palpe edilebilir ve ölçülebilir tümörler (≥ 1 mm³) 20 fareden 4'ünde implantasyonu takip eden 9. günde ortaya çıktığında (kontrol ve tedavi grubunda eşit prevalans), randomizasyon koluna göre tüm hayvanlar için 20(OH)D₃ veya araç ile tedaviye

başlanmıştır. İmplantasyonu takip eden 12. gün (tedavinin 3. günü) itibariyle hayvanların %40'ında palpe edilebilir tümörler gelişmiştir. Hem 20(OH)D3 hem de araçla tedavi edilen farelerin (n=20) tamamında 14. güne (tedavinin 5. günü) kadar tümör gelişmiştir. Daha sonra her iki grupta da sürekli tümör büyümesi gözlenmiştir, ancak 20(OH)D3 ile tedavi edilen farelerde tümör büyümesi araçla tedavi edilen farelere kıyasla azalmıştır. Tedavinin 6. gününde, gerçekleşen tümör hacmi 20(OH)D3 ile tedavi edilen grupta 262,35 mm³ iken araçla tedavi edilen grupta 674,11 mm³ olmuştur; bu da tedavi edilen ve kontrol grubundaki tümör hacminde sırasıyla %61'lik bir azalmayı göstermiştir. 20(OH)D3'ün melanom büyümesi üzerindeki inhibitör etkisi, implantasyon sonrası 13, 18 ve 21. günlerde tümör hacmi veya tümör boyutlarının geometrik ortalaması ile ölçüldüğünde istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (Skobowiat ve ark., 2016).

1,25(OH)2D3'ün fenotipik aktivitesine, kanonik sinyal iletim yolu olarak tanımlanabilecek VDR ile etkileşiminin aracılık ettiği kabul edilmektedir. Benzer şekilde, kalsemik olmayan 20(OH)D3 de melanom hücrelerinde VDR'yi aktive ederek aşağı yönde anti-proliferatif ve antitümörijenik etkilere neden olabileceği gözlenmiştir (Slominski ve ark., 2014; Christakos ve ark., 2016) Daha önce Janjetovic ve arkadaşları 20(OH)D3 ve metabolitlerinin keratinositlerde ve melanom hücrelerinde VDR ile etkileşim yoluyla NF-κB (Nükleer Faktör kappa B) sinyalini inhibe ettiğini saptamışlardır (Janjetovic ve ark., 2010). Dolayısıyla, 20(OH)D3 tümör hücrelerinde NF-κB'nin inhibisyonu ve stromada proinflamatuvar aktivitenin azaltılması yoluyla melanom büyümesini engelleyebilir.

D vitaminini KRK'ye karşı koruyucu rolü ile tutarlı olarak, kolon epitelini yüksek düzeyde VDR eksprese etmektedir. KRK hücrelerinde ve ilişkili fibroblastlarda ve deney hayvanlarında yapılan birçok çalışma, VDR aracılı D vitamini-KRK etkilerinin geniş bir serisini göstermiştir (Ferrer-Mayorga ve ark., 2019; Fernández-Barral ve ark., 2020; Carlberg ve Velleuer, 2022) Ek olarak, KRK'nin ana bileşeni olarak yapısal aktif Wnt/β-katenin sinyaline sahip farelerde VDR'nin germline silinmesi, bağırsak tümör yükünün artmasına neden olmuştur (Larriba ve ark., 2011; Zheng ve ark., 2012)

D vitamini güçlü bir steroid hormonu kolekalsiferolün öncüsüdür. Kolekalsiferol, kanser riskini ve prognozunu belirlemede rol oynayabilecek çok sayıda hücre mekanizmasının düzenlenmesini sağlamaktadır. Kolekalsiferol, hücre proliferasyonunu azaltmak, hücre farklılaşmasını ve apoptozu artırmak ve hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 (HIF-1) yoluyla

anjyogenezini inhibe etmekte dâhil olmak üzere kanserin ilerlemesini önlemektedir (Wang ve ark., 2019). Bu tez projesinde de kolekalsiferolün insan kolon kanseri üzerindeki olası antikanser etkinliği endoplazmik retikulum stresi ve otofaji üzerinden değerlendirilmiştir.

Kolekalsiferolün insan KRK hücrelerinde hücre büyümesini baskılama ve/veya farklılaşmayı indüklemeye eğiliminde olduğu genel olarak kabul edilmiştir. Huang ve ark. (2021) kolekalsiferolün potansiyel olarak faydalı etkisini incelemek için iki insan KRK hücre hattı olan HT-29 ve SW480 kullanmış ve deneylerin çoğunda 48 saat boyunca 100 nM kolekalsiferol kullanmışlardır. Wang ve ark. (2019) yaptıkları bir çalışma da, altı günlük bir süre boyunca HT-29 hücrelerinde kolekalsiferolün (10⁻¹¹ ila 10⁻⁶ M) önemli bir doza bağımlı, büyüme önleyici etkisi olduğunu bildirmiştir. Palmer ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada, 48 saat boyunca 100 nM kolekalsiferolün SW480 hücrelerinde farklılaşmayı desteklediğini saptamıştır. Kolekalsiferolün KRK hücreleri üzerindeki etkisi birlikte, hücre tipine, kolekalsiferol konsantrasyonuna ve tedavi süresine bağlı olabilir. Thomas ve arkadaşları (2019) normal rektal mukozası olan bireylerden ve ailesel adenomatöz polipozisi olan hastalardan rektal biyopsi örnekleri almışlar ve kript hücre üretim hızı ve Ki-67 etiketleme indeksini belirleyerek kolekalsiferolün rektal epitel proliferasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için organ kültüründe eksplantlar oluşturmuşlardır. Hem normal hem de premalign insan rektal örneklerinde kolekalsiferol, kript hücre üretim hızını ve Ki-67 etiketleme indeksini azaltmıştır (Thomas ve ark., 2019).

1,25(OH)2D3'ün antikanser etkileri en azından kısmen tümör hücresi proliferasyonunun inhibisyonu yoluyla ortaya çıkmaktadır (Carlberg ve Velleuer, 2022; Muñoz ve Grant, 2022). 1,25(OH)2D3, S-G2M hücre döngüsü evrelerindeki KRK hücrelerinin yüzdesini güçlü bir şekilde azaltmış ve sonuç olarak hücre döngüsünü uzatmış ve KRK hücre proliferasyonunu azaltmıştır (García-Martínez ve ark., 2023). D vitamini bileşiklerinin (kolekalsiferol, kalsidiol ve kalsitriol), hücre çoğalması ve canlılığının azalması, otofajik hücre ölümünün indüklenmesi ve metastaz ve anjyogenezin azalmasını içeren mekanizmalarla çeşitli kanser hücre hatları üzerinde antikanser etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Susa ve ark., 2018). Bhoora ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada CaSki servikal kanser hücre hattı, yüksek dozlarda kolekalsiferol (100 ve 1000 ng/mL) ile muamele edildiğinde, kontrollere ve düşük dozlarda kolekalsiferol (10 ve 40 ng/mL) ile muamele edilen kültürlerle kıyasla apoptotik hücre ölümüyle beraber azalmış kanserli hücre sayısı olduğu saptanmıştır (Bhoora ve ark., 2020).

Bu tez ptojesinde de XTT analiz sonuçlarımıza göre kolekalsiferol, HT-29 ve HCT 116 proliferasyonunu doza ve zamana bağılı bir şekilde inhibe etmiştir. Sitotoksisite sonuçlarımızı göz önünde aldığımızda, sonraki analizlerde hücreler 48 saat boyunca 150 ve 250 µM kolekalsiferol ile muamele edilmiştir. Sonrasında gerçekleştirilen koloni formasyon analizi sonuçlarımız da HT-29 ve HCT 116 hücrelerinde 48 saat süresince kolekalsiferol uygulamasının hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerini inhibe ettiğini göstermiştir.

Yüksek doz kolekalsiferol uygulamalarında hücre sayısındaki önemli düşüş ve hücre döngüsünün alt G1 fraksiyonundaki istatistiksel artış, kontrollere ve düşük doz uygulamalarına kıyasla hücre ölümünün arttığını göstermektedir. Hücre büyümesinin inhibisyonu, diğer servikal kanser hücre hatlarında D vitamini etkisini araştıran çalışmalarda gösterilmiştir. HeLa hücrelerinde kalsitriol, hücre proliferasyonunda zamana ve doza bağılı düşüşler ve G1 hücre döngüsü durmasının teşvik edildiğini göstermiştir (Wang ve ark., 2015). Shruthi ve arkadaşları da 1250 µM dozunda kolekalsiferol ile tedavi edilen HeLa hücrelerinde %50 büyüme inhibisyonu gözlemlemiştir (Shruthi ve ark., 2017). Ayrıca, kalsitriol ile tedavi edilen HeLa ve SiHa hücreleri doza bağılı hücre çoğalmasında azalma göstermiştir (Friedrich ve ark., 2002).

Tümörleri doğru şekilde hedeflemek için otofajinin farklı aşamalarındaki ve farklı mutasyon yükleri altındaki rolünü anlamak önemlidir. Bu çalışmada da kolekalsiferolün kolon knaseri hücrelerindeki etkinliği otofaji ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir. Hem otofaji analizi sonuçları hem de otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini değerlendirdiğimiz qRT-PZR analizi sonuçları kolon kanseri hücrelerinde kolekalsiferol uygulamasının otofajiyi inhibe ettiğini ortaya koymuştur.

Otofajinin kanserde tartışmalı bir rolü olsa da yapılan çalışmalar KRK'de otofajinin tümör ilerlemesini indükleyerek kanser hücreleri için koruyucu bir mekanizma olarak devreye girebildiğini göstermiştir. Klinik bir çalışmada, KRK hastalarında ATG5'in artmış ekspresyonu, artmış invazyon insidansı ile korelasyon göstermiştir (Cho ve ark., 2012). Benzer şekilde LC3B ve SQSTM1 ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Niklaus ve ark., 2017). Fare modellerinde, bağırsak epitel hücrelerinde ATG7 kaybı, mikrobiyom tarafından ortaya çıkarılan bir bağışıklık tepkisi yoluyla tümör büyümesini inhibe etmiştir (Lévy ve ark., 2015). Ek olarak, kanserde yaygın olarak bulunan bir mutasyon olan aktive C kinaz 1 reseptörleri, otofajiyi indüklemiş ve KRK'de apoptozu inhibe ederken proliferasyonu teşvik etmiştir (Xiao ve ark., 2018). Otofaji ayrıca KRK'de transkripsiyon

faktörü FOXO3a'nın degradasyonunu da modüle etmiştir. Otofajinin inhibisyonu FOXO3a seviyelerini yükseltmiş ve pro-apoptotik genlerin transkripsiyonel yukarı regülasyonuna yol açmıştır (Fitzwalter ve ark., 2018). Apoptoz, p53 ve endoplazmik retikulum stresinin aktivasyonunu takiben KKK hücrelerinde otofaji inhibe edildiğinde de artmıştır (Sakitani ve ark., 2015).

Bu çalışmada kolon kanseri hücrelerinde kolekalsiferol uygulamasının etkileri ER stresi üzerinden de değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre kolon kanseri hücrelerinde kolekalsiferol uygulaması sonrasında ER stresi belirteci olan GRP78/BiP miktarında artış tespit edilmiştir. Ayrıca qRT-PZR analizi sonuçları kolekalsiferol uygulamasının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kolon kanseri hücrelerinde ER-stresi ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini artırdığını ortaya koymuştur. Ancak ER stresinin kanserdeki rolü de otofaji gibi tartışmalıdır. Örneğin, çeşitli çalışmalar UPR'nin tümörün hayatta kalmasına katkısını ortaya koymaktadır. ER şaperon immünoglobülin bağlayıcı proteinin (BiP) kısmi yıkımına sahip insan fibrosarkom hücrelerinin, farelerde tümör olarak büyüme yetenekleri bozulurken, PERK nakavt, Ras ile dönüştürülmüş fare fibroblastlarının farelerde tümör olarak büyüme yeteneğini tehlikeye atmıştır. Benzer şekilde, XBP1'in devrilmesi, farelerde nakledilebilir tümörlerin büyümesini tehlikeye atar. Birlikte, bu gözlemler kanseri tedavi etmenin bir yolu olarak UPR'ye müdahale etmenin potansiyel faydasını göstermektedir. (Ron ve Walter, 2007). PERK inhibitörleri olan GSK2606414 ve GSK2656157, farklı kanserlerin insan ksenograft modellerinde tümör büyümesini baskılamaktadır (Hetz ve ark., 2019). Değişmiş aminoasit metabolizması, azalmış kan damarı yoğunluğu ve azalmış vasküler perfüzyon, bu inhibitörlerin gözlenen antitümör aktivitesi için potansiyel mekanizmalardır. GSK2656157 ayrıca KKK hücrelerini 5-fluorourasil (5-FU) kemoterapisine karşı hassaslaştırır (Shi ve ark., 2019). Bununla birlikte kanser hücrelerinde ER stresinde artışın meydana gelmesinin apoptozun içsel ve dışsal yollarını tetikleyebileceği de bilinmektedir (Sano ve Reed, 2013). qRT-PZR analizi sonuçlarımıza göre de kolekalsiferol uygulaması kolon kanseri hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinde artışa neden olmuştur. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde kolon kanseri hücrelerinde kolekalsiferolün kanser hücreleri için koruyucu bir mekanizma olarak devreye girebilen otofajiyi inhibe ederken ER stresini indüklediği, böylelikle apoptozu regüle ederek antikanser aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, yapmış olduğumuz çalışma HCT 116 ve HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde kolekalsiferolün doz ve zaman bağımlı şekilde sitotoksik etkiye sebep olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca 150 ve 250 μ M konsantrasyonlarında kolekalsiferol uygulaması sonrasında hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri baskılanmıştır. Kolekalsiferol, kolon kanseri hücrelerinde otofajiyi inhibe ederken, ER stresinde artışa neden olmuştur. Bunun bir sonucu olarak da apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelmiştir. Bununla birlikte, HCT 116 ve HT-29 hücre hattında kolekalsiferolün yerel metabolizmasını tamamen karakterize etmek için farklı daha fazla araştırma gerektirmektedir. Buna ek olarak, HCT 116 ve HT-29 hücre hattında kolekalsiferol tarafından otofaji, ER stresi ve apoptotik indüksiyon mekanizmalarının daha fazla açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

Gelecekteki çalışmalar, D vitamini ve VDR etkileşimlerinin bağırsak mukozal bağışıklığını, patojen istilasını ve antimikrobiyal peptid ekspresyonunu etkilediği moleküler mekanizmalara ışık tutacaktır. Ayrıca KKK hastaları için bağırsak mikrobiyotasını modüle etmenin en iyi yolları araştırılmalı ve klinik deneyler yoluyla kısa ve uzun vadeli faydaları incelenmelidir. Hücre metabolizması için D vitamini de dâhil olmak üzere çok sayıda vitamin, mikro besin ve mineral dengesi, sağlığı korumak ve hastalıkları kontrol etmek için önemlidir. D vitamini ve insan bağırsağı mikrobiyotası arasındaki fonksiyonel, immünolojik, biyokimyasal ve genetik etkileşimlerin ayrıntılı olarak değerlendirilmesi karmaşık olan bağırsak fonksiyonunun anlaşılmasına ışık tutacaktır.



7. KAYNAKLAR

- Aghagolzadeh, P., & Radpour, R. (2016). New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(25), 5678-5693. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i25.5678>
- Ahmed, S., Johnson, K., Ahmed, O., & Iqbal, N. (2014). Advances in the management of colorectal cancer: From biology to treatment. *International Journal of Colorectal Disease*, 29(9), 1031-1042. <https://doi.org/10.1007/s00384-014-1928-5>
- Ahmed, M. (2020). Colon cancer: A clinician's perspective in 2019. *Gastroenterology Research*, 13(1), 1-10. <https://doi.org/10.14740/gr.v13i1.1239>
- Ahronian, L. G., Sennott, E. M., Van Allen, E. M., Wagle, N., Kwak, E. L. et al. (2015). Clinical acquired resistance to raf inhibitor combinations in braf-mutant colorectal cancer through mapk pathway alterations. *Cancer Discovery*, 5(4), 358-367. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1518>
- Akkoyun, H. T., Bayramoğlu, M., Ekin, S., & Çelebi, F. (2014). D Vitamini Ve Metabolizma İçin Önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 9(3). <https://doi.org/10.17094/avbd.05043>
- Al-Ghafari, A. B., Balamash, K. S., & Al Doghaither, H. A. (2019). Relationship between serum vitamin d and calcium levels and vitamin d receptor gene polymorphisms in colorectal cancer. *BioMed Research International*, 2019, 8571541. <https://doi.org/10.1155/2019/8571541>
- Alvarez-Meythaler, J. G., Garcia-Mayea, Y., Mir, C., Kondoh, H., & LLeonart, M. E. (2020). Autophagy takes center stage as a possible cancer hallmark. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.586069>
- Amaravadi, R. K., Kimmelman, A. C., & Debnath, J. (2019). Targeting autophagy in cancer: Recent advances and future directions. *Cancer Discovery*, 9(9), 1167-1181. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0292>
- American Cancer Society. (2023a). Colorectal Cancer Stages. <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>
- American Cancer Society. (2023b). Treatment of Colon Cancer, by Stage. <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/by-stage-colon.html>
- American Cancer Society. (2023). Colorectal Cancer Stages. <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>
- Amodio, V., Yaeger, R., Arcella, P., Cancelliere, C., Lamba, S. et al. (2020). EGFR blockade reverts resistance to krasg12c inhibition in colorectal cancer. *Cancer Discovery*, 10(8), 1129-1139. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0187>
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>
- Bhoora, S., Pather, Y., Marais, S., & Punchoo, R. (2020). Cholecalciferol Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in the CaSki Cell Line. *Medical Sciences*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/medsci8010012>
- Bikle, D. D. (2014). Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry & Biology*, 21(3), 319-329. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>
- Bizzaro, G., Antico, A., Fortunato, A., & Bizzaro, N. (2017). Vitamin D and autoimmune diseases: Is vitamin d receptor (vdr) polymorphism the culprit? *The Israel Medical Association Journal: IMAJ*, 19(7), 438-443.
- Boland, P. M., Yurgelun, M. B., & Boland, C. R. (2018). Recent progress in Lynch syndrome and other familial colorectal cancer syndromes. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(3), 217-231. <https://doi.org/10.3322/caac.21448>
- Byers, S. W., Rowlands, T., Beildeck, M., & Bong, Y.-S. (2012). Mechanism of action of vitamin D and the vitamin D receptor in colorectal cancer prevention and treatment. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 13(1), 31-38. <https://doi.org/10.1007/s11154-011-9196-y>
- Carlberg, C., & Velleuer, E. (2022). Vitamin D and the risk for cancer: A molecular analysis. *Biochemical Pharmacology*, 196, 114735. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114735>
- Chen, X., & Cubillos-Ruiz, J. R. (2021). Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nature reviews. Cancer*, 21(2), 71-88. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00312-2>
- Cho, D.-H., Jo, Y. K., Kim, S. C., Park, I. J., & Kim, J. C. (2012). Down-regulated expression of ATG5 in colorectal cancer. *Anticancer Research*, 32(9), 4091-4096.
- Cho, E., Smith-Warner, S. A., Ritz, J., van den Brandt, P. A., Colditz, G. A. et al. (2004). Alcohol intake and colorectal cancer: A pooled analysis of 8 cohort studies. *Annals of Internal Medicine*, 140(8), 603-613. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00007>
- Choi, Y.-J., Myung, S.-K., & Lee, J.-H. (2018). Light alcohol drinking and risk of cancer: A meta-analysis of cohort studies. *Cancer Research and Treatment*, 50(2), 474-487. <https://doi.org/10.4143/crt.2017.094>

- Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., & Carmeliet, G. (2016). Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiological Reviews*, 96(1), 365-408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>
- Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F., & Ricciardiello, L. (2013). Molecular pathways involved in colorectal cancer: Implications for disease behavior and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), Art. 8. <https://doi.org/10.3390/ijms140816365>
- Cronin, K. A., Lake, A. J., Scott, S., Sherman, R. L., Noone, A.-M. et al. (2018). Annual report to the nation on the status of cancer, part 1: National cancer statistics. *Cancer*, 124(13), 2785-2800. <https://doi.org/10.1002/cncr.31551>
- Devenport, S. N., & Shah, Y. M. (2019). Functions and implications of autophagy in colon cancer. *Cells*, 8(11), 1349. <https://doi.org/10.3390/cells8111349>
- DeVorkin, L., Pavey, N., Carleton, G., Comber, A., Ho, C. et al. (2019). Autophagy regulation of metabolism is required for cd8+ t cell anti-tumor immunity. *Cell Reports*, 27(2), 502-513.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.037>
- Dimitrakopoulou, V. I., Tsilidis, K. K., Haycock, P. C., Dimou, N. L., Al-Dabhani, K. et al. (2017). Circulating vitamin D concentration and risk of seven cancers: Mendelian randomisation study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 359, j4761. <https://doi.org/10.1136/bmj.j4761>
- Dong, Y., Zhou, J., Zhu, Y., Luo, L., He, T. et al. (2017). Abdominal obesity and colorectal cancer risk: Systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Bioscience Reports*, 37(6), BSR20170945. <https://doi.org/10.1042/BSR20170945>
- Estébanez, N., Gómez-Acebo, I., Palazuelos, C., Llorca, J., & Dierssen-Sotos, T. (2018). Vitamin D exposure and Risk of Breast Cancer: A meta-analysis. *Scientific Reports*, 8, 9039. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27297-1>
- Ettarh, R. (2015). Screening for Colorectal Cancer with Colonoscopy. BoD – Books on Demand.
- Fathi, N., Ahmadian, E., Shahi, S., Roshangar, L., Khan, H. et al. (2019). Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 391-401. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.102>
- Fedirko, V., Mandle, H. B., Zhu, W., Hughes, D. J., Siddiq, A. et al. (2019). Vitamin D-related genes, blood vitamin d levels and colorectal cancer risk in western european populations. *Nutrients*, 11(8), 1954. <https://doi.org/10.3390/nu11081954>
- Fernández-Barral, A., Bustamante-Madrid, P., Ferrer-Mayorga, G., Barbáchano, A., Larriba, M. J. et al. (2020). Vitamin D Effects on Cell Differentiation and Stemness in Cancer. *Cancers*, 12(9), 2413. <https://doi.org/10.3390/cancers12092413>
- Ferrer-Mayorga, G., Larriba, M. J., Crespo, P., & Muñoz, A. (2019). Mechanisms of action of vitamin D in colon cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 185, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.07.002>
- Fitzwalter, B. E., Towers, C. G., Sullivan, K. D., Andrysiak, Z., Hoh, M. et al. (2018). autophagy inhibition mediates apoptosis sensitization in cancer therapy by relieving foxo3a turnover. *Developmental Cell*, 44(5), 555-565.e3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.02.014>
- Fleet, J. C., DeSmet, M., Johnson, R., & Li, Y. (2012). Vitamin D and Cancer: A review of molecular mechanisms. *The Biochemical journal*, 441(1), 61-76. <https://doi.org/10.1042/BJ20110744>
- Friedrich, M., Meyberg, R., Axt-Fliedner, R., Villena-Heinsen, C., Tilgen, W. et al. (2002). Vitamin D receptor (VDR) expression is not a prognostic factor in cervical cancer. *Anticancer Research*, 22(1A), 299-304.
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2015). immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. *Cancer Cell*, 28(6), 690-714. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.10.012>
- García-Martínez, J. M., Chocarro-Calvo, A., Martínez-Useros, J., Fernández-Aceñero, M. J., Fiuza, M. C. et al. (2023). Vitamin D induces SIRT1 activation through K610 deacetylation in colon cancer (s. 2023.02.22.529558). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.02.22.529558>
- GLOBOCAN. (2020a). Estimated age-standardized mortality rates (World) in 2020, World, both sexes, all ages (excl. NMSC). <https://i24.im/Wbdna>
- GLOBOCAN. (2020b). Estimated number of prevalent cases (5-year) World, males, all ages (excl. NMSC). <https://i24.im/J4Iz>
- Gupta, R., Bhatt, L. K., Johnston, T. P., & Prabhavalkar, K. S. (2019). Colon cancer stem cells: Potential target for the treatment of colorectal cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 20(8), 1068-1082. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1599660>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Hetz, C., Axten, J. M., & Patterson, J. B. (2019). Pharmacological targeting of the unfolded protein response for disease intervention. *Nature Chemical Biology*, 15(8), 764-775. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0326-2>
- Hewitt, G., & Korolchuk, V. I. (2017). Repair, reuse, recycle: The expanding role of autophagy in genome maintenance. *Trends in Cell Biology*, 27(5), 340-351. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.011>
- Huang, J., Pan, H., Wang, J., Wang, T., Huo, X. et al. (2021). Unfolded protein response in colorectal cancer. *Cell & Bioscience*, 11(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00538-z>
- Hughes, D., & Mallucci, G. R. (2019). The unfolded protein response in neurodegenerative disorders—Therapeutic modulation of the PERK pathway. *The FEBS Journal*, 286(2), 342-355. <https://doi.org/10.1111/febs.14422>
- Janjetovic, Z., Tuckey, R. C., Nguyen, M. N., Thorpe, E. M., & Slominski, A. T. (2010). 20,23-dihydroxyvitamin D₃, novel P450_{scc} product, stimulates differentiation and inhibits proliferation and NF-kappaB activity in human keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 223(1), 36-48. <https://doi.org/10.1002/jcp.21992>
- Kalyan, A., Kircher, S., Shah, H., Mulcahy, M., & Benson, A. (2018). Updates on immunotherapy for colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 9(1), 160-169. <https://doi.org/10.21037/jgo.2018.01.17>
- Khan, F. A., Albalawi, R., & Pottoo, F. H. (2022). Trends in targeted delivery of nanomaterials in colon cancer diagnosis and treatment. *Medicinal Research Reviews*, 42(1), 227-258. <https://doi.org/10.1002/med.21809>
- Kimmelman, A. C., & White, E. (2017). Autophagy and tumor metabolism. *Cell metabolism*, 25(5), 1037-1043. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.004>
- Klionsky, D. J., Petroni, G., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Ballabio, A. et al. (2021). Autophagy in major human diseases. *The EMBO Journal*, 40(19), e108863. <https://doi.org/10.15252/embj.2021108863>
- Kostouros, A., Koliarakis, I., Natsis, K., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. et al. (2020). Large intestine embryogenesis: Molecular pathways and related disorders (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 46(1), 27-57. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4583>
- Krishnamurty, D. M., Hawkins, A. T., Wells, K. O., Mutch, M. G., Silveira, M. L. et al. (2018). Neoadjuvant Radiation Therapy in Locally Advanced Colon Cancer: A Cohort Analysis. *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 22(5), 906-912. <https://doi.org/10.1007/s11605-018-3676-2>
- Larriba, M. J., Ordóñez-Morán, P., Chicote, I., Martín-Fernández, G., Puig, I. et al. (2011). Vitamin D receptor deficiency enhances Wnt/ β -catenin signaling and tumor burden in colon cancer. *PloS One*, 6(8), e23524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023524>
- Lavier, L. (2023). Immunotherapy Cancer Treatment. *Microreviews in Cell and Molecular Biology*, 2.
- Leary, R. J., Lin, J. C., Cummins, J., Boca, S., Wood, L. D. et al. (2008). Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(42), 16224-16229. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808041105>
- Lévy, J., Cacheux, W., Bara, M. A., L'Hermitte, A., Lepage, P. et al. (2015). Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth. *Nature Cell Biology*, 17(8), 1062-1073. <https://doi.org/10.1038/ncb3206>
- Lewandowska, A., Rudzki, G., Lewandowski, T., Strykowska-Góra, A., & Rudzki, S. (2022). Title: Risk Factors for the Diagnosis of Colorectal Cancer. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, 29, 10732748211056692. <https://doi.org/10.1177/10732748211056692>
- Li, J., Ma, X., Chakravarti, D., Shalapour, S., & DePinho, R. A. (2021). Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes & Development*, 35(11-12), 787-820. <https://doi.org/10.1101/gad.348226.120>
- Lotfollahzadeh, S., Recio-Boiles, A., & Cagir, B. (2022). *Colon Cancer*. *Içinde StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>
- Machado, M. R. M., de Sousa Almeida-Filho, B., De Luca Vespoli, H., Schmitt, E. B., Nahas-Neto, J., & Nahas, E. A. P. (2019). Low pretreatment serum concentration of vitamin D at breast cancer diagnosis in postmenopausal women. *Menopause (New York, N.Y.)*, 26(3), 293-299. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001203>
- Markotic, A., Langer, S., Kelava, T., Vucic, K., Turcic, P. et al. (2019). Higher Post-Operative Serum Vitamin D Level is Associated with Better Survival Outcome in Colorectal Cancer Patients. *Nutrition and Cancer*, 71(7), 1078-1085. <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1597135>
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodríguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), Art. 1. <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>
- Mathew, R., Khor, S., Hackett, S. R., Rabinowitz, J. D., Perlman, D. H. et al. (2014). Functional role of autophagy-mediated proteome remodeling in cell survival signaling and innate immunity. *Molecular Cell*, 55(6), 916-930. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.07.019>

- Mayo Clinic. (2022). Colon cancer—Symptoms and causes. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/symptoms-causes/syc-20353669>
- Mehta, R. S., Song, M., Nishihara, R., Drew, D. A., Wu, K. et al. (2017). Dietary patterns and risk of colorectal cancer: Analysis by tumor location and molecular subtypes. *Gastroenterology*, 152(8), 1944-1953.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.02.015>
- Meléndez, A., & Levine, B. (2009). Autophagy in *C. elegans*. WormBook.org. http://www.wormbook.org/chapters/www_autophagy/autophagy.html
- Meléndez, A., & Levine, B. (2018). Autophagy in *C. elegans*. İçinde WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology [Internet]. WormBook. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK116074/>
- Mendoza-Moreno, F., Diez-Alonso, M., Matías-García, B., Ovejero-Merino, E., Gómez-Sanz, R. et al. (2022). Prognostic factors of survival in patients with peritoneal metastasis from colorectal cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 11(16), 4922. <https://doi.org/10.3390/jcm11164922>
- Meseha, M., & Attia, M. (2023). Colon Polyps. İçinde StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430761/>
- Miles, F. L., Goodman, P. J., Tangen, C., Torkko, K. C., Schenk, J. M. et al. (2017). Interactions of the insulin-like growth factor axis and vitamin d in prostate cancer risk in the prostate cancer prevention trial. *Nutrients*, 9(4), 378. <https://doi.org/10.3390/nu9040378>
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), Art. 7182. <https://doi.org/10.1038/nature06639>
- Mizushima, N., & Levine, B. (2020). Autophagy in human diseases. *The New England Journal of Medicine*, 383(16), 1564-1576. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2022774>
- Mizushima, N. (2020). The ATG conjugation systems in autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 63, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.12.001>
- Mork, M. E., You, Y. N., Ying, J., Bannon, S. A., Lynch, P. M. et al. (2015). High prevalence of hereditary cancer syndromes in adolescents and young adults with colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(31), 3544-3549. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.4503>
- Morishita, H., & Mizushima, N. (2019). Diverse cellular roles of autophagy. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 35, 453-475. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125300>
- Mousavi Rad, S. A., Haji Hajikolaie, M. R., Nouri, M., Seyfi Abad Shapouri, M. R., & Ghorbanpoor, M. (2023). Determination of the fate of Cholecalciferol injected by the basis of 25D3 plasma concentration. *Scientific Reports*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29870-9>
- Muñoz, A., & Grant, W. B. (2022). Vitamin D and cancer: An historical overview of the epidemiology and mechanisms. *Nutrients*, 14(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/nu14071448>
- Müller, M. F., Ibrahim, A. E. K., & Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 469(2), 125-134. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1956-3>
- Negri, M., Gentile, A., de Angelis, C., Montò, T., Patalano, R. et al. (2020). Vitamin D-Induced molecular mechanisms to potentiate cancer therapy and to reverse drug-resistance in cancer cells. *Nutrients*, 12(6), 1798. <https://doi.org/10.3390/nu12061798>
- NICE (2023). Suspected Cancer Recognition and Referral: Site or Type of Cancer. <http://pathways.nice.org.uk/pathways/suspected-cancer-recognition-and-referral>.
- Niklaus, M., Adams, O., Berezowska, S., Zlobec, I., Graber, F. et al. (2017). Expression analysis of LC3B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer. *Oncotarget*, 8(33), 54604-54615. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17554>
- Nimptsch, K., & Wu, K. (2018). Is Timing Important? The role of diet and lifestyle during early life on colorectal neoplasia. *Current Colorectal Cancer Reports*, 14(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11888-018-0396-7>
- Novellademunt, L., Antas, P. ve Li, VS (2015). Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A review in the theme: cell signaling: proteins, pathways and mechanisms. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 309 (8), C511-C521.
- NCCN (National Comprehensive Cancer Network) Guidelines For Patients (2021). Colon Cancer. <https://www.nccn.org/guidelines/recently-published-guidelines>
- NCCN (National Comprehensive Cancer Network) Guidelines For Patients (2022). Colon Cancer. <https://www.nccn.org/guidelines/recently-published-guidelines>
- Park, S.-Y., Wilkens, L. R., Setiawan, V. W., Monroe, K. R., Haiman, C. A. et al. (2019). alcohol intake and colorectal cancer risk in the multiethnic cohort study. *American Journal of Epidemiology*, 188(1), 67-76. <https://doi.org/10.1093/aje/kwy208>
- Peixoto, R. D., Oliveira, L. J. de C., Passarini, T. de M., Andrade, A. C., Diniz, P. H. et al. (2022). Vitamin D and colorectal cancer – A practical review of the literature. *Cancer Treatment and Research Communications*, 32, 100616. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2022.100616>

- Poillet-Perez, L., Sharp, D. W., Yang, Y., Laddha, S. V., Ibrahim, M. et al. (2020). Autophagy promotes growth of tumors with high mutational burden by inhibiting a T-cell immune response. *Nature Cancer*, 1(9), Art. 9. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-00110-7>
- Rahner, N., & Steinke, V. (2008). Hereditary cancer syndromes. *Deutsches Arzteblatt International*, 105(41), 706-714. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2008.0706>
- Raskov, H., Søby, J. H., Troelsen, J., Bojesen, R. D., & Gögenur, I. (2020). Driver gene mutations and epigenetics in colorectal cancer. *Annals of Surgery*, 271(1), 75-85.
- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny*, 14(2), 89-103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
- Richardson, P. G., Mitsiades, C., Hideshima, T., & Anderson, K. C. (2006). Bortezomib: Proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Annual Review of Medicine*, 57, 33-47. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.042905.122625>
- Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), Art. 7. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>
- Rybshtein, M. D., Bravo-San Pedro, J. M., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2018). The autophagic network and cancer. *Nature Cell Biology*, 20(3), 243-251. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0042-2>
- Safiri, S., Sepanlou, S. G., Ikuta, K. S., Bisignano, C., Salimzadeh, H. et al. (2019). The global, regional, and national burden of colorectal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 4(12), 913-933. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30345-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30345-0)
- Sağlık Bakanlığı. (2017). Kanser Taramaları. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-taramalari>
- Sağlık Bakanlığı (2022). Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2020. <https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/43399,siy2020-tur-26052022pdf.pdf?0>
- Sakitani, K., Hirata, Y., Hikiba, Y., Hayakawa, Y., Ihara, S. et al. (2015). Inhibition of autophagy exerts anti-colon cancer effects via apoptosis induced by p53 activation and ER stress. *BMC Cancer*, 15, 795. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1789-5>
- Sano, R., & Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*, 1833(12), 3460–3470. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>
- Sawicki, T., Ruskowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arlukowicz, T. et al. (2021). A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers*, 13(9), Art. 9. <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>
- Shi, Z., Yu, X., Yuan, M., Lv, W., Feng, T., Bai, R. et al. (2019). Activation of the PERK-ATF4 pathway promotes chemo-resistance in colon cancer cells. *Scientific Reports*, 9(1), 3210. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39547-x>
- Shruthi, N., Prashanthkumar, M. V., Venugopalreddy, B., Suma, M. N & Subba Rao, V. M. (2017). Analysis of the Cytotoxic Effects of Vitamin D3 on Colorectal, Breast and Cervical Carcinoma Cell Lines. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 06(02). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000318>
- Skender, S., Böhm, J., Schrotz-King, P., Chang-Claude, J., Siegel, E. M., Steindorf, K. et al. (2017). Plasma 25-hydroxyvitamin d3 levels in colorectal cancer patients and associations with physical activity. *Nutrition and Cancer*, 69(2), 229-237. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1265131>
- Skobowiat, C., Oak, A. S. W., Kim, T.-K., Yang, C. H., Pfeffer, L. M. et al. (2016). Noncalcemic 20-hydroxyvitamin D3 inhibits human melanoma growth in in vitro and in vivo models. *Oncotarget*, 8(6), 9823-9834. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14193>
- Slominski, A. T., Kim, T.-K., Li, W., Yi, A.-K., Postlethwaite, A. et al. (2014). The role of CYP11A1 in the production of vitamin D metabolites and their role in the regulation of epidermal functions. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 144 Pt A, 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.10.012>
- Song, Z.-Y., Yao, Q., Zhuo, Z., Ma, Z., & Chen, G. (2018). Circulating vitamin D level and mortality in prostate cancer patients: A dose-response meta-analysis. *Endocrine Connections*, 7(12), R294-R303. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0283>
- Spaan, C. N., Smit, W. L., van Lidth de Jeude, J. F., Meijer, B. J., Muncan, V. et al. (2019). Expression of UPR effector proteins ATF6 and XBP1 reduce colorectal cancer cell proliferation and stemness by activating PERK signaling. *Cell Death & Disease*, 10(7), 490. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1729-4>
- Stewart, S. L., Wike, J. M., Kato, I., Lewis, D. R., & Michaud, F. (2006). A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998-2001. *Cancer*, 107(5 Suppl), 1128-1141. <https://doi.org/10.1002/cncr.22010>
- Stryker, S. J., Wolff, B. G., Culp, C. E., Libbe, S. D., Ilstrup, D. M., & MacCarty, R. L. (1987). Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology*, 93(5), 1009-1013. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)90563-4](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)90563-4)

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I. et al. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Susa, T., Iizuka, M., Okinaga, H., Tamamori-Adachi, M., & Okazaki, T. (2018). Without 1 α -hydroxylation, the gene expression profile of 25(OH)D3 treatment overlaps deeply with that of 1,25(OH)2D3 in prostate cancer cells. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27441-x>
- Szylberg, Ł., Janiczek, M., Popiel, A., & Marszałek, A. (2015). Serrated polyps and their alternative pathway to the colorectal cancer: A systematic review. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015, e573814. <https://doi.org/10.1155/2015/573814>
- Tatar, M., & Tatar, T. (2018). Endoplazmik retikulum stresi ve ilişkili hastalıklar. *Osmangazi Journal Of Medicine*. <https://doi.org/10.20515/otd.417682>
- Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients*, 11(1), 164. <https://doi.org/10.3390/nu11010164>
- Thomas, A. M., Manghi, P., Asnicar, F., Pasolli, E., Armanini, F. et al. (2019). Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation. *Nature Medicine*, 25(4), 667-678. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0405-7>
- Türk Kanser Derneği. (2018). Kanser Risk Faktörleri. <https://www.turkkanserderneği.org/tr/kanser-nedir.htm>
- Urta, H., Dufey, E., Avril, T., Chevet, E., & Hetz, C. (2016). Endoplasmic reticulum stress and the hallmarks of cancer. *Trends in Cancer*, 2(5), 252-262. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.03.007>
- Valle, L., Vilar, E., Tavtigian, S. V., & Stoffel, E. M. (2019). Genetic predisposition to colorectal cancer: Syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *The Journal of Pathology*, 247(5), 574-588. <https://doi.org/10.1002/path.5229>
- Vieth, R. (2009). How to optimize vitamin D supplementation to prevent cancer, based on cellular adaptation and hydroxylase enzymology. *Anticancer Research*, 29(9), 3675-3684.
- Vieth, R. (2020). Vitamin D supplementation: Cholecalciferol, calcifediol, and calcitriol. *European Journal of Clinical Nutrition*, 74(11), Art. 11. <https://doi.org/10.1038/s41430-020-0697-1>
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6059), 1081-1086. <https://doi.org/10.1126/science.1209038>
- Wang, G., Lei, L., Zhao, X., Zhang, J., Zhou, M. et al. (2015). calcitriol inhibits cervical cancer cell proliferation through downregulation of hccr1 expression. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 22(5-6), 301-309. <https://doi.org/10.3727/096504015X14424348425991>
- Wang, W., Yu, S., Huang, S., Deng, R., Ding, Y. et al. (2019). A complex role for calcium signaling in colorectal cancer development and progression. *Molecular Cancer Research: MCR*, 17(11), 2145-2153. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0429>
- WHO. (2023). Cancer. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Welsh, J. (2018). Vitamin D and breast cancer: Past and present. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 177, 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.07.025>
- Xia, H., Green, D. R., & Zou, W. (2021). Autophagy in tumour immunity and therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 21(5), 281-297. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00344-2>
- Xiao, J.-B., Leng, A.-M., Zhang, Y.-Q., Wen, Z., He, J. et al. (2019). CUEDC2: Multifunctional roles in carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 24(5), 935-946. <https://doi.org/10.2741/4759>
- Xiao, T., Zhu, W., Huang, W., Lu, S.-S., Li, X.-H. et al. (2018). RACK1 promotes tumorigenicity of colon cancer by inducing cell autophagy. *Cell Death & Disease*, 9(12), 1148. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1113-9>
- Xu, X., Zhang, X., Wei, C., Zheng, D., Lu, X. et al. (2020). Targeting SLC7A11 specifically suppresses the progression of colorectal cancer stem cells via inducing ferroptosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 152, 105450. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105450>
- Yamagishi, H., Kuroda, H., Imai, Y., & Hiraishi, H. (2016). Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chinese Journal of Cancer*, 35(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0066-y>
- Yang, J., Gurudu, S. R., Koptiuch, C., Agrawal, D., Buxbaum, J. L. et al. (2020). American Society for Gastrointestinal Endoscopy guideline on the role of endoscopy in familial adenomatous polyposis syndromes. *Gastrointestinal Endoscopy*, 91(5), 963-982.e2. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2020.01.028>
- Yonaga, H., Okada, S., Akutsu, T., Ohdaira, H., Suzuki, Y. et al. (2019). Effect modification of vitamin d supplementation by histopathological characteristics on survival of patients with digestive tract cancer: Post hoc analysis of the amaterasu randomized clinical trial. *Nutrients*, 11(10), 2547. <https://doi.org/10.3390/nu11102547>
- Yuan, C., Sato, K., Hollis, B. W., Zhang, S., Niedzwiecki, D. et al. (2019). Plasma 25-hydroxy vitamin d levels and survival in patients with advanced or metastatic colorectal cancer: findings from calgb/swog 80405 (alliance). *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(24), 7497-7505. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0877>

Zheng, W., Wong, K. E., Zhang, Z., Dougherty, U., Mustafi, R. et al. (2012). Inactivation of the vitamin D receptor in APC(min/+) mice reveals a critical role for the vitamin D receptor in intestinal tumor growth. *International Journal of Cancer*, 130(1), 10-19. <https://doi.org/10.1002/ijc.25992>

Zheng, Y., Trivedi, T., Lin, R. C., Fong-Yee, C., Nolte, R. et al. (2017). Loss of the vitamin D receptor in human breast and prostate cancers strongly induces cell apoptosis through downregulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Bone Research*, 5, 17023. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.23>





8. EKLER

EKLER1 Necmettin Erbakan Üniversitesi ilaç ve tıbbi cihaz dışı etik kurul kararı

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı:177

Toplantı Tarihi: 02 Haziran 2023

Karar Sayısı:2023/4351:(Başvuru ID:14335) N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hasibe VURAL'ın "Kolon Kanseri Hücrelerinde Kalsitriol Uygulamasının Otofaji ve Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerinden Değerlendirilmesi" başlıklı yüksek lisans tez çalışma başlığı değişikliği talebi dilekçesi ve ekleri görüşüldü. Çalışma başlığının "Kolon Kanseri Hücrelerinde Kolekalsiferol/D3 Vitamin Uygulamasının Otofaji ve Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerinden Değerlendirilmesi" olarak değiştirilmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izinlerin alınması ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Hasibe VURAL

Yardımcı Araştırmacılar: Yüksek Lisans Öğrencisi Esra TANRIVERDİ

ASLI GİBİDİR
02.06.2023