



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**KOLOREKTAL KANSERDE TÜRÖR METABOLİZMASININ
LAKTAT DEHİDROGENAZ BAĞLANTILI
MODİFİKASYONUNUN KEMOTERAPİ ETKİNLİĞİ
ÜZERİNDEKİ ROLÜ**

GİZEM ÇALIBAŞI KOÇAL

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr.TÜRKAN YİĞİTBAŞI

İSTANBUL- 2019

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya
Tez Sahibi : Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL
Tez Başlığı : Kolorektal Kanserde Tümör Metabolizmasınınin Laktat Dehidrogenaz Bağlantılı Modifikasyonunun Kemoterapi Etkinliği Üzerindeki Rolü
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 19.08.2019

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

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Türkan YİĞİTBAŞI

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Prof.Dr. Tuğba AKBAY

Prof.Dr. Yasemin BAŞBINAR

Prof.Dr. Hülya ELLİDOKUZ

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

Marmara Üniversitesi

Dokuz Eylül Üniversitesi

Dokuz Eylül Üniversitesi

İmza

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 20./08./2019 tarih ve 2019/26 - 13 sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü V.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince derin bilgi, deneyim ve yardımseverlik duygusuyla öğrenciliğim ve akademik hayatım için ihtiyacım olan her türlü desteği sağlayan Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürümüz ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr.Nesrin Emekli'ye;

Öğrencisi olduğum süre içerisinde bilimsel ve duygusal desteği ile emek yoğun biyokimya doktorası sürecimi daha değerli hale getiren, tezimin plan aşamsından son haline kadar geçen süre içerisinde çözüm odaklı kişiliği ile zorlu süreçleri üstesinden gelinebilir kılan ve çok değerli deneyimlerini paylaşarak sorularıma yanıt bulmamı sağlayan eşsiz Hocam Prof.Dr.Türkan Yiğitbaşı'na,

Her zaman yanımda olduklarını hissettirerek, bir insanın akademik hayatına nasıl dokunulacağını gösteren, kalbimde ve aklımdaki varlıkları hiç bitmeyecek olan çok değerli yol gösterici Hocalarım Prof.Dr.Yasemin Başbınar ve Prof.Dr.Hülya Ellidokuz'a,

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü müdürümüz sayın hocam Prof.Dr.Nur Olgun'a, akademik kariyerimle ilgili en önemli adımları atmam ve deneysel çalışmalarımı yapabilmem konusundaki desteği için,

Öğrencilik sürecimde kahrımı çeken tüm Sağlık Bilimleri Enstitüsü idari personeline;

Laboratuvarda çalışmalarımdaya desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olduklarını gösteren sevgili arkadaşlarım Dr. Feriha Toksöz, Dr. Şeniz İnanç ve Araş.Gör.Çağrı Çakıcı'ya,

Her zaman her koşulda yanımda olduklarını sonsuz destekleri ve sevgileriyle bana hissettiren canım aileme,

Sabırlı, hoşgörülü ve destekleyici varlığı ile herşeyi daha kolay kılan, eşim Ersin'e yanımda olduğu her an için;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR.....	vi
TABLO BAŞLIKLARI.....	ix
ŞEKİL ALTYAZILARI.....	x
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT.....	3
3.GİRİŞ AMAÇ.....	4
4.GENEL BİLGİLER.....	6
4.1.Kolorektal Kanserin Epidemiyolojisi.....	6
4.2.Kolorektal Kanserin Etiyolojisi.....	6
4.3.Kolorektal Kanserde Histolojik Tipler.....	7
4.4.Kolorektal Kanserin Tedavisi.....	7
4.5.Kolorektal Kanserin Moleküler Temeli.....	8
4.5.1.APC Geni.....	9
4.5.2.Kras Geni.....	10
4.5.3.DCC Geni.....	13
4.5.4.p53 Geni.....	13
4.6.Kanser Metabolizması.....	13
4.6.1.Aminoasit Metabolizması.....	15
4.6.1.1.Serin ve Tek Karbon Metabolizması.....	15
4.6.1.2.Glutamin Metabolizması ve Anapleroz.....	17
4.6.2.Krebs Döngüsü ve Kateplorozis.....	18
4.6.3.Pentoz Fosfat Yolağı ve Nükleotid Sentezi.....	18
4.6.4.Lipit Metabolizması.....	20
4.6.5.Glukoz Metabolizması.....	21
4.7.Warburg Etkisi ve Artmış Aerobik Glikoliz.....	24

4.7.1. Warburg etkisi ve Moleküler Mekanizmalar	27
4.7.2. Anjiyogenez	28
4.8. Laktat Metabolizması.....	29
4.9. Laktatın Karsinogeneze Etkisi	31
4.9.1. Laktatın Anjiyogenezdeki Rolü	32
4.9.2. Laktatın Hücre Göçü ve Metastazı Teşvik etmedeki Rolü	32
4.9.3. Laktatın Kanser Hücresinin İmmün Sistemden Kaçışındaki Rolü	33
4.9.4. Laktatın Kanser Hücresinin Kendine Yeterliliği ve Sürekli Glikolizdeki Rolü	33
4.9.5. Laktatın Tümör Mikroçevresinin Şekillenmesindeki Rolü.....	34
4.10. Laktat Dehidrogenaz Altbirimleri ve İzofomları.....	35
4.10.1. Laktat Dehidrogenaz A	36
4.10.2. Laktat Dehidrogenaz B	37
4.11. Kanserde Terapötik Hedef Olarak Laktat Dehidrogenaz.....	38
4.11.1. Küçük Molekül İnhibitörleri	39
4.11.2. Laktat Dehidrogenaz A ve B'nin Moleküler İnhibisyonu	40
4.11.3. Tümör Stroma Arasındaki Laktat Değişimini Engelleme	41
5. MATERYAL METOT.....	43
5.1. Hücre Kültürü	43
5.2. Kullanılan İlaçlar	44
5.3. Gerçek Zamanlı Sitotoksisite Analizleri.....	44
5.4. İlaçların IC50Dozlarının Belirlenmesi.....	46
5.5. Gerçek Zamanlı Hücre Migrasyon Analizleri.....	47
5.6. Laktat analizi.....	48
5.7. Asetil KoA Eliza Analizi	49
5.8. Total Antioksidan Kapasitesi Analizi	50
5.9. Total Oksidan Seviyesi Analizi	51
5.10. Kantitatif Geçrek Zamanlı PCR ile LDH Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi	52
5.11. İstatistiksel Analiz.....	54
6. BULGULAR.....	55
6.1. Kolorektal Kanser Hücrelerinin Kültür Edilmesi	55
6.2. İlaç Uygulamaları Sonucu IC50 Değerlerinin Belirlenmesi.....	56

6.3.Gerçek Zamanlı Sitotoksisite Analizlerinin Sonuçları	58
6.4.Gerçek Zamanlı Hücre Migrasyon Analizlerinin Sonuçları	60
6.5.Laktat Analizi Sonuçları	62
6.6.Asetil-KoA Eliza Analizi sonuçları	64
6.7.Total Antioksidan Kapasitesi Analizinin Sonuçları	69
6.8.Total Oksidan Seviyesi Analizinin Sonuçları	67
6.9.Oksidatif Stres İndeksi Sonuçları.....	71
6.10.Laktat Dehidrogenaz Gen Ekspresyonu Sonuçları	73
7.TARTIŞMA.....	79
8.SONUÇ.....	88
9.KAYNAKLAR	90
10.ETİK KURUL ONAYI.....	102
11.ÖZGEÇMİŞ	105

KISALTMALAR

APC: Adenomatöz polipozis coli

CDKN2A: Siklin-bağımlı kinaz inhibitör 2A

CIN: kromozomal dengesizlik

CTNNB1: Katenin (kaderin-ilişkili protein) beta-1

DCC: Deleted in colorectal carcinogenesis geni

DHAP: Dihidroksiaseton fosfat

dTMP: Timidin monofosfat

dUMP: Deoksiüridin monofosfat

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

F6P: Fruktöz-6-fosfat

FU: 5-Fluorourasil

G3P: Gliseraldehit-3-fosfat

G6P: Glukoz-6-fosfat

G6PDH: Glukoz-6 Fosfat Dehidrogenaz

GLDC: Glisin dehidrogenaz

GLS: Gltaminaz

GLUD: Glutamat dehidrojenaz

GLUD: Glutamat dehidrojenaz

GLUT: Glukoz taşıyıcı

GP: Glukojen fosforilaz

GYS: Glukojen sentaz

HIF1: Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1a

IC50: Yarısını inhibie eden konsantrasyon (half maximal inhibitory concentration)

KRK: Kolorektal kanser

KT: Kemoterapi

LDH: Laktat dehidrogenaz

LDHA: Laktat dehidrogenaz A

LDHB: Laktat dehidrogenaz B

LEF: Lenfosit çoğaltıcı faktör
ME: malik enzim
MMP: Matris metaloproteinaz
MSI: mikrosatellit dengesizliği
OXPHOS: Oksidatif fosforilasyonu
PCK1: Fosfoenolpirüvat karboksiaz
PCK2: Fosfoenolpirüvat karboksiaz 2
PCK2: Fosfoenolpirüvat karboksiaz 2
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDH: Pirüvat dehidrojenaz
PEPCK: Fosfoenolpirüvat karboksiaz kinaz
PHGDH: Fosfogliserat dehidrojenaz
PIK3CA: Fosfotidil inositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz, katalitik altbirim alfa
PKM2: Pürüvat kinaz izoform M2
PSAT1: Fosfoserin aminotransferaz 1
RAS: Fare sarkoma proto-oncogen
RPE: Riboz-5-fosfat epimeraz
RTK: tirozin kinaz reseptörüdür
S7P: Sedoheptuloz-7-fosfat
SAM: S-adenosilmetionin
SHMT: Serin hidroksimetiltransferaz
TCA: Trikarboksilik asit döngüsü
TCF: T-hücre faktörü (TCF)
TS: Timidilat sentaz
UGT1A1: Difosfat glukuronosiltransferaz 1A1
VEGF: Anjiyojenik büyüme faktörleri
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
Xu5P: Xylulose-5-fosfat
 α -KG: α -ketoglutarat
2PG: 2-fosfogliserat
3PG: 3- fosfogliserat

3PG: 3-fosfogliserat

3PHP: 3-fosfohidroksipirüvat

6PGL: 6-fosfoglukonat



TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1. KRK gelişiminde etkili olan faktörler.....	6
Tablo 4.7.2.1. Mikroçevrede artan hipoksi ve asidoz durumlarının sonuçları.....	29
Tablo 5.1.1. Kolorektal kanser hücre hattı karakteristik özellikleri.....	43
Tablo 5.6.1. Laktat standartları	49
Tablo 5.10.1. DNA eliminasyon karışımı hazırlığı.....	52
Tablo 5.10.2. Revers transkripsiyon karışımı hazırlığı	53
Tablo 5.10.3. PCR karışımı hazırlığı.....	53
Tablo 6.2.1. Deneyde kullanılan ilaçların/kimyasalların IC50 değerleri	56

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.5.1. Kolorektalkanserde multi-step karsinogenez	9
Şekil 4.5.1.1. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı	10
Şekil 4.5.2.1. Kras proteini ve EGFR aracılı sinyal yolağı.....	11
Şekil 4.5.2.2. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı.....	12
Şekil 4.6.1. Kanser hücresinde meydana gelen metabolik değişimler	14
Şekil 4.6.1.1.1. Serin sentez yolağı.....	15
Şekil 4.6.1.1.3. Tek-karbon metabolizmasını oluşturan folat ve metiyonin.....	16
Şekil 4.6.1.2.1. Azot ve karbon kaynağı glutamin metabolizması	17
Şekil 4.6.3.1. Pentoz fosfat yolağı	19
Şekil 4.6.5.1. Kanser hücrelerinde değişmiş glukoz metabolizması süreçleri.....	21
Şekil 4.6.5.2. Kanserde glikojen metabolizması.....	22
Şekil 4.6.5.3. Hücresel solunumu oluşturan glikoliz, krebs ve oksidatif fosforilasyon süreçleri.....	23
Şekil 4.6.5.4. Warburg etkisi altında oksidatif fosforilasyon, anaerobik glikoliz ve aerobik glikoliz	23
Şekil 4.7.1. Karsinogenez sürecinde hücre-mikroçevre etkileşimleri modeli	27
Şekil 4.8.1. Kanserde laktat mekiği modelleri	31
Şekil 4.10.1. Laktat dehidrogenaz aktivitesi ve tetramerleri	36
Şekil 5.3.1. Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde empedans ölçümüne dayanan analize genel bakış	45
Şekil 5.5.1. Gerçek zamanlı hücre migrasyon analizi için CIM-Plate	48
Şekil 5.6.1. Laktat kalibrasyon eğrisi	49
Şekil 5.7.1. Asetil-CoA standartların hazırlanışı	50
Şekil 5.7.2. Asetil-Coa kalibrasyon eğrisi	50
Şekil 6.1.1. HCT116 hücrelerinin kùltür koşullarındaki mikroskopik görüntüleri	55
Şekil 6.1.2. HT-29 hücrelerinin kùltür koşullarındaki mikroskopik görüntüleri.....	55
Şekil 6.2.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde 5-fluorourasil ilacına ait IC50 eğrileri	56
Şekil 6.2.2. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde irinotekan ilacına ait IC50 eğrileri.	57

Şekil 6.2.3. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde sodyum okzamata ait canlılık grafikleri....	57
Şekil 6.2.4. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde sodyum okzamata ait IC50 grafikleri.....	58
Şekil 6.3.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerine ait canlılık grafikleri.....	58
Şekil 6.3.2. HCT116 hücrelerine ait canlılık grafikleri.	59
Şekil 6.3.3. HT-29 hücrelerine ait canlılık grafikleri.....	59
Şekil 6.4.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerine ait migrasyon grafikleri.	60
Şekil 6.4.2. HCT116 hücrelerine ait migrasyon grafikleri.	61
Şekil 6.4.3. HT-29 hücrelerine ait migrasyon grafikleri.....	61
Şekil 6.5.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde laktat ait konsantrasyon grafikleri.....	62
Şekil 6.5.2. HCT116 hücrelerine ait laktat konsantrasyon grafikleri	63
Şekil 6.5.3. HT-29 hücrelerine ait laktat konsantrasyon grafikleri.....	64
Şekil 6.6.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde asetil-KoA konsantrasyon grafikleri.	65
Şekil 6.6.2. HCT116 hücrelerine ait asetil-KoA konsantrasyon grafikleri.....	65
Şekil 6.6.3. HT-29 hücrelerine ait asetil-koA konsantrasyon grafikleri.....	66
Şekil 6.7.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde total antioksidan kapasite grafikleri	67
Şekil 6.7.2. HCT116 hücrelerine ait total antioksidan kapasite grafikleri.....	68
Şekil 6.7.3. HT-29 hücrelerine ait total antioksidan kapasite grafikleri.....	68
Şekil 6.8.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde total oksidan seviye grafikleri.	69
Şekil 6.8.2. HCT116 hücrelerine ait total oksidan seviye grafikleri.	70
Şekil 6.8.3. HT-29 hücrelerine ait total oksidan seviye grafikleri.....	70
Şekil 6.9.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde oksidatif stres indeksi grafikleri.....	71
Şekil 6.9.2. HCT116 hücrelerine ait oksidatif stres indeksi grafikleri	72
Şekil 6.9.3. HT-29 hücrelerine ait oksidatif stres indeksi grafikleri.....	72
Şekil 6.10.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde LDH-A enziminin ekspresyonuna ait grafikler.....	73
Şekil 6.10.2. HCT116 hücrelerine ait LDH-A ekspresyon grafikleri.....	74
Şekil 6.10.3. HT-29 hücrelerine ait LDH-A ekspresyon grafikleri	75
Şekil 6.10.4. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde LDH-B enziminin ekspresyonuna ait grafikler.....	76
Şekil 6.10.5. HCT116 hücrelerine ait LDH-B ekspresyon grafikleri.....	76
Şekil 6.10.6. HT-29 hücrelerine ait LDH-B ekspresyon grafikleri	77

1. ÖZET

KOLOREKTAL KANSERDE TÜMÖR METABOLİZMASININ LAKTAT DEHİDROGENAZ BAĞLANTILI MODİFİKASYONUNUN KEMOTERAPİ ETKİNLİĞİ ÜZERİNDEKİ ROLÜ

Kanser hücreleri, Warburg etkisi olarak bilinen durum altında proliferasyonlarını ve büyümelerini desteklemek için metabolizmalarını yeniden programlayarak oksidatif fosforilasyon yerine, pirüvat üzerinden laktat oluşumunu destekler. Kanserde laktat dehidrogenaz A aktivasyonu ile değişim gösteren metabolik fenotipin hücrenin sağkalımına, kemoterapi direncine ve metastazına etki edebileceği gösterilmiştir. Bu doğrultuda kanser metabolizmasının yeniden programlanması ve kemoterapi etkinliğinin artırılması için metabolizmanın modülasyonu üzerine olan çalışmalar artmaktadır. Bu çalışma, laktat dehidrogenazın sodyum okzamat ile inhibe edilmesinin güncel kolorektal kanser tedavi seçenekleri olan 5-fluorourasil ve irinotekan kullanımı üzerindeki etkisini göstermek üzere planlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, gerçek zamanlı hücre analiz sistemleri ile hücre canlılığı ve migrasyonu değerlendirilmiştir. Metabolik değişimi desteklemek amacıyla kolorimetrik kit aracılığıyla laktat, eliza tabanlı kit aracılığıyla asetil KoA, ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile laktat dehidrogenaz ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca oksidatif stress indeksi değerleri de ölçülmüştür. Sonuçlarımıza göre, sodyum okzamatın 5-fluorourasil ve irinotekan ile birlikte kullanılması durumunda kanser hücrelerinin canlılığı ve migrasyonu anlamlı olarak azalmaktadır ($p \leq 0.05$). Bu koşullar altında laktat seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($p \leq 0.05$). Ayrıca sodyum okzamatın kemoterapötiklerle birlikte kullanılması asetil KoA düzeylerini arttırmaktadır ($p \leq 0.05$). Bu, laktat oluşumuna gitmeyen pirüvatın krebs döngüsü üzerinden oksidatif fosforilasyonunun artışına sebep olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda sodyum okzamat kullanımı ile birlikte oksidatif stres, laktat dehidrogenaz A ve B ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişim saptanmamıştır. Özetle, laktat dehidrogenazı inhibe ederek laktat oluşumunu azaltan sodyum okzamatın, kemoterapötiklerle kombinasyonu kanser hücrelerinin canlılığını ve

migrasyonunu azaltmaktadır; ayrıca sodyum okzamat kullanımı laktat düzeylerini azaltıp, asetil KoA düzeylerinin arttırarak metabolik fenotipi değiştirmektedir.

Anahtar kelimeler: Kolorektal kanser, tümör metabolizması, Warburg etkisi, laktat dehidrogenaz, laktat



2. ABSTRACT

THE ROLE OF LACTATE DEHYDROGENASE-RELATED MODIFICATION OF TUMOR METABOLISM ON CHEMOTHERAPY EFFICACY IN COLORECTAL CANCER

Cancer cells promote lactate formation via pyruvate rather than oxidative phosphorylation by programming their metabolism to maintain proliferation under the condition known as Warburg effect. It has been shown that the altered metabolic phenotype with activation of lactate dehydrogenase-A in the cancer cell, may affect cell survival, chemotherapy resistance and metastasis. In this direction, studies on modulation of metabolism are increasing to reprogramme cancer metabolism and increase the effectiveness of chemotherapy. This study was planned to demonstrate the effect of lactate dehydrogenase inhibition with the combination of sodium oxamate and current colorectal cancer treatment options such as 5-fluorouracil and irinotecan. Viability and migration were evaluated with real time cell analysis systems. Lactate levels were measured by colorimetric kit, acetyl CoA levels were measured by eliza, and lactate dehydrogenase expression levels were measured by quantitative polymerase chain reaction. According to the results, the viability and migration of cancer cells were significantly decreased with the combination of sodium oxamate and chemotherapeutics ($p \leq 0.05$). Under these conditions, lactate levels were significantly decreased ($p \leq 0.05$). The use of sodium oxamate with chemotherapeutics increased the levels of acetyl-CoA. This result indicates that pyruvate, which does not form lactate, may cause increased oxidative phosphorylation. There was no significant change in oxidative stress, lactate dehydrogenase expression levels with sodium oxamate. In summary, the combination of chemotherapeutics and sodium oxamate which inhibits lactate dehydrogenase, decrease cancer cell viability and migration; the use of sodium oxamate changes metabolic phenotype by decreasing lactate and increasing acetyl CoA levels.

Key words: Colorectal cancer, tumor metabolism, Warburg effect, lactate dehydrogenase, lactate

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanserde (KRK) geleneksel kemoterapi birçok kanser tipinde olduğu gibi ilk tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir ancak kemoterapötiklerin spesifik olmayışı ve gelişen ilaç direnci kanserde yüksek mortalitenin en önemli sebepleri arasındadır [1]. Konvansiyonel sitotoksik ilaçlarla, kanserde anormal hücrel sinyal gönderilmesini engelleyen hedeflenmiş ilaçların bir arada kullanılmasını içeren ilaç kombinasyonları ile tümör hücrelerinin klonal olarak seçilme riski azaltılarak ilaç direncinin önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Kombine tedavi rejimlerinde, hedefe yönelik tedaviler ile büyüme faktörleri, hücre yüzeyi reseptörleri veya tümör oluşumu ve kanser progresyonu ile ilişkili enzimler gibi moleküler hedeflerin işlevlerini engellemek veya değiştirmek özgüllük sağlamaktır [2, 1]. Bu noktada araştırmacılar ve klinisyenler, KRK yönetiminde kullanılabilecek yeni tedavi seçenekleri arayışı içerisinde. Özellikle değişime uğramış metabolik faktörler ve kanser hücrelerinin yolakları, geleneksel kemoterapiye yanıt geliştirmek için yeni ve kombine edici ilaçların geliştirilmesi için önemli hedefler olarak öne sürülmektedir. Ancak tümör gelişimini ve metastazı teşvik eden genetik ve epigenetik faktörlerin anlaşılmasında önemli ilerleme kaydedilmesine rağmen, tümör progresyonu ve metastatik fenotipin gelişiminde etkili olan tümör metabolizmasına yönelik değişikliklerden ötürü yeni kanser ilaçlarının geliştirilmesinde ilerleme yavaştır. Bu nedenle bu çalışma, tümör metabolizmasının, kemoterapi etkinliği üzerindeki rolü üzerine oluşturulmuştur [3].

Kanser hücreleri, Warburg etkisi olarak bilinen durum altında proliferasyonlarını ve anabolik büyümelerini desteklemek için aerobik glikolize dayalı olarak metabolizmalarını programlamıştır [4, 5]. Aerobik glikoliz ATP'yi hızla üretir ve glikozun parçalanması ile oluşan karbonu nükleotidlerin, proteinlerin ve lipidlerin sentezi için öncül olarak kullanır. Bu geçişin bir sonucu olarak glukoz, 'Pirüvat- Asetil Co A' dönüşümü ile Krebs siklusu üzerinden, gerçekleşen oksidatif fosforilasyon yoluyla metabolize edilmek yerine, pirüvat üzerinden laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi aracılığıyla laktata katabolize edilir [6, 5, 7]. Klinik çalışmalar, yüksek laktat düzeylerinin (8 mM'den yüksek medyan konsantrasyonlarda) primer servikal, baş-boyun

ve rektal kanserlerde metastazların gelişmesiyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu durum, kanserde LDH enzimi bağlantılı hücrel metabolizmanın önemini vurgulamıştır [8-10].

Bu doğrultuda bu çalışmanın primer amacı tümör metabolizmasının belkemiği olan Warburg etkisi doğrultusunda tümöre sağkalım ve direnç avantajı sağlayan LDH enziminin ve laktatın LDH inhibitörü sodyum okzamat ile modüle edilmesinin, güncel KKK tedavi seçenekleri 5-Fluorourasil ve irinotekan kullanımı üzerindeki etkisini göstermektir.

Sodyum okzamat, suda çözünebilir bir pirüvat analogudur. Sodyum okzamatın bulunduğu ortamda yarışmalı olarak LDH'in inhibisyonu söz konusu olacağı için laktat oluşumunda azalma görülecektir [11]. Böylece LDH'in sodyum okzamat aracılı inhibisyonuna konvansiyonel kemoterapötik uygulamasının eklenmesi ile tümör metabolizmasının kanser hücrelerine malinite açısından kazandırdığı avantajların önüne geçilmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmadaki ana hedeflerin gerçekleştirilebilmesi için, LDH inhibitörü olan sodyum okzamat kullanılması ile sodyum okzamat aracılı LDH inhibisyonu hedeflenmiştir. Böylece kemoterapötik uygulaması LDH inhibisyonu varlığında gerçekleştirilmiş olacaktır.

Önerilen proje doğrultusunda, ilk hedefimiz KKK sağaltımında güncel olarak kullanılan 5-fluorourasil ve irinotekan ajanlarının sodyum okzamat ile kombine olarak uygulanması ardından hücre canlılıklarının değerlendirilmesidir. Böylece KKK'de tümör metabolizmasını hedefleyen sağaltımda, sodyum okzamat aracılı LDH inhibisyonunun sitotoksositeye etkisi incelenecektir. Ayrıca hücre canlılığı dışında kanser hücrelerinin diğer malin özelliklerine katkısı olduğu bilinen LDH ve laktatın KKK hücrelerinin migrasyonuna olan etkisinin incelenmesidir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kolorektal Kanserin Epidemiyolojisi

Kanser, dünya genelindeki ölüm sebepleri arasında, kalp damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Gelişmiş ülkelerde ve kentselleşmenin yoğun olduğu bölgelerde, yaşam ve diyet şekillerinin değişmesi ile birlikte artış gözlenen KRK kanserle ilişkili morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinden birisi haline gelmiştir [12].

4.2. Kolorektal Kanser Etyolojisi

KRK gelişiminde etkili olduğu düşünülen çok sayıda risk faktörü tanımlanmıştır. (Tablo 4.1). Ancak KRK insidansındaki heterojenite, çevresel maruziyetlerin, özellikle yaşam tarzı ve diyetin etiyolojik etkisini kuvvetle göstermektedir. Sağlıklı yaşam tarzı alışkanlıkları KRK karşıtı veri sunarken, fiziksel hareketsizlik, obezite ve bazı diyet faktörlerinin (kırmızı/ işlenmiş et, alkol) KRK ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. KRK ile ilişkili faktörlerin belirlenmesi tarama ve takip programları açısından önem teşkil etmektedir [13].

Tablo 4.1. KRK gelişiminde etkili olan faktörler

Kontrol edilebilir risk faktörleri	Kontrol edilemez risk faktörleri
<ul style="list-style-type: none">• Diyet (Yağdan zengin, posadan fakir beslenme)• Sedanter yaşam şekli• Sigara, alkol• Aşırı kilo- Obezite	<ul style="list-style-type: none">• Yaş- 50 üzeri• Kişisel kanser öyküsü- Kolorektal polipler veya kanser• Aile öyküsü- Polipozis sendromları(Ailesel adenomatoz polipozis, Gardner, Turcot), Hereditör non-polipozis kolorektal kanser• Birincil dereceden KRK'li aile yakınları• İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (Ülseratif kolit, Crohn hastalığı vb.)• Etnisite• Tip 2 diyabet öyküsü

4.3.Kolorektal Kanserde Histolojik Tipler

KRK'ler, uluslararası kabul görmüş Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) histolojik sınıflandırmasına göre epitelyal tümörler, karsinoid tümörler ve non-epitelyal tümörler olmak üzere üç ana grup altında sınıflandırılırlar. Adenokarsinomalar, epitelyal tümör tipinin alt-tipi olarak karşımıza çıkmakla birlikte, tüm KRK'lerin %90-95'ini oluşturmaktadırlar. Adenokarsinomaların da müsinöz adenokarsinoma ve taşlı yüzük hücreli karsinomşeklinde iki alt tipi bulunmaktadır. Müsinöz adenokarsinomda tümör dokusunun %50'sinden daha fazlasında müsin izlenmektedir. Bazı müsinöz adenokarsinomalarda, taşlı yüzük hücreleri de bulunabilir. Taşlı yüzük hücreli adenokarsinomlarda, müsinöz adenokarsinomlardan farklı olarak tümör hücrelerini sitoplazmasında artmış müsin yapımı bulunur [14].

4.4.Kolorektal Kanserin Tedavisi

Özellikle kanserler başta olmak üzere birçok hastalıkla ilişkili tedavi planlanması multidisipliner yaklaşım içerisinde gerçekleştirilmektedir. KRK için tedavi seçenekleri, tümörün yerleşim yeriyle (kolon veya rektum) birlikte tümörün ne kadar yayıldığı (veya bağırsak duvarını ve diğer dokuları ne kadar invaze ettiği) ile ilişkilidir. Metastatik yayılımı bulunmayan KRK'de cerrahi operasyon küratiftir. Karaciğere spesifik ve izole metastaz odaklarının bulunması durumunda da cerrahi seçenekler değerlendirilebilir, ancak metastaz anında hastaların sadece %20-25'i cerrahiye uygun bulunmaktadır [15].

Cerrahi uygulanamayan hastaların %10-30'unda kemoterapötik ajan uygulaması (neoadjuvan kemoterapi) ile tümör yükü azaltılmaya çalışılarak, hasta cerrahiye uygun hale getirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla kullanılan iki grup kemoterapi (KT) mevcuttur:

1) *Sitotoksik kemoterapi*: 5-Fluorourasil (FU), irinotekan, oksaliptin, kapesitabin (oral 5-FU analogu) gibi hızlı bölünen tüm hücreleri hedefleyen ve hücrelerin DNA sentezini bloke eden ajanlar bu grupta yer almaktadır.

2) *Hedefe yönelik ajanlar (sitostatik terapi)*: Bu grupta bulunan ajanlar, mekanistik olarak bölünen hücrelere, spesifik reseptör ve proteinlere bağlanarak etki etmektedir. EGFR (endothelial growth factor receptor)' yi hedefleyen setuksimab ve panitumumab,

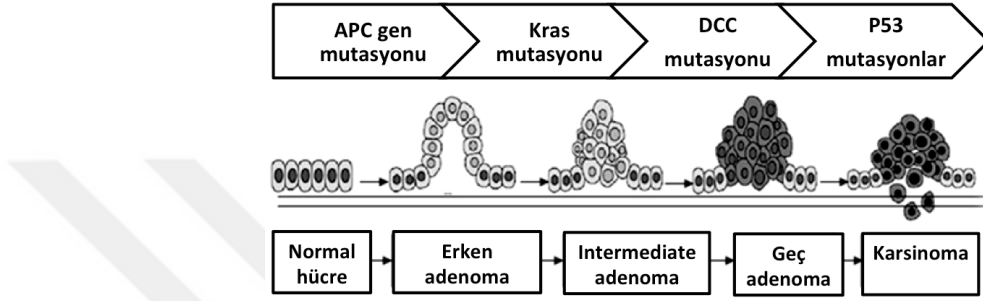
tirozin kinaz inhibitörü regorafenib ve VEGF (vascular endothelial growth factor)'i hedefleyen bevacizumab ve aflibercept bunlara örnek verilebilir. Cerrahi uygulama sonrasında, çeşitli basamaklarda uygulanan kemoterapi rejimlerinde sitotoksik ajanlar kendileri tek olarak veya kombinasyonlar halinde kullanılmaktadır. Bu tek veya kombinasyon halinde kullanımlara, hedefe yönelik ajanlardan bevacizumab ve setuksimab da dahil edilebilmektedir [16].

4.5.Kolorektal Kanserin Moleküler Temeli

Normal özelliklere sahip bir hücrenin, kanser hücresine dönüşümü için gerekli olan karsinogenez süreci çok basamaklı ve karmaşık bir süreçtir. Bir hücrenin, kanser hücresi adı altında kimliklendirilebilmesi için spesifik özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler: Sınırsız çoğalmaya devam etme, çoğalma karşıtı sinyallere karşı duyarsızlık, programlı hücre ölüm mekanizmalarından kaçış, anjiyogenez ile damarlanma, invazyon ve metastaz yapabilmeye [17]. Birçok kanserde olduğu gibi, KRK'de genetik olarak oldukça heterojen ve karmaşık bir hastalıktır [18]. Kromozomal anaploidilerin artması ile gerçekleşen kromozomal dengesizlik (chromosomal instability, CIN), CpG bölgelerinin hipermetilasyonu ile oluşan epigenetik bozukluklar, DNA yanlış eşleşme tamirindeki bozukluklarla oluşan mikrosatellit dengesizliği (microsatellite instability, MSI) KRK gelişiminde tanımlanan temel yollarıdır [19]. Genellikle DNA yanlış eşleşme tamir enzimlerinde karşımıza çıkan MSI, KRK olgularının yaklaşık %13'üne neden olmaktadır. MSI, HNPCC sendromlarının %90'unda, sporadik KRK'lerin %20'sinde görülmektedir [18, 19]. DNA dizisinin 5' ucunda yer alan CpG zengin bölgeler hipermetilasyona giderek tümör baskılayıcı genlerin sessizleşmesineneden olan epigenetik bozukluklar ise KRK'lerin yaklaşık % 40'ında etkili olmaktadır [18, 19].

Kromozomlarda büyük veya küçük parçalarının kazanımı veya kaybına neden olan CIN de, KRK'lerin % 47'sinde ise etkili olmakla birlikte, sporadik KRK'lerin yaklaşık olarak %80'ninde etkindir. CIN, tümör baskılayıcı genlerden (tumour suppressor genes) APC, P53, SMAD2, SMAD4, DCC ve onkogenlerden ise K-ras, β -katenin'in karsinogenez sürecinde etkin olmasını sağlamaktadır [20, 19].

KRK'de, multistep karsinogenez olarak adlandırılan ve normal epitelden adenom-karsinom gelişimi oak lartanımlanabilen süreç, tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerdeki çeşitli mutasyonların birikimi ile 20- 40 yılda gerçekleşen bir süreçtir. (Şekil 4.5.1)



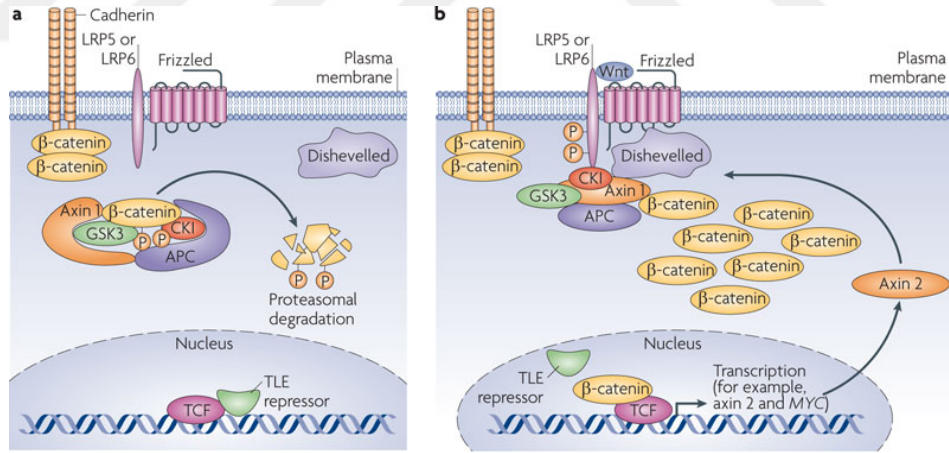
Şekil 4.5.1. Kolorektal kanserde multi-step karsinogenez

Kolon ve rektum dokusunda, mutasyonların birikimi ile adenoma- karsinom gelişimi oluşmaktadır. Hızla bölünen kanser hücrelerinde mutasyon oluşumunu hızlandıran genetik dengesizliklerin, multi-step karsinogenez sürecinde etkinleştiği düşünülmektedir. KRK'deki CIN yolağı, normal epitel hücrelerinde *APC* geninin iki allelinin kaybı ya da inaktivasyonu ile hücre çoğalmasındaki artış ve erken adenom oluşumuyla başlamaktadır, ardından bunu DNA metilasyonundaki değişimler takip etmektedir. Erken adenom hücrelerindeki K-ras (12p), DCC-Smad (1qQ), p53 (17p) genlerinde oluşan mutasyonlar kolon kanserine neden olacak malin transformasyona yol açmaktadırlar.

4.5.1.APC Geni

Adenomatöz polipozis coli (APC) geni 5.kromozomda yer alan tümör baskılayıcı gen olup, hücre büyümesini indükleyen sinyalleri baskılama, migrasyon ve adezyonu kontrol etme gibi önemli görevlere sahiptir (Şekil 4.5.1.1). KRK'lerin %80'inden fazlasında APC inaktiftir. APC geni, KRK açısından önemli olan Wnt/ β -katenin yolağında yer alan aksin, GSK-3 β ve β -kateninden oluşan sitoplazmik kompleksin oluşumunu yöneterek β -katenin'in fosforilasyonuna ve degradasyonuna yol açarak bu

molekülün düzeyini kontrol etmektedir. β -katenin, kadherin temelli hücre adezyon kompleksinin bir üyesidir ve hücre dışından gelen uyarıların hücre içine iletilmesini sağlar. APC'deki fonksiyon kaybı sonucu, β -kateninin hücre içi sitoplazmik düzeyi artar ve nükleusa geçer. Nükleusta transkripsiyon faktörü olarak davranarak, T-hücre faktörü (TCF) veya lenfosit çoğaltıcı faktör (LEF) proteinleri olarak bilinen bir transkripsiyon faktör kompleksine bağlanır. TCF, DNA bağlayan bölgeye, β -katenin de bir transaktivasyon bölgesine katılır. β -katenin-TCF kompleksi, c-MYC ve siklin D1 gibi hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenleyen genleri aktive eder [21]. Özetle APC genindeki fonksiyon kaybı ile β -katenin ve nükleus proteinlerinin birikimi ile hücre çoğalmasında artış ve azalmış apoptoz söz konusu olur. APC genindeki fonksiyon kaybı, hücreler arası adezyonda etkin transmembran proteini E-kaderin üzerinden adezyonda değişiklikler gözlenir. Çünkü E-kaderinin sitoplazmik bölümü β -katenine bağlanır, bu komplekste alfa-katenine ve aktine bağlanarak adezyon oluşumunda rol oynar.

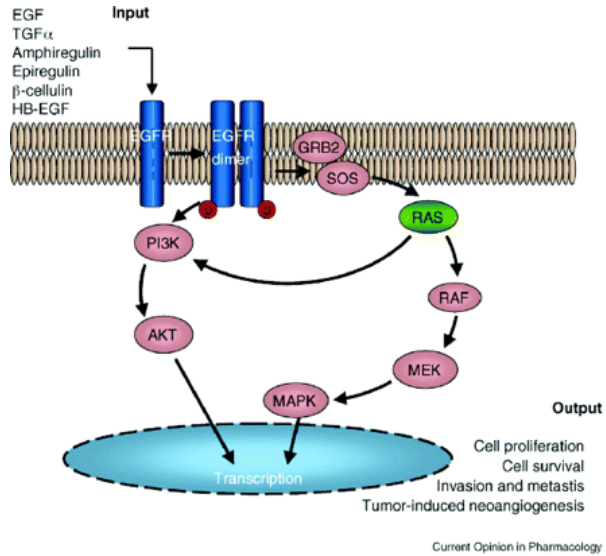


Şekil 4.5.1.1. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı [21]

4.5.2.Kras geni

EGFR sinyal yolağı, hücre içinde RAS sinyal iletimi ile aktiflenmektedir. Ras genindeki mutasyonlar tüm insan kanserlerinin yaklaşık % 30'unda bulunur, bu da onu kanserdeki en yaygın mutasyona uğramış genlerden biri yapar. K-ras (Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog), N-ras ve H-ras olmak üzere 3 ras geni

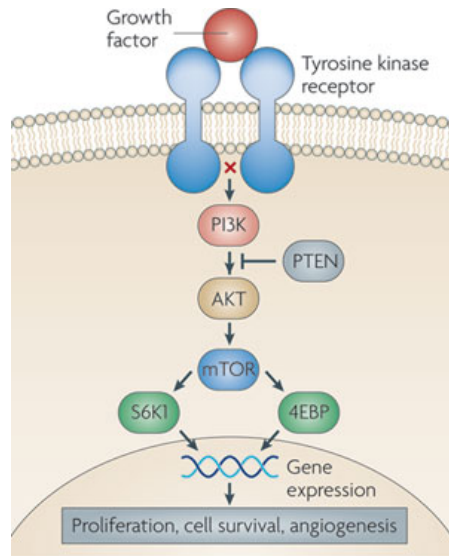
mevcuttur ve 12.kromozomun kısa kolunda yerleşmişlerdir. KRAS geni, birincil olarak hücre bölünmesini kontrol altına almak için bir protein olan KRAS'ın kodlanmasını sağlayan bir genidir. Bu protein, MAP kinaz sinyal kaskadı (RAS/RAF/MEK/ERK) 'nın bir parçasıdır ve hücrenin dışından hücrenin çekirdeğine kimyasal sinyalleri iletir ve temel olarak hücre bölünmesini kontrol etmede rol oynar. KRAS, GTP adlı bir molekülü GDP'ye dönüştüren bir enzimdir (bir GTPaz). KRAS GDP'ye bağlandığında (bağlı), "kapalı" konumdadır ve çekirdeğe sinyal gönderemez (Şekil 4.5.2.1). Ancak bir GTP molekülü KRAS'a ulaştığında ve bağlandığında, KRAS aktive edilir ve sinyalini gönderir ve sonra GTP'yi GDP'ye dönüştürür ve "kapalı" konuma geri döner. KRAS mutasyona uğradığında, normal hücrelerin kanserli hale gelmesine neden olarak bir onkojen gibi davranabilir. Mutasyonlar KRAS proteinini her zaman "açık" konuma getirebilir. KRK'lerin %65 inde Ras geninde (genellikle K-ras) nokta mutasyonu saptanmaktadır ve KRK gelişiminin orta dönemlerinde oluşmaktadır. RAS proteinleri ile; ardışık olarak birbirleri tarafından aktiflenen RAS- RAF- MAPK moleküllerinden oluşan sinyal yolağı ve lipid kinaz fosfotidil inozitol 3 kinaz (PI3K) ile bunun aktive ettiği PDK1-AKT moleküllerinden oluşan sinyal ara yolları aktiflenir [22, 23]



Şekil 4.5.2.1. Kras proteini ve EGFR aracılı sinyal yolağı [24]

EGFR sinyal yolağı: Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR, ERBB1 veya HER1), ERBB ailesi içinde yer alan bir tirozin kinaz reseptörüdür (RTK). Hücre membran yerleşimli, EGFR RAS/RAF/MAPK ve PI3K/Akt ve gibi proliferatif ve anti-apoptotik sinyal arayollarını aktive ederek, hücreye gelen proliferasyon sinyalinin nükleusa iletilmesini sağlar (Şekil 4.5.2.1) [24]. RAS/RAF/MAPK yolağı tümörgenezde önemli rol oynayan birkaç anahtar sinyalleşme bileşeni ve fosforilasyon olayını içerir. Bu aktive edilmiş kinazlar, hücre büyümesini, farklılaşmasını, çoğalmasını, apoptoz ve göç fonksiyonlarını düzenleyen hücre dışı sinyalleri iletir. Reseptör tirozin kinazlarının anormal aktivasyonu, ve RAS veya RAF genlerindeki fonksiyon kazandıran mutasyonlar nedeniyle sinyal yolunun değişimi, insan kanserinde yaygındır.

PI3K/AKT/mTOR yolağı meydana gelen bozukluklar, migrasyon ve invazyonu etkilediğinden, arayoldaki kilit moleküller, potansiyel tedavi hedeflerini oluşturmaktadır (Şekil 4.5.2.2). PI3K/AKT/mTOR yolağı, RAS-RAF yolağı ile etkileşim içinde olduklarından tümörün EGFR tedavisine vereceği yanıtının belirlenmesinde yardımcı olabilirler [25].



Şekil 4.5.2.2. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı [26]

4.5.3.DCC geni

DCC (Deleted in colorectal carcinogenesis) geni 18. kromozomda yer alan bir tümör baskılayıcı genidir. Delesyonu KRK'lerin %70'inde ve ileri derecede displazi gözlenen adenomların yarısında gözlenmiştir. DCC geni, yapısal olarak hücre adezyon moleküllerine benzeyen bir proteinin sentezini gerçekleştirmektedir. DCC proteini sentezlenemediğinde hücreler arası etkileşimin malin dönüşümle sonuçlanacak şekilde değiştiği düşünülmektedir. Aynı kromozomun değişik bir bölgesinde yer alan ve diğer bir tümör baskılayıcı gen olan DPC4/Smad4'ün de KRK'lerin üçte birinde delesyona uğradığı gösterilmiştir [27].

4.5.4.p53 Geni

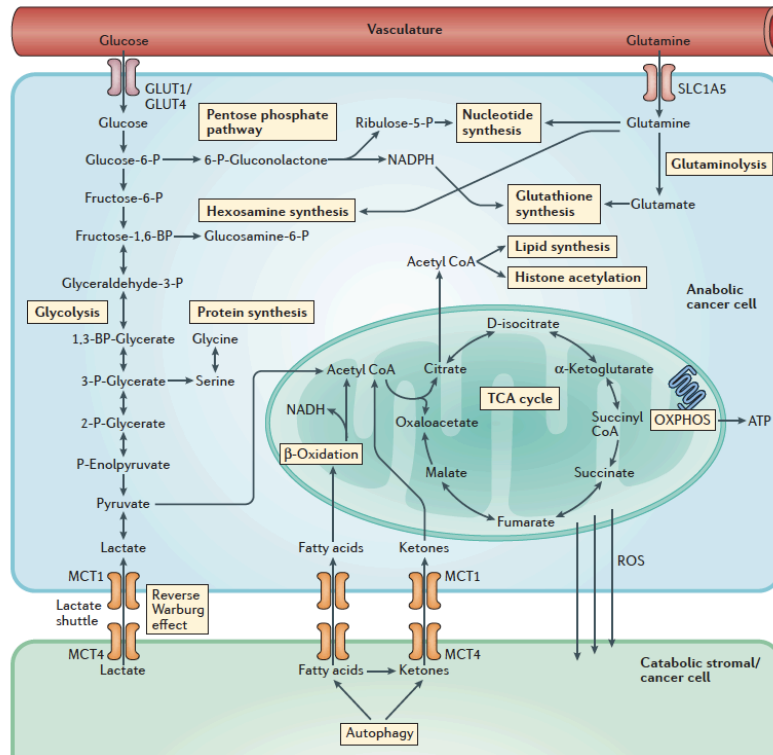
p53 geni, 17.kromozomda yer alan bir tümör baskılayıcı genidir ve genomun gardiyanı olarak bilinmektedir. P53 delesyonuna KRK'lerin %75 inde rastlanmaktadır. p53 proteini hücre döngüsünde yer alan kontrol noktalarında, hücrenin DNA hasarlanmalarına karşı korunmasını sağlayan bir kontrol noktası proteinidir, bu nedenle p53 kaybı hasarlı hücrenin apoptozdan kaçış sebebidir. KRK gelişiminin geç dönemlerinde oluşan p53 kaybı, adenomadan karsinomaya geçiş sürecini yönetir [28, 29].

4.6. Kanser Metabolizması

Kanser metabolizmasındaki değişim, kanserin temel özelliklerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Karsinogenez sürecinde olduğu gibi, onkojenik sinyal yolları ve metabolik enzimler tarafından yönlendirilen bu değişimlerin tamamı kanser hücresinin büyümesi, proliferasyonu ve sağkalımı için gerekli olan ortamı sürdürmesine veya talepleri karşılamasına olanak tanır (Şekil 4.6.1) [30].

Kanser hücreleri, yüksek oranda proliferatif normal hücre tipleriyle benzer şekilde yüksek oranda anabolik metabolizma sergiler. Kanser hücreleri, büyük miktarlarda glikoz ve glutamin alır ve bu besleyicileri, trikarboksilik asit (TCA) döngüsü, oksidatif fosforilasyonu (OXPHOS), pentoz fosfat yolunu (nükleotit sentezi) ve glikozile edilmiş moleküllerin, amino asitlerin, proteinlerin ve lipidlerin sentezini beslemek için

kullanırlar. Bununla birlikte, bu yollar hücre çoğalmasını desteklemek için yeterli düzeyde hüresel bileşen üretir. Malign hücreler ayrıca, TCA-döngüsü ara maddelerini yenilemek ve oksidatif fosforilasyonu (ters Warburg etkisi) desteklemek için, çevredeki katabolik hücreler tarafından salgılanan laktat, serbest yağ asitleri ve ketonları da kullanabilir [31]. Ayrıca artmış biyosentetik aktivite, anabolik reaksiyonlar için indirgeyici madde olan ve hücre redoks dengesini koruyan NADPH üretiminde artışa neden olur. Metabolik olarak aktif hücrelerde artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi, koenzim NADPH kullanılarak glutatyon redüktaz tarafından üretilen indirgenmiş glutatyon formunu içeren uygun antioksidan seviyelerinin üretilmesini gerektirir. Hüresel dönüşüm ve kanser progresyonu sırasındaki epigenetik modifikasyonlar, asetilasyon için asetil KoA, deasetilasyon için NAD, metilasyon için SAM, demetilasyon için α -ketoglutarat ve glikozilasyon için de UDP-GlcNAc gibi metabolitlerin devamı ile gerçekleşir [32].



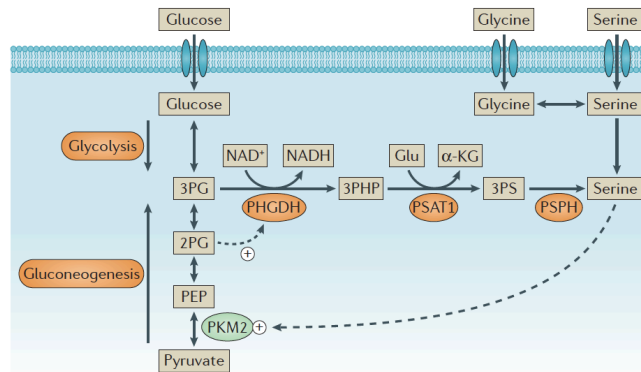
Şekil 4.6.1. Kanser hücresinde meydana gelen metabolik değişimler [31]

4.6.1.Aminoasit Metabolizması

4.6.1.1.Serin ve Tek Karbon Metabolizması

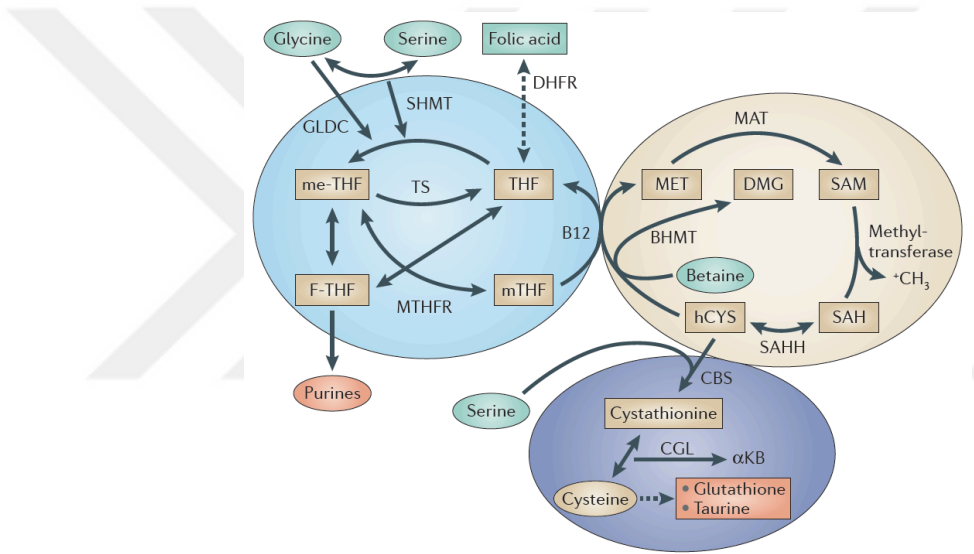
Non-esansiyel serin aminoasiti, protein, amino asit ve glutatyon sentezi de dahil olmak üzere çoğalan hücrelerin büyümesi ve hayatta kalması için çok önemli olan birkaç metabolik işlemi destekler. Tek karbon metabolizması, birbirine bağlı folat döngüsü ve metionin döngüsünü içerir. Bir aminoasitteki (çoğunlukla serin ve glisin) bir karbon grubu, folat döngüsüne önemli bir karbon vericisi olarak nükleotid sentezine, metilasyon reaksiyonlarına ve antioksidan savunma için NADPH oluşumuna katkıda bulunur [33].

Serin ve glisin, nötr amino asit taşıyıcıları tarafından alınır veya de novo olarak sentezlenirler. Serin sentez yolu, glikolitik veya glukoneojenik ara ürün olan 3-fosfogliseratı (3PG) üç adımda kullanır. İlk adımda fosfogliserat dehidrojenaz (PHGDH), 3PG'nin 3-fosfohidroksipirüvata (3PHP) NAD⁺ bağımlı oksidasyonunu katalizler. Daha sonra fosfoerin aminotransferaz 1 (PSAT1) 3PHP'yi glutamat (Glu)- bağımlı transaminasyon reaksiyonu ile 3-fosfoerine (3PS) dönüştürür. Fosfoerin fosfataz (PSPH), serin sentezinin son basamağını 3-PS'nin hidroliziyle katalize eder. Fizyolojik konsantrasyonlarda, serin, glikolizin son basamağını katalizleyen püruvat kinaz izoform M2 (PKM2)'nin allosterik aktivatörüdür. Hücrelerde, serin azalması durumunda PKM2 aktivitesi azalır ve 3-PG havuzu serin sentezine yönlendirilir. Ek olarak 2-fosfogliserat (2PG) PHGDH'nin aktivatörüdür (Şekil 4.6.1.1.1) [34].



Şekil 4.6.1.1.1. Serin sentez yolu. (+), aktivatörü belirtir. Kesik oklar allosterik regülasyonu belirtir. α -KG, α -ketoglutarat; PEP, fosfoenolpirüvat) [34]

Serin ve glisin, serin hidroksimetiltransferaz (SHMT) ile ana serin ile glisinin arasındaki dönüşümüne ve glisin dehidrogenaz (GLDC) ile glisin bölünmesine uğramak suretiyle folat döngüsünü besler. Sonra, folat döngüsü, homosisteine bir karbon grubu vererek metiyonine dönüştürerek metil-THF (mTHF) ile metionin döngüsüne bağlanır. Metiyonin döngüsü ara maddelerinden biri olan S-adenosilmetionin (SAM), DNA, RNA, proteinler ve lipidlerin metilasyon modifikasyonunda ve poliamin sentezinde n-propilamin vericide gerekli metil grubu vericisidir (Şekil 4.6.1.1.3) [35].

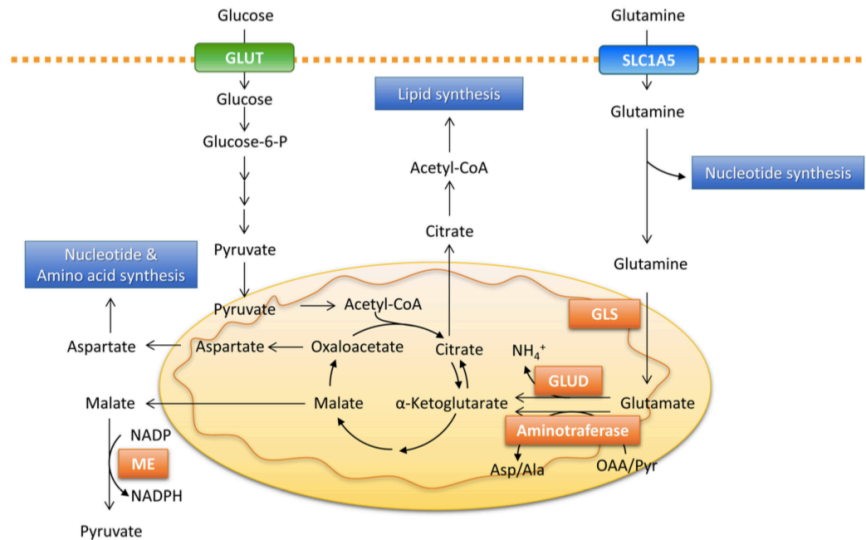


Şekil 4.6.1.1.3. Tek-karbon metabolizmasını oluşturan folat ve metiyonin metabolizması [33]

Serin, glisin ve bir karbon metabolizması, kanser metabolizması için oldukça önemlidir. Çoğu kanser hücresi, serin sentezine veya dış kaynaklı alımına bağımlıdır. Tersine, serin/glisin biyosentezinin artmış aktivasyonu onkogenezi artırır. Tek karbonlu metabolizmadaki antifolat kemoterapi, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan önemli bir stratejidir. Birçok kanser hücresi için, de novo serin sentezinin inhibisyonu veya eksojen serinin mevcudiyeti veya alımının sınırlandırılması yeni terapötik seçeneği veya mevcut terapötik seçeneklerini destekleyici olabilir. ırsat sunan bir özellik olan yüksek derecede bağımlıdır.

4.6.1.2. Glutamin Metabolizması ve Anapleroz

Pek çok kanser hücresi, glutamin bağımlılığı ve glutamin bağımlılığına dayalı olarak glutaminoliz hızını arttırmıştır. Kanser hücreleri genellikle aerobik glikolize başvurur; ancak pirüvat laktik aside dönüştürülür. TCA döngüsüne giren pirüvatın azalması, yağ asitleri, proteinler ve nükleotidlerin sentezi için metabolik ara ürün tedarikini sınırlayabilir. Böyle bir durumda glutaminoliz, azaltılmış NADPH'nın eşzamanlı üretimi ile TCA döngüsünü tekrar doldurmanın anahtarıdır (Şekil 4.6.1.2.1). Anapleroz; TCA döngüsü ara ürünlerinin mitokondride yenilenmesi ve konsantrasyonlarının artması durumudur. Hücelere taşınan glutamin, glutamat dehidrojenaz (GLUD) veya aminotransferaz ile glutaminoliz yoluyla α -ketoglutarata (α -KG) metabolize edilir. α -KG ters TCA döngüsünde indirgeyici karboksilasyon işlemi olan NADPH tüketimi ile sitrata dönüştürülür. Sitrat, ATP-sitrat liyaz ile asetil-CoA'ya dönüştürülür. Bu nedenle, glutamin anaproluk akıma katkıda bulunarak; yağ asitleri için asetil-CoA'nın öncül maddeleri, nükleotid sentezi için oksaloasetattan aspartat ve birçok esansiyel olmayan amino asidin sentezinde rolü olan TCA döngüsü ara maddeleri için karbon sağlar. Ayrıca, glutamin, nükleotidler, amino asitler ve heksosaminler için bir azot kaynağıdır [36, 37].



Şekil 4.6.1.2.1. Azot ve karbon kaynağı glutamin metabolizması. Glutamin, hücelere SLC1A5 taşıyıcısı üzerinden girer ve doğrudan nükleotit biyosentezine katkıda bulunur

veya GLS tarafından glutamata dönüştürülür. Glutamat, GLUD veya aminotransferazlar tarafından a-ketoglutarat'a dönüştürülür. TCA döngüsünden gelen malat, sitoplazmaya ihraç edilebilir ve ME tarafından pirüvat haline getirilebilir ve NADPH üretilebilir. Okzaloasetat, amino asit ve nükleotid sentezini destekleyen aspartata dönüştürülebilir. Glutamin türevli a-ketoglutarat, indirgeyici karboksilasyon yoluyla lipid sentezi için gerekli asetil-CoA oluşumu için alternatif bir karbon kaynağı sağlayabilir. Glikoz-6-P: glukoz-6-fosfat, GLS: Gltaminaz, GLUD: Glutamat dehidrojenaz, ME: malik enzim [36].

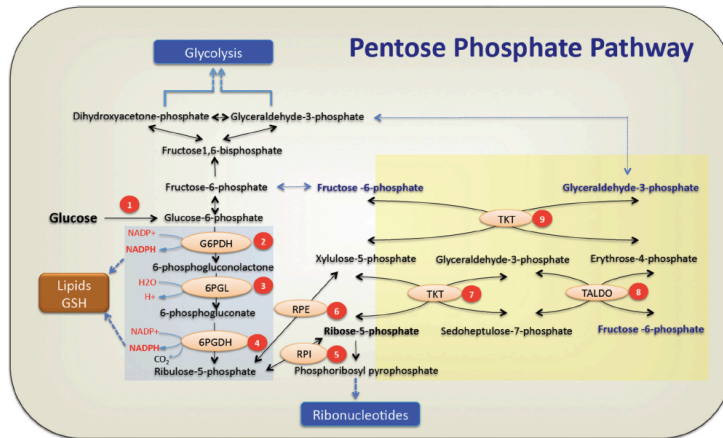
4.6.2.Krebs Döngüsü ve Kateplorozis

Lipidleri, proteinleri ve nükleik asitleri sentezlemek için, çoğalan kanser hücreleri, döngüden ayrılan moleküller için (katapleroz) TCA döngüsü ara ürünlerini kullanabilir. Katapleroz, ürünlerin konsantrasyonlarındaki azalmayı tanımlamaktadır. Normoksik koşullar altında glikoz türevi asetil-CoA ve glutamin türevli oksaloasetat, TCA döngüsüne girmek için sitrat sentaz ile sitrat oluşturmak üzere yoğunlaşır. Bununla birlikte, oksidatif mitokondriyal metabolizma, TCA döngüsü bileşenleri veya elektron taşıma zincirindeki mutasyonların bir sonucu olarak kanser hücrelerinde kesilebilir veya bozulabilir. Üstelik, tümör hipoksisi, pirüvatın TCA döngüsüne girmesini engeller ve sitratın bu yolla sentezini önler. Bu koşullar altında glutamin kaynaklı α -ketoglutaratın mitokondriyal NADPH-bağımlı isokitrat dehidrojenaz ile redüktif karboksilasyonu lipid sentezi için sitrat oluşturmak için kullanılır; burada sitrat sitozole ihraç edilir ve yağ asidi için asetil-CoA'ya dönüştürülür [38].

4.6.3.Pentoz Fosfat Yolağı ve Nükleotid Sentezi

Glikolizden dallanan pentoz fosfat yolu, ribonükleotidlerin sentezi ve büyük bir NADPH kaynağı için gereklidir. Pentoz fosfat yolu, artan hücre proliferasyonu sonucu artan nükleotidlerin anabolik taleplerini karşılamak ve oksidatif stresle mücadele etmek için kanser hücrelerinde çok önemli bir rol oynamaktadır [39]. Pentoz fosfat yolunun oksidatif kolu, glukozun glukoz-6-fosfata (G6P) heksokinazlarla dönüştürülmesiyle başlatılır (Şekil 4.6.3.1). Glikoz-6 Fosfat Dehidrojenaz (G6PDH), NADP + 'yı

NADPH'ye düşürürken, 6-fosfoglukonolakton oluşturmak üzere glukoz-6 fosfatı okside eder. 6-fosfoglukonolaktonun 6-fosfoglukonaz (6PGL) ile hidrolizi, 6-fosfoglukonat (6PG) üretir. Ribuloz-5-fosfatın oluşumu, 6-fosfoglukonatin 6PGDH ile oksidatif dekarboksilasyonu ile gerçekleşir. Bu adımda, NADPH'nin ikinci molekülü üretilir. Oksidatif PPP'de üretilen NADPH, lipid biyosentezi veya ROS detoksifikasyon (GSH) için kullanılabilir. Ribuloz 5 fosfat (Ru5P), riboz-5-Fosfat İzomeraz (RPI) veya ile riboz-5-Fosfat Epimeraz (RPE) ile sırasıyla riboz-5-fosfat ve xyluloz-5-phosphate (Xu5P) oluşturmak üzere izomerizasyon reaksiyonu gerçekleştirir. Riboz-5-fosfat, ribonükleotit sentezi için omurga görevi gören fosforibosil-pirofosfata dönüştürülür. Oksidatif olmayan PPP'de Transketolaz, sedoheptuloz-7-fosfat (S7P) ve gliseraldehit-3-fosfat (G3P) üretmek için iki karbon ünitesini ksilüloz-5-fosfattan riboz-5-fosfata aktarır. Transaldolaz, eritroz-4-fosfat ve birinci fruktoz-6-fosfat molekülünün üretilmesi için üç karbon birimini sedoheptuloz-7-fosfattan gliseraldehit-3-fosfata aktarır. İkinci bir transketolaz reaksiyonunda, ksilüloz-5-fosfattan iki karbon birimi, ikinci bir fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat molekülü verecek şekilde eritroz-4-fosfata aktarılır. Fruktoz-6-fosfat (F6P) ya glikoliz için kullanılabilir ya da oksidatif PPP'yi takviye etmek için G6P'ye geri dönüştürülebilirken, G3P hücresel gereksinimlere bağlı olarak glikolizde kullanılabilir (ayrıntılar için metne bakınız). PPP'nin oksidatif ve oksidatif olmayan dalları sırasıyla mavi ve sarı arka planlarla vurgulanır [39].



Şekil 4.6.3.1. Pentoz fosfat yolağı [39]

Pürin nükleotid (ATP, GTP, dATP ve dGTP) biyosentezi pentoz fosfat yolunun aktif bir riboz ürünü olan 5-fosforibosil-pirofosfat (PRPP) üzerine kurulmuştur. Pürin halkası ard arda glutamin, glisin, 10-formil-tetrahidrofolat, CO₂ ve aspartattan yapılır. Bu öncüllerden, glisin, glikolitik ara madde 3-fosfogliserrattan (3PG) türetilir. Bir karbon birimi donörü olan 10-formil-THF, her ikisi de 3PG'den türetilen serin veya glisinden karbon birimi elde eder [37]. Pirimidin nükleotidlerinin (CTP, UTP, dCTP ve dTTP) biyosentezinde, pirimidin halkası önce bikarbonat, aspartik asit ve amonyaktan (genellikle glutaminden hidrolize edilir) toplanır ve sonra PRPP'nin ribozil grubuna bağlanır. Bu öncüllerden aspartat doğrudan çevreye veya TCA döngüsünde okzaloasetattan elde edilebilir. Okzaloasetattaki karbonlar glikoz veya glutamin kaynaklı olabilir. Timidin için bir ek karbon 5,10-metilen tetrahidrofolattan türetilir [37].

4.6.4.Lipit Metabolizması

Lipid metabolizması, özellikle yağ asitlerinin sentezi, membran biyosentezi, enerji depolaması ve sinyal moleküllerinin üretilmesi için metabolik ara maddeleri üreten önemli bir hücresel prosestir. Düzenlenmemiş yağ asiti sentezi, sadece aktif hücre büyümesi için membran lipidleri yaparak veya ATP sentezi için substrat tedarik ederek değil aynı zamanda lipit sinyal molekülleri (örneğin LPA, prostaglandinler), ikinci haberciler (örneğin PIP3) gibi sinyal yolları yoluyla kansere katkıda bulunur [40].

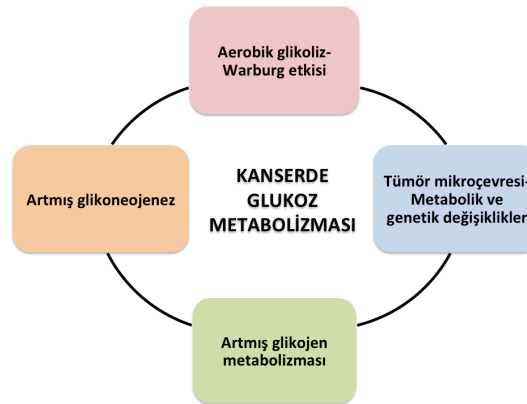
Glikoliz, lipidlere dönüşen ara ürünlerin çoğunu üretir. Örneğin, dihidroksiaseton fosfat (DHAP), hücre membranlarındaki ana yapısal lipidler olan fosfolipidlerin ve triaçilgliserollerin biyosentezi için çok önemli olan gliserol-3-fosfatın öncüsüdür. 3-fosfogliserrat (3PG), hücre lipidlerinin bir diğer sınıfı olan sfingolipidlerin öncüsüdür. Yağ asiti sentezi için asetil-CoA'nın çoğu, mitokondrideki pirüvatın dönüşümünden türetilir. Asetil-CoA, çeşitli lipid sınıflarının yağ açil zincir bileşenlerini sentezlemek için karbon ünitesini ve ayrıca kolesterol ve ilgili moleküllerin öncüsü olan mevalonatı sağlar [37]. Mevalonat yolu, tümör büyümesi ve ilerlemesi için ayrılmaz steroller ve izoprenoitler üretmek için gereklidir. Son yıllarda, bir çok kanserojen sinyal yolağının

MVA yolağı enzimlerinin aktivitesini ve / veya ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [41].

4.6.5. Glukoz Metabolizması

Sağlıklı hücelere kıyasla, kanser hücreleri normoksik koşullarda bile anaerobik glikoliz kullanmayı tercih etmektedirler. Glikoliz- tam kelime anlamıyla glukozun parçalanması, ilk önce glukozun pirüvata sonrasında da atık ürün olan laktik aside dönüştürülmesini gerektirir. Memeli hücrelerinde anaerobik glikoliz, mitokondrinin pirüvatu CO₂ ve H₂O'ye kadar oksitlemesine izin veren oksijenin varlığı ile inhibe edilir. Bu durum Louis Pasteur tarafından oksijen varlığında glukoz akışının azaldığının gösterilmesi ardından 'Pasteur etkisi' olarak tanımlanmıştır. Tümör hücrelerinde ise oksijen varlığında glukozun laktik aside dönüştürülmesi, aerobik glikoliz veya "Warburg etkisi" olarak bilinir [42].

Glikoliz, tümör büyümesinde önemli bir rol oynayan glukoz metabolizmasının tek bileşeni değildir (Şekil 4.6.5.1). Glikojenoliz, glikojenin glikolitik yola girmek için glukoz-1-fosfata (G1P) ve sonra glukoz-6-fosfata (G6P) dönüştürüldüğü süreçtir (Şekil 4.6.5.2). Glikojen metabolizmasının, kanser araştırmacıları tarafından glikolizden çok daha az çalışılmış olmasına rağmen, böbrek, meme, mesane, uterin, yumurtalık, cilt ve beyin kanserleri gibi birçok kanser türünde artmış olduğu; ve kanser hücrelerinin glikojen içeriğinin, replikasyon oranıyla ters orantılı olduğu gösterilmiştir.



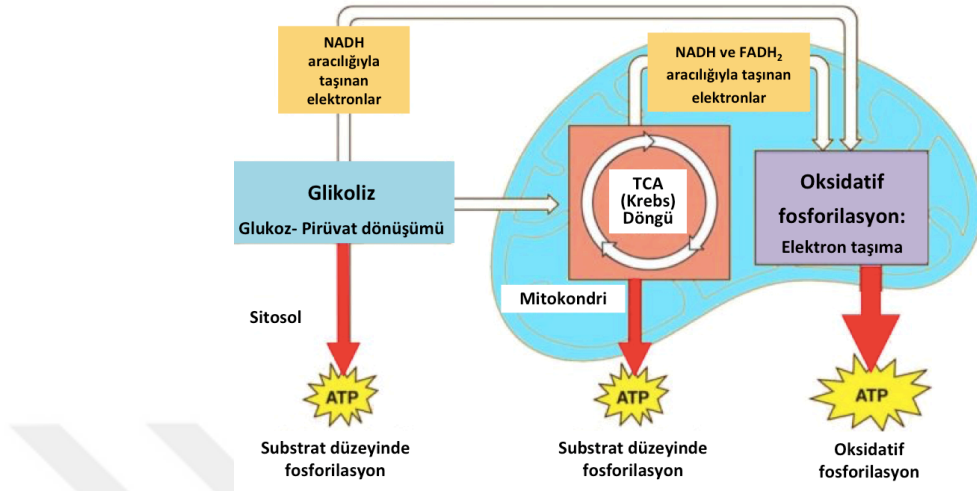
Şekil 4.6.5.1. Kanser hücrelerinde değişmiş glukoz metabolizması süreçleri



Şekil 4.6.5.2. Kanserde glikojen metabolizması. (Glikojen sentaz (GYS), glikojen fosforilaz (GP)) [43]

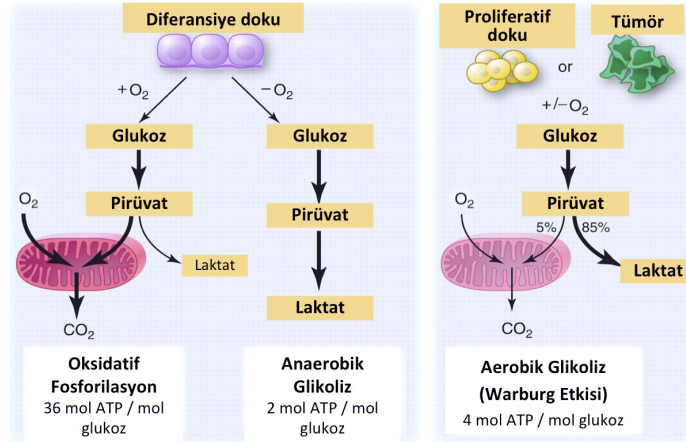
Glikolitik yol, tersine de işlev görebilir. Glikoneojenez olarak bilinen bu süreç pirüvat gibi karbonhidrat olmayan karbon yapıları substratlardan glikoz üretme işlemidir. Kanser metabolizmasında önemli rol oynayan iki glukoneojenik enzim vardır: Fosfoenolpirüvat karboksiaz 1 (PCK1) ve fosfoenolpirüvat karboksiaz 2 (PCK2). TP53'ün her iki enzimi de inhibe ettiği, bu da TP53 kaybının bu enzimleri ve glukoneojenez arttırdığı gösterilmiştir [44]. Glikoneojenez ve glikoliz benzer ara ürünler ürettiğinden, iki yolun da gelişimi, hücre büyümesi için anabolik öncülleri artırabilir. Belirli türdeki kanser hücreleri trikarboksilik asit (TCA) döngüsünden türeyen substratları makromoleküler sentez haline kanalize etmek için glikoneojenik enzimler olan fosfoenolpirüvat karboksiaz kinazı (PEPCK) ve fosfoenolpirüvat karboksiaz 2'yi (PCK2) kullanır [45].

Glukoz normal hücrelerde, krebs veya diğer adıyla trikarboksilik asit döngüsü (TCA döngüsü) yoluyla daha sonra asetil-CoA'ya dönüştürülebilen pirüvata katabolize edilir. TCA döngüsü süresince, enerji üretimi için gerekli olan oksidatif fosforilasyonda kullanılacak (mitokondriyal solunum zinciri, veya elektron taşıma zinciri) NADH ve FADH₂ üretilir (Şekil 4.6.5.3).



Şekil 4.6.5.3. Hüresel solunumu oluşturan glikoliz, krebs ve oksidatif fosforilasyon süreçleri

Bu etkin enerji üretim sürecinde, mitokondriyal solunum sayesinde her bir glikoz molekülü 36 ATP üretebilir. Normal hücrelerde, glikoliz yalnızca oksijen kaynağı sınırlı olduğunda önceliklidir. Aksine, kanser hücreleri, oksijen bolluğunda bile, glikoliz kullanır. Bu nedenle, sağlıklı hücrelerin normal anaerobik glikolizden ayırt edilmesi için, tümör glikolizine "aerobik glikoliz" veya 'Warburg etkisi' denir (Şekil 4.6.5.4) [5].



Şekil 4.6.5.4. Warburg etkisi altında oksidatif fosforilasyon, anaerobik glikoliz ve aerobik glikoliz [5]

4.7. Warburg Etkisi ve Artmış Aerobik Glikoliz

Tümör hücrelerindeki glikolitik yolağa dayalı metabolik değişikliklerin Dr. Otto Warburg tarafından gözlenip raporlanmasından ötürü, bu fenomen Warburg etkisi olarak adlandırılmıştır. Warburg, toplardamarların tümörü besleyen atar damarlardan daha fazla laktat ve daha az glukoz içerdiğini göstererek normoksik tümör ortamında net bir laktat çıkışı olduğunu göstermiştir [6]. Kansere hücreleri Warburg etkisi altında, glikolizi mitokondriyal solunuma tercih ederler ve bunun sonucunda açığa çıkan düşük enerji üretimi durumunu telafi edilmek zorundadır. Çünkü glikoliz sürecinde her bir glukoz molekülü başına 2 ATP enerji üretimi söz konusu iken, mitokondriyal solunumda katabolize edilen her glukoz molekülü için 32 ATP üretebilir. Dolayısıyla kanser hücreleri, Warburg etkisiyle glikoz alımını ve glikoliz sürecini arttırmak üzere programlanmıştır. Enerji kontrolünün düzenlenmesi adına hücrenin içine daha fazla glukoz alımının yapılabilmesi için glukoz taşıyıcıları GLUT1, GLUT2, GLUT3 ve GLUT4'ün ekspresyonları artış yönünde düzenlenir. Kansere hücrelerinin daha fazla glukoz tüketme durumu ve glukoz taşıyıcı proteinlerdeki ekspresyon artışları, tümörlerin görüntülenmesinde pozitron emisyon tomografisi (PET) ve 18F-fluorodeoksiglukoz gibi radyoaktif işaretlenmiş glukoz analoglarının kullanılmasını sağlamıştır [46, 47].

Warburg hipotezi doğrultusunda glikolitik fenotipin tümör hücrelerine proliferatif yönde avantaj sağladığı şüpheli görünmektedir. Çünkü, ilk olarak anaerobik metabolizma glikozun tam oksidasyon ile toplamda 32 ATP üretmesi yerine, glikoz başına sadece 2 ATP üretimiyle sonuçlanan verimsiz bir süreçle kullanılmasına yol açar (Şekil x1). İkinci olarak da, glikolizin metabolik ürünleri olan hidrojen iyonları (H⁺) hücrelere toksik etki gösteren asidik bir mikroçevre oluşumunu desteklemektedir. Ancak kanser hücrelerinin aerobik glikolizi tercih etmelerinin çeşitli nedenleri vardır.

Tümör hücreleri kültür ortamındaki normoksik koşullar altında metabolik fenotiplerini korurlar, bu da aerobik glikolizin stabil genetik veya epigenetik değişikliklerle düzenlendiğini gösterir. FdG-PET sonuçlarına uygun olarak, hücre kültür hatlarındaki glikolitik oran, tümör agresifliği ile ilişkili gibi görünmektedir. Örneğin, non-invaziv MCF-7 meme kanseri hücreleri, oldukça invaziv olan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına kıyasla çok daha düşük aerobik glikoz tüketim oranlarına sahiptir.

Bu sonuçlar, tümörler tarafından değiştirilmiş glikoz metabolizmasının hipoksi ortamına adaptasyondan daha fazlası olduğunu göstermektedir. İnvaziv insan kanserlerinde normoksik koşullar altında bile aerobik glikolizin kalıcılığını sürdürmesi ve bunun tümör agresifliği ile ilişkisi, glikolitik fenotipin kanserin somatik gelişimi ve malign fenotipe proliferatif avantaj sağlaması açısından önemli bir bileşen olduğunu göstermektedir [48].

Polip veya karsinoma in situ gibi pre-malign bir lezyon vasküler bir stromaya sahip olabilir, hiperplastik epitel fiziksel olarak bazal bir membran tarafından kan damarı kaynağından açıkça ayrılır. Kan damarları stromal bölmeyle sınırlıdır ve bu nedenle, erken karsinogenez ve malign fenotip gelişimi gerçekte avasküler bir ortamda meydana gelir. Sonuç olarak, oksijen ve glukoz gibi substratlar, bazal membran boyunca ve içindeki damarlardan diffüz olmalı ve metabolize edildikleri tümör hücrelerinin katmanlarına yayılmalıdır. Bu difüzyon ve tüketim süreci, Krogh tarafından oksijen konsantrasyonlarının bir kapilerden uzaklaştıkça azaldığını gösteren reaksiyon-difüzyon denklemleri ile modellenmiştir [49]. Bu nedenle, pre-malign lezyonlar kaçınılmaz olarak oksijen difüzyon sınırının yakınında hipoksik bölgeler oluşturacaktır, çünkü sürekli çoğalma epitelyal tabakanın kalınlaşmasına neden olur ve bu da hücreleri bazal membranın diğer tarafında kalan kan akışlarından daha uzak tutar. Bu katmanda, mikroçevre seçim kuvvetleri, zorlu ortamlara adapte olan (hipoksi ve aside bağlı hücre toksisitesine direnç geliştirebilen) ve oksijen ve glukoz gibi sınırlı kaynaklar için rekabet eden fenotipleri destekleyecektir [50, 51].

Normal hücrelerin çoğalması, diğer hücreler ve hücre dışı matris (ECM) ile etkileşimleri ve büyüme faktörlerinin seviyeleri ile kontrol edilir. Karsinogenezin erken dönemlerinde, normal doku kısıtlamalarına karşı oluşan hücresel duyarlılıkta değişiklikler gerekir. Bu nedenle proliferasyon, diğer hücreler, ECM ve/veya büyüme faktörleri ile oluşturulan büyüme kısıtlamalarına karşı duyarlılığı azaltan genetik değişiklikleri takip edecektir [52]. Bununla birlikte, gelişimsel modeller, pre-malign tümör popülasyonlarının klonal genişlemesinin yani normal doku etkileşimleri tarafından sınırlandırılmayan hücre çoğalmasının, popülasyonu kan dolaşımından uzaklaştırarak, substrat mevcudiyeti ile sınırlandırıldığını göstermektedir. Düşük oksijen

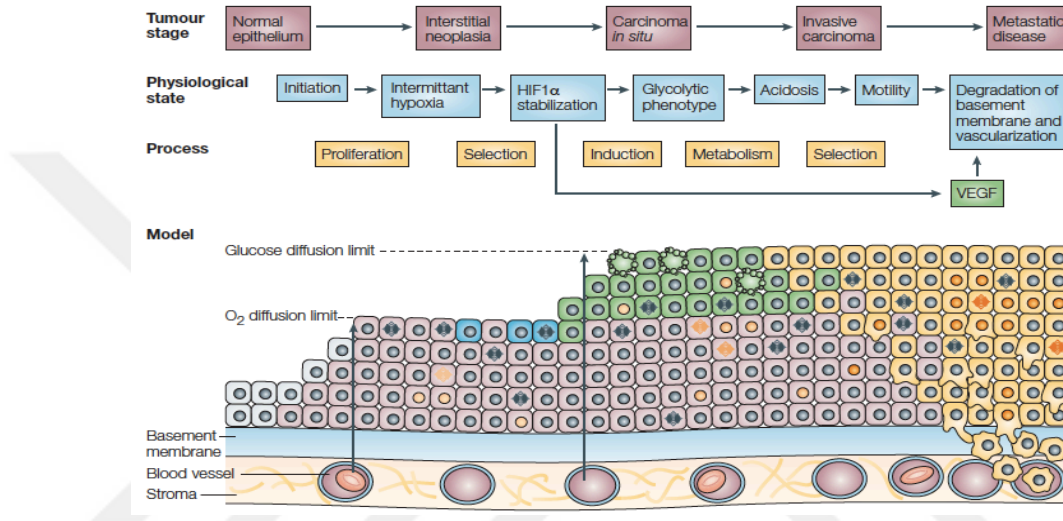
konsantrasyonları, neoplastik hücre popülasyonlarının karşı karşıya kaldığı ilk substrat sınırlaması gibi görünmektedir, çünkü reaksiyon difüzyon modelleri, pO₂'nin kan damarlarından uzaklaştıkça glukoz seviyelerine göre daha hızlı azaldığını ve oksijen dağılımının da dağınık olduğunu göstermiştir [53].

Hipoksi, pre-malignlezyonlarda oksijen yokluğunda bile metabolik aktivitelerin sürdürülebilir olmasını sağlayan anaerobik metabolizmaya dönüşüm şeklinde adaptif bir karakter gelişir. Vasküler düzenlenme ile yeni kan damarlarının oluşumu ve sağkalımını destekleyen hipoksi ile indüklenen VEGF ekspresyonu gerçekleşir. Biyoenerjetik açıdan bakıldığında, hipoksi daha iyi hayatta kalacakları için anaerobik glukoz metabolizmasının artış gösterdiği hücreleri seçer. Glikolizin artışının, hipoksi/anoksiye başarılı bir adaptasyon olmasına rağmen, artan asit üretimi nedeniyle hücre dışı pH'ta önemli düşüşlere neden olan negatif sonuçlara sahiptir [54].

Normal hücrelerin asidik bir mikroçevreye uzun süre maruz kalması p53- ve kaspaz-3-bağımlı apoptosis ve nekroz ile sonuçlanır. Apoptoz için fizyolojik tetikleyici, hücre içi asidoz ile oluşan transmembran H⁺ gradyanının çökmesi olabilir, ancak diğer faktörlerin de rolü olabilir. Hücre içi pH, aynı anda eksprese olan birden fazla H⁺ taşıyıcı ailesi tarafından sağlanır. Na⁺ -H⁺ değişimi ve vakuolar H⁺ -ATPazlar, apoptoza direnç gösterebilir [55].

Glukoz tüketim oranı arttıkça, azalan glukoz miktarına karşı ilave adaptasyonlar da gerekebilir. Giderek azalan kaynağa karşı artan hücrel rekabet daha fazla sayıda fenotip açığa çıkışını artıracak ve destekleyecektir. Örneğin, özofageal, gastrik, meme ve kolon kanserlerinde karsinogenez sırasında glikoz taşıyıcılarının (GLUT) bu şekilde arttığı gözlenmiştir. Özet olarak, glikolitik fenotip başlangıçta lokal hipoksiye adaptasyon olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.7.1). Kalıcı veya döngüsel hipoksi, daha sonra oksijen varlığında bile, glikolizin artmış bir şekilde düzenlenmesine yol açan seçilimi uygular. Bu düzenleme, mutasyonlar veya promotörlerin metilasyon modellerinde değişiklik gibi epigenetik değişiklikler yoluyla meydana gelebilir. Artan glikolizin sonuçları, yüksek asit ve düşük glikoz konsantrasyonlarına sahip ortamlara daha fazla adaptasyon gerektirir. Bu gelişimsel seçim kanserin gelişiminde önemlidir. İlk olarak, kalıcı aerobik glikoliz yoluyla proliferatif avantajı olan bir fenotip açığa

çıkarak, bu kendine zarar vermeyecek ancak rakip popülasyonlar için ölümcül olabilecek bir mikroçevre geliştirmesini sağlar. İkincisi, mikroçevrenin asitleştirilmesi, hem bitişik normal popülasyonların yok edilmesini hem de ECM'nin aside bağlı bozunması ve anjiyogenezin teşviki yoluyla tümör istilasını kolaylaştırır [56].



Şekil 4.7.1. Karsinojeniz sürecinde hücre-mikroçevre etkileşimleri modeli [56]

4.7.1. Warburg Etkisi ve Moleküler Mekanizmalar

Kanser hücrelerinde aerobik glikolizin düzenlenmesine yol açan moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Genellikle glikoz taşıyıcılarının ve heksokinazların glikolitik süreci düzenleyen anahtar moleküller olduğu varsayılır. Glikolitik tepkinin temel bir düzenleyicisi, transkripsiyon faktörü hipoksi ile indüklenebilir faktör-la (HIF1)'dir. Bu faktör, hipoksik strese karşı pleiotropik bir tepkiye aracılık eder ve glukoz taşıyıcıları dahil olmak üzere, anjiyojenik büyüme faktörleri (örneğin, VEGF); heksokinaz II; ve hematopoietik faktörler (örneğin, transferrin ve eritropoietin) gibi hayatta kalma genlerini indükler [57].

HIF1 α seviyeleri aslında bir dizi faktör tarafından dengelenebilir, siklooksijenaz-2 aktivitesi, insülin benzeri büyüme faktörü 2, ERBB2, epidermal büyüme faktörü reseptörü, fosfatidilinositol 3-kinaz, ısı şoku proteini 90, mikrotübül durumu, thioredoxin ve histon deasetilaz da dahil olmak üzere birkaçını içermektedir [58]. Buna

ek olarak, Ras ve Myc gibi onkogenlerin aktivitesi ve yetersiz p53 kontrolü nedeniyle tümörlerde glikolitik enzimlerin çoğunun ekspresyonunun belirgin şekilde yükseldiği rapor edilmiştir. Özellikle glikolitik genlerin doğrudan veya dolaylı aktivasyonu yoluyla glikolizin ana uyarıcısı olarak kabul edilen c-Myc ve HIF-1 α , hekzokinaz-2, fosfofruktokinaz-1 ve laktat dehidrogenaz A gibi enzimlerin sentezlenmesini teşvik eder. HIF-1 α , esas olarak hipoksizde işlevsel iken, c-Myc'in, glikolitik hedef genlerin normoksideki ifadesini teşvik ettiği iyi bilinir. Bu eşgüdüm, tümörlerin hızlı proliferasyonunu ve hızlandırılmış biyosentezini desteklemek için sürekli olarak glikolizi desteklemektedir [59, 60]. Buna karşılık, p53'ün glikoz taşıyıcı GLUT1 ve GLUT4' ün transkripsiyonunu doğrudan inhibe ederek ve GLUT3' ün ekspresyonunu baskılayarak glikoz alımını baskıladığı bilinmektedir. GLUT3 bir NF- κ B hedef genidir ve p53'ün NF- κ B aktivasyonunu bloke ettiği ve dolayısıyla GLUT3 transkripsiyonunu ve ekspresyonunu önemli ölçüde düşürdüğü bulunmuştur [61].

P53, c-Myc ve HIF-1 α arasındaki etkileşim, kanser glikolizinin durumu üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptir. Birçok çalışma kanser glikolizinin bu üç ana düzenleyicisi arasındaki iletişimi ve bu faktörler arasındaki dengenin kanser metabolizmasının durumunu nasıl kontrol ettiği üzerinde durmuştur [62, 59].

4.7.2. Anjiyogenez

Glikolitik fenotip avasküler bir mikroçevrede gelişmektedir. Yani, gelişen tümör hücreleri, *in situ* tümörlerde olduğu gibi, kan damarı kaynaklarından bazal membran aracılığıyla ayrılır. Bu durum, substratların vaskülarize stromadan proliferatif tümör epiteline difüzyonunu gerektirir. Bu nedenle, geç evre karsinomun *in situ* olarak “anjiyojenik” olarak nitelendirilebilmesine rağmen, bazal membran invaziv bir hücre tarafından parçalanıncaya kadar tümör vaskülarize olmaz. Aslında, laktik asitin avaskülarize ortamlarda bulunmasından ötürü glikolitik fenotip değişimi anjiyogenez gelişiminden önce gerçekleşmektedir [56, 63]. Her ne kadar glikolitik fenotip, pre-malign lezyonlardaki çevresel kısıtlamalara adaptasyonun bir sonucu gibi görünse de, malign progresyon sonrası normoksi koşullarında bile primer ve metastatik tümör odaklarında yer alan hücrelere güçlü selektif büyüme avantajı sağlamaktadır. Yani

kısaca glikolitik fenotip, invaziv tümör büyümesi için gerekli bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır [64].

Glikolizin sürekli artışı, mikroçevrenin akut ve kronik olarak asitleşmesine yol açar. İnsan ve hayvan tümörlerinde hücre dışı pH'nın asidik değerlerde (yaklaşık pH 6.0) olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Hücre dışı asidoza adapte olacak bir mekanizmaya sahip olmayan normal hücreler (p53 mutasyonu gibi), bu koşullar altında hayatta kalamazlar, oysa tümör popülasyonları çoğalmaya devam eder. Ek olarak asidozun kendisi muhtemelen DNA onarımının engellenmesi yoluyla mutajenik olması yanında, hem gap-junction iletkenliğinin inhibe edilmesine hem de normal diploid fibroblastların kendiliğinden dönüşümüne yol açabilir. Sonuç olarak ortaya çıkan glikolitik fenotipik çeşitlilik, tümör popülasyonunun gelişimsel potansiyelini arttırmakta, bu da malign ilerlemeyi ve terapötik stratejilere adaptasyonu hızlandırmaktadır (Tablo 4.7.2.1). Ayrıca düşük pH'ın *in vitro* invazyon ve *in vivo* metastaz durumunu desteklediği bilinmektedir [65, 64]. Bu indüksiyonun mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, ECM ve bazal membranların bozulmasını destekleyen metalloproteinaz ve katepsinlerle ilişkili olduğu yönünde çalışmalar bulunmaktadır [56].

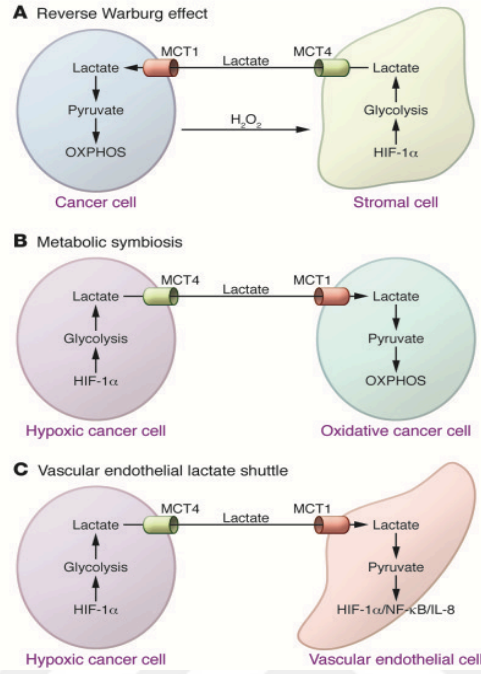
Tablo 4.7.2.1. Mikroçevrede artan hipoksi ve asidoz durumlarının sonuçları [56]

Hipoksi	Asidoz
Radyoterapi direnci	Artmış radyoterapi direnci
İlaç direnci	Antrasiklinlere direnç
Metastaz ve invazyon	Artmış metastaz
Artan mutasyon oluşumu	Artmış migrasyon ve invazyon
HIF-1a ile artan gen ekspresyonları	Mutajenez
Apoptoz	Apoptoz

4.8.Laktat Metabolizması

Tümör hücrelerinin, glikolizin son ürünü olan pirüvatı işleyiş biçimi normal hücrelerden farklıdır. Normal hücrelerde, pirüvatın çoğu TCA döngüsünü tetiklemek

için asetil-CoA'ya dönüştürülür, bir kısmı ise alanin veya laktat üretmek için kullanılır. Tümör hücrelerinde ise, sağlıklı hücrelerin aksine, laktat dehidrogenaz A'nın (LDHA) upregülasyonu nedeniyle, pirüvat-laktat dönüşümü tercih edilir. Bu dönüşüm reaksiyonu, glikolizi hızlandırmak için NADH'yi yeniden üretmeye yardımcı olduğu için kanser hücreleri açısından yararlıdır [47]. Kanser hücrelerinin hidrojen peroksit salgılaması durumunda tümör stromasında sahte hipoksik bir çevre oluşumu söz konusu olur. Buna karşılık, stromal hücrelerde HIF-1 α ve MCT4 ekspresyonu ile oluşan glikoliz sonucu açığa çıkan laktat tümör hücreleri tarafından MCT1 yoluyla alınır ve oksidatif bir metabolit olarak kullanılır. Bu durum, ters Warburg etkisi olarak tanımlanmaktadır (Şekil 4.8.1). Ayrıca, MCT4 taşıyıcısı vasıtasıyla tümör mikroçevresine salınan laktat kan dolaşımındaki besin öğelerine erişimi olmayan diğer kanser hücrelerine besin kaynağı olarak sunulmaktadır. Mikroçevrede bulunan laktat, MCT1 taşıyıcısı tarafından alınıp metabolizma için TCA döngüsü tarafından kullanılabilir. Bu geçiş, tümörün hipoksik bölgelerine glikoz vermeyi kolaylaştırır (Şekil 4.8.1). Laktat üreten kanser hücrelerinin ve laktat tüketen tümör hücrelerinin simbiyozu, tümörlerdeki sızıntılı ve kötü şekillendirilmiş tümör kan damarı ağının neden olduğu koşullara tümörlerin adaptasyonu için etkili bir yoldur. Vasküler endotelial laktat mekiğinde, tümör hücreleri, MCT4 vasıtasıyla vasküler endotel hücreleri tarafından alınan laktatı mikroçevreye sunar. MCT1 ile endotelial hücre tarafından alınan laktat daha sonra, HIF-1 α ve NF- κ B/IL-8 sinyalizasyonunu aktive eden pirüvata dönüştürülür (Şekil 4.8.1) [6].



Şekil 4.8.1. Kanserde laktat mekiği modelleri [6]

Ayrıca, pirüvatın laktata dönüştürülmesi ile azalan reaktif oksijen türlerinin seviyeleri kanser hücrelerindeki hücre içi oksidatif stresini azalttığı için tümörlerin sağkalımını teşvik etmektedir. Ayrıca, laktat hücre dışı mikroçevrenin pH'sını düşürür, böylece ekstrasellüler matriksin parçalanması için metaloproteazların aktivasyonu kolaylaştırır. Tüm bunların göz önünde bulundurulması sonucu, laktatın kanserin yayılması, metastazı ve inaktif terapötik yanıtının için uyarıcı durumda olduğu kabul edilebilir [66].

4.9.Laktatın Karsinogeneze Etkisi

Glikolitik tümörlerde kanser hücrelerinin laktat seviyeleri 40 kata kadar yükselir ve bu artış kanserin agresifliği yanında kötü sağkalım ile yüksek korelasyon gösterir [8]. Bu nedenle, Warburg etkisi ile laktatın üretilmiş olmasıyla, laktatın yolculuğu bitmiş sayılmaz. Transforme olmuş hücrelerin sınırları içinde ve ötesinde, aday kanser hücrelerinde, laktat, MCT4 ve MCT1 ekspresyonunu yükseltir, böylece laktat, tümör büyümesinin ve karsinogenezin düzenlenmesinde anahtar bir element yapar. Hanahan ve

Weinberg, kanser araştırma tarihinin en çok alıntılanan makalesinde, kanserin belirleyici özelliklerini proliferasyon için sinyal verme, büyüme bastırıcılardan kaçınma, hücre ölümüne direnme, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, anjiyogenezi indükleme ve istila ve metastazı aktive etme şeklinde tanımlamıştır [17, 67]. Laktat, karsinogenezdeki tüm büyük adımlara katkıda bulunmaktadır [68].

4.9.1.Laktatın Anjiyogenezdeki Rolü

Anjiyogenez, tümörigenezde önemli bir adımdır. Laktatın, anjiyogenezde, hücre göçünde, VEGF'nin uyarılmasında, yara iyileşmesinde ve onarımında anahtar bir rol oynadığı bilinmektedir [69, 70]. Kanserde laktat, anjiyogenezde endotel hücrelerinde VEGF protein ekspresyonunu uyarıcı yönde rol oynar. Laktat tümör endotel hücrelerine MCT4 yoluyla girebilir ve bu şekilde tümör hücrelerinden salınan laktat, anjiyogenez ve tümör büyümesini uyarmak için yeterlidir [71]. Stromayı çevreleyen kanser hücreleri, kanser büyümesini ve kanser hücrelerinin hareketliliğini artıran yüksek seviyelerde hyaluronan içerir. Laktat, hyaluronan üretimini artırır, bu nedenle anjiyogeneze yardımcı olur [72]. Laktat üretimini ve taşınımını inhibe etmek, anjiyogenez azaltır veya inhibe eder. LDHA'nın bir LDHA inhibitörü olan sodyum okzamat ile inhibe edilmesi anjiyogenez büyük ölçüde azaltır, ayrıca LDH'nin knock-out olması kanser hücresi proliferasyonunu da inhibe eder [73, 5]. Kanser hücreleri arasında MCT'leri ve laktat taşınımı hedefleyen yeni yaklaşımlar, günümüzde azalmış anjiyogenez ve hücre göçü yönünde etki göstermektedir [68].

4.9.2.Laktatın Hücre Göçü ve Metastazı Teşvik Etmedeki Rolü

İnvazyon kanserogenezde diğer önemli bir adımdır, laktat endotel hücre invazyonunu arttırmada anahtar unsur olarak görünmektedir. Gliyoma hücrelerinde, laktat, glioma hücrelerinin göçünün temel bir düzenleyicisi olan transforme edici büyüme faktörü- $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) ekspresyonunu indükler [74]. Eksojen laktat eklenmesi, konsantrasyon ile ilişkili bir şekilde farklı kanser hücre hatlarının hücre hareketliliğini ve göçünü artırır. Ayrıca yaklaşık yirmi yıldır laktat seviyesinin farklı kanser türlerinde metastaz ile yüksek derecede korele olduğu da bilinmektedir. Laktatın, metastaz

basamaklarına etkisi tam olarak anlaşılmasına rağmen, yüksek laktat konsantrasyonları kanserin erken evresinde metastaz sıklığı ile ilişkilidir [68].

4.9.3. Laktatın Kanser Hücresinin İmmün Sistemden Kaçışındaki Rolü

Laktat, kanser hücrelerinin immün sistemden kaçışına farklı şekillerde katkıda bulunur. Monositler oldukça hareketli hücrelerdir ve tümörle ilişkili makrofajların öncüleridir. Laktat, monosit göçünü ve sitokin tümör nekroz faktörü ve interlökin-6 (IL-6) salınımını inhibe eder [75]. Ayrıca laktat, T hücrelerinin aktivasyonunu ve ayrıca monositlerin dendritik hücrelere farklılaşmasını inhibe eder. Laktat, insan T hücrelerinin sitokin üretiminde %95'e kadar bir düşüşe neden olur ve sitotoksik aktiviteyi %50 azaltır [76]. Laktat aynı zamanda sitolitik fonksiyonu inhibe ederek doğrudan doğal öldürücü hücre fonksiyonunu da inhibe eder ve dolaylı olarak doğal öldürücü sitotoksitesini inhibe eden miyeloid türevli bastırıcı hücrelerin sayısını artırır. Oluşan asidoz laktatın bağışıklık sistemini baskılamasının başka bir yolu olabilir [77]. Kanser hücrelerinde hücre içi pH seviyeleri, MCT'lerin mikro çevreye laktat ve H⁺ verme etkisinden dolayı nötr veya hafif alkalidir. Hücre büyümesi ve çoğalması için aktive edildiğinde, T-hücreleri yüksek glikolitik aktiviteye geçer ve böylece MCT'ler yoluyla önemli miktarda laktat üretir ve ihraç eder [68].

4.9.4. Laktatın Kanser Hücresinin Kendine Yeterliliği ve Sürekli Glikolizdeki Rolü

Laktat, biyoenerjetik, kendine yeterlilik ve kanser hücrelerinin sürdürülebilirliği için merkezi bir rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinin kendi kendine yeterliliği, yüksek glikolitik akıya bağlı olarak, kanser hücrelerinin, anjiyogenez, immün kaçış, hücre göçü ve metastaz için gerekli olan laktat üretimini de sağlar. Ayrıca, daha önce belirtildiği gibi, bu kendi kendine yeterlilik ve kronik glikoz kullanımı, insan vücudundaki sınırlı glikojen depolaması nedeniyle (~400–500g veya 1,600-2000kcal) tek başına kanser hücresi glikojenolizinden türetilemez. Bu nedenle, esas olarak vücut amino asidinden ve protein rezervlerinden türetilmiş prekürsörler içindeki glukoneojenik mekanizmalar, kanser hücrelerine yeterli glikoz beslemesini sağlar (Şekil 1). Kanserde, glukoneogenez,

glutaminin degrade olması ile desteklenir. Glutaminoliz, kanserde yaygın bir metabolik yoldur ve birçok kanser türünde artış gözlenir [78].

Glutamin, kanserlerde fazla eksprese edilen ve c-MYC tarafından düzenlenen glutaminaz ile glutamata dönüştürülür. Her ne kadar kanser hücreleri tarafından glutamin kullanımı tarihsel olarak bir biyoenerjetik substrat ve biyosentetik öncü olarak düşünülmüş olsa da, glutaminoliz de laktat üretir. Glutamin, farklı kanserlerde aşırı eksprese edilen malik enzim aracılığı ile önce malata sonrada pirüvata oksitlenir [79]. Kanser hücrelerinde malatın piruvat'a dönüşüm oranlarının daha yüksek olduğu, 1973 yılında Lehninger'in laboratuvarında gözlemlenmiştir [80]. Glikolitik kanserlerde LDHA'nın artmış ekspresyonu, piruvatın laktata indirgenmesinde bir artışa yol açmaktadır, dolayısıyla kanserde glutaminoliz, laktajenez için ikincil bir karbon kaynağı olarak kabul edilebilir. Ayrıca, oksidatif kanser hücrelerinde, laktat, glutamin taşıyıcı ASCT2 ve glutaminaz 1 (GLS1) ekspresyonunu artırarak glutamat alımını ve katabolizmayı desteklediği için glutamat ve laktat arasında karşılıklı bir ilişki olduğu görülmektedir. Vücuttaki ana glutamin kaynağı, iskelet kası içindeki serbest amino asit havuzunun yaklaşık % 50-60'ını oluşturduğu için iskelet kasıdır [81]. Artan glutaminoliz, glukoz kullanımı ve laktat üretimi ile aynı şekilde kanser saldırganlığı ve mortalite ile korele olan kanserde kaşeksiyi de açıklayabilir [68].

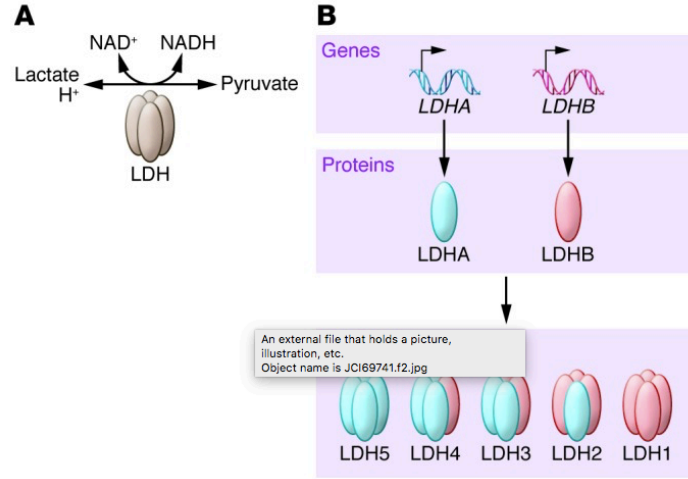
4.9.5. Tümör Mikroçevresinin Şekillenmesinde Laktatın Rolü

Kanserojenezdeki kilit rolü nedeniyle, tümörle ilişkili mikroçevre kanser araştırmalarında büyük dikkat çekmektedir. Tümör mikroçevresi malign hücreler, bağışıklık hücreleri, kanser dışı hücre stroması, fibroblastların yanı sıra tümöre ait damarlar ve lenfatiklerinden oluşur. Chen ve arkadaşları, tümör mikroçevresinin tümörün değişim süreçlerini şekillendiren patolojik olarak aktif bir niş olduğunu açıklar [82]. Tümör mikroçevresinin asidik özelliği, tipik bir özelliği, karsinojenez sürecinde yer alan moleküllerin etkileşimi ve sinyalleşmesi için kilit rol oynamaktadır. Laktat, sürekli laktat ve protonun kanser hücrelerinden hücre dışı boşluğa aktarılması nedeniyle hücre dışı mikroçevrenin asidozundan sorumlu ana elementtir. Aslında, kanser

hücrelerinde hücre içi pH, kanserlerde pH 5.5 ila 7.0 olan yaygın hücre dışı alana kıyasla hafif alkali olma eğilimindedir [83, 84].

4.10. Laktat Dehidrojenaz Altbirimleri ve İzofomları

Laktat dehidrojenaz [(S)-laktat: NAD⁺ oksidoredüktaz; EC 1.1.1.27] piruvat ile laktat arasındaki dönüşümü katalizleyen NAD⁺ bağımlı enzimler ailesidir. LDH, LDHA (M) ve LDHB (H) şeklindeki iki ayrı gen tarafından kodlanan M ve H alt birimlerinin biraraya gelmesiyle oluşan bir homo veya hetero-tetramerdir. Üçüncü bir alt birim, ayrı bir LDHC geni tarafından kodlanan LDHC, yalnızca testis ve spermde eksprese edilir ve muhtemelen LDHA geninin bir kopyasıdır. LDH tetramerleri, elektroforetik hareketlilik, piruvat ve laktat için Km, immünolojik özellikler, ısıl stabilite ve koenzim analogları veya aşırı piruvat tarafından inhibisyon açısından farklılık gösteren farklı izoenzimler oluşturur [85]. LDH, piruvat ve laktatın çift yönlü dönüşümüne aracılık eder ve ortaya çıkan bir antikanser hedefidir (Şekil 4.10.1). LDH, iki farklı alt birimden oluşan bir tetramerdir, LDHA ve LDHB, beş farklı kombinasyonda birleştirilebilir (LDH1, dört LDHB alt ünitesinden oluşur; LDH2, üç LDHB ve bir LDHA alt ünitesinden oluşur; LDH3, iki LDHB ve iki LDHA alt ünitesini içerir; bir LDHB ve üç LDHA alt birimi ve LDH5 dört LDHA alt birimi içerir) (Şekil x6). LDHB, kalp kasında bulunan baskın izoform olmasına rağmen, her yerde açıkça ifade edilir. LDHA, iskelet kasında bulunan baskın izoformdur. Özellikle, LDHA, piruvat redüksiyonu için LDHB'den daha yüksek bir afiniteye sahiptir. Bu dikkate alındığında, LDHA ve özellikle LDH5 tetramer, laktat için lokalize olur ve gerekli olan NAD⁺ üretir. Buna karşılık LDHB, laktatı piruvat'a dönüştürür, bu da hücrelerin oksidatif metabolizma için (örneğin, kalp dokusu ve nöronlar) ve/veya glukoneogenez için (örneğin, karaciğerde ve böbrekte) besin kaynağı olarak laktatın kullanılmasına izin verir.



Şekil 4.10.1. Laktat dehidrogenaz aktivitesi ve tetramerleri [6]

4.10.1.Laktat Dehidrogenaz A

Laktat dehidrogenaz A (LDH-5 veya LDHA4), dört LDHA alt biriminden oluşur ve LDH izoformlarının piruvat için en düşük K_m değerine sahip olanıdır ve glikolizin devam etmesi için gerekli olan NAD + moleküllerinin yenilenmesi ile birlikte glikolizin son aşaması olan pirüvatın laktata indirgenmesini katalizler. LDHA esas olarak sitoplazmada bulunur, ancak çekirdekteki tek iplikli DNA' yı bağladığı da bulunmuştur [85]. LDHA değerli bir prediktif/prognostik belirteç olarak kabul edilmiştir; aşırı ekspresyonu kanser invazivliği ile ilişkilidir ve yüksek serum laktat seviyeleri kötü prognoz ve kemo- ve radyoterapiye direnç ile ilişkilidir [86].

LDHA ifadesi c-Myc, HIF-1 ve mikro-RNA 34a ile düzenlenir. LDHA'nın kanser hücrelerinde Warburg fenotipinin korunmasındaki kilit rolü, çeşitli LDHA inhibisyonu ile meme, akciğer, karaciğer, lenfoma ve pankreas kanserlerinde tümörjenitenin ciddi şekilde azaldığı raporlanmıştır. Azalan LDHA aktivitesi, oksidatif fosforilasyon ve mitokondriyal oksijen tüketiminin uyarılmasına ve mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasına ve ROS üretimi ile apoptozun artmasına neden olur. Bu veriler, LDHA eksikliğinin normal şartlar altında ciddi sonuçlara yol açmaması gerçeği ile birlikte, LDHA'yı antikanser tedavisi için çekici bir hedef haline getirmektedir [87, 85].

Tümör büyümesini *in vitro* ve *in vivo* olarak baskıladığı gösterilen birçok LDHA inhibitörü, belli başlı farmasötik gruplar tarafından geliştirilmiştir, ancak özellikle birçok enzime ortak olan dinükleotit bağlanma bölgesini hedef alanların orta düzeyde seçiciliği vardır. Bu inhibitörler, diğer tedavilerle kombinasyon halinde daha güçlü olmakla birlikte, hiçbiri klinik çalışma aşamasına gelmemiştir. Geçtiğimiz yıllarda, her iki izoformu nanomolar potansiyeli ile inhibe edebilen GNE-140 adlı yeni bir LDHA inhibitörü tanımlanmıştır. Çalışmaları, ağırlıklı olarak glikolitik hücre çizgilerinin LDHA inhibisyonuna karşı daha duyarlı olduğunu, oksidatif fosforilasyona daha fazla dayanan hücre çizgilerinin doğal olarak dirençli olduğu gösterilmiştir ve bu hücrelerde LDHA inhibisyonunun oksidatif fosforilasyon inhibitörleri ile kombinasyonu sentetik olarak öldürücüdür [88, 85].

4.10.2.Laktat Dehidrogenaz B

LDHB dört B alt ünitesinden oluşur ve NADH formasyonu ile birleştiğinde pirüvat için laktat oksidasyonunu katalize eder. Çok sayıda çalışma LDHB'nin kanserin alt tiplerinde rolünü araştırmıştır, ancak rolü belirsizdir. LDHB'nin, hem ölümsüzleştirilmiş fare hücre hatları hem de insan kanser hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR yolu ile pozitif olarak düzenlendiği bulunmuştur. Ekspresyonu, birçok kanserde anahtar bir tümörjenik sürücü olan sinyal transdüktörü ve transkripsiyon STAT3'ün aktivatörü ile uyarılmaktadır [89]. Ayrıca, LDHB'nin üçlü negatif meme kanserinde ve Kras'a bağlı akciğer adenokarsinomunda artmış olduğu ve kötü hasta sonuçları ile korele olduğu bulunmuştur. LDHB'yi azaltmak, hücre büyümesini, çoğalmasını inhibe etmektedir ve LDHB kaybının, *in vitro* ve *in vivo* olarak tümör büyümesini durdurduğu gösterilmiştir [90, 91]. Bu durum, stromal veya kanser hücrelerinin aerobik glikolize maruz kalmasını ve laktat üretmesini öneren “ters Warburg etkisi” ile uyumludur ve daha sonra MCT1 tarafından pirüvate LDHB katalizörlü dönüşüm yoluyla oksidatif hücreleri yakmak için alınır. Aslında, MCT1 ekspresyonunun TNBC'de yüksek LDHB ekspresyonu ile korele olduğu bulundu [85]. Bunlara zıt sonuçlar içeren çalışmalarda LDHB'nin artmış ekspresyonunun daha iyi prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur ve buna göre LDHB ekspresyon kaybının

metastatik progresyon ile ilişkili olduğu savunulmuştur. Bunun altında yatan mekanizma, LDHB promotör hipermetilasyonunu ve bunun sonucunda transkripsiyon seviyesinde gen susturmayı içeriyor gibi görünmektedir, ancak LDHB kaybının tümör ilerlemesine tam olarak nasıl katkıda bulunduğunu tam olarak anlayamamıştır [92].

4.11.Kanserde Terapötik Hedefi Olarak Laktat Dehidrogenaz

Glikoliz, metabolizmaya nükleotidlerin, amino asitlerin ve lipitlerin biyosentezi için öncüler sağlar. Glikolizin çok yüksek oranı, hücrelerin hızlı çoğalma sırasında biyosentetik akışın korunmasına ve çok miktarda pirüvat üretilmesine neden olur. Bununla birlikte, yüksek glikolitik oluşumlar, mitokondride pirüvat oksidasyonunun başlatılmasında etkin olan enzim pirüvat dehidrojenazın (PDH) maksimum kapasitesini önemli ölçüde aşabilir. Sitoplazmada pirüvat birikimini önlemek için, pirüvatın çoğu laktat dehidrogenaz A (LDHA) ile laktata dönüştürülür; bu, pirüvatı uzaklaştıran ve NAD'yi NADH'den yeniden üreten yüksek kapasiteli bir sistemdir [46].

Önemlisi, glikoliz kanserli hücelere sadece enerji değil aynı zamanda kök hücrelerinin metabolik profillerine benzeyen biyosentez için gerekli öncül maddeleri de sağlar. Glukoz-6-fosfat, dihidroksiaseton fosfat gibi bazı glikolitik metabolitler diğerlerinin yanında metabolizma yollarına yönlendirilebilir. Örneğin glukoz-6-fosfat nükleotidleri sentezlemek için pentoz fosfat yolu ile sıklıkla tüketilir Dihidroksiaseton fosfat, tümör büyümesini ve proliferasyonunu hızlandırmak için yeni organellerin ve hücrelerin toplanması için önemli olan lipid sentezi için kullanılabilir. Glikolizden ileri gelen metabolitler, aktif hücre bölünmesi ve büyük ölçekli biyosentetik programlar için gerekli olan amino asit üretimi ve makromolekül sentezi için de önemli maddelerdir. Glikolitik enzimler metabolik işlevlerine ek olarak kanser sağkalımı, metastaz, invazyon, kromatin yeniden şekillendirme, gen ekspresyonu regülasyonu ve diğer önemli hücresel süreçleri destekleme konusunda aktif rol oynamaktadır. Bu nedenle, glikolitik enzimlerin aktivitelerini hedeflemek, kanser tedavisi için yararlı stratejiler olabilir.

Önceden tartışıldığı gibi, LDHA ve LDHB'nin diferansiyel ekspresyonu çoklu malignitelerde bildirilmiştir ve sıklıkla klinik sonuçlarla hastalığın sonuçları arasında

korelasyon vardır. Gelecekteki terapötik tasarım için LDHA ve LDHB'yi hedeflemek büyük avantaj olacaktır. Etkili hedeflemenin olası yollarından bazıları, küçük molekülü inhibitörlerin ve küçük etkileşimli RNA aracılı moleküler inhibisyonun kullanılmasıdır.

4.11.1. Küçük Molekül İnhibitörleri

Bu bağlamda, son birkaç yılda yapılan *in vitro* ve *in siliko* çalışmalar, potansiyel terapötik hedefler olarak LDHA ve LDHB'yi ortaya koymuştur. Seçici, küçük molekül inhibitörlerin LDH aracılı kanser hedeflemesi için öncü adaylar olarak tanımlanması umut vericidir ve spesifik yolak inhibitörleri ile kombine kullanımları farklı metabolik tipteki tümörlerde klinik yararın genişletilmesine yardımcı olacaktır [88]. Küçük molekül inhibitörleri geliştirmek için, X-ışını kristalografisi, moleküler dinamik ve simülasyonlar, reseptör bazlı farmakofor modelleme yaklaşımı ve yapı-tabanlı sanal taramalar gibi farklı *in siliko* yaklaşımlar kullanılmıştır. Hem doğal hem de sentetik kaynaklı küçük molekülü inhibitörler ile yapılan prelinik laboratuvar çalışmaları LDH ekspresyonunu bloke etme potansiyeli olduğunu göstermiştir [11]. FXII (3-dihidroksi-6-metil-7-(fenilmetil)-4-propilnaftalen-1-karboksilik asit), çoklu kanserde kanser ilerlemesini engellediği bildirilen bir NADH yarışmalı, seçici, küçük molekülü LDHA inhibitörüdür [93]. Safra kesesi karsinomunda FX11 aracılı LDHA susturma, kanser hücresi proliferasyonunu, istilasını, büyümesini baskılamış ve safra kesesi karsinomu hücresinde apoptosisi anlamlı şekilde indüklemiştir [94].

Prostat kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edilen LDHA'nın FXII ile inhibe edilmesi hücre proliferasyonunu, göçünü, istilasını inhibe ederken apoptozu indüklemiştir [95]. Pamuk tohumundan türetilen doğal bir fenolik ürün olan Gossypol'un ayrıca tümör büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Melanom, küçük hücreli akciğer kanseri, meme kanseri, rahim ağzı kanseri, miyeloid lösemi ve glioma gibi farklı kanser hücrelerinde doza bağlı sitotoksisite göstermiştir. Gossypol ayrıca metastatik meme kanseri, metastatik adrenal kanser ve gliomalarda anlamlı antikanser aktivitesi de göstermiştir [96, 97]. Galloflavin LDHA ve LDHB için sentetik olarak sentezlenen diper bir inhibitördür. Galloflavin tercihen serbest enzimlere bağlanır ve substrat ve kofaktörlerle rekabet etmez ve insan meme kanseri hücrelerinde antikanser

aktivitesi göstermiştir [94]. N-Hidroksiindol bazlı inhibitörler, piruvat ve NADH ile rekabet edebilen ve kanserde iyi bir anti-proliferatif ve açlık uyandırma kabiliyeti sergileyen rekabetçi, küçük moleküllü inhibitörlerdir [11]. Piruvatın bir analogu olan sodyum okzamat aynı zamanda glikolizin hafifletilmesiyle tümör büyümesini de engeller [98, 99].

4.11.2.Laktat Dehidrogenaz A ve B'nin Moleküler İnhibisyonu

Küçük interferans RNA'lar (siRNA'lar), sekans tamamlayıcılığını hedef alarak gen ekspresyonunu azaltan 20-25 nükleotid uzun, çift sarmallı RNA molekülleridir. siRNA aracılı gen ekspresyonu inhibisyonu, kanser araştırmalarında önemli bir araç haline gelmiştir ve gelecek vaat eden yollar sunmaktadır. LDHA'yı hedeflemede siRNA'ların kullanımı, kanser ilerlemesini durdurmak için etkili bir yol olarak birkaç grup tarafından gösterilmiştir [11]. Renal karsinom hücrelerinde aşırı eksprese edilen LDHA'nın siRNA aracılı bloke edilmesi, Bcl-2, Bax, p21, siklin D1 ve ayrıca indirgenmiş matris metaloproteinaz (MMP) -2 ve MMP-9 ekspresyonu gibi proteinleri hedefleyerek hücre proliferasyonunu inhibe ederken ve apoptozu indüklemiştir [100]. Benzer şekilde, glioblastomda LDHA ekspresyonunun bloke edilmesi hücre büyümesini azaltmış, glikolizi azaltmış ve apoptozu arttırmıştır [101]. KKK hücrelerinde aşırı LDHA ekspresyonunun azaltılması, büyüme oranını inhibe etti ve laktat ve ATP üretiminin yanı sıra glukoz alımını azaltmıştır [102]. shRNA aracılı LDHA'nın yıkılması, MDA-MB-435 kanser hücre hattında mitokondriyal ROS üretimini artırırken, hücre çoğalmasını ve hareketliliğini azaltmıştır [38]. Lentiviral vektör aracılı, hepatosellüler karsinoma (HCC) hücrelerinde LDHA'nın RNA etkileşimi (RNAi), bir ksenograft fare modelinde reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak ve metastatik potansiyeli önemli ölçüde azaltarak apoptozu arttırmıştır [103]

Nöroblastom hücrelerinde LDHA ekspresyonunun CRISPR/Cas9 ve shRNA ile bloke edilmesi, LDH aktivitesini iptal etmeden veya aerobik glikolizi önemli ölçüde azaltmadan tümör büyümesini, klonojenikliği ve tümörjenisiteyi inhibe etmiştir [104]. İnsan pankreas kanseri hücrelerinde HIF1/2a ile aktiflenmiş LDHA ekspresyonunun bloke edilmesi, hücre büyümesini ve göçünü azaltmıştır [105]. LDHA'nın inhibe

edilmesinin ayrıca hücreleri radyasyon ve kemoterapiye daha duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir. Glioblastomada LDHA ekspresyonunun siRNA ile azaltılması, hücre döngüsü ilerlemesini bloke ederek bu hücrelerde apoptozu indüklemiş ve temozolomid duyarlılığını artırarak hücre büyümesini durdurmuştur [106]. siRNA veya FX11 ile LDHA inhibisyonu ayrıca LDHA'ya bağlı tümörler için etkili bir tedavi stratejisi olan oksidatif stres ve hücre ölümünün indüklenmesine yol açmaktadır [93]. Prostat kanseri hücrelerinde LDHA ekspresyonu, radyoterapi direnci ile ilişkilidir ve siRNA aracılı LDHA blokesi hücrelerin radyoterapiye karşı duyarlılığını arttırmış, epitel-mezenkimal geçişi azaltmış ve apoptozu arttırmıştır [107]. LDHA'yı kondrosarkomda inhibe etmek, doksorubisine duyarlılığı ve meme kanseri hücrelerinde inhbe etmek ise meme kanseri hücrelerinin taksole (paklitaksel) tekrar duyarlılığını arttırmıştır [108, 109].

LDHA ve LDHB ekspresyonunun küçük moleküllü inhibitörler veya kodlayıcı olmayan RNA yaklaşımıyla engellenmesi büyük ilgi çekebilir ve muhtemelen kanserin ilerlemesine müdahale edebilir. Bu alanda gelecekteki çalışmalar devam etmekte ve sonuçlar beklenmektedir. LDHA ve LDHB'nin inhibisyonunun olası herhangi bir yan etkiye neden olması muhtemel değildir, Bu nedenle, yeni inhibitörleri tamamlayıcı kemoterapötik ajanlar ve tedavi duyarlılaştırıcıları olarak aramak son derece faydalı olabilir [11].

4.11.3. Tümör ve Stroma Arasındaki Laktat Değişimini Engelleme

Kanser-ilişkili fibroblastlar, kendilerine mevcut glikozu sunarak ve ustaları tarafından salgılanan laktatı kullanarak, kanser hücrelerine destek verirler. Tümör proliferasyonunu inhibe ederek tümör ve stromal hücreler arasındaki karşılıklı besin alışverişini kırmak için kanser hücrelerinde LDHA'yı stromal hücrelerde LDHB'yi hedeflemek faydalı olabilir. Giatromanolaki ve arkadaşları prostat kanserindeki stromal ve epitelial elementler arasında metabolik etkileşimlere yönelik analizler yapmış ve prostat kanseri hücrelerinin başlıca LDH-5'i ifade ettiğini, tümör ile ilişkili fibroblastlar/ miyofibroblastların LDH-1'i ifade ettiğini göstermişler ve her iki izoenzimin tamamlayıcı davrandığını vurgulamışlardır. Kanser hücrelerinde bulunan LDH-5 izoenzimi piruvatı laktata dönüştürürken, kanser-ilişkili fibroblastlar/ miyofibroblastlar

üzerinde bulunan LDH-1 izoenzimi eksprese ederek laktatı kullanır ve onu kanser hücreleri için gerekli enerji kaynağı piruvat'a dönüştürür [110].

Tümör mikroçevresinde üretilen laktat, metabolik düzenlemenin çeşitli yönlerini desteklemede kritik rol oynar ve kanser mikroçevresinin kanser hücrelerini destekleyici yönde davranmasına katkıda bulunur. Patel ve arkadaşları stromal kanser-ilişkili fibroblastların kendi enerji gereksinimlerini ve komşu glikolitik tümör hücreleri için genel yedek glikozu karşılamak için laktat salgılayan tümörü geri dönüştürdüğünü göstermiştir [11, 111].

Literatür bilgisi eşliğinde sunulan çalışmalar, kolorektal kanserde LDH-A aktivasyonu ile değişim gösteren metabolik fenotipin kanser hücrelerinin sağkalımına, kemoterapi direncine ve metastazına etki edebileceğini göstermektedir. Ancak literatürde non-metastatik kolorektal kanserlerde metabolizmanın LDH-A bağlantılı inhibisyonunun, kemoterapi etkinliğine olan etkisini değerlendiren çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, LDH-A bağlantılı tümör metabolizması modifikasyonu ile, kolorektal kanserde neoadjuvan/adjuvan tedavi süreçlerinde kullanılan sitotoksik 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonundan alınabilecek yanıtın artırılabilmesi yönünde araştırmaların gerekliliği fikri ortaya çıkmaktadır. Bu çalışma, kolorektal kanserlerinde LDH-A inhibitörlerinin mevcut kombin tedavi uygulamalarına eklenebilirliği hakkında fikir sahibi olunmasını sağlayacak bir basamak olmaktadır.

Çalışmamızda hücre canlılığı ve migrasyonu hakkında bilgi almak için gerçek zamanlı, otomatize sistemler kullanılmıştır. Bu sistemler deney süresince hücrelerin sürekli ve kantitatif izlenmesini sağlayan yenilikçi teknoloji sunmaktadır. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemleri, özellikle potansiyel antikanser ilaçlarının taranması ve bileşiklerin hücreler üzerindeki etkilerinin saatlerce hatta günler boyunca izlenmesi için sitotoksikite araştırmasında bir avantaj sağlar. Böylece *in vitro* çalışmalarda karşımıza çıkan tekrarlanabilirlik ve standardizasyon konusundaki eksiklikleri aşmak adına önemlidir.

5.MATERYAL METOT

5.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan insan KRK hücre hatları olan HCT116 (ATCC® CCL-247) ve HT-29 (ATCC® HTB-38™) ve American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edilmiştir. Hücre hatlarına ait özellikler Tablo 5.1.1.'de verilmiştir. HCT116 ve HT-29 hücreleri deneylerde kullanılmak üzere %10 fetal sıgır serumu (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA) ve %1 penisilin-streptomisin (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA) ile desteklenmiş McCoy's 5A (Gibco by Life Technologies, NY, USA)' dan oluşan kültür ortamı kullanılarak, 37°C'de 5% CO₂ içeren inkübatör ortamında çoğaltıldı. Hücrelerin çoğalması mikroskop altında düzenli olarak kontrol edildi. Hücrelerden elde edilen ilk pasajlar, -196°C'de depolandı. Sonraki planlanan deneyler pasaj 5'ten sonra elde edilen hücrelerle çalışılarak gerçekleştirildi.

Tablo 5.1.1. Kolorektal kanser hücre hattı karakteristik özellikleri

Hücre Hattı	Hasta-Organ	Tanısı-Evresi	Mutasyon
HCT116	48 yaş- erkek Kolon	Kolorektal karsinoma	CDKN2A, c.68-69insG, p.R24fs*20 (Homozigot) CTNNB1, c.133-135delTCT, p.S45del, (Het.) PIK3CA, c.3140A>G, p.H1047R (Heterozigot) RAS, c.38G>A, p.G13D (Heterozigot)
HT-29	44 yaş- kadın Kolon	Kolorektal adenokarsino ma	APC c.2557G>T, p.E853 (Heterozigot) APC c.4666-4667insA, p.T1556fs*3 (Heterozigot) BRAF, c.1799T>A, p.V600E (Heterozigot) PIK3CA, c.1345C>A, p.P449T (Heterozigot) SMAD, c.931C>T, p.Q311* (Homozigot) TP53, c.818G>A, p.R273H (Homozigot)

5.2.Kullanılan ilaçlar

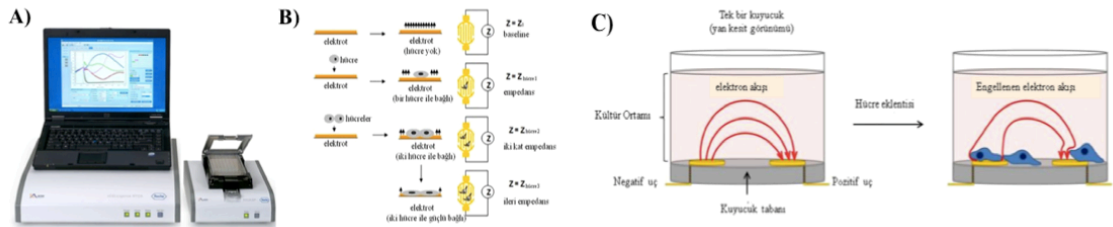
Çalışmamızda KRK tedavisi için aktif olarak kullanılan kemoterapötikler olan 5-fluorourasil (FU) ve irinotekan kullanıldı. Gastrointestinal sistem, meme, baş ve boyun kanserlerinin sağaltımında kullanılan FU çeşitli şekillerde etki eder, ancak esas olarak bir timidilat sentaz (TS) inhibitörü olarak görev yapar. Bu enzimin aktivitesinin bloke edilmesi sonucu, DNA replikasyonu için gereken pirimidin (timidin) sentezi engellenmiş olur. Timidilat sentaz, deoksiüridin monofosfatı (dUMP) metilleyerek timidin monofosfatını (dTMP) oluşturur. 5-FU'nun verilmesi ile timidilat sentazın inhibe edilmesi sonucu dTMP'de bir azlık durumu oluşur ve kanserli hücreleri hızlı bir şekilde bölünmesinin önüne geçilmiş olur. Bu durum kanser hücrelerinde hücre ölümüne yol açar [112]. İrinotekan, kolon kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Kolon kanseri için, tek başına veya fluorourasil ile birlikte kullanılmaktadır. İrinotekan, hidroliz reaksiyonu sonucu bir topoizomera I inhibitörü olan SN-38'e aktive edilir. Bu daha sonra difosfat glukuronosiltransferaz 1A1 (UGT1A1) tarafından glukuronidasyon ile etkisizleştirilir. DNA'nın sarmal yapısını açarak DNA replikasyonu ve transkripsiyonda görevli olan Topoizomera I enziminin aktif metabolit SN-38 tarafından inhibisyonu, hem DNA replikasyonu hem de transkripsiyonun inhibisyonuna yol açar [113]. Fluorourasil (Sigma Aldrich) ve irinotekan (Sigma Aldrich) ikisi de DNA sentezini inhibe ederek kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemek üzerine kullanılmaktadır. Bu noktada kanser hücrelerinin hayatta kalmalarını ve kemoterapötiklere karşı direnç oluşumunu destekleyen laktat bağımlı metabolik sürecin ortadan kaldırılması için LDH inhibitörü olan sodyum okzamat (Sigma Aldrich) kullanıldı.

5.3.Gerçek Zamanlı Sitotoksisite Analizleri

Çalışmamızda ilk adım olarak KRK hücrelerine (HCT116 ve HT-29) tekli ve kombinasyon halinde uygulanan kemoterapötiklerin ve sodyum okzamatın hücre canlılığına olan etkisi incelendi. Bu amaç doğrultusunda, canlılık analizleri Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCelligence Real Time Cell Analyzer SP, ACEA, Biosciences, San Diego, CA) kullanılarak değerlendirildi. Bu sistemde hücreler cihaza

özgün olan 96 kuyucuklu e-plate (ACEA Biosciences, California) kuyucuklarına ekildikten sonraki 24 saat süresince, ve 24 saat ardından gerçekleştirilen ilaç uygulamalarını takip eden 48 saat süresince gerçek zamanlı olarak analiz edildi. Bu sistemde, hücrelerin altın elektrotların kaplı olduğu kuyucuk zeminine yapışması ile oluşan empedans değişiklikleri üzerinden analizler yapılmaktadır. Cihazın genel prensibi Şekil 5.3.1 üzerinde anlatılmıştır [114, 115].

Sisteme ait olarak tasarlanan 96 E-plate içerisindeki kuyucuklara kuyucuk başına 1×10^4 hücre olacak şekilde (toplamda 200 μL hücre kültür ortamı içinde) hücre ekimi gerçekleştirildi. Hücreler, 24 saat boyunca 37°C 'de, %5 CO_2 içeren ortamında gerçek zamanlı görüntülenecek ve 24. saatin sonunda 96 E-plate içerisindeki tüm kültür ortamı çekilerek ilaçlara yönelik farklı konsantrasyonlar uygulanacaktır. Hücrelerin 48 saat boyunca, 15 dakikada bir hücre indeksi ölçümü alındı. Hücre canlılığı grafiği, hücrelerin kullanılan bileşiğe verdiği cevaba dayalı olarak yüzde canlılık olarak sunuldu. Yüzde canlılık oranı, ilaç ilave edilmemiş kontrol ve deneyin sıfır noktasındaki hücre indekslerinin oranı kullanılarak tespit edildi.



Şekil 5.3.1. Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde empedans ölçümüne dayanan analize genel bakış. **A)** Hücre çoğalmasının gerçek zamanlı olarak ölçülmesi. **B)** Mikroelektrotlar üzerinde hücre yayılması ile değişen akımın ölçülmesi ve zamana bağlı olarak grafiklenmesi tam otomatik olarak gerçekleştirilmektedir. **C)** Hücre eklenmeden önce ve sonrasında tek bir kuyucuğun yan kesit görünümü. Hücre yokluğunda elektrik akımı elektrotlar arasındaki devreyi tamamlayan kültür ortamı üzerinden serbestçe akar. Hücreler elektrotlar üzerine yapışıp proliferasyonunda ise elektrik akımını engeller.

5.4.İlaçların IC50 Dozlarının Belirlenmesi

Deney gruplarına ilaç uygulamaları için öncelikli olarak, kullanılacak ilaçların seçilen KRK hücre hatları üzerindeki IC50 dozları belirlendi. IC50 dozu (half maximal inhibitory concentration) hücre canlılığını diğer bir deyişle, sayısını deneyin başlangıcına oranla %50 oranında azaltan ilaç konsantrasyonudur ve hücrelerin net kaybını ifade etmektedir. Bunun için kemoterapötiklerin ve sodyum okzamatın HCT116 ve HT-29 hücrelerine seri dilüsyon ile farklı dozlarda uygulanması sonucu hücre indeks ve sayısındaki değişimler Gerçek zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCelligence Real Time Cell Analyzer, ACEA, Biosciences, San Diego, CA) kullanılarak değerlendirildi ve IC50 dozları hesaplandı. Deneyin başındaki sıfır zamanı (time zero, Tz) kontrol (C), ve bileşiklerin bulunduğu konsantrasyonlarda yapılan ölçüm (Ti) değerleri kullanılarak inhibisyon oranı yüzde cinsinden hesaplandı. IC50 değeri: $[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 = -50$ formülü ile hesaplandı. IC50 dozları şu şekilde belirlendi. HCT116 için: 5- Fluorourasil 17 µM; İrinotekan 100 µM; Sodyum okzamat 25 mM. HT-29 için: 5- Fluorourasil 120 µM; İrinotekan 21 µM; Sodyum okzamat 25 mM olarak belirlenmiştir. KRK hücreleri üzerindeki fluorourasil, irinotekan, ve sodyum okzamatın hücre ölümü üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla kimyasalların tek başına ve sodyum okzamatın kombine olarak uygulandığı deney grupları oluşturuldu. IC50 dozlarının belirlenmesinin ardından deney grupları belirlenerek, deneysel uygulamalar gerçekleştirildi.

GRUP-1: HCT116 hücre hattıyla gerçekleştirilen deneylere ait gruptur.

C1: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı] (Kontrol)

C2: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı] + Fluorourasil (IC50 doz)

C3: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı] + İrinotekan (IC50 doz)

C4: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı] + Sodyum okzamat (IC50 doz)

C5: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı]+Fluorourasil+Sodyum okzamat (IC50 doz)

C6: C5: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı]+İrinotekan+Sodyum okzamat (IC50 doz)

C7: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı]+Fluorourasil+İrinotekan+Sodyum okzamat (IC50 doz)

C8: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı] + Fluorourasil + İrinotekan (IC50 doz)

GRUP-2: HT29 hücre hattıyla gerçekleştirilen deneylere ait gruptur.

T1: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı] (Kontrol)

T2: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı] + Fluorourasil (IC50 doz)

T3: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı] + İrinotekan (IC50 doz)

T4: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı] + Sodyum okzamat (IC50 doz)

T5: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı] + Fluorourasil+ Sodyum okzamat (IC50 doz)

T6: C5: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı]+İrinotekan+Sodyum okzamat (IC50 doz)

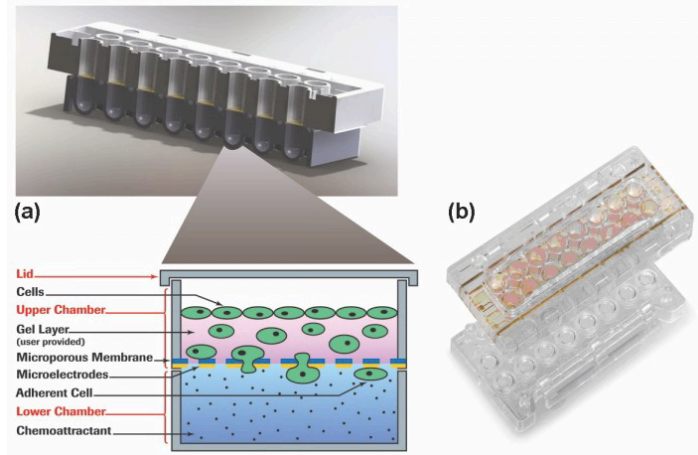
T7: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı]+Fluorourasil+İrinotekan+Sodyum okzamat (IC50 doz)

T8: [KRK Hücreleri+Hücre kültür ortamı] + Fluorourasil + İrinotekan (IC50 doz)

5.5.Gerçek Zamanlı Hücre Migrasyon Analizleri

Sitotoksisite analizleri ile birlikte ilaç uygulaması yapılan hücrelerin migrasyon yetenekleri değerlendirildi. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCelligence Real Time Cell Analyzer DP, ACEA, Biosciences, San Diego, CA) migrasyonun değerlendirilmesine özgü olarak 8 uM por çapıyla tasarlanmış CIM-Plate 16 kullanılması ile migrasyon deneyleri gerçekleştirildi (Şekil 5.6.1) [114].

Hücreler 40,000 hücre/kuyucuk olacak şekilde serum içermeyen hücre kültür ortamı eşliğinde ve spesifik kemoterapötik uygulaması ile üst kuyucuklara ekildi. Alt kuyucuğa migrasyon için serum içeren kültür ortamı uygulandı. Hücrelerin migratif özellikleri gereği, porlardan geçişini temsil eden hücre indeksi değerleri impedans değerlerindeki değişimlerin 48 saat süresince 15 dakikada bir ölçülmesi ile elde edilecektir. Hücrenin migratif özelliği, ilaçla muamele edilmemiş kontrol hücrelerinin migrasyonunun %100 olarak ifade edilmesiyle sunulacaktır.



Şekil 5.5.1. Gerçek zamanlı hücre migrasyon analizi için CIM-Plate. A) Plate'in grafiksel gösterimi. B) Kullanım kolaylığı açısından ayrılabilir iki bölmeye sahip olan ve şeffaf görünümlü plate.

5.6.Laktat Analizi

Laktat ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO}^-$), birçok biyolojik süreçte önemli role sahiptir. L(+)-Laktat, insan ara metabolizmasında oluşan başlıca laktat stereoizomeridir ve kanda bulunur. D(-)-Laktat kanda da bulunabilir, ancak L(+)-Laktat konsantrasyonunun yaklaşık % 1 – 5'i kadardır. Laktat metabolizmasına yönelik çalışmamızda, pirüvatın laktata dönüşümü hakkında bilgi sahibi olabilmek için, çalışma kapsamında belirlenen spesifik gruplara kemoterapötik uygulamalarını takip eden 48.saat sonunda laktat oluşumuna ilişkin analizler gerçekleştirildi. L-Lactate Assay Kit (Kolorimetrik) (ab65331), laktatın laktat dehidrogenaz ile oksitlenmesi sonucu açığa çıkardığı ürünün prob ile etkileşime girmesi sonucu açığa çıkan rengin şiddetinin 450 nm'de okunması prensibine dayanmaktadır.

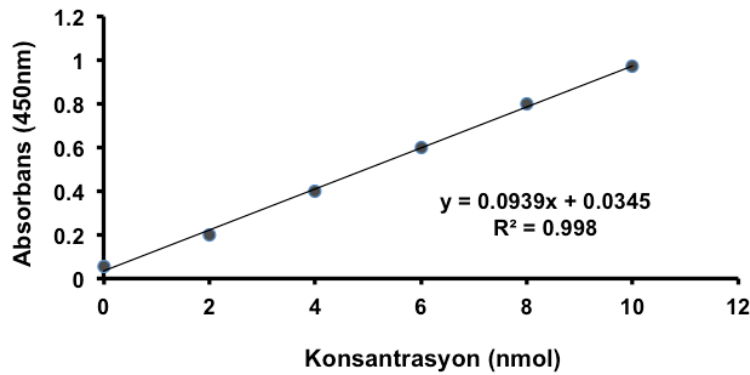
Örnek Hazırlığı: Spesifik ilaç uygulamalarının ardından, hücreler tripsinize edildi ve soğuk PBS ile yıkandı. Ardından hücre pelleti, Lactate Assay Buffer (~200 μL) ile süspanse edildi ve homojenize edildi. Santrifüj ardından (5 dakika, 4°C) üst faz toplandı ve hücrelere buz üzerinde deproteinizasyon işlemi uygulandı. Hücre supernatant endojen LDH içerdiği için deproteinizasyon işlemi enzim degrade edildi. Bu işlem sırasında Deproteinizing Sample Preparation Kit – TCA (ab204708) kullanıldı. Örneklerin üzerine

TCA (~20µL) eklendi ve buz üzerinde 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra 12.000g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz alındı ve Neutralizing Solution (~12µL) eklendikten sonra örnekler buz üzerinde 5 dakika bekletildi.

Ölçüm: Her örnekten 50 µL alınıp, üzerine 50 µL reaksiyon miksi (Lactate assay buffer- 46µL; Lactate substrate mix 2µL; Lactate enzyme mix 2µL) eklendi. Oda sıcaklığında 30dakika beklendikten sonra 450 nm'de absorbans gerçekleştirildi. Ölçümler hazırlanan standartlar doğrultusunda değerlendirildi (Tablo 5.7.1 ve Şekil 5.7.1).

Tablo 5.6.1. Laktat standartları

	Standart hacmi (µL)	Örnek (µL)	Tamponu	Konsantrasyon (nmol/kuyucuk)
Standart #1	0	50		0
Standart #2	2	48		2
Standart #3	4	46		4
Standart #4	6	44		6
Standart #5	8	42		8
Standart #6	10	40		10

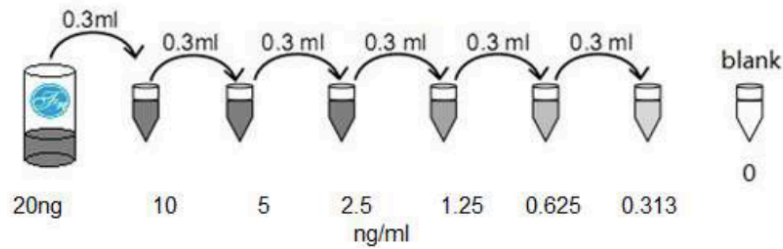


Şekil 5.6.1. Laktat kalibrasyon eğrisi

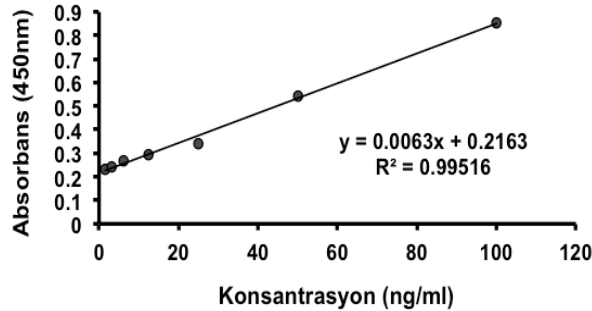
5.7.Asetil KoA Eliza Analizi

Bu test, sandviç enzime bağlı immün-sorbent tahlil teknolojisine dayanmaktadır. 96 kuyucuklu plakalar anti-Asetil KoA antikor, önceden kaplandı. Biotin konjuge anti-

Asetil KoA antikoru tespit antikoru olarak kullanıldı. Standartlar, spesifik gruplara ait hücreler örnekleri ve biotin eşlenik tespit antikoru vasıtasıyla kuyucuklara eklendi ve ardıl yıkalamalar gerçekleştirildi (Şekil 5.8.1). HRP-Streptavidin ilave edildi ve bağlanmayan konjugatlar yıkama tamponuyla yıkandı. TMB substratları HRP enzimatik reaksiyonu görselleştirmek için kullanıldı. TMB, asidik durdurma çözeltisi ilave edildikten sonra sarıya dönüşen mavi renkli bir ürün üretmek için HRP ile katalizlenmektedir. En son durdurma solüsyonu ekleyerek sarı rengin oluşması sağlandı. Sarı renk yoğunluğu, plakada yakalanan Asetil KoA örnek miktarıyla orantılıdır. Absorbansın 450nm'de ölçülmesi ardından örneklerde mevcut olan Asetil KoA konsantrasyonu standartlar aracılığı ile elde edilen kalibrasyon eğrisi aracılığı ile hesaplandı (Şekil 5.8.2).



Şekil 5.7.1. Asetil KoA standartların hazırlanışı. Her bir tüpe 0,3ml standart tamponu eklendir, ve bunun üzeri bir önceki standart tüpünden 0,3ml standart çözeltisi eklendi.



Şekil 5.7.2. Asetil KoA kalibrasyon eğrisi

5.8.Total Antioksidan Kapasitesi Analizi

Örnekler içindeki total antioksidan ölçümü, Erel tarafından geliştirilen metotla yapılmıştır [116]. Tampon çözelti varlığında ortam pH'sının sabit tutulması ile ABTS

(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) reaktifi hidrojen peroksit ile radikal hale getirilmiştir. Bu reaksiyon sonucunda oluşan çözelti koyu yeşil-lacivert arası bir renge sahiptir. Bu çözeltiliye, hücre lizatlarının ilave edilmesi ile, örnekler içerisindeki antioksidanlar mevcut ABTS radikallerini nötralize eder. Nötralizasyonun gerçekleşmesi ile birlikte çözeltinin rengi açılır, dolayısıyla örnek içinde bulunan total antioksidan miktarı ile çözeltinin renk şiddeti orantılıdır. Standartların ve örneklerin, absorbansı 658 nm'de ölçülür. Standart eğri olarak kullanılan absorbans-molarite verileri kullanılarak örneğin total antioksidan molaritesi hesaplanır.

Kullanılan Reaktifler:

R1: 0.4 Molar Asetat tamponu (pH:5.8)

R2: 30mM Asetat Tamponu (pH:3.6); 10mM ABTS reagent +1000ml için 278 µL H₂O₂; %10 Etilen glikol

Standart: 0.1 Molar (pH:8) Tris tamponu içinde 1mM Potasyum heksosiyanoferat (C₆FeK₃N₆)

5.9.Total Oksidan Seviyesi Analizi

Örnekler içindeki total oksidan ölçümü, Erel tarafından geliştirilen metotla yapılmıştır [117]. Fe₂SO₄'nin suda çözünmesi ile Fe²⁺ açığa çıkar. Hücre lizatlarında bulunan oksidanlar Fe²⁺'nin Fe³⁺'e yükseltgenmesini sağlar. R1 solüsyonu içindeki X-orange reaktifi Fe³⁺ ile birlikte renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan rengin şiddeti; örneklerin içindeki total oksidan miktarı ile orantılıdır. Standartların ve örneklerin absorbansları 658 nm'de ölçüldü. Standart olarak kullanılan çözeltinin absorbans-molarite verileri üzerinden örneklerin total oksidan molaritesi hesaplandı.

Kullanılan Reaktifler:

R1:Fox solüsyonu: 140mM NaCl; 25mM Sülfirik asit; Fox solüsyonu içine 150mM D-Sorbitol ve 250µM X-orange

R2: Fox solüsyonu içine 10mM 4-Hidroksibenzoik asit ve 5mM Amonyum Fe²SO₄

Standart: 20µM H₂O₂

Oksidatif Stres İndeksi=TOS/TAS olarak hesaplanmıştır ve OSI Referans Aralığı:0-3'tür.

5.10.Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR ile LDH Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

mRNA izolasyonu: Öncelikli olarak farklı gruplara ait hücrelerden RNeasy Mini Kit (Qiagen, Cat no: 74104, Germany) kullanılarak mRNA izolasyonu yapıldı. Örnekler önce parçalanır ve daha sonra homojenleştirildi. İdeal bağlama koşulları sağlamak için lizata etanol eklendi. Lizat daha sonra RNeasy silika membranına yüklenir.RNA filtrelelere bağlanır ve tüm kirlenmeler verimli bir şekilde yıkama basamaklarıyla ortamdan uzaklaştırıldı. Saf, konsantre RNA 30-100 µl su kullanılarak elüe edildi.

cDNA sentezi: mRNA sentezi ardından, gen ekspresyon analizlerinde mRNA'dan verimli bir şekilde cDNA sentezi gerçekleştirilmelidir. cDNA sentezi için RT2 First Strand Kit (Qiagen, Cat no: 330404, Germany) kullanıldı. İlk olarak, genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlandı ve bu karışım 5 dakika süresince 42°C'de inkübe edildi (Tablo 5.11.1).

Tablo 5.10.1. DNA eliminasyon karışımı hazırlığı

DNA Eliminasyon Karışımı	
RNA	5-10 µl
Buffer GE	2 µl
Rnase free water	Değişken

İnkübasyon ardından Genomik DNA eliminasyon karışımını içeren tüpler buz üzerine konuldu ve Revers Transkripsiyon karışımı hazırlandı ve tüplerin üzerine 10 µl bu karışımdan eklendi (Tablo 5.11.2). Örnekler 42°C'de 15dakika, 95°C'de 5dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her bir reaksiyona 91ul DNAaz free dH2O eklendi ve örnekler dondurucuda saklandı.

Tablo 5.10.2. Revers transkripsiyon karışımı hazırlığı

Revers Transkripsiyon Karışımı	
5X Buffer BC3	4 µl
Control P2	1µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl
Rnase free water	3 µl
DNA Elimination mix	25 µl

Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PCR): Çoğaltma işlemleri için LDHA ve LDHB genlerine özgü olan RT² qPCR Primer Assay kullanıldı (Qiagen, LDHA, Cat no: PPH02047H; LDHB, Cat no: PPH14743B). Pcr master miks hazırlığında, ise yine RT² SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Cat no: 330500, Germany) kullanıldı (Tablo 5.11.3). RT2 SYBR PCR Kit'i, qPCR Mastermix, PCR tamponu, yüksek performanslı HotStart DNA Taq polimeraz, nükleotidler ve SYBR® Green boya içerir. SYBR® Green, DNA bazları arasında interkale olan ve moleküler biyolojide birçok uygulamaya sahip olan bir boyadır. Böyle bir uygulama, aynı zamanda qPCR olarak da bilinen gerçek zamanlı PCR'dir. Boyanın flüoresansının yoğunluğu, ardıl olarak gerçekleşen her PCR döngüsü ile artar ve bu nedenle PCR ürünün ölçülmesi için kullanıldı. Veri analizi aşamasında, normalizasyon için hedef gen ile birlikte housekeeping bir gen (Beta-aktin) de amplifiye edildi. Reaksiyon hazırlığında kullanılan reaktif, primer, kalıp miktarları aşağıdaki gibidir. Sonuçların analizinde delta-delta CT değerleri üzerinden ekspresyon kat sayısı hesaplandı.

Tablo 5.10.3. PCR karışımı hazırlığı

PCR Karışımı	
RT SYBR GREEN Mastermix	12.5 µl
qPCR Primer Assay	1µl
cDNA	5-7 µl
RNaz free su	Toplam hacim 25 µl olacak şekilde tamamlanır

5.11.İstatistiksel Analiz

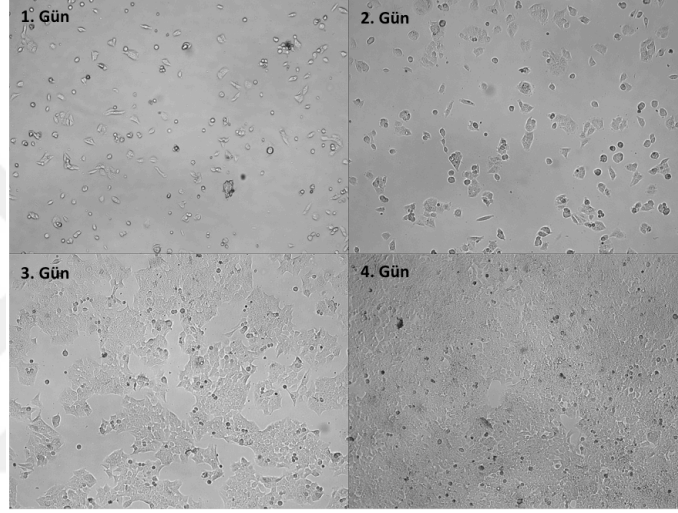
Çalışma doğrultusunda gerçekleştirilen tüm deneyler 3 veya daha fazla bağımsız deneyde tekrar edildi. İstatistiksel analiz GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, ABD) veya SPSS version 21.0 (SPSS, Chicago, IL, United States) kullanılarak gerçekleştirildi. Değerlendirilen parametreler kapsamında farklılıkları değerlendirmek için parametrik olmayan Mann Whitney U testi kullanıldı. Metin ve şekillerin sayısal değerleri, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. P değeri ≤ 0.05 düzeyinde kabul edildi.



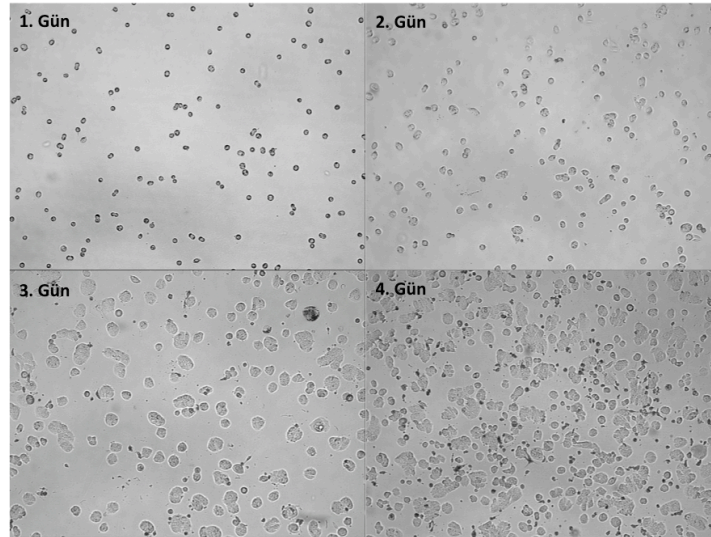
6.BULGULAR

6.1. Kolorektal Kanser Hücrelerinin Kültür Edilmesi

KRK hücre hatları, satın alınan firmanın yönergesi doğrultusunda kültür edildi (Şekil 6.1.1 ve Şekil 6.1.2). Elde edilen hücreler sonraki deney aşamalarında kullanılmak üzere uygun koşullarda saklandı.



Şekil 6.1.1. HCT116 hücrelerinin kültür koşullarındaki mikroskopik görüntüleri



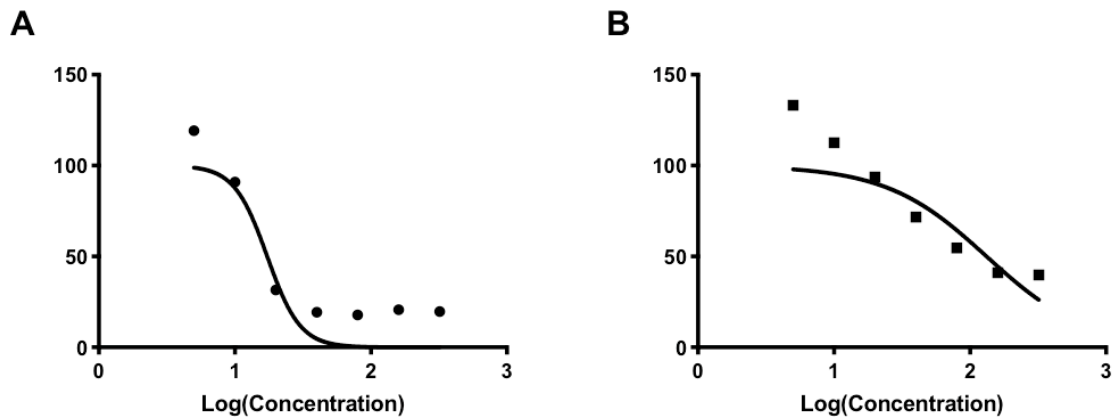
Şekil 6.1.2. HT-29 hücrelerinin kültür koşullarındaki mikroskopik görüntüleri

6.2.İlaç Uygulamaları Sonucu IC50 Değerlerinin Belirlenmesi

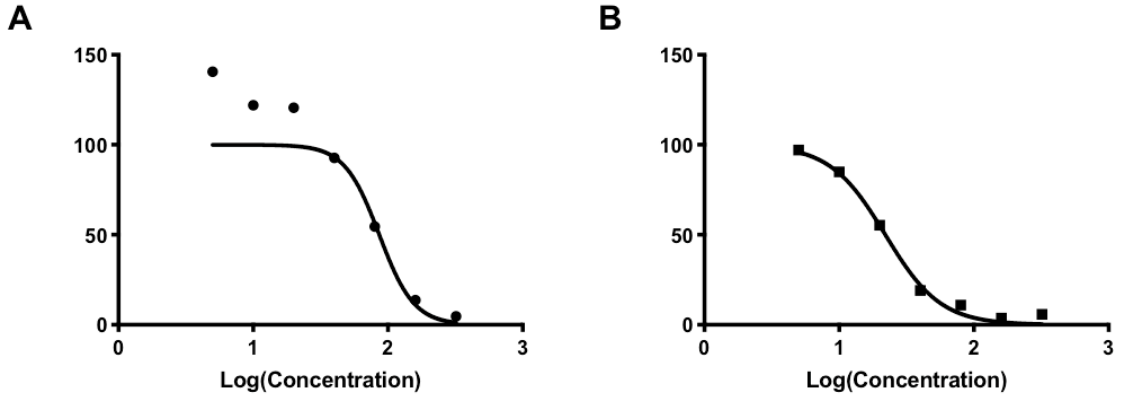
HCT116 ve HT-29 hücrelerinin *in vitro* kültür edildiği koşullarda ilaç uygulamalarının yapılabilmesi için, ilaçların ve kullanılacak kimyasal maddelerin IC50 dozu (half maximal inhibitory concentration) diğer bir deyişle hücre canlılığını-sayısını deneyin başlangıcına oranla %50 oranında azaltan ilaç konsantrasyonları belirlendi. Bunun için HCT116 ve HT-29 hücrelerine ilaçlara ait farklı doz uygulamaları gerçekleştirildi. HCT116 için: 5- Fluorourasil 17 μ M; irinotekan 100 μ M; sodyum okzamat 25 mM; HT-29 için: 5- Fluorourasil 120 μ M; irinotekan 21 μ M; sodyum okzamat 25 mM olarak belirlenmiştir. KRK hücreleri üzerinde sodyum okzamatın tek başına veya 5-fluorourasil ve irinotekan ile birlikte uygulanacağı deney grupları oluşturuldu.

Tablo 6.2.1.Deneylerde kullanılan IC50 değerleri

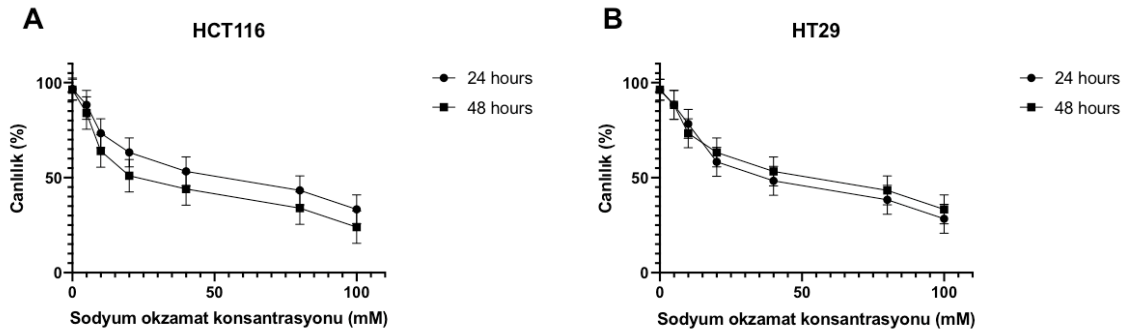
İlaç/Kimyasal	IC50 Dozu	
	HCT116	HT-29
5-Fluorourasil	17 μ M	120 μ M
İrinotekan	21 μ M	21 μ M
Sodyum okzamat	25 mM	25 mM



Şekil 6.2.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde 5-fluorourasil ilacına ait IC50 eğrileri. A) HCT116, B) HT-29 hücrelerinin eğrileridir.



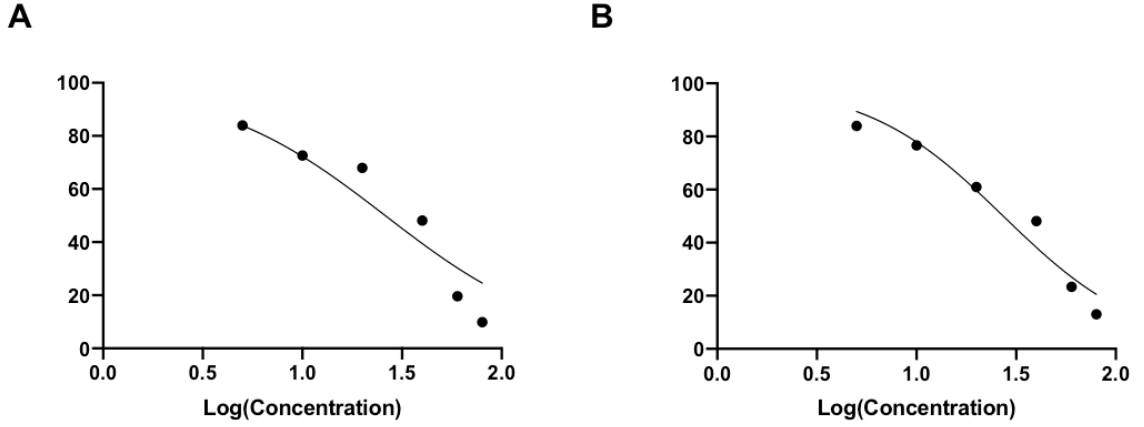
Şekil 6.2.2. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde irinotekan ilacına ait IC50 eğrileri. A) HCT116, B) HT-29 hücrelerinin eğrileridir.



Şekil 6.2.3. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde sodyum okzamata ait canlılık eğrileri

24 saatlik canlılık verileri değerlendirildiğinde hem HCT116 hem de HT29 hücre hattında, 10, 20, 40,80 ve 100mM konsantrasyonundaki sodyum okzamat uygulaması kontrole göre canlılığı istatistiksel anlamlı olarak azaltmaktadır ($p \leq 0.05$).

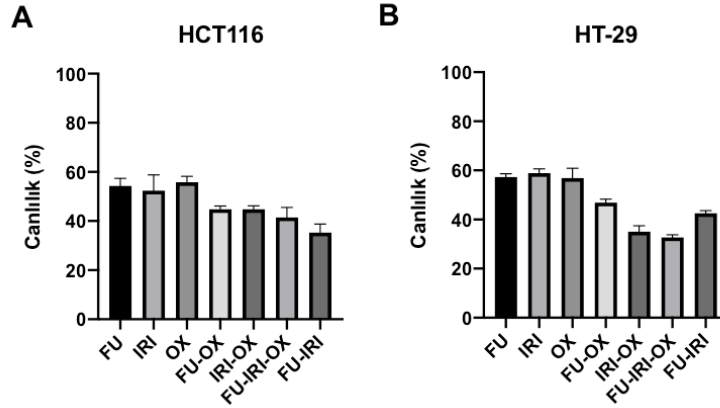
48 saatlik canlılık verileri incelendiğinde ise hem HCT116 hem de HT29 hücre hattında, 10, 20, 40, 80 ve 100mM konsantrasyonundaki sodyum okzamat uygulaması kontrole göre canlılığı istatistiksel anlamlı olarak azaltmaktadır ($p \leq 0.05$).



Şekil 6.2.4. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde sodyum okzamata ait IC50 eğrileri. A) HCT116, B) HT-29 hücrelerinin eğrileridir.

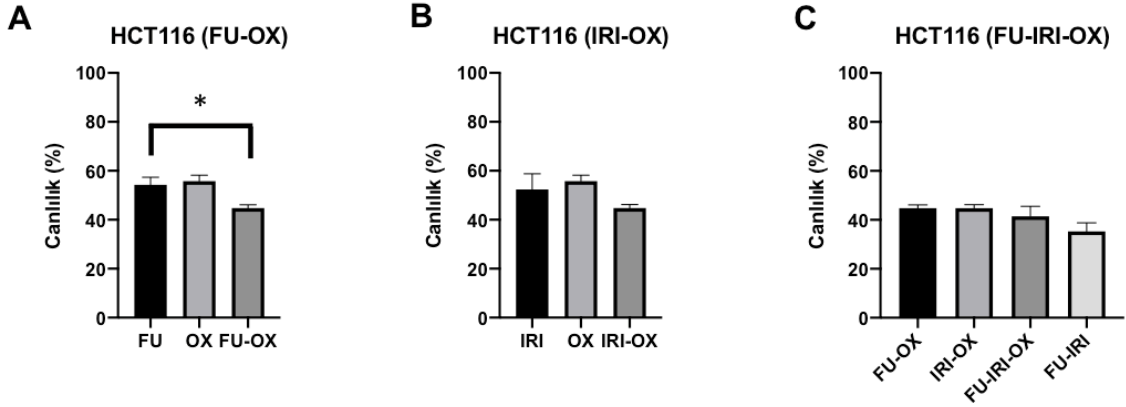
6.3. Gerçek Zamanlı Sitotoksosite Analizlerinin Sonuçları

İlaçlara yönelik IC50 dozlarının belirlenmesinin ardından sodyum okzamatın, mevcut kemoterapötiklerle uygulanması sonucu hücre canlılığına olan etkisi gerçek zamanlı sitotoksosite analizleri ile incelendi. Bu amaç doğrultusunda her hücreye özgü olarak belirlenmiş IC50 dozları uygulandı.

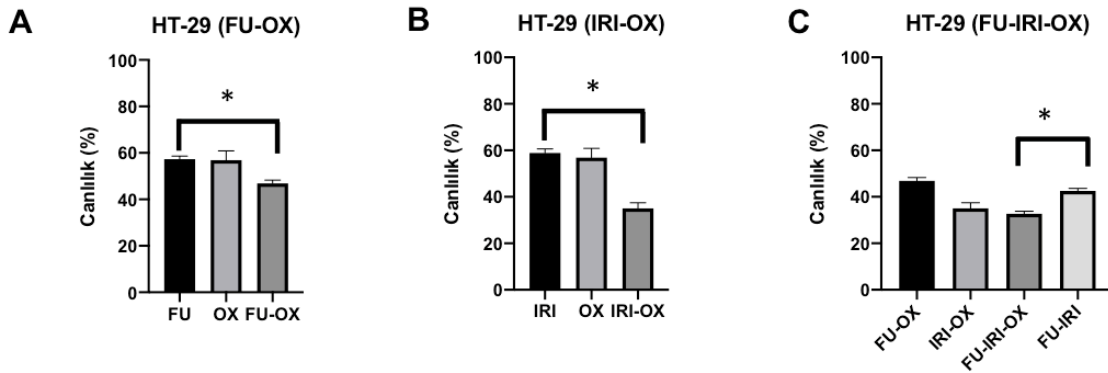


Şekil 6.3.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerine ait canlılık grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının canlılık üzerine olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı

kombinasyonlar halinde uygulanmasının canlılık üzerine olan etkisi. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)



Şekil 6.3.2. HCT116 hücrelerine ait canlılık grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının canlılık üzerine olan etkisi. B) HCT116 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının canlılık üzerine etkisi. C) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının canlılık üzerine etkisi. * $p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

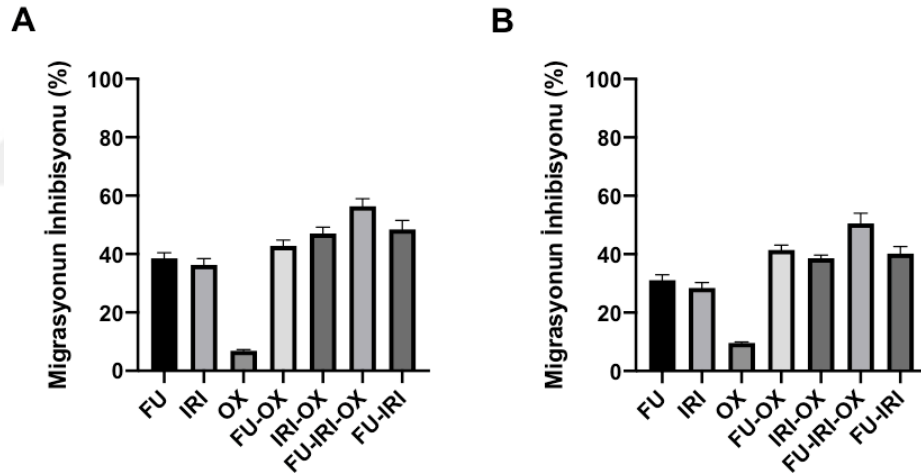


Şekil 6.3.3. HT-29 hücrelerine ait canlılık grafikleri. A) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının canlılık üzerine etkisi. B) HT-29 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının canlılık üzerine etkisi. C) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan

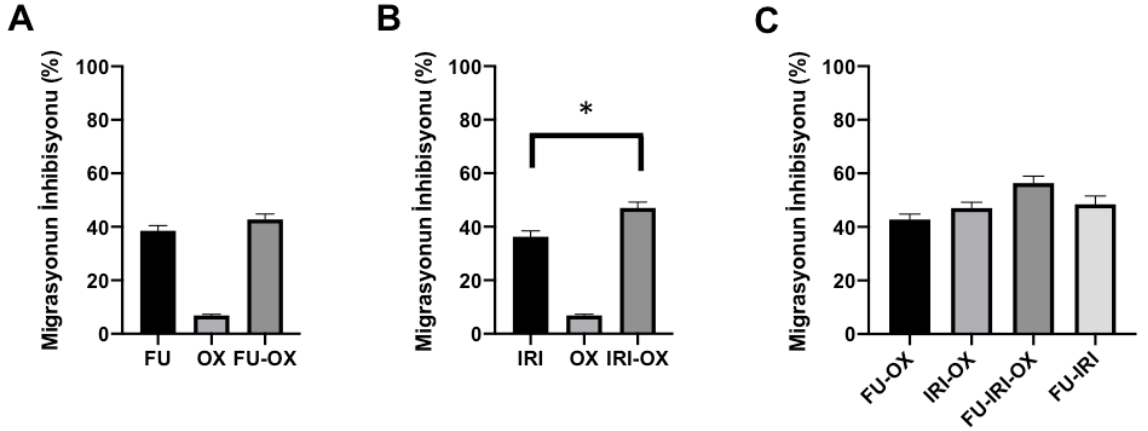
kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının canlılık üzerine etkisi. $*p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

6.4. Gerçek Zamanlı Hücre Migrasyon Analizlerinin Sonuçları

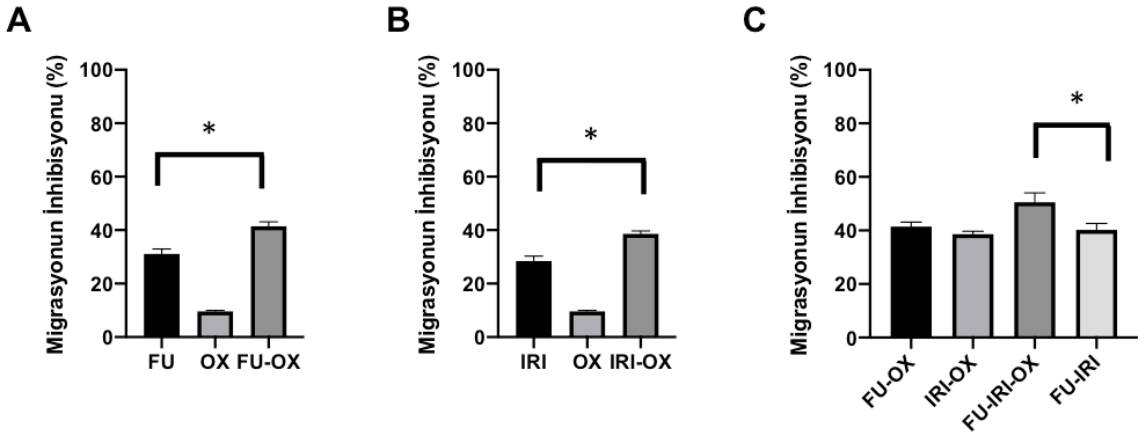
HCT116 ve HT-29 hücrelerine mevcut kemoterapötiklerin ve sodyum okzamatın tek başına veya çeşitli kombinasyonlar halinde uygulanmasını takiben, hücrelerin migrasyon yetenekleri değerlendirilmiştir. Hücrelerin migratif yetenekleri Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCelligence Real Time Cell Analyzer DP, ACEA, Biosciences, San Diego, CA) ile değerlendirilmiştir.



Şekil 6.4.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerine ait migrasyon grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının migrasyon inhibisyonuna olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının migrasyon inhibisyonuna olan etkisi. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)



Şekil 6.4.2. HCT116 hücrelerine ait migrasyon grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının migrasyonun inhibisyonu üzerine olan etkisi. B) HCT116 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının migrasyonun inhibisyonu üzerine olan etkisi. C) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının migrasyonun inhibisyonu üzerine olan etkisi. * $p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

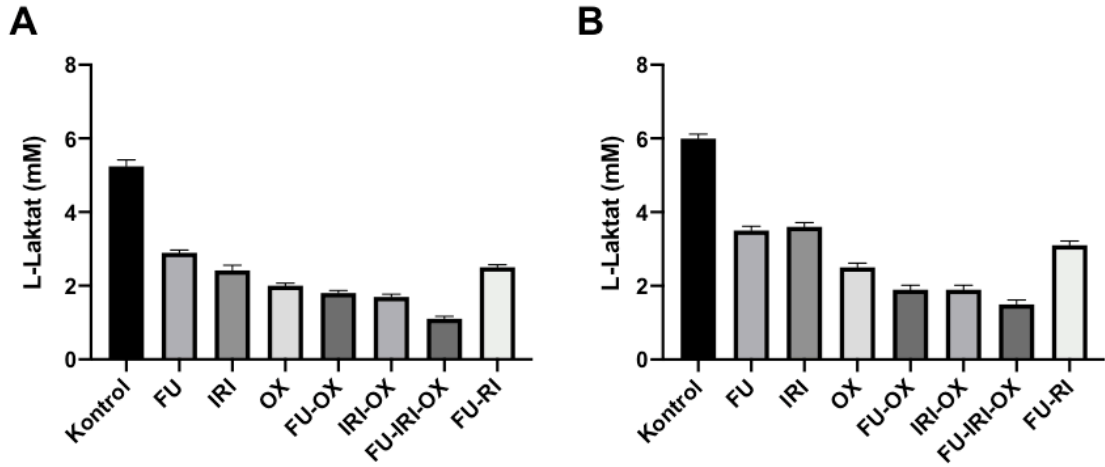


Şekil 6.4.3. HT-29 hücrelerine ait migrasyon grafikleri. A) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte kombinasyon şeklinde uygulanmasının migrasyonun inhibisyonu üzerine olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte kombinasyon halinde

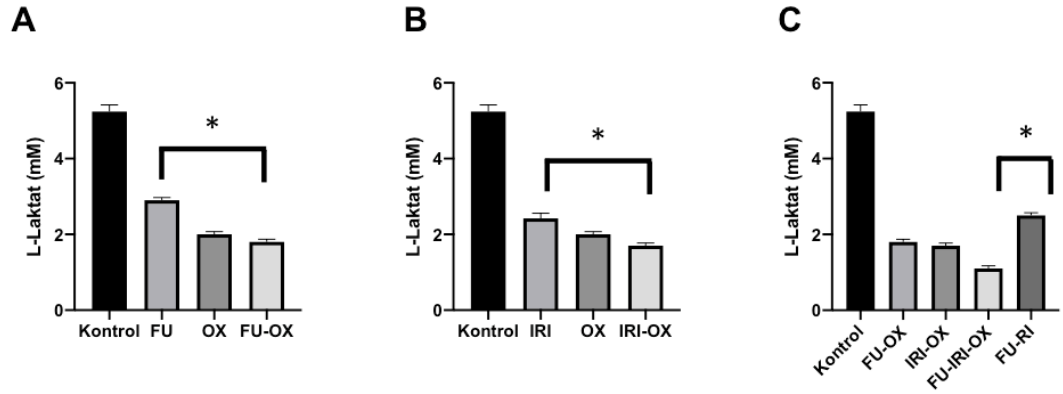
uygulanmasının migrasyonun inhibisyonu üzerine olan etkisi. C) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının migrasyonun inhibisyonu üzerine olan etkisi. * $p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

6.5. Laktat Analizi Sonuçları

HCT116 ve HT-29 hücrelerine mevcut kemoterapötiklerin ve sodyum okzamatın tek başına veya çeşitli kombinasyonlar halinde uygulanmasını takiben, tümör metabolizmasının belkemiği olan Warburg etkisi doğrultusunda tümöre sağkalım ve direnç avantajı sağlayan laktatın hücre ortamındaki konsantrasyonu değerlendirilmiştir. Böylece pirüvatın laktata dönüşümü hakkında bilgi sahibi olunarak, Warburg etkisinin ne derece aşıldığı hakkında bilgi sahibi olunmuştur.

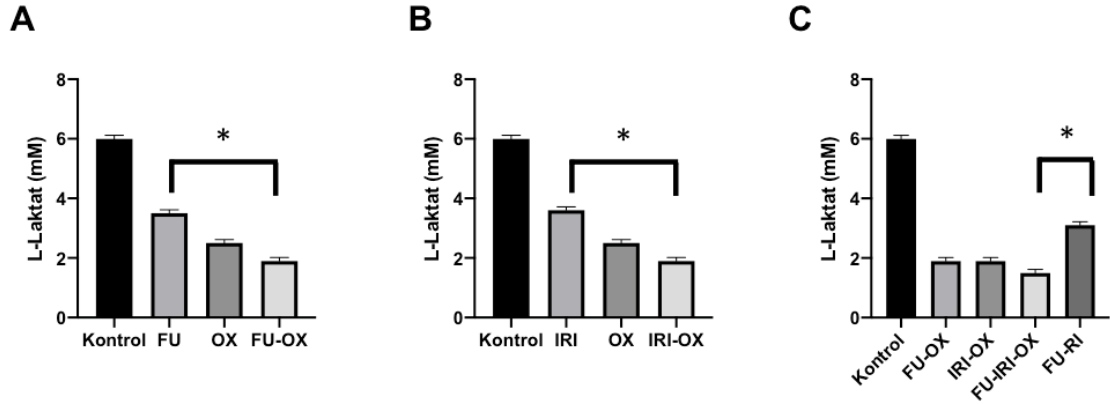


Şekil 6.5.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde laktat ait konsantrasyon grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının laktat konsantrasyonuna olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının laktat konsantrasyonuna olan etkisi. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)



Şekil 6.5.2. HCT116 hücrelerine ait laktat konsantrasyon grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının laktat konsantrasyonuna olan etkisi. B) HCT116 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte kombinasyon halinde uygulanmasının laktat konsantrasyonuna olan etkisi. C) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının laktat konsantrasyonuna olan etkisi. * $p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

HCT116 hücrelerinde kontrol grubuna ait laktat konsantrasyonu diğer gruplarla karşılaştırıldığında (FU, IRI, OX, FU-OX, IRI-OX, FU-IRI-OX ve FU-IRI) tüm sonuçlarda kontrole oranla anlamlı bir azalma gözlenmektedir ($p \leq 0.05$).

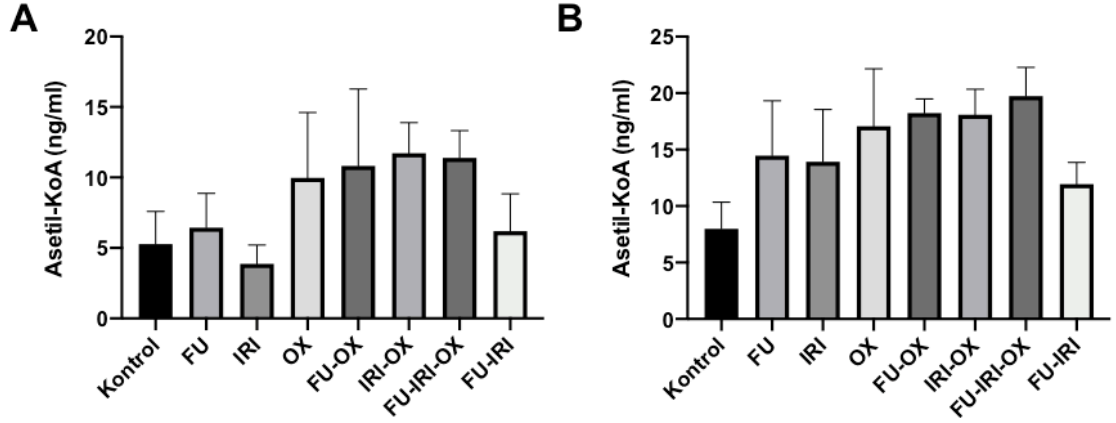


Şekil 6.5.3. HT-29 hücrelerine ait laktat konsantrasyon grafikleri. A) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının laktat konsantrasyonuna olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının laktat konsantrasyonuna olan etkisi. C) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının laktat konsantrasyonuna olan etkisi. * $p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

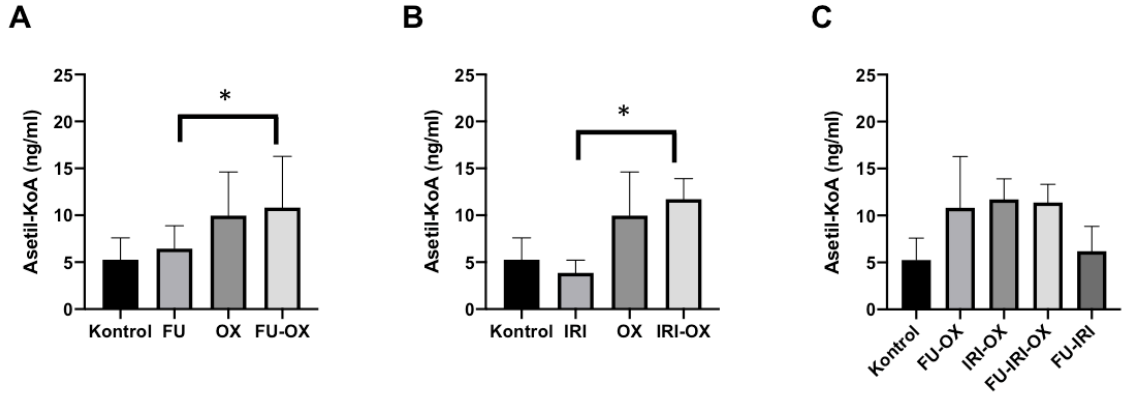
HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna ait laktat konsantrasyonu diğer gruplarla karşılaştırıldığında (FU, IRI, OX, FU-OX, IRI-OX, FU-IRI-OX ve FU-IRI) tüm sonuçlarda kontrole oranla anlamlı bir azalma gözlenmektedir ($p \leq 0.05$).

6.6. Asetil KoA Eliza Analizi Sonuçları

HCT116 ve HT-29 hücrelerine mevcut kemoterapötiklerin ve sodyum okzamatın tek başına veya çeşitli kombinasyonlar halinde uygulanmasını takiben, asetil KoA ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümle tümör metabolizmasının belkemiği olan Warburg etkisi doğrultusunda tümöre sağkalım ve direnç avantajı sağlayan laktatın azaltılmasının amaçlandığı koşullarda, laktata gitmeyen pirüvatın asetil KoA oluşturması hakkında hakkında bilgi sahibi olunmuştur.



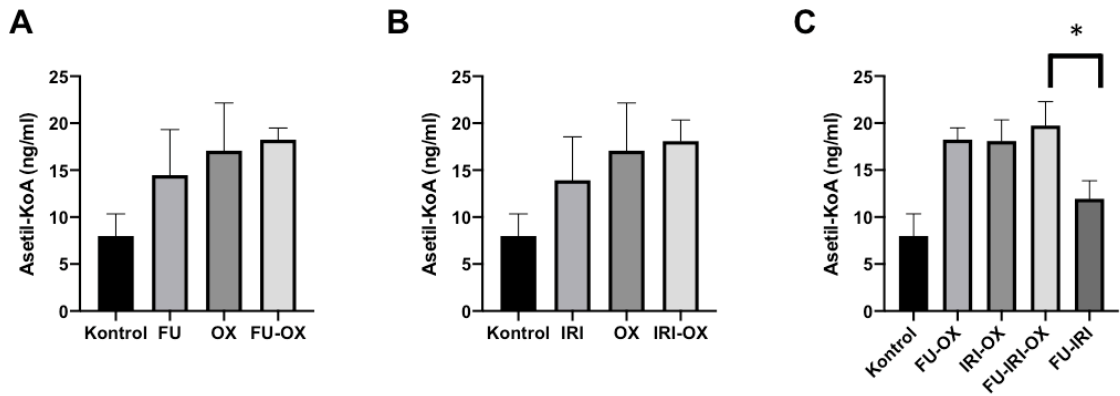
Şekil 6.6.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde asetil KoA konsantrasyon grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının asetil KoA konsantrasyonuna olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının asetil KoA konsantrasyonuna olan etkisi. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)



Şekil 6.6.2. HCT116 hücrelerine ait asetil KoA konsantrasyon grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının asetil KoA konsantrasyonuna olan etkisi. B) HCT116 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının asetil KoA konsantrasyonuna olan etkisi. C) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum

okzamatla birlikte uygulanmasının asetil KoA konsantrasyonuna olan etkisi. * $p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna ait asetil KoA konsantrasyonu diğer gruplarla karşılaştırıldığında (FU, IRI, OX, FU-OX, IRI-OX, FU-IRI-OX ve FU-IRI) IRI grubu hariç tüm sonuçlarda kontrole oranla anlamlı bir artış gözlenmektedir ($p \leq 0.05$).

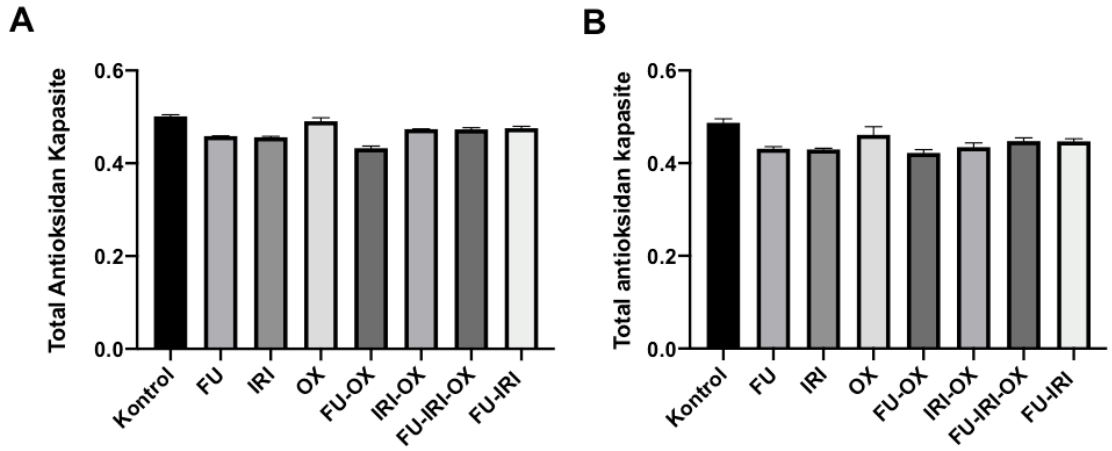


Şekil 6.6.3. HT-29 hücrelerine ait asetil koA konsantrasyon grafikleri. A) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının asetil KoA konsantrasyonuna olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının asetil KoA konsantrasyonuna olan etkisi. C) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının asetil KoA konsantrasyonuna olan etkisi. * $p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

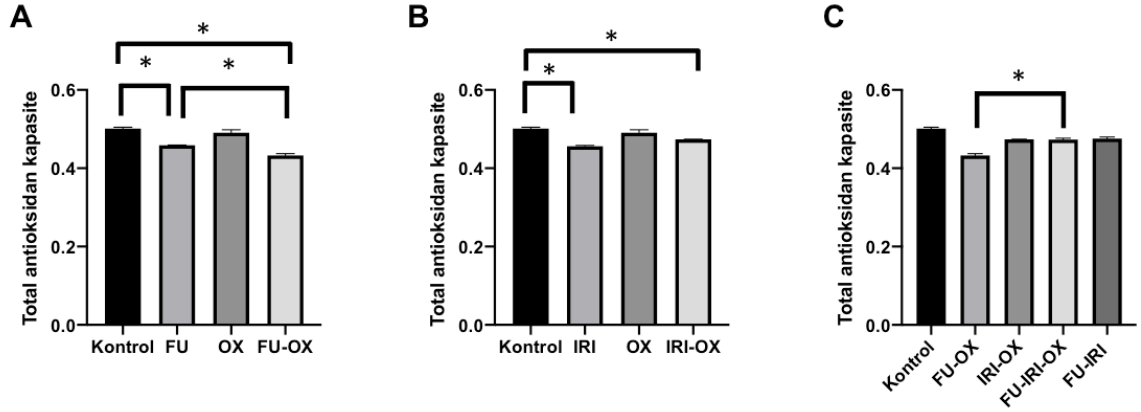
HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna ait asetil KoA konsantrasyonu diğer gruplarla karşılaştırıldığında (FU, IRI, OX, FU-OX, IRI-OX, FU-IRI-OX ve FU-IRI) tüm sonuçlarda kontrole oranla anlamlı bir artış gözlenmektedir ($p \leq 0.05$).

6.7.Total Antioksidan Kapasitesi Analizinin Sonuçları

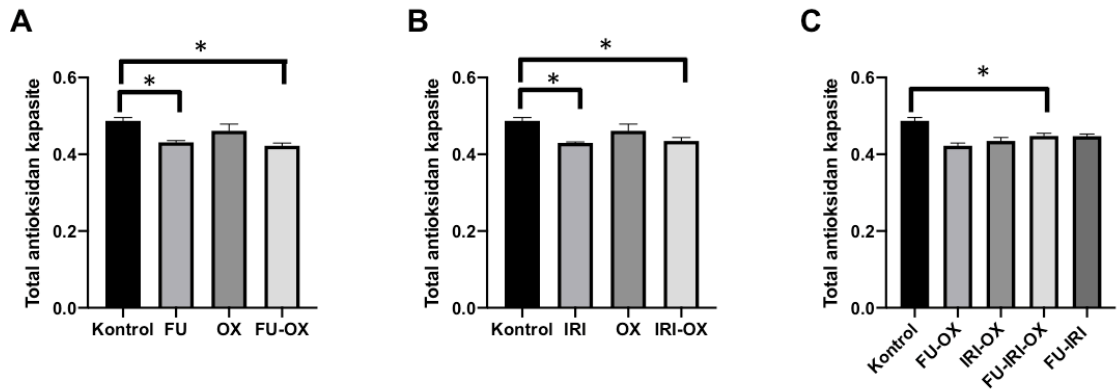
HCT116 ve HT-29 hücrelerine mevcut kemoterapötiklerin ve sodyum okzamatın tek başına veya çeşitli kombinasyonlar halinde uygulanmasını takiben, total antioksidan kapasitesi (TAK) ölçülmüştür. Bu ölçümle ortamdaki antioksidan kapasitesi hakkında bilgi sahibi olunarak kemoterapötik aracılı, oksidatif stres hakkında yorum yapılabilmesi sağlanmıştır. Total antioksidan kapasite birimi mmol Trolox eq. olarak tanımlanmıştır.



Şekil 6.7.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde total antioksidan kapasite grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının total antioksidan kapasitesine olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının total antioksidan kapasitesine olan etkisi. Total antioksidan kapasite birimi mmol Trolox eq.'dir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)



Şekil 6.7.2. HCT116 hücrelerine ait total antioksidan kapasite grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının total antioksidan kapasitesine olan etkisi. B) HCT116 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının total antioksidan kapasitesine olan etkisi. C) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının total antioksidan kapasitesine olan etkisi. Total antioksidan kapasite birimi mmol Trolox eq.'dir. * $p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

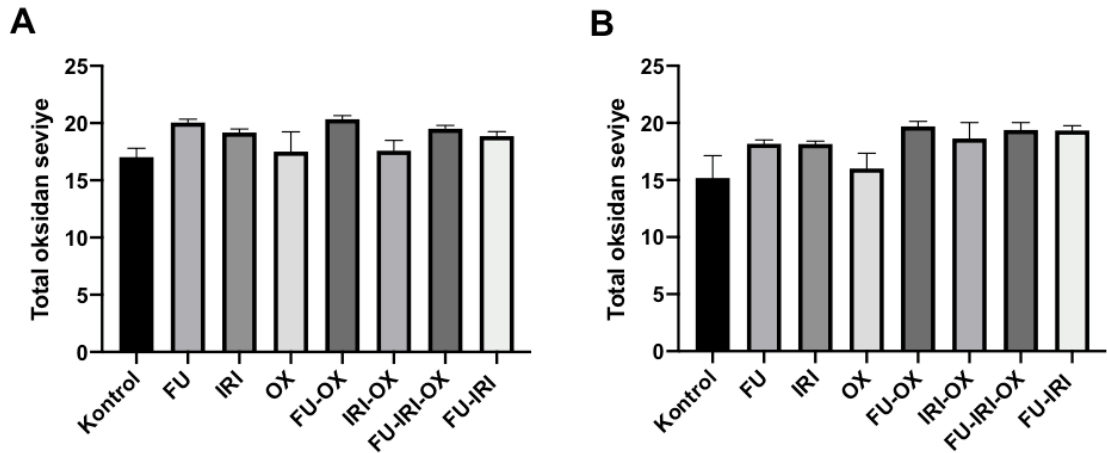


Şekil 6.7.3. HT-29 hücrelerine ait total antioksidan kapasite grafikleri. A) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte kombinasyon şeklinde uygulanmasının total antioksidan kapasitesine olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte kombinasyon halinde uygulanmasının total antioksidan kapasitesine olan etkisi. C) HT-29 hücrelerine 5-

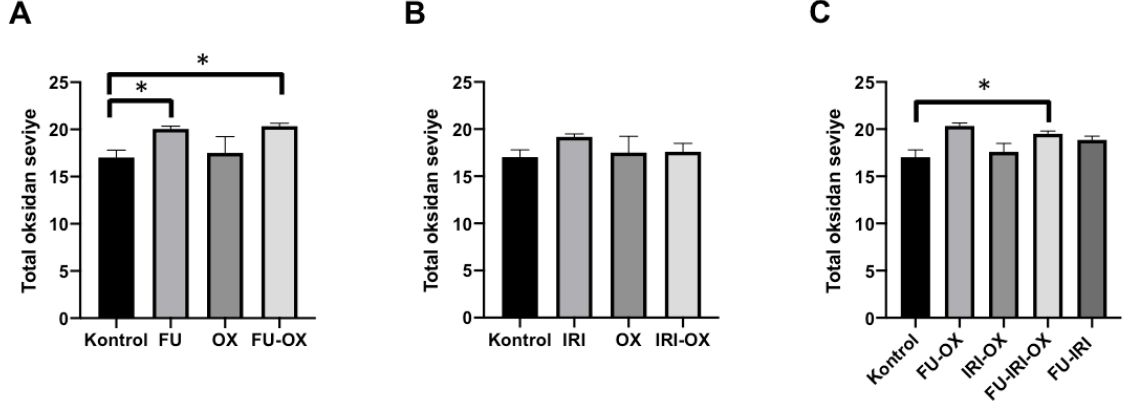
fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının total antioksidan kapasitesine olan etkisi. Total antioksidan kapasite birimi mmol Trolox eq.'dir. $*p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

6.8.Total Oksidan Seviyesi Analizinin Sonuçları

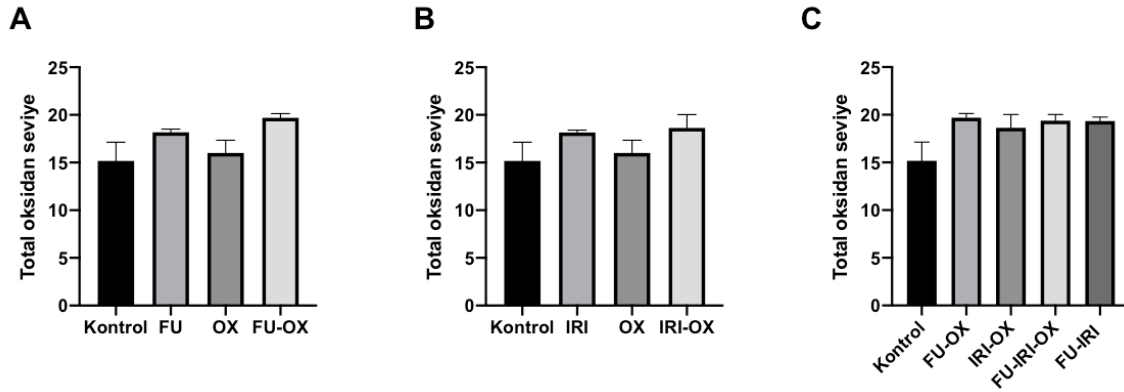
HCT116 ve HT-29 hücrelerine mevcut kemoterapötiklerin ve sodyum okzamatın tek başına veya çeşitli kombinasyonlar halinde uygulanmasını takiben, total oksidan seviyesi (TOS) ölçülmüştür. Bu ölçümle ortamdaki oksidan seviyesi hakkında bilgi sahibi olunarak kemoterapötik aracılı, oksidatif stres hakkında yorum yapılabilmesi sağlanmıştır. Total antioksidan kapasite birimi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ olarak tanımlanmıştır.



Şekil 6.8.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde total oksidan seviye grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının total oksidan seviyesine olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının total oksidan seviyesine olan etkisi. Total oksidan seviyesi birimi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 'dir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)



Şekil 6.8.2. HCT116 hücrelerine ait total oksidan seviye grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının total oksidan seviyesine olan etkisi. B) HCT116 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının total total oksidan seviyesine olan etkisi. C) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının total total oksidan seviyesine olan etkisi. Total oksidan seviyesi birimi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 'dir. $*p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

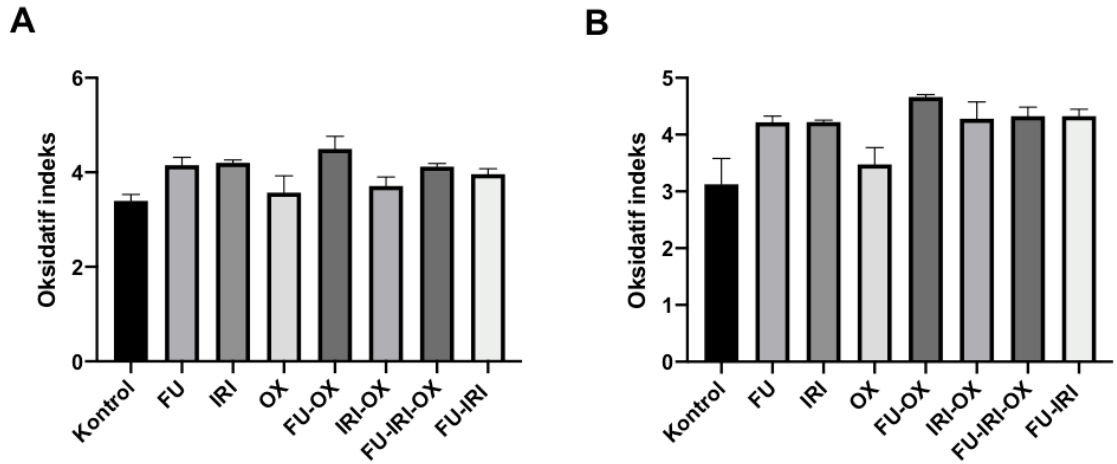


Şekil 6.8.3. HT-29 hücrelerine ait total oksidan seviye grafikleri. A) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının total oksidan seviyesine olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte kombinasyon halinde uygulanmasının total oksidan seviyesine olan etkisi. C) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun

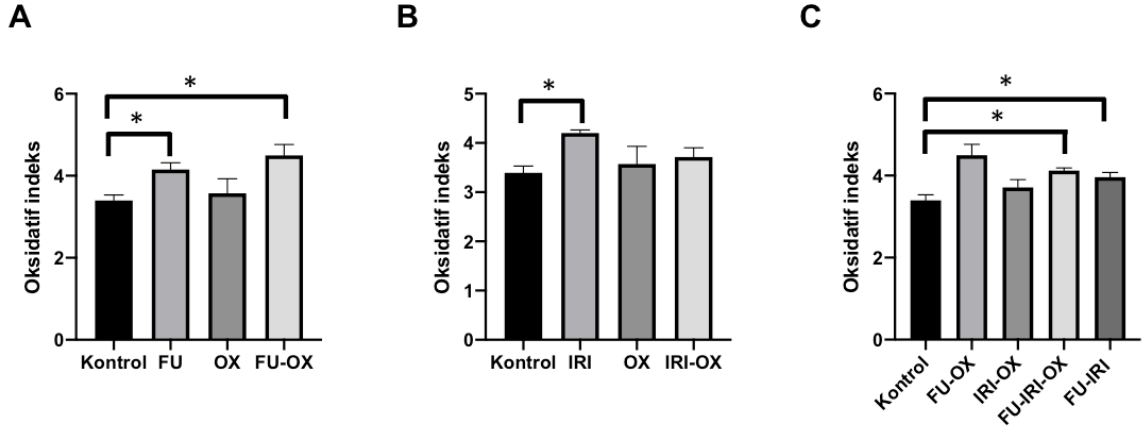
sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının total oksidan seviyesine olan etkisi. Total oksidan seviye birimi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 'dir. $*p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

6.9.Oksidatif Stres İndeksi Sonuçları

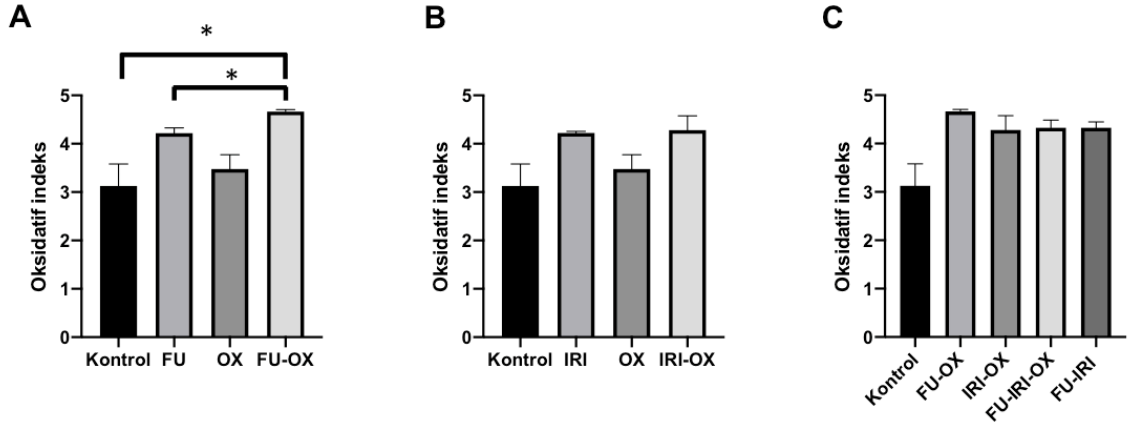
Yukarıda verilen total antioksidan kapasitesi ve total oksidan seviyeleri ölçümleri ile oksidatif stres hakkında yorum yapılabilmesini sağlayan oksidatif stress indeksine ulaşılmıştır. Total oksidan seviyesi ile total antioksidan kapasitesi arasındaki oran oksidatif stresinin derecesi hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayan oksidatif indeks değerini verir.



Şekil 6.9.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde oksidatif stress indeksi grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının oksidatif stres indeksine olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının oksidatif stres indeksine olan etkisi. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)



Şekil 6.9.2. HCT116 hücrelerine ait oksidatif stress indeksi grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının oksidatif stres indeksine olan etkisi. B) HCT116 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının oksidatif stres indeksine olan etkisi. C) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının oksidatif stres indeksine olan etkisi. * $p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

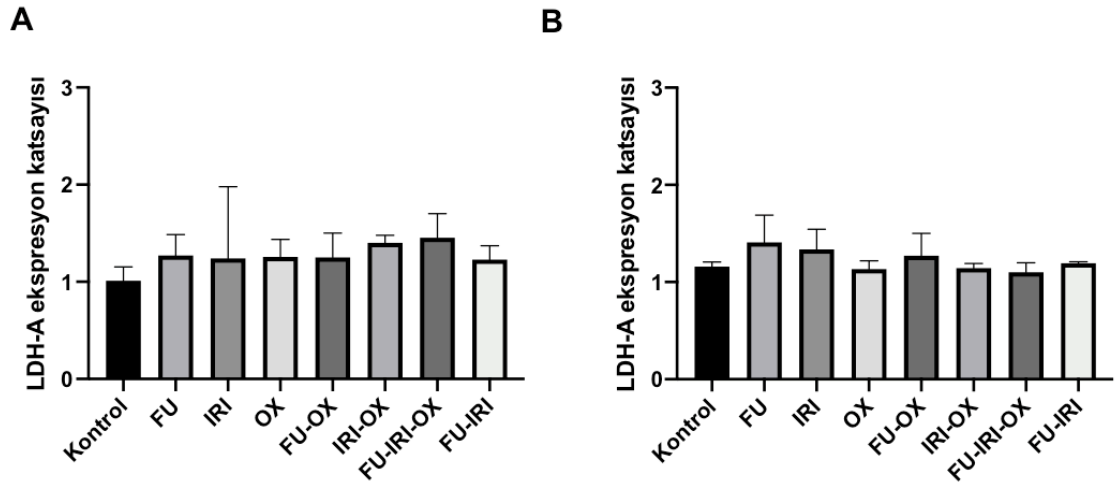


Şekil 6.9.3. HT-29 hücrelerine ait oksidatif stress indeksi grafikleri. A) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının oksidatif stres indeksine olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının oksidatif stres indeksine olan etkisi. C) HT-

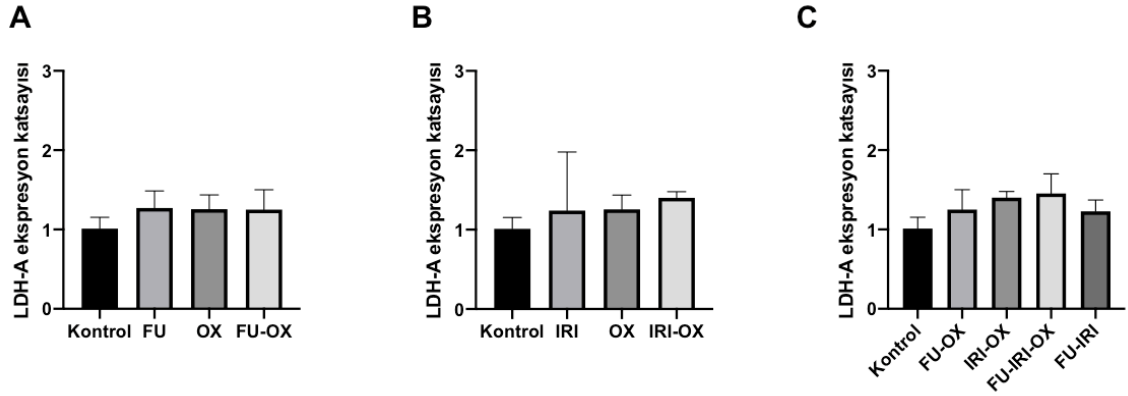
29 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının oksidatif stres indeksine olan etkisi. * $p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

6.10. Laktat Dehidrogenaz Gen Ekspresyonu Sonuçları

HCT116 ve HT-29 hücrelerine mevcut kemoterapötiklerin ve sodyum okzamatın tek başına veya çeşitli kombinasyonlar halinde uygulanmasını takiben, LDH enziminin ekspresyon durumları ölçülmüştür. Bu şekilde mevcut uygulamaların LDH-A veya LDH-B enzimlerinin ekspresyonlarında değişiklik oluşturup oluşturmadığı hakkında bilgi sahibi olunmuştur.

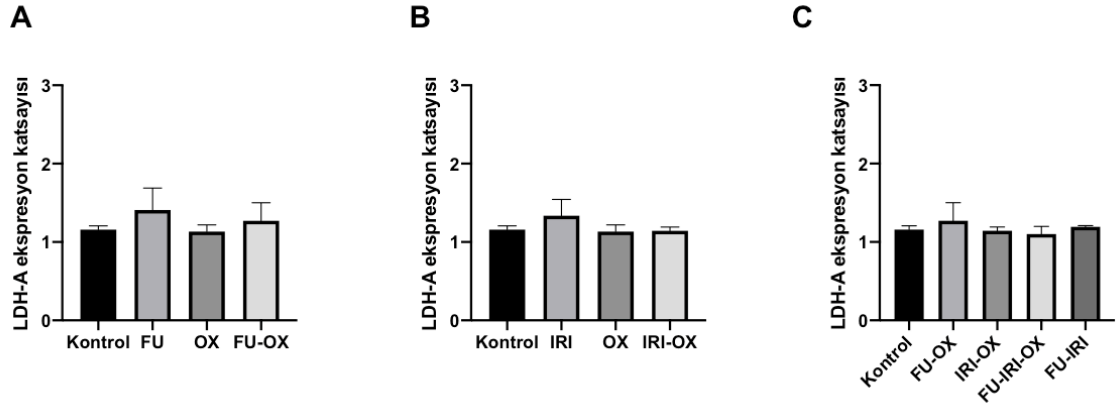


Şekil 6.10.1. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde LDH-A enziminin ekspresyonuna ait grafikler. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının LDH-A enziminin ekspresyonuna olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının LDH-A enziminin ekspresyonuna olan etkisi. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)



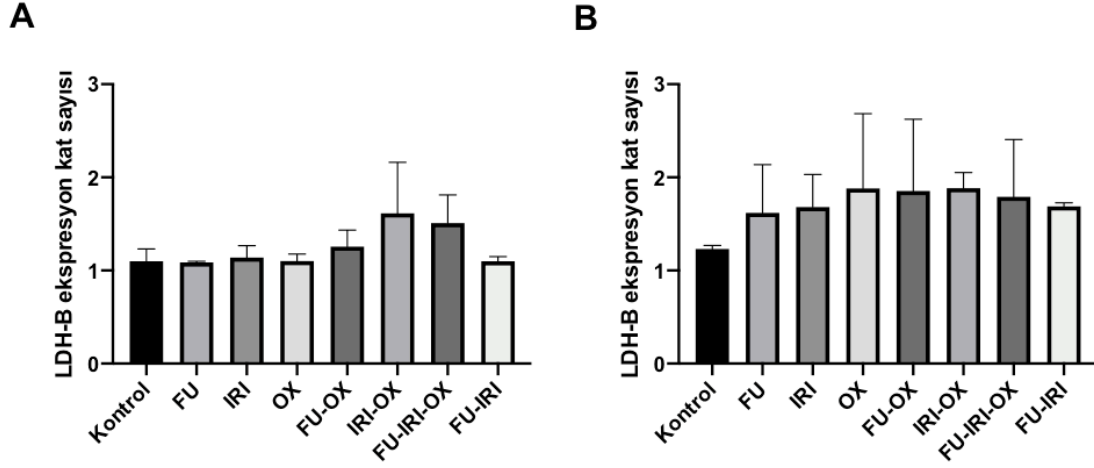
Şekil 6.10.2. HCT116 hücrelerine ait LDH-A ekspresyon grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının LDH-A ekspresyonuna olan etkisi. B) HCT116 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının LDH-A ekspresyonuna olan etkisi. C) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının LDH-A ekspresyonuna olan etkisi. $*p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

HCT116 hücrelerinde kontrol grubuna ait LDH-A ekspresyonu diğer gruplarla karşılaştırıldığında (FU, IRI, OX, FU-OX, IRI-OX, FU-IRI-OX ve FU-IRI) sonuçlarda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Özetle, HCT116 hücrelerinde mevcut kemoterapötiklerin ve sodyum okzamatın tek başına veya çeşitli kombinasyonlar halinde uygulanması LDH-A enziminin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış ya da azalma oluşturmamaktadır.

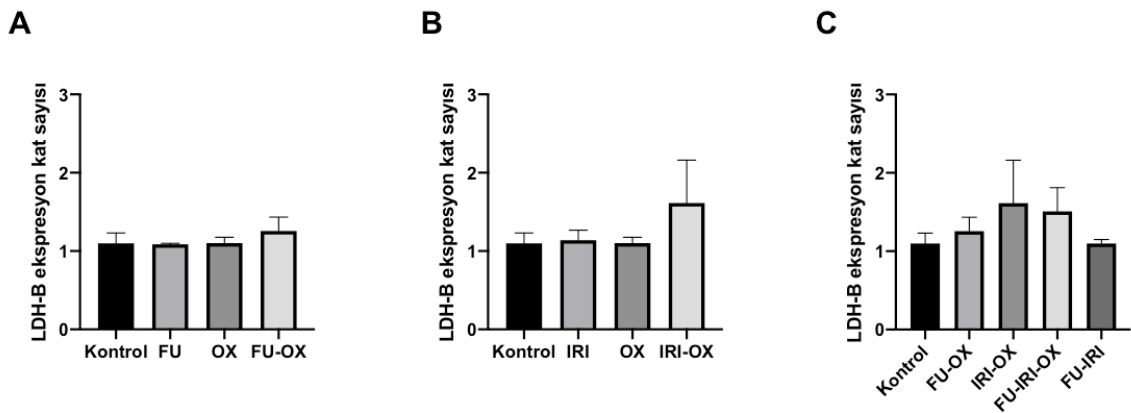


Şekil 6.10.3. HT-29 hücrelerine ait LDH-A ekspresyon grafikleri. A) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının LDH-A ekspresyonuna olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının LDH-A ekspresyonuna olan etkisi. C) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının LDH-A ekspresyonuna olan etkisi. * $p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna ait LDH-A ekspresyonu diğer gruplarla karşılaştırıldığında (FU, IRI, OX, FU-OX, IRI-OX, FU-IRI-OX ve FU-IRI) sonuçlarda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Özetle, HT-29 hücrelerinde mevcut kemoterapötiklerin ve sodyum okzamatın tek başına veya çeşitli kombinasyonlar halinde uygulanması LDH-A enziminin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış ya da azalma oluşturmamaktadır.



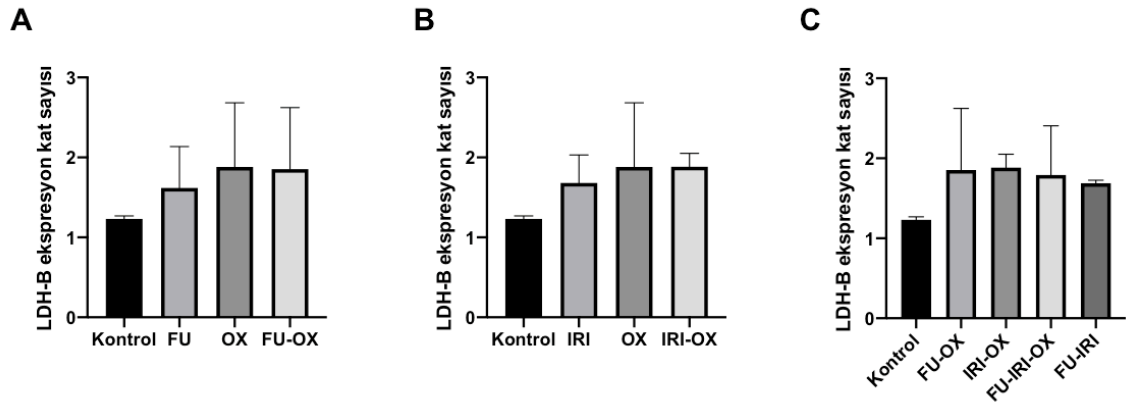
Şekil 6.10.4. HCT116 ve HT-29 hücrelerinde LDH-B enziminin ekspresyonuna ait grafikler. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının LDH-B enziminin ekspresyonuna olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının LDH-B enziminin ekspresyonuna olan etkisi. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)



Şekil 6.10.5. HCT116 hücrelerine ait LDH-B ekspresyon grafikleri. A) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının

LDH-B ekspresyonuna olan etkisi. B) HCT116 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının LDH-B ekspresyonuna olan etkisi. C) HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının LDH-B ekspresyonuna olan etkisi. * $p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

HCT116 hücrelerinde kontrol grubuna ait LDH-B ekspresyonu diğer gruplarla karşılaştırıldığında (FU, IRI, OX, FU-OX, IRI-OX, FU-IRI-OX ve FU-IRI) sonuçlarda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Özetle, HCT116 hücrelerinde mevcut kemoterapötiklerin ve sodyum okzamatın tek başına veya çeşitli kombinasyonlar halinde uygulanmasını LDH-B enziminin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış ya da azalma oluşturmamaktadır.



Şekil 6.10.6. HT-29 hücrelerine ait LDH-B ekspresyon grafikleri. A) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasilin tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının LDH-B ekspresyonuna olan etkisi. B) HT-29 hücrelerine irinotekanın tek başına ve sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının LDH-B ekspresyonuna olan etkisi. C) HT-29 hücrelerine 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonunun ve bunun sodyum okzamatla birlikte uygulanmasının LDH-B ekspresyonuna olan etkisi. * $p \leq 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. (FU: 5-Fluorourasil, IRI: İrinotekan, OX: Sodyum okzamat)

HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna ait LDH-B ekspresyonu diğer gruplarla karşılaştırıldığında (FU, IRI, OX, FU-OX, IRI-OX, FU-IRI-OX ve FU-IRI) sonuçlarda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Özetle, HT-29 hücrelerinde mevcut kemoterapötiklerin ve sodyum okzamatın tek başına veya çeşitli kombinasyonlar halinde uygulanmasını LDH-B enziminin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış ya da azalma oluşturmamaktadır.



7. TARTIŞMA

KRK'de tedavi seçenekleri diğer kanserlerde olduğu gibi kanserin evresine ve hastanın durumuna bağlı olarak değişim göstermektedir. Her hastaya cerrahi operasyon yapılamasa bile, kemoterapi uygulamaları cerrahi öncesi veya sonrası olarak uygulanabilmektedir. Ancak kemoterapötiklerin kanser hücresine spesifik olmayışı ve zaman içinde gelişen ilaç direnci kanserde yüksek mortalitenin en önemli sebepleri arasındadır [1]. Konvansiyonel sitotoksik ilaçların bir arada kullanılmasıyla, tümör hücrelerinin klonal olarak seçilme riski azaltılarak ilaç direncinin önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Konvansiyonel sitotoksik ilaçlara ek olarak hedefe yönelik tedaviler ile büyüme faktörleri, hücre yüzeyi reseptörleri veya tümör oluşumu ve progresyonu ile ilişkili enzimlerin işlevlerini engellemek veya değiştirmek tedaviye özgüllük kazandırırken başarı şansını arttırmaktadır. Özellikle kanser hücresinde değişime uğramış metabolik yollarla ilişkili faktörler geleneksel kemoterapiye yanıt geliştirmek için yeni ve kombine edici ilaçların geliştirilmesi için önemli hedefler olarak öne sürülmektedir. Ancak tümör gelişimini ve metastazı teşvik eden genetik ve epigenetik faktörlerin anlaşılmasında önemli ilerleme kaydedilmesine rağmen, tümör progresyonu ve metastatik fenotipin gelişiminde etkili olan metabolik fenotipe yönelik değişiklikler ve bunların kemoterapi etkinliği üzerine etkisi ve bununla ilişkili yeni tedavi hedeflerinin açığa çıkarılması konusunda ilerleme yavaştır [3]. Bu nedenle çalışmamız temel olarak tümör metabolizmasındaki değişikliklerin kemoterapi etkinliği üzerindeki rolü üzerine oluşturulmuştur.

Literatürdeki çalışmalar, KRK'de LDH-A aktivasyonu ile değişim gösteren metabolik fenotipin kanser hücresinin sağkalımına, kemoterapi direncine ve metastazına etki edebileceğini göstermektedir. Ancak literatürde non-metastatik KRK'de metabolizmanın LDH-A bağlantılı olarak inhibe edilmesinin kemoterapi etkinliğine olan etkisini değerlendiren çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, LDH-A bağlantılı metabolik fenotipin inhibisyonu ile, KRK'de neoadjuvan/adjuvan tedavi süreçlerinde kullanılan sitotoksik 5-fluorourasil ve irinotekan kombinasyonundan alınabilecek yanıtın artırılabilmesi yönünde araştırmaların gerekliliği fikri ortaya çıkmaktadır. Bu çalışma,

KRK'de LDH-A inhibitörlerinin mevcut tedavi uygulamalarına eklenebilirliği hakkında fikir sahibi olunmasını sağlayacak bir basamak olmasından ötürü özgündü.

Çalışmamızda LDHA enzimi inhibitörü sodyum okzamat kullanılarak, tümör metabolizmasının belkemiği olan Warburg etkisi doğrultusunda tümöre sağkalım ve direnç avantajı sağlayan laktat dehidrogenaz enziminin inhibisyonunun, geleneksel sitotoksik ajanlar olan fluorourasil ve irinotekan yanıtlarına etkisi değerlendirilmiştir. Fluorourasil, bir antineoplastik antimetabolit olan bir pirimidin analogudur. Timidilat sentetazın, deoksiüridik asidin timidilik aside dönüşümünü bloke ederek DNA sentezine müdahale eder. İrinotekanda, KRK tedavisinde kullanılan antineoplastik enzim inhibitörüdür. Topoizomeraz I'in etkisini inhibe eden kamptotesinin bir türevidir. İrinotekan, topoizomeraz I-DNA kompleksine bağlanarak DNA zincirinin yeniden bağlanmasını önler ve oluşan çift iplikli DNA kırılması ve hücre ölümüne neden olur. Çalışmamızda ilk olarak HCT116 ve HT-29 kolorektal kanser hücrelerine 5-fluorourasil, irinotekan ve sodyum okzamatın tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde uygulanmasının hücre canlılığı ve migrasyon üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Canlılık ve migrasyonun değerlendirilmesi için gerçek zamanlı, otomatize sistemler kullanıldı. Bu sistemler deney süresince hücrelerin sürekli ve kantitatif izlenmesini sağlayan yenilikçi teknoloji sunmaktadır. xCELLigence sistemi, özellikle potansiyel antikanser ilaçlarının taranması ve bileşiklerin hücreler üzerindeki etkilerinin saatlerce hatta günler boyunca izlenmesi için sitotoksisite araştırmasında bir avantaj sağlar. Böylece *in vitro* çalışmalarda karşımıza çıkan tekrarlanabilirlik ve standardizasyon konusundaki eksiklikleri aşmak adına önemlidir.

Sodyum okzamatın KRK hücre canlılığı üzerine tek başına etkisi: HCT116 ve HT-29 hücreleri üzerinde sodyum okzamat, 5-fluorourasil ve irinotekanın IC50 dozları belirlenmiştir. Bunun için her ilaç ilaç farklı dozlarda uygulanmıştır ve canlılık yüzdeleri üzerinden hücrelerin %50'sini öldüren dozlar belirlenmiştir. 5-fluorourasil ve irinotekan, KRK hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi bilinen ilaçlardır. Ancak sodyum okzamatın farklı dozlarının KRK hücrelerine olan etkileri Şekil 6.2.3'te gösterilmiştir. Sodyum okzamat, her iki KRK hücre hattına 5, 10, 20, 40, 80 ve 100mM olacak şekilde farklı dozlarda uygulanmıştır. Elde edilen 24 saatlik ve 48 saatlik canlılık verilerinden yola

çıkıldığında, sodyum okzamat doza bağımlı olarak hem HCT116 hem de HT-29 hücrelerine sitotoksik etki göstermektedir. Her iki hücre hattında hem 24 saatlik hemde 48 saatlik canlılık verileri değerlendirildiğinde 10, 20, 40, 80 ve 100mM konsantrasyonlarındaki sodyum okzamat uygulaması kontrole göre canlılığı anlamlı olarak azaltmaktadır ($p \leq 0.05$).

Zhao ve arkadaşları, okzamat-aracılı otofaji hakkında yürüttükleri çalışmalarında sodyum okzamatın 20-120mM doz aralığında gastrik kanser hücre hatları üzerindeki etkisini değerlendirmiştir ve proliferasyonun anlamlı oranda azaldığını saptamışlardır. Aynı çalışmada sodyum okzamat uygulanması ile Akt/mTOR yolağı ilişkili otofajinin indüklendiği de gösterilmiştir [118].

Yang ve arkadaşları, LDH-A inhibisyonunun akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında sodyum okzamatı 20-100mM doz aralığında akciğer kanseri hücre hatlarına uygulamışlardır. Sonuçlarda proliferasyonun anlamlı oranda azaldığını saptamışlardır. Aynı çalışmada sodyum okzamat uygulanması ile hücre ölümünün oksidatif stresle indüklenen apoptoz üzerinden gerçekleştiği de gösterilmiştir [119].

Zhai ve arkadaşları, LDH-A inhibisyonu ve radyosensitivite hakkında yürüttükleri çalışmalarında sodyum okzamatın 20-100mM doz aralığında nazofariks karsinoma hücre hatları üzerindeki etkisini değerlendirmiştir, ve proliferasyonun dozla bağımlı olacak şekilde anlamlı oranda azaldığını saptamışlardır. Aynı çalışmada sodyum okzamat aracılı LDHA inhibisyonunun, CDK1/siklin B1 yolağının baskılanmasıyla ve ROS artışı ile indüklenen apoptoz aracılığıyla G2/M hücre döngüsü kaçışına neden olduğu da gösterilmiştir [120].

Liu ve arkadaşları, LDH-A baskılanmasının gastrik kanser hücrelerine olan etkilerini inceledikleri çalışmalarında sodyum okzamatı 20-100 mM doz aralığında gastrik karsinoma hücre hatlarına uygulamışlardır ve laktat üretimindeki azalma ile birlikte proliferasyonun dozla bağımlı olacak şekilde anlamlı oranda azaldığını saptamışlardır. Aynı çalışmada sodyum okzamat aracılı LDHA inhibisyonunun, Bax protein ekspresyonunu arttırıp, Kaspaz-3'ü aktive edip ve Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir [121].

Sodyum okzamatın kemoterapötiklerler kombinasyonunun KRK hücre canlılığı üzerine etkisi: HCT116 hücrelerine sodyum okzamatın, 5-fluorourasil ve irinotekan ile kombinasyon halinde uygulanmasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi incelendiğinde, 5-fluorourasil/sodyum okzamat kombinasyonunun 5-fluorourasilin tek başına uygulanmasına göre hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir ($p \leq 0.05$). Bunun yanında irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonu, irinotekanın tek başına kullanılmasına oranla, ve 5-fluorourasil/irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonu fluorourasil/irinotekan kombinasyonuna kıyasla hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmamıştır (Şekil 6.3.2).

HT-29 hücrelerine ait canlılık grafikleri incelendiğinde, 5-fluorourasil/sodyum okzamat kombinasyonu 5-fluorourasilin tek başına kullanımına kıyasla; irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonu irinotekanın tek başına kullanımına kıyasla; 5-fluorourasil/irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonunun kullanımı 5-fluorourasil/irinotekan birlikteliğine kıyasla hücre canlılığını anlamlı oranda azaltmıştır ($p \leq 0.05$) (Şekil 6.3.3).

LDH inhibisyonunun, kanser hücrelerine uygulanan kemoterapiye hassasiyetin artması üzerine etkisi olduğu çeşitli grupların yürüttüğü çalışmalarla gösterilmiştir [122, 109]. Örneğin, Zhou ve arkadaşları sodyum okzamatın taksol ile kombinasyonunun taksol dirençli meme kanseri hücrelerinde canlılığı anlamlı oranda azalttığını ve apoptozun indüklendiğini raporlamışlardır [122, 109]. Ancak literatürde KRK’de güncel olarak kullanılan kemoterapötiklerin sodyum okzamat ile birlikte kullanılmasını değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

HCT116 ve HT-29 genetik açıdan farklılık içeren hücre hatlarıdır, HCT116 *Kras* G13D mutasyonu barındırırken; HT-29 is *Braf* V600E mutasyonu barındırmaktadır. Aynı ilaçların ve dozların uygulanması sonucu gözlenen farklılıklar genetik farklılıklar üzerinden anlamlandırılabilir. Literatürde *Kras* ve *Braf* mutasyonu açısından farklılık gösteren KRK’lerin metabolik fenotiplerinin ve gen ekspresyon paternlerinin farklılığı açısından yayınlar mevcuttur [123-125].

Çalışmamızda, sodyum okzamatın mevcut kemoterapötiklerle kombinasyon şeklinde kullanımının KRK hücrelerinin canlılığı üzerine sinerjistik inhibitör etkisi açık

olarak görülmektedir. Bunun sebebi olarak, tümörün canlılığını destekleyen Warburg etkisi doğrultusunda LDH enziminin inhibisyonu ve laktat seviyelerinin düşmesiyle kanser hücresinin kazandığı agresif fenotipin önlendiği yorumu yapılabilir. LDH, laktat ve agresif fenotip hakkında bilgi sahibi olabilmek için canlılık analizlerinin ardından hücrenin metastatik özelliğinin ilk adımı olan migratif karakteri değerlendirilmiştir.

Sodyum okzamatın KRK hücre migrasyonu üzerine etkisi: Hücre canlılığının değerlendirilmesinden sonra, sodyum okzamat kullanımının KRK hücrelerinin yayılmacı karakterine olan etkisini yorumlayabileceğimiz migratif özelliği hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayan migrasyon kapasitesi değerlendirilmiştir.

HCT116 hücrelerine sodyum okzamatın, 5-fluorourasil ve irinotekan ile kombinasyon halinde uygulanmasının migrasyonun inhibisyonu üzerine olan etkisi incelendiğinde, irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonunun irinotekanın tek başına uygulanmasına göre migrasyonu anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir ($p \leq 0.05$). Ancak 5-fluorourasil/sodyum okzamat kombinasyonu, 5-fluorourasilin tek başına kullanılmasına kıyasla; ve 5-fluorourasil/irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonu 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonuna kıyasla migrasyonu anlamlı olarak azaltmamıştır (Şekil 6.4.2).

HT-29 hücrelerine ait migrasyon grafikleri incelendiğinde, 5-fluorourasil/ sodyum okzamat kombinasyonu 5-fluorourasilin tek başına kullanımına kıyasla; irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonu irinotekanın tek başına kullanımına kıyasla; 5-fluorourasil/irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonu 5-fluorourasil/irinotekan birlikteliğine kıyasla migrasyonu anlamlı oranda azaltmıştır ($p \leq 0.05$) (Şekil 6.4.3).

Liu ve arkadaşları çalışmalarını sodyum okzamatın, mevcut kemoterapötiklerle birlikte kullanımına yönelik olarak yürütmemişlerdir. Ancak sodyum okzamatın 20-100 mM doz aralığında kullanımının gastrik karsinoma hücrelerinin invaziv karakterini azalttıklarını raporlamışlardır [121].

Literatürde, LDH-A'nın kimyasal kullanımını ile değil de siRNA kullanılarak inhibe edildiği çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda da, LDH-A inhibisyonu ile birlikte kanser hücresinin invaziv özelliğinin azaldığı raporlanmıştır. Örneğin Arseneault ve arkadaşları, meme kanseri hücrelerinde LDHA'nın siRNA ile inhibisyonu sonucu hücre

migrasyonunun anlamlı oranda azaltıldığını göstermişlerdir [98].

Jiang ve arkadaşları tarafından mesane kanseri üzerinde yürütülen çalışmada da, LDH-A'nın siRNA ile inhibe edilmesinin mesane kanseri hücrelerinin epitelyal-mezenşimal geçişle ilişkili proteinlerin (E-kaderin) ekspresyonlarını ve hücrelerin invaziv/migratif özelliklerini anlamlı oranda azalttığı gösterilmiştir [99].

Sodyum okzamatın laktat seviyelerine olan etkisi: HCT116 hücrelerine sodyum okzamatın, 5-fluorourasil ve irinotekan ile kombinasyon halinde uygulanmasının laktatın üretimi üzerine olan etkisi incelendiğinde, 5-fluorourasil/sodyum okzamat kombinasyonu 5-fluorourasilin tek başına kullanımına kıyasla; irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonu irinotekanın tek başına kullanımına kıyasla; ve 5-fluorourasil/irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonu 5-fluorourasil/irinotekan birlikteliğine kıyasla laktat üretimini anlamlı olarak azaltmıştır ($p \leq 0.05$) (Şekil 6.5.2).

HT-29 hücrelerine ait laktat grafikleri incelendiğinde ise, 5-fluorourasil/sodyum okzamat kombinasyonu 5-fluorourasilin tek başına kullanımına kıyasla; irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonu irinotekanın tek başına kullanımına kıyasla; ve 5-fluorourasil/irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonu 5-fluorourasil/irinotekan birlikteliğine kıyasla laktat üretimini anlamlı olarak azaltmıştır ($p \leq 0.05$) (Şekil 6.5.3).

Literatürdeki yayınlarda, sodyum okzamatın hücre kültür ortamına eklenerek kullanıldığı çalışmalarda sodyum okzamatın kullanım amacına uygun olarak etki gösterip göstermediğinin kontrolü için ya laktat analizi, ya da LDH-A aktivitesine yönelik aktivite analizi yapılmıştır. Hepsinde sodyum okzamat uygulaması ile elde edilen LDH-A aktivitesinde azalma/inhibisyon ve bunun sonucu laktat üretimindeki azalma ile laktat konsantrasyonlarındaki azalma gösterilmiştir.

Zhao ve arkadaşları, gastrik kanser hücrelerinde sodyum okzamatı 20-120mM doz aralığında kullanarak LDH-A'yı inhibe ettikleri çalışmalarında, sodyum okzamat uygulaması ile doza bağımlı olarak laktat konsantrasyonunda anlamlı azalma saptamışlardır [118].

Seliger ve arkadaşlarının glioma hücreleri üzerinde sodyum okzamat uygulamasıyla laktatı module ettikleri çalışmalarında, sodyum okzamat uygulaması ile doza bağımlı olarak LDHA aktivitesinde ve laktat konsantrasyonunda anlamlı azalma

saptamışlardır [126].

Liu ve arkadaşları, gastrik karsinoma hücre hatları üzerinde sodyum okzamatın 20-100 mM doz aralığında uygulanması ile doza bağımlı olarak laktat üretiminde anlamlı azalma saptamışlardır [121].

Zhai ve arkadaşları nazofarinks hücreleri üzerinde, Yang ve arkadaşlarının ise akciğer kanseri hücreleri üzerinde yürüttükleri çalışmalarında, sodyum okzamat uygulamasıyla birlikte doza bağımlı olarak LDHA aktivitesinde anlamlı azalma saptamışlardır [119] [120].

Sodyum okzamatın asetil KoA miktarına etkisi: Laktat analizi ardından, HCT116 ve HT-29 hücrelerine mevcut kemoterapötiklerin ve sodyum okzamatın tek başına veya çeşitli kombinasyonlar halinde uygulandığı gruplarla asetil KoA ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümle tümör metabolizmasının belkemiği olan Warburg etkisi doğrultusunda tümöre sağkalım ve direnç avantajı sağlayan laktatın azaltılmasının amaçlandığı koşullarda, laktata gitmeyen pirüvatın asetil KoA oluşturması hakkında hakkında bilgi sahibi olunmuştur.

HCT116 hücrelerine sodyum okzamatın, 5-fluorourasil ve irinotekan ile kombinasyon halinde uygulanmasının asetil KoA üzerine olan etkisi incelendiğinde; 5-fluorourasil/sodyum okzamat kombinasyonunun kullanıldığı koşullarda 5-fluorourasilin tek başına kullanımına kıyasla irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonunun kullanıldığı koşullarda irinotekanın tek başına kullanımına kıyasla asetil KoA miktarı anlamlı olarak artmıştır ($p \leq 0.05$) (Şekil 6.6.2).

HT-29 hücrelerine ait asetil KoA grafikleri incelendiğinde, 5-fluorourasil/irinotekan/sodyum okzamat kombinasyonunun kullanıldığı koşullarda 5-fluorourasil/irinotekan kullanımına kıyasla asetil KoA miktarı anlamlı olarak artmıştır ($p \leq 0.05$) (Şekil 6.6.3).

Lu ve arkadaşlarının, pankreas kanseri hücrelerinde epigallokatekin gallate ve sodyum okzamat ile LDH-A inhibisyonun meydana getirdiği metabolik değişimlere odaklandıkları çalışmalarında, okzamat ile LDH-A inhibisyonu sonucunda azalmış glikoliz ile birlikte pirüvatın asetil KoA oluşumuna katkıda bulunduğu saptanmıştır [127].

Laktat oluşturmeyan pirüvatın, asetil KoA üzerinden TCA'ya girip mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu arttırması, LDH-A inhibisyonun ve laktat azaltımının ana hedeflerinden birisidir. Bu nedenle asetil KoA miktarındaki artış pirüvatın oksidatif fosforilasyona girdiğinin göstergesi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sodyum okzamatın total antioksidan kapasitesine etkisi: Anti-kanser ajanlarının işlevsel mekanizmaları, genellikle mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin üretimini uyarılması ve kanser hücresinde oldukça aktif olan antioksidan savunma sistemlerinin metabolik inhibisyonla etkisizleştirilmesidir. Hücrel metabolik yollarla ilişkili olan değişiklikler genelde, amino asitler, lipitler ve nükleotit gibi temel yapı taşlarının sentezi ile bağlantılıdır. Bu yolların substratları, NADPH ve glutatyon (GSH) dahil olmak üzere yalnızca antioksidan molekülleri değil aynı zamanda NADH ve FADH gibi redoks kofaktörlerini üretmek için kullanılır. Redoks homeostazında yer alan hücrel metabolik yollar arasında, glikoliz, tümördeki homeostazın kontrolünde esas oyuncu olarak kabul edilir, çünkü glikolitik ara maddeler NADPH ve GSH43 gibi indirgen eşdeğerleri üreten metabolik yollara yerleştirilebilir. Son çalışmalar, sodyum okzamat dahil LDHA inhibitörleri tarafından aerobik glikolizin baskılanmasının, oksidatif stresin indüklenmesi yoluyla kanserin ilerlemesini azalttığını göstermiştir [93, 119].

Çalışmamızda, hem HCT116 hem de HT-29 hücrelerinde fluorourasil ve irinotekanın tek başına kullanıldığı durumlarda total antioksidan kapasitesinde istatistiksel olarak anlamlı düşüşler gözlenmektedir. Ancak kemoterapötik ajanlara sodyum okzamat eklenmesi durumunda benzer anlamlılık oranları elde edilememiştir. Sodyum okzamatın kullanıldığı şartlarda total antioksidan kapasitesinde düşmeler görülse bile bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlı değildir. HCT116 hücrelerine 5-fluorourasil/sodyum okzamat kombinasyonunun kullanıldığı koşullarda 5- fluorourasilin tek başına kullanımına kıyasla total antioksidan anlamlı olarak azalma göstermiştir ($p \leq 0.05$). Bu durum, 5-fluorourasil/sodyum okzamat kombinasyonunun HCT116 hücrelerinin antioksidan kapasitesini azalttığını; bunun da 5-fluorourasil/sodyum okzamat grubundaki azalmış canlılığın destekleyicilerinden olabileceği düşünülebilir.

Sodyum okzamatın total oksidan seviyesine ve oksidatif indekse etkisi: Total oksidan seviyeleri açısından inceleme yapıldığında, hem HCT116 hücrelerinde hem de

HT-29 hücrelerinde hiçbir grupta anlamlı bir artış yakalanamamıştır. Oksidatif stres indeksi açısından analiz yapıldığında da HT-29 hücrelerinde 5-fluorourasil/sodyum okzamat grubunda, 5-fluorourasil grubuna oranla artmış oksidatif stres indeksi saptanmaktadır ($p \leq 0.05$). Bu durum, 5-fluorourasil/sodyum okzamat kombinasyonunun HT29 hücrelerinde oksidatif stresi indüklediğini ve bunun da azalmış canlılık oranının ana sebeplerinden biri olabileceğini düşündürmektedir.

Zhao ve arkadaşlarının gastrik kanser üzerinde, Zhai ve arkadaşlarının nazofarinks kanseri hücrelerinde, Yang ve arkadaşlarının akciğer kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmalarda okzamatın reaktif oksijen türlerini arttırarak hücreleri apoptoza götürdüğü gösterilmiştir [119, 120, 118].

Sodyum okzamatın LDHA ve LDHB ekspresyonuna etkisi: HCT116 ve HT-29, kolorektal kanser hücreleri üzerinde sodyum okzamatın tek başına ve güncel kemoterapötiklerle birlikte kullanıldığı çalışmamızda, canlılık, migrasyon, mikroçevredeki laktat ve asetil KoA'da saptanan değişimlerle birlikte LDHA ve LDHB enzimlerinin ekspresyon durumlarında değişiklik olup olmadığına dair bilgi almak için gerçek zamanlı pcr ile bu enzimlerin ekspresyon durumlarını değerlendirdik. Sonuçlarımızda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim ne LDHA için ne de LDHB için saptanmamış olsa da; sodyum okzamat kullanımı ve onun yarattığı mikroçevresel değişimlerle birlikte LDHA ekspresyonlarında azalma ile birlikte LDHB ekspresyonlarında artış durumu gözlenmektedir. Bu durum, LDHA enziminin aktivitesel olarak bloke edilmeye çalışıldığı durumda LDHB'de artış olabileceğine dair bilgi veriyor olabilir. Warburg etkisinin ve tümör mikroçevresinde laktattan ileri gelen avantajın devamlılığı konusunda LDH izoenzimleri arasında ekspresyonel değişimlerin varlığı literatüre sunulmuştur [128]. Her iki LDH enziminin düzenlenme mekanizmalarının ve yollarının farklılığı göz önüne alındığında, LDHA'nın regülasyonu için gereken koşullar ortadan kaldırıldığında LDHB'nin ekspresyonel olarak artış göstermesi söz konusu olabilir.

8. SONUÇ

Kanser metabolizmasıyla ilgili olarak Otto Warburg tarafından önerilen aerobik glikoliz rolünün ötesinde, kanser metabolizması konusundaki anlayışımız büyük ölçüde değişmektedir. Günümüzde kanser metabolizması araştırmaları kanseri iyileştirmek ve geleneksel tedavilerin sınırlarını aşmak için yürütülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Avrupa'da kanser metabolizmasını yönlendiren ilaçlara ait çok sayıda klinik çalışma yürütülmektedir. Bu nedenle, kanser terapisi için kanser metabolizmasına yönelik ilave ilaçların tek başına ya da geleneksel tedavi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi ile kombinasyon halinde geliştirilebileceği muhtemeldir.

Bu noktada, kanser metabolizmasının yeniden programlanması ve kemoterapi etkinliğinin artırılması için metabolizmanın modülasyonu üzerine olan çalışmaların gerekliliği söz konusuysen, ülke olarak ilaç çalışmalarında kullanılabilecek yeni bilgilerin literatüre kazandırılması konusunda kaynak gösterilme potansiyeli olan öncü proje çıktılarını oluşturabilmek önemlidir. Bu doğrultuda bu çalışmanın primer amacı tümör metabolizmasının belkemiği olan Warburg etkisi doğrultusunda tümöre sağkalım ve direnç avantajı sağlayan LDH enziminin ve laktatın LDH inhibitörü sodyum okzamat ile modüle edilmesinin, güncel KRK tedavi seçenekleri 5-Fluorourasil ve irinotekan kullanımı üzerindeki etkisini göstermektir.

Çalışmamızda, ilk olarak sodyum okzamatın kanser hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçlarımız doğrultusunda, sodyum okzamatın hem HCT116 hücrelerinde hem de HT-29 hücre hattında canlılığı anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir ($p \leq 0.05$).

Sodyum okzamatın KRK'nin tedavisinde güncel olarak kullanılan 5-fluorourasil ve irinotekanla kombinasyonu sonucunda HCT116 ve HT-29 hücre hatlarının canlılığında anlamlı azalma gözlenmiştir ($p \leq 0.05$). Sodyum okzamatın HCT116 hücre hattında 5-fluorourasil ile birlikte kullanılması durumunda; HT-29 hücre hattında ise hem 5-fluorourasil hem de irinotekan ile birlikte kullanılması durumunda hücre canlılığında anlamlı azalma gözlenmiştir ($p \leq 0.05$).

Migrasyon açısından yapılan incelemelerde, ise sodyum okzamatın 5-fluorourasil ve irinotekanla kombinasyonu sonucunda migrasyonu anlamlı olarak inhibe ettiği gözlenmiştir ($p \leq 0.05$). Sodyum okzamatın HCT116 hücre hattında irinotekan ile birlikte kullanılması durumunda; HT-29 hücre hattında ise hem 5-fluorourasil hem de irinotekan ile birlikte kullanılması durumunda migrasyonun inhibisyonunda anlamlı artış gözlenmiştir ($p \leq 0.05$).

Çalışmamızda sodyum okzamatın tek başına veya kemoterapötiklerle birlikte kullanılması sonucunda, laktat ve asetil KoA düzeylerindeki değişimlere de odaklanılmıştır. Sonuçlarımız doğrultusunda, her iki hücre hattında sodyum okzamatın tek başına veya fluorourasil ve irinotekanla kombinasyon şeklinde kullanıldığında laktat seviyelerinde anlamlı azalmalar gözlenmiştir ($p \leq 0.05$). Bu sonuç sodyum okzamatın, LDHA'yı inhibe ettiğini ve laktat oluşumunu azalttığının göstergesidir. Hücrenin agresif fenotipini destekleyen laktatın azaltılması canlılıkla birlikte migrasyondaki azalmanın temel sebebi olarak gösterilebilir.

Asetil KoA düzeyleri açısından incelemeler yapıldığında, HCT116 hücrelerinde sodyum okzamatın 5-fluorourasil ve irinotekanla birlikte kullanıldığında; HT-29 hücrelerinde ise sodyum okzamatın 5-fluorourasil/irinotekan kombinasyonu ile birlikte kullanıldığında asetil KoA'nın anlamlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir ($p \leq 0.05$). Asetil KoA miktarındaki artış pirüvatın TCA üzerinden oksidatif fosforilasyona girdiğinin işareti olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sonuç olarak, sodyum okzamatın KRK'nin güncel tedavisinde kullanılan 5-fluorourasil ve irinotekan ile kombinasyon halinde kullanılması durumunda kanser hücrelerinin canlılığı ve migrasyonu; 5-fluorourasil ve irinotekanın tek başına kullanılmasına oranla anlamlı olarak azalmaktadır. Kanser mikroçevresinde hücrenin migratif ve metastatik özelliğini destekleyerek hücreye agresif fenotip kazandırma konusunda etkin olan laktatın, sodyum okzamat kullanılmasıyla azaltılması canlılık ve migrasyondaki azalmayı desteklemektedir. Ayrıca artış gösteren asetil KoA düzeyleri de metabolik açıdan mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun artabileceğini göstermektedir.

9. KAYNAKLAR

- [1] Persidis A. Cancer multidrug resistance. *Nat Biotechnol.* 17(1); 94-5, 1999.
- [2] Crawford S. Is it time for a new paradigm for systemic cancer treatment? Lessons from a century of cancer chemotherapy. *Front Pharmacol.* 4(68), 2013.
- [3] Galluzzi L, Kepp O, Vander Heiden MG, Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 12(11); 829-46, 2013.
- [4] Schwartz L, Supuran CT, Alfarouk KO. The Warburg Effect and the Hallmarks of Cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 17(2); 164-70, 2017.
- [5] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 324(5930); 1029-33, 2009.
- [6] Doherty JR, Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest.* 123(9); 3685-92, 2013.
- [7] Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 21(3); 297-308, 2012.
- [8] Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 51(2); 349-53, 2001.
- [9] Walenta S, Chau TV, Schroeder T, Lehr HA, Kunz-Schughart LA, et al. Metabolic classification of human rectal adenocarcinomas: a novel guideline for clinical oncologists? *J Cancer Res Clin Oncol.* 129(6); 321-6, 2003.
- [10] Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfor K, et al. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.* 60(4); 916-21, 2000.
- [11] Mishra D, Banerjee D. Lactate Dehydrogenases as Metabolic Links between Tumor and Stroma in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel).* 11(6); 2019.
- [12] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 69(1); 7-34, 2019.

- [13] Murphy N, Moreno V, Hughes DJ, Vodicka L, Vodicka P, et al. Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Mol Aspects Med.* 2019.
- [14] Fleming M, Ravula S, Tatishev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 3(3); 153-73, 2012.
- [15] Xing M, Kooby DA, El-Rayes BF, Kokabi N, Camacho JC, et al. Locoregional therapies for metastatic colorectal carcinoma to the liver--an evidence-based review. *J Surg Oncol.* 110(2); 182-96, 2014.
- [16] Mahnken AH, Pereira PL, de Baere T. Interventional oncologic approaches to liver metastases. *Radiology.* 266(2); 407-30, 2013.
- [17] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1); 57-70, 2000.
- [18] Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol.* 41(3); 185-92, 2006.
- [19] Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol.* 13(28); 3784-91, 2007.
- [20] Cheah PY. Recent advances in colorectal cancer genetics and diagnostics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 69(1); 45-55, 2009.
- [21] McNeill H, Woodgett JR. When pathways collide: collaboration and connivance among signalling proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(6); 404-13, 2010.
- [22] Marmol I, Sanchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 18(1); 2017.
- [23] Porru M, Pompili L, Caruso C, Biroccio A, Leonetti C. Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer: current strategies and emerging opportunities. *J Exp Clin Cancer Res.* 37(1); 57, 2018.
- [24] Shankaran V, Obel J, Benson AB, 3rd. Predicting response to EGFR inhibitors in metastatic colorectal cancer: current practice and future directions. *Oncologist.* 15(2); 157-67, 2010.
- [25] Pandurangan AK. Potential targets for prevention of colorectal cancer: a focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt pathways. *Asian Pac J Cancer Prev.* 14(4); 2201-5, 2013.

- [26] Holmes D. PI3K pathway inhibitors approach junction. *Nat Rev Drug Discov.* 10(8); 563-4, 2011.
- [27] Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol.* 22(16); 3420-8, 2004.
- [28] Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol.* 21(1); 84-93, 2015.
- [29] Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 7(12); 979-87, 2008.
- [30] Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 23(1); 27-47, 2016.
- [31] Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pages M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol.* 14(1); 11-31, 2017.
- [32] Kinnaird A, Zhao S, Wellen KE, Michelakis ED. Metabolic control of epigenetics in cancer. *Nat Rev Cancer.* 16(11); 694-707, 2016.
- [33] Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer.* 13(8); 572-83, 2013.
- [34] Yang M, Vousden KH. Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nat Rev Cancer.* 16(10); 650-62, 2016.
- [35] Amelio I, Cutruzzola F, Antonov A, Agostini M, Melino G. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci.* 39(4); 191-8, 2014.
- [36] Choi YK, Park KG. Targeting Glutamine Metabolism for Cancer Treatment. *Biomol Ther (Seoul).* 26(1); 19-28, 2018.
- [37] Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27(441-64), 2011.
- [38] Schulze A, Harris AL. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature.* 491(7424); 364-73, 2012.
- [39] Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci.* 39(8); 347-54, 2014.

- [40] Rohrig F, Schulze A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer*. 16(11); 732-49, 2016.
- [41] Mullen PJ, Yu R, Longo J, Archer MC, Penn LZ. The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. *Nat Rev Cancer*. 16(11); 718-31, 2016.
- [42] Jiang B. Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment. *Genes Dis*. 4(1); 25-7, 2017.
- [43] Zois CE, Favaro E, Harris AL. Glycogen metabolism in cancer. *Biochem Pharmacol*. 92(1); 3-11, 2014.
- [44] Zhang P, Tu B, Wang H, Cao Z, Tang M, et al. Tumor suppressor p53 cooperates with SIRT6 to regulate gluconeogenesis by promoting FoxO1 nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(29); 10684-9, 2014.
- [45] Balsa-Martinez E, Puigserver P. Cancer Cells Hijack Gluconeogenic Enzymes to Fuel Cell Growth. *Mol Cell*. 60(4); 509-11, 2015.
- [46] DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 7(1); 11-20, 2008.
- [47] Phan LM, Yeung SC, Lee MH. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol Med*. 11(1); 1-19, 2014.
- [48] Schornack PA, Gillies RJ. Contributions of cell metabolism and H⁺ diffusion to the acidic pH of tumors. *Neoplasia*. 5(2); 135-45, 2003.
- [49] Krogh A. The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J Physiol*. 52(6); 409-15, 1919.
- [50] Gatenby RA, Gawlinski ET. A reaction-diffusion model of cancer invasion. *Cancer Res*. 56(24); 5745-53, 1996.
- [51] Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. 379(6560); 88-91, 1996.

- [52] Gatenby RA, Vincent TL. An evolutionary model of carcinogenesis. *Cancer Res.* 63(19); 6212-20, 2003.
- [53] Kiani MF, Pries AR, Hsu LL, Sarelius IH, Cokelet GR. Fluctuations in microvascular blood flow parameters caused by hemodynamic mechanisms. *Am J Physiol.* 266(5 Pt 2); H1822-8, 1994.
- [54] Patan S, Tanda S, Roberge S, Jones RC, Jain RK, et al. Vascular morphogenesis and remodeling in a human tumor xenograft: blood vessel formation and growth after ovariectomy and tumor implantation. *Circ Res.* 89(8); 732-9, 2001.
- [55] Gillies RJ, Gatenby RA. Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 26(2); 311-7, 2007.
- [56] Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 4(11); 891-9, 2004.
- [57] Yasuda S, Arii S, Mori A, Isobe N, Yang W, et al. Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance. *J Hepatol.* 40(1); 117-23, 2004.
- [58] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3(10); 721-32, 2003.
- [59] Dang CV. The interplay between MYC and HIF in the Warburg effect. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 4); 35-53, 2007.
- [60] Yeung SJ, Pan J, Lee MH. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci.* 65(24); 3981-99, 2008.
- [61] Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol.* 10(5); 611-8, 2008.
- [62] Bensaad K, Vousden KH. p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol.* 17(6); 286-91, 2007.
- [63] Li X, Vigneron DB, Cha S, Graves EE, Crawford F, et al. Relationship of MR-derived lactate, mobile lipids, and relative blood volume for gliomas in vivo. *AJNR Am J Neuroradiol.* 26(4); 760-9, 2005.

- [64] Raghunand N, Gatenby RA, Gillies RJ. Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours. *Br J Radiol.* 76 Spec No 1(S11-22, 2003.
- [65] Gillies RJ, Raghunand N, Karczmar GS, Bhujwala ZM. MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging.* 16(4); 430-50, 2002.
- [66] Draoui N, Feron O. Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. *Dis Model Mech.* 4(6); 727-32, 2011.
- [67] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5); 646-74, 2011.
- [68] San-Millan I, Brooks GA. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis.* 38(2); 119-33, 2017.
- [69] Beckert S, Farrahi F, Aslam RS, Scheuenstuhl H, Konigsrainer A, et al. Lactate stimulates endothelial cell migration. *Wound Repair Regen.* 14(3); 321-4, 2006.
- [70] Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res.* 71(22); 6921-5, 2011.
- [71] Vegran F, Boidot R, Michiels C, Sonveaux P, Feron O. Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 71(7); 2550-60, 2011.
- [72] Formby B, Stern R. Lactate-sensitive response elements in genes involved in hyaluronan catabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 305(1); 203-8, 2003.
- [73] Hunt TK, Aslam R, Hussain Z, Beckert S. Lactate, with oxygen, incites angiogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 614(73-80), 2008.
- [74] Baumann F, Leukel P, Doerfelt A, Beier CP, Dettmer K, et al. Lactate promotes glioma migration by TGF-beta2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. *Neuro Oncol.* 11(4); 368-80, 2009.
- [75] Goetze K, Walenta S, Ksiazkiewicz M, Kunz-Schughart LA, Mueller-Klieser W. Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int J Oncol.* 39(2); 453-63, 2011.

- [76] Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 109(9); 3812-9, 2007.
- [77] Choi SY, Collins CC, Gout PW, Wang Y. Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? *J Pathol*. 230(4); 350-5, 2013.
- [78] Daye D, Wellen KE. Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 23(4); 362-9, 2012.
- [79] Jiang P, Du W, Mancuso A, Wellen KE, Yang X. Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature*. 493(7434); 689-93, 2013.
- [80] Hansford RG, Lehninger AL. Active oxidative decarboxylation of malate by mitochondria isolated from L-1210 ascites tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 51(2); 480-6, 1973.
- [81] Perez-Escuredo J, Dadhich RK, Dhup S, Cacace A, Van Hee VF, et al. Lactate promotes glutamine uptake and metabolism in oxidative cancer cells. *Cell Cycle*. 15(1); 72-83, 2016.
- [82] Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med*. 13(45), 2015.
- [83] Justus CR, Dong L, Yang LV. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol*. 4(354), 2013.
- [84] Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR, Bashford CL. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol Med Today*. 6(1); 15-9, 2000.
- [85] Zdravlevic M, Marchiq I, de Padua MMC, Parks SK, Pouyssegur J. Metabolic Plasticity in Cancers-Distinct Role of Glycolytic Enzymes GPI, LDHs or Membrane Transporters MCTs. *Front Oncol*. 7(313), 2017.
- [86] Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R. Lactate dehydrogenase 5: an old friend and a new hope in the war on cancer. *Cancer Lett*. 358(1); 1-7, 2015.
- [87] Wang ZY, Loo TY, Shen JG, Wang N, Wang DM, et al. LDH-A silencing suppresses breast cancer tumorigenicity through induction of oxidative stress mediated mitochondrial pathway apoptosis. *Breast Cancer Res Treat*. 131(3); 791-800, 2012.

- [88] Boudreau A, Purkey HE, Hitz A, Robarge K, Peterson D, et al. Metabolic plasticity underpins innate and acquired resistance to LDHA inhibition. *Nat Chem Biol.* 12(10); 779-86, 2016.
- [89] Zha X, Wang F, Wang Y, He S, Jing Y, et al. Lactate dehydrogenase B is critical for hyperactive mTOR-mediated tumorigenesis. *Cancer Res.* 71(1); 13-8, 2011.
- [90] McClelland ML, Adler AS, Deming L, Cosino E, Lee L, et al. Lactate dehydrogenase B is required for the growth of KRAS-dependent lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 19(4); 773-84, 2013.
- [91] McClelland ML, Adler AS, Shang Y, Hunsaker T, Truong T, et al. An integrated genomic screen identifies LDHB as an essential gene for triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* 72(22); 5812-23, 2012.
- [92] Koh YW, Lee SJ, Park SY. Prognostic significance of lactate dehydrogenase B according to histologic type of non-small-cell lung cancer and its association with serum lactate dehydrogenase. *Pathol Res Pract.* 213(9); 1134-8, 2017.
- [93] Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(5); 2037-42, 2010.
- [94] He Y, Chen X, Yu Y, Li J, Hu Q, et al. LDHA is a direct target of miR-30d-5p and contributes to aggressive progression of gallbladder carcinoma. *Mol Carcinog.* 57(6); 772-83, 2018.
- [95] Xian ZY, Liu JM, Chen QK, Chen HZ, Ye CJ, et al. Inhibition of LDHA suppresses tumor progression in prostate cancer. *Tumour Biol.* 36(10); 8093-100, 2015.
- [96] Van Poznak C, Seidman AD, Reidenberg MM, Moasser MM, Sklarin N, et al. Oral gossypol in the treatment of patients with refractory metastatic breast cancer: a phase I/II clinical trial. *Breast Cancer Res Treat.* 66(3); 239-48, 2001.
- [97] Yu Y, Deck JA, Hunsaker LA, Deck LM, Royer RE, et al. Selective active site inhibitors of human lactate dehydrogenases A4, B4, and C4. *Biochem Pharmacol.* 62(1); 81-9, 2001.

- [98] Arseneault R, Chien A, Newington JT, Rappon T, Harris R, et al. Attenuation of LDHA expression in cancer cells leads to redox-dependent alterations in cytoskeletal structure and cell migration. *Cancer Lett.* 338(2); 255-66, 2013.
- [99] Jiang F, Ma S, Xue Y, Hou J, Zhang Y. LDH-A promotes malignant progression via activation of epithelial-to-mesenchymal transition and conferring stemness in muscle-invasive bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 469(4); 985-92, 2016.
- [100] Wang X, Xu L, Wu Q, Liu M, Tang F, et al. Inhibition of LDHA Deliver Potential Anticancer Performance in Renal Cell Carcinoma. *Urol Int.* 99(2); 237-44, 2017.
- [101] Li J, Zhu S, Tong J, Hao H, Yang J, et al. Suppression of lactate dehydrogenase A compromises tumor progression by downregulation of the Warburg effect in glioblastoma. *Neuroreport.* 27(2); 110-5, 2016.
- [102] Wang J, Wang H, Liu A, Fang C, Hao J, et al. Lactate dehydrogenase A negatively regulated by miRNAs promotes aerobic glycolysis and is increased in colorectal cancer. *Oncotarget.* 6(23); 19456-68, 2015.
- [103] Sheng SL, Liu JJ, Dai YH, Sun XG, Xiong XP, et al. Knockdown of lactate dehydrogenase A suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *FEBS J.* 279(20); 3898-910, 2012.
- [104] Dorneburg C, Fischer M, Barth TFE, Mueller-Klieser W, Hero B, et al. LDHA in Neuroblastoma Is Associated with Poor Outcome and Its Depletion Decreases Neuroblastoma Growth Independent of Aerobic Glycolysis. *Clin Cancer Res.* 24(22); 5772-83, 2018.
- [105] Cui XG, Han ZT, He SH, Wu XD, Chen TR, et al. HIF1/2alpha mediates hypoxia-induced LDHA expression in human pancreatic cancer cells. *Oncotarget.* 8(15); 24840-52, 2017.
- [106] Di H, Zhang X, Guo Y, Shi Y, Fang C, et al. Silencing LDHA inhibits proliferation, induces apoptosis and increases chemosensitivity to temozolomide in glioma cells. *Oncol Lett.* 15(4); 5131-6, 2018.
- [107] Hao J, Graham P, Chang L, Ni J, Wasinger V, et al. Proteomic identification of the lactate dehydrogenase A in a radioresistant prostate cancer xenograft mouse model for improving radiotherapy. *Oncotarget.* 7(45); 74269-85, 2016.

- [108] Hua G, Liu Y, Li X, Xu P, Luo Y. Targeting glucose metabolism in chondrosarcoma cells enhances the sensitivity to doxorubicin through the inhibition of lactate dehydrogenase-A. *Oncol Rep.* 31(6); 2727-34, 2014.
- [109] Zhou M, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Liu Z, et al. Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. *Mol Cancer.* 9(33), 2010.
- [110] Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Koutsopoulos A, Mendrinos S, Sivridis E. The metabolic interactions between tumor cells and tumor-associated stroma (TAS) in prostatic cancer. *Cancer Biol Ther.* 13(13); 1284-9, 2012.
- [111] Patel BB, Ackerstaff E, Serganova IS, Kerrigan JE, Blasberg RG, et al. Tumor stroma interaction is mediated by monocarboxylate metabolism. *Exp Cell Res.* 352(1); 20-33, 2017.
- [112] Lee CS, Ryan EJ, Doherty GA. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation. *World J Gastroenterol.* 20(14); 3751-61, 2014.
- [113] Fujita K, Kubota Y, Ishida H, Sasaki Y. Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 21(43); 12234-48, 2015.
- [114] Limame R, Wouters A, Pauwels B, Franssen E, Peeters M, et al. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One.* 7(10); e46536, 2012.
- [115] Roshan Moniri M, Young A, Reinheimer K, Rayat J, Dai LJ, et al. Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology.* 67(2); 379-86, 2015.
- [116] Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 37(4); 277-85, 2004.
- [117] Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 38(12); 1103-11, 2005.

- [118] Zhao Z, Han F, Yang S, Wu J, Zhan W. Oxamate-mediated inhibition of lactate dehydrogenase induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of the Akt-mTOR signaling pathway. *Cancer Lett.* 358(1); 17-26, 2015.
- [119] Yang Y, Su D, Zhao L, Zhang D, Xu J, et al. Different effects of LDH-A inhibition by oxamate in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget.* 5(23); 11886-96, 2014.
- [120] Zhai X, Yang Y, Wan J, Zhu R, Wu Y. Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol Rep.* 30(6); 2983-91, 2013.
- [121] Liu X, Yang Z, Chen Z, Chen R, Zhao D, et al. Effects of the suppression of lactate dehydrogenase A on the growth and invasion of human gastric cancer cells. *Oncol Rep.* 33(1); 157-62, 2015.
- [122] Fiume L, Manerba M, Vettraino M, Di Stefano G. Impairment of aerobic glycolysis by inhibitors of lactic dehydrogenase hinders the growth of human hepatocellular carcinoma cell lines. *Pharmacology.* 86(3); 157-62, 2010.
- [123] Hutton JE, Wang X, Zimmerman LJ, Slebos RJ, Trenary IA, et al. Oncogenic KRAS and BRAF Drive Metabolic Reprogramming in Colorectal Cancer. *Mol Cell Proteomics.* 15(9); 2924-38, 2016.
- [124] Lundberg IV, Wikberg ML, Ljuslinder I, Li X, Myte R, et al. MicroRNA Expression in KRAS- and BRAF-mutated Colorectal Cancers. *Anticancer Res.* 38(2); 677-83, 2018.
- [125] Sagaert X, Vanstapel A, Verbeek S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology.* 85(1-2); 72-84, 2018.
- [126] Seliger C, Leukel P, Moeckel S, Jachnik B, Lottaz C, et al. Lactate-modulated induction of THBS-1 activates transforming growth factor (TGF)-beta2 and migration of glioma cells in vitro. *PLoS One.* 8(11); e78935, 2013.
- [127] Lu QY, Zhang L, Yee JK, Go VW, Lee WN. Metabolic Consequences of LDHA inhibition by Epigallocatechin Gallate and Oxamate in MIA PaCa-2 Pancreatic Cancer Cells. *Metabolomics.* 11(1); 71-80, 2015.

[128] Smith B, Schafer XL, Ambeskovic A, Spencer CM, Land H, et al. Addiction to Coupling of the Warburg Effect with Glutamine Catabolism in Cancer Cells. *Cell Rep.* 17(3); 821-36, 2016.



10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmralıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.2866
Konu : Etik Kurulu Kararı

26/01/2018

Sayın Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Kolonorektal Kanserde Tümör Metabolizmasınınin Laktat Dehidrogenaz Bağlantılı Modifikasyonunun Kemoterapi Etkinliği Üzerindeki Rolü" isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Ek:
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 26.01.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 371DE13CX3 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinçiler Cad.No:19 Kavacak Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44

İnternet: www.medipol.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr




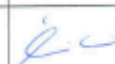

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kolorektal Kanserde Tümör Metabolizmasının Laktat Dehidrogenaz Bağlantılı Modifikasyonunun Kemoterapi Etkinliği Üzerindeki Rolü			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Temel Onkoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	23.01.2018		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	23.01.2018		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
Karar Bilgileri	Karar No: 77	Tarih: 24/01/2018		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Ergoterapi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gizem	Soyadı	ÇALIBAŞI KOÇAL
Doğum Yeri	İzmir	Doğum Tarihi	23 Mart 1986
Uyruğu	Türk	E-mail	gizemcalibasi@gmail.com

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji (*Birincilikle mezuniyet)	2016
Yüksek Lisans	Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji (*İkincilikle mezuniyet)	2011
Lisans	Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya	2008

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Araştırmacı (Visiting Researcher)	Koch Institute for Integrative Cancer Research at MIT, Cambridge, Amerika Birleşik Devletleri	2018- Devam
Araştırma Görevlisi	Dokuz Eylül Üniversitesi- Onkoloji Enstitüsü, İzmir	2012- Devam
Araştırmacı (Visiting Researcher)	Stanford Üniversitesi, Canary Center, California, Amerika Birleşik Devletleri	2014-2015
Doktora-öncesi Araştırmacı (Pre-doctoral Research Fellow)	Harvard Üniversitesi, Tıp Fakültesi Brigham and Women's Hospital, Massachusetts, USA	2013-2014
Danışma kurulu üyesi	Bireye Özgü Tedavi & Farmakogeneomik/Genomik Merkezi, Dokuz Eylül Üniversitesi	2015- 2018