



T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DLD-1 İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRE SOYUNDA 5-
FLOUROURASİL ÖNCESİ VE SONRASI GST İZOZİMLERİ,
İLAÇ DİRENÇLİLİK PROTEİNLERİNİN VE APOPTOTİK
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fatıma Nurdan GÜRBÜZ

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

KIRIKKALE- 2022



T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DLD-1 İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRE SOYUNDA 5-FLOUROURASİL ÖNCESİ VE SONRASI GST İZOZİMLERİ, İLAÇ DİRENÇLİLİK PROTEİNLERİNİN VE APOPTOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma Nurdan GÜRBÜZ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN
KIRIKKALE- 2022

Fatıma Nurdan GÜRBÜZ tarafından hazırlanan “DLD-1 İNSAN KOLON KANSER HÜCRE SOYUNDA 5-FLOUROURASİL ÖNCESİ VE SONRASI GST PROTEİNLERİ, İLAÇ DİRENÇLİLİK PROTEİNLERİ VE APOPTOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

Biyoloji, Kırıkkale Üniversitesi

İmza

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan: Prof. Dr. Nursel GÜL

Biyoloji, Ankara Üniversitesi

İmza

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Prof. Dr. Ahmet Oğuz ADA

Toksikoloji, Ankara Üniversitesi

İmza

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Prof. Dr. Tülay ÇOBAN

Toksikoloji, Ankara Üniversitesi

İmza

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

Biyomühendislik, Kırıkkale Üniversitesi

İmza

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 29/09/2022

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. Recep ÇALIN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Canım eşim ve oğluma...



ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



F.Nurdan GÜRBÜZ

29/09/2022

ÖZET

DLD-1 İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRE SOYUNDA 5-FLOUROURASİL ÖNCESİ VE SONRASI GST İZOZİMLERİ, İLAÇ DİRENÇLİLİK PROTEİNLERİNİN VE APOPTOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

Eylül 2022,100 sayfa

Çoklu ilaç direnci, kemoterapinin kanser tedavisi üzerindeki etkisini sınırlayan önemli bir faktördür. İlaç taşıma ve apoptoz bozuklukları, redoks homeostazının bozulması, çoklu ilaç direncine yol açan ana mekanizmalar arasındadır. Tez çalışmasında, DLD-1 insan kolon kanseri hücre soyunda, 5-FU (5 -Flourourasil) öncesi ve sonrası GST izozimleri, ilaç dirençlilik proteinleri (MDR-1, MRP-1, MRP-2, MRP-3, MRP-6, MRP-7) ve apoptotik (p38, p53, bcl-2, kaspaz-3) etkisi araştırılmıştır. Bununla birlikte 46 kolon adenokanser dokusunda apoptotik proteinler, Ki-67, SOX-9, E-kaderin,p38, p53, bcl-2, kaspaz-3 protein ekspresyonlarının prognostik faktörlerle ilişkisi incelendi. GST izozimleri (GSTA1, GSTM1, GSTT1, GSTZ1, GSTK1 ve GSTO1), bcl 2 ve p53 proteinlerinden daha yüksek ekspresyona sahip olduğu bulundu. MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları 5 -Flourourasil öncesi ve sonrası immünositokimyasal olarak farklılık göstermedi. Sitotoksikite düzeyi ile uygulanan ilaç konsantrasyonu arasında doğrudan bir ilişki olduğu belirlendi. İlacın dozu arttıkça sitotoksik etki de arttı. Bazı apoptotik belirteçler (p38, p53, bcl-2, kaspaz-3), GST izozimleri ve ilaç direnç proteinleri (MDR-1 ve MRP-1 hariç), diğer çalışılan proteinler kontrole göre daha fazla ekspresyon gösterdi. İmmunohistokimyasal metodla çalışılan 46 kolon adenokanser dokusunda, p53 ekspresyonu ile tümörün derinliği arasında, E kaderin ekspresyonu ile tümör grade (derecesi), Ki-67 ekspresyonu ile hastaların yaşı arasında istatistiksel olarak (p<0,05) anlamlı bir ilişki bulundu. p53 ekspresyonu ile tümör invazyon derinliği arasında, Ki-67 ile ileri yaş arasında (>60) pozitif ilişki bulunmuştur. G2 vakalarında, E-kaderin ekspresyonu %54,35 ile en yüksek ekspresyon değerine sahiptir. p38; p53 ve bcl-2 ekspresyonu (p<0,05) ile SOX-9 ve p53 ekspresyonu(p<0,01) arasında (+) pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir. p53, E-kaderin ve Ki-67 protein ekspresyonlarının kolon kanserinde, prognostik değeri olduğu ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: Kolon kanseri, GST, Apoptoz, Sox-9, Ki-67, E-kaderin

ABSTRACT

INVESTIGATION OF GST ISOENZYMES, MULTIDRUG RESISTANCE PROTEINS AND APOPTOTIC EFFECT IN DLD-1 HUMAN COLON CANCER CELL LINE BEFORE AFTER 5-FLOUROURACIL TREATMENT

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, PhD. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

Haziran 2022, 100 pages

Multidrug resistance is an important factor limiting the effect of chemotherapy on cancer treatment. Disorders of drug transport and apoptosis, disruption of redox homeostasis are among the main mechanisms leading to multidrug resistance. In the thesis study, GST isozymes, drug resistance proteins (MDR-1, MRP-1, MRP-2, MRP-3, MRP-6, MRP-7) and drug resistance proteins before and after 5-FU (5-Flourouracil) were found in DLD-1 human colon cancer cell line. Apoptotic (p38, p53, bcl-2, caspase-3) effect was investigated. In addition, the relationship between apoptotic proteins, Ki-67, SOX-9, E-cadherin, p38, p53, bcl-2, caspase-3 protein expressions and prognostic factors in 46 colon adenocancer tissues was investigated.

GST isozymes (GSTA1, GSTM1, GSTT1, GSTZ1, GSTK1 and GSTO1) were found to have higher expression than bcl-2 and p53 proteins. Expressions of MDR-1 and MRP-1 did not differ immunocytochemically before and after 5-FU. It was determined that there was a direct relationship between the cytotoxicity level and the drug concentration administered. As the dose of the drug increased, the cytotoxic effect also increased. Some apoptotic markers (p38, p53, bcl-2, caspase-3), GST isozymes and drug resistance proteins (except MDR-1 and MRP-1), other studied proteins showed higher expression than control. A statistically significant ($p < 0.05$) correlation was found between p53 expression and tumor depth, E cadherin expression and tumor grade, Ki-67 expression and age of the patients in 46 colon adenocarcinoma tissues studied by immunohistochemical method. A positive correlation was found between p53 expression and tumor invasion depth, and between Ki-67 and advanced age (> 60). In G2 cases, E-cadherin expression has the highest expression value with 54.35%. P38; It was determined that there was a positive (+) correlation between p53 and bcl-2 expression ($p < 0.05$) and SOX-9 and p53 expression ($p < 0.01$). p53, E-cadherin and Ki-67 protein expressions in colon cancer, demonstrated to have prognostic value.

Keywords: Colon cancer, GST, Apoptosis, SOX-9, Ki-67, E-cadherin

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında, ortaya çıkmasında ve doktora öğrenimim boyunca bilgi ve birikimini benimle paylaşan, tecrübeleriyle bana ışık tutan danışman hocam Sayın Sayın Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamın deneysel kısmında dokuların elde edilmesinde ve immünohistokimyasal boyama sonuçlarının değerlendirilmesinde bana yardımcı olan Sağlık Bilimleri Üniveristesi Gülhane Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Bölümü öğretim üyesi, Sayın Prof. Dr Gülçin Güler ŞİMŞEK'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın istatistik kısmının yapılmasında desteğini esirgemeyen Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Ceylan DEMİR BAL'a teşekkürlerimi sunarım. Tezimin deney aşamalarında desteklerini esirgemeyen takım arkadaşlarım Arzu Kaya KOÇDOĞAN, Pınar KAYGIN ve Muharrem Atlı'ya teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmam boyunca sağladıkları imkanlardan dolayı Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Laboratuvarları Müdürlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam boyunca hep yanımda olan eşim Serdar Tevfik GÜRBÜZ, oğlum Ömer Said Efe GÜRBÜZ ve canım annem ve babam Yıldız ve Bülent ERTAŞ'a en içten teşekkürlerimi iletmek isterim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	IV
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
SİMGELER DİZİNİ	XII
KISALTMALAR DİZİNİ.....	XIII
1 GİRİŞ ve AMAÇ	1
1.1 Kolon Anatomisi	2
1.2 Kolon Kanseri.....	3
1.2.1 Kolon Kanserinde Epidemiyoloji.....	3
1.2.2 Kolon Kanserinde Etyoloji.....	4
1.2.3 Evreleme	6
1.2.4 Tedavi.....	9
1.3 Kolon Tümörlerinin Sınıflandırılması.....	10
1.4 5-FU ve Etki Mekanizması.....	12
1.5 İlaç Dirençlilik Proteinleri.....	14
1.5.1 P glikoprotein (MDR 1, ABCB1)	14
1.5.2 Çoklu İlaç Dirençliliği Proteinleri (MRP,ABCC).....	14
1.5.3 Çoklu İlaç Dirençlilik Proteini 1(MRP1,ABCC1).....	14
1.5.4 Çoklu İlaç Dirençlilik Proteini 2 (MRP 2, ABCC2).....	14
1.5.5 Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 3 (MRP 3,ABCC3).....	15
1.5.6 Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 4 (MRP 4,ABCC4) ve Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 5 (MRP 5,ABCC5).....	15
1.5.7 Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 6 (MRP 6, ABCC6) ve Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 7 (MRP 7, ABCC10).....	15
1.5.8 Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 8 (MRP 8, ABCC 11) ve Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 9 (MRP 9, ABCC12).....	16
1.6 Glutasyon- S transferazlar.....	16

1.6.1	Glutasyon S-Transferaz Alfa.....	17
1.6.2	Glutasyon S-Transferaz Pi.....	18
1.6.3	Glutasyon S-Transferaz Mu.....	18
1.6.4	Glutasyon S-Transferaz Omega.....	19
1.6.5	Glutasyon S-Transferaz Teta.....	19
1.6.6	Glutasyon S-Transferaz Zeta.....	20
1.6.7	Glutasyon S-Transferaz Sigma.....	20
1.7	Apoptotik Proteinler ve Kolon Kanseri.....	21
1.7.1	p 53.....	21
1.7.2	bcl-2.....	21
1.7.3	p38.....	21
1.7.4	Kaspaz-3.....	22
1.8	Ki-67 ve Kolon Kanseri.....	22
1.9	SOX-9 ve Kolon Kanseri.....	23
1.10	E-Kadherin ve Kolon Kanseri.....	24
1.11	Çalışmanın Amacı.....	25
2	MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
2.1	Kullanılan Malzemeler.....	26
2.1.1	Kullanılan Laboratuvar Cihaz ve Malzemeleri.....	26
2.2	Materyal ve Yöntem.....	27
2.2.1	Hücre Kültürü.....	27
2.2.2	Kimyasal Reaktifler ve Antikorlar.....	27
2.2.3	Sitotoksosite için WST Testi.....	27
2.2.4	Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Analizi.....	27
2.2.5	İmmüsitokimya.....	28
2.2.6	İmmühistokimya.....	29
2.2.7	Western Blot Analizi.....	32
2.2.8	İstatistiksel Analiz Yöntemleri.....	35
3	BULGULAR.....	36
3.1	Kolon Hücre Hattı İlaç Dirençliliği ve İmmüsitokimya sonuçları.....	36
3.1.1	Hücre Kültürü ve Sitotoksosite.....	36
3.1.2	Apoptotik Nekrotik Hücre Analizi.....	36
3.1.3	İmmüsitokimya.....	39
3.1.4	Western Blot.....	42
3.1.5	Kolon Kanseri Dokuları ve İmmühistokimya.....	43

4	TARTIŞMA ve SONUÇ	51
	KAYNAKLAR	62
	ÖZGEÇMİŞ	85



ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE	Sayfa
1.1 Kolorektal Kanser TNM Sınıflaması	6
2.1 Kolon kanser hastalarının klinik ve patolojik özellikler	30
2.2 Protein örneklerinin hazırlanması	33
2.3 Western blot antikor dilüsyonları.....	35
3.1 Farklı dozlarda 5-FU uygulanmış DLD-1 hücre hatlarında Apoptotik / nekrotik indeks	37
3.2 Klinik parametrelerle immünohistokimya sonuçlarının karşılaştırılması	43
3.3 Protein ekspresyonların korelasyonu: p53,bcl-2, p38,kaspaz-3, E- kaderin,SOX-9, Ki-67	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>SEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Kolon anatomik bölümleri	3
1.2 TNM Evrelemesi.....	9
1.3 5-Flourouracil Yapısı	12
3.1 Farklı 5-FU konsantrasyonlarında DLD-1'in hücre canlılıklarını ölçmek için kullanılan WST-1 testinin sonuçları	36
3.2 DLD-1 hücre kültüründe farklı konsantrasyonlarda 5-FU uygulaması sonrası apoptotik hücrelerin görüntüleri (200X).....	38
3.3 Farklı konsantrasyonlarda 5-FU uygulama sonrası DLD-1 hücre kültüründe nekrotik hücre görüntüleri. (200X).....	39
3.4 Çalışmaya konu olan bazı belirteçlerin ekspresyon düzeylerinin immünotokimyasal olarak saptanması.	40
3.5 Test edilen proteinlerin immünotokimyasal ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin radar çizimleri.	41
3.6 β -aktin, MRP-3 ve p38 antikorlarının 5-FU uygulama öncesi ve sonrası protein ekspresyonlarının western blot yöntemi ile gösterilmesi.....	42
3.7 Kolon adenokanser olgusunda kaspaz-3 ile tümörün boyanması skor (3+) (100x).....	47
3.8 Kolon adenokanser olgusunda Ki-67 ile tümörün boyanması skor(1+) (200x). 48	
3.9 Kolon adenokanser olgusunda p53 ile tümörün boyanması skor (3+) (200x)....	49
3.10 Kolon adenokanser olgusunda E-kadherin ile tümörün boyanması skor(2+) (100x).....	50

SİMGELER DİZİNİ

μ	Mikron
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
cm	Santimetre



KISALTMALAR DİZİNİ

AJCC	Amerikan Kanser Ortak Komitesi
CYP	Sitokrom p450
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
GST	Glutasyon S-Transferaz
GST-A	Glutasyon S-transferaz Alfa
GST-K	Glutasyon S-transferaz Kappa
GST-M	Glutasyon S-transferaz Mu
GST-O	Glutasyon S-transferaz Omega
GST-P	Glutasyon S-transferaz Pi
GST-S	Glutasyon S-transferaz Sigma
GST-T	Glutasyon S-transferaz Teta
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
kDa	Kilo dalton
kb	Kilo baz
MDR	Çoklu İlaç Dirençliliği
MRP	Çoklu İlaç Dirençlilik Proteini
PBS	Phosphate buffered saline
RNA	Ribo nükleik asit
TNM	Tümör, Nodül, Metastaz
UICC	Uluslararası Kanser Birliği
5 FU	5-Flourourasil

1 GİRİŞ ve AMAÇ

Kolorektal kanser (KRK), kansere bağılı ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır[1]. Kolon kanseri tedavisinde yaygın olarak uygulanan iki tedavi yöntemi kemoterapi ve cerrahidir. Kemoterapi özellikle ilerlemiş kolon kanserli hastalarda cerrahi sonrası (adjuvan kemoterapi) veya ameliyat öncesi (neoadjuvan kemoterapi) tümörü küçültmek için uygulanmaktadır [2,3]. Ancak ilaç direnci kanser tedavisinde uygulanan kemoterapinin etkinliğini sınırlamaktadır [4]. Kemoterapi sırasında kalıtsal direnç veya kazanılmış direnç ile ortaya çıkabilir [5,6].

İlaç direnci ile ilgili mekanizmalar iki kategoriye ayrılmıştır: hücrenel ve hücrenel olmayan. Hücrenel olmayan mekanizmalar, sınırlı vasküler erişilebilirlik ve tümör mikro ortamı gibi dış faktörleri içerir [7]. Bununla birlikte hücrenel faktörler, MDR taşıyıcılarının aşırı ekspresyonu, apoptotik yoldaki bozulmalar, ilaç metabolizmasındaki değişiklikler, DNA onarımındaki değişiklikler ve ilaç hedeflerindeki değişiklikler gibi mekanizmaları içerir [8-11].

5-FU(5-Flourourasil), kolorektal kanser tedavisinde öncelikli olarak kullanılan bir kemoterapi ajanıdır [12]. Günümüzde kolorektal kanserin sistematik tedavisinde FOLFOX (FA, 5-FU ve oxaliplatin), FOLFIRI (FA, 5-FU ve irinotekan), FUFA (FA ve 5-FU) gibi 5-FU bazlı kemoterapötik rejimler kullanılmaktadır[13]. Ancak etkili antikanser ajanları mevcut olmasına rağmen, bu ilaçlara karşı gelişen direnç nedeniyle tedaviler etkisiz hale gelebilir. Bu nedenle tümör kemosenitivitesini artırmak ve KRK hastalarının prognozunu iyileştirmek için MDR ile baş etmek gereklidir [14].

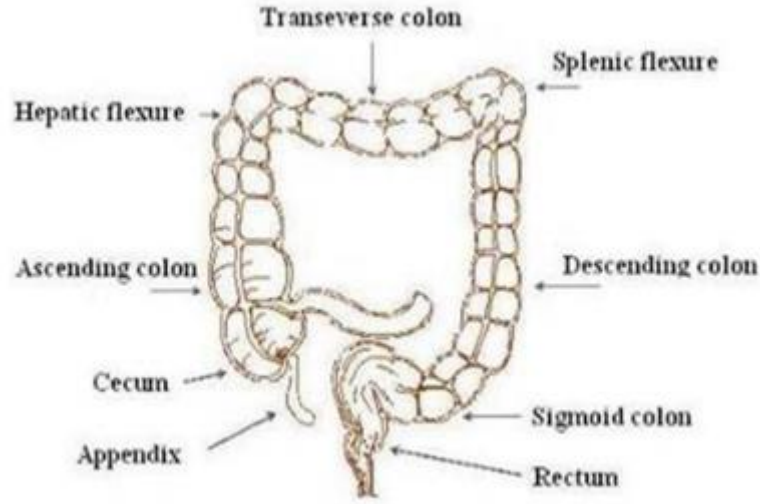
Çoklu ilaca dirençli proteinlere sahip olan ve ksenobiyotiklerin taşınmasında yer alan ATP'ye bağımlı taşıyıcı proteinlerin çoğu MDR fenotipine sahiptir; GST'nin tümör hücrelerinde aşırı ekspresyonu, MDR'nin gelişimi ile uyumludur [15,16]. Birkaç klinik çalışma, yüksek seviyelerde p53 birikiminin 5-FU bazlı kemoterapiye direnç

ile ilişkili olduğunu göstermiştir [17-19]. MAPK, CRC hücrelerinde anti-apoptotik süreçler ve kemo-direnç gelişimi ile ilişkilendirilmiştir [20].

Kolorektal kanserde, ilk tercih edilen tedavi adjuvan kemoterapi veya kemoterapi olmadan cerrahi eksizyonu olsa da [21], prognoz için yeni biyobelirteçlerin ve terapötik müdahale için moleküler hedeflerin tanımlanmasına kesinlikle ihtiyaç vardır. Kolorektal kanser başlangıcı ve ilerlemesi, kromozomal kararsızlık (CIN) ve mikro uydu kararsızlığı (MSI) [22] gibi mutasyonel yollarla bağlantılıdır ve kolorektal karsinogenez, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozun [23] homeostatik kontrolünün ilerleyici kaybı ile ilişkilidir. Transkripsiyon faktörleri, bu hücre süreçlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.

1.1 Kolon Anatomisi

Kolon, ileoçekal bileşmeden anüse uzanan 1.5m uzunluğundaki kalın bağırsağın üç ana bölümünden (kolon, rektum ve anal kanal) biridir. Tüm kolon yaklaşık 150 cm uzunluğundadır ve kolon ascendens, kolon transversum, kolon descendens ve kolon sigmoideum olmak üzere dört ana bölüme ayrılmıştır Şekil 1.1. Sağ kolon; çekum, kolon ascendens, hepatik fleksura ve kolon transversum sağ yarısından oluşur. Sol kolon; kolon transversum sol yarısını, kolon descendens, splenik fleksurayı ve sigmoidi içerir. Rektum, anüsten önceki son anatomik segmenttir[24-26]. Kolonun ana işlevi, kolonik mikroorganizmaların büyümesi için uygun ortamın yaratılması, dışkı içeriğinin depolanması, kolon içeriğinin uygun zamanda dışarı atılması ve lümeninden potasyum ve suyun emilmesidir[27].



Şekil 1.1 Kolon anatomik bölümleri [24]

1.2 Kolon Kanseri

1.2.1 Kolon Kanserinde Epidemiyoloji

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) GLABACON 2020 verilerine göre kolorektal kanserde her iki cinsiyet ve tüm yaştaki kanser vakalarında 10%; 9,4% mortalite oranlarıyla dünyada 3. sırada yer almaktadır. Dünyanın farklı bölgelerinde (Asya, Avrupa, Kuzey Amerika, Latin Amerika, Afrika, Okyanusya), kolorektal kanser insidansı her iki cinsiyette 49,6%; mortalite 51,4% oranları ile Asya bölgesi tüm bu bölgeler arasında 1. sıradadır [28]. Türkiye Bileşik Veri Tabanı 2017 veri tabanına verilerine göre; kolorektal kanser kadınlarda 8,1% ve erkeklerde 9,8% oranları ile 3.sırada yer alarak dünya verileri ile paralellik göstermektedir. Türkiye de en sık görülen bazı kanserlerin yaş profiline göre dağılımları; 0-14 yaş grubunda 0%, 15-24 yaş grubu erkeklerde 2,8%/kadınlarda tanımlanmamış, 25-49 yaş grubunda erkeklerde 11,7% oranıyla 1.sırada, kadınlarda 4,6 % ile 3.sırada; 50-69 yaş grubunda erkeklerde 10,1%, kadınlarda 8,5% ile erkek ve kadınlarda 3.sırada; 70 yaş üzeri grupta erkeklerde 9,7% oranıyla 3.sırada, kadınlarda 11,9 % ile 2.sırada yer almaktadır [29]. Kanser tarama programlarıyla kanser öncesi poliplerin belirlenmesi kanser insidansının azalmasına büyük ölçüde katkıda bulunmuştur [30].

1.2.2 Kolon Kanserinde Etyoloji

Yaş, kalıtsal yatkınlık, kişinin adenomatöz polip geçmişi, inflamatuvar geçmişi gibi değiştirilemez risk faktörleri ve beslenme şekli, fiziksel aktivite ve obezite durumu, sigara kullanımı, yüksek alkol tüketimi gibi çevresel faktörler kolorektal kanser gelişiminde önemli rol oynar [31].

1.2.2.1 Yaş

Kolorektal kanser tanısı olasılığı 40 yaşından sonra artmaya başlar ve 50 yaşından itibaren bu olasılık daha keskin bir şekilde artar[32].Kolorektal kanser vakalarının %90'ı 50 yaş ve üzeri vakalarda görülür [33]. 60 ile 79 yaş arası kanser insidansı 40 yaş altına göre daha 50 kat daha fazladır [34]. Ancak kolorektal kanser genç kişiler arasında da artış göstermektedir [35,36].

1.2.2.2 Adenomatus

Kolorektumun neoplastik polipleri,t übüler ve villöz adenomlar kolorektal kanserin öncü lezyonlarıdır[37].Daha önce adenom geçmişi olan bireylerde, hiç adenom geçmişi olmayan bireylere göre kolorektal kanser gelişim riskinin daha yüksek olduğu bulunmuştur [38].Maling gelişim öncesinde adenomu belirlenmesi ve ortadan kaldırılması kolorektal kanser riskini azaltabilir[39]. Adenomatöz polip veya lokalize karsinomun çıkarılması gelecekte artan bir oranda kolon ve rektumda metakron kanser gelişimi ile ilişkilendirilmiştir [38].

İnflamatuvar bağırsak hastalığı, ülseratif kolit ve chron hastalığı olmak üzere iki hastalığı tanımlamak için kullanılır. Ülseratif kolit kolon ve rektum mukozasında inflamasyona sebep olurken; chron hastalığı bağırsak duvarının kalınlaşması ve ağızdan başlayıp anüse kadar sindirim sisteminin herhangi bir bölümünde inflamasyonla sonuçlanır[33]. İnflamatuvar bağırsak hastalıkları ile kanser riskinin 4 ila 20 kat arasında bir artış ilişkisi bulunduğu tespit edilmiştir[37].

1.2.2.3 Kalıtılan genetik risk

Kolorektal kanserlerin %5-10 belirlenen kalıtsal koşullar sonucudur[40]. En yaygın kalıtsal durumlar ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve Linc sendromu olarak da isimlendirilen kalıtımsal polip olmayan kolorektal kanser(HNPCC)dir. Kalıtımsal

kolorektal kanserlerin bu türlerinden sorumlu genler tanımlanmıştır. DNA tamir yolağında görev yapan MLH1 ve MSH2 genlerindeki mutasyon HNPCC ile ilişkilidir [41,42]. FAP ise tümör süpressör gen olan APC 'deki mutasyonlardan kaynaklanır[43].

1.2.2.4 Beslenme alışkanlığı

Diyet kolorektal kanser riskini güçlü bir şekilde etkiler ve gıda alışkanlıklarındaki değişiklikler kanser yükünü % 70'e kadar düşebilir[44]. Özellikle hayvansal yağlar kolorektal kanser için önemli bir risk faktörüdür[45]. Etiyolojik olarak yağın etkisi yağı degrade etme yeteneğine sahip bakteri florası safra tuzlarını potansiyel karsinojenik N-nitroz bileşiklerine dönüşümü ile bağlantılıdır. Kolon kanseri, rektum kanserine göre et tüketimi ile daha fazla ilişkilendirilmiştir [46]. Kırmızı etin kolorektal kanser ile ilişkisi kırmızı et içeriğindeki Fe'den kaynaklanır[47]. Bunlara ek olarak yüksek sıcaklıkta pişirilen bazı etler; heterosiklik amin ve polisiklik aromatik hidrokarbonların üretimi ile sonuçlanır ve her ikisinde kanserojen özelliğe sahiptir. Bazı çalışmalarda meyve ve sebze içeriği düşük diet yapanların kolorektal kanser riskinin daha yüksek olabileceği gösterilmiştir[48].

1.2.2.5 Fiziksel aktivite

Fiziksel aktivite ve sağlıklı besleme, kolorektal kanseri riskini, rektum kanseri riskine göre azalttığını gösteren kanıtlar daha güçlüdür[49].

1.2.2.6 Sigara kullanımı

Kolorektal kanser ölümlerinin %12 sinden sigaranın sorumlu olduğunu gösteren kanıtlar vardır [50]. Kolorektal kanserin gösterge lezyonları olan ,adenomatöz poliplerin hem oluşumu hem de büyümesi için sigara kullanımı önemlidir[51].

1.2.2.7 Alkol Tüketimi

Genç yaşta alkol tüketimi kolorektal kanserin başlamasında bir faktördür. Aset aldehit gibi alkolün reaktif metaboliti karsinojen olabilir. Alkolün varlığı sigaranın neden olduğu DNA'daki spesifik mutasyonları uyarabilir, DNA tamir mekanizmasının doğru çalışmamasına neden olur. Alkol ayrıca iyi bir çözücü olabilir diğer karsinojenik moleküllerin mukozal hücrelere hızlı penetrasyonuna da neden olur[52].

1.2.3 Evreleme

Kolorektal kanser evrelemesinde 1936'dan beri Duke's Sınıflama, Astler Coller Sınıflama, TNM Sınıflama olmak üzere üç farklı evreleme sistemi kullanılmıştır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan sınıflama sistemi Amerika Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) tarafından geliştirilen ve Uluslararası Kanser Birliği (UICC) tarafından onaylanan TNM sınıflamasıdır [53]. Tümör derinliği (büyüklüğü), lenf nodu metastazı ve uzak organ metastazının değerlendirildiği bu evrelemede Ocak 2018'den itibaren geçerli olan en yeni AJCC sistemi [54] Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1 Kolorektal kanser TNM sınıflaması[54]

AJCC EVRE	EVRE GRUPLAMASI	EVRE TANIMLAMASI*
0	Tis N0 M0	Kanser en erken evresinde. Bu aşama ayrıca karsinoma in situ veya intramukozal karsinom (Tis) olarak da bilinir. Kolon veya rektumun iç tabakasının (mukoza) ötesine geçmemiştir.
I	T1 or T2 N0 M0	Kanser, muskularis mukozadan submukozaya (T1) büyümüştür ve ayrıca muskularis propriaya (T2) büyümüş olabilir. Yakındaki lenf düğümlerine (N0) veya uzak bölgelere (M0) yayılmamıştır.
II A	T3 N0 M0	Kanser, kolonun veya rektumun en dış katmanlarına doğru büyümüştür ancak bunları geçmemiştir (T3). Yakın organlara ulaşmamıştır. Yakındaki lenf düğümlerine (N0) veya uzak bölgelere (M0) yayılmamıştır.
IIB	T4a N0 M0	Kanser kolon veya rektumun duvarından büyümüştür ancak yakındaki diğer dokulara veya organlara yayılmamıştır (T4a). Yakın organlara ulaşmamıştır. Yakındaki lenf düğümlerine (N0) veya uzak bölgelere (M0) yayılmamıştır.

Çizelge 1.1 Kolorektal kanser TNM sınıflaması devamı

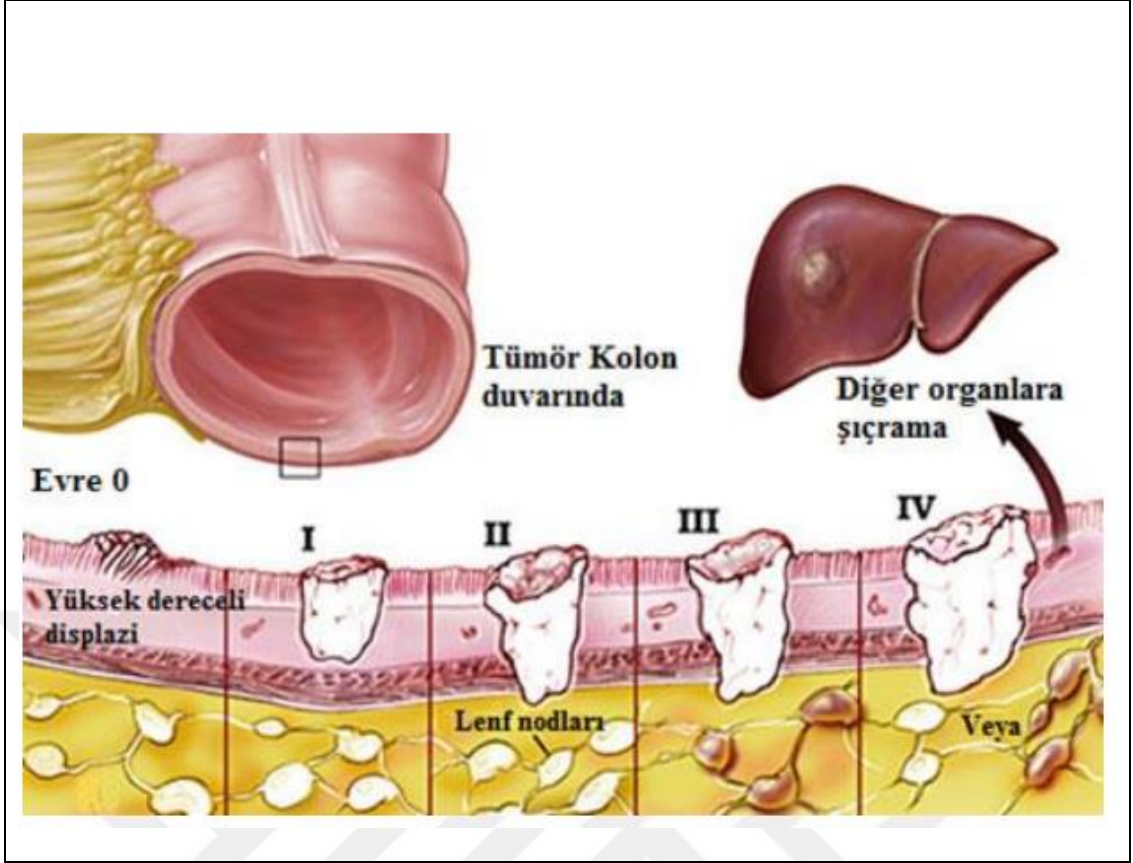
IIC	T4b N0 M0	Kanser kolon veya rektumun duvarından büyümüştür ve yakındaki diğer doku veya organlara büyümüş oralara yapışmıştır (T4b).Henüz yakındaki lenf düğümlerine (N0) veya uzak bölgelere (M0) yayılmamıştır.
III A	T1 or T2 N1/N1c M0	Kanser, mukozadan submukozaya doğru büyümüştür. (T1) ve ayrıca muskularis propriaya (T2) dönüşmüş olabilir. 1 ile 3 yakındaki lenf düğümlerine (N1) veya lenf düğümlerinin yakınındaki yağ alanlarına yayıldı, ancak düğümlerin kendilerine yayılmadı (N1c). Uzak bölgelere yayılmamıştır (M0).
	T1 N2a M0	Kanser, mukozadan submukozaya (T1) büyümüştür. 4 ile 6 yakındaki lenf düğümlerine (N2a) yayılmıştır. Uzak bölgelere yayılmamıştır (M0).
IIIB	T3 or T4a N1/N1c M0	Kanser, kolon veya rektumun en dış katmanlarına (T3) veya viseral periton (T4a) yoluyla büyümüştür, ancak yakındaki organlara ulaşmamıştır. Yakındaki 1 ila 3 lenf düğümüne (N1a veya N1b) veya lenf düğümlerinin yakınındaki yağ alanlarına yayıldı, ancak düğümlerin kendilerine yayılmadı (N1c). Uzak bölgelere yayılmamıştır (M0).
	T2 or T3 N2a M0	Kanser, muskularis propriaya (T2) veya kolon veya rektumun (T3) en dış katmanlarına doğru büyümüştür. 4 ila 6 yakındaki lenf düğümlerine (N2a) yayılmıştır. Uzak bölgelere yayılmamıştır (M0).
	T1 or T2 N2b M0	Kanser, mukozadan submukozaya (T1) büyümüştür ve ayrıca muskularis propriaya (T2) büyümüş olabilir. 7 veya daha fazla yakındaki lenf düğümüne (N2b) yayılmıştır. Uzak bölgelere yayılmamıştır (M0).
IIC	T4a N2a M0	Kanser kolon veya rektumun duvarından (visseral periton dahil) büyümüştür ancak yakın organlara ulaşmamıştır (T4a). 4 ila 6 yakındaki lenf düğümlerine (N2a) yayılmıştır. Uzak bölgelere yayılmamıştır (M0).

Çizelge 1.1 Kolorektal kanser TNM sınıflaması devamı

IIIC	T3 or T4a N2b M0	Kanser, kolon veya rektumun en dış katmanlarına (T3) veya viseral periton (T4a) yoluyla büyümüştür, ancak yakındaki organlara ulaşmamıştır. 7 veya daha fazla yakındaki lenf düğümüne (N2b) yayılmıştır. Uzak bölgelere yayılmamıştır (M0).
	T4b N1 or N2 M0	Kanser kolon veya rektumun duvarından büyümüştür ve yakındaki diğer doku veya organlara bağlı veya büyümüş(T4b). Yakındaki en az bir lenf düğümüne veya lenf düğümlerinin (N1 veya N2) yakınındaki yağ bölgelerine yayılmıştır. Uzak bölgelere yayılmamıştır (M0).
IVA	Any T Any N M1a	Kanser, kolon veya rektumun duvarından büyümüş olabilir veya olmayabilir (Herhangi bir T). Lenf düğümleri tarafından yakınlar yayılmış olabilir veya olmayabilir (Herhangi bir N). 1 uzak organa (karaciğer veya akciğer gibi) veya uzak lenf düğümlerine yayıldı, ancak peritonun (karın boşluğunun astarı) uzak kısımlarına yayılmadı (M1a).
IVB	Any T Any N M1b	Kanser, kolon veya rektumun duvarından büyümüş olabilir veya olmayabilir (Herhangi bir T). Lenf düğümleri tarafından yakınlar yayılmış olabilir veya olmayabilir (Herhangi bir N). 1'den fazla uzak organa (karaciğer veya akciğer gibi) veya uzak lenf düğümlerine yayıldı, ancak peritonun (karın boşluğunun astarı) uzak kısımlarına yayılmadı (M1b).
IVC	Any T Any N M1c	Kanser, kolon veya rektumun duvarından büyümüş olabilir veya olmayabilir (Herhangi bir T). Lenf düğümleri tarafından yakınlar yayılmış olabilir veya olmayabilir (Herhangi bir N). Peritonun uzak kısımlarına (karın boşluğunun astarı) yayılmıştır ve uzak organlara veya lenf düğümlerine yayılmış olabilir veya olmayabilir (M1c).

*Aşağıdaki ek kategoriler yukarıdaki tabloda listelenmemiştir:

- T_x: Bilgi eksikliği nedeniyle ana tümör değerlendirilemiyor
- T₀: Primer tümör kanıtı yok.
- N_x: Bilgi eksikliğinden dolayı bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemiyor.



Şekil 1.2 TNM Evrelemesi

1.2.4 Tedavi

Kolorektal kanserin tedavi yönetimi öncelikle komşu lenf düğümleri ile bağırsağın rezeksiyonuna dayanır. Eşzamanlı radyoterapi olsun veya olmasın neoadjuvan veya adjuvan kemoterapi ihtiyacı, tümörün konumuna ve hastalığın evresine bağlıdır. Kolorektal kanserin erken evreleri, mümkünse öncelikle cerrahi-laparoskopik kolektomi ile tedavi edilir. Tanı anında bölgesel veya uzak metastazlar keşfedilirse, cerrahi ve diğer terapötik yöntemlerin bir kombinasyonu endikedir. Kolorektal kanser için adjuvan tedavi, evre IV hastalığın ve evre III hastalığın küratif amaçlı rezeksiyonları için endikedir[55]. Evre II hastalıkta adjuvan tedavinin faydası belirsiz ve tartışmalıdır [56]. Yüksek riskli hastalar bu tür tedavi için düşünülebilir. Öte yandan, daha kötü prognozlu hastalar kemoterapi yerine palyatif bakımdan daha fazla fayda görebilirler [57]

1.3 Kolon Tümörlerinin Sınıflandırılması

Dünya Sağlık Örgütü (WHO 2019) sınıflamasına göre kolon kanserinin histolojik açıdan aşağıda verilen başlıklar altında incelenmektedir[58]

İyi huylu epitelyal tümörler ve öncüleri

- Serrated displazi, düşük dereceli
- Serrated displazi, yüksek dereceli
 - Hiperplastik polip, mikroveziküler tip
 - Hiperplastik polip, kadeh hücresi
- Adenomatöz polip, düşük dereceli displazi
- Adenomatöz polip, yüksek dereceli displazi
 - Tübüler adenom, düşük derece
 - Tübüler adenom, yüksek dereceli
 - Villöz adenom, düşük dereceli
 - Villöz adenom, yüksek dereceli
 - Tubulovillöz adenom, düşük dereceli
 - Tubulovillöz adenom, yüksek derece -Gelişmiş adenom
- Glandüler intraepitelyal neoplazi, düşük dereceli
- Glandüler intraepitelyal neoplazi, yüksek dereceli

Malign epitelyal tümörler

- Adenokarsinom,

-Adenom benzeri adenokarsinom

-Mikropapiller adenokarsinom

-Müsinöz adenokarsinom

-Zayıf kohezyonlu karsinom

-Taşlı yüzük hücreli karsinom

-Medüller adenokarsinom

-Adenoskuamöz karsinom

-Karsinom, farklılaşmamış,

-Sarkomatoid bileşenli karsinom

- Nöroendokrin tümör,

-Nöroendokrin tümör, derece 1

-Nöroendokrin tümör, derece2

-Nöroendokrin tümör, derece3

-L hücreli tümör

-Glukagon benzeri peptit üreten tümör

-PP / PYY üreten tümör

-Enterokromafin hücreli karsinoid

-Serotonin üreten karsinoid

- Nöroendokrin karsinom,

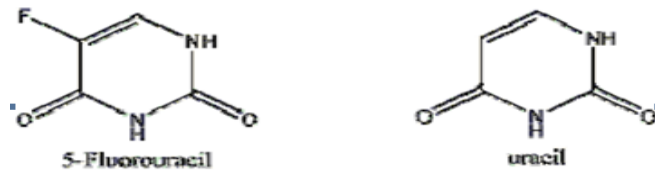
-Büyük hücreli nöroendokrin karsinom

-Küçük hücreli nöroendokrin karsinom

- Karışık nöroendokrin - nöroendokrin olmayan neoplazm

1.4 5-FU ve Etki Mekanizması

5-FU geniş çaplı antikanser ilacı olarak kullanılmaktadır.1957'den beri kolon kanseri, meme kanseri, baş boyun kanserleri gibi birçok kanserin tedavisinde önemli rol oynamaktadır [59]. 5-FU, DNA ve RNA'daki pirimidin moleküllerine benzer bir yapıya sahip bir heterosiklik aromatik organik bileşiktir [60] Şekil 1.3. 5-FU nükleozit ile etkileşir , DNA ve RNA 'ya dahil olur ve böylece sitotoksiste ve hücre ölümüne sebep olur [61,62].



Şekil 1.3 5-Flourourasil Yapısı

Geçen 50 yılda birçok avantajına rağmen, ilaç dirençliliğinden dolayı klinik uygulamalar sınırlandırılmıştır. Kolorektal kanserde tek başına uygulamalarda 5-FU'nun için genel yanıt oranı % 10-15'tir[63]. 5-FU ile diğer anti-tümör ilaçların kombinasyonunda yanıt oranları % 40-50'lerdedir [64].Bu nedenle terapi ve direncin çevrilmesinde acil yeni stratejilere ihtiyaç vardır. Tümörlerin 5-FU'e dirençli olduğu mekanizmaların anlaşılması ve bu direncin tahmin edilmesi veya aşılmasında önemli bir adımdır.

5-FU, timidilat sentaz (TS) ile kararlı bir kompleks oluşturularak florodeoksiüridin monofosfata (FdUMP) dönüştürülür ve böylece deoksitimidin monofosfat (dTMP) üretimini inhibe eder. DNA replikasyonu ve onarımı için dTMP gereklidir, dTMP'nin tükenmesi sitotoksositeye neden olur[65,66]. 5-FU'nun dihidroflorourasil (DHFU)'ya Dihidropirimidin dehidrogenaz (DPD) aracılı dönüşümü normal ve tümörlü hücrelerde 5-FU katabolizmasının hız sınırlayıcı adımıdır. Uygulanan 5-FU'nun% 80'ine kadarı DPD olarak karaciğer tarafından bozulur[67].

Araştırmalar 5-FU'nun antikanser etkisini TS inhibisyonu ile sağladığını gösteriyor. TS, timidilat sentezini katalizleyen bir enzimdir ve protein sentezi ile apoptotik süreçleri düzenler[68,69]. Sentezlenen timidilat DNA replikasyonu ve tamirinin devamlılığını sağlar [70].

Kanser hücrelerinin ilaca bağlı apoptosise duyarlılığının artırılması 5-FU için önemli bir strateji haline gelmiştir. 5-FU kaspaz-6'yı aktive ederek kanser hücresinde apoptozunu tetikleyebilir. RSV p53'den bağımsız olarak yüksek konsantrasyonda sinerjik olarak 5-FU-aracılı apoptozu teşvik eder [71]. 5-FU ayrıca p53'e bağlı yolda mitokondriyal ROS üretir[72].

Anti-kanser ilaç direnci, ilaç akışının değiştirilmesi de dahil olmak üzere çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir ve dışı akımı, ilaç inaktivasyonu ve ilaç hedefinin mutasyonu artırılması, yüksek seviyedeki TS ekspresyonu[73], deoksiüridin trifosfataz aktivitesini artırır[74], Bcl-2 [75], Bcl-XL [76], Mcl-1 proteini'nin aşırı eksprese edilmesi 5U'ya karşı direncin gelişmesine sebep olur.

5-FU'ya karşı ilaç direncinin başka bir mekanizması ise ROS 'a adaptif hücresel yanıtıdır. Akut oksidatif stres hücrede apoptozu veya nekrozu tetikler, kalıcı oksidatif stres genomik kararsızlığı uyarır ve bu da tümörün ilerlemesi ve ilaç direncinin oluşmasında rol oynar. Çalışmalar oksidatif strese adapte olmuş tümör hücreleri, manganez süperoksit dismutaz, Prx I ve Bcl-2'yi artırarak 5-FU'ya direnç gösterirler [77].

1.5 İlaç Dirençlilik Proteinleri

1.5.1 P glikoprotein (MDR 1, ABCB1)

Kromozom 7q21 üzerinde bulunan çoklu ilaç direnci 1 (MDR-1) geni tarafından kodlanan P-gp, 170 kDA'luk ATP bağlayıcı protein süper ailesinin bir üyesidir[78]. Karaciğer, böbrek, kolon, adrenal dahil olmak üzere normal insan dokularının plazma zarı, golgi zarı ve hücre içi kanalikülünde yaygın olarak eksprese edilir.

P-Glikoprotein, substratlarının taşınmasında ve/veya salgılanmasında ve dokuların fizyolojik olarak aktif maddelerden, sitotoksik ajanlardan ve ksenobiyotiklerden korunmasında işlev görür[79-81].

1.5.2 Çoklu İlaç Dirençliliği Proteinleri (MRP,ABCC)

Çoklu ilaç direnci proteinleri (MRP), hücre zarında yer alan ABC üst ailesine ait olan 13 proteinden oluşan ABC alt ailesinin üyeleridir ve birçok kemoterapötik ajanın emilimini, dağılımını ve atılımını modüle eder ve hedef hücreyi ölümden korur. MRP1'den MRP9' a kadar çoklu ilaç dirençliliği ile ilişkilidir [82,83]. MRP1-9'da yapısalve fonksiyonel benzerlikler bulunmaktadır[84].

1.5.3 Çoklu İlaç Dirençlilik Proteini 1(MRP1,ABCC1)

190 k DA büyüklüğünde olan MRP 1,16. Kromozom tarafından kodlanmaktadır. MRP1'i aşırı eksprese eden hücreler, doksorubisin, vinkristin, etoposid, kampatesin ve metotreksat dahil birçok antitümör ajana direnç gösterirken, MRP1, LTC4 ve GS-prostaglandin A2 gibi GSH konjugatlarını, estradiol 17-D-glukuronid gibi glukuronid konjugatlarını taşır[85,86].

1.5.4 Çoklu İlaç Dirençlilik Proteini 2 (MRP 2, ABCC2)

MRP2 esas olarak, polarize hücreler içeren karaciğer ve böbreklerde eksprese edilir [87] MRP2, apikal yüzeyde, ağırlıklı olarak hepatositlerin kanaliküler membranında lokalizedir. Bu proteinin temel fizyolojik işlevi, konjuge proteinleri taşımaktır.

metabolitleri karaciğerde safra kanalına girer. Bozulmuş MRP2 ekspresyonu olan sıçanlar, bilirubin glukuronidin hepatobiliyer ekstrüzyonunda kusurlar gösterir ve Dubin-Johnson sendromu geliştirir [88].

1.5.5 Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 3 (MRP 3,ABCC3)

MRP3'ün genel yapısal organizasyonu, MRP1 ve MRP2'ninkilere benzer, ancak MRP3'ün substrat özgüllüğü, MRP1 ve MRP2'ninkilere tamamen benzer değildir. MRP3, E217G, LTC4 ve GS-DNP'yi taşır. Ancak MRP1'den farklı olarak E217G'nin MRP3 tarafından taşınması GSH tarafından uyarılmaz Benzer şekilde, etoposid MRP3 tarafından değiştirilmemiş biçimde taşınıyor gibi görünmektedir ve GSH gerektirmemektedir bu da MRP1 için varsayımsal birlikte taşıma mekanizmasının MRP3 için geçerli olmadığını düşündürür[89].

1.5.6 Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 4 (MRP 4,ABCC4) ve Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 5 (MRP 5,ABCC5)

MRP4 ve MRP5'te MSD0 alanlarının bulunmamasından dolayı bu taşıyıcılar, MRP1, MRP2 ve MRP3'ten farklı substrat spesifiklikleri ve ilaç direnç profilleri sergiler. MRP4 ve MRP5, glukuronid gibi organik anyonik bileşikleri ve E217G ve DHEAS gibi steroidlerin sülfat konjugatlarını taşıma yeteneğine sahiptir. MRP4 ve MRP5 ayrıca cAMP ve siklik GMP'nin (cGMP) önemli taşıyıcılarıdır [90-92].

1.5.7 Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 6 (MRP 6, ABCC6) ve Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 7 (MRP 7, ABCC10)

MRP2 gibi, MRP6 da karaciğer ve böbreklerde eksprese edilir [93]. Nakavt teknolojisi ile kesilen MRP6'ya sahip hayvanlar, bağ derisinde mineralizasyon geliştirir, psödoksantoma elastikum sendromuna benzeyen bir fenotiptir [94].

MRP7'nin ekspresyonu her yerde bulunur, ancak hem yetişkin hem de fetal dokularda pankreasta daha yüksektir [94].Doksorubisin ile tedavi edilen MCF7 hücrelerinde artan MRP7 ekspresyonu tespit edildi, bu da bunun antitümör ajanlara dirençte rol oynayabileceğini düşündürdü[95]. Belinsky et al. MRP6'nın LTC4 ve

GS-DNP gibi GS-konjugatlarını taşıdığı, ancak E217G gibi glukuronid konjugatlarını taşımadığını göstermiş olması, MRP6'nın aynı zamanda bir GS-X pompası olduğunu düşündürmektedir [96]. GSH'nin bu taşıyıcıların işlevindeki rolleri, diğer MRP taşıyıcılarınınki kadar iyi tanımlanmamıştır.

1.5.8 Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 8 (MRP 8, ABCC 11) ve Çoklu ilaç Dirençlilik Proteini 9 (MRP 9, ABCC12)

MRP8 (ABCC11) ve MRP9 (ABCC12), veritabanı araştırması ile tanımlanan ve taşıyıcılarıdır [97] Her iki gen ürününün tahmin edilen amino asit dizileri, MRP4 ve MRP5'inkilere yüksek benzerlik gösterir. Fonksiyonel olarak ta nükleozid analoglarına karşı direnç oluşmasındaki rolleri MRP-4 ve MRP-5 ile benzer özellik göstermektedir [98].

1.6 Glutasyon- S transferazlar

Hücredeki konumlarına bağlı olarak, GST'ler sitoplazmik (A, P, M, S, T, Z), mitokondriyal (K) veya zara bağlı (Eikosanoid ve Glutasyon metabolizmasında Membran İlişkili Proteinler) olarak gruplandırılır[99]. Sitoplazmik Glutasyon S-transferazlar , amino asit dizilerine ve substrat spesifikliğine göre alfa (A), kapa (K), mu (M), omega (O), pi (P), sigma (S), teta (T) ve zeta (Z) şeklinde sınıflandırılmışlardır.[100] GST'ler, çoğu yaşam formunda bulunan ve hücre homeostazın sürdürülmesi için hayati önem taşıyan faz II detoksifikasyon enzimleridir [101]. GST'ler, öncelikle indirgenmiş glutasyon (GSH) ve sitokrom P450 metabolizması tarafından üretilen reaktif elektrofillerin konjugasyon reaksiyonunu katalize ederek, GSH konjugatlarını oluşturmak üzere sitoprotektif bir rol oynar [102]. Detoksifikasyon rollerine ek olarak, GST'ler hücre sinyalizasyonu, translasyon sonrası modifikasyon ve kemoterapötik ajanlara dirençteki işlevleriyle bilinir [103]. Örneğin, GST'lerin pi ve mu sınıfları, c-Jun N-terminal kinaz 1 (JNK1) ve apoptoz sinyal düzenleyici kinaz ile doğrudan etkileşimler yoluyla hücre hayatta kalmasını ve hücre ölümü sinyallerini yöneten mitojenle aktive olan protein (MAP) kinaz yolunu düzenler. (ASK1) [104]. Ek olarak, GST'ler, translasyon sonrası modifikasyonları için bir dizi hücre içi protein ile kompleksler oluşturur [105].

Kristalografik çalışmalar, katalitik GST'lerin benzer üçüncül yapılar sergilediğini ve memelilerde homodimerler olarak var olduklarını ortaya koymuştur [106]; bununla birlikte, bitkilerde birkaç sitozolik GST'nin heterodimerleri tanımlanmıştır [107]. Şu anda, GST proteinlerinin enzimatik olarak aktif monomerleri bilinmemektedir [108]. Daha sonraki yapısal analizler, tüm temel GST ailesinin üyeler, iki alandan oluşan bir temel protein katına sahiptir: N-terminal alanı ve C-terminal alanı. GST N-terminal alanı kıvrımı, glutatyon peroksidazlar ve glutaredoksinler gibi diğer hücrel homeostaz ve detoksifikasyon proteinlerine benzer. GST proteinlerinin sekans ve yapı benzerliğinin global karakterizasyonu iki ana alt grup gösterir: (1) GSH'yi aktive etmek için tirozin kullanan tirozin tipi GST'ler (Y-GST'ler); ve (2) GSH ile etkileşime girmek için serin (veya GST Omega (GSTO) durumunda sistein kullanan) S/C-GST'ler [109] Bununla birlikte, GST'lerin C-terminal alanı, protein yapısının diğer üçte ikisini oluşturur ve benzersiz bir all- α -sarmal alanından oluşur [110]. Hidrofobik substratlar, H-bölgesi olarak bilinen N- ve C-terminal alanları arasındaki bir yarığa bağlanır. G-yerinden farklı olarak, H-bölgesi, sınıflar arasında şekil ve kimyasal yapı bakımından oldukça değişkendir [111] H bölgesi yapısındaki bu değişkenlik, çeşitli GST izozimlerinin substrat seçiciliğini belirler [112].

1.6.1 Glutatyon S-Transferaz Alfa

GST Alfa (GSTA), karaciğer, böbrekler, adrenal bezler, bağırsak ve testislerde yüksek ekspresyonu ile akciğer de dahil olmak üzere çok çeşitli diğer dokularda orta-düşük seviyelerde eksprese edilir . GST Alpha sınıfı genler, kromozom 6'ya eşlenmiş bir kümede bulunur ve beş farklı izoform içerir: GSTA1, GSTA2, GSTA3 (ekspresyon nadirdir), GSTA4 ve GSTA5, ancak GSTA5'in hiçbir zaman fonksiyonel bir gen olarak doğrulanmamıştır [113]. GSTA izoformlarından GSTA4 proteini, uzunluk olarak aynıdır ve insan GSTA1 ve GSTA2 ile %54 sekans özdeşliğini paylaşır. Faz II detoksifikasyon enzimi olmasının yanı sıra, insan Alfa sınıf genlerinin karaciğerde bilirubin ve hemi metabolize ettiği bilinmektedir. GSTA enzimleri ayrıca oksidanların ve lipid peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonu yoluyla hücrelerin ve dokuların korunmasına yardımcı olan GPX aktivitesi sergiler. GSTA enzimlerinin, glutatyon bağımlı steroid izomeraz aktivitesine de (özellikle GSTA3) [113,114] sahip olduğu ve polisiklik aromatik hidrokarbonlara, epoksitlere ve lipid peroksidasyonunun alkenil ürünlerine (4-hidroksi-inonenal), özellikle

GSTA4'e karşı aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. [115]. Alfa sınıfı GST'lerde tek nükleotid polimorfizmlerin neden olduğu özelliklerin, çevresel bir bileşeni olan hastalıklara (kanser, astım ve kardiyovasküler hastalık gibi) duyarlılıkta rol oynadığını göstermektedir[116].

1.6.2 Glutasyon S-Transferaz Pi

GSTP sınıfının sadece bir izoformunun, kromozom 11'de yer alan GSTP1'in insanlarda eksprese edildiği bilinmektedir [117-119]. GSTP1, ana ekspresyonu kalp, akciğer ve beyinde olmak üzere en yaygın olarak karaciğer dışında eksprese edilen GST'dir. GSTP, akciğerde CDNB'ye yönelik GST aktivitesinin %90'ından fazlasını oluşturur ve kalan aktivite GSTM1 ve GSTT1'e atfedilir [120]. Ek olarak, GSTP substrata bağımlı olmayan bir şekilde doğrudan protein-protein etkileşimi ile JNK'ye bağlanabilir, böylece kinaz aktivitesini inhibe eder ve hücreleri (H₂O₂ ile indüklenen) hücre ölümüne karşı korur [121,122]. GSTP'nin bir başka ligand bağlanma ortağı, sırayla p38 ve JNK'yi [123] aktive eden ve GSTP bağlanması tarafından inhibe edilen TNF-a kaynaklı sinyalleme bir üyesi olan tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 2'dir (TRAF2). Ayrıca GSTP'nin ileri PSSG reaksiyonunu katalize ettiği bilinmektedir [124].

1.6.3 Glutasyon S-Transferaz Mu

GST Mu (GSTM) sınıfının, GSTM1 ila GSTM5 olmak üzere, kromozom 1 üzerinde bulunan ve farklı organlarda(karaciğer, akciğerler, kas, böbrek ve beyin dahil olmak üzere) çoğu dokuda yüksek oranda eksprese edilen beş izoformu mevcuttur[125,126]. STM, CDNB kullanır ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler gibi kanserojen bileşiklerin ve benzon(a)piren, stiren-7,8-oksit ve trans-stilben oksit gibi diğer organik bileşiklerin detoksifikasyonuna katılır [127]. GSTM1'in, bir protein olan c-Jun N-terminal kinazı (JNK) aktive eden bir MAPK kinaz kinazı (MAPKKK) olan apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1) aktivitesini [128] bağladığı (substrata bağımlı olmayan) ve bastırdığı gösterilmiştir. stres yanıtlarında ve pro apoptotik sinyalleşmede ve sitokin ve stres kaynaklı apoptozu düzenleyen p38 yollarında önemlidir.

1.6.4 Glutasyon S-Transferaz Omega

GSTO esas olarak karaciğerde, özellikle makrofajlarda, glialde ve endokrin hücrelerin yanı sıra örneğin böbrek, akciğer ve safra kesesi gibi diğer dokularda bulunur [129]. GSTO sınıfının iki izoformu vardır, GSTO1 ve GSTO2, kromozom 10'da yer alır [130] ve üçüncü bir dizi, kromozom 3'te tanımlanan GSTO3p, ters kopyalanmış bir psödojen gibi görünmektedir [129]. GSTO1 ve GSTO2, %64 dizi homolojisi sergileyen iki homo-dimerik proteindir [131]. GSTO2 testis, karaciğer, böbrek ve iskelet kasında güçlü bir şekilde eksprese edilirken GSTO1 kalpte, gastrointestinal dokularda ve akciğerde orta derecede eksprese edilir [129]. Omega sınıfı, ana deglutasyonilasyon enzimleri olan GLRX'lerin üçüncül yapısına benzeyen benzersiz bir 19 kalıntı N-terminali içerdiğinden, diğer ökaryotik GST'lerden yapısal ve işlevsel olarak farklıdır.

GSTO enzimleri, CDNB gibi yaygın GST substratlarına karşı zayıf aktiviteye sahiptir. GSTO enzimleri, hücrel redoks homeostazında ve ayrıca ER'de enzimatik olarak modüle edici ryano-din reseptörleri, kalsiyum kanalları gibi işlevler sergiler [132]. GSTO1, spesifik koşullara bağlı olarak hem ileri reaksiyonun katalizörü hem de deglutasyonilasyon enzimi olarak işlev gördüğü için S-glutasyonilasyon döngüsünde önemli bir rol oynar [133]. GSTO1 orijinal olarak ubiquitin ligaz, p28 olarak tanımlandı ve anti-kanser ilaç direnci ile ilişkilendirildi [134]. Ek olarak, GSTO1'in, muhtemelen ERK1 / 2, AKT ve JNK'ye bağlanması ve (de)fosforilasyonu nedeniyle, sağkalımı aktive ederek ve apoptotik sinyal yollarını inhibe ederek hücre sağkalımını etkilediği öne sürülmüştür [135].

1.6.5 Glutasyon S-Transferaz Teta

GST Theta (GSTT) ağırlıklı olarak karaciğerde (hepatositler) bulunur ve ayrıca böbrekte (böbrek proksimal tübül hücreleri), gastrointestinal sistemde ve akciğerde eksprese edilir [136-138]. Theta sınıfı, her ikisi de kromozom 22'de bulunan GSTT1 ve GSTT2 izoformlarını içerir [139,140]. GSTT1 ve GSTT2, %55 amino asit sekans özdeşliğini paylaşır. GSTT1, ilaçların ve kimyasalların faz II biyotransformasyonunda önemlidir ve peroksitlenmiş lipidler gibi oksidatif stres sırasında üretilen substrat ara ürünlerinin detoksifikasyonunda yer alır[141]. GSTT ayrıca etilen oksit gibi dumandan türetilen küçük hidrokarbonların yanı sıra epoksi

bütanlar ve metil bromürün detoksifikasyonuna katılır [142,143]. GST'lerin Mu sınıfına benzer şekilde, GSTT1'in boş bir aleli mevcuttur, yaklaşık 54 kb'lik bir silme içerir ve enzimatik aktivite kaybına neden olur [144-146]. Bu alel için homozigot olan bireyler, silme işlemi olası kanserojenlerin detoksifikasyon kapasitesinin azalmasıyla sonuçlandığından, maligniteler (baş, boyun, ağız boşluğu) için yüksek risk oluşturmaktadır [147].

1.6.6 Glutasyon S-Transferaz Zeta

GST Zeta (GSTZ), pankreasın yanı sıra karaciğer, mide ve testis de dahil olmak üzere çok çeşitli endokrin dokularda bulunur ve GST'nin bilinen ana işlevleri ve etkileşimlerine sahiptir [148,149]. Gen yaklaşık 10.9 kb'lik bir alana yayılır, 9 ekzondan oluşur ve 14. kromozomda bulunur [150]. Detoksifikasyondaki rolünün yanı sıra GSTZ, tirozin katabolizmasında da rol oynar. Özellikle GSTZ, maleilasetatın fumarilasetata cis-trans izomerizasyonunu katalize eder, bu nedenle GSTZ ayrıca maleilasetat izomeraz (MAAI) olarak da tanımlanmıştır [151]. İlginç bir şekilde, GSTZ1, GSTO1'e en yakın dizi benzerliğini gösterir. Bununla birlikte, GSTZ, GSH gerektiren ancak tüketmeyen bir reaksiyonda dikloroasetik asidin glioksilata dönüştürülmesi de dahil olmak üzere ara metabolizmadaki süreçleri katalize ederek β -oksidasyonda rol oynayan GST ailesindeki tek enzimdir [152,153].

1.6.7 Glutasyon S-Transferaz Sigma

Sigma sınıfı GST'ler, doğada yaygın olarak dağılmıştır ve sitozolik GST ailesine aittir. GST sınıflarının filogenetik analizi, sigma sınıfının en uygun şekilde alfa, mu ve pi ile gruplandırıldığını gösterir [154]. Memelilerde, 4. kromozomda lokalize olmuş GST S1 geninden eksprese edilen GSTS1-1 tek bir izozimden oluşmaktadır [155]. Kalp, böbrek, mide, akciğer, beyin, testis gibi bir çok organda farklı oranlarda eksprese edilmektedir [156]. Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan metabolitlerin inaktivasyonunu sağlarken ve prostaglandinlerin sentezlenme sürecinde prostaglandin sentetaz aktivitesi gösterir [157].

1.7 Apoptotik Proteinler ve Kolon Kanseri

1.7.1 p 53

p53, tümör baskılayıcı rolüyle iyi bilinen bir gen dir ve insan kanserinin tüm formlarında en çok mutasyona uğramış genlerden biridir. p53 DNA hasarı stres yanıtının aktivasyonu, DNA onarımını indükler ve onkojenik mutasyonu önlemek için hücre döngüsünü düzenler[158]. Genetik bütünlüğü değiştirirken apoptoz ve hücre sel kontrol noktalarının kaybına neden olan kolon kanserinde p53 sinyalinin değişmesi, sonuçta maligniteye yol açar. K-ras, p53 ve APC gibi kanserle ilişkili genlerdeki mutasyonların birikmesi, normal epitelden adenomatöze ve kolorektal kansere geçişi başlatır [159].

1.7.2 bcl-2

Bcl-2 ailesi antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptozu düzenlemede en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur. Bcl-2 ve Bcl-XL apoptozu engelleme fonksiyonunu ya kaspasların öncü formlarını durdurarak ya da kaspas akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-C gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir. Bax ya da Bak gibi proapoptotik üyeler heterodimerizasyon yoluyla kaspas serbestleşmesini uyarır ve mitokondri zarının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom C'yi serbestleştirir. Dolayısıyla kaspas aktivasyonuna yol açar[160]. Bir hücrenin apoptoz eğilimli oluşu heterodimer ya da homodimer formundaki Bcl-2 ailesi genlerinin etkisine bağlıdır. Bcl-2 salgılanması sonucu Bcl-2 homodimerleri şekillenir. Böylece apoptoz inhibe edilir [161].

1.7.3 p38

p38, hücre sel stres ve sitokinlere duyarlı olduğu için stres aktiveli olarak bilinen mitojenle aktive olmuş bir protein kinazdır (MAPK). Ancak, p38'in fizyolojik olarak daha geniş işlevleri vardır.p38 çeşitli sinyal yollarında terminal kinaz olarak ikili fosforilasyon ile aktive edilir[162,163]. p38 son zamanlarda bir tümör baskılayıcı olarak dikkat çekmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda aktif p 38'in kemoterapiye cevabı

değerlendirilmiştir. Sonuçlar çeşitli kemoterapötik ajanların p38 bağımlı apoptozu uyardığı göstermiştir[164].

1.7.4 Kaspaz-3

Apoptoz, bir proteolitik kaspaz kaskadının aktivasyonuna bağlı olarak programlanmış hücre ölümü sürecidir ve ve doku homeostazında, hücre gelişiminde, yaralı veya enfekte hücrelerin çıkarılmasında ve hastalık patogenezinde çok önemli bir rol oynar[165]. Apoptozun kritik aracısı olarak kabul edilen kaspaz-3, apoptotik süreçte hücre içinde; hem dışsal hem de içsel yollarla aktive olur[166]. Apoptotik akışta kaspaz-3'ün önemli rolünden dolayı , kaspaz 3 eksikliği apoptozu bozarak karsinogenez ile sonuçlanabilir. Bunun üzerine, apoptoz indükleyici bir ajan olarak kaspaz-3'ün aşırı ekspresyonu klinik öneme sahiptir.Şimdiye kadar tanımlanmış toplam 14 memeli kaspazı vardır ve bunlardan 12 tanesi insan kaynaklı olarak bildirilmiştir (yani kaspazlar 1-10, 12 ve 14) [167].İnsan kaspazları, dizi benzerliklerine ve biyolojik işlevlerine göre, iki ana gruba ayrılır; (I)apoptotik kaspazlar ve (II) inflamatuvar kaspazlar. Apoptotik kaspazlar, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, -9 ve -10) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olarak sınıflandırılır. Efektör kaspaz-3 başlangıçta olgunlaşmamış bir zimojen (procaspaz) olarak sentezlenir. Prokaspaz-3, kararsız bir dimerdir; her monomer, kısa bir N-terminal ön etki alanından (<30 amino asit uzunluğunda), büyük bir alt birimden ve bir alt birim arası bağlayıcı ile birbirine bağlanan küçük bir alt birimden oluşur[168,169] Kaspaz-3 fonksiyonel formunda (yani tetramerik yapı) iki özdeş aktif bölgeye sahiptir. Her aktif bölge, kısa aspartat-glutamat-valin-aspartat (D-E-V-D) tetrapeptid motiflerinde aspartat kalıntısından sonra bölgedeki substratları spesifik olarak parçalayabilen, korunmuş bir katalitik histidin-sistein motifi içerir[170]. Kaspaz araştırmalarındaki son gelişmeler, kaspaz-3'ün sadece apoptotik akışta değil, aynı zamanda doku farklılaşması, doku rejenerasyonu ve nöral gelişim gibi apoptotik olmayan süreçlerde de önemli bir enzim olduğunu göstermektedir.

1.8 Ki-67 ve Kolon Kanseri

Ki67, hücre döngüsünün G1'den M-fazına kadar çoğalan hücrelerde eksprese edilen bir nükleer antijendir [171]. İnsanlarda Ki-67, MKI67 geni tarafından kodlanır. Ki-

67, birkaç korunmuş fonksiyonel bölge içermesine rağmen , bu bölgelerin dışındaki birincil dizi korunumu düşüktür[172]. Ki-67'nin, farklı izoformlara sahip olması hücre proliferasyonunu ve hücre döngüsü ilerlemesini farklı şekilde etkileyebileceğini göstermektedir[173]. Birçok çalışma, Ki67'nin gastrointestinal stromal tümörler, gastrointestinal nöroendokrin tümörler ve prostat ve meme kanseri dahil çok çeşitli insan malignitelerinde öngörücü bir rolü olduğunu göstermiştir[174-178].Ki67 ekspresyonunun immünohistokimya ile ölçülmesi,Ki67 etiketleme indeksi olarak bilinen, bir tümörün büyüme fraksiyonunu tahmin etmek için klinik patolojide rutin bir uygulama haline gelmiştir[179]. Bir çok tümör grubunda yüksek Ki 67 değeri kötü prognozla ilişkilendirilmiştir[180].Ki67'nin kolorektal kanserde kullanılması kısmen çelişkili sonuçlar göstermiştir[181-183].

1.9 SOX-9 ve Kolon Kanseri

SRY ile ilgili Yüksek Hareketlilik Grubu (HMG)-kutusu (SOX) transkripsiyon faktörleri, kardiyovasküler sistem ve lenfatik kanalların gelişimi dahil olmak üzere potansiyel ve hayati fizyolojik rollere sahiptir[184]. SOX transkripsiyon faktörlerinin ilk izolasyonu ve tanımlanması 1990'da yapıldı ve SOX ailesinin üyelerinin, cinsiyet belirleyici bölge Y (SRY) ile ilişkili olan Yüksek Hareketlilik Grubu (HMG)-kutu protein alanı olarak bilinen ortak bir özelliği paylaştığı bulundu. [185] HMG alanı, 79 amino asit içeren özel bir bölgedir ve belirli bir grubun üyeleri, SRY ile ilgili olarak bu bölgede %50 homoloji gösterir. SOX üyeleri transkripsiyon faktörleri olarak kabul edilir ve ekspresyonları embriyo oluşumu, hastalık gelişimi ve tümör oluşumu sırasında çeşitli dokularda meydana gelir[186,187]. HMG alanı, diziyeye özgü şekilde SOX transkripsiyon faktörlerinin DNA bağlanmasından sorumludur[188].Bu bağlanma, DNA minör oluğu ile etkileşime girebilen L şeklinde bir alan üreten HMG alanlarındaki üç alfa heliks aracılığıyla gerçekleşir. DNA dizi motifi ATTGTT esas olarak SOX transkripsiyon faktörlerinden etkilenir [189]. SOX üyelerinin HMG alanı yoluyla DNA ile etkileşimi, DNA'da konformasyonel değişikliklere yol açar, onu bükerek ve SOX üyelerini etkinleştirir[190]. SOX transkripsiyon faktörlerinin rolü daha karmaşıktır, çünkü bu üyeler, öncü faktörler olarak rollerini gösteren, nükleozomlarda bulunan önceden bükülmüş DNA ile etkileşime girebilir [191].SOX transkripsiyon faktörleri, dokuya özgü ve bağlama özgü bir şekilde işlev görür ve

kanser biyolojisine yönelik bilgimizi karmaşıklaştırır [192,193]. SOX transkripsiyon faktörlerinin progresyonu ve terapötik yanıtı düzenlediği bildirilmiştir [194,195]. Son zamanlarda, kanserde SOX transkripsiyon faktörlerinin rolüne çok dikkat çekilmiştir. Kanser hücrelerinin çoğalması ve metastazı; kemoterapi dahil olmak üzere kanser hücrelerinin terapi yanıtı, SOX transkripsiyon faktörleri tarafından sıkı bir şekilde düzenlendiği belirtilmiştir. [196]. Artan kanıtlar, SOX9'un bağırsaktaki işlevinin deşifre edilmesinin, SOX9'un doza bağlı bir etkisini hesaba katması gerektiğini göstermektedir. SOX9'un bağırsak epitelinde bir tümör baskılayıcı mı yoksa bir onkogen gibi mi davrandığına dair tekrarlayan tartışmalar söz konusudur ve bu durum SOX 9'un bağırsaktaki biyolojik işlevi ve kolorektal kanserdeki rolü hakkındaki birikmiş bilgilerin bir güncellemesi gerekliliğini ortaya koymuştur[197].

1.10 E-Kadherin ve Kolon Kanseri

Hücre-hücre adezyon kompleksleri doku bütünlüğü ve organ fonksiyonu için vazgeçilmezdir; ancak bunların bozulması, iltihaplanma ve kanser dahil olmak üzere çok sayıda hastalığa yol açabilir. Adherens Kavşağı (AJ), aktin ve mikrotübül hücre iskeletine yakın bağlanması yoluyla doku bütünlüğünü ve mimarisini korumak için anahtar olan büyük bir hücre-hücre yapışma yapısıdır [198]. AJ'lerin temel bileşenleri, katenin protein ailesinin üyeleri, p120 katenin (p120), α -katenin ve β -katenin yanı sıra, epitelyal kaderin (E-cadherin), nöral kaderin (N-cadherin), plasental kaderin (P-cadherin) gibi ve klasik kaderin süper ailesinin üyeleridir. Kadherin süper ailesi, klasik, dezmozomal, protocadherinler ve konvansiyonel olmayan kaderin tiplerini içerir[199]. Klasik tip I cadherin olan E-cadherin ailenin epitel dokularındaki baskın üyesidir ve CDH1 geni tarafından kodlanır. Klasik memeli kaderinleri, EC1'den EC5'e uzanan ve kalsiyum bağlama bölgeleri olan beş hücre dışı alana sahiptir. Bu bölgelerin her biri, üç Ca^{2+} molekülüne bağlanabilen, böylece hücre dışı alanlar arasındaki etkileşimleri güçlendiren negatif yüklü motifler içerir [200]. Kolon epitelinin hızlı yenileme kapasitesi ve devri, plastisite ve homeostaziyi sürdürme yeteneği sağlamasına rağmen, kolonu mutajeneze ve potansiyel olarak tümörigeneze duyarlı hale getirir[201]. E-kadherinin durumu, Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu bağlamında CRC'de kapsamlı bir şekilde incelenmiştir çünkü bu yolun düzensizliği kolonda tümörigenezin baskın bir itici gücü olarak

karşımıza çıkmaktadır [202-203]. Genel olarak, E-cadherin bu bağlamda ağırlıklı olarak tümör baskılayıcı bir role sahiptir. Örneğin, E-cadherin, β -katenin'i çekirdeğe gitmesine izin vermek yerine hücre-hücre temas alanlarında tutarak β -katenin aktive edici mutasyonlar tarafından desteklenen pro-tümörjenik dönüşümü baskılar [204-205]. Ancak, kolon tümörjenezindeki rolü ile ilgili olarak E-cadherinin diğer işlevleri son zamanlarda ortaya çıkmıştır. İlginç bir şekilde, bu çalışmaların çoğu β -katenin salınımı yoluyla çekirdekte dolaylı olarak değil, doğrudan AJ'ler tarafından yönlendirilen sinyalleşmeye işaret etmektedir. Bu sinyali düzenleyen bir etkileşim, kadenin komplekslerinin EGFR ve Src ile karşılıklı etkileşiminden kaynaklanır. Src, kolon tümörlerinde aşırı eksprese edilen ve/veya aktive edilen onkojenik reseptör olmayan bir tirozin kinazdır ve kolon tümörjenezindeki ana itici güçlerden biridir [206-208]. E-cadherin, birçok kanserde aşağı regülasyonu veya kaybı nedeniyle CRC için ek bir biyobelirteç olarak önerilmiştir [209].

1.11 Çalışmanın Amacı

DLD-1 kolon kanseri hücre hattında 5-FU tedavisi öncesi ve sonrası 5-FU'nun GST izozimlerinin, ilaç dirençlilik ve apoptotik proteinler ile ilişkisini belirlemektir. Ayrıca hastane arşiv kolon kanser dokularında moleküler belirteçlerinin (bcl-2, caspase-3, p 53 ve p 38, Ki 67, SOX9, E-cadherin) ekspresyonlarının kolon kanserinde prognostik ilişkisi araştırılmıştır.

2 MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Malzemeler

2.1.1 Kullanılan Laboratuvar Cihaz ve Malzemeleri

- Etüv (Binder ED53)
- Tam otomatik rotary mikrotom (Leica RM2255)
- Vorteks (Heidolph- MRHei)
- Ultra distile su sistemi (Elga Purelab Optia)
- Isıtcılı manyetik karıştırıcı (IKA C-Mag H58)
- Ocak (Arçelik 021)
- Buzdolabı (Beko-9621)
- Düdüklü tencere (Hisar)
- Boyama tablası (Biogen)
- Mikrotom bıçağı (Shandon MB35)
- Lamel (24x50 Isolab)
- Poly-L-lysin kaplı lamlar (Thermo)
- Otomatik pipet seti (CAPP)
- Işık mikroskobu (Zeiss-Primostar)
- -80 °C Derin Dondurucu (GFL6485)
- iBlot 2 Dry Blotting System (İnvitrogen)
- XCell II Blot Module(İnvitrogen)
- Mezür, Beher, Erlenmayer, balon joje

2.2 Materyal ve Yöntem

2.2.1 Hücre Kültürü

İnsan DLD-1 hücre çizgisi, American Type Culture Collection'dan elde edildi. Hücreler, %10 fetal sığır serumu (FBS) ile desteklenmiş RPMI 1640 ortamında kültürlendi ve her 2 günde bir ortam değişiklikleri ile %95 hava ve %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde 37°C'de inkübe edildi.

2.2.2 Kimyasal Reaktifler ve Antikorlar

5-FU, DEVA'dan elde edildi. MDR-1,MRP-1,2,3,6,7,GSTZ1,GSTO1 ve p38 antikorları Bioss'tan satın alındı. Boster'dan p53, GSTP1, bcl-2 ve kaspaz-3, Santa Cruz'dan GSTS1 ve GSTA1 antikorları, GSTM1, GSTK1 ve Cell Signaling'den β -aktin antikorları, ProteinTech'ten GSTT1 antikorları temin edildi.

2.2.3 Sitotoksosite için WST Testi

Hücre canlılığı, Çiftçi ve diğerleri [210], 2013'te tarif edildiği gibi WST-1 tahlili ile belirlendi. Hücreler, tedaviden 24 saat önce 48 oyuklu plakalarda kültürlendi. DLD-1 hücreleri, 5-FU'nun (5 μ g/ mL, 2.5 μ g/ mL, 1.25 μ g/ mL, 0.625 μ g/mL) dört farklı konsantrasyonunda inkübe edildi.

Her kuyucuğa WST-1 reaktifi (10 μ L) eklendi ve 4 saat inkübe edildi. Plakalar hemen bir ELISA Mikroplaka Okuyucusunda (BioTek, ABD) 440 nm ve 630 nm referans dalga boylarında okundu.

2.2.4 Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Analizi

Hoechst 33342 ve Propidium iodide (PI) içeren Double Staining Detection Kit (Serva, İSRAİL), kültürde apoptotik ve nekrotik hücrelerin tanımlanması için kullanıldı. DLD-1 hücreleri (10x10³ hücre/kuyu), 48 oyuklu plakalarda, %5 CO₂ ile nemlendirilmiş atmosferde 37°C'de %10 fetal buzağı serumu ve %1 penisilin-streptomisin ile desteklenmiş RPMI 1640 ile DMEM içinde büyütüldü. DLD-1 hücreleri, 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda 5-FU'e (0.625-5 μ g/ mL) ile işlendi. Kontrol grubu sadece hücre ortamı ile tedavi edildi. İnkübasyon periyodu sonunda apoptotik hücreler ve FITCH (480-520 nm), nekrotik hücreler floresan

mikroskopunda (Fluorescence Inverted Microscope, Leica DMI600, Almanya) DAPI filtresi kullanılarak değerlendirildi.

2.2.5 İmmünohistokimya

DLD-1 kolon kanseri hücreleri, 6 kez her iki günde bir 2.5 ug mL⁻¹'lik bir 5-FU dozu uygulandı. Hücreler tripsin ile uzaklaştırıldı ve sitospin ile hazırlıklar tamamlandı. MDR-1, MRP1,2,3,6-7 ilaç direnç proteinleri, GST izozimleri (GSTA1, GSTP1, GSTM1, GSTT1, GSTO1, GSTZ1, GSTK1, GSTS1) ve apoptotik proteinler(p38,p53,Bcl-2,kaspaz- 3) ifadeler, Koçdoğan ve diğerleri, 2020 tarafından tarif edildiği gibi immünohistokimyasal boyama ile belirlendi. Antikor şu şekilde seyreltilti: GSTA1,1:50; MDR-1 veGSTT1 1:100; s53, 1:200; Bcl-2 ve GSTM1 1:250; GSTS1 ve GSTO1 1:300; MRP1,2,3,6-7, GSTK1,GSTZ1 ve p38,1:500;GSTP1 ve kaspaz-3 1:1000). Patolog eşliğinde; intensitelerine; (0): negatif (protein ifadesi yok), (1+) :hafif şiddette protein ifadesi, (2+): orta şiddette protein ifadesi, (3+) : şiddetli boyanma ifadesi şeklinde değerlendirildi. Test edilen proteinlerin immünohistokimyasal ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin radar grafikleri, lisanslı yazılım SigmaPlot13.0 tarafından hazırlandı.

2.2.5.1 İmmünohistokimya Prosedürü

- %70'lik alkol (1dk.)
- dH₂O (1dk.)
- H₂O₂ blokajı(15dk.)
- Çeşme suyu(2-3dk)
- PBS buffer(15dk)
- Protein Blocking Solüsyonu(10 dk)
- Aşağıda belirtilen dilüsyonlarda antikor uygulaması (1 saat)
- PBS buffer'la 3 kere yıkama (aralarda)

- Sekonder antikor (10dk)
- Streptavidin-peroksidaz kompleksi
- PBS buffer'la 3 kere yıkama
- DAB (10dk.)
- dH2O(1dk.)
- Hematoksilen(2dk.)
- Çeşme suyu, dH2O ve lam kapatılır.

2.2.6 İmmünohistokimya

2.2.6.1 Hasta Dokularının Toplanması ve Klinik /Patolojik Özellikler

Çalışmada kullanılacak numuneler 2009-2019 yılları arasında Keçiöğren Eğitim Araştırma Hastanesi'nde tanı alıp ,arşivde parafin blokları mevcut olan , patoloğ tarafından uygunluğu belirlenmiş 46 kolon kanser hastası çalışmaya dahil edilmiştir.Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik/patolojik özellikleri şu şekildedir: çalışmaya katılan 46 hastanın % 67.39'u erkek, %67.39'u 60 yaş üstü, %58.70 'i sigmoid kolon yerleşimli,%54.35'i grade2,%47.83'ü evre 3 özelliğine sahiptir.Hastalara ait klinik ve patolojik özelliklerin ayrıntılı bilgisi Çizelge 2.1 'de verilmiştir.Hastalara ait bloklarından, tissumicroarray yöntemiyle bloklar hazırlanmış; hazırlanan tissue array bloklarından 4-5µ kalınlığında alınan kesitlerle hazırlanan preparatlar, immünohistokimyasal yöntemle boyandı Patoloğ eşliğinde; intensitelerine; (0): negatif (protein ifadesi yok), (1+) :hafif şiddette protein ifadesi, (2+): orta şiddette protein ifadesi, (3+) : şiddetli boyanma ifadesi şeklinde değerlendirildi.

Çizelge 2.1 Kolon kanser hastalarının klinik ve patolojik özellikleri

	n=46	%
Yaş (yıl)		
<60	15	32.61
>60	31	67.39
Cinsiyet		
Erkek	26	56.52
Kadın	20	43.48
Tümör lokasyonu		
Çıkan kolon	8	17.39
Transvers kolon	3	6.52
İnen kolon	8	17.39
Sigmoid kolon	27	58.70
Tümör derecesi		
G ₁	6	13.04
G ₂	25	54.35
G ₃	15	32.61
Lenf nodu metastazı		
N ₀	19	41.30
N ₁₋₂	27	58.70
Metastaz		
M ₀	43	93.48
M ₁	3	6.52
Tümör derinliği		
T ₁	1	2.17
T ₂	3	6.52
T ₃	30	65.22
T ₄	12	26.09

Çizelge 2.1 Kolon kanser hastalarının klinik ve patolojik özelliklerin devamı

TNM evre

Evre 1	1	2.17
Evre 2	20	43.48
Evre 3	22	47.83
Evre 4	3	6.52

2.2.6.2 Kullanılan Kitler ve Antikor

- 3.3-Diaminobenzidine kromojen kit (GBI Lab)
- Sitrat Tamponu (Boster)
- Fosfat Tamponu (Boster)
- Ksilol (Merck)
- Alkol (Merck)
- %3'lük H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) (Boster)
- SOX 9 (Boster) :1/300
- Ki- 67 (Boster):1/300
- E-kadherin (Leica):1/40
- Bcl-2 (Boster):1/250
- p 53(Boster):1/200
- p 38(Bioss):1/300
- caspase- 3 (Boster):1/750

2.2.6.3 İmmünohistokimya Prosedürü

Belirlenen hasta dokularında her bir antikor için 4-5 µm kalınlığında poly-L-lysin kaplı lamlara ince kesitler alındı. Deparafinizasyon için dokular etüvde 70 °C'de 1 saat, ardından sıcak ksilolde 10 dakika bekletildi. Etüvden çıkarılan preparatlar

soğuk ksilolde 10 dakika bekletildi. Ardından azalan konsantrasyonlardaki alkol serilerinde birer dakika tutuldu. Distile suda 1-2 dakika bekletilen preparatlar endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 10 dakika H₂O₂ blokajında tutuldu. Çeşme suyunda 5 dakika yıkanan preparatlar PBS (Phosphate Buffer Saline) tamponuna batırılıp çıkarıldıktan sonra antijen retrieval solüsyonu (Citrate Buffer pH 6,5, Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, USA) içerisinde düdüklü tencerede 3 dakika kaynatıldı. Nonspesifik boyanmanın engellenmesi amacıyla protein blocking (SHP125) (ScyTek Laboratories, West Logan, UT, USA) solüsyonunda 10 dakika bekletilen preparatlar 1 saat süreyle uygun dilisyon oranlarında hazırlanan antikorlarla SOX 9, Ki-67, E-cadherin, Bcl-2, p53, p38, kaspaz-3 oda sıcaklığında bir saat inkübasyona bırakıldı. Ardından preparatlar 3 kez PBS tamponuyla yıkandı. Sekonder antikör streptavidin-peroksidaz kompleksinde (SHP 125) (ScyTek Laboratories, West Logan, UT, USA) 10 dakika tutuldu. Ardından 3 kez PBS tamponuyla yıkanan preparatlar 5 dakika DAB'da (3,3'-Diaminobenzidine) tutulduktan sonra 1 dakika distile suda yıkandı. 2 dakika hematoksilende bekletilen preparatlar çeşme suyunda yıkandı. Ardından artan alkol serilerinde 1'er dakika tutuldu, havada kurutulduktan sonra ksilolda 5 dakika bekletildi. Son olarak Kanada balzamu ile preparatlar kapatıldı.

2.2.7 Western Blot Analizi

2.2.7.1 Protein Miktar Tayini ve Western Blot İçin Örneklerin Hazırlanması

Öncelikli olarak ilaç uygulaması yapılmış ve uygulama yapılmamış hücre örneklerinden nanodrop verileri kullanılarak içeriğinde 100 µg protein olması için örnekten kaç µl alınması gerektiği hesaplandı. Aşağıda verilen oranlara göre örnek ve reaktifler eklenerek protein örneklerin total hacim 10 µl olacak şekilde hazırlandı. (Çizelge 2.2)

Çizelge 2.2 Protein örneklerinin hazırlanması

	5-Flourouracil uygulanmış örnek	Kontrol
Örnek	5.9 µl	6.5 µl
LDS Sample Buffer(4x)	2.5 µl	2.5 µl
Reducing Agent(10x)	1 µl	1 µl
Distile H2O	0.6 µl	-

- Hazırlanan örnekler 70 °C’ de 10 dk. boyunca Thermoboxer cihazında denatüre edildi
- Bu işlemden sonra örnekleri oda sıcaklığına getirmek için buz üzerinde 2dk. inkübe edildi.

2.2.7.2 Surelock Xcell Dikey Jel Elektroforezi

- %4-12’lik Bis-Tris Gradient jeli plastik ambalajından çıkarılır, jel kaseti üzerinde yer alan beyaz bant sökülür ve kurutma kağıdı üzerine silkelendir.
- Jel kasetinin alçak kısmı Buffer core ‘a bakacak şekilde dikey jel tankının içine; diğer tarafa diğer jel kasetinin alçak kısmı Buffer core’a bakacak şekilde yerleştirilir. Taraklar dikkatlice çıkarılır.
- Jel sıkıştırma aparatı yerleştirildikten sonra 20X MES ya da 20X MOPS Runnig Buffer’dan 25 ml alınıp, üzerine 475 ml distile su eklenerek 1X ‘lık buffer elde edilir.
- Hazırlanan running buffer önce buffer core içine kuyucukları 0.5 cm geçecek şekilde doldurulur.Sızma olup olmadığı kontrol edilir.Geriye kalan running buffer alt buffer odasına konulur. İç buffera 500 ul antioksidan konulur ve kuyucuklar mikropipet yardımıyla runnig bufferla yıkanır.
- İlk kuyucuğa 3 µl See Blue ve diğer kuyucuklara her bir örnekten 10 µl yüklenir.

- 150 voltta 35-40 dk'da jel yürütülür. İşlem tamamlandıktan sonra güç kaynağı kapatılır,kaset çıkarılır ve bağlantı yerlerinden açılır.
- Kuyucukların ve jelin alt tarafında kalan jel çıkıntısı jel bıçağıyla uzaklaştırılır.
- İçerisinde distile su bulunan temiz bir kap içerisine jel dikkatlice alınır.

2.2.7.3 Iblot Dry Blotting Sistemi ile Western Blotlama

Cihaz güç kaynağına bağlanır, PVDF kitinde yer alan Anot Stock jelatini çıkarılarak plastiği ile cihaza yerleştirilir.

- Distile su içerisinde yer alan membran anot stock üzerine yerleştirilir. kitin içerisinde yer alan filtre kağıt dikkatlice yerleştirilerek distile su ile ıslatılır ve hava kabarcıkları roller yardımıyla uzaklaştırılır.
- Katot stack da jelatini çıkarılarak kurutma kağıdının üzerine yerleştirilir,roller yardımıyla hava kabarcıkları giderilir.Cihazın kapağı kapatılır ve 7 dk. beklenir.
- İşlem tamamlandıktan sonra membran bir kasete alınır ve üzerine kurumadan 10 ml Blocking solutionla 30 dk. muamele edilir.
- 20 ml dH₂O ile 5 dk. iki kez yıkanır.
- 10 ml primer antikor 1 saat veya overnight (β -actin hariç tüm antikorlar.) olacak şekilde uygulanır.Antikor dilüsyonları Çizelge 2.3'de verilmiştir.
- 10ml sekonder antikor 30 dk. uygulanır.
- 20'şer ml yıkama solüsyonu 3 'er defa 5'er dakika uygulanır.
- 20'şer ml dH₂O 2 'şer defa 2'şer dk uygulanır.
- 5ml kromojenik substrat ile 1-60 dk uygulanır.
- Uygulamadan sonra filtre kağıdı kurutulur.

Çizelge 2.3 Western blot antikor dilüsyonları

ANTİKORLAR	DİLÜSYONLARI
MDR-1,MRP-1(Bioss),GSTT1(Protein tech),GSTS1(Santacruz),GSTZ1(Bioss) p53(Boster),bcl-2(Boster)	1\500
MRP2,MRP-3,MRP-6,MRP-7(Bioss), GSTA1(Santacruz),GSTM1,GSTK1,GSTO1(Bioss), kaspaz-3(Boster),p38(Bioss), β -actin (Cellsingaling),	1\ 1000
GSTP1 (Boster)	1\2000

2.2.8 İstatistiksel Analiz Yöntemleri

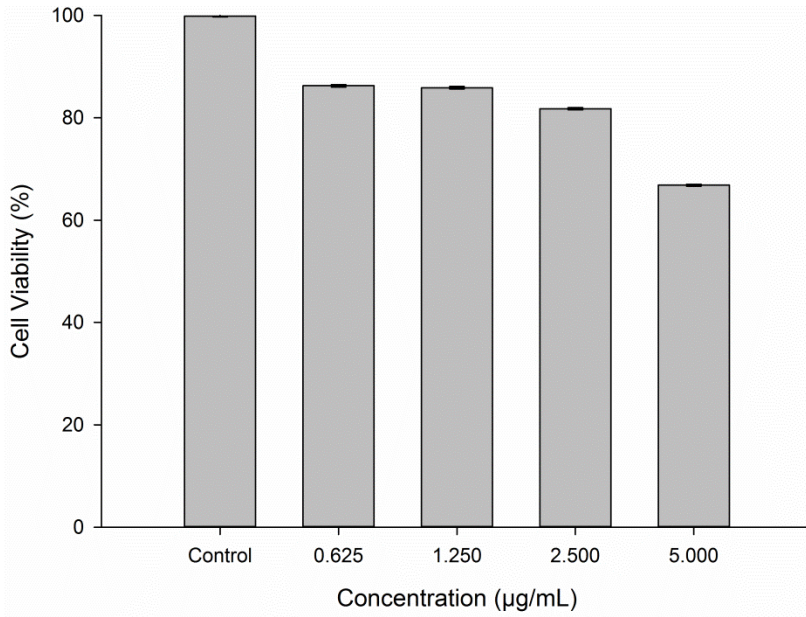
Analizler SPSS 28.0.1 programı kullanılarak yapılmıştır. Kolon kanser dokularında apoptotik proteinler (bcl-2,caspase-3,p 53ve p 38);Ki 67, SOX9, E caderin protein ekspresyonlarının kolon kanseri prognostik faktörlerle ilişkisi Fisher exact test ile ve çalışan antikorların birbirleriyle ilişkisi Spearman korelasyon katsayısı testi ile araştırıldı. Sonuçlar $p < 0.05$ için anlamlı olarak kabul edildi.

3 BULGULAR

3.1 Kolon Hücre Hattı İlaç Dirençliliği ve İmmüsitokimya sonuçları

3.1.1 Hücre Kültürü ve Sitotoksisite

Elde edilen bulgulara göre, ilaç dozundaki artışa bağlı olarak ilacın sitotoksik etkisi artmış ve kanser hücrelerinde % canlılık değerini düşürmüştür. DLD-1 hücrelerine uygulanan 5-FU konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığı azalır(Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Farklı 5-FU konsantrasyonlarında DLD-1'in hücre canlılıklarını ölçmek için kullanılan WST-1 testinin sonuçları

Hata çubukları \pm standart hatayı gösterir.

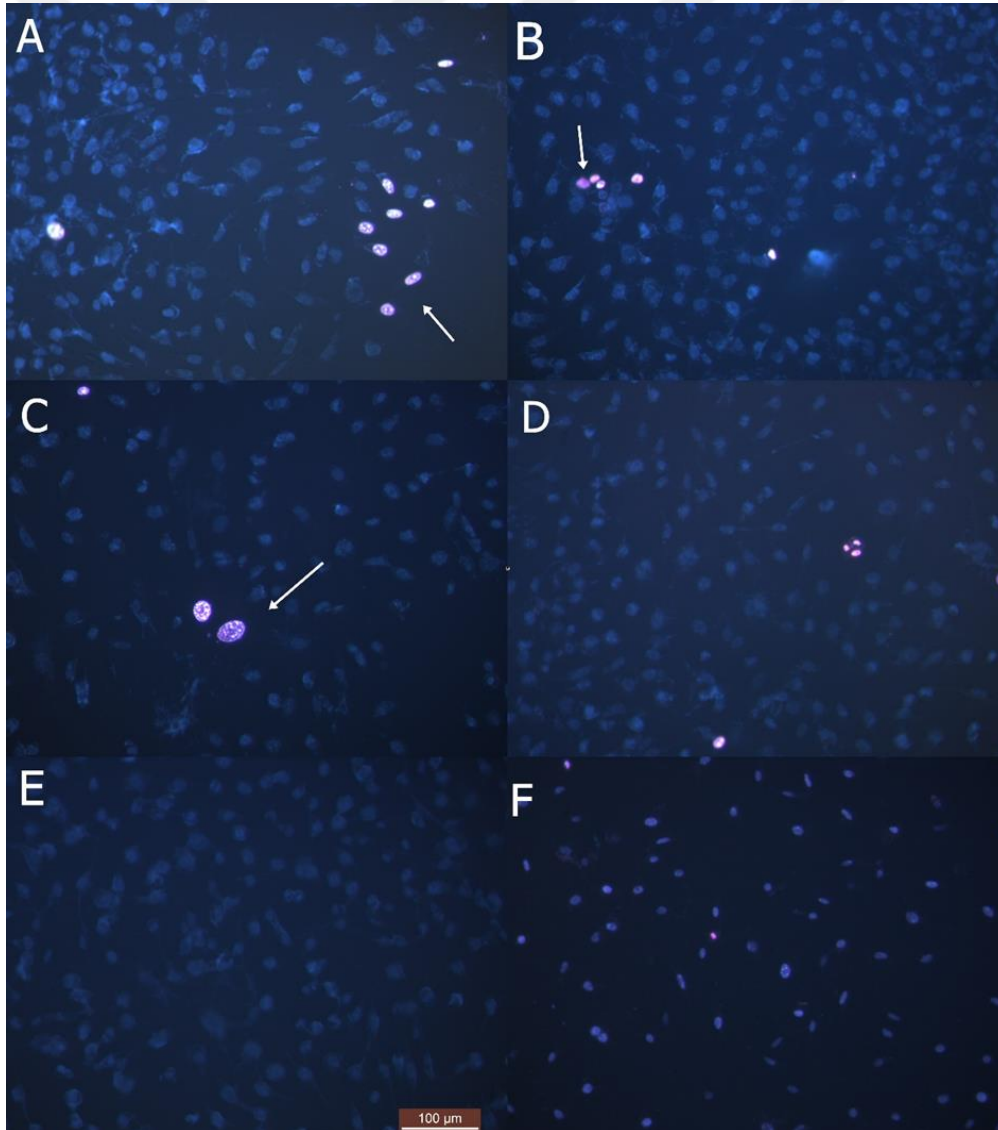
3.1.2 Apoptotik Nekrotik Hücre Analizi

Çift boyama sonuçlarına göre DLD-1 hücre hattında uygulanan 5-FU konsantrasyonu arttıkça yüzde apoptotik ve nekrotik değerlerin arttığı gösterildi (Çizelge 3.1)(Şekil

3.2, Şekil3.3). Sitotoksisite testi ve çift boyama sonuçları birbiriyle uyumludur ve bunlar 5-FU'nun işleyişini ve etkinliğini açıkça ortaya koymaktadır.

Çizelge 3.1 Farklı dozlarda 5-FU uygulanmış DLD-1 hücre hatlarında Apoptotik / nekrotik indeks

Konsantrasyon ($\mu\text{g/ mL}$)	% Apoptoz	%Nekroz
5	$5,90 \pm 2,4$	$2,55 \pm 1,2$
2,5	$2,57 \pm 1,6$	$1,92 \pm 1,0$
1,25	$2,74 \pm 1,6$	$0,73 \pm 0,8$
0,625	$1,56 \pm 0,8$	$0,69 \pm 0,6$
Negatif Kontrol	$0,74 \pm 0,7$	$1,99 \pm 0,6$
Pozitif Kontrol	$9,64 \pm 2,4$	$32,14 \pm 4,1$



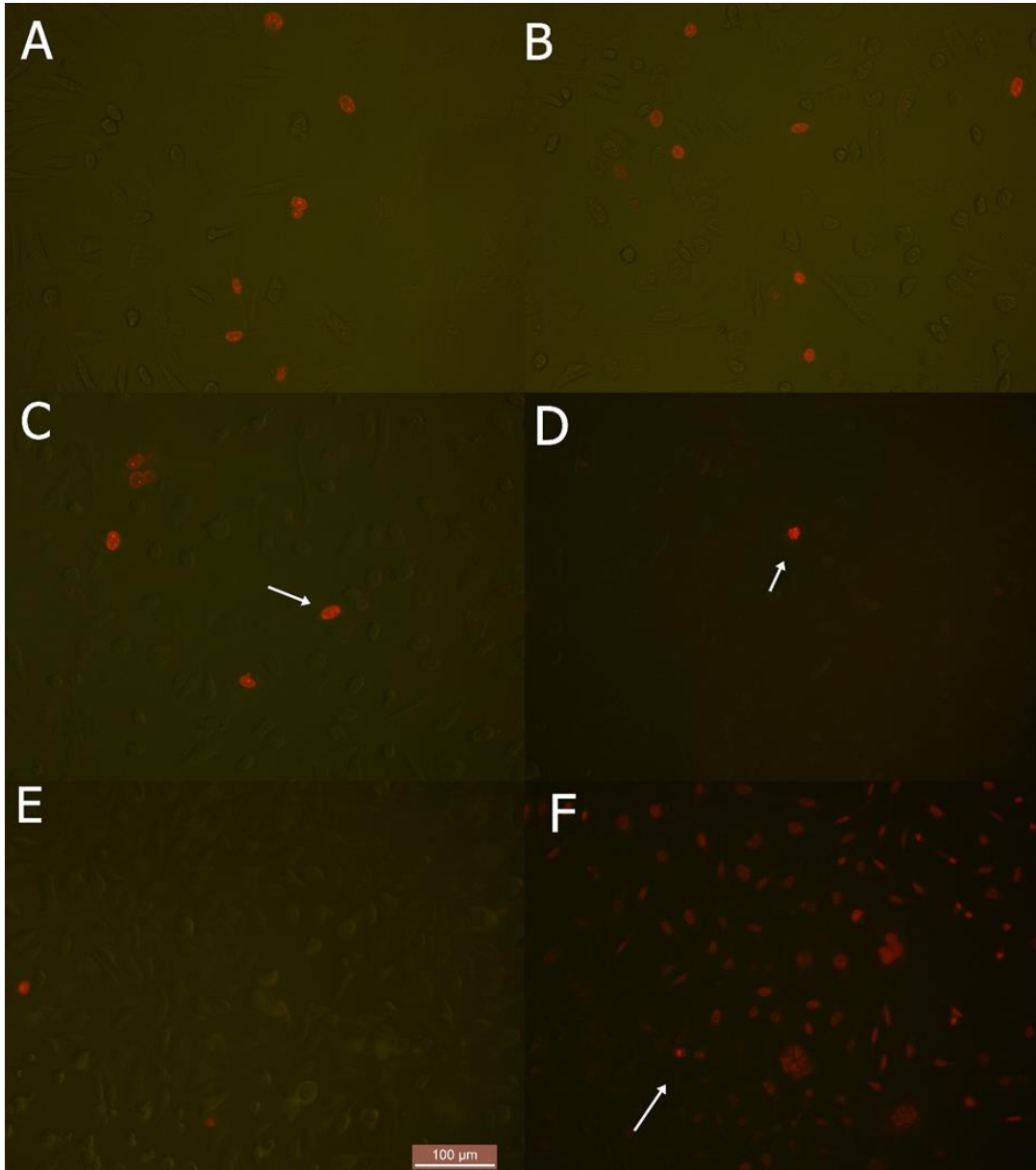
Şekil 3.2 DLD-1 hücre kültüründe farklı konsantrasyonlarda 5-FU uygulaması sonrası apoptotik hücrelerin görüntüleri (200X)

A: 5-FU, 5 µg/mL apoptotik sonuç; B: 5-FU, 2.5 µg/mL apoptotik sonuç;

C: 5-FU, 1,25 µg/mL apoptotik sonuç; D: 5-FU, 0,625 µg/mL apoptotik sonuç;

E: Negatif kontrol apoptotik sonucu*; F: Pozitif kontrol apoptotik sonucu**

Nekrotik hücreler propidium iyodür ile kırmızıya boyanmıştır. Oklar, Şekil 3.3'teki bazı nekrotik hücreleri göstermektedir.



Şekil 3.3 Farklı konsantrasyonlarda 5-FU uygulama sonrası DLD-1 hücre kültüründe nekrotik hücre görüntüleri. (200X)

A: 5-FU, 5 µg/mL nekrotik sonuç; B: 5-FU, 2,5 µg/mL nekrotik sonuç;

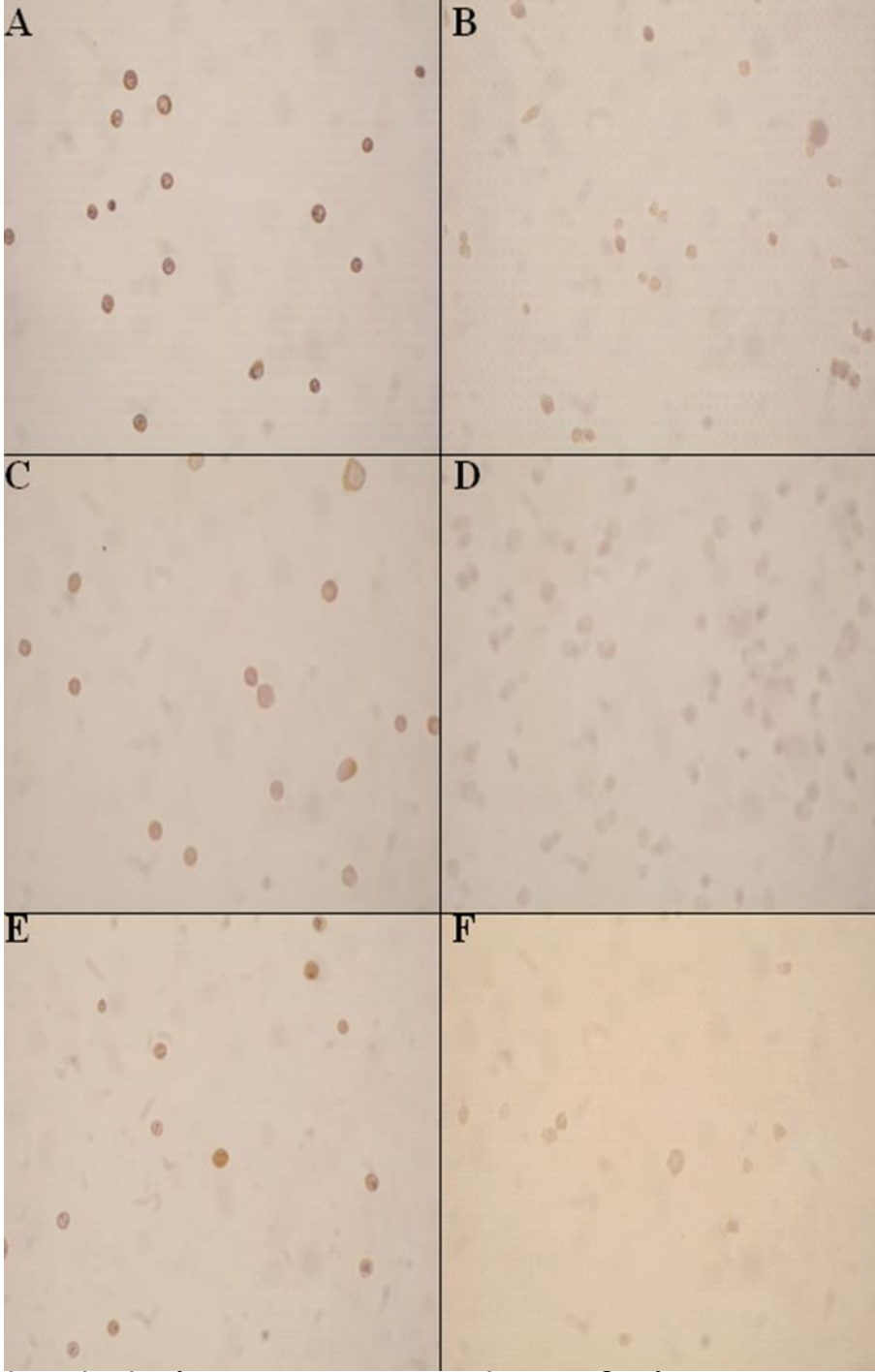
C: 5-FU, 1,25 µg/mL nekrotik sonuç; D: 5- Fu, 0,625 µg/mL nekrotik sonuç;

E. Negatif kontrol nekrotik sonucu*; F: Pozitif kontrol nekrotik sonuç**

*Negatif kontrol : 5-FU uygulaması yok ** Pozitif kontrol: 5-FU

3.1.3 İmmünsitokimya

İmmünositokimyasal boyama, DLD-1 kanser hücre hattına 5-FU uygulanması üzerine ilaca dirençli proteinlerin, apoptotik belirteçlerin ve GST izozimlerinin yukarı regülasyonunu gösterdi (Şekil 3.4). MRP-2, MRP-3, 6, 7, ilaç uygulanan DLD-1 hücre hattında, ilaç uygulanmayan hücre hattına göre daha yüksek ekspresyona sahiptir. GSTA1, GSTM1, GSTT1, GSTZ1, GSTK1 ve GSTO1 proteinleri, ilaç uygulanan DLD-1 hücre hattında, ilaç uygulanmayan hücre hattından daha yüksek ekspresyona sahiptir. Apoptotik proteinler olan Bcl-2, kaspaz-3, p38 ve p53, ilaçla tedavi edilen DLD-1 hücre hattında, tedavi edilmeyen hücre hattından daha yüksek ekspresyona sahiptir. MDR-1, MRP-1, GSTS1 proteinleri, ilaçla tedavi edilen DLD-1 hücre hattında, tedavi edilmeyen hücre hattından daha negatif bir ifadeye sahiptir (Şekil 3.4)



Şekil 3.4 Çalışmaya konu olan bazı belirteçlerin ekspresyon düzeylerinin immünohistokimyasal olarak saptanması.

A: 5-FU uygulanmış DLD-1 hücre hattında (3+) boyama gösteren Bcl-2'nin immünohistokimyası

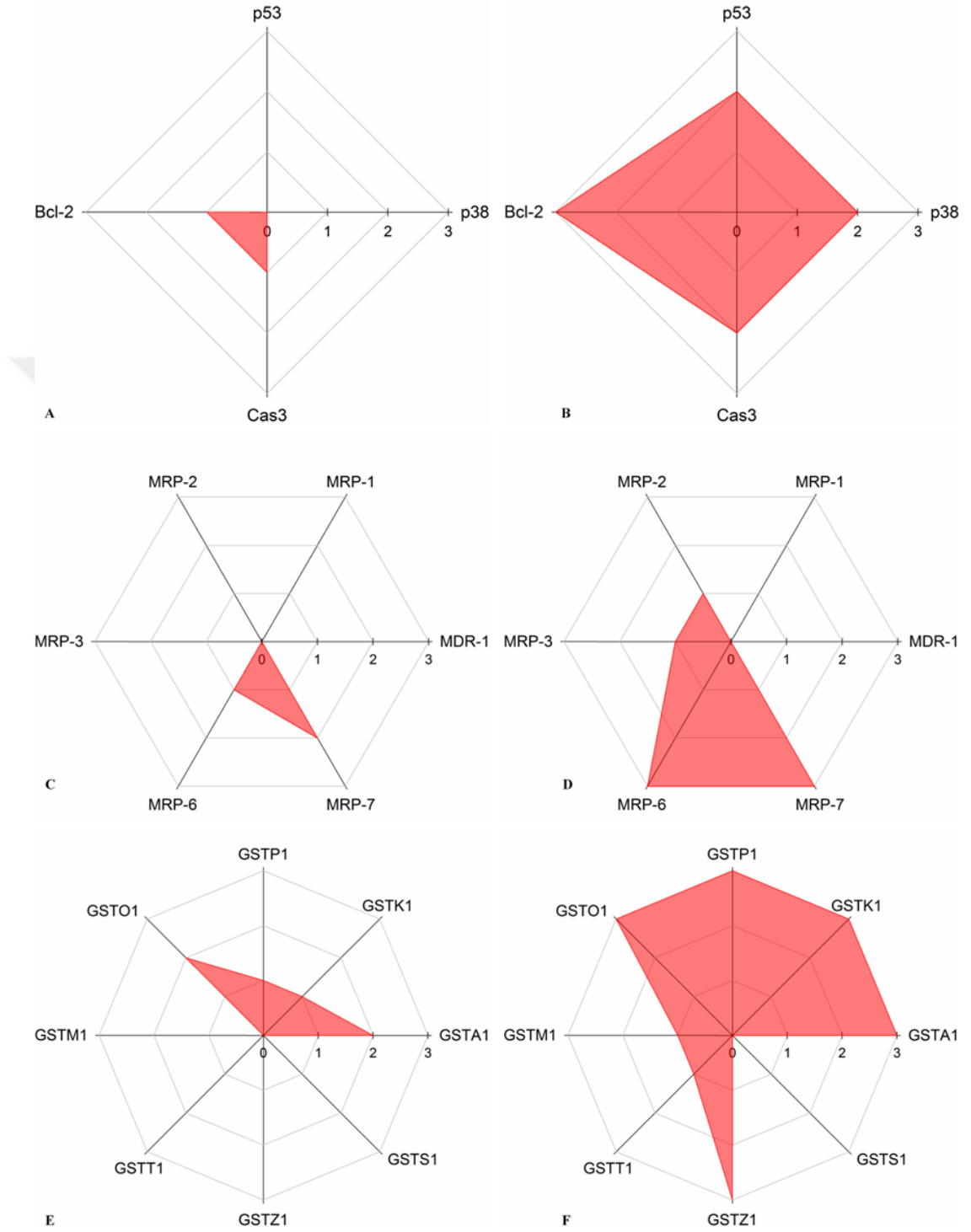
B: 5-FU uygulanmamış DLD-1 hücre hattında (1+) boyama gösteren Bcl-2'nin immünohistokimyası

C: 5-FU uygulanmış DLD-1 hücre hattında (3+) boyama gösteren GSTZ1'in immünohistokimyası

D: 5-FU uygulanmamış DLD-1 hücre hattında (-) boyama gösteren GSTZ1'in immünohistokimyası

E: 5-FU uygulanmış DLD-1 hücre hattında (2+) boyama gösteren p53'ün immünohistokimyası

F: 5-FU uygulanmamış DLD-1 hücre hattında (-) boyama gösteren p53'ün immünohistokimyası



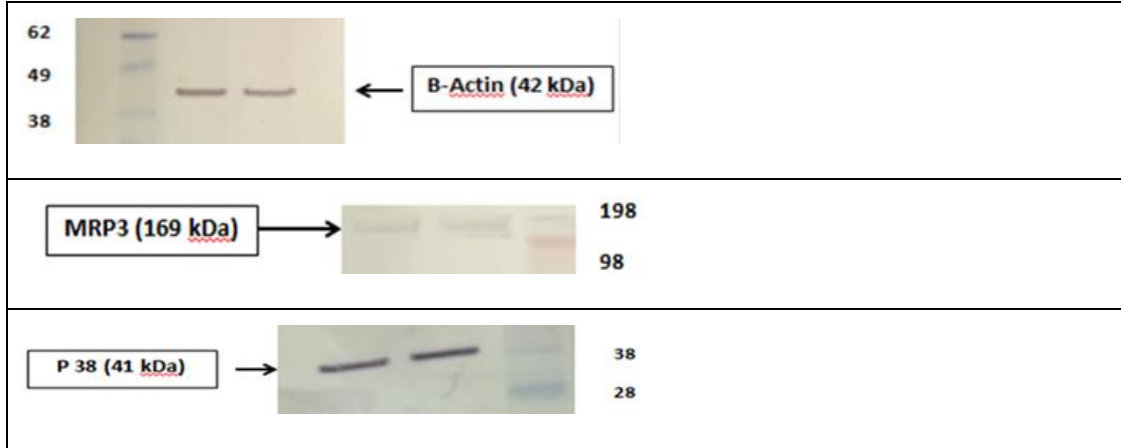
Şekil 3.5 Test edilen proteinlerin immünohistokimyasal ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin radar çizimleri.

Kontrol (A) ve 5-FU ile tedavi edilen (B) gruplarındaki apoptotik belirteçlerin puanları; kontrol (C) ve 5-FU ile tedavi edilen (D) gruplarındaki ilaç direnci proteinlerinin puanları; ve kontrol (E) ve 5-FU ile tedavi edilen (F) gruplardaki GST izozimlerinin skorları temsil edildi. Radar grafikleri, lisanslı SigmaPlot13.0 yazılımı tarafından hazırlanmıştır.

Apoptotik belirteçlerin tümü, radar grafiğinin taralı alanında önemli bir artıştan kaynaklanan kontrole göre 5-FU uygulanmış gruplarda yukarı doğru düzenlenmiştir. İlaç direnci proteinlerinin ekspresyonunda dikkat çekici bir artış gözlenmiştir. Ancak MDR-1 ve MRP-1, kontrol grubunda olduğu gibi negatif immün boyama göstermiştir. GSTS1 hariç tüm GST izozimleri yukarı regüle edilmiş ve ilaç uygulanmış grup için radar grafiğinde daha büyük alan taranmıştır.(Şekil 3.5).

3.1.4 Western Blot

β aktini kontrol grubu olarak kullandığımız DLD-1 Kolon kanser hücre hattında yapılan Western blot analizinde uygulanan MDR-1, MRP1,2,3,6,7,GSTA1 , GSTT1, GSTM1 ,GSTO1, GSTS1 , GSTZ1 ,GSTK1 , GSTP1 ; P53 ; Bcl-2 ; P38 ; Caspaz-3 antikorlardan ; MRP-3 ve p38 antikorları hem kontrol grupların da hem de 5-FU uygulanmış örneklerde western blot ile ekspresyonları gösterilmiştir. β -aktin, MRP-3 ve p38 antikorları ile elde edilen bant görüntüleri Şekil 3.6'da verilmiştir



Şekil 3.6 β -aktin, MRP-3 ve p38 antikorlarının 5-FU uygulama öncesi ve sonrası protein ekspresyonlarının western blot yöntemi ile gösterilmesi

3.1.5 Kolon Kanser Dokuları ve İmmühistokimya

3.1.5.1 Bcl-2, p53, p38, kaspaz 3, Ki-67, SOX- 9 ve E-kaderin Ekspresyonlarının Prognostik Faktörlerle İlişkisi

Çalışmamızda 46 kolon adenokanser hastasının dokularınada apoptotik proteinler (bcl-2,kaspaz-3, p53 ve p38) ve Ki-67, SOX-9, E-kaderin protein ekspresyonları immünohistokimyasal metod kullanarak incelendi. Elde edilen veriler Fisher exact test kullanılarak analiz edilmiştir ($p<0.05$). Analiz sonuçları çizelge 3.2’de görülmektedir.

Protein ekspresyonları ve klinik parametreler arasındaki analiz sonuçlarına göre; Ki-67 ekspresyonu ile yaş, E-kaderin ile grade, p53 ile tümör derinliği arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur. Diğer prognostik faktörler ve bcl-2, kaspaz-3,p38, SOX-9 protein ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Çizelge 3.2 Klinik parametrelerle immünohistokimya sonuçlarının karşılaştırılması

	HASTA SAYISI	p53	bcl2	p38	Kaspaz-3	E-kaderin	SOX-9	Ki-67
YAŞ								
<60	13	,094	1	,305	,470	1	,581	,020
≥60	33							
CİNSİYET								
Kadın	20	,092	,632	,256	,590	,470	,079	,680
Erkek	26							

Çizelge 3.2 Klinik parametrelerle immünohistokimya sonuçlarının karşılaştırılması devamı

LOKALİZASYON									
Çıkan kolon	8	,265	,359	,635	,464	,126		,214	,436
Transvers kolon	3								
İnen kolon	8								
Sigmoid kolon	27								
LENF NODU METASTAZI									
Var	27	,743	,604	,616	,665	,798		,323	,976
Yok	19								
UZAK METASTAZ									
Var	3	,436	1,000	,203	,118	Hesaplanamadı		,265	,636
Yok	43								
GRADE									
G1	6								
G2	25								
G3	15								
TÜMÖR EVRE									
T1	1								
T2	3								
T3	30								
T4	12								

Çizelge 3.2 Klinik parametrelerle immünohistokimya sonuçlarının karşılaştırılması devamı

TNM	,673	,613	,326	,478	,509	,382	,884
EVRELEME							
EVRE1	1						
EVRE2	20						
EVRE3	22						
EVRE4	3						

Fisher exact test : $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (koyu olarak işaretlendi).

3.1.5.2 Bcl-2, p53, p38, kaspaz 3, Ki 67, SOX 9 ve E-kaderin Ekspresyon İlişkisi

Kolon adenokanser hastasının dokularında apoptotik proteinler (bcl-2,kaspaz-3, p53 ve p38) ve Ki 67, SOX9, E-kaderin protein ekspresyonlarının immünohistokimyasal sonuçlarının kendi aralarındaki ilişkileri Spearman korelasyon test kullanılarak analiz edilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre, p 38 ile p 53 ($r_{\text{sperman}} = , 332; p < 0,05$), p38 ile bcl-2 ($r_{\text{sperman}} = , 381; p < 0,05$) proteinleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Sox 9 ile p 53 arasında da ($r_{\text{sperman}} = , 485; p < 0,01$) pozitif yönlü ilişki bulunmuştur. Diğer protein ekspresyonları arasında; bcl-2 ile p53($r_{\text{sperman}} = , 108; p > 0,05$), kaspaz-3 ile p53($r_{\text{sperman}} = , 011; p > 0,05$), kaspaz-3 ile bcl-2 ($r_{\text{sperman}} = -, 149; p > 0,05$), kaspaz-3 ile p38 ($r_{\text{sperman}} = , 144; p > 0,05$), e-cadherin ile p 53 ($r_{\text{sperman}} = -, 055; p > 0,05$), bcl-2 ($r_{\text{sperman}} = , 267; p > 0,05$), p38 ($r_{\text{sperman}} = , 212; p > 0,05$), kaspaz-3 ($r_{\text{sperman}} = -, 239; p > 0,05$); sox 9 ile bcl-2 ($r_{\text{sperman}} = , 130; p > 0,05$), p 38 ($r_{\text{sperman}} = , 281; p > 0,05$), kaspaz 3 ($r_{\text{sperman}} = , 010; p > 0,05$), e cadherin ($r_{\text{sperman}} = , 147; p > 0,05$); ki 67 ile p53 ($r_{\text{sperman}} = , 118; p > 0,05$), bcl-2 ($r_{\text{sperman}} = , 098; p > 0,05$), p38 ($r_{\text{sperman}} = , 033; p > 0,05$), kaspaz3 ($r_{\text{sperman}} = , 029; p > 0,05$), e cadeherin ($r_{\text{sperman}} = , 167; p > 0,05$). sox 9 ($r_{\text{sperman}} = , 096; p > 0,05$) anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Çizelge3.3).

Çizelge 3.3 Protein ekspresyonların korelasyonu: p53,bcl-2, p38,kaspaz-3, E- kaderin,SOX-9, Ki-67

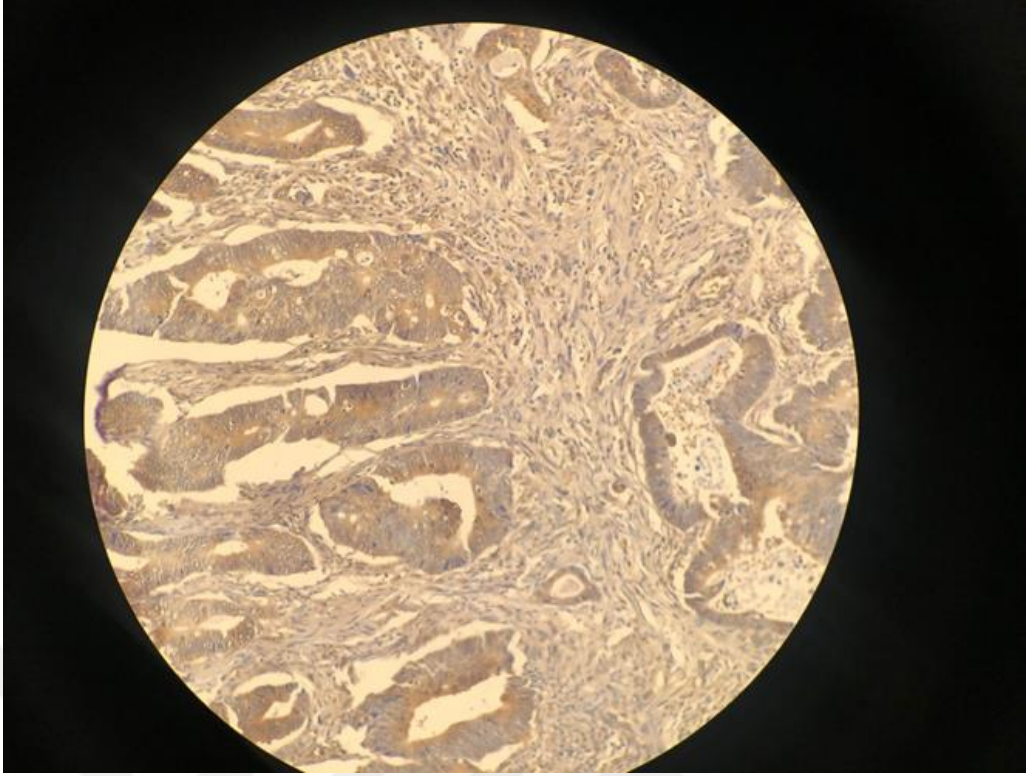
	p53	bcl2	p38	Kaspaz-3	E-kaderin	SOX-9	Ki-67
p53	-	-	-	-	-	-	-
bcl-2	,108	-	-	-	-	-	-
p38	,332*	,381*	-	-	-	-	-
Kaspaz- 3	,011	-,149	,144	-	-	-	-
E-kaderin	-,055	,267	,212	-,239	-	-	-
SOX- 9	,485**	,130	,281	,010	,147	-	-
Ki-67	,118	,098	,033	,029	,167	,096	-

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

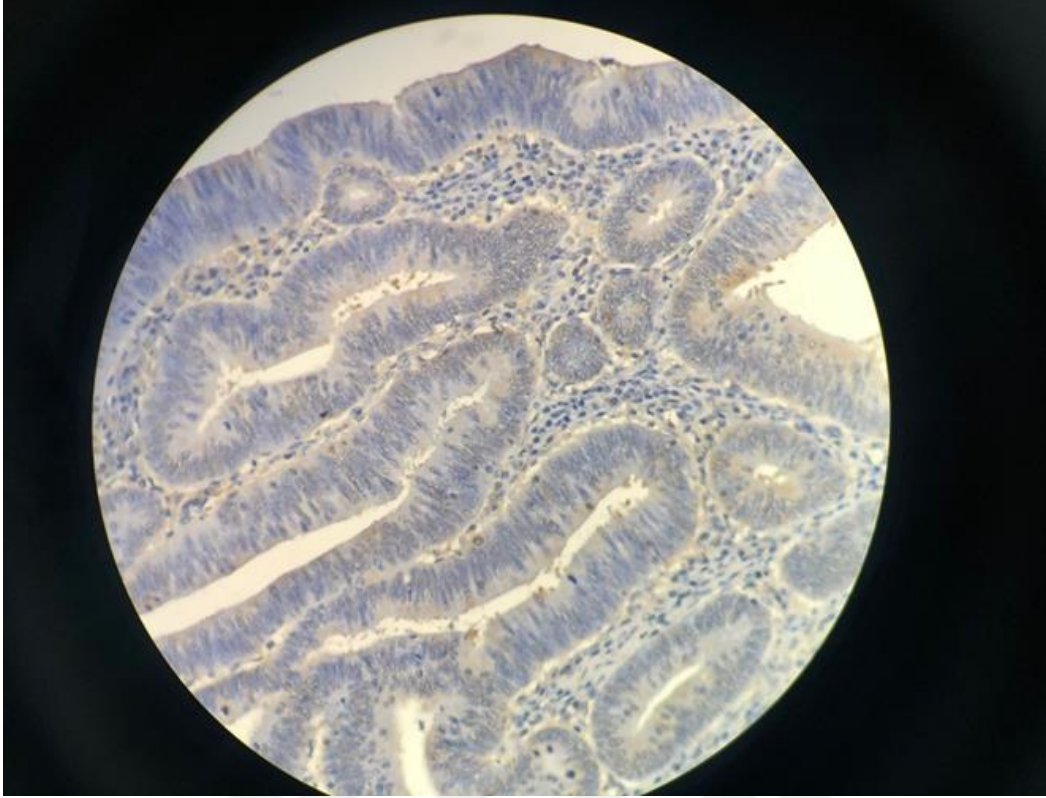
(r sperman değerleri tabloda verilmiştir.)

46 adeno kolon kanserli hastanın hücrelerinde kaspaz-3 apoptotik proteini boyanma şiddetlerine göre farklı dağılım göstermektedirler.Kaspaz-3 proteini, kolon adenokanser vakalarının; %19,57 (n=9)'sinde negatif, %50 (n=23)'sinde (1+), %19,57 (n=9)'sinde (2+),%8.70 (n=4)'inde (3+) boyanma göstermiştir Şekil 3.7. 1vaka değerlendirilememiştir.



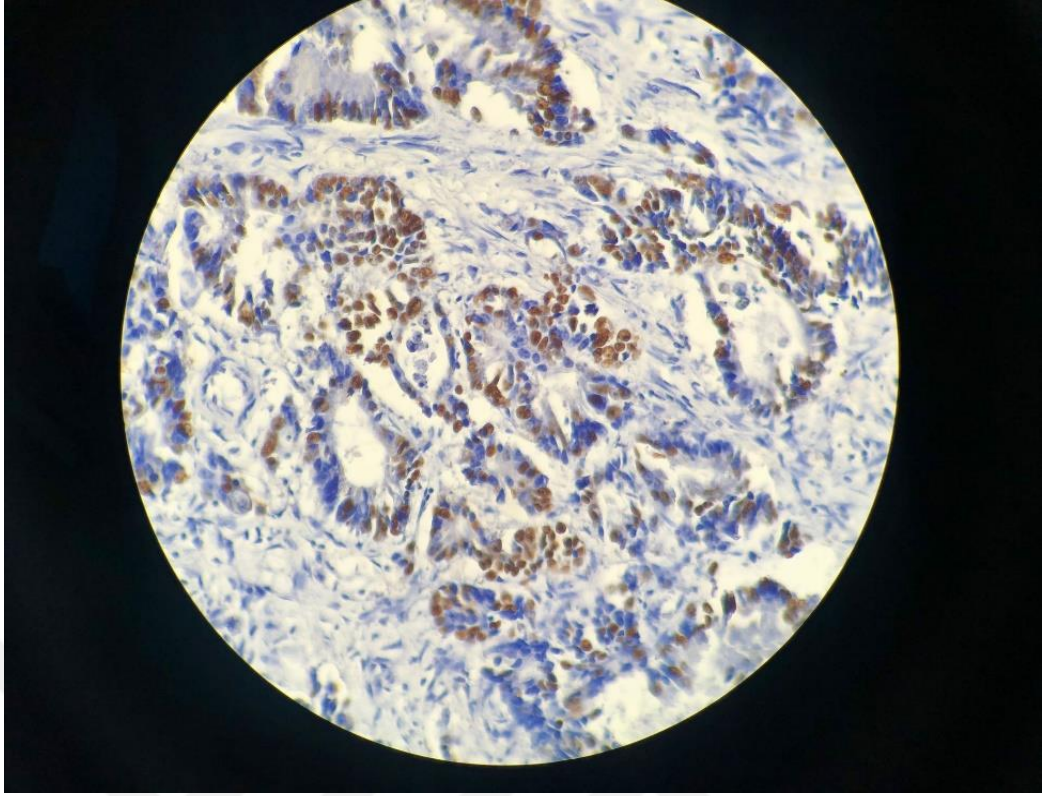
Şekil 3.7 Kolon adenokanser olgusunda kaspaz-3 ile tümörün boyanması skor (3+) (100x)

46 adeno kolon kanser hastasının 43'ünde Ki-67 ekspresyonu değerlendirilmiştir. Kolon adenokanser vakalarında Ki-67; %6,52 (n=3) negatif, %67,39 (n= 31) vaka (1+), %19,57 (n=9) vaka (2+) boyanma ekspresyonu göstermiş, vakaların hiçbirinde (3+) boyanma gözlenmemiştir (Şekil 3.8).



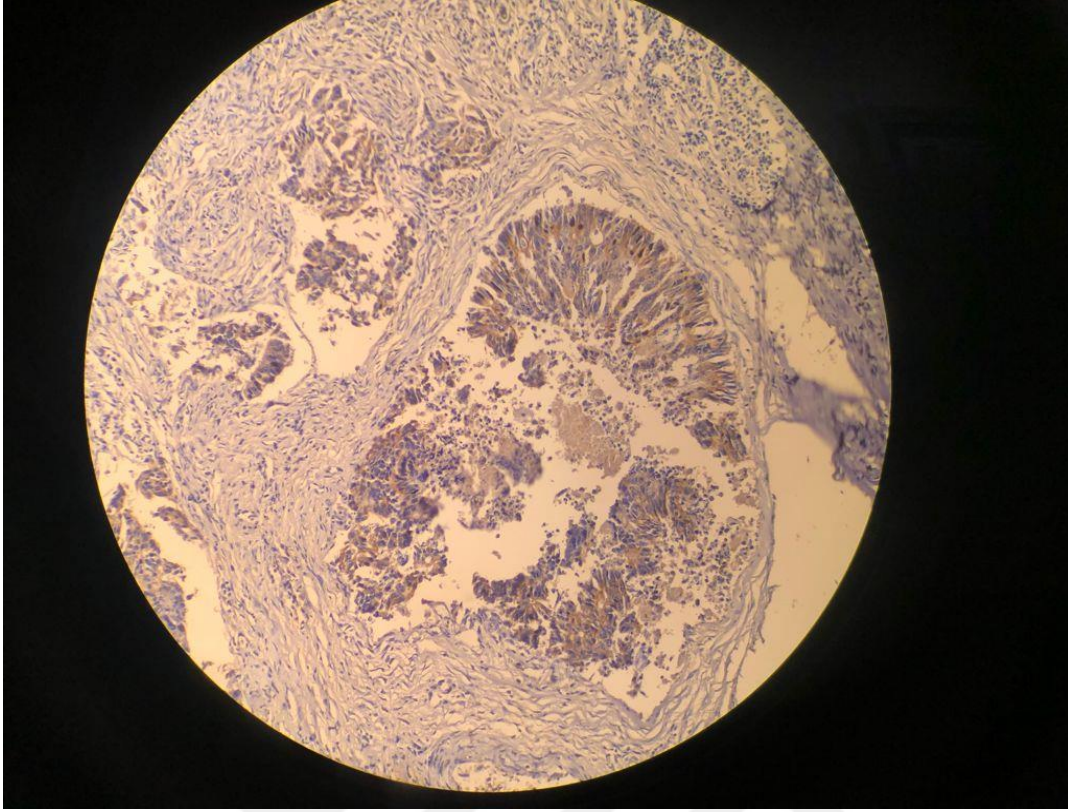
Şekil 3.8 Kolon adenokanser olgusunda Ki-67 ile tümörün boyanması skor(1+) (200x)

p 53 ile boyanma yoğunluğuna göre kolon adenokanser 46 vakanın, % 36,96 (n=17)'sinde negatif boyanma, % 23,91(n=11) (1+) boyanma,% 8,70 (n=4)'inde (2+) boyanma,%30,43 (n=14)' ünde (3+) boyanma gözlenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Kolon adenokanser olgusunda p53 ile tümörün boyanması skor (3+) (200x)

E -kadherin ile boyanma yoğunluğuna göre kolon adenokanser vakalarının %23,91 (n=11)'i negatif, %36,96 (n=17) (1+) boyanma, %10,87 (n=5) (2+) boyanma göstermiş, 13 vaka değerlendirilememiş, (3+) boyanma gösteren vaka olmamıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Kolon adenokanser olgusunda E-kadherin ile tümörün boyanması skor(2+) (100x)

46 adeno kolon kanser hastasının 43'ünde SOX-9 ekspresyonu değerlendirilmiştir. Kolon adenokanser vakalarında SOX-9; %21,74 (n=10) negatif, %23,91 (n= 11) vaka (1+), %28,26 (n=13) vaka (2+), %19,57 (n=9) vaka (3+) boyanma ekspresyonu göstermiştir.

bcl-2 ile boyanma yoğunluğuna göre 46 kolon adenokanser vakasından 42'si değerlendirilmiştir. % 80,43'ü (n=37) negatif, % 10.87'si (n=5) (1+) boyanma gözlenmiştir. Vakaların hiçbirinde (2+) ve (3+) boyanma gözlenmemiştir.

4 TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser üzerine yapılan çalışmalarda genellikle genetiği değiştirilmiş laboratuvar organizmaları, ksenograftlar, birincil tümörler, parafine gömülü örnekler, tümör birincil hücre kültürleri veya temel olarak kanser hücre dizileri kullanılır [211]. Bunlar arasında, özellikle ilaç araştırmaları için hücre hatları, kolay kullanımları, manipüle edilmeleri ve moleküler olarak karakterize edilmeleri nedeniyle daha iyi bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır. Karakterizasyon hayati önem taşır çünkü hücre metabolizma açısından kanserin karmaşıklığı hakkında bilgi edinmemizi sağlar. Bu sayede yeni antikanser ilaçları geliştirmek, var olanların etki mekanizmasını anlamak ve farklı kanser türlerinde direnç/duyarlılık paternlerini ortaya çıkarmak mümkün olabilecektir [212].

Kolon kanseri hücre dizileri, 5-Fluorourasil gibi DNA sentezinde işlev gören enzimleri inhibe ederek hücre proliferasyonunu önleme kabiliyetine sahip ilaçlara karşı daha duyarlı olduğundan, kanser hücre hatları kemoterapötik ajanlara karşı çeşitli tepkilere ve direnç seviyelerine sahiptir ve son 50 yılda kolorektal kanserli hastalar için önemli bir kemoterapötik olarak kullanılmaktadır [213].

Bazı kanser türlerinin farklı ilaçlara direnci veya duyarlılığı, araştırmacıları yeni biyolojik belirteçleri keşfetmeye ve test etmeye zorlar veya terapötik yanıtla ilişkili çeşitli sinyal yolları üzerinde çalışmalarını sağlar [214]. p53, p38, Bcl-2, Bax ve kaspaz ailesi gibi yaygın ve popüler apoptotik belirteçler, hücrelerin durumunun ve bunların bir ilaç aktif bileşenine karşı tepkisinin değerlendirilmesinin ölçütleridir. Tez çalışmamızda, apoptotik proteinler Bcl-2, p53, p38 ve kaspaz-3, kontrol hücrelerine göre 5-FU'ya maruz kalan DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde daha yüksek ekspresyon göstermiştir. Literatürde Bcl-2 [215], p53 [216], p38 [217] ve kaspaz-3 [218] için benzer sonuçlar bildirilmiştir. 5-FU ile muamele edilmiş DLD-1 hücre hattı için, p38 MAPK'nın inhibisyonunun kolorektal kanser hücrelerini öldürmek için 5-FU'nun etkinliğini artırabileceği bulunmuştur [219].

Farklı p53 ve Bax durumlarına sahip 8 farklı kolon kanseri hücre hattında 5-FU ile indüklenen apoptoz direnç çalışmasında, Bcl-2, Bcl-xL ve Bax seviyelerinin, kolon tümör hücrelerinin çoğunun, p53 durumlarından bağımsız olarak uzun süreli 5-FU tedavisine direncinin belirlenmesine katkıda bulunabileceği kaydedildi [220]. Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun, mide kanserli hastalarda 5-FU, ADM ve MMC gibi kemoterapi ilaçlarının etkinliğinin kaybı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [221].

Kanser hücre hatlarının karakterizasyonu, Çoklu İlaç Direnç domainleri ve Çoklu İlaç Direnç Proteinlerinin varlığı ve çeşitliliği (MRP'ler), antikanser ilaç testlerinde önemli bir yer teşkil etmektedir. MDR'ler [222] ve MRP'ler [223-225] gibi 5-FU ile tedavi edilen kolorektal kanser hücre dizilerinde bu proteinlerin yukarı regülasyonunu belirten raporlar vardır.

Glutasyon S-transferazlar, ilaç metabolize eden enzimlerin önemli üyeleridir ve kanser ilerlemesinde ve kemorezistansta rolleri vardır. Antikanser ajanın tümör hücresine girmesiyle birlikte GSH düzeyi, GST enziminin fizyolojik substratı ve GST ekspresyonu genellikle artar. Literatürde tümör hücrelerinde spesifik MRP'ler ile GST izozimlerinin koordineli bir şekilde artması sonucu bazı kemoterapötik ajanlara karşı direnç geliştirdiklerini belirten kayıtlar bulunmaktadır [226,227].

Yapılan tez çalışmasında, DLD-1 hücreleri üzerinde 5-FU uygulaması, kontrol grubuna kıyasla GSTA1, GSTT1, GSTM1, GSTO1, GSTZ1, GSTK1, GSTP1, MRP2,3,6,7 ifadelerinde eşzamanlı bir artışa yol açtığı ortaya konmuştur. Hücre proliferasyonu ve hücre ölümünde sinyal yollarının aracıları olarak GST izozimleri, özellikle GSTP1 oldukça önemlidir [228]. GSTP-1'in susturulması, SNU-407 kolon hücrelerinin antikanser ajan 5-florourasil'e karşı duyarlılığını arttırdığı ve bunun da GSTP-1'in kolon kanseri için klinik olarak yararlı bir biyobelirteç ve kolon kanseri önleyici ilaçlar için bir hedef olabileceğini gösterdi [229]. Bazı GST izozimlerinin aşırı ekspresyonu, kolon kanseri hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir [230-234]. Bu çalışmalardan bazıları da hem ilaç direnç mekanizmalarını hem de bunların GST izozimleri ile ilişkilerini belirlemeyi amaçlamıştır. Bu sayede kolon kanserinde direnci tersine çevirebilecek ve kemoterapinin başarısını artıracak yeni mekanizmaların ortaya çıkarılması mümkün olacaktır.

5-FU uygulamasından sonra DLD-1 kolon kanseri hücre hattında GST ekspresyonu 5-Flourourasil almayan gruptan daha yüksekti. Bildiğimiz kadarıyla, bu, kolorektal kanser hücrelerinin yüksek etkili 5-Fluorourasil kemoterapötik ilacına kısa süreli yanıtında, tüm sitoplazmik GST izozimleri ile korelasyon içinde bazı ana apoptotik belirteçlerin ve ilaç dirençlilik proteinlerinin ifadelerindeki değişiklikleri sunan ilk çalışmadır. Bu proteinlerin kolorektal kanserde 5-FU ilaç direnci gelişimindeki rollerini tam olarak belirlemek için farklı hücre dizileri ile daha ileri çalışmalar yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

Kolorektal kanser, tümörün başlaması ve ilerlemesi ile ortaya çıkan genetik ve epigenetik olaylardan patogenezinin etkilendiği bir hastalıktır. Moleküler heterojenitenin neden olduğu bireysel hasta prognozunda ve kemoterapiye yanıtta büyük farklılıklar vardır. Tümör evrelemesinin ötesinde klinik sonucu tahmin edebilen ve tedavi seçimini bilgilendirebilen belirli biyobelirteçler tanımlanmıştır. [235]. Malignitede görülen kontrolsüz hücre proliferasyonu, artmış proliferasyon ve/veya azalmış apoptozun sonucu olabilir. Apoptotik fonksiyon veya kontroldeki anormallikler, kolorektal kanser patogenezinde katkıda bulunan olaylar olarak tanımlanmıştır[236]. Şu anda literatürde kolorektal kanserde apoptozun prognozu hakkında bir fikir birliği yoktur[237].

Apoptoz mekanizmalarından biri kaspazların kademeli aktivasyonu ile gerçekleşir[238].179 kolon kanser hastasının histolojik örnekleri ile yapılan çalışmada; TdT-mediated X-dUTP yöntemi ile ölçülen daha düşük apoptotik indeksin ve kaspaz-3'ün daha düşük immünohistokimyasal ekspresyonunun, daha kısa hastalısız sağkalım ve genel sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir[239]. Sheren vd. (2022) 50 kolorektal kanserli hastayla yaptıkları çalışmada, kaspaz 3 ekspresyonu ile T evresi, lenf nodu metastazı, arasında anlamlı bir negatif korelasyon gösterirken ($p<0.001$) ; lenfo vasküler invazyonu ile anlamlı bir ilişki bulamamışlardır[240].

Kolorektal kanserli hastalarla yapılan başka bir çalışmada; Ki67 ve kaspaz-3 immünoaktivitesinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur [241]. Doksan üç evre II ve III kolon kanserli hastadan alınan tümör dokusundan oluşan doku mikrodizilerinin (TMA) immünohistokimya ile analiz edildiği çalışmada, şaşırtıcı bir şekilde, düşük aktif kaspaz-3 seviyelerine sahip hastalarda (özellikle

5FU bazlı adjuvan kemoterapi alan hastalarda belirgindi) hastaliksız sağkalım süresinin arttığı belirlenmiştir[242].

Tez çalışmamızda, kaspaz 3 ekspresyonunun yaş, cinsiyet gibi demografik , klinik ve histopatolojik özellikler açısından anlamlı bir ilişkisi bulunamamıştır. HCT116 kolon hücreleri ve kaspaz 3 nakavt hücrelerle (CASP3KO) yapılan invitro çalışmada, ebeveyn HCT116 hücreleri ile karşılaştırıldığında, artan E-kadherin ekspresyonu, azalmış N-kadherin ekspresyonu ve buna bağlı epitel mezankimal geçiş (EMT) fenotipinin azalmasına neden olduğu görülmüştür. Böylece, CASP3KO hücreleri ,kontrol hücrelerinden önemli ölçüde daha az istilacı ve radyasyona ve mitomisin C'ye daha duyarlı oldukları ortaya konmuştur. İnvivo da ise, CASP3KO hücrelerinin, kontrol hücrelerine benzer oranlarda tümörler oluşturduğu, ancak radyoterapiye önemli ölçüde daha duyarlı oldukları belirlenmiştir. Bu nedenle, kaspaz-3'ün terapötik hedeflemesi, kanser hücresinin kemoterapi ve radyoterapiye duyarlılığını arttırmakla kalmadığı gibi, aynı zamanda kanser hücresi istilasını ve metastazı da engellediği yapılan çalışmayla ortaya konmuştur [243].

p53 proteinini kodlayan TP53 geni, kanser oluşumunu baskılama işlevi görür. Kanser baskılanmasına aracılık etmek için p53, spesifik DNA yanıt elemanlarına bağlanır ve hücre döngüsü durması, DNA onarımı, apoptoz, yaşlanma, otofaji, ferroptoz ve metabolizma süreçlerinin bir veya daha fazlasında yer alan genlerin ekspresyonunu indükler [244,245]. Mekanizmalarda meydana gelen sorunlar hücreyi kansere ve kanserleşmiş hücrede kötü prognoza neden olurlar.

Kırkbir kolorektal karsinom olgusunda PCNA, Ki-67 ve p53 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak gösterildiği çalışmada adenokarsinomlarda, PCNA ve Ki-67 antikorları ile tespit edilen tümör proliferatif aktivitesi, tümör derecesinin adenokarsinomlarda, bu tümörlerin farklılaşması ile p53 pozitif oranı arttığı ortaya konmuştur[246].

Wang vd.(2017) kolorektal kanserde p53 pozitifliğinin prognostik değerini araştırdıkları retrospektif çalışmada; p53 pozitif ve negatif, karsinoembriyonik antijen ≥ 5 ng/mL (p = 0.036), tümör farklılaşma derecesi (p = 0.026), patolojik tümör evresi (p = 0.019), patolojik lenf nodu evresi (p = 0.037) ile = 0.004), patolojik tümör düğümü metastazı evresi (p =0.017), sinir istilasası (p = 0.008) ve damar istilasası

($p = 0.018$) ile ilişkilendirildi. Tümör bölgesi, tümör boyutu ve patolojik patern bu iki grup arasında anlamlı farklılık göstermedi. p53 pozitif grupta hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım, p53 negatif gruptan önemli ölçüde daha kısa olarak belirlendi (sırasıyla $p = 0.021$ ve 0.025) [247].

ECG(Epicatechin gallate)' nin SW480 kolon kanseri hücre hattı üzerindeki invitro antikanser etkilerinin araştırıldığı çalışmada AKT/fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) ve mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'ler) ve bu süreçlerde p53'ün rolü araştırılmış, p38, p21 ve p53'ün birlikte aktive oldukları apoptotik sürecin gerçekleştiğini göstermişlerdir. Tez çalışmamızda da p53 ve p38'in ekspresyonlarının birbirleriyle pozitif korelasyonu ($<0,05$) ortaya konmuştur. Bu da p53 ve p38'in apoptotik yolakta birlikte çalıştıklarını gösteren bir çalışma olmuştur [248].

Albayrak vd. (2014), 50 kolorektal karsinom olgusuna ait operasyon materyalleri Hastaların %100'ü p53 ile nükleer ve %78'i c-erbB-2 ile sitoplazmik ve membranöz boyanma göstermiştir. p53 overekspresyonunun patolojik evre, lenf nodu metastazı, anjiolenfatik invazyon, tümör derece ve diferansiyasyonu ile anlamlı derecede ($p<0,005$) ilişkili olduğu saptandı. c-erbB-2 ekspresyonu histolojik tip ve lenfositik infiltrasyon ile korele iken, tümör boyutu, tümör büyüme paterni, tümör lokalizasyonu, evre, lenf nodu tutulumu, lenfatik invazyon ile korele bulunmadı[249]. Tez çalışmamızda da p53 ve tümör evresi anlamlı derecede ($p<0,05$) ilişkili olduğu bulunmuş, bulduğumuz bu sonuçlar Albayrak ve arkadaşlarının sonuçlarını da destekler niteliktedir. Bu sonuçlar p53 'ün immünohistokimyasal ekspresyonunun hastaların seyrini görmede değerli olabileceğini düşündürmüştür.

Bcl-2, mitokondriyal membran fonksiyonunu stabilize eden ve böylece apoptozu önleyen proteinleri kodlayan anti-apoptotik etkiye sahip bir proto-onkogendir[250]. Çoğu kolonik adenom, neoplastik epitelyum boyunca anormal durumlarda Bcl-2 proteinini eksprese ederken, neoplastik olmayan polipler düzenli Bcl-2 ekspresyonuna sahiptir. Bu şekilde, Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, hiperplastik epitel ve adenomlar arasındaki geçişe katkıda bulunur. Kolorektal karsinomlarda Bcl-2 protein ekspresyonu, normal mukozadakinden daha fazladır, ancak adenomlardakinden daha azdır [251,252].

Kolorektal kanserde Bcl-2'nin prognostik-prediktif kapasitesini sistematik olarak değerlendirmek için farklı databaselerden alınan 7658 hasta içeren 40 makaleden elde edilen verilerde meta analiz uygulanan çalışmada, Bcl-2 aşırı ekspresyonunun, özellikle Avrupa ve Amerika'dan gelen ancak Asyalı olmayan hastalarda ve ameliyattan önce herhangi bir adjuvan tedavi almamış hastalarda genel sağ kalım (OS) prognozu ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir. Son olarak, mevcut sonuçlar, bcl-2 proteininin ekspresyonunun yüksek farklılaşma derecesi ve A/B Duck's Evrelemesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir[253].

Zeestraten vd. (2013), Bcl-2 protein ailesi ile ilgili belirteçlerin prognostik uygunluğunu tanımlayan 55 çalışmadan, 38 çalışmada, Bcl-2'nin ifadesi immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Bu 38 çalışmanın sadece 9'unda istatistiksel olarak kanıtlanmış bir prognostik önemi belirlenmiştir. Tüm çalışmalarda, Bcl-2'nin yukarı regülasyonu, hastalısız, genel veya nüksüz sağkalım için gösterildiği gibi daha iyi sağkalım ile ilişkiliydi. Bu veriler, Bcl-2'nin anti-apoptotik işlevi ile çelişmektedir. Yukarı regüle edilmiş Bcl-2 ekspresyonun, daha agresif bir tümör fenotipinin bir belirteci olma olasılığı daha yüksek olmalıdır[254].

Moleküler proteinler hücre içinde farklı ya da aynı yollarda etkilerinin gösterebilirler. PMC (antifungal ajan) uygulanmış HCT-16 kolon hücre hattında p53'ten bağımsız(p53^{-/-}) transkripsiyonel Bcl-2 aşağı regülasyonu ve p38 sinyali, PMC-A'nın neden olduğu apoptozda anahtar modülatör olaylar olduğunu düşünmüşlerdir [255]. Bizim çalışmamızda da kolon kanser dokularında Bcl-2 ve p38 arasında anlamlı bir ilişki olduğunu belirledik. (p<0,05).Bu da p38 ve Bcl-2'nin apoptotik yolda etkileşimli çalıştıkları düşüncesini desteklemektedir.

p38, hücre proliferasyonu, farklılaşma, stres yanıtı, apoptoz ve hücre göçü ve hayatta kalma dahil olmak üzere çoklu hücre fonksiyonları, çok sayıda substrat ile etkileşime girerek düzenleyen çok görevli bir kinazdır. [256,257]. p38'in anti-tümörijenik rolüne dair deneysel kanıt sağlayan çok sayıda çalışmaya rağmen, diğerleri bu kinazın hayatta kalmayı, göçü veya tümör hücrelerinde stres ve kemoterapötik ajanlara karşı direnci artırarak kanseri desteklediğini göstermektedir [258].

Fun vd. evre I-III'deki 316 kolorektal kanser hastasına ait dokularda, Fosforillenmiş p38 (p-p38) ekspresyonunu, doku mikroarray ve immünohistokimya boyaması kullanılarak değerlendirdikleri çalışmalarında; kolorektal kanser dokularında p-p38'in aşırı eksprese (%48.1 (152/316) edilirken, buna karşın normal bitişik epitelde düşük veya eksik eksprese edildiğini bulmuşlardır. P-p38 hastalık ilerlemesinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynadığı ve tümör prognozu ile korelasyon gösterdiği belirlenmiştir[259].

SRY- Box Transkripsiyon Faktör (SOX), kanserde prognostik ve diagnostik faktörler olarak kabul edilmektedir [260]. Hem adenomlarda hem de adenokarsinomlarda normal kolon dokusundan önemli ölçüde daha yüksek SOX9 protein ve mRNA seviyeleri gösterdiği ve doku verileriyle uyumlu olarak, genellikle insan kolorektal kanser hücre hatlarında SOX 9'un, normal kolon mukozasından daha yüksek seviyede ifade edildiği ortaya konmuştur[261].

Kolonda, SOX9 bağırsak epitelinin proliferatif kompartmanında lokalizedir ve epitel homeostazının yönetimi için Wnt/ β -katenin sinyallemede aşağı akışta yer alır [262].

Doku mikroarray teknolojisini kullanarak her bir belirteç için immünohistokimyasal analizler gerçekleştirildiği, 1290 Norveçli kolorektal kanser hasta serisinde, üç WNT sinyali ile ilişkili protein, β -katenin, E-cadherin ve SOX9'un prognostik değerinin araştırıldığı çalışmada; membranöz veya sitozolik β -katenin kaybı ve sitozolik E-cadherin protein ekspresyonu kaybı, standart klinikopatolojik yüksek risk parametrelerinden bağımsız olarak majör rezeksiyon uygulanan 903 hastada (722 değerlendirilebilir doku çekirdeği) düşük 5 yıllık sağkalım ile önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur. Sitozolik E-cadherin kaybı olan evre II hastalar bağımsız bir beş yıllık sağ kalım için yüksek riskli alt grup olarak tanımlanmış, SOX9 ile prognoz arasında ilişki bulunamamıştır[263]. Erken evre (evre I-II) kolorektal kanser tanılı 90 Mekisikalı hasta dokusunda ve HTC-19 hücre hattında yapılan çalışmada, yüksek SOX9 ekspresyonunun tümörjenezde önemli bir rol oynayabileceğini ve klinik evre II hastaların ileri T-evreleri ile ilişkili olabileceğini, ancak nüksüz sağkalım ile ilişkili olmadığını göstermiştir [264].

SOX9 ve β -katenin ekspresyonunun, QPCR ve western blot metodlarıyla gösterildiği kolorektal kanser çalışmasında, TNM evre III veya IV'ün artan tümör tomurcuklanmasını (≥ 15), yüksek histolojik derece ve güçlü SOX9 ekspresyonunun olumsuz bir genel sağkalım ile önemli ölçüde ilişkili olduğu ortaya konuldu ($p < .01$) [265].

Evre II primer kolon kanserli yüz kırk dört hastada, immünohistokimya ile değerlendirilen SOX9 ekspresyonun, yüksek SOX9 seviyeleri düşük nüks riskini tahmin ederken, düşük SOX9 seviyeleri yüksek nüks riskini belirlediği ortaya konulmuş. SOX9'un, kişiselleştirilmiş tedavi için nüks riskini değerlendirirken bir biyobelirteç olarak önemli bir değere sahip olabileceği belirtilmiştir [266].

Ullah vd.(2022) yaptıkları çalışmada; Transkripsiyon Faktörü 9 (SOX9), geni ve ürünlerini kolon kanseri için bir teşhis belirteci ve terapötik hedef olarak geliştirmek için kolorektal kanser örneklerinde farklı biyoinformatik araçlarla incelenmiştir. Öncelikle, bu genin normal numunelere kıyasla farklı kolorektal kanser dokularında yukarı doğru düzenlendiği ($\log_2 FC > 4$) gösterilmiştir. Kanserli ve normal kolon dokuları arasındaki immünohistokimya verileri, kolorektal kanser numunelerinde normal numunelere göre SOX9 proteinin daha yüksek ekspresyon gösterdiği ortaya konulmuştur [267]. Tez çalışmamızda, SOX9 ve prognostik faktörler açısından istatistiksel olarak anlamlılık yoktu, ancak SOX9 ve p53 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur.

Bir transmembran glikoproteini olarak, E-cadherin çeşitli epitel dokularında yaygın olarak dağılır ve kalsiyumun katılımıyla benzer hücreler arasında yapışmaya aracılık eder [268]. Azaltılmış E-cadherin ekspresyonunun, genellikle kanser ilerlemesinde rol oynayan epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) olarak bilinen hücresel bir sürecin ayırt edici özelliği olduğu bildirilmiştir [269]. Son çalışmalarda, E-cadherin ekspresyon kaybının, kolon kanseri invazivliğiyle ilişkili olduğunu belirtilmiştir [270]. Bu durum nadiren gen mutasyonlarına bağlanır; posttranslasyonel mekanizmalar E-cadherin ekspresyon düşüklüğünün temel nedeni olarak belirtilmiştir [271,272].

Meta-Analiz çalışmasında, kolorektal kanserde düşük veya kayıp E-cadherin düzeylerinin Asyalı hastalarda kötü prognoz ile korele olduğunu ancak Avrupalı

hastalarda böyle olmadığını bildirilmiştir [273] . 59 hastayı araştıran bir çalışmada, E-kadherin negatif taşlı yüzük hücreli adenokarsinom hastalarında daha düşük sağkalım oranları ile karşılaştırıldığında, E-kadherin pozitif taşlı yüzük hücreli adenokarsinomlu hastalarda istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek bir sağkalım olduğu bildirilmiştir [274]. E-cadherin bariyerini modüle eden kaderin komplekslerinin diğer üyelerini dahil etmek ve kolondaki sinyal fonksiyonları, hastalığın başlaması ve ilerlemesi ile daha iyi bir ilişki sağlamak için gereklidir .

Ki-67, G0 hücre döngüsü fazı hariç hücre döngüsünün tüm fazlarında (G1,S, G2 ve mitoz) saptanır ve mitotik indeksin ve bölünen hücrelerin fraksiyonunun iyi bir belirteci olarak kabul edilir[275]. Bu nedenle Ki-67 ekspresyonunun seviyesi büyük prognostik bir öneme sahiptir.

1800 kolorektal kanserli hastada tissue microarray üzerinde immünohistokimya ile Ki-67 ekspresyonu analiz edildiği ve sonuçların klinikopatolojik ve moleküler parametrelerle karşılaştırıldığı çalışmada; yüksek Ki-67 ekspresyonu, düşük tümör evresi ($p<0.0001$) ve nodal durum ($p=0.0315$) ile ilişkili bulunmuştur. Ancak tümör derecesi ($p=0.8639$), histolojik tümör tipi ($p=0.1542$) ve tümör lokalizasyonu ile ilişkili olmadığı ortaya konmuştur. Yüksek Ki-67 ekspresyonu, yüksek seviyeli nükleer β -katenin ve p53 ekspresyonu ile de anlamlı şekilde ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Kolorektal kanserde,yüksek Ki-67 ifadesinin iyi klinik sonuç ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir. Ki-67, p53 ve β -katenin aşırı ekspresyonu, kolorektal kanser ile bağlantılı gibi görünmektedir ve yüksek proliferatif aktivitenin bir hücresel durumunu gösterir.Ki-67'nin prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini şiddetle önermektedirler[276].

CD34 ve Ki67, normal dokularda zayıf bir şekilde eksprese edilir, ancak malign tümör dokusunda bol miktarda eksprese edilir ve CD34 ve Ki67'nin tümör anjiyogenezi ile ilişkisinin neden olduğu tümör metastazını kolaylaştırır[277].

Bu araştırma, kolorektal kanserin pT3, G2'sinde proliferatif proteinlerin (PCNA, Ki-67, MCM-2) ekspresyonunun, lenf nodu metastazlarının gelişimini gösterebileceğini ve Bcl-2 proteini tarafından inhibe edilen apoptozun eylemi artırabileceğini düşündürmektedir[278].

Luo vd. yaptığı çalışmada, yüksek Ki-67 ekspresyonunun, kötü genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir; bu, yüksek Ki-67 ekspresyonunun kolorektal kanser hastalarının kötü prognozu için değerli bir tahmin yöntemi olarak hizmet edebileceğini gösterir[279]. Dharmayuda vd.[280] kolorektal kanserde Ki-67 ekspresyonunun prognostik yönlerinin değerlendirildiği çalışmada, Ki-67 düzeyleri ile tümörün klinik evresi ($p=0.316$), histopatolojik derecesi ($p=0.183$) ve tümörün bölgesel lenf düğümlerine yayılımı (N) ($p=0.573$) arasında istatistiksel bir ilişki bulunamadı. Tez çalışmamızda da Ki-67 ile tümörün klinik evresi, histopatolojik derecesi ve lenf düğüm yayılımı ile istatistiksel bir ilişki bulunmamıştır. Ancak Ki-67 ekspresyonu ve yaş arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Çok sayıda çalışma, bu genin ifadesinin kolorektal kanser için kötü bir prognostik faktör olarak etkileri olduğunu göstermiştir. Kolorektal kanserde kötü prognostik faktör olarak $<25\%$ eşik değeri ile Ki-67 kullanmıştır[281]. Bununla birlikte, diğer birkaç çalışma, Ki-67 ekspresyonunun hayatta kalma süresini uzatan bir prognostik faktör olarak değerlendirmiştir. Kolorektal kanserde elde edilen Ki-67 ekspresyonunun diğer malignitelerden farkı hala iyi bilinmemektedir. Daha büyük datalarla yapılacak çalışmalarla Ki-67 ve prognostik faktörlerle ilişkisi araştırılmalıdır.

Sonuç olarak, Bcl-2, p53, p38, kaspaz-3, Ki-67, SOX-9 ve E-kaderin protein ekspresyon ilişkileri incelendiğinde analiz sonuçlarına göre, p 38 ile p 53, p38 ile bcl-2, SOX-9 ile p 53 arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönlü ilişki bulunmuştur. Protein ekspresyon ilişkilerinin incelenmesi; kanser oluşumu, prognozu gibi aşamalarda bu proteinlerin yolaklardaki birlikte etkilerinin ortaya konulmasında önemlidir.

TNM evrelemesi, tümör derinliği, tümör derecesi, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, tümör lokalizasyonu, yaş ve cinsiyet klinik parametreleri ile bcl-2, kaspaz-3, p53, p38, Ki-67, SOX-9 ve E-kaderin proteinlerinin prognostik değerini değerlendirmek için 46 kolon adenokanser vakası ile yaptığımız çalışmada; Ki-67 ekspresyonu ile yaş, E-kaderin ile tümör derecesi, p53 ile tümör derinliği arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur. G2 vakalarında, E-cadherin ekspresyonu $54,35\%$ ile en yüksek ekspresyon değerine sahiptir. Yüksek tümör

derecelerinde (G2/G3) E-kaderin düşük eksprese edilmiştir. Bu durum kolon kanser vakalarında kötü prognozla ilişkilendirilmiştir.

Çalışma bulgularımız E-kadeherin, p53 ve Ki-67 ekspresyonlarının kolon kanserinde prognostik önemi olduğunu ortaya koyarken, literatür desteklemiştir. Bcl-2, p38, kaspaz-3 ve SOX-9 protein ekspresyonlarının klinik parametrelerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak prognozu belirlemede yeterli olmayacakları ortaya konmuştur. Ancak kolon kanserinde bu proteinlerin prognostik öneme sahip olduğunu gösteren bir çok literatür bulgusu vardır. Niceliksel olarak daha büyük vaka grupları ile çalışma yapılması çalışılan proteinlerin kolon kanserindeki prognostik etki derecelerinin belirlenmesinde daha net bulgular elde edilebileceğini düşünmekteyiz.



5 KAYNAKLAR

- [1] Cancer Today[Internet].(2021),[cited 2021 Jun 30].Available from:<https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers> .
- [2] Stein ,A., Atanackovic, D., & Bokemeyer, C.(2011). Current standards and new trends in the primary treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 47 Suppl 3: S312-S314 [PMID: 21943995 [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(11\)70183-6](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(11)70183-6)] .
- [3] Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H.J., Lynch, H.T., Minsky, B., Nordlinger, B., &Starling N.(2010). Colorectal cancer. *Lancet*,375: 1030-1047.PMID:20304247 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60353-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60353-4).
- [4] Longley,C.,D.,B.,& Johnston, P.,G. (2005) .Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*,205: 275–292 (DOI: 10.1002/path.1706) <https://doi.org/10.1002/path.1706>.
- [5] Gong, J., Jaiswal, R., Mathys, J-M., Combes, V., Grau, G.,E.,R.,& Bebawy, M.(2012). Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance. *Cancer Treat Rev*, 38:226–34. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.06.005>
- [6] Baguley, B.,C. (2010).Multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol*,596:1-14. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-416-6_1.
- [7] Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.,B.,& Johnston,(2013). P.,G. *Cancer drug resistance: an evolving paradigm*. *Nat Rev Cancer*, 13: 714-726.PMID: 24060863 <https://doi.org/10.1038/nrc3599>.
- [8] Fojo,A., Hamilton, T.,C.,Young,R.,C.,&Ozols,R.,F.(1987). Multidrugresistance in ovarian cancer. *Cancer*,60:S2075–80. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19901015\)60](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19901015)60)
- [9] Gottesman, M.,M.,&Living, V.(2006). The moleculer basis of multi drug resistanace in cancer; the early years of P-glycoprotein research. *FEBS Lett*, 580:998-1009. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.060>.
- [10] Gottesman,M.,M.,Fojo,T.,&Bates,S.,E.(2002).Multidrugresistance in cancer: role of ATP-dependenttransporters. *Nat Rev Cancer* , 2:48–58.
- [11] Szakács,G.,Paterson,J.,K.,Ludwig,J.,A.,BoothGenthe,C.,&Gottesman,M.,M. (2006) . Targeting multidrugresistance in cancer. *Nat Rev DrugDiscov*, 5:219–34.
- [12] Longley, D.,B., Harkin, D.,P.,& Johnston, P.,G.(2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*,3:330–338.
- [13] Fiore, D., Proto, M. ,C., Pisanti, S., Picardi, P., Pagano Zottola, A. C., Butini, S., Gemma, S., Casagni, A., Laezza, C., Vitale, M., Ligresti, A., Di Marzo, V., Zisterer, D. M., Nathwani, S., Williams, D. C., Campiani, G., Gazzerro, P., & Bifulco, M. (2016). Antitumor effect of pyrrolo-1,5-benzoxazepine-15 and its

synergistic effect with Oxaliplatin and 5-FU in colorectal cancer cells. *Cancer biology & therapy*, 17(8), 849–858. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1078028>.

[14] Dongxing, C., Shaolan, Q., Mu y., & Ming,Z . (2017). The role of MRP1 in the multidrug resistance of colorectal cancer. *Oncology Letters*, 13: 2471-2476, <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5741>

[15] Morrow, C.,S., Peklak-Scott, C., Bishwokarma, B., Kute, T.,E., Smitherman, P.,K., & Townsend, A.,J. (2006). Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) mediates resistance to mitoxantrone via glutathione-dependent drug efflux. *Mol Pharmacol*, 69(4):1499-505. <https://doi.org/10.1124/mol.105.017988>

[16] Towsend, D.,M., & Tew KD.(2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47):7369-75 <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>

[17] Elsaleh, H., Powell, B., McCaul, K, Grieu, F., Grant, R., Joseph, D., & Lacopetta, B. (2001).P53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma.*Clin Cancer Res*, 7: 1343-1349.

[18] Liang, J.,T., Huang, K.,C., Cheng, Y.,M, Hsu, H-Y., Cheng, A-L., Hsu, C-H., Yeh, K-H., Wang, S-H., & Chang, K-J. (2002) . P53 overexpression predicts poor chemosensitivity to high-dose 5-fluorouracil plus leucovorin chemotherapy for stage IV colorectal cancers after palliative bowel resection. *Int J Cancer*, 97: 451-457. <https://doi.org/10.1002/ijc.1637>

[19] Ahnen, D.,J., Feigl, P., Quan, G., Feneoglio-Preiser, C., Lovata, L., C., Bunn, P., A., Stemmerman, G., Wells, J., D., Macdonald, J.,S., & Meyskens, Jr., F., L. (1998). Ki-ras mutation and p53overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res*,58: 1149-1158.

[20] Xu, R., Sato, N., Yanai, K.,, Akiyoshi, T., Naga,i S., Wada, J., Koga, K., Mibu, R., Nakamura, M., &Katano, M. (2009). Enhancement of paclitaxelinduced apoptosis by inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway in colon cancer cells. *Anticancer Res*, 29: 261-270..

[21] D.Markowitz, S., & M.Bertagnolli, M. (2009). Molecular Basis of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmra0804588>

[22] Duval, A., Collura, A., Berthenet, K., Lagrange, A., & Garrido, C. (2011). Microsatellite instability in colorectal cancer: time to stop hiding!. *Oncotarget*, 2(11), 826.

[23] Bastide, P., Darido, C., Pannequin, J., Kist, R., Robine, S., Marty-Double, C., ... & Jay, P. (2007). Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *The Journal of cell biology*, 178(4), 635-648.

[24] Malik, K., Goswami, L., Kothiyal, P., & Mukhopadhyay, S. (2012). A review on colon targeting drug delivery system: Novel approaches, anatomy and evaluation. *The pharma innovation*, 1(9, Part A), 1.

[25] Arifoğlu Y. Her Yönüyle Anatomi, 1. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2017:354-359.

- [26] Gövsa Gökmen F. Sistemik Anatomi. 1. Baskı. İzmir, İzmir Güven Kitabevi, 2008:493-506.
- [27] Chourasia, M. K., & Jain, S. K. (2003). Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *J Pharm Pharm Sci*, 6(1), 33-66.
- [28] Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>. Erişim Tarihi:15.02.2022.
- [29] https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf ANKARA 2021
- [30] Jemal A, Clegg LX, Ward E, et al. (2004) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer*;101(1):3-27.
- [31] Haggard, F. A., & Boushey, R. P. (2009). Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery*, 22(04), 191-197.
- [32] Ries, L. A. G., Melbert, D., Krapcho, M., Stinchcomb, D. G., Howlader, N., Horner, M. J., ... & Edwards, B. (2008). SEER cancer statistics review, 1975-2005. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2999. [32]
- [33] National Cancer Institute (US). Office of Cancer Communications. (1980). What you need to know about cancer of the skin (No. 80). Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health.
- [34] American Cancer Society. (2005). Colorectal cancer facts & figures special edition 2005. Atlanta: American Cancer Society.
- [35] O'Connell, J. B., Maggard, M. A., Liu, J. H., & Etzioni, D. A. (2003). Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. *The American surgeon*, 69(10), 866. [36] Saku, T., Hayashi, Y., Takahara, O., Matsuura, H., Tokunaga, M., Tokuoka, S., & Land, C. E. (1997). Salivary gland tumors among atomic bomb survivors, 1950 - 1987. *Cancer*, 79(8), 1465-1475.
- [36] O'Connell, J. B., Maggard, M. A., Livingston, E. H., & Cifford, K. Y. (2004). Colorectal cancer in the young. *The American journal of surgery*, 187(3), 343-348.
- [37] Janout, V., & Kollárová, H. (2001). Epidemiology of colorectal cancer. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae*, 5-10.
- [38] De Jong, A. E., Morreau, H., Nagengast, F. M., Mathus-Vliegen, E. M., Kleibeuker, J. H., Griffioen, G., ... & Vasen, H. F. (2005). Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *Official journal of the American College of Gastroenterology/ACG*, 100(1), 139-143.
- [39] Grande, M., Milito, G., Attinà, G. M., Cadeddu, F., Muzi, M. G., Nigro, C., ... & Farinon, A. M. (2008). Evaluation of clinical, laboratory and morphologic prognostic factors in colon cancer. *World journal of surgical oncology*, 6(1), 1-7.

- [40] Jackson- Thompson, J., Ahmed, F., German, R. R., Lai, S. M., & Friedman, C. (2006). Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998–2001. *Cancer*, 107(S5), 1103-1111.
- [41] Papadopoulos, N., Nicolaidis, N. C., Wei, Y. F., Ruben, S. M., Carter, K. C., Rosen, C. A., ... & Vogelstein, B. (1994). Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*, 263(5153), 1625-1629.
- [42] Wilmink, A. B. M. (1997). Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Diseases of the colon & rectum*, 40(4), 483-493.
- [43] Johnson, I. T., & Lund, E. K. (2007). Nutrition, obesity and colorectal cancer. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26(2), 161-181.
- [44] Willett, W. C. (2005). Diet and cancer: an evolving picture. *Jama*, 293(2), 233-234.
- [45] Larsson, S. C., & Wolk, A. (2006). Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta- analysis of prospective studies. *International journal of cancer*, 119(11), 2657-2664.
- [46] Santarelli, R. L., Pierre, F., & Corpet, D. E. (2008). Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and cancer*, 60(2), 131-144.
- [47] Kabat, G. C., Miller, A. B., Jain, M., & Rohan, T. E. (2007). A cohort study of dietary iron and heme iron intake and risk of colorectal cancer in women. *British journal of cancer*, 97(1), 118-122.
- [48] Sinha, R. (2002). An epidemiologic approach to studying heterocyclic amines. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 506, 197-204.
- [49] Bazensky, I., Shoobridge-Moran, C., & Yoder, L. H. (2007). Colorectal cancer: an overview of the epidemiology, risk factors symptoms, and screening guidelines. *Medsurg Nursing*, 16(1), 46.
- [50] Zisman AL, Nickolov A, Brand RE, Gorchow A, Roy HK. Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Arch Intern Med* 2006;166(6): 629–634
- [51] Botteri, E., Iodice, S., Raimondi, S., Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2008). Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 134(2), 388-395.
- [52] Pöschl, G., & Seitz, H. K. (2004). Alcohol and cancer. *Alcohol and alcoholism*, 39(3), 155-165.
- [53] Türkoğlu, A. (2010). Kolorektal kanserlerde prognostik faktörlerin belirlenmesi/Exploring the prognostic factors in colorectal cancer.
- [54] American Joint Committee on Cancer. Chapter 20 - Colon and Rectum. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017.
- [55] Popek, S., & Tsikitis, V. L. (2011). Neoadjuvant vs adjuvant pelvic radiotherapy for locally advanced rectal cancer: Which is superior?. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(7), 848.

- [56] Benson, A. 3., Schrag, D., Somerfield, M. R., Cohen, A. M., Figueredo, A. T., Flynn, P. J., ... & Haller, D. G. (2004). American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *Journal of clinical oncology*, 22(16), 3408-3419.
- [57] Kozovska, Z., Gabrisova, V., & Kucerova, L. (2014). Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(8), 911-916.
- [58] Gonzalez,R.,S (2022). WHO classification. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/colontumorwhoclassification.html>. Accessed August 20th, 2022.
- [59] Grem, J. L. (2000). 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Investigational new drugs*, 18(4), 299-313.
- [60] Rutman, R. J., Cantarow, A., & Paschkis, K. E. (1954). Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis: III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. *Cancer Research*, 14(2), 119-123.
- [61] Thomas, D. M., & Zalcborg, J. R. (1998). 5- Fluorouracil: A pharmacological paradigm in the use of cytotoxics. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 25(11), 887-895.
- [62] Noordhuis, P., Holwerda, U., Van der Wilt, C. L., Van Groeningen, C. J., Smid, K., Meijer, S., ... & Peters, G. J. (2004). 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Annals of oncology*, 15(7), 1025-1032.
- [63] Giacchetti, S., Perpoint, B., Zidani, R., Le Bail, N., Faggiuolo, R., Focan, C., ... & Levi, F. (2000). Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*, 18(1), 136-136.
- [64] Douillard, J., Cunningham, D., Roth, A. D., Navarro, M., James, R. D., Karasek, P., ... & Rougier, P. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *The Lancet*, 355(9209), 1041-1047.
- [65] Parker, W. B., & Cheng, Y. C. (1990). Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacology & therapeutics*, 48(3), 381-395.
- [66] Longley, D. B., Latif, T., Boyer, J., Allen, W. L., Maxwell, P. J., & Johnston, P. G. (2003, June). The interaction of thymidylate synthase expression with p53-regulated signaling pathways in tumor cells. In *Seminars in oncology* (Vol. 30, No. 3, pp. 3-9). WB Saunders.
- [67] He, Y. F., Wei, W., Zhang, X., Li, Y. H., Li, S., Wang, F. H., ... & Jiang, W. Q. (2008). Analysis of the DPYD gene implicated in 5- fluorouracil catabolism in Chinese cancer patients. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 33(3), 307-314.
- [68] Bruni, P., Minopoli, G., Brancaccio, T., Napolitano, M., Faraonio, R., Zambrano, N., ... & Russo, T. (2002). Fe65, a ligand of the Alzheimer's β -amyloid

precursor protein, blocks cell cycle progression by down-regulating thymidylate synthase expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35481-35488.

[69] Chernyshev, A., Fleischmann, T., & Kohen, A. (2007). Thymidyl biosynthesis enzymes as antibiotic targets. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(2), 282-289.

[70] Roberts, S. A., Hyatt, D. C., Honts, J. E., Changchien, L., Maley, G. F., Maley, F., & Montfort, W. R. (2006). Structure of the Y94F mutant of *Escherichia coli* thymidylate synthase. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 62(9), 840-843.

[71] Chan, J. Y., Phoo, M. S., Clement, M. V., Pervaiz, S., & Lee, S. C. (2008). Resveratrol displays converse dose-related effects on 5-fluorouracil-evoked colon cancer cell apoptosis: the roles of caspase-6 and p53. *Cancer biology & therapy*, 7(8), 1305-1312.

[72] Hwang, P. M., Bunz, F., Yu, J., Rago, C., Chan, T. A., Murphy, M. P., ... & Vogelstein, B. (2001). Erratum: Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells (*Nature Medicine* (2001) 7 (1111-1117)). *Nature medicine*, 7(11), 1255.

[73] Van Triest, B., Pinedo, H. M., Van Hensbergen, Y., Smid, K., Telleman, F., Schoenmakers, P. S., ... & Peters, G. J. (1999). Thymidylate synthase level as the main predictive parameter for sensitivity to 5-fluorouracil, but not for folate-based thymidylate synthase inhibitors, in 13 nonselected colon cancer cell lines. *Clinical Cancer Research*, 5(3), 643-654.

[74] Grem, J. L. (2005). Screening for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Clinical Cancer Research*, 11(14), 5067-5068.

[75] Violette, S., Poulain, L., Dussaulx, E., Pepin, D., Faussat, A. M., Chambaz, J., ... & Lesuffleur, T. (2002). Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-XL in addition to Bax and p53 status. *International journal of cancer*, 98(4), 498-504.

[76] Liu, R., Page, C., Beidler, D. R., Wicha, M. S., & Núñez, G. (1999). Overexpression of Bcl-xL promotes chemotherapy resistance of mammary tumors in a syngeneic mouse model. *The American journal of pathology*, 155(6), 1861-1867.

[77] Hwang, I. T., Chung, Y. M., Kim, J. J., Chung, J. S., Kim, B. S., Kim, H. J., ... & Do Yoo, Y. (2007). Drug resistance to 5-FU linked to reactive oxygen species modulator 1. *Biochemical and biophysical research communications*, 359(2), 304-310.

[78] Loo, T. W., & Clarke, D. M. (2005). Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *The Journal of membrane biology*, 206(3), 173-185.

[79] Gupta, S., & Gollapudi, S. (1993). P-glycoprotein (MDR 1 gene product) in cells of the immune system: its possible physiologic role and alteration in aging and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. *Journal of clinical immunology*, 13(5), 289-301.

- [80] Ludescher, C., Pall, G., Irschick, E. U., & Gastl, G. (1998). Differential activity of P-glycoprotein in normal blood lymphocyte subsets. *British journal of haematology*, 101(4), 722-727.
- [81] Puddu, P., Fais, S., Luciani, F., Gherardi, G., Dupuis, M. L., Romagnoli, G., ... & Gessani, S. (1999). Interferon-gamma up-regulates expression and activity of P-glycoprotein in human peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 79(10), 1299-1309.
- [82] Stavrovskaya, A. A., & Stromskaya, T. P. (2008). Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Moscow)*, 73(5), 592-604.
- [83] Suzuki, T., Nishio, K., & Tanabe, S. (2001). The MRP family and anticancer drug metabolism. *Current drug metabolism*, 2(4), 367-377.
- [84] Toyoda, Y., Hagiya, Y., Adachi, T., Hoshijima, K., Kuo, M. T., & Ishikawa, T. (2008). MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions. *Xenobiotica*, 38(7-8), 833-862.
- [85] Ishikawa, T., Wright, C. D., & Ishizuka, H. (1994). GS-X pump is functionally overexpressed in cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 29085-29093.
- [86] Avcu, F. (2008). Hematolojik Malignitelerde İlaç Direnç Mekanizmaları. *Türk Hematoloji Derneği Bülteni*, 3, 61-64.
- [87] Kuo, M. T., Bao, J. J., Curley, S. A., Ikeguchi, M., Johnston, D. A., & Ishikawa, T. (1996). Frequent coordinated overexpression of the MRP/GS-X pump and γ -glutamylcysteine synthetase genes in human colorectal cancers. *Cancer research*, 56(16), 3642-3644.
- [88] Kartenbeck, J., Leuschner, U., Mayer, R., & Keppler, D. (1996). Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology*, 23(5), 1061-1066.
- [89] Zelcer, N., Saeki, T., Reid, G., Beijnen, J. H., & Borst, P. (2001). Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3). *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 46400-46407.
- [90] Jedlitschky, G., Burchell, B., & Keppler, D. (2000). The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39), 30069-30074.
- [91] Chen, Z. S., Lee, K., & Kruh, G. D. (2001). Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17- β -D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33747-33754.
- [92] Guo, Y., Kotova, E., Chen, Z. S., Lee, K., Hopper-Borge, E., Belinsky, M. G., & Kruh, G. D. (2003). MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2', 3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl) adenine. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29509-29514.

- [93] Kool, M., Linden, M. V. D., De Haas, M., Baas, F., & Borst, P. (1999). Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Research*, 59(1), 175-182.
- [94] Kurz, E. U., Cole, S. P., & Deeley, R. G. (2001). Identification of DNA–protein interactions in the 5' flanking and 5' untranslated regions of the human multidrug resistance protein (MRP1) gene: evaluation of a putative antioxidant response element/AP-1 binding site. *Biochemical and biophysical research communications*, 285(4), 981-990.
- [95] Takayanagi, S. I., Kataoka, T., Ohara, O., Oishi, M., Kuo, M. T., & Ishikawa, T. (2004). Human ATP-binding cassette transporter ABCC10: expression profile and p53-dependent upregulation. *Journal of experimental therapeutics & oncology*, 4(3).
- [96] Bera, T. K., Iavarone, C., Kumar, V., Lee, S., Lee, B., & Pastan, I. (2002). MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), 6997-7002.
- [97] Tammur, J., Prades, C., Arnould, I., Rzhetsky, A., Hutchinson, A., Adachi, M., ... & Allikmets, R. (2001). Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. *Gene*, 273(1), 89-96.
- [98] Shimizu, H., Taniguchi, H., Hippo, Y., Hayashizaki, Y., Aburatani, H., & Ishikawa, T. (2003). Characterization of the mouse Abcc12 gene and its transcript encoding an ATP-binding cassette transporter, an orthologue of human ABCC12. *Gene*, 310, 17-28.
- [99] Chatterjee, A., & Gupta, S. (2018). The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer letters*, 433, 33-42.
- [100] Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 45(1), 51-88.
- [101] Zhang, J., Grek, C., Ye, Z. W., Manevich, Y., Tew, K. D., & Townsend, D. M. (2014). Pleiotropic functions of glutathione S-transferase P. In *Advances in cancer research* (Vol. 122, pp. 143-175). Academic Press.
- [102] Kural, C., Kocdogan, A. K., Şimşek, G. G., Oğuztüzün, S., Kaygın, P., Yılmaz, I., ... & Izci, Y. (2019). Glutathione S-Transferases and Cytochrome P450 enzyme expression in patients with intracranial tumors: Preliminary report of 55 patients. *Medical Principles and Practice*, 28(1), 56-62.
- [103] Tew, K. D., & Townsend, D. M. (2011). Regulatory functions of glutathione S-transferase P1-1 unrelated to detoxification. *Drug metabolism reviews*, 43(2), 179-193.
- [104] Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S. Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K. D., ... & Ronai, Z. E. (1999). Regulation of JNK signaling by GSTp. *The EMBO journal*, 18(5), 1321-1334.
- [105] Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Eberini, I., Salmona, M., ... & Ghezzi, P. (2002). Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins

in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3505-3510.

[106] Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug metabolism reviews*, 43(2), 138-151.

[107] Kilili, K. G., Atanassova, N., Vardanyan, A., Clatot, N., Al-Sabarna, K., Kanellopoulos, P. N., ... & Kampranis, S. C. (2004). Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 24540-24551.

[108] Reinemer, P., Dirr, H. W., Ladenstein, R., Schäffer, J., Gallay, O., & Huber, R. (1991). The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *The EMBO Journal*, 10(8), 1997-2005.

[109] Atkinson, H. J., & Babbitt, P. C. (2009). Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry*, 48(46), 11108-11116.

[110] Li, J., Xia, Z., & Ding, J. (2005). Thioredoxin-like domain of human κ class glutathione transferase reveals sequence homology and structure similarity to the θ class enzyme. *Protein science*, 14(9), 2361-2369.

[111] Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermini, L. S., Schulte, G. K., ... & Pandit, J. (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24798-24806.

[112] Wilce, M. C., & Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1205(1), 1-18.

[113] Coles, B. F., & Kadlubar, F. F. (2005). Human alpha class glutathione S-transferases: genetic polymorphism, expression, and susceptibility to disease. *Methods in enzymology*, 401, 9-42.

[114] Laborde, E. (2010). Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell death & differentiation*, 17(9), 1373-1380.

[115] Johansson, A. S., & Mannervik, B. (2001). Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *Journal of biological chemistry*, 276(35), 33061-33065.

[116] van de Wetering, C., Elko, E., Berg, M., Schiffers, C. H., Stylianidis, V., van den Berge, M., ... & Reynaert, N. L. (2021). Glutathione S-transferases and their implications in the lung diseases asthma and chronic obstructive pulmonary disease: Early life susceptibility?. *Redox Biology*, 43, 101995.

[117] Henderson, C. J., & Wolf, C. R. (2005). Disruption of the glutathione transferase pi class genes. *Methods in enzymology*, 401, 116-135. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01007-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01007-4)

- [118] Board, P. G., Webb, G. C., & Coggan, M. (1989). Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Annals of human genetics*, 53(3), 205-213. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1989.tb01786.x>
- [119] Cowell, I. G., Dixon, K. H., Pemble, S. E., Ketterer, B., & Taylor, J. B. (1988). The structure of the human glutathione S-transferase π gene. *Biochemical Journal*, 255(1), 79-83. <https://doi.org/10.1042/bj2550079>
- [120] Fryer, A. A., Hume, R., & Strange, R. C. (1986). The development of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase activities in human lung. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 883(3), 448-453. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(86\)90283-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(86)90283-7)
- [121] Wang, T., Arifoglu, P., Ronai, Z. E., & Tew, K. D. (2001). Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 20999-21003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101355200>
- [122] Elsby, R., Kitteringham, N. R., Goldring, C. E., Lovatt, C. A., Chamberlain, M., Henderson, C. J., ... & Park, B. K. (2003). Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling in mice lacking glutathione S-transferase Pi. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 22243-22249. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301211200>
- [123] Wu, Y., Fan, Y., Xue, B., Luo, L., Shen, J., Zhang, S., ... & Yin, Z. (2006). Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals. *Oncogene*, 25(42), 5787-5800.
- [124] Townsend, D. M., Manevich, Y., He, L., Hutchens, S., Pazoles, C. J., & Tew, K. D. (2009). Novel Role for Glutathione S-Transferase π : Regulator of protein s-glutathionylation following oxidative and nitrosative stress. *Journal of biological chemistry*, 284(1), 436-445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805586200>
- [125] Pearson, W. R., Vorachek, S. J., Berger, X. R., Hart, I., Vannalls, D. (1993) Identification of class-mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *Am. J. Human Genetics*, 53(1), 220-233.
- [126] Ross, W. L., Board, P. G., Webb, G. C. (1993). Chromosomal mapping of the human Mu class Glutathione S-transferases to 1p13. *Genomics* 18(1) 87-91.
- [127] Ketterer, B., Harris, J. M., Talaska, G., Meyer, D. J., Pemble, S. E., Taylor, J. B. (1992) The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ. Health Perspect*, 98, 87-94.
- [128] Cho, S. G., Lee, Y. H., Park, H. S., Ryoo, K., Kang, K. W., Park, J., ... & Choi, E. J. (2001). Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12749-12755. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005561200>
- [129] Whitebread, A. K., Tetlow, N., Eyre, H. J., Sutherland, G. R., Board, P. G. (2003). Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphism. *Pharmacogenetics*, 13 (3), 131-144. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq031>
- [130] Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Eastal, S., Jermini, L. S., Schulte, G. K., ... & Pandit, J. (2000). Identification, characterization, and crystal

structure of the Omega class glutathione transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24798-24806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001706200>

[131] Mukherjee, B., Salavaggione, O. E., Pelleymounter, L. L., Moon, I., Eckloff, B. W., Schaid, D. J., ... & Weinshilboum, R. M. (2006). Glutathione S-transferase omega 1 and omega 2 pharmacogenomics. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(7), 1237-1246. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.009613>

[132] Dulhunty, A., Gage, P., Curtis, S., Chelvanayagam, G., & Board, P. (2001). The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3319-3323. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007874200>

[133] Menon, D., & Board, P. G. (2013). A role for glutathione transferase Omega 1 (GSTO1-1) in the glutathionylation cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 288(36), 25769-25779. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.487785>

[134] Kodym, R., Calkins, P., & Story, M. (1999). The Cloning and Characterization of a New Stress Response Protein: A MAMMALIAN MEMBER OF A FAMILY OF θ CLASS GLUTATHIONES-TRANSFERASE-LIKE PROTEINS. *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), 5131-5137. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.8.5131>

[135] Piaggi, S., Raggi, C., Corti, A., Pitzalis, E., Mascherpa, M. C., Saviozzi, M., ... & Casini, A. F. (2010). Glutathione transferase omega 1-1 (GSTO1-1) plays an anti-apoptotic role in cell resistance to cisplatin toxicity. *Carcinogenesis*, 31(5), 804-811. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101995>

[136] Simic, T., Savic-Radojevic, A., Pljesa-Ercegovac, M., Matic, M., & Mimic-Oka, J. (2009). Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nature reviews urology*, 6(5), 281-289. doi:10.1038/nrurol.2009.49

[137] de Bruin, W. C., Wagenmans, M. J., & Peters, W. H. (2000). Expression of Glutathione S-Transfer α , P1-1 and T1-1 in the Human Gastrointestinal Tract. *Japanese journal of cancer research*, 91(3), 310-316. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2000.tb00946.x>

[138] Butler, M. W., Hackett, N. R., Salit, J., Strulovici-Barel, Y., Omberg, L., Mezey, J., & Crystal, R. G. (2011). Glutathione S-transferase copy number variation alters lung gene expression. *European Respiratory Journal*, 38(1), 15-28. <https://doi.org/0.1183/09031936.00029210>

[139] Webb, G., Vaska, V., Coggan, M., & Board, P. (1996). Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1). *Genomics*, 33(1), 121-123. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0167>

[140] Tan, K. L., Webb, G. C., Baker, R. T., & Board, P. G. (1995). Molecular cloning of a cDNA and chromosomal localization of a human theta-class glutathione S-transferase gene (GSTT2) to chromosome 22. *Genomics*, 25(2), 381-387. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80037-M](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80037-M)

[141] Josephy, P. D., Kent, M., & Mannervik, B. (2009). Single-nucleotide polymorphic variants of human glutathione transferase T1-1 differ in stability and functional properties. *Archives of biochemistry and biophysics*, 490(1), 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.07.025>

- [142] Meyer, D. J., Coles, B., Pemble, S. E., Gilmore, K. S., Fraser, G. M., & Ketterer, B. (1991). Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochemical Journal*, 274(2), 409-414. <https://doi.org/10.1042/bj2740409>
- [143] Wiencke, J.K., Pemble, S., Ketterer, B., Kelsey, K.T..(1995). Gene deletion of glutathione S-transferase theta: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 4(3), 253-259.
- [144] Brasch-Andersen, C., Christiansen, L., Tan, Q., Haagerup, A., Vestbo, J., Kruse, T.A. (2004). Possible gene dosage effect of glutathione S-transferases on atopic asthma: using real-time PCR for quantification of GSTM1 AND GSTT1 gene copy numbers. *Human Mutation*, 24(3), 208-214.
- [145] Pemble, S., Schroeder, K. R., Spencer, S. R., Meyer, D. J., Hallier, E., Bolt, H. M., ... & Taylor, J. B. (1994). Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochemical Journal*, 300(1), 271-276. <https://doi.org/10.1042/bj3000271>
- [146] Seidegård, J., Vorachek, W. R., Pero, R. W., & Pearson, W. (1988). Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(19), 7293-7297. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.19.7293>
- [147] Joseph, T., Kusumakumary, P., Chacko, P., Abraham, A., Radhakrishna Pillai, M. (2004). Genetic polymorphism of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTT1 and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Indian children. *Pediatric Blood Cancer*, 43(5), 355-361.
- [148] Flanagan, J. U., Rossjohn, J., Parker, M. W., Board, P. G., & Chelvanayagam, G. (1999). Mutagenic analysis of conserved arginine residues in and around the novel sulfate binding pocket of the human Theta class glutathione transferase T2-2. *Protein Science*, 8(10), 2205-2212.
- [149] Board, P. G., & Anders, M. W. (2005). Human glutathione transferase zeta. *Methods in enzymology*, 401, 61-77. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01004-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01004-9)
- [150] Blackburn, A.C., Woollatt, E., Sutherland, G.R., Board, P.G. (1998). Characterization and chromosome location of the gene GSTZ1 encoding the human Zeta class glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase. *Cytogenet Cell Genetics*, 83(1-2), 109-114.
- [151] Fernandez-Canon, J.M., Baetscher, M.W., Finegold, M., Burlingame, T., Gibson, K.M., Grompe, M. (2002). Maleylacetoacetate isomerase (MAAI/GSTZ)-deficient mice reveal a glutathione-dependent nonenzymatic bypass in tyrosine catabolism. *Molecular Cell Biology*, 22(13), 1943-4951.
- [152] Tong, Z., Board, P. G., & Anders, M. W. (1998). Glutathione transferase zeta catalyses the oxygenation of the carcinogen dichloroacetic acid to glyoxylic acid. *Biochemical Journal*, 331(2), 371-374. <https://doi.org/10.1042/bj3310371>
- [153] Anderson, W.B., Board, P.G., Anders, M.W. (2004). Glutathione transferase zeta-catalyzed bioactivation of dichloroacetic acid: reaction of glyoxylate with amino acid nucleophiles. *Chemical Research in Toxicology*, 17(5), 650-662.

- [154] Pearson, W. R. (2005). Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods in enzymology*, 401, 186-204. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01012-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01012-8)
- [155] Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., ... & Hayaishi, O. (1997). Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin synthase. *Cell*, 90(6), 1085-1095. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80374-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80374-8)
- [156] Jowsey, I. R., Thomson, A. M., Flanagan, J. U., Murdock, P. R., Moore, G. B., Meyer, D. J., ... & Hayes, J. D. (2001). Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D2 synthases. *Biochemical Journal*, 359(3), 507-516. <https://doi.org/10.1042/bj3590507>
- [157] Kural, C., Oguztuzun, S., Şimşek, G. G., Guresci, S., Kaygın, P., Yasar, S., & Izci, Y. (2019). Expression of Sigma-Class Glutathione-S-Transferase in Fetal and Pediatric Filum Terminale Samples: A Comparative Study. *Medicina*, 55(5), 133.
- [158] Rotter, V., & Prokocimer, M. (1991). p53 and human malignancies. *Advances in cancer research*, 57, 257-272..
- [159] Hsieh, J. S., Lin, S. R., Chang, M. Y., Chen, F. M., Lu, C. Y., Huang, T. J., ... & Wang, J. Y. (2005). APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation to clinicopathologic features and postoperative surveillance. *The American Surgeon*, 71(4), 336-343..
- [160] Yildirim, M., Suren, D., Goktas, S., Dilli, U. D., Kaya, C., Copuroglu, R., ... & Sezer, C. (2012). The predictive role of Bcl-2 expression in operable locally advanced or metastatic gastric carcinoma. *J BUON*, 17(1), 106-9.
- [161] Menezes, H. L. D., Jucá, M. J., Gomes, E. G. D. A., Nunes, B. L., Costa, H. O., & Matos, D. (2010). Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors. *Arquivos de gastroenterologia*, 47, 141-147. [162] Boyer, T. D. (1989). The glutathione S-transferases: an update. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 9(3), 486-496.
- [162] Shi, Y., & Gaestel, M. (2002). In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance.
- [163] Ono, K., & Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway activation and function. *Cellular signalling*, 12(1), 1-13.
- [164] Deacon, K., Mistry, P., Chernoff, J., Blank, J. L., & Patel, R. (2003). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. *Molecular biology of the cell*, 14(5), 2071-2087.
- [165] Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- [166] McArthur, K., & Kile, B. T. (2018). Apoptotic caspases: multiple or mistaken identities?. *Trends in cell biology*, 28(6), 475-493. [166]

- [167] Wilson, C. H., & Kumar, S. (2018). Caspases in metabolic disease and their therapeutic potential. *Cell Death & Differentiation*, 25(6), 1010-1024.
- [168] Crawford, E. D., & Wells, J. A. (2011). Caspase substrates and cellular remodeling. *Annual review of biochemistry*, 80, 1055-1087.
- [169] Walters, J., Pop, C., Scott, F. L., Drag, M., Swartz, P., Mattos, C., ... & Clark, A. C. (2009). A constitutively active and uninhibitable caspase-3 zymogen efficiently induces apoptosis. *Biochemical Journal*, 424(3), 335-345.
- [170] Tait, S. W., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(9), 621-632.
- [171] Schwab, U., Stein, H., Gerdes, J., Lemke, H., Kirchner, H., Schaadt, M., & Diehl, V. (1982). Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature*, 299(5878), 65-67..
- [172] Schlüter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M. H., Key, G., Flad, H. D., & Gerdes, J. (1993). The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *The Journal of cell biology*, 123(3), 513-522.
- [173] Schmidt, M. H., Broll, R., Bruch, H. P., Bögler, O., & Duchrow, M. (2003). The proliferation marker pKi- 67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and cyclin B. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 199(1), 18-27.
- [174] De Azambuja, E., Cardoso, F., de Castro, G., Colozza, M., Mano, M. S., Durbecq, V., ... & Paesmans, M. (2007). Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *British journal of cancer*, 96(10), 1504-1513.
- [175] Jones, R. L., Salter, J., A'Hern, R., Nerurkar, A., Parton, M., Reis-Filho, J. S., ... & Dowsett, M. (2009). The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 116(1), 53-68.
- [176] Zhao, W. Y., Xu, J., Wang, M., Zhang, Z. Z., Tu, L., Wang, C. J., ... & Cao, H. (2014). Prognostic value of Ki67 index in gastrointestinal stromal tumors. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(5), 2298.
- [177] Yamaguchi, T., Fujimori, T., Tomita, S., Ichikawa, K., Mitomi, H., Ohno, K., ... & Kato, H. (2013). Clinical validation of the gastrointestinal NET grading system: Ki67 index criteria of the WHO 2010 classification is appropriate to predict metastasis or recurrence. *Diagnostic pathology*, 8(1), 1-7.
- [178] Pollack, A., DeSilvio, M., Khor, L. Y., Li, R., Al-Saleem, T. I., Hammond, M. E., ... & Sandler, H. M. (2004). Ki-67 staining is a strong predictor of distant metastasis and mortality for men with prostate cancer treated with radiotherapy plus androgen deprivation: Radiation Therapy Oncology Group Trial 92-02. *Journal of clinical oncology*, 22(11), 2133-2140.

- [179] Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H. E. I. N. Z., Wacker, H. H., Schwab, U., & Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The journal of immunology*, 133(4), 1710-1715.
- [180] Lucy A. Peipins, Robert S. Sandler, *Epidemiology of Colorectal Adenomas*, *Epidemiologic Reviews*, Volume 16, Issue 2, 1994, Pages 273–297, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036>
- [181] Porschen, R., Lohe, B., Hengels, K. J., & Borchard, F. (1989). Assessment of cell proliferation in colorectal carcinomas using the monoclonal antibody Ki- 67. Correlation with pathohistologic criteria and influence of irradiation. *Cancer*, 64(12), 2501-2505.
- [182] Salminen, E., Palmu, S., Vahlberg, T., Roberts, P. J., & Söderström, K. O. (2005). Increased proliferation activity measured by immunoreactive Ki67 is associated with survival improvement in rectal/recto sigmoid cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(21), 3245.
- [183] Reimers, M. S., Zeestraten, E. C., van Alphen, T. C., Dekker, J. W. T., Putter, H., Saadatmand, S., ... & Kuppen, P. J. (2014). Combined analysis of biomarkers of proliferation and apoptosis in colon cancer: an immunohistochemistry-based study using tissue microarray. *International journal of colorectal disease*, 29(9), 1043-1052.
- [184] Olbromski, M., Podhorska-Okolów, M., & Dzięgiel, P. (2020). Role of SOX protein groups F and H in lung cancer progression. *Cancers*, 12(11), 3235.
- [185] Olbromski, M., Podhorska-Okolów, M., & Dzięgiel, P. (2020). Role of SOX protein groups F and H in lung cancer progression. *Cancers*, 12(11), 3235.
- [186] R. Lovell-Badge, The early history of the Sox genes, *Int J. Biochem. Cell Biol.* 42 (3) (2010) 378–380..
- [187] Lovell-Badge, R. (2010). The early history of the Sox genes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(3), 378-380.
- [188] Kumar, P., & Mistri, T. K. (2020, December). Transcription factors in SOX family: Potent regulators for cancer initiation and development in the human body. *In Seminars in cancer biology* (Vol. 67, pp. 105-113). Academic Press.
- [189] Williams, C. A., Soufi, A., & Pollard, S. M. (2020, December). Post-translational modification of SOX family proteins: Key biochemical targets in cancer?. *In Seminars in cancer biology* (Vol. 67, pp. 30-38). Academic Press.
- [190] Kamachi, Y., & Kondoh, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development*, 140(20), 4129-4144.
- [191] M. Ashrafizadeh, A. Zarrabi, S. Orouei, A. Zabolian, H. Saleki, N. Azami, A. K. Bejandi, S. Mirzaei, M.N. Janaghard, K. Hushmandi, N. Nabavi, B. Baradaran, A.P. Kumar, P. Makvandi, S. Samarghandian, H. Khan, M.R. Hamblin, Interplay between SOX9 transcription factor and microRNAs in cancer, *Int. J. Biol. Macromol.* 183 (2021) 681–694..].

- [192] Zhu, Y., Li, Y., Wei, J., & Liu, X. (2012). The role of Sox genes in lung morphogenesis and cancer. *International journal of molecular sciences*, 13(12), 15767-15783.
- [193] Castillo, S. D., & Sanchez-Cespedes, M. (2012). The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(9), 903-919.
- [194] de la Rocha, A. M. A., Sampron, N., Alonso, M. M., & Matheu, A. (2014). Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *American journal of cancer research*, 4(4), 312.
- [195] Abadi, A. J., Zarrabi, A., Hashemi, F., Zabolian, A., Najafi, M., Entezari, M., ... & Hamblin, M. R. (2021). The role of SOX family transcription factors in gastric cancer. *International journal of biological macromolecules*, 180, 608-624.
- [196] Ashrafizadeh, M., Taeb, S., Hushmandi, K., Orouei, S., Shahinozaman, M., Zabolian, A., ... & Najafi, M. (2020). Cancer and SOX proteins: new insight into their role in ovarian cancer progression/inhibition. *Pharmacological research*, 161, 105159.
- [197] Mehta, G. A., Khanna, P., & Gatza, M. L. (2019). Emerging role of SOX proteins in breast Cancer development and maintenance. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 24(3), 213-230.
- [198] Takeichi, M. (2014). Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(6), 397-410.
- [199] Harris, T. J., & Tepass, U. (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(7), 502-514.
- [200] Rudini, N., & Dejana, E. (2008). Adherens junctions. *Current Biology*, 18(23), R1080-R1082.
- [201] Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(1), 7-34.
- [202] Yaeger, R., Chatila, W. K., Lipsyc, M. D., Hechtman, J. F., Cercek, A., Sanchez-Vega, F., ... & Schultz, N. (2018). Clinical sequencing defines the genomic landscape of metastatic colorectal cancer. *Cancer cell*, 33(1), 125-136.
- [203] Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., Van Wichen, D., De Weger, R., Kinzler, K. W., ... & Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science*, 275(5307), 1784-1787. Ayoub, M. S. E. D., El-Shafei, M. M., Elias, W. Y., & El-kammar, H. A. (2018). Immunohistochemical evaluation of CD44 expression in mucoepidermoid carcinoma of human salivary glands. *Future Dental Journal*, 4(2), 197-204.
- [204] Clevers, H. (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469-480.
- [205] Huels, D. J., Ridgway, R. A., Radulescu, S., Leushacke, M., Campbell, A. D., Biswas, S., ... & Sansom, O. J. (2015). E-cadherin can limit the transforming properties of activating β -catenin mutations. *The EMBO journal*, 34(18), 2321-2333.

- [206] Irby, R. B., Malek, R. L., Bloom, G., Tsai, J., Letwin, N., Frank, B. C., ... & Lee, N. H. (2005). Iterative microarray and RNA interference–based interrogation of the Src-induced invasive phenotype. *Cancer research*, 65(5), 1814-1821.
- [207] Cordero, J. B., Ridgway, R. A., Valeri, N., Nixon, C., Frame, M. C., Muller, W. J., ... & Sansom, O. J. (2014). c- Src drives intestinal regeneration and transformation. *The EMBO journal*, 33(13), 1474-1491.
- [208] Zhang, B., Wang, J., Wang, X., Zhu, J., Liu, Q., Shi, Z., ... & Liebler, D. C. (2014). Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 513(7518), 382-387..
- [209] Christou, N., Perraud, A., Blondy, S., Jauberteau, M. O., Battu, S., & Mathonnet, M. (2017). E- cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncology letters*, 13(6), 4571-4576.
- [210] Ciftci, H., TÜRK, M., TAMER, U., Karahan, S., & Menemen, Y. (2013). Silver nanoparticles: cytotoxic, apoptotic, and necrotic effects on MCF-7 cells. *Turkish Journal of Biology*, 37(5), 573-581.
- [211] Van Staveren, W. C., Solís, D. Y., Hébrant, A., Detours, V., Dumont, J. E., & Maenhaut, C. (2009). Human Cancer Cell Lines: Experimental Models for Cancer Cells in Situ? For Cancer Stem Cells? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1795, 92-103. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.12.004>
- [212] Nakatsu, N., Yoshida, Y., Yamazaki, K., Nakamura, T., Dan, S., Fukui, Y., & Yamori, T. (2005). Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays. *Molecular Cancer Neuro Therapy*, 4(3), 399-412 <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0234>
- [213] Bahrami, A., Amerizadeh, F., Hassanian, S., M., ShahidSales, S., Khazaei, M., Maftauh, M., GhayourMobarhan, M., Ferns, G. A., & Avan, A. (2018). Genetic variants as potential predictive biomarkers in advanced colorectal cancer patients treated with oxaliplatin- based chemotherapy. *Journal of Cellular Physiology*, 233(3), 2193-2201. <https://doi.org/10.1002/jcp.25966>
- [214] Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe J-P., Tong, F., Speed, T., Spellman, T. S., De Vries, S., Lapuk, A., Wang, N. J., Kuo, W-L., Stilwell, J. L., Pinkel, D., Albertson, D. G., Waldman, F. M., McCormick, F., Dickson, R. B., Johnson, M. D., Lippman, M., Etheir, S., Gazdar, A., & Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10(6), 515–527. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008>
- [215] Nita, E. M., Nagawa, H., Tominaga, O. Tsuno, N., Fuji, S., Sasaki, S., Fu, C. G., Takenoue, T., Tsuruo, T., & Muto, T. (1998). 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *British Journal of Cancer*, 78(8), 986–992. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.617>
- [216] Choi, J. H., Yoon, J. S., Won, Y. W., Park, B. B., & Lee, Y. Y. (2012). Chloroquine enhances the chemotherapeutic activity of 5-fluorouracil in a colon cancer cell line via cell cycle alteration. *Acta Pathologica, Microbiologica, et*

Immunologica Scandinavica, 120(7), 597-604. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02876.x>

[217] Fiore, D., Proto, M. C., Pisanti, S., Picardi, P., Pagano Zottola, A. C., Butini, S., Gemma, S., Casagni, A., Laezza, C., Vitale, M., Ligresti, A., Di Marzo, V., Zisterer, D. M., Nathwani, S., Williams, D. C., Campiani, G., Gazzerro, P., & Bifulco, M. (2016). Antitumor effect of pyrrolo-1,5-benzoxazepine-15 and its synergistic effect with Oxaliplatin and 5-FU in colorectal cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 17(8), 849–858. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1078028>

[218] Gong, R. H., Yang, D. J., Kwan, H. Y., Lyu, A. P., Chen, G. Q., & Bian, Z. X. (2022). Cell death mechanisms induced by synergistic effects of halofuginone and artemisinin in colorectal cancer cells. *International Journal of Medical Sciences*, 19(1), 175-185. <https://doi.org/10.7150/ijms.66737>

[219] Yang, S. Y., Miah, A., Sales, K. M., Fuller, B., Seifalian, A. M. & Winslet, M. (2011). Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitises human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment. *International Journal of Oncology*, 38, 1695-1702. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.982>

[220] Violette, S., Poulain, L., Dussaulx, E., Pepin, D., Faussat, A-M., Chambazı J., Lacorte, J-M., Staedel, C., & Lesuffleur, T. (2002). Resistance of colon cancer cells to long-term 5-Fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-XL in addition to bax and P53 status. *International Journal of Cancer*, 98(4), 498–504. <https://doi.org/10.1002/ijc.10146>

[221] Gong, J., Jaiswal, R., Mathys, J-M., Combes, V., Grau, G. E. R., & Bebawy, M. (2012). Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance. *Cancer Treatment Reviews*, 38, 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.06.005>

[222] Ghafouri-Fard, S., Abak, A., TondroAnamag, F., Shoorei, H., Fattahi, F., Javadinia, S. A., Basiri, A., & Taheri, M. (2021). 5-Fluorouracil: A narrative review on the role of regulatory mechanisms in driving resistance to this chemotherapeutic agent. *Frontiers in Oncology*, 11, 658-636. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.658636>

[223] Reipsch, F., Biersack, B., Lucas, H., Schobert, R., & Mueller, T. (2021). Imidazole analogs of vascular disrupting combretastatin A-4 with pleiotropic efficacy against resistant colorectal cancer models. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13082. <https://doi.org/10.3390/ijms222313082>.

[224] Namwat, N., Amimanan, P., Loilome, W., Jearanaikoon, P., Sripa, B., Bhudhisawasdi, V., & Tassaneeyakul, W. (2008). Characterization of 5-Fluorouracil-Resistant cholangiocarcinoma cell lines. *Chemotherapy*, 54, 343-351. <https://doi.org/10.1159/000151541>

[225] Jung, J. H., Taniguchi, K., Min Lee, H., Young Lee, M., Bandu, R., Komura, K., Yeon Lee, K., Akao, Y., & Pyo Kim, K. (2020). Comparative lipidomics of 5-Fluorouracil-sensitive and -resistant colorectal cancer cells reveals altered sphingomyelin and ceramide controlled by acid sphingomyelinase (SMPD1). *International Journal of Scientific Reports*, 10, 6124. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62823-0>

- [226] Sau, A., Pellizzari Tregno, F., Valentino, F., Federici, G., & Caccuri, A. M. (2010). Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Archives Biochemistry Biophys*, 500(2), 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.012>
- [227] Yasemin, A. (2010). Kanserde ilaç direncinin üstesinden gelmenin yolları: Yeni ilaçların tasarımı. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 30(6), 2011-2016. <https://doi.org/10.5336/medsci.2010-21607>
- [228] Laborde, E. (2010). Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ*, 17, 1373–1380. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.80>
- [229] Zhang, R., Ah Kang, K., Piao, M. J., Kim, K. C., Zheng, J., Wen Yao, C., Cha, J. W. Hee Maeng, Y., Young Chang, W., Moon, P-G., Baek, M-C., & Won Hyun, J. (2014). Epigenetic alterations are involved in the overexpression of glutathione S-transferase π -1 in human colorectal cancers. *International Journal of Oncology*, 45(3), 1275-1283. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014>.
- [230] Very, N., Lefebvre, T., & El Yazidi-Belkoura, I. (2017). Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(1), 1380-1402. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22377>.
- [231] Dang, D. T., Chen, F., Kohli, M., Rago, C., Cummins, J. M., & Dang, L. H. (2005). Glutathione S-transferase pi1 promotes tumorigenicity in HCT116 human colon cancer cells. *Cancer Research*, 65(20), 9485-9494. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1930>
- [232] Chao, C. C., Huang, Y. T., Ma, C. M., Chou, W. Y., & Lin-Chao, S. (1992). Overexpression of glutathione S-transferase and elevation of thiol pools in a multidrug-resistant human colon cancer cell line. *Molecular Pharmacology*, 41(1), 69-75.
- [233] Hoban, P. R., Robson, C. N., Davies, S. M., Hall, A. G., Cattan, A. R., Hickson, I. D., & Harris, A. L. (1992). Reduced topoisomerase II and elevated alpha class glutathione S-transferase expression in a multidrug resistant CHO cell line highly cross-resistant to mitomycin C. *Biochemical Pharmacology* 43(4), 685-93. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90231-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90231-7)
- [234] Yang, Y., Huycke, M. M., Herman, T. S., & Wang X. (2016). Glutathione S-transferase alpha 4 induction by activator protein 1 in colorectal cancer. *Oncogene*, 35(44), 5795-5806. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.113>.
- [235] Molecular Biomarkers in the Personalized Treatment of Colorectal Cancer. (2016). *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.02.008>
- [236] JMWatson, A. (2004). Apoptosis and colorectal cancer. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.052704>
- [237] Koornstra, J. J., De Jong, S., Hollema, H., De Vries, E. G. E., & Kleibeuker, J. H. (2003). Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature. *Critical reviews in oncology/hematology*, 45(1), 37-53.

- [238] Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 6(11), 1028-1042.
- [239] Kunac, N., Šundov, Ž., & Vilović, K. (2019). Apoptosis as a prognostic factor in colorectal carcinoma: comparison of TUNEL method and immunohistochemical expression of Caspase-3. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 27(3), e22-e27.
- [240] Ahmed, S. F., Bernaba, C. N., & Muhammad, E. (2022). Immunohistochemical Expression of Caspase-3 in Colorectal Carcinoma. *SVU-International Journal of Medical Sciences*, 5(1), 240-251.
- [241] Dawson, H., Koelzer, V. H., Karamitopoulou, E., Economou, M., Hammer, C., Muller, D. E., ... & Zlobec, I. (2014). The apoptotic and proliferation rate of tumour budding cells in colorectal cancer outlines a heterogeneous population of cells with various impacts on clinical outcome. *Histopathology*, 64(4), 577-584.
- [242] Flanagan, L., Meyer, M., Fay, J., Curry, S., Bacon, O., Duessmann, H., ... & Prehn, J. H. (2016). Low levels of Caspase-3 predict favourable response to 5FU-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: Caspase-3 inhibition as a therapeutic approach. *Cell death & disease*, 7(2), e2087-e2087.
- [243] Zhou, M., Liu, X., Li, Z., Huang, Q., Li, F., & Li, C. Y. (2018). Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *International journal of cancer*, 143(4), 921-930.
- [244] Hafner, A., Bulyk, M. L., Jambhekar, A., & Lahav, G. (2019). The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(4), 199-210.
- [245] Janic, A., Valente, L. J., Wakefield, M. J., Di Stefano, L., Milla, L., Wilcox, S., ... & Herold, M. J. (2018). DNA repair processes are critical mediators of p53-dependent tumor suppression. *Nature medicine*, 24(7), 947-953.
- [246] Georgescu, C. V., Saftoiu, A., Georgescu, C. C., Ciurea, R., & Ciurea, T. (2007). Correlations of proliferation markers, p53 expression and histological findings in colorectal carcinoma. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 16(2), 133.
- [247] Wang, P., Liang, J., Wang, Z., Hou, H., Shi, L., & Zhou, Z. (2017). The prognostic value of p53 positive in colorectal cancer: A retrospective cohort study. *Tumor Biology*, 39(5), 1010428317703651.
- [248] Cordero-Herrera, I., Martín, M. A., Bravo, L., Goya, L., & Ramos, S. (2013). Epicatechin gallate induces cell death via p53 activation and stimulation of p38 and JNK in human colon cancer SW480 cells. *Nutrition and Cancer*, 65(5), 718-728.
- [249] Albayrak, A., Gürsan, N., & Güngoğdu, C. (2014). Kolorektal kanserlerde c-erbB-2 ve p53 ekspresyonunun prognostik önemi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 5(1), 80-85.
- [250] Bosari, S., Moneghini, L., Graziani, D., Lee, A. K., Murray, J. J., Coggi, G., & Viale, G. (1995). bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas. *Human pathology*, 26(5), 534-540.

- [251] Bronner, M. P., Culin, C., Reed, J. C., & Furth, E. E. (1995). The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *The American journal of pathology*, 146(1), 20.
- [252] Flohil, C. C., Janssen, P. A., & Bosman, F. T. (1996). Expression of bcl-2 protein in hyperplastic polyps, adenomas, and carcinomas of the colon. *The Journal of Pathology*, 178(4), 393-397.
- [253] Huang, Q., Li, S., Cheng, P., Deng, M., He, X., Wang, Z., ... & Huang, J. (2017). High expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 is a good prognostic factor in colorectal cancer: Result of a meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 23(27), 5018.
- [254] Zeestraten, E. C., Benard, A., Reimers, M. S., Schouten, P. C., Liefers, G. J., Van de Velde, C. J., & Kuppen, P. J. (2013). The prognostic value of the apoptosis pathway in colorectal cancer: a review of the literature on biomarkers identified by immunohistochemistry. *Biomarkers in cancer*, 5, BIC-S11475.
- [255] Bodur, C., Kutuk, O., Karsli-Uzunbas, G., Isimjan, T. T., Harrison, P., & Basaga, H. (2013). Pramanicin analog induces apoptosis in human colon cancer cells: critical roles for Bcl-2, Bim, and p38 MAPK signaling. *PLoS One*, 8(2), e56369.
- [256] Cuenda, A., & Sanz-Ezquerro, J. J. (2017). p38 γ and p38 δ : from spectators to key physiological players. *Trends in biochemical sciences*, 42(6), 431-442.
- [257] Bonney, E. A. (2017). Mapping out p38 MAPK. *American Journal of Reproductive Immunology*, 77(5), e12652.
- [258] Martínez-Limón, A., Joaquin, M., Caballero, M., Posas, F., & de Nadal, E. (2020). The p38 pathway: from biology to cancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 1913.
- [259] Fan, X. J., Wan, X. B., Fu, X. H., Wu, P. H., Chen, D. K., Wang, P. N., ... & Wang, L. (2014). Phosphorylated p38, a negative prognostic biomarker, complements TNM staging prognostication in colorectal cancer. *Tumor Biology*, 35(10), 10487-10495.
- [260] Mehta, G. A., Khanna, P., & Gatz, M. L. (2019). Emerging role of SOX proteins in breast Cancer development and maintenance. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 24(3), 213-230.
- [261] Matheu, A., Collado, M., Wise, C., Manterola, L., Cekaite, L., Tye, A. J., ... & Lovell-Badge, R. (2012). Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer research*, 72(5), 1301-1315.
- [262] Bastide, P., Darido, C., Pannequin, J., Kist, R., Robine, S., Marty-Double, C., ... & Jay, P. (2007). Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *The Journal of cell biology*, 178(4), 635-648.
- [263] Bruun, J., Kolberg, M., Nesland, J. M., Svindland, A., Nesbakken, A., & Lothe, R. A. (2014). Prognostic significance of β -catenin, E-cadherin, and SOX9 in colorectal cancer: results from a large population-representative series. *Frontiers in oncology*, 4, 118.

- [264] Lizárraga-Verdugo, E., Carmona, T. G., Ramos-Payan, R., Avendaño-Félix, M., Bermúdez, M., Parra-Niebla, M., ... & Aguilar-Medina, M. (2021). SOX9 is associated with advanced T-stages of clinical stage II colon cancer in young Mexican patients. *Oncology Letters*, 22(1), 1-10.
- [265] Lü, B., Fang, Y., Xu, J., Wang, L., Xu, F., Xu, E., ... & Lai, M. (2008). Analysis of SOX9 expression in colorectal cancer. *American journal of clinical pathology*, 130(6), 897-904.
- [266] Espersen, M. L. M., Linnemann, D., Christensen, I. J., Alamili, M., Troelsen, J. T., & Høgdall, E. (2016). SOX9 expression predicts relapse of stage II colon cancer patients. *Human pathology*, 52, 38-46.
- [267] Ullah, M. A., Islam, N. N., Sarkar, B., Araf, Y., Zohora, U. S., & Rahman, M. S. (2022). Bioinformatics analysis on the prognostic significance of SOX9 gene and its transcriptional product in colorectal cancer. *Human Gene*, 201043.
- [268] Lu, M., Marsters, S., Ye, X., Luis, E., Gonzalez, L., & Ashkenazi, A. (2014). E-cadherin couples death receptors to the cytoskeleton to regulate apoptosis. *Molecular cell*, 54(6), 987-998.
- [269] Hollestelle, A., Peeters, J.K., Smid, M., Timmermans, M., Verhoog, C.H., Westenend, P.J., Heine, A.J.H., Chan, A., Sieuwerts, A.M., Wiemer, E.A.C., Klijn J.G.M., Spek P. J., Foekens, A.J., Schutte, M., Bakker, M.A., Martens, J.W.M. (2013) Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 138, 47–57 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2415-3>
- [270] Okugawa, Y., Toiyama, Y., Inoue, Y., Iwata, T., Fujikawa, H., Kawamura, M., ... & Kusunoki, M. (2011). Clinical Significance of Preoperative Serum Soluble E-cadherin in Colorectal Carcinoma: 363. *Official journal of the American College of Gastroenterology/ ACG*, 106, S143-S144.
- [271] Efstathiou, J. A., Liu, D., Wheeler, J. M. D., Kim, H. C., Beck, N. E., Ilyas, M., ... & Bodmer, W. F. (1999). Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5), 2316-2321.
- [272] Kitadai, Y., Bucana, C. D., Ellis, L. M., Anzai, H., Tahara, E., & Fidler, I. J. (1995). In situ mRNA hybridization technique for analysis of metastasis-related genes in human colon carcinoma cells. *The American journal of pathology*, 147(5), 1238.
- [273] He, X., Chen, Z., Jia, M., & Zhao, X. (2013). Downregulated E-cadherin expression indicates worse prognosis in Asian patients with colorectal cancer: evidence from meta-analysis. *PloS One*, 8(7), e70858.
- [274] Wang, R., Ma, X., Li, Y., He, Y., Huang, D., Cai, S., & Peng, J. (2016). The characteristics and prognostic effect of E-cadherin expression in colorectal signet ring cell carcinoma. *PLoS One*, 11(8), e0160527.
- [275] Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki- 67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, 182(3), 311-322. [276] Melling, N., Kowitz, C. M., Simon, R., Bokemeyer, C., Terracciano, L., Sauter, G., ... & Marx, A.

H. (2016). High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *Journal of clinical pathology*, 69(3), 209-214.

[277] Ma, Y. L., Peng, J. Y., Zhang, P., Liu, W. J., Huang, L., & Qin, H. L. (2010). Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer. *Medical oncology*, 27(2), 304-309.

[278] Guzińska-Ustymowicz, K., Pryczynicz, A., Kemon, A., & CZYŻEWSKA, J. (2009). Correlation between proliferation markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer. *Anticancer research*, 29(8), 3049-3052.

[279] Luo, Z. W., Zhu, M. G., Zhang, Z. Q., Ye, F. J., Huang, W. H., & Luo, X. Z. (2019). Increased expression of Ki-67 is a poor prognostic marker for colorectal cancer patients: a meta analysis. *BMC cancer*, 19(1), 1-13.

[280] Dharmayuda, T. G., Suega, K., Bakta, I. M., & Sumohadi, I. M. D. (2021). Ki67 expression and prognostic aspects of colorectal cancer. *International Journal of Health Sciences*, 5(2), 79-88.

[281] Tong, G., Zhang, G., Liu, J., Zheng, Z., Chen, Y., Niu, P., & Xu, X. (2020). Cutoff of 25% for Ki67 expression is a good classification tool for prognosis in colorectal cancer in the AJCC- 8 stratification. *Oncology reports*, 43(4), 1187-1198.

[282] Melling, N., Kowitz, C. M., Simon, R., Bokemeyer, C., Terracciano, L., Sauter, G., ... & Marx, A. H. (2016). High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *Journal of clinical pathology*, 69(3), 209-214.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatıma Nurdan GÜRBÜZ

Doğum Tarihi :

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu :

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi (2003)

Yüksek Lisans : Kırıkkale Üniversitesi (2008)

Yayınları (SCI) :

- Sedat, A., Serpil, O., **Nurdan, G.**, Aylin, G., Arif, Ş., Muzeyyen, O., ... & Nimet, K. (2010). Immunohistochemical Localization of Glutathione S-Transferase Isoenzymes (GSTA, GSTP, GSTM4, and GSTT1) and Tumour Marker p53 in Matched Tissue from Normal Larynx and Laryngeal Carcinoma: Correlations with Prognostic Factors. Journal of Otolaryngology--Head & Neck Surgery, 39(5)
- Güler Şimşek, G., Oğuztüzün, S., Bozer, B., Kılıç, M., Kaya Koçdoğan, A., Kaygın, P., **Gürbüz,N.**, Buluş, H. (2018). Expressions of CYP and GST isoenzymes in human gastric tumor and non-tumor tissues. Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi.

Yayınları (Diğer) :

- **Gürbüz, F. N.**, Koçdoğan, A. K., YILMAZ, C., OĞUZTÜZÜN, S., ŞİMŞEK, G. G., & Mustafa, TÜRK.(2022) GSTs, MRP and Apoptotic Markers in DLD-1 Human Colon Cancer Cell Line Before and After 5-FU Treatment. International Journal of Nature and Life Sciences, 6(1), 25-40.
- Polat, F., Buluş, H., KAYGIN, P., Dirican, O., ŞİMŞEK, G. G., SARIALTIN, S. Y., **Gürbüz, F. N.**, & Oğuztüzün, S. (2022). Investigation of the role of CYP1A1 and CYP1B1 expressions in obesity susceptibility. Türk Doğa ve Fen Dergisi, 11(3), 69-78.

•

Araştırma Alanları : Kanser Biyolojisi

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl/Yıllar :

- Özel Darüşşifa Eymir Anadolu-Fen Lisesi (2016-...)-Biyoloji Öğretmeni
- Özel Nazime Özlem Temel Lisesi (2014-2016)- Biyoloji Öğretmeni
- Özel Seçkin Bireyler Dershanesi (2006-2014)- Biyoloji Öğretmeni
- Özel Bilgi Dershanesi(2002-2006)- Biyoloji Öğretmeni