T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARANTULA CUBENSİS ALKOLİK EKSTRAKTININ DENEYSEL KOLON KANSERİNDE TÜMÖR YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Gökhan AKÇAKAVAK

DOKTORA TEZİ
VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR

KONYA-2021

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARANTULA CUBENSİS ALKOLİK EKSTRAKTININ DENEYSEL KOLON KANSERİNDE TÜMÖR YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Gökhan AKÇAKAVAK

DOKTORA TEZİ
VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Kordinatörlüğü tarafından 19202084 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2021

ÖNSÖZ

Kolon kanseri, küresel ölçekte en ölümcül kanser türlerinden biri olarak değerlendirilmektedir. Kanser olguları içinde ölümlerin %10'nundan kolorektal kanser sorumludur. Günümüzde kolon kanseri tedavisinde, klasik yöntemlere (klasik cerrahi ve kemoterapi) ek olarak alternatif yöntemler de araştırılmaktadır. Tarantula cubensis alkolik ekstraktının (TCAE), veteriner sahada homeopatik bir ilaç olarak kullanılmasının yanı sıra yara iyileşmesini hızlandırıcı, antioksidan ve bazı kanser türlerinde etkinliğinin olduğu bildirilmiştir (Mezger 1977, Hamilton 1999, Richardson-Boedler 2002, Gültiken ve Vural 2007).

Yapılan bir deneysel kolon kanseri çalışmasında Tarantula cubensis alkolik ekstraktının tümör gelişimindeki etkinliği ortaya konulmuştur. Ancak etkinlik moleküler olarak doğrulanmamıştır (Er ve ark 2019). Mevcut çalışmada ratlarda Azoksimetan ile indüklenen kolon kanserinde, Tarantula cubensis alkolik ekstraktının tümör gelişim yolakları üzerine etkileri moleküler olarak incelenmiştir. Çalışmada Tarantula cubensis alkolik ekstraktı uygulamasının, kolon kanseri gelişim yolaklarında meydana gelen birtakım değişiklikleri modüle ederek, tümör gelişimi ve proliferasyonunu önleyebileceği, kolon kanseri tedavisinde tek başına ve/veya kemoterapötik ilaçlar ile kombine olarak kullanılabilecek yeni bir tedavi seçeneği olabileceği öngörülmüştür.

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) tarafından 2021/20 karar ile onaylanmış ve Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Kordinatörlüğü tarafından 19202084 proje numarası ile desteklenmiştir.

Doktora öğrenimim boyunca yardımlarını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI'ya, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. M. Kemal ÇİFTÇİ, Prof. Dr. Fatih HATİPOĞLU, Prof. Dr. Ertan ORUÇ, Doç. Dr. Mehmet TUZCU, Dr. Ögr. Üye. Mehmet Burak ATEŞ'e, Arş. Gör. Zeynep ÇELİK'e ve öğrenimim boyunca burs imkanı sağlayan TÜBİTAK 2211/A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı ile YÖK 100/2000 Doktora Burs Programına (Moleküler Patoloji) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ 1
1.1.MAPK YOLAĞI 6
1.1.1. Erk Yolağı 6
1.1.2. JNK Yolağı 9
1.1.3. P38 Yolağı 10
1.2. P53 Yolağı 11
1.3.WNT Yolağı 15
1.4. PI3K ve TGF-β Yolağı 19
1.5. Tarantula cubensis alkolik ekstraktı 23
1.6. Deneysel Kolon Kanseri Modelleri 24
1.6.1. Kimyasal ajanlarla indüklenen modeller 24
1.6.2. Genetik Modeller 25
1.7. Hipotez ve Amaç 25
2. GEREÇ VE YÖNTEM 27
2.1. Hayvan Materyali 27
2.2. Çalışma Dizaynı 27
2.3. Histopatolojik Analiz 27
2.4. Real Time PCR Analizi 28
2.4.1. Parafinden Uzaklaştırma 29
2.4.2. RNA İzolasyonu 29
2.4.3. cDNA sentez aşaması 30
2.4.4. Real Time PCR Aşaması 31
2.5. İstatiksel Analiz 33
3. BULGULAR 34
3.1. Histopatolojik Bulgular 34
3.2. Real Time PCR Bulgular 35
4. TARTIŞMA 45
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 53
6. KAYNAKLAR 54

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACF: Aberrant crypt foci

AKT: Protein Kinaz B

AOM: Azoksimetan

AP-1: Activatör protein

APAF-1: Apoptotic protease activating factor-1

APC: Adenomatous polyposis coli

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

CDK: Cyclin-dependent kinases

COP-1: Constitutive photomorphogenic-1

COX: Cyclooxygenase

DVL: Dishevelled gene

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EMT: Epitelial Mezenkimal Transition

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

E2F1: E2F transcription factor-1

FAP: Familyal Adenomatöz Polipozis

FGF: Fibroblast growth factors

FZD: Frizzled reseptör protein

GAP: GTPase aktive edici protein

GADD45a: Growth Arrest And DNA Damage Inducible alpha

GRB2: Growth factor receptor-bound protein-2

HİF-1a: Hypoxia-inducible factor 1- alpha

HNPCC: Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser

İBD: İnflamatuvar bağırsak hastalığı

İL-1: İnterlökin-1

JNK: c-Jun N-terminal kinases

KK: Kanser Kontrol

KRAS: Kirsten rat sarcoma viruses

KRK: Kolorektal kanser

LRP: LDL reseptör related protein

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MEK: Mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase

MLH: Mismatch Repair gene

MSH: Mismatch Repair gene

MTOR: Mechanistic target of rapamycin kinase

NF-κB: Nuclear factor kappa B

PDGF: Platelet-derived growth factor

PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinaz

PMS: Mismatch repair gene

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

RAS: Rat sarcoma viruses

RB: Retinoblastoma protein

RNF43: Ring Finger Protein 43

RTK: Receptör Tirozin Kinaz

SAPK: Stress-activated protein kinases

SİAH: Seven in absentia homolog

SK: Sağlıklı Kontrol

SOS: Son of sevenless

STAT: Signal transducer and activator of transcription

TCAE: Tarantula cubensis alkolik ekstraktı

TGF-β: Transforming growth factor beta

TNF-α: Tumor necrosis factor alpha

WİP: WASP interacting protein

ZNRF3: Zinc and ring finger-3

ΔΔCt: Delta Delta Ct

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARANTULA CUBENSİS ALKOLİK EKSTRAKTININ DENEYSEL KOLON KANSERİNDE TÜMÖR YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Gökhan AKÇAKAVAK

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ/ KONYA-2021

Kolorektal kanser (KRK), kalın bağırsağın bölümleri olan kolon ve rektumun kanseri olarak tanımlanır. KRK küresel ölçekte en fazla morbidite ve mortaliye sebep olan kanserlerden biri olarak bilinmektedir. Günümüzde sistemik olarak herhangi bir yan etki ve toksisiteye sebebiyet vermeyen, tümör büyümesi ve gelişimini inhibe edebilen kemopreventif bir takım ajanların geliştirilmesi önemli bir araştırma konusu haline gelmektedir. Tarantula cubensisin alkolik ekstraktı (TCAE) veteriner sahada homeopatik ürün olarak son zamanlarda kangren, septisemi, toksemi gibi durumlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Sığır kutanöz papillomatozis, köpek oral papillomatozis, köpek meme tümörleri gibi tümörlerin tedavisinde başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir. Ayrıca serbest oksijen radikallerini azalttığı ve invitro olarak kaspaz-3 yolağını indükleyerek apoptozu aktive edebileceği bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı ratlarda azoksimetan ile indüklenen KRK'de TCAE'nın tümör gelişim yolakları üzerine etkilerini moleküler düzeyde belirlemektir.

Bu çalışmada materyal olarak daha önce yapılan deneysel kolon kanseri çalışmasının bağırsak parafin blokları kullanıldı. Çalışmada sağlıklı kontrok (SK), Kanser Kontrol (KK), Kanser + Tarantula cubensisin alkolik ekstrat (K-TCAE) gruplarında, her gruptan 6 adet olmak üzere 18 adet parafine gömülü bağırsak dokusu kullanıldı. Elde edilen parafin bloklarından 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Histopatolojik incelemede Aberrant Crypt Foci (ACF) oluşturan kript sayısı ve kriptlerdeki displazi dereceleri skorlandı. Her parafin bloktan alınan örneklere β-katenin, KRAS, APC ve P53 ekspresyonlarını belirlemek için Real Time PCR analizi yapıldı.

ACF oluşturan kript sayısı ile kriplerdeki displazinin varlığı ve derecelendirilmesi yönünden K-TCAE grubunda, KK grubuna kıyasla skorlar önemli ölçüde azaldı ($P<0.05$). Real Time PCR analizinde p53 ($P>0,05$) ve APC ($P<0,001$) geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin, K-TCAE grubunda arttığı bulundu. KRAS ($P<0,05$) ve β-katenin ($P<0,05$) mRNA ekspresyon düzeylerinin K-TCAE grubunda önemli derecede azaldığı saptandı.

Sonuç olarak sıçanlarda azoksimetan ile indüklenen KRK'de, TCAE'nın etkileri moleküler olarak değerlendirilmiş olup, deneysel KRK modellerinde KRAS, APC ve β-katenin yolaklarında belirgin değişiklikler olduğu ve antitümöral tedavilerde bu yolaklardaki değişimlerin değerlendirme kriteri olarak kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelime: APC, Kolorektal kanser, KRAS, Tarantula cubensis alkolik ekstraktı, P53, β-katenin.

ABSTRACT

REPUBLIC OF TURKEY

SELÇUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF TARANTULA CUBENSIS ALCOHOLIC EXTRACT ON TUMOR PATHWAYS IN EXPERIMENTAL COLON CANCER BY MOLECULAR METHODS

Gokhan AKCAKAVAK

DEPARTMENT OF VETERINARY PATHOLOGY

PhD THESIS / KONYA-2021

Colorectal cancer is defined as cancer of the colon and rectum, which are parts of the large intestine. KRK is known to be one of the cancers that cause the highest morbidity and mortality on a global scale. Today, any systemic side effects and toxicity which does not cause the development of some chemopreventive agents capable of inhibiting tumor growth and development is becoming an important research subject. Tarantula cubensis alcoholic extract (TCAE) has been frequently used as a homeopathic product in the veterinary field in cases such as gangrene, septicemia, and toxemia. It has been reported to be used successfully in the treatment of tumors such as bovine cutaneous papillomatosis, canine oral papillomatosis, canine mammary tumors. It has also been reported that it reduces free oxygen radicals and can activate apoptosis by inducing the caspase-3 pathway in vitro. The aim of this study was to determine the effects of Theranecron on tumor development pathways at the molecular level in Azoxymethane-induced KRK in rats.

In this study, intestinal paraffin blocks of a previous experimental colon cancer study were used as material. In the study, 18 paraffin-embedded intestinal tissues, 6 from each group, were used in healthy control (SK), Cancer Control (KK), Cancer+TCAE (K-TCAE) groups. Sections of 5 micron thickness were taken from the obtained paraffin blocks and stained with Hematoxylin-Eosin. In the histopathological examination, the number of crypts forming ACF and the degree of dysplasia in the crypts were scored. Real Time PCR analysis was performed to determine β-catenin, KRAS, APC and P53 expressions on samples from each paraffin block.

In terms of the number of crypts forming ACF and the presence and grading of dysplasia in the crypts, the scores were significantly lower in the K-TCAE group compared to the KK group ($P<0.05$). In Real Time PCR analysis, mRNA expression levels of p53 ($P>0.05$) and APC ($P<0.001$) genes were found to be increased in the K-TCAE group. KRAS ($P<0.05$) and β-catenin ($P<0.05$) mRNA expression levels were found to be decreased in the K-TCAE group.

As a result, the effects of TCAE in AOM-induced KRK in rats were evaluated molecularly, and it was revealed that there are significant changes in the KRAS, APC and β-catenin pathways in experimental colorectal cancer models, and changes in these pathways can be used as evaluation criteria in antitumoral treatments.

Key words: APC, Colorectal cancer, KRAS, Tarantula cubensis alcoholic extract, P53, β-catenin.

1. GİRİŞ

Tümör, organizmada hücrelerden herhangi birinin otonomi kazanarak, canlının kontrol mekanizmalarının herhangi etkisinde kalmadan, sınırsız çoğalması sonucunda oluşan, gelişmesi normal dokuların aksine hızlı ve sebep ya da sebepler ortadan kalktıktan sonra bile büyümesini sürdüren yeni doku oluşumudur (Erer ve Kıran 2019). Kanser, büyük bölümü edinsel olarak kendiliğinden veya çevreden kaynaklanan travmalara bağlı olarak gerçekleşen DNA mutasyonlarının neden olduğu genetik bir hastalıktır. Ayrıca kanserde DNA metilasyonundaki fokal artışlar ve histon modifikasyonlarındaki değişiklikler gibi modifikasyonları düzenleyen genlerdeki mutasyonlar sonucu gelişen epigenetik değişiklikler de mevcuttur. Bu genetik ve epigenetik değişiklikler hücrelerdeki büyüme, hayatta kalma ve yaşlanma gibi temel süreçleri düzenleyen, kilit genlerin ekpresyonunda ve fonksiyonunda değişikliklere neden olmaktadır (Kumar ve ark 2017).

Kanser hücreleri aşırı ve zamansız bir şekilde çoğalırlar ve uzaktaki dokuları istila edebilirler (Merlo ve ark 2006). Tüm kanser hücreleri, anormal hücre büyümesi ve bölünmesi (hücre çoğalması) ile hücrelerin vücudun diğer bölümlerine yayılması ve istilası (metastaz) olmak üzere iki ortak özelliği paylaşırlar (Klug ve ark 2011).

Karsinojenez olarak adlandırılan kanser gelişim süreci inisiasyon (başlangıç), promosyon (artma) ve progresyon (ilerleme) olmak üzere üç sahfadan oluşur. Başlangıç safhası, gen ekspresyonunu düzenleyen epigenom, kromozom ve DNA hasarı ile kendini gösterir. Başlangıç safhasını uzun bir süreç takip eder. İnflamasyonla birlikte genomik olarak kararsız hücrelerin büyüdüğü görülür. İlerleme safhasında ise hücreler çoğalırken, genomlarda daha fazla zarar oluşmasıyla kötü huylu tümöre dönüşmektedir (Dragan ve ark 1993, Vincent ve Gatenby 2008, Erer ve Kıran 2019).

Tümörler protoonkogen ve tümör supresör genlerinde adım adım mutasyonlar sonucu ortaya çıkar (McCormick 1999). Kansere sebep olan 250'nin üzerinde gen tanımlandığı ve çeşitli mekanizmalar ile kansere sebep olabileceği belirtilmektedir. Bu çalışmalar devam ettiği için bilinen onkoproteinlerin büyük çoğunluğu bu sınırlı sayıdaki yolaklara dahil edilebilir ve/veya bu yolaklarda aktive olduğu gösterilebilir.

Bu yolaklar aynı zamanda normal hücrelerin yaşamını, akibetini, proliferasyonunu, farklılaşmasını ve fonksiyonunu düzenler. Kanser hücrelerinde kontrol edilemeyen proliferasyon, farklılaşmanın bloke edilmesi, azalmış apoptoz gibi kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri bu yolakların aktivitesinin artması veya azalması sonucu ortaya çıkar (Schulz 2007).

Çeşitli regülatör sistemleri prototipik kanser yolakları olarak değerlendirilebilirler. Özellikle Mitogen-activated protein kinase (MAPK) yolağı, TP53 regülatör sistemi ve Retinoblastoma (RB1) etrafında yoğunlaşmış olan hücre döngüsü regülatör ağı başta gelmektedir. Bu yolaklar sürekli birbirleriyle etkileşim halindedir. Ayrıca Phosphoinositide 3-Kinases (PI3K) yolağı, Janus Kinaz-Sinyal Transduseri (STAT) yolağı, Nuclear Factor Kappa-B (NF-κB), Transforming Growth Factor-beta (TGF-β) yanıt yolağı da ilave edilebilir. Ayrıca, fötal gelişim için elzem olan ve yetişkinlerde doku homeostazının sağlanmasında önemli olan WNT, Hedgehog yanıt yolağı ile NOTCH regülatör sistemi de bu sisteme dahil edilmiştir (Schulz 2007, Weber 2007).

Onkogen, kontrolünü kaybetmiş protein kodlayan genler olarak, protoonkogenler, mutasyon ve/veya artmış gen ekspresyonuna bağlı onkogene dönüşebilen normal genler olarak, tümör supresör genler ise hücre bölünmesine engel olan genler olarak bilinmektedir. TP53, Rb, APC, p16, TGF-β vb. tümör supresör genlerini oluştururken, PI3KCA, MYC, CCND1, RAS vb. protoonkogen ve onkogenleri oluşturmaktadır (Schubbert ve ark 2007, Lee ve Muller 2010, Imran ve ark 2017).

İnsanlarda kolon, ileo-sekal valf ile rektosigmoid köşe arasında bulunan yaklaşık olarak 1.5 metrelik bağırsak bölümünden oluşmaktadır. Damarlar ile beslenme durumuna göre çıkan kolon, transversal kolon, inen kolon, sigmoid kolon olmak üzere dört bölümden meydana gelmektedir. Kolon duvarının katmanları, mukoza, submukoza, iç sirküler kas, dış longitudinal kas ve serozadan oluşmaktadır (Cummings 1990, Hounnou ve ark 2002, Alemdaroğlu ve ark 2004). Ratlarda kolon uzunluğu 22-25 cm, çap ise 2.3-2.5 cm olarak bildirilmektedir (Kararli 1995).

Kolorektal kanser (KRK), kalın bağırsağın bölümleri olan, kolon ve rektumun kanseri olarak tanımlanır. Kolorektal kanser semptomlarını defekasyonda ağrı, yorgunluk, kilo kaybı, bağırsak hareketlerinin değişmesi, dışkıda mukus ve kan oluşturmaktadır (Qureshi ve ark 2018). Kolorektal kanserinin risk faktörleri arasında yaş, kırmızı et tüketimi, lifli gıdaların yetersiz tüketilmesi, obezite, alkol ve sigara kullanımı, fiziksel aktivitenin yetersizliği ve baharatlı yiyeceklerin kullanımı gibi faktörler bulunmaktadır. Ayrıca inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) ve genetik faktörler kolorektal kanser için yatkınlık oluşturmaktadır (Forman ve ark 2014, Theodoratou ve ark 2017, Qureshi ve ark 2018). Kolorektal kanserlerin büyük çoğunluğu, yaşlılık ve yaşam tarzı faktörlerine bağlı olmakla birlikte, altta yatan genetik bozukluklara bağlı az sayıda vaka da mevcuttur (Forman ve ark 2014).

Kolorektal kanser, batı dünyasında kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (Jemal ve ark 2008). Küresel ölçekte, kolorektal kanser akciğer, meme ve prostattan sonra en yaygın dördüncü kötü huylu neoplazmadır (Ferlay ve ark 2010, Mattiuzzi ve Lippi 2019). Kolorektal kanser, görülme sıklığı açısında erkeklerde 3. ve ölüm oranında 4. sırada yer alırken, kadınlarda görülme sıklığı açısından 2. sırada ve ölüm oranında 3. sırada yer almaktadır (Bray ve ark 2018). Türkiye'de ise görülme sıklığı açısında 3. sırada ve ölüm oranında 4. sırada yer almaktadır (Altobelli ve ark 2016, Bray ve ark 2018). Amerika Birleşik Devletleri'nde ise yılda yaklaşık 130.000 yeni vaka ve 55.000 ölümle en yaygın dördüncü kanser vakası olup ikinci en yaygın kanser ölüm nedenidir (Compton ve Greene 2004).

KRK'nin patogenezi çoklu genetik ve epigenetik değişikliklerin olduğu karmaşık bir ağdır. Kalıtsal ve çevresel faktörleri içermektedir. Yapılan araştırmalar, KRK oluşumuna yol açan moleküler mekanizmalara önemli ışık tutmuştur. Tüm KRK vakaları içerisinde sporadik kökenliler çoğunlukta (%75-80) olup, geri kalanlar ailesel veya inflamatuar bağırsak hastalıkları ile ilgilidir (Hisamuddin ve Yang 2006, Migliore ve ark 2011).

KRK, çoklu genetik mutasyonlardan ve yangısal süreçlerden kaynaklanır (Watson ve Collins 2011). Kolorektal kanserler, bazı onkogenlerdeki ve tümör baskılayıcı genlerdeki spesifik mutasyonlardan kaynaklanan bir dizi iyi karakterize edilmiş histopatolojik değişikliklerle meydana gelmektedir (Fearon ve Vogelstein

1990). Sporadik KRK'lerın yaklaşık %90'ı, Wnt/β-katenin sinyal yolağının bileşenlerindeki mutasyonları içerir (Giles ve ark 2003). Kolorektal kanser vakalarının %80'iyle ilişkili somatik mutasyonlar, β-katenin aktivasyonuna yol açan adenomatous polipozis koli (APC) tümör supresör genini hedefler ve bunu K-RAS, PI3K3CA ve P53'teki ek mutasyonlar izler (Vogelstein ve Kinzler 2004, Fearon 2011).

Ailesel KRK vakalarının yaklaşık %30'u bir genetik etiyolojiye sahiptir (Hisamuddin ve Yang 2006). KRK'ye yönelik bu genetik yatkınlıklar genellikle adenom veya hamartom şeklinde öncü lezyonların oluşumu ile karakterizedir (De la Chapelle 2004). Kolorektal neoplazinin altında yatan genetik ve epigenetik değişiklikler, büyük olasılıkla neoplastik ilerlemeyi tetikleyen olaylardır (Fearon ve Vogelstein 1990). Adenom oluşumuna olanak sağlayan FAP (familial adenomatous polyposis) ve HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) olmak üzere iki ana tip ailesel yatkınlık vardır (Cruz-Correa ve Giardiello 2003). Bunlara ek olarak Peutz-Jeghers sendromu (PJS) ve Cowden hastalığı gibi bazı kalıtsal kanser sendromları kolon karsinomu riskini az çok artırmaktadır (Schulz 2007).

FAP ve HNPCC, otozomal dominant bir şekilde kalıtımla geçen, kolorektal kanser yatkınlığının iki sendromudur. Sırasıyla tüm kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %1 ve %5-7'sini oluştururlar. FAP, bir tümör supresör geni olan, APC geninin germ hattı mutasyonlarından kaynaklanırken, HPNCC ise DNA tamir genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır (Soravia ve ark 1997). HNPCC'den sorumlu olduğu belirlenen genler MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 ve PMS2'dir. Bu genlerden herhangi birindeki mutasyona sahip bireylerin yaşamı boyunca %80'inde kolon kanseri gelişme riski bulunmaktadır (Lynch ve De la Chapelle 1999). FAP etkilenen hastaların yaşamlarının erken dönemlerinde başta kolon olmak üzere tüm gastrointestinal sistemde binlerce adenomatöz polipin ortaya cıkması ile karekterize bir hastalıktır (Cruz-Correa ve Giardiello 2003). HNPCC'li hastalarda sporadik vakaların aksine, kolonun sağ tarafında kanser geliştirmesi daha olasıdır. Ayrıca poliplerin kansere ilerlemesi, sporadik vakalara kıyasla daha kısa sürede meydana gelmektedir (Lynch ve De la Chapelle 1999). HNPCC vakalarında, çok fazla miktarda poliplere rastlanmadığı gibi FAP'da sıklıkla meydana gelen kromozal değişikliklerde nispeten seyrek görülmektedir (Schulz 2007).

İBD, sürekli artan insidensi ile dünya çapında sağlık problemi oluşturan, bağırsaktaki mikroplara karşı anormal ve devam eden bir bağışıklık tepkisinden kaynaklandığı düşünülen, kronik olarak nüks eden bağırsak iltihabıdır (Zhang ve Li 2014). KRK vakalarının yaklaşık %1-2'sinden oluşan küçük bir alt grup, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının bir sonucu olarak ortaya çıkar. KRK, hastalığın ciddi bir komplikasyonu olarak kabul edilir ve tüm ölümlerin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır (Munkholm 2003).

KRK gelişiminde öncelikle adenomların oluşumunda temel adım, gatekeeper olarak bilinen, Wnt sinyal yolağının yapısal aktivasyonudur. Tümör baskılayıcı gen olarak bilinen APC işlev kaybı ve daha az sıklıktaki β-katenin aktive eden CTNNB1 (β-katenin kodlayan gen)'de görülen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Kanserin ilermesindeki diğer yolaklar ise KRAS ekspresyonunu arttıran mutasyonlar, P53'de oluşan işlev kaybı, TGF-β hücresel yanıtın inaktivasyonu ve PI3K yolağınında aktive edilmesi oluşturmaktadır (Schulz 2007). Genel olarak KRK gelişiminde ve ilermesinde APC, K-RAS, P53 mutasyonlarının birbirlerini takip ettiği bilinmektedir (Allen 1995, Cottu ve ark 1996).

Kolon kanserinin genetik paradigmasında tümör supresör genler ve onkogenler olmak üzere iki farklı grup bulunmaktadır. Tümör supresör genler hücre proliferasyonunu inhibe eden veya apoptik yolları aktive eden proteinleri kodlamaktadır. Tümör supresör genler, kolorektal kanserde inaktive olmaktadır. Onkogenler ise hücre çogalmasını ve/veya gelişimini teşvik eden proto-onkogenlerin aktive edilmiş versiyonlarıdır. İlk basamak FAP ve sporadik kolorektal kanserlerin büyük bölümünü oluşturan bir tümör supresör gen olan APC'nin mutasyonel inaktivasyonu ile başlar. İkinci basamak HNPCC'den sorumlu olan MSH2, MLH1, PMS2 gibi DNA onarım mekanizmalar ile bağlantılı tümör supresör genlerin inaktivasyonudur (Kinzler ve Vogelstein 1996). SMAD4 ve P53 gibi ek tümör süpresör genlerin mutasyonel inaktivasyonu ve KRAS, COX-2 gibi onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu kolorektal kanser oluşumunun sonraki aşamalarında mevcuttur (Hisamuddin ve Yang 2006).

1.1. MAPK Yolağı

Mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) kaskadlarının, hücresel tepkilere transdüksiyon hücre dışı sinyallerinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. MAP Kinazlar, Mitojen Activated Protein Kinase super ailesinde yer almaktadırlar. Bu proteinler, hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında ve hücresel yanıtın şekillenme sürecinde önemli rol oynamaktadır (Kolch 2000). Memeli hücrelerinde üç MAPK ailesi tanımlanmıştır; Klasik MAPK (ayrıca ERK olarak bilinen), C-Jun N-terminal kinaz/strese aktif protein kinaz (JNK/SAPK) ve p38 kinazdır. MAP kinazları protein kinaz kaskadları içinde yer alır. Her bir kaskad, seri olarak aktive edilen üç enzimden oluşur; bir MAPK kinaz kinazı (MAPKKK), bir MAPK kinaz (MAPKK) ve bir MAP kinaz (MAPK). Günümüzde 14 MAPKKK, 7 MAPKK ve 12 MAPK memeli hücrelerinde tanımlanmıştır (Widmann ve ark 1999, Johnson ve Lapadat 2002). Genel olarak bu kinazlar, yukarıdan aşağıya MAPK kinaz-kinaz (MAPKKK), MAPK kinaz (MAPKK) ve MAPK olarak adlandırılır (De Luca ve ark 2012).

MAPK yolları, çeşitli uyaranlardan gelen sinyalleri çoğaltır, güçlendirir, bütünleştirir ve memeli hücrelerinde proliferasyon, farklılaşma, gelişim, inflamatuvar yanıt ve apoptoz dahil uygun bir fizyolojik tepki ortaya çıkarır. Çok hücreli organizmada hücre çoğalmasının düzenlenmesi, esas olarak çevre hücrelerin sağladığı dış büyüme faktörleri tarafından düzenlenen karmaşık bir süreçtir. Bir dizi protein kinaz kaskadını içeren MAPK yolları, hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynar (Zhang ve Liu 2002). MAPK'ler, MAP2K kinazları tarafından katalize edilen Thr-X-Tyr motifi üzerinde çift fosforilasyon gerektirenenzimlerdir. Aktivasyondan sonra, MAPK'ler diğer protein kinazları ve birçok transkripsiyon faktörlerini içeren hedef substratların spesifik serin ve treonin kalıntılarını fosforile eder (Wagner ve Nebreda 2009).

1.1.1. ERK Yolağı

ERK MAPK yolağı, hücre proliferasyonu için en önemli yolaklardan biridir. Protoonkogenler ve büyüme faktörleri proliferasyonu teşvik eden sinyalleri aktarırlar (Defazio ve ark 2000). Ayrıca bu sinyal yolağının aktivasyonu, bağırsak epitel hücrelerinin farklılaşmasında önemli role sahiptir (Taupin ve Podolsky 1999). Hormonlar ve büyüme faktörleri RAS-RAF'ı, onlar da MEK 1/2 aracığıyla ERK 1/2

yolağını etkinleştirmektedir (Chambard ve ark 2007). RAS aracılığıyla JNK ve p38 MAPK gibi diğer sinyal yolakları da aktive edilebilir (Binétruy ve ark 1991, Pulverer ve ark 1991). ERK aktivasyonu EGFR ligandlarının aşırı ekspresyonuna yol açarak otokrin büyüme döngüsünü teşvik eder ve böylece tümör büyümesini sağlar (McCubrey ve ark 2007). Herhangi bir ligandın (Örn. EGFR, PDGF), reseptör tirozin kinaz ailesinden bir reseptörün hücre dışında bulunan kısmına bağlanmasıyla, RTK iki alt biriminin dimerleşmesini ve RTK enzimleri birbirlerini fosforillenmesini tetikler (otofosforilasyon). Daha sonra SOS olarak adlandırılan GRB2'ye bağlanarak, RAS'ı hücre zarına bağlanabilir hale getirir. SOS bağlanması ile RAS üzerindeki GDP'nin GTP'ye dönüşümü katalizlenir. Bu biyokimyasal dönüşüm RAS'ın aktifleşmesini sağlamaktadır. BRAF olarak bilinen kinaz RAS'ın aktif hale getirdiği en önemli proteinlerden biridir. Aktifleşen BRAF, MEK1/2 fosforilleyerek aktif hale getirir. Son olarak MEK1/2 ERK1/2 fosforilleyerek aktif hale getirir. Bu akış şemasının sonunda AP-1 bünyesinin altında bulunan Jun ve Fos isimli transkripsiyon faktörlerinin aktifleşmesi sağlanır. Jun ve Fos aktivasyonunun sonucunda çekirdeğe taşınmasının ardından bir heterodimer yapı oluşturarak, DNA'nın AP-1 bölgesine bağlanırlar. Bu etkileşim sonucu olarak büyüme faktörü, siklinler ve sitokinler gibi proteinleri kodlayan birçok genin aktifleşmesini sağlayarak, hücre proliferasyonunu aktive eder. Normalde aktif RAS-BRAF kompleksi kısa sürede, GAP olarak bilinen protein tarafından inaktive edilir. Böylelikle MAPK yolağı inaktive olur. RAS'da meydana gelen herhangi bir mutasyon sonucu, RAS-GTP sürekli aktif kalmakta ve yolak inaktive olmamaktadır (Fang ve Richardson 2005, Santarpia ve ark 2012).

RAS proteinleri, küçük bir GTP bağlayıcı protein ailesinin prototip üyelerini temsil etmektedir. RAS proteinleri HRAS, KRAS ve NRAS olmak üzere üç prototipten oluşmaktadır (Lowy ve Willumsen 1993, Pylayeva-Gupta ve ark 2011). KRAS protoonkogeni çok sayıda alt efektörlerden oluşmakta ve bunlar arasında RAF ve PI3K de bulunmaktadır (Shields ve ark 2000, Pruitt ve Der 2001). RAS/MEK/ERK ve PI3K/AKT basamakları aracığıyla hücre büyümesi ve hayatta kalma gibi süreçleri kontol edilmektedir (Downward 2003). Bu bağlamda ERK, transkripsiyon genlerinin düzenlenmesini ve apoptoz için gerekli olan pro-apoptik proteinlerin AKT aracılı inaktivasyonunu sağlamaktadır (Cox ve Der 2003, Downward 2003). Ayrıca KRAS'ın, hücre göçü, endositoz, hücre iskeletindeki değişiklikler ve kalsiyum sinyallenmesi gibi süreçleri düzenleyen bir dizi etkileri

belirtilmiştir (Shields ve ark 2000, Lambert ve ark 2002, Cox ve Der 2003, Karnoub ve Weinberg 2008).

MAPK yolağı (Ras/Raf/MEK/ERK kaskadı), kanserde büyüme sinyalleri ile hücre sağkalımı ve metastaz kontrolünde anahtar rol oynamaktadır. Bu yolak kanserlerin üçte birinde düzensiz ekspresyon gösteren birkaç protoonkogen içermektedir (Watanabe ve ark 2000, Fang ve Richardson 2005). ERK/MAPK yolağının aktivasyonunun, insan kolorektal kanserlerinde tümör gelişimi ve davranışında rol oynadığına dair kanıtlar bildirilmiştir (Lin ve ark 2013).

Onkojenik dönüşüm sürecinde, tümör hücreleri normal büyüme ve farklılaşma kontrolünden kaçar ve çevre dokuları istila etme yeteneği kazanırlar (Sever ve Brugge 2015). RAS ailesi genlerinde (KRAS, HRAS ve NRAS) oluşan nokta mutasyonları, tüm insan kanserlerindeki mutasyonların %30'unu oluşturmaktadır (Stephens ve ark 2012). KRAS mutasyonları çoğunlukla 12. ve 13. kodonlarda oluşmaktadır (Wang ve ark 2010). Kolorektal, akciğer ve safra yolu karsinomlarında K-RAS mutasyonu sık görülmesine rağmen, H-RAS ve N-RAS mutasyonları nadir görülmektedir. Buna karşın melanomlarda ve tükrük bezi karsinomlarında H-RAS ve N-RAS mutasyonları mevcuttur (Santarpia ve ark 2012).

RAS, kolorektal kanserlerin yaklaşık %36'ında mutasyona uğramıştır (Andreyev ve ark 2001). Costigan ve Dong (2020) tarafından yapılan çalışmada kolorektal kanserde KRAS (%44), NRAS (%4), HRAS (<%1), BRAF (%10), MAP2K1 (%1), RAF1 (<%1) ve PTPN11 (<%1) mutasyonları olduğu bildirilmiştir. Mutasyon sonucu meydana gelen yüksek RAS aktivitesine artmış ERK aktivitesi eşlik etmektedir (Johnston 2001). Kolorektal kanserde sık rastlanılan RAS mutasyonları, konstitütif RAS aktivasyonuna yol açarak ERK yolağının aşırı aktivitesini tetiklediği düşünülmektedir. Ayrıca KRAS'ın mutasyonel aktivasyonu PI3K/AKT ve NF-κB yollaklarının aktivasyonuna yol açmaktadır (Schubbert ve ark 2007, Bodemann ve White 2008).

KRAS'ın onkogenik aktivasyonu kolon kanserinde sıklıkla gözlenmektedir (Li ve ark 2005). Aktive edilmiş KRAS'ın, β-katenin tirozin fosforilasyonunu tetikleyerek E-kadherin salınmasına ve Wnt sinyalinin artmasına neden olduğu bildirilmektedir (Kinch ve ark 1995). ERK/MAPK yolağının aktivasyonun hücre

bölünmesini teşvik eden siklin D1 sentezini indüklediği gösterilmiştir (Lavoie ve ark 1996). Ayrıca, bazı sitokinlerin (interferon-α), diğer transkripsiyon faktörleri ile uyumlu olarak antiproliferatif sinyalleri dönüştürmek için MAPK sinyal yolağını kullandığı öne sürülmektedir. Sonuç olarak, ERK/MAPK yolağı p38 ve JNK yolaklarına göre kolorektal kanserde hücre çoğalmasının temel düzenleyicisi olarak gösterilmektedir (Fang ve Richardson 2005).

BRAF mutasyonları maling melanoma, tiroid ve kolon kanseri gibi insan kanserlerinde sıklıkla görülmektedir. Kolorektal kanserde BRAF mutasyonları %9-11 oranında oluşmaktadır. Ayrıca BRAF mutasyonları mikroinstabilite ile sporadik kolon kanserlerinde tanımlanır (Brose ve ark 2002, Rajagopalan ve ark 2002, Fang ve Richardson 2005). BRAF ve KRAS mutasyonları kolorektal kanserde birbirleriyle karşılıklı ilişki olduğundan, BRAF sinyalinin anormal aktivasyonu, KRAS aracılı kolorektal kanser için kritik olarak kabul edilmektedir (Rajagopalan ve ark 2002, Yuen ve ark 2002).

1.1.2. JNK Yolağı

JNK proteinleri, MAPK8 (JNK1'i kodlayan), MAPK9 (JNK2'yi kodlayan) ve MAPK10 (JNK3'ü kodlayan) tarafından kodlanır. Alternatif olarak en az on izoforma neden olacak şekilde eklenmişlerdir (Gupta ve ark 1996). JNK1 ve JNK2 hemen hemen her hücrede bildirilirken, JNK3 esas olarak beyinde bulunur (Bode ve Dong 2007).

JNK'ler yukarı MKK4 ve MKK7 kinazları tarafından aktif hale getirilebilir (Wagner ve Nebreda 2009). Önemli bir JNK reseptörü, Fos ve Jun aile üyelerinden oluşan transkripsiyon faktörü Activator protein-1 (AP-1)'dir (Eferl ve ark 2003). JNK'lerin onkojenik fonksiyonları çoğunlukla, Jun'u fosforile etme ve AP-1'i aktive etme yeteneklerine dayanır, tümör baskılayıcı işlevleri ise muhtemelen proapoptotik aktiviteleri ile ilişkilidir (Wagner ve Nebreda 2009). Ek olarak JNK, kronik hipoksi ile aktive edilebilmekte ve otofajiyi etkileyebilmektedir (Tam ve ark 2019). JNK yolağının tümör gelişimindeki rolü, kanser hücre hatlarında yüksek seviyede JNK aktivitesi bulunması ile desteklenmiştir (Kennedy ve Davis 2003). Drosophila ile tümör oluşumunun tetiklendiği bir çalışmada, onkojenik RAF ve JNK modelinin masif hiperplaziyi indüklemek için işbirliği yaptığı gösterilmiştir (Uhlirova ve ark

2005). JNK'nın tümör baskılanmasında rolü üzerine yapılan çalışmalarda JNK'nın CD8 (+) T hücreleri üzerinden bağışıklık sistemine etki ederek proapoptik etkileri başlattığı ve tümör baskılanmasında rol aldığı gösterilmiştir (Kennedy ve Davis 2003, Gao ve ark 2005). JNK yolunun tümör baskılama özelliği, p38 MAPK'lerden daha az olsa da inflamasyonu ve kanseri kontrol eden sitokinlerin ekspresyonuna bağlanmıştır (Karin ve Gallagher 2005).

1.1.3. P38 Yolağı

Memeli p38 MAPK aileleri, UV ışıması, ısı şoku, yüksek ozmotik stres, lipopolisakkarit, protein sentez inhibitörleri, proinflamatuar sitokinler (IL-1, TNF-α, vs) ve bazı mitojenler dahil olmak üzere hücresel stres ile aktive edilir (Zhang ve Liu 2002). P38 MAPK'leri kodlayan, MAPK14 (p38α'yı kodlar), MAPK11 (p38β'yi kodlar), MAPK12 (p38γ'yi kodlar) ve MAPK13 (p38δ'yi kodlar) olmak üzere dört gen bulunmaktadır. MAPK14'ün iki alternatif olarak eklenmiş izoformları da rapor edilmiştir (Lee ve ark 1994, Sanz ve ark 2000).

P38 MAPK aktivasyonu, apoptozdan hücre bölünmesine, hücre istilasına ve inflamatuvar tepkiye kadar değişen çok sayıda hücresel süreci düzenler (Cuenda ve Rousseau 2007, Cuadrado ve Nebreda 2010). G4/S'de Cdc42 ile indüklenen hücre döngüsü baskılanmasında p38 aktivitesi gereklidir. Bu engelleyici rol, siklin D1 ekspresyonunun inhibisyonuna aracılık edebilir (Zhang ve Liu 2002).

P38α'nın bir tümör baskılayıcı olarak rolünü destekleyen çok fazla kanıt bulunmaktadır. P38α'nın bu işlevi, hücre farklılaşmasının hem negatif regülasyonu hem de apoptozis indüksiyonu tarafından aracılık edilmekle birlikte, terminal farklılaşmasının indüksiyonu da tümörün baskılayıcı fonksiyonuna katkıda bulunmaktadır (Bulavin ve Fornace 2004, Wagner ve Nebreda 2009). P38α, melanom olmayan deri kanseri, meme kanseri ve gliomalarda kanser ilerlemesine potansiyel olarak katkıda bulunabilecek pro-inflamatuar mediatör siklooksijenaz 2'nin (COX2) indüksiyonunu düzenler (Bachelor ve Bowden 2004, Xu ve Shu 2007). İlaveten, p38α'nın, TNF-α, IL-1 ve IL-6 gibi, proinflamatuar ve anjiyojenik etkilere sahip olan birçok sitokinlerin üretiminde önemli bir rolü vardır (Kumar ve ark 2003). P38α ayrıca inflamasyondaki rolünden bağımsız olarak tümör invazyonunu ve anjiyogenezini doğrudan etkileyebilir. P38α, matriks metalloproteinazları MMP1,

MMP3 ve MMP13'ün, metastatik kanser hücrelerin tarafından matriks yeniden biçimlenmesini ve degradasyonunu düzenlemesinin yanı sıra, tümör sağkalımı ve anjiyogenezin güçlü bir indükleyicisi olan vasküler endotelyal büyüme faktörü A'yı (VEGFA) da düzenler (Wagner ve Nebreda 2009). Ek olarak anjiyogenik faktörlerin hipoksi kaynaklı uyarımında önemli bir role sahip olan hipoksi indüklenebilir faktör 1'i (HİF-1a) aktive edebilir (Emerling ve ark 2005).

1.2. P53 Yolağı

TP53 geni, kromozom 17p'nin kısa kolunda bulunur ve 53 kDa'lık bir nükleer proteini kodlamaktadır. Doğal tip TP53, bir tümör baskılayıcı gen olup ve onun ürünü olan p53 proteini hücre döngüsü durdurulmasında ve apoptoz indüksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Crawford ve ark 1982, Donehower ve Bradley 1993, Halaby ve ark 2015).

P53 proteinini kodlayan tümör baskılayıcı gen, TP53, insan kanserlerinde mutasyona en fazla uğrayan genlerden biridir. P53 proteini, neoplastik transformasyonu, hücre siklusunun geçici olarak durmasının (sessizlik durumunun) aktivasyonu, hücre siklusunun kalıcı olarak durmasının (hücre yaşlanması) başlatılması veya programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) tetiklenmesi olmak üzere üç mekanizmayla engellemektedir. P53, stres altında kalan hücreleri bu üç mekanizmadan birine yönlendiren internal stres monitörü olarak da görülebilir (Kumar ve ark 2017).

P53 proteininin ekspresyonu, ağırlıklı olarak proteolitik dönüş ile düzenlenir. P53 proteininin 6-20 dakikalık kısa bir yarı ömrü vardır ve bu kısa yarı ömrü veren ubikuitin ligaz MDM-2 proteinidir. Son zamanlarda, diğer iki ubikuitin ligazın, COP-1 (Synthetic Polypeptid) ve PIRH-2 üzerinde etki gösterdiği gösterilmiştir (Leng ve ark 2003, Dornan ve ark 2004). Bazı DNA hasarları (gama radyasyonu), MDM-2 proteini bozulması ve p53 aktivitesinde ve seviyesinde artış ile sonuçlanmaktadır (Stommel ve Wahl 2004).

P53 proteini ve onun sinyal iletim yolu, çok çeşitli iç ve dış gerilme sinyallerine cevap vermek üzere tasarlanmış bir dizi gen ve bunların protein ürünlerini içerir. Bu stres sinyalleri, DNA replikasyonu, kromozom ayrımı ve hücre bölünmesini izleyen ve kontrol eden hücresel homeostatik mekanizmalar üzerinde

etkilidir. P53 tümör baskılayıcı gen, DNA hasarı, hücresel stres ve uygunsuz mitojenik uyarımı algılayan bir hücresel yol ağına dayanır (Levine ve ark 2006). P53, bu tür sinyalleri birleştirir ve buna karşılık, büyümenin durdurulmasını indükler, apoptozu teşvik eder, anjiyogenezi bloke eder (Vogelstein ve ark 2000).

P53 proteinini aktive eden stresler arasında bir hücrede DNA'nın bütünlüğüne zarar vardır. Gamma veya UV ışınlaması, bazların alkilasyonu, DNA'nın çapraz bağlanması, DNA'nın yok edilmesi, deoksiriboz şeker kısmının değiştirilmesi, oksidatif serbest radikallerle reaksiyon gibi DNA hasarına yol açan birçok fiziksel ve kimyasal nedenleri vardır. Bu tip DNA hasarlarının her biri farklıdır ve her biri farklı bir protein kümesi tarafından tespit edilir ve daha sonra farklı yollar ile hasarı tersine çeviren farklı enzimler veya aktivitelerle onarılır (Kastan ve ark 1992, El-Deiry ve ark 1993, Oren 2003, Zhan 2005, Tuteja ve ark 2009).

Hücrede birden çok DNA hasar tespit ve onarım sistemi vardır, ancak her türlü DNA hasarı p53 proteinine ve yoluna rapor edilir (Giaccia ve Kastan 1998, Oren 2003). P53 yolu, c-Myc gibi aşırı eksprese edilmiş onkogenler de dâhil olmak üzere çeşitli stres sinyallerine yanıt olarak apoptoz veya hücre siklusunun durdurulmasını indükleyerek kanser başlangıcını azaltır. P53 proteini DNA hasarı yanıtını yöneterek genom bütünlüğünün korunmasında merkezi bir rol oynar. Yıkımın hedefi olan MDM-2 (Murine Double Munites) proteiniyle birlikte bulunması nedeniyle p53'ün stres altında olmayan, sağlıklı hücrelerdeki yarı ömrü kısadır. Hücre, DNA'nın saldırıya uğraması gibi bir stres altında kaldığında, ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) protein kinaz dahil birtakım sensörler aktive edilir. Aktif duruma geçen bu kompleksler p53'te gerçekleşen ve beraberindeki MDM-2 proteininden kurtulmasını sağlayarak yarı-ömrünü uzatan ve hedef genlerin transkripsiyonunu arttıran translasyon sonrası modifikasyonları katalize eder. Hücre siklusunun durdurulması, DNA hasarı karşısındaki ilk yanıt olarak kabul edilebilir. Bu yanıt, G1 fazının geç dönemlerinde ve öncelikle, bir CDK1 geni olan CDKN1A (p21) geninin p53'e bağımlı olarak transkripsiyonu sonucunda gerçekleşir. P21 proteini, siklin-CDK komplekslerini inhibe ederek hücre siklusunu, Rb fosforilasyonunun önlenmesi üzerinden durdurur. DNA hasarı bu sırada onarılabilirse p53, MDM2 proteini transkripsiyonu üzerinden tahrip olarak hücre

siklusunundaki blokun ortadan kalkmasını sağlar. DNA hasarı onarılmazsa hücre siklusu, p53 tarafından başlatılan, yine p53 tarafından yönlendirilen apoptoza gidebilir (Mirzayans ve ark 2012, Kumar ve ark 2017).

Özetlemek gerekirse P53, DNA hasarı ile aktive edilir ve hücre siklusunun G1'de duraklamasını ve DNA onaran genlerin indüksiyonunu sağlayarak DNA onarımına yardım eder. DNA'sı onarılamayan bir hücre p53 tarafından normalde yaşlanmak ya da apoptoza girmek üzere yönlendirilir.

P53 proteinini aktive etmenin ilginç ve farklı bir durumu ise, Retinoblastoma Proteini (E2F-1 transkripsiyon faktörünü aktive eden) ve APC gibi tümör süpresör genlerinin mutasyonal inaktivasyonu, Myc veya RAS gibi onkojenlerin mutasyonal aktivasyonudur. Bu genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanan transkripsiyon faktörlerinin aktiviteleri, p19 veya p14 ARF (ADP-Ribosylation Factor) genini transkripte edebilir, protein daha sonra MDM-2 proteinine bağlanır ve bir ubikuitin ligaz olarak aktivitesini inhibe eder. Bu bağlamda bir hücrede p53 seviyelerini yükseltir ve organizmayı kanserlerin gelişiminden koruyan bir p53 cevabı getirmeye yardımcı olabilir (Stott ve ark 1998, Lowe ve Sherr 2003, Hemann ve Lowe 2007). Bu, bir hücredeki çeşitli sinyal iletim yollarının, hücresel homeostaza katkıda bulunan geri besleme döngülerinin nasıl iletişim kurup, oluşturduğuna dair iyi bir örnektir (Levine ve ark 2006).

Bir çalışmada, p53 proteininin mitokondri ile doğrudan etkileşime girmesine ve apoptozisi teşvik etmesine izin veren bir aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Erster ve ark 2004). P53, hedef genlerin transaktivasyonunu ve transkripsiyondan bağımsız mekanizmalar yoluyla da apoptozu teşvik eder. P53, Bax, Noxa ve Puma gibi Bcl-2 ailesinin üyelerini de içeren çeşitli proapoptotik genlerin transkripsiyonunu aktive etme yeteneğine sahiptir (Amaral ve ark 2010). Aktifleşmiş p53 geni, Sitokrom c'nin dokuya özgü bir tarzda, mitokondriden sitoplazmaya sekresyonunu arttırır. Sitokrom c, bir proteaz kaskadı başlatmak için APAF-1 (bir p53-regüle edilmiş gen) ile etkileşir, kaspaz 9'un ve sonrasında kaspaz-3'ün aktivasyonuna, ardından apoptoza yol açmaktadır. Bu, p53 yolunu aktive eden bir dizi stres sinyali ile başlatılan intrinsik apoptotik yol olarak bilinmektedir. İntrinsik yola ek olarak, p53, ekstrinsik apoptotik yolunu (Fas ligandı, Katil Dr reseptörü)

başlatan bir dizi gen oluşturur. Akabinde kaspaz 8 ve 3 aktiviteleri ve apoptoz ile sonuçlanmaktadır (Erster ve ark 2004, Shen ve ark 2008, Amaral ve ark 2010).

P53 yolunda 10 pozitif veya negatif geri besleme döngüsü tespit edilmiştir. Bunlardan yedisi negatif geri bildirim (MDM-2, Cop-1, Pirh-2, p73 delta N, siklin G, Wip-1 ve Siah-1) ve üçü pozitif geri bildirim döngüsüdür (PTEN-AKT, p14/19 ARF ve Rb). Bunlar p53 aktivitesini düzenlemektedir. Tüm bu ağlar veya devreler, transkripsiyonel seviyede p53 aktivitesi ile indüklendikleri, p53 ile transkripsiyonel olarak bastırıldığı (p14/19 ARF) veya p53-indüklü proteinler tarafından düzenlendikleri için otoregülasyon olarak tanımlanırlar (Harris ve Levine 2005).

P53 yolağı ayrıca kanserin kökeninde önemli bir rol oynayan diğer sinyal iletim yollarıyla yakından bağlantılıdır. Bu bağlantılardan biri, p14/p19 ARF ve MDM-2'dir. P14/19 ARF proteini, MDM-2 proteinine bağlanır ve ubiquitin ligaz aktivitesini azaltarak, p53 proteini seviyesini artırır (Honda ve Yasuda 1999). P14/19 ARF geninin transkripsiyonu, E2F-1 (Zhu ve ark 1999) ve β-katenin (Damalas ve ark 2001) tarafından pozitif olarak düzenlenir ve p53'ün kendisi tarafından negatif olarak düzenlenir. Ek olarak, bir hücrede RAS ve Myc aktiviteleri ile p14/19 ARF proteini seviyeleri artmıştır (Lowe ve Sherr 2003).

P53, insan kanserlerinde en yaygın mutasyona uğramış gen olarak bilinmektedir (Kandoth ve ark 2013). Onkojenik yapıya dönüşüm esnasında p53 mutasyonlarının adenomdan karsinoma geçişte kritik rol oynadığı düşünülmektedir (López ve ark 2012). Yapılan çalışmalarda p53 molekülünün mutant formunun 2 farklı şekilde oluştuğu gösterilmiştir. İlk yol p53 proteini kodlayan DNA fragmentinin yapısında meydana gelen mutasyonlar sonucu yapısının değişmesi iken, ikinci yol ise şaperonların p53 proteinin düzgün şekilde üç boyutlu yapısını düzenleyememesi sonucu meydana gelmektedir (Wang ve ark 2011). Mutant p53 bulunduran kanser hücrelerinin, bulundurmayan kanser hücrelerine göre daha hızlı bölündükleri, farklı olarak metastaz ve invazyon gerçekleştirdikleri yapılan birçok araştırmada bildirilmiştir (Doyle ve ark 2010, Nakayama ve Oshima 2019). Ayrıca tümör hücrelerinde normal işlevini kaybetmiş olan mutant p53'lerin onkogen olarak görev yaptıkları bulunmuş ve tümör hücreleri mutant p53 sentezini, normal hücredeki p53'e göre daha fazla gerçekleştirerek, büyümeyi ve bölünmeyi arttıran faktörlerin miktarını artırdığı gözlenmiştir (Muller ve Vousden 2014). Mutant p53,

tümör büyümesini baskılayıcı etkinliği yok olmasına rağmen, hücre proliferasyonu ve tümör oluşumuna duyarlılığı arttırmada etkin rol oynamaktadır (Addadi ve ark 2010).

P53'te meydana gelen mutasyon, kolorektal kanserin de dahil olduğu birçok kanser türünde en yaygın genetik anormallik olarak bilinmektedir (Hollstein ve ark 1994). Mutant p53'ün kolorektal adenomun karsinoma ilermesini teşvik ettiği gösterilmiştir (Saleh ve ark 2000). Sporadik KRK'nin yaklaşık %40-50'sinde p53 mutasyonu oluşmaktadır (Kim 2018). P53 mutasyonları iyi huylu adenomatöz poliplerde çok yaygın olmamakla birlikte, %15-30'unda gözlenmektedir (Baker ve Vogelstein 2019, Nakayama ve Oshima 2019).

P53 mutasyonların çoğu nokta mutasyonu (missens mutasyonu**,** hot-spot) olarak (Nakayama ve Oshima 2019), proksimal kolon kanserlerinde %34, distal kolon kanserlerinde %45 oranında meydana gelmektedir (Ryan ve ark 2001, Russo ve ark 2005). Ek olarak mutant p53, KRAS aktivasyonu ve TGF-β baskılaması ile birlikte metastazı teşvik edebilmektedir. Ayrıca bu tip p53 mutasyonu ve doğal tip p53 kaybı, NF-kB aktivasyonunu indükleyebilir. Bu bağlamda p53 mutasyonlarının, doğal tip p53 kaybıyla birlikte değerlendirildiğinde, hem onkojenik hem de inflamatuvar aktivasyonları indüklemesinden dolayı kolorektal kanserin ileri aşamalarını hızlandırdığı öngörülmektedir (Nakayama ve Oshima 2019).

Mutant p53'ün benzersiz bir özelliği de mutant p53 proteinlerinin sıklıkla stabil hale gelmesine ve tümörlerde çok yüksek seviyelerde birikmesine yol açmasıdır (Oren ve Rotter 2010, Freed-Pastor ve Prives 2012, Muller ve Vousden 2013). Bu sebeple tümör dokularında p53'ün pozitif immünohistokimyasal boyaması, p53 mutasyonu saptaması için yaygın şekilde kullanılmıştır (Alsner ve ark 2008, Freed-Pastor ve Prives 2012). Yapılan çalışmalarda doğal tip p53 kısa yarı ömüre sahip olmasından dolayı immunohistokimyasal yöntemler ile tespit edilemezken, mutant p53 daha uzun bir yarı ömüre sahip olmasından dolayı İHC yöntemler ile kolaylıkla saptanmaktadır (Baas ve ark 1994, Kaserer ve ark 2000, Xi ve ark 2017).

1.3. WNT Yolağı

Wnt proteinleri hem embriyojenezde hem de olgun dokularda önemli rolleri olan küçük (39-46 kD), lipitle modifiye edilmiş olarak salgılanan glikoproteinlerdir

(Bhanot ve ark 1996, Ingham 1996). Wnt sinyalizasyonu, evrim sırasında çok hücreli organizmaların çeşitli dokularındaki doku morfogenezi ve rejenerasyonunu (kök hücreler aracılığıyla) düzenleyen yüksek oranda korunmuş bir sinyal yolu olarak ortaya çıkmıştır (Peifer ve Polakis 2000, Clevers ve ark 2014). Hayvan modellerinde Wnt sinyalinin değişmesi anormal morfogeneze yol açmaktadır (Bhanot ve ark 1996).

Wnt yolu β-katenin bağımlı (kanonik) ve bağımsız (kanonik olmayan) olmak üzere iki sinyale bölünmektedir (Kadowaki ve ark 1996). Wnt/β-katenin sinyal yolağı haricinde kalan diğer yolaklar ise β-katenin'den bağımsız sinyal yolakları olarak isimlendirilir. Bu yolaklar farklılaşma, hücre polaritesi ve migrasyonla ilişkilendirilmiştir (Yamamoto ve ark 2008). Kanonik Wnt yolu, Wnt/β-katenin yolu olarak da bilinir, çünkü β-katenin, Wnt sinyalinin sitoplazmadan çekirdeğe kadar önemli bir transdüseridir (Clevers ve ark 2014). β-katenin, çok işlevsel bir protein yapısına sahiptir. Önemli işlevlerinden biri, hücre yapışmasını düzenleyen E-kadherini hücre zarı üzerine bağlar (Giles ve ark 2003, Clevers ve ark 2014).

Salgılanmış Wnt ligandları, R-spondin ligand ailesinin üyeleri, Wnt sinyalinin pozitif efektörleri olarak keşfedilmiştir (Kazanskaya ve ark 2004, Glinka ve ark 2011). R-spondinler, G-protein eşli reseptörleri LRP 4-6 içeren lösin bakımından zengin tekrarlara bağlanır. R-spondin bağlanmasının yokluğunda, iki homolog E3 ubikuitin ligazları ZNRF3/RNF43, lizozomal bozunması için Fzd reseptörü hedefler (De Lau ve ark 2011, De Lau ve ark 2014). R-spondinlerin LRP 4-6'ya bağlanması, ZNRF3/RNF43'ün aktivitesini inhibe eder ve hücre yüzeyi üzerinde Fzd reseptörlerinin birikmesine yol açar (Hao ve ark 2012, Koo ve ark 2012, De Lau ve ark 2014). Böylelikle Wnt sinyal yolağının başlaması için gerekli olan Fzd-Wnt-LRP4-6 yapısı oluşur (Cadigan ve Liu 2006, Chen ve ark 2008). Meydana gelen sinyal ile sitoplazmaya translokasyon ve akabininde DVL fosforilasyonu uyarılır. Bu meydana gelen fosforilasyon sonrasında APC, Axin, GSK3β, CKI kompleksinden meydana gelen yıkıcı kompleksinin dağılmasına yol açar, böylelikle β-katenin serbest hale gelir. β-katenin daha sonrasında çekirdeğe translokasyon olur (Veeman ve ark 2003, Teo ve Kahn 2010). Çekirdekte β-katenin, TCF/LEF transkripsiyon faktörleri ailesinin üyelerine bağlanır ve hedef gen transkripsiyonunun bir ortak aktivatörü olarak rol oynar. β-katenin, T hücre faktörü (TCF/LEF) düzenlenmiş gen

transkripsiyonunun hiperaktivasyonu, kolorektal kanser gelişiminin bir işaretidir (Conacci-Sorrell ve ark 2002, Bian ve ark 2020).

Wnt sinyalleri, Frizzled reseptörlerini RNF43/ZNRF3 ubiquitin ligazları tarafından salgılanan ve bozulmaya karşı stabilize etmeye yarayan R-spondinler tarafından pozitif olarak düzenlenir (Hao ve ark 2012, Koo ve ark 2012). Normal hücrelerde, β-katenin bozulması amino-terminal bölgesinde Serin/Treonin (Ser/Thr) fosforilasyonuyla başlatılır (Aberle ve ark 1997, Orford ve ark 1997). Wnt sinyali olmadan, β-katenin, Kazein Kinaz I (CKI), Glikojen Sentaz Kinaz-3 beta (GSK-3β) ve bir yapı proteini olan Axin ile bir kompleksi oluşturur ve Serin-45'te CKI aracılı β-katenin fosforilasyonu ile sonuçlanır. Serin-45 fosforilasyonu GSK3β için bir tanıma bölgesi sağlar ve GSK3β'nın Thr-41, Ser-37 ve Ser-33 pozisyonlarında fosforile edilmesine izin verir. Fosforile edilmiş β-katenin, Beta-Trcp tarafından tanınır, ubikutlenir ve yıkım için hedeflenir (Hart ve ark 1999, Spencer ve ark 1999, Winston ve ark 1999).

APC, intestinal homeostaz ve kolorektal kanserde anahtar rol oynayan, Wnt/β-katenin yolağının temel bileşenidir (Polakis 2000, Giles ve ark 2003). APC, kolorektal kanser için önemli bir tümör supresördür (Kinzler ve Vogelstein 1996). APC geni ilk olarak ailesel adenomatöz polipoz (FAP) oluşmasında, temel faktör olarak tanımlandı (Kinzler ve ark 1991). Daha sonraki dönemlerde sporadik kolon kanserlerinde yaygın olarak mutasyona ugradığı (yaklaşık %80) ve doğal tip APC'li kolorektal kanserlerinin yaklaşık olarak yarısında β-katenin mutasyonu olduğu bulunmuştur (Morin ve ark 1997). APC mutasyonları, FAP ve sporadik kolon kanserlerinin %85'inden sorumludur (Kinzler ve Vogelstein 1996). Kolorektal kanserlerin çoğunda APC'nin bir allelinde kısalma ve/veya diğer allelde heterozigotluk kaybına sahiptir (Kinzler ve Vogelstein 1996, Rowan ve ark 2000).

APC mutasyonları ile işlevinin bozulması, birçok aşamaya sahip kolorektal kanserde ilk erken genetik evredir (Powell ve ark 1992). APC mutasyonları ile APC, fonksiyon kaybı meydana geldiğinden dolayı yıkıcı kompleks yapısına katılamamaktadır. Kanserle ilişkili APC mutasyonlarında axin bağlayıcı alanlar kaybolur (Segditsas ve Tomlinson 2006). Bu bağlamda APC mutasyonlarında, axin kompleksi ile birleşmesinin önlenmesi ve sonrasında β-katenin fosforilasyonu

sağlanmamaktadır. β-katenin sitoplazmada uygunsuz birikimi ve çekirdeğe translokasyon olması hedef genlerin anormal ekspresyonuna ve iyi huylu adenomların gelişmesine yol açmaktadır. Bu adenomlar ilerleyen zamanlarda diğer yolaklarda ek mutasyonlar birikmesi sonucu karsinoma ilerlemektedir (Leslie ve ark 2002, Davies ve ark 2005).

APC kaybı, kolorektal kanserde Wnt sinyallemesinde ana itici güçtür (Drost ve ark 2015, Matano ve ark 2015). İnsan KRK numuneleri ve fare modellerinden yapılan çalışmalarda APC'nin farklı mutasyonlarının farklı seviyelerde kanonik Wnt yolu aktivitesi ile sonuçlandığını ve kalın bağırsak içindeki karakteristik tümör lokasyonlarıyla ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Buchert ve ark 2010, Christie ve ark 2013). Kolorektal adenomlar invaziv karsinomaya ilerlerken, onkogenlerdeki veya tümör baskılayıcılardaki genetik değişikliklerin, Wnt/β-katenin sinyalleşmesinin aktivasyonunu arttırdığı bulunmuştur (Li ve ark 2005, Qi ve ark 2006). Adenoma-karsinoma sekansı boyunca, APC fonksiyonunun kaybını genellikle KRAS onkojenin, onkogenik aktivasyonu izlemektedir (Zhang ve ark 2004). İnsanlarda yapılan bir çalışmada, APC restorasyonu sağlanır ise TP53 ve KRAS mutasyonları bulunmasına rağmen, kolorektal kanserde gerilemeye neden olduğu gösterilmiştir. Bu durum kolorektal kanserin aktif Wnt sinyaline olan bağımlılığını göstermektedir (Dow ve ark 2015).

β-katenin proteini kodlayan CTNNB-1'de özellikle N-terminal kısmında fonksiyon bozukluğu ile karekterize mutasyonlar meydana geldiğinde, başta kolon olmak üzere birçok kanser türü oluşabilmektedir. CTNNB-1 genindeki mutasyon sonucu olarak, β-katenin fosforile edilememekte ve protezomal yıkıma dirençli hale gelmektedir (Polakis 2000). Genel anlamda WNT sinyal yolağının kontrolsuz aktivasyonu ile sonuçlanan mutasyonlar, bu yolakta işlev gören hangi biyomolekülde meydana gelirse gelsin, çoğunlukla β-katenin sitoplazma birikimi ile sonuçlanmaktadır (Brembeck ve ark 2006, Willert ve Jones 2006). β-katenin çekirdeğe translasyon olmasının ardından, TCF/LEF transkripsiyon faktörleri aktifleştirir. TCF/LEF transkripsiyon faktörleri c-Myc, siklin D1, c-Jun (JUN), MMP7, Survivin (BIRC5), Cox-2 gibi intestinal epitel hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve ölümünde rol oynayan çok çeşitli hedef genleri aktive etmektedir (Yamada ve ark 2000, Hocevar ve ark 2003, Demirkan ve ark 2007, Cui ve ark

2012). Ek olarak Wnt/β-katenin, EMT (Epitelial Mezenkimal Transition) ile ilişkili transkripsiyon faktörleri indükleyerek EMT teşvik etmede önemli rol oynamaktadır (Yang ve ark 2006). c-Myc onkogeni KRK'de aşırı eksprese edilir ve gelişiminde önemli rol oynamaktadır (He ve ark 1998). Ayrıca siklin D1, β-katenin ve KRAS vasıtasıyla artmış ekpresyonu KRK gelişiminde önemli bir rol oynayabilir (Tetsu ve McCormick 1999). Wnt sinyal yolağı, tümör mikroçevresi ve kanser kök hücreleri ile etkileşimi vasıtasıyla kolorektal kanser ilermesinde önemli rol oynamaktadır. Tümör mikroçevresindeki stromal hücreler tarafından salgılanan büyüme faktörleri, Wnt/β-katenin aktivitesini arttırabilmektedir. Hepatosit büyüme faktörü, β-katenin ile bir kompleks oluşturduğu gibi (Rasola ve ark 2007) Epidermal büyüme faktörü (EGF), Trombosit büyüme faktörü (PDGF), Transforme büyüme faktörü (TGF-b), p68 vasıtasıyla Wnt/β-katenin sinyalini arttırabilir (Yang ve ark 2006).

APC ve β-katenin mutasyonlarına ek olarak R-spondin/Lgr5/RNF43 modülündeki mutasyonlar tümör gelişmesinde itici güçler olarak gösterilmiştir. KRK'de RNF43 mutasyonlarına %19 oranında rastlanılmaktadır (Giannakis ve ark 2014). Ayrıca R-Spondin mutasyonları ve yüksek düzeyde eksprese edilen füzyon proteinlerine %10 oranında rastlanılmaktadır (Seshagiri ve ark 2012).

Kolon kanseri gelişiminde yukarıda anlatılan Wnt/β-katenin sinyal yolağı bileşenlerinin mutasyonlarına ek olarak çok sayıda genetik ve epigenetik değişiklikler barındırmaktadır. Bunlar daha önce de bahsedildiği gibi nokta mutasyonları ile KRAS aktivasyonu, TP53 nokta mutasyonları ve allel delesyonu ile fonksiyon kaybı, PI3K yolağındaki mutasyonlar ve/veya yolağın düzensiz aktivasyonu, TGF-β sinyal yolağının bileşenlerindeki mutasyonlar ve SMAD transkripsiyon faktörlerinin fonksiyon kaybıdır (Schulz 2007).

1.4. PI3K ve TGF-β Yolağı

Fosfosinositid 3-kinazlar (PI3K'ler), geniş bir hücresel süreçler dizisini düzenleyen, hücre içi sinyalleme kaskadlarını yayan bir lipit kinaz ailesidir. Alt tabaka tercihine ve yapısına göre gruplandırılmış 3 adet PI3K sınıfı vardır. Sınıf I PI3K'ler ayrıca IA ve IB sınıflarına ayrılmıştır. Sınıf IA PI3K'ler, reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler) ve G proteinine bağlı reseptörler tarafından aktive edilirken, sınıf IB ise PI3K sadece G proteinine bağlı reseptörler tarafından aktive edilir (Engelman

ve ark 2006). PI3K'lerden, sınıf IA PI3K'leri en çok kanserde rol oynamaktadır (Zhao ve ark 2005, Bader ve ark 2006). Bu kinazlar, 5 regülatör alt birimden (p85a, p85p, p55a, p55p veya p50a) ve 3 katalitik alt birimden 1'ini (p110a, p110p veya p110p) içeren heterodimerik yapıya sahiptir. Bu alt birimlerden, işlev kazanma mutasyonları en çok katalitik alt birim p110a'da ve daha az bir ölçüde düzenleyici alt birim p85a'da meydana gelmektedir (Engelman ve ark 2006).

Kanserde PI3K sinyalinin ekseni, büyüme faktörlerinin RTK'larla birleşmesiyle başlar. PI3K daha sonra plazma membran ile bağlantılı reseptörlere alınır ve aktive edilir ve PIP2'yi PIP3 üretmek için fosforile eder. Pleckstrin homoloji (PH) domeni ile nodal kinaz AKT (PKB olarak da bilinir), iki fosforilasyon olayıyla aktive edildiğinde PIP3'e bağlanır ve büyüme, çoğalma, hayatta kalma ve motiliteyi düzenleyen karmaşık bir sinyal dizisini tetikler (Yuan ve Cantley 2008). Aktive olmuş AKT, bcl-2 ailesinden proapoptatik proteinlerin inhibisyonu, MDM2 ekspresyonunu arttırarak P53'ün degradasyonunu arttırması, transkripsiyon faktörü olan NF-kB etkileyerek antiapoptotik genlerin transkripsiyonunu arttırması gibi birçok işleve sahiptir (Luo ve ark 2003, Fayard ve ark 2005, Duronio 2008). Lipid fosfataz ve PTEN, bu işlemi AKT'nin aktivasyonunu inhibe etmek için PIP3'ü defosforile ederek antagonize etmektedir. Bu sinyalleme ekseninin her bir üyesi, sıklıkla kanserde değiştirilmektedir (Yuan ve Cantley 2008).

AKT'ın aşağı akış yönünde başlıca efektörlerden biri olan mTOR kompleksi 1 (mTORC1), büyüme faktörü sinyallemesi, hücrenin enerji durumu ve O2 mevcudiyeti dahil olmak üzere birçok işlevi entegre eder. Ayrıca mTOR kompleksi, hücre büyümesi ve protein sentezi için önemlidir. PI3K/AKT sinyalizasyon kaskadı, hücrenin hayatta kalmasını ve büyümesini teşvik ettiği için kanserde çok önemlidir. PI3K/AKT sinyali, kanserlerde birkaç farklı mekanizma ile aktive edilir (Engelman 2009). İnsan kanserlerinde PI3K-Akt aktivasyonu reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler) ve sinyal yolunun spesifik bileşenlerinde oluşan somatik mutasyonlar tarafından gerçekleştirilir (Roy ve ark 2002). Reseptör tirozin kinazlar gibi birçok kanserde aktive olan EGFR, PDGFR gibi reseptörler PI3K yolağını da devreye sokmaktadır. Ayrıca, p110'un RAS'ı doğrudan bağladığı gösterilmiştir, böylece RAS ve PI3K sinyallemesi arasında potansiyel bir biyokimyasal bağlantı sağlanmaktadır. PI3K'nin fosfoinositid ürünlerini bozan bir fosfataz olan PTEN, prostat, meme ve beyin

kanserleri dahil olmak üzere birçok farklı kanser türünde sıklıkla kaybolmaktadır (Li ve ark 1997).

AKT, kolon, pankreas, yumurtalık ve bazı meme kanserleri olmak üzere birçok kanserde aşırı eksprese edilmektedir (Rychahou ve ark 2006, Brugge ve ark 2007). AKT, normal kolon mukozası ve hiperplastik poliplerde az, kolorektal adenomlar ve karsinomlarda ise çok fazla eksprese edilmektedir (Roy ve ark 2002). PTEN genindeki mutasyonlar, AKT aşırı ekspresyonu ve gen amplifikasyonu dahil olmak üzere, PI3K-Akt yolağının anormal aktivasyonuna neden olmaktadır (Vivanco ve Sawyers 2002, Luo ve ark 2003).

Kolorektal kanserlerde, PIK3CA ve PTEN de meydana gelen değişiklikler daha baskındır. Kolorektal kanserlerin %14-20'sinde PIK3CA geni mutasyona uğramaktadır. Ekson 9 ve Ekson 20'de meydana gelen sıcak nokta mutasyonları, KRK'de onkogenik bir işlev almaktadır. Bu mutasyonlar ile kolorektal kanserin, istilacı ve ilerleyici olması ilişkilendirilmektedir (Samuels ve ark 2005, Zhang ve ark 2011). Ayrıca p85a düzenleyici alt biriminindeki meydana gelen somatik mutasyonlar, insan kolon ve yumurtalık kanserlerinde rapor edilmiştir (Kang ve ark 2005). PTEN kaybı kolorektal kanser vakalarının %20-40'ındameydana gelmektedir (Zhang ve ark 2011). Waniczek ve ark (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, adenomatöz poliplerin %46'sında PTEN ekspresyonunun bulunmadığı, normal mukozada ise örneklerin tümünde PTEN ekspresyonunun bulunduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda PTEN kaybı karsinogenezde erken aşamada ortaya çıkabilmektedir.

TGF-β sinyal yolu, hücre büyümesi, farklılaşması, apoptoz, motilite, hücre dışı matris üretimi, anjiyogenez ve bağışıklık tepkisi gibi önemli hücresel aktivitelerin düzenlenmesinde etkilidir. Kanserde, TGF-β'nin ikili bir rolü vardır. Kanser gelişiminin ilk aşamalarında, TGF-β bir tümör baskılayıcı olarak görev alırken, geç aşamalarda ise, bağışıklık sistemini ve tümör mikroçevresini modüle ederek invazyon ve metastazı destekler. TGF-β'nin (TGF-β1, TGF-β2 ve TGF-β3) üç izoformunun tümü, TGF-β homodimerine ek olarak bir propeptid bölgesi içeren öncü moleküller olarak hücrelerde sentezlenir (Hyytiäinen ve ark 2004). TGFβRI, TGFβRII ve TGFβRIII olmak üzere üç tane reseptör bulunmaktadır. TGFβRI ve TGFβRII sitoplazmik domenlerinde serin/treonin protein kinazları içerirken,

TGFβRIII kinaz aktivitesine sahip değildir (Neuzillet ve ark 2015, Papageorgis 2015). TGF-β hücrelerdeki süreçleri, TGF-β reseptörü I ve II'den oluşan bir komplekse bağlanarak düzenlenir. Reseptörün liganda bağlanması sonucu dimerizasyonu, büyümeyi baskılayan bir aktiviteye sahip olan ve ayrıca MYC, CDK2, CDK4 gibi proliferasyonu teşvik eden genler ile siklin A ve siklin E' yi kodlayan genlerin baskılanmasına yol açan CDK1'in transkripsiyonel aktivitesiyle sonuçlanan bir olay dizisini başlatır (Kumar ve ark 2017).

TGF-β ligandı, TGFβRI ve TGFβRII'den oluşan bir hetero-tetramerik reseptör kompleksinin oluşumunu tetikleyen TGFβRII'ye bağlanır. Bu bağlanma, TGFβRII'yi serin veya treonin kalıntıları üzerinde TGFβRI'yi fosforile etmek için tetikler. Kanonik yoldaki aktive edilmiş reseptör kompleksi, daha sonra SMAD4 ile bir heteromerik kompleks oluşturan ve hedef gen ekspresyonunu düzenlemek için çeşitli transkripsiyon faktörleri, koaktivatörler veya çekirdek baskı maddeleri ile etkileştiği nükleusa translokasyon yapan R-SMAD (SMAD2 veya SMAD3) fosforile eder (Syed 2016). Aktive edilmiş SMAD kompleksi, doğrudan veya dolaylı olarak kromozomun yeniden modellemesi gibi epigenetik süreçleri kontrol ederek veya mezenkimal epitelyal hücrelerde epitelyal gen ekspresyonunu inhibe eden promoter DNA metilasyonunu kontrol ederek gen ekspresyonunu çekirdeğe taşır. TGF-β sinyallemesinin aktivitesi, SMAD7'nin inhibe edici aktivitesi ile düzenlenir (Neuzillet ve ark 2015, Papageorgis 2015).

TGF-β ekspresyonu, prostat, meme, akciğer, kolorektal, pankreatik, karaciğer, deri kanserleri ve gliomalar da dahil olmak üzere geniş bir kanser tipinde incelenmiştir. Erken evre tümörlerde, TGF-β seviyeleri olumlu prognozla pozitif ilişkiliyken, ilerlemiş tümörlerde tümör agresifliği ve kötü prognoz ile pozitif ilişkilidir (Padua ve Massagué 2009). Erken evre tümörlerdeki TGF-β yolu, hücre döngüsünün inhibe edilmesi ve apoptozu desteklerken, ileri evre tümörlerde ise kanser hücresi motilitesini, invazyon, epitelyal-mezenşim geçişini (EMT) ve tümör kök hücresini teşvik ederek, tümör ilerlemesini ve metastazını destekler (Drabsch ve Ten Dijke 2012).

TGF-β, ekspresyon seviyesine bağlı olarak hem pro-anjiyogenik hem de anti-anjiyojenik özelliklere sahiptir. Düşük TGFβ seviyeleri anjiyogeneze dolaylı olarak,

anjiyogenik faktörlerin (VEGF, bFGF, CTGF) ve proteazların ekspresyonunu ve aktivitesini yukarı doğru düzenleyerek katkıda bulunurken, yüksek TGF-β seviyeleri ise bazal membran reformasyonunu ve düz kas hücrelerini uyararak farklılaşmayı arttırır ve endotelyal hücre büyümesini inhibe eder (Neuzillet ve ark 2015).

Kolorektal kanserler, TGF-β'nin tümör baskılayıcı etkilerinden kaçabilmektedir. Ayrıca TGF-β tarafından indüklenen büyüme inhibisyonuna dirençlidir (Hoosein ve ark 1989). Kolorektal kanserlerin geç aşamalarında ise TGF-β bir tümör destekleyicisi olarak hareket etmektedir ve yüksek oranda eksprese edilmektedir. Ayrıca yüksek TGF-β seviyeleri daha yüksek nüks olasığı ve azalmış sağkalım ile ilişkilendirimiştir (Friedman ve ark 1995, Robson ve ark 1996).

TGF-β'nin büyüme engelleyici etkisinden, büyüme uyarıcı etkiye çevirdiği mekanizma tam olarak anlaşılmamasına ragmen, önceki çalışmalarda EGF, FGF gibi mitojenik büyüme faktörlerinin üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Ek olarak TGFβ, MAPK, PI3K-Akt gibi yolakları SMAD'den bağımsız olarak aktive edebilmektedir. Bu bağlamda TGF-β özellikle kolorektal kanserde, onkogenik yollar ile bağlantılı olarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu yönetebilmektedir (Roman ve ark 2001, Elliott ve Blobe 2005). Ayrıca tümörler,, R-SMAD proteinleri veya SMAD4'teki mutasyonlar sebebiyle de, TGF-β'nin büyümeyi inhibe edici etkisinden kaçabilmektedir (Itoh ve ark 2000).

1.5. Tarantula cubensis Alkolik Ekstraktı

Tarantula cubensis alkolik ekstraktı (TCAE), Tarantula cubensis örümceğinden elde edilir (Gültiken ve Vural 2007, Duz ve ark 2012). TCAE veteriner sahada homeopatik ürün olarak kangren, septisemi, toksemi gibi durumlarda tedavi amacıyla kullanılabilmektedir (Richardson-Boedler 2002). Tarantula cubensis zehirinin etki mekanizması tam olarak anlaşılmamasına rağmen, herhangi bir yangısal veya proliferatif lezyonun remisyonuna yardımcı olmak için vücudun savunma mekanizmalarını uyardığı düşünülmektedir (Day ve Saxton 1998).

TCAE, cilt, bağ dokusu ve sinir sisteminde iltihaplanmanın tedavisinde homeopatik bir ilaç olarak kullanılır. Ağrılı apse, inflamatuvar ülser ve şiddetli dermatitisi iyileştirmede çok etkili olmaktadır (Hamilton 1999). Bir peptid yapısına sahip olan bu madde, nekrotik yapıların iyileştirilmesini ve böylece epitelizasyonu

hızlandırarak yaraların iyileşmesini sağlar (Mezger 1977). TCAE kullanımının hem iyi huylu meme tümörlerinde hem de kötü huylu meme tümörlerinde gerileme ile sonuçlandığı bildirilmektedir (Gültiken ve Vural 2007). Sığır kutanöz papillomatozis, köpek oral papillomatozis ve köpek meme tümörleri gibi tümörlerin tedavisinde başarılı bir şekilde kullanıldığı belirtilmektedir (Cam ve ark 2007, Icen ve ark 2011). Sığırlarda ayak ve ağız hastalığı lezyonları ile sığırlarda mavi dil hastalığı lezyonlarını iyileştirmek için, ayrıca erken puerperal dönemde ineklerde endometritis ve vajinal akıntı gibi genital problemlerde kullanılmıştır (Koch ve Stein 1980, Enbergs ve Sensen 2007, Lotfollahzadeh ve ark 2007, Icen ve ark 2011). Ayrıca Er ve ark (2019) tarafından yapılan çalışmada, TCAE'nın AOM ile indüklenen deneysel kolon kanserinde polip ve ACF oluşumunu azalttığını bildirilmiştir.

1.6. Deneysel Kolon Kanserı Modelleri

Günümüzde deneysel kolon kanser çalışmalarında, hayvan modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. Genetik modeller ve kimyasal ajanlar olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır.

1.6.1. Kimyasal ajanlarla indüklenen modeller

Deneysel kolon kanser modellerinde, dimetilhidrazin (DMH) ve metaboliti azoksimetan (AOM) en sık kullanılan kimyasal maddelerdir. AOM ile indüklenen KRK, insanlarda meydana gelen KRK ile kıyaslandığında hastalığın seyri, klinik semptomları ve patolojik bulguları benzerlik göstermektedir (Takayama ve ark 2008, Rosenberg ve ark 2009).

DMH ve AOM kimyasal maddeleri, günümüzde KRK indüklemek için rodentlerde kullanılmaktadır. DMH'nin vucutta metabolize edilmesi sonucu azometana dönüşmektedir. Azometanda AOM dönüşmekte, CYP2E1 enzimi vasıtasıyla AOM metilazoksimetanole dönüşmektedir. Yapılan çalışmalarda oluşan son metabolit, dolaşım ile kolona geçmekte ve dışkıyla atılmadığı belirtilmektedir (Fiala 1977). AOM düşük dozlarda kullanıldığında kanser özelliği bağırsakta oluşmakta iken, yüksek dozlarda barsaklara ek olarak böbrek, karaciğer, prepisyumda ve yağ bezlerinde kansere neden olduğu bildirilmiştir. (Macejova ve Brtko 2001).

1.6.2. Genetik Modeller

Genetik modeller APC^{Min} Mice Model, IL-10 Knockout (KO) Mice Model, Chronic Colitis ve CAC in Cotton Top-Tamarin (CTT) oluşmaktadır (Çorum 2016).

APC tumor süpresor geni, intestinal homeostaz ve kolorektal kanserde anahtar rol oynayan, Wnt/β-katenin yolağının temel bileşinidir (Polakis 2000, Giles ve ark 2003). APC^{Min} fareler, homozigot oldukları zaman embriyonik dönemde ölmekte iken, heterozigotta oldukları zaman ise barsaklarda yaygın olarak adenoma bulunmaktadır (Kanneganti ve ark 2011).

IL-10 eksikliği olan farelerde, insanlardaki iltihaplı barsak hastalığı ile ilişkili kanserde olduğu gibi 6 aylık sürede, kolit ve kolorektal kanser geliştirmektedir. IL-10 (KO) farelerde kolit spontan olarak geliştmektedir (Rennick ve ark 1997, Kamada ve ark 2005). IL-10 eksik farelerde, düzenleyici T hücrelerinin gelişmemesi ve/veya işlevinin bozulması bağışıklık sisteminde düzensizlik oluşmaktadır (Madsen ve Jijon 2003). Bu farelerde ilk zamanlarda epitelyal hiperplazi, bağ dokuda yangısal infiltrasyon ve kriptlerde apse yapıları bulunmaktadır. İlerleyen zamanlarda displazik bez yapıları ve adenokarsinom gibi patolojik değişiklikler meydana gelmektedir (Kanneganti ve ark 2011, Johnson ve Fleet 2013).

Chronic Colitis ve CAC in Cotton Top-Tamarin (CTT) modeli, geçmiş zamanda kolit ve KRK çalışmalarında, sık kullanılmakta olan en iyi primat modellerinden biri olarak bilinmektedir. CTT modelinde spontan olarak kolit gelişmekte ve akabininde KRK yol açmaktadır. CTT modelinde displazi, kolitis ve adenokarsinom geliştiği bildirilmiştir (Kanneganti ve ark 2011).

1.7. Hipotez ve Amaç

Yapılan literatür taramasında, etki mekanizması tam olarak bilinmeyen ve veteriner sahada sıklıkla kullanılan, homeopatik bir ürün olan TCAE'nın sığır kutanöz papillomatozis (Cam ve ark 2007), köpek oral papillomatozis (Icen ve ark 2011) ve köpek meme tümörleri gibi tümörlerin tedavisinde başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir. Farklı çalışmalarda ise serbest oksijen radikallerini azalttığı (Dik ve ark 2014), invitro olarak kaspaz-3 yolağını indükleyerek apoptozu aktive edebileceği (Ghasemi-Dizgah ve ark 2017), bu bağlamda köpeklerde meme tümörleri

üzerinde olumlu etkisi olduğu da kaydedilmiştir (Gültiken ve Vural 2007, Gultiken ve ark 2015). Ayrıca köpeklerde meme adenokarsinomlarında Bcl-2 ve Ki-67 ekspresyonunu da azalttığı ifade edilmektedir (Karayannopoulou ve Lafioniatis 2016). Er ve ark (2019) tarafından yapılan çalışmada, ratlarda deneysel kolon kanserinde polip ve ACF oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. TCAE'nin sporadik veya deneysel olarak KRK gelişim yolakları üzerine etkinliğine dair herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Literatür bilgi dikkate alındığında, sağlıklı ratlarda AOM ile indüklenen kolon kanserinde, TCAE'nin, p53 ve APC mRNA ekspresyon düzeylerini arttırabileceği, K-Ras ve β-katenin mRNA ekspresyon düzeylerini ise düşürerek faydalı etkiler gösterebileceği hipoteze edildi.

Bu çalışmanın amacı ratlarda AOM ile indüklenen kolon kanserinde, eş zamanlı TCAE uygulamasının kanser gelişim yolakları üzerine etkilerini moleküler düzeyde belirlemektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Çalışmanın materyalini, 'Tarantula cubensis alkolik ekstraktı ve Nerium oleander distilatının deneysel kolon kanserinde etkinlikleri (Er ve ark 2019)" isimli çalışmadan alınan 18 adet sıçana ait bağırsak (kolon) parafin blokları oluşturdu. Çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulunca (SÜVDAMEK) onaylandı (2021/20).

2.2. Çalışma Dizaynı

Er ve ark (2019)'nın yaptıkları deneysel kolon kanseri çalışmasının dizaynı aşağıda bildirilmiştir.

Toplamda 28 (12-16 haftalık, 242±1.92 g) Wistar albino erkek rat rastgele olarak 3 gruba ayrılmıştır. Sağlıklı Kontrol grubu (SK) 8 adet rattan oluşurken, deneme grupları 10'ar rattan oluşmuştur. Deneme gruplarından Kanser Kontrol grubuna (KK grubu, n=10); kanser oluşturmak için azoksimetan deneyin başında bir hafta ara ile 2 kez 15 mg/kg (SC) dozunda uygulanmıştır (Refaat ve ark 2015). Tedavi grubu olan Kanser + TCAE (K-TCAE, n=10) grubuna azoksimetan deneyin başında bir hafta ara ile 2 kez 15 mg/kg (SC) dozunda uygulandı (Refaat ve ark 2015) ve TCAE deneyin başından itibaren haftada bir kez 0.2 mL/kg (SC) dozunda 18 hafta süresince uygulandı (Karabacak ve ark 2015). Deneme sonunda ratlar ketamin (95 mg/kg, SC) + ksilazin (5 mg/kg, SC) ile anesteziye alındıktan sonra servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi edildi. Nekropsi sonrası çıkartılan kolon dokuları %10'luk formaldehit solüsyonunda 1 gün süreyle tespit edildi. Sonra rutin doku takip prosedürü uygulanarak parafine gömüldü.'

Bu çalışmada ise yukarıda dizaynı anlatılan çalışmadan alınan bağırsak örneklerine ait parafin bloklar (her grupta 6'şar adet olmak üzere toplamda 18 adet sıçanın kolon dokusu) kullanıldı.

2.3. Histopatolojik Analiz

Mevcut parafin bloklarından 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) altında incelendi (Luna 1968). Histopatolojik incelemede hem

grupdaki ACF oluşturan kript sayıları, hem de gruplardaki ACF sınıflandırılması her preparattan rastgele şeçilen 10 farklı bölgeden Tablo 2.1'de verilen kriterlere göre yapıldı (Papanikolaou ve ark 2000) ve ortalamaları alındı.

Tablo 2.1. Kriptlerde displazi varlığı ve derecelendirilmesi ile ilgili skorlama.

Skor	Kriter
1 (Displazisiz hiperplazi)	Kriptteki hücre sayısında artış var ancak kriptler normal nükleer morfolojiye ve normal goblet hücre oluşuma sahip.
2 (Düşük-orta dereceli displazi)	Kriptlerde nükleer tabakalaşmayla birlikte koyu renkli uzamış çekirdekler (ince uzun iğ görünümlü) ve orta derece goblet hücresi farklılaşmasına sahip.
3 (Yüksek dereceli displazi)	Kript epitellerinde çekirdeklerde büyüme ve nükleer pleomorfizim ile kript morfolojisinin bozulması.

2.4. Real Time PCR Analizi

Her parafin bloktan alınan örneklere β-CATENİN, KRAS, APC ve P53 ekspresyonlarını belirlemek için Real Time PCR analizi yapıldı. Ekspresyon çalışmalarında, RNA molekülü PCR ile çoğaltılamadığından, RNA ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi kullanılarak cDNA (komplementer DNA)'ya çevrilerek, Real Time PCR ile çoğaltılan DNA miktarı aynı anda artış göseteren floresan problar kullanılarak eş zamanlı olarak DNA'nın belirlenmesi ve miktarının gösterilmesi tekniği sıklıkla kullanılır.

Histopatolojik inceleme ile tümörü en iyi temsil eden preparatların hazırlandığı parafin bloklar belirlendi ve moleküler incelemede bu bloklar kullanıldı. Bu işlem her bir vaka için tekrar edildi. Silinip, kurulanmış Leica RM2255 model mikrotom cihazı ile bloklardan her seferinde temiz mikrotom bıçağı kullanılarak 5 mikron kalınlığında 4-5 kesit alındı ve steril ependorf tüplerine konularak moleküler inceleme için kullanıldı.

2.4.1. Parafinden kurtarma

Formalin ile fikse edilmiş parafine gömülü dokulardan RNA eldesi Roche High Pure FFPE RNA Micro Kit (Roche, Almanya; Kat. No: 04823125001) kullanılarak üretici firmanın önerdiği ve aşağıda aşamaları verilen protokol doğrultusunda gerçekleştirildi.

Örneklerin bulunduğu tüplerin içine 1000 µl Ksilen koyuldu, vortekslendi, 56 °C'ye getirilen ısı bloğuna alındı, 5 dk bekletildi, tekrar vortekslendi ve 13.200 rpm'de 2 dk santrifüj edilip üst sıvı (ksilen) uzaklaştırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.

Bu tüplere 500 µl ksilen konup vortekslendi ve 56 °C'ye getirilen ısı bloğuna alındı. 5 dk bekletildi. Tekrar vortekslendi ve spin yapıldı. Üzerine 500 µl etanol konup vortekslendi ve 56 °C'ye getirilen ısı bloğuna alındı. 5 dk bekletildi. 13.200 rpm'de 2 dk santrifüj edilip üst sıvı (ksilen ve etanol) uzaklaştırıldı.

Bu tüplerin kapağı açılıp 1000 µl etanol konulup vortekslendi ve 13.200 rpm'de 2 dk santrifüj edilip üst sıvı (etanol) uzaklaştırıldı. Bu işlem 2 kez yapıldı.

Bu tüpler spin yapılarak tüplerin dibindeki sıvı 200 µl pipetle doku kaybolmadan dikkatlice alındı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.

2.4.2. Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Roche marka High Pure FFPET RNA Isolation Kit kullanılarak aşağıdaki gibi yapıldı.

Üzerine her bir örnek için 100 µl RNA Tissue Lysis Buffer, 16 µl %10 SDS, 40 µl Proteinaz K olmak üzere toplam 156 µl eklendi.

Karışım vortekslendi ve spin yapıldı. 600 rpm'de çalkalanarak 85 °C sıcaklıkta 30 dk bekletildi.

Süre sonunda tüp spin yapıldı ve 55 °C sıcaklığa düşmesi beklendi. (Örnekler 10 dk oda sıcaklığında 55 °C'ye gelmektedir.)

80 µl Proteinaz K eklendi.

Karışım vortekslendi ve spin yapıldı. 600 rpm'de çalkalanarak 55 °C sıcaklıkta 30 dk bekletildi. Bu aşama sonunda lysate net şekilde görüldü, partikül var ise süre 10 dk daha uzatıldı.

Her bir örnek için 325 µl RNA Binding Buffer, 325 µl absolut ethanol olmak üzere toplam 650 µl eklendi.

Karışım vortekslendi ve Hıgh Pure Filtreli tüplere alındı, altına da High Pure Collection Tüp koyuldu. Ardından 6000 g'de 30 sn santrifüj edildi.

Collection Tüp değiştirildi. Filtrenin kuruması için 16000 g'de 2 dk santrifüj edildi.

100 µl DNase working solution eklendi. Oda sıcaklığında 15 dk bekletildi (100 µl DNase working solution 90 µl DNase Incubation Buffer, 10 µl DNase I olmak üzere toplam 100 µl şeklinde hazırlandı.)

500 µl Wash Buffer 1 eklendi. 6000 g'de 30 sn santrifüj edildi. Collection tüp değiştirildi.

500 µl Wash Buffer 2 eklendi. 6000 g'de 30 sn santrifüj edildi. Collection tüp boşaltıldı.

500 µl Wash Buffer 2 eklendi. 6000 g'de 30 sn santrifüj edildi. Collection tüp değiştirildi.

Filtrenin kuruması için 16000 g'de 2 dk santrifüj edildi. Ardından High Pure Filtreli tüpün altına temiz bir ependorf tüp koyuldu.

25-50 µl arası (35 µl kullanıldı) Elution Buffer eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk bekletildi.

6000 g'de 1 dk santrifüj edierek total RNA eldesi tamamlandı. Elde edilen total RNA'lar -20 °C'de saklandı.

2.4.3. cDNA sentez aşaması

RNA örneklerinden cDNA sentezi, High Fidelity Transcriptor cDNA sentez kiti (Roche Almanya; Kat. No: 0508995001) kullanılarak üretici firmanın önerdiği ve

aşağıda özetlenen protokol doğrultusunda gerçekleştirildi. Master karışım çalışılan örnek sayısına göre hesaplanarak Tablo 2.2'de verildiği gibi hazırlandı. Elde edilen cDNA'lar kantitatif gerçek zamanlı PCR yapılana kadar -20 C'de saklandı.

Tablo 2.2. Master karışım hazırlama prosedürü.

Master Karışım*	**1X**
Transcriptase Reaction Buffer	4 µL
Protector RNase Inhibitor	0.5 µL
dNTP	2 µL
DTT	1 µL
Reverse Transcriptase	1.1 µL
TOPLAM HACİM	**8.6 µL**

2.4.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (Real-Time PCR);

Kantitatif gerçek zamanlı PCR, Roche Light Cycler 2.0 cihazında TaqMan prob yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla Roche Light Cycler TaqMan Master (Roche, Almanya; Kat No: 04735536001) kullanıldı. Amplifikasyon işleminde aşağıda dizilimleri verilen GAPDH, P53, KRAS, APC, β-CATENİN primerleri kullanıldı.

P53

Forward 5'-CCCAACGAAATTACTGCCTTTC-3'

Reverse 5'-TAGTGGCCTTGGTGCATTAG-3'

KRAS

Forward 5'-GGACTCTGAAGATGTGCCTATG-3'

Reverse 5'-CCCATAACTCCTTGCTAACTCC-3'

APC

Forward 5'-CACCATGTGGATCAGCCTATT-3'

Reverse 5'-CCCTGTACTGATGGAGTCTTTG-3'

β-CATENİN

Forward 5'-CAAGCCACAGGACTACAAGAA-3'

Reverse 5'-CAATGTCCAGTCCGAGATCAG-3'

GAPDH

Forward 5'-GGGCCAAAAGGGTCATCATC-3'

Reverse 5'-AACCTGGTCCTCAGTGTAGC-3'

Araştırılacak her bölge için reaksiyon karışımı için Roche Taqman Master Miks kullanılarak aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Reaksiyon karışımı hazırlama prosedürü.

REAKSİYON KARIŞIMI	**1X**
Master mix	4 µL
Primer F	2 µL
Primer R	2 µL
Prob	2 µL
dH2O	5 µL
TOPLAM HACİM	**15 µL**

Araştırılacak her bir gen için ayrı ayrı reaksiyon karışımı hazırlandı. Her bir örnek için kapillere 15 µl reaksiyon karışımı ve 5 µl cDNA örneği ilave edildi. Reaksiyon koşulları aşağıdaki Tablo 2.4'de verildiği şekilde oluşturuldu.

Tablo 2.4. Kantitatif gerçek zamanlı PCR reaksiyon koşulları**.**

	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Pre-İnkübasyon	95 °C	10 dk	1
Amplifikasyon			
Denatürasyon	95 °C	10 sn	50
"Annealing"	54 °C	30 sn	
Uzama/Sentez	72 °C	3 sn	
Soğutma	40 °C	30 sn	1

Real Time PCR ile kantitasyon yapılmasına yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan sıklıkla kullanılanı göreceli kantitasyon yöntemidir. Yöntem kabaca, belirli şartlar altında ekspresyonu değişmeyen, her doku ya da hücrede bazal düzeyde ve hücreler arası varyasyon göstermeden eksprese edilen bir "house keeping" gen ekspresyonunun hedef gen ekspresyonu ile kıyaslanmasına dayanır. Bu yönteme Delta delta Ct adı verilmektedir. Bu yöntem, hedef DNA molekülü ve standart olarak kullanılan DNA molekülünün aynı verimlilik ile amplifiye olduğunu kabul ederek aşağıdaki formülasyona dayalı kantitasyon yapar. Formülde geçen oran; hedef gen ekspresyonunun kontrole oranı, E; verimlilik, Δ Cp

ise Ct değerleri farkını ifade etmektedir. Hedef gen ve kontrol geninin PZR verimlilikleri birbirine ve 2'ye eşit kabul edildiğinde yeni formülasyon aşağıdaki gibi olacaktır. Daha açık biçimde ifade etmek gerekirse,

CtA: Kontrole ait house keeping gen Ct değeri,

CtB: Hastaya ait house keeping gen Ct değeri,

CtC: Kontrole ait hedef miRNA Ct değeri,

CtD: Hastaya ait hedef miRNA Ct değeri olmak üzere

ΔCt Hasta = CtD – CtB,

ΔCt Kontrol = CtC - CtA,

ΔΔCt = ΔCt Hasta - ΔCt Kontrol = (CtD-CtB) – (CtC-CtA)'dir.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ise kontrole göre kat olarak ekspresyon değişimini ifade etmektedir (Pfaffl 2001, Pfaffl ve Hageleit 2001).

Çalışmada araştırılan genlerin ekspresyon seviyeleri için ΔΔCt (Delta delta Ct) yöntemi ile analiz yapılmıştır. Çalışmada araştırılan her primer için elde edilen Ct değerinin, aynı dokuda GAPDH (housekeeping) için elde edilen Ct değerine oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

2.5. İstatistiksel Analiz

Araştırmada her gruptan ACF skorlaması ve Real Time PCR analizi için 6 hayvan dikkate alınarak değerlendirme yapıldı. Elde edilen veriler SPSS 25.0 istatistik programı ile analiz edildi. ACF skorlamasında ve kript sayılarında t testi, Real Time PCR analizinden elde edilen veriler ise ANOVA ve posthoc Duncan testi ile değerlendirildi. $P < 0.05$ istatiksel olarak önem sınırı kabul edildi.

3. BULGULAR

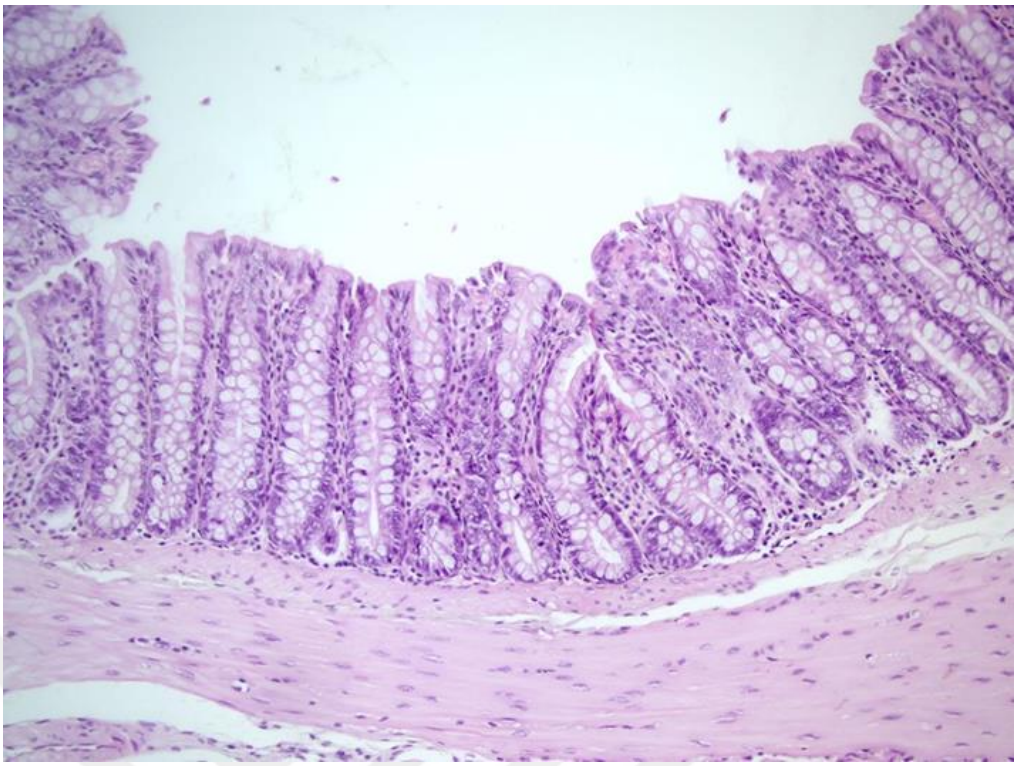
3.1. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik incelemede her gruptan altışar hayvan değerlendirildi. Her olguya ait preparatlardan rastgele seçilen 10 farklı bölgeden ACF oluşturan kriptler sayılarak ortalaması değerlendirildi. Sağlıklı kontrol grubunda normal bağırsak dokusu izlenirken (Şekil 3.1), AOM uygulanan gruplarda (KK ve K-TCAE) ACF mevcudiyetine rastlanıldı (Şekil 3.2-10). K-TCAE grubundaki ACF oluşturan kript sayılarının, KK grubuna göre önemli ölçüde azaldığı (%21.6) saptandı ($P < 0.05$). ACF sınıflandırılmasında kriptlerde displazi varlığı ve derecelendirilmesi ile ilgili olarak, her preparattan rastgele şeçilen 10 alandaki kriptler skorlanarak ortalaması alındı. K-TCAE grubundaki, displazi varlığı (Şekil 3.8-10) ve derecelendirilme skorları, KK grubuna kıyasla (Şekil 3.2-7) anlamlı olarak azaldığı (%23) belirlendi (Tablo 3.1, $P < 0,01$).

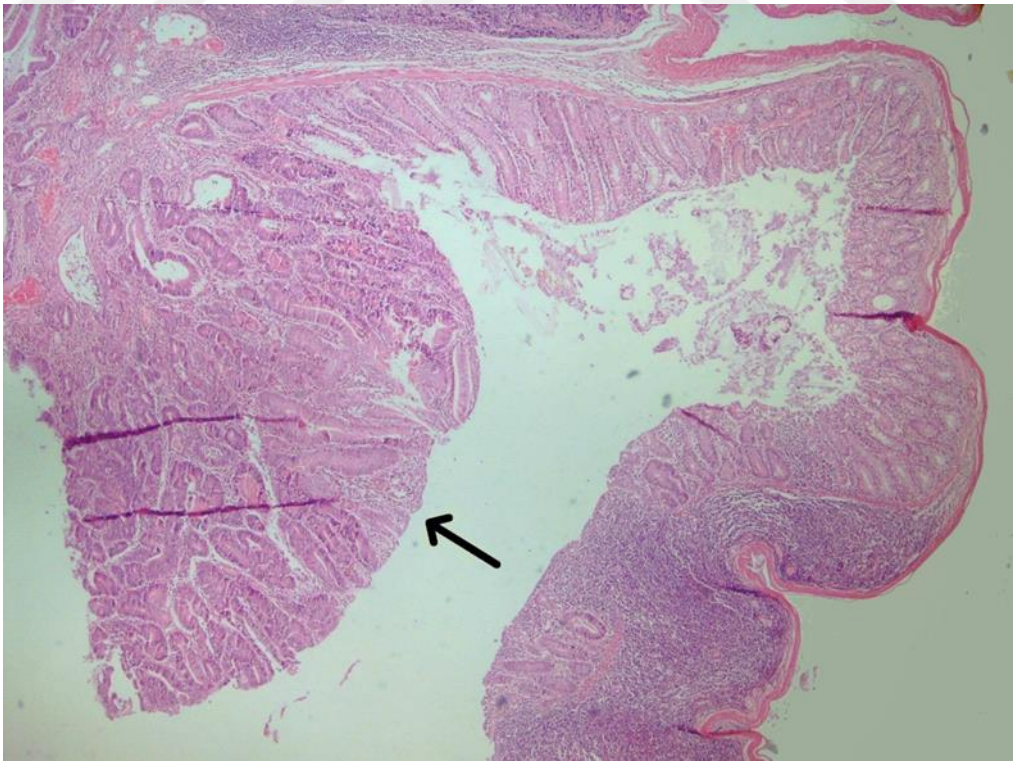
Tablo 3.1. Azoksimetan uygulanan gruplardaki ACF sınıflandırılması (ACF oluşturan kriptlerin displazi skorları) ve kript sayıları.

	KK (Mean ±SE)	K-TCAE (Mean ±SE)	*P* değeri
ACF oluşturan kript sayısı	81,83±4,57[a]	64,16±3,52[b]	*p<0,05*
ACF oluşturan kriptlerin displazi skorları	2,15±0,08[a]	1,65±0,12[b]	*p<0,01*

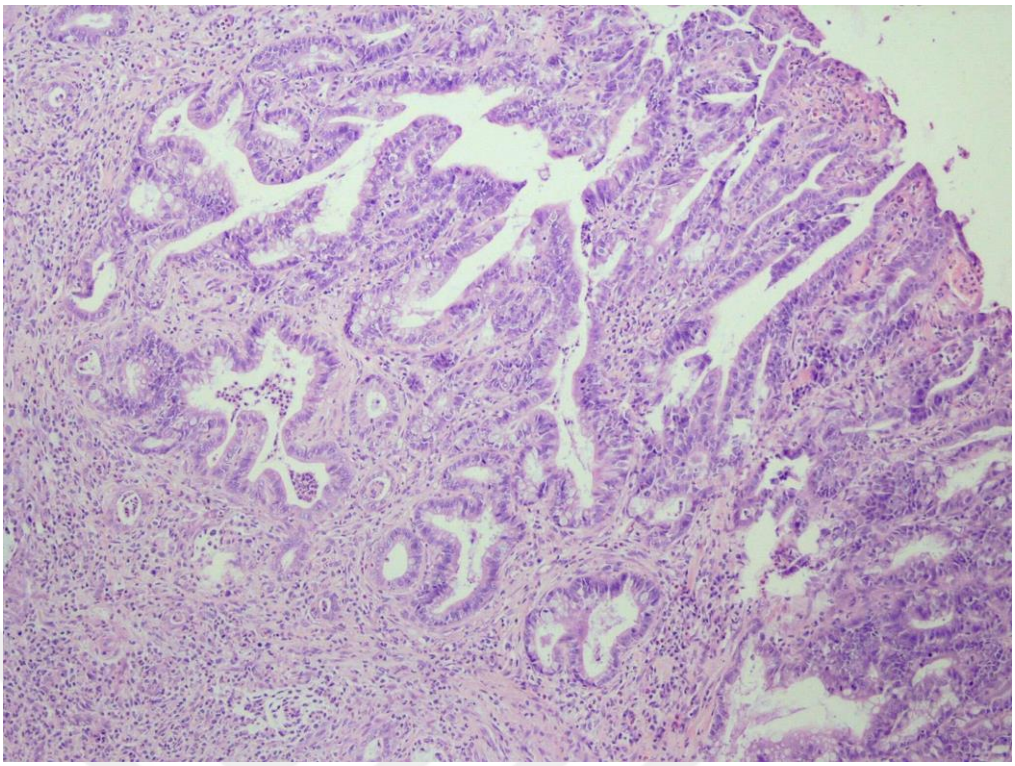
[a, b] : Aynı satırdaki değerler arasındaki istatistiksel önemi belirtir.



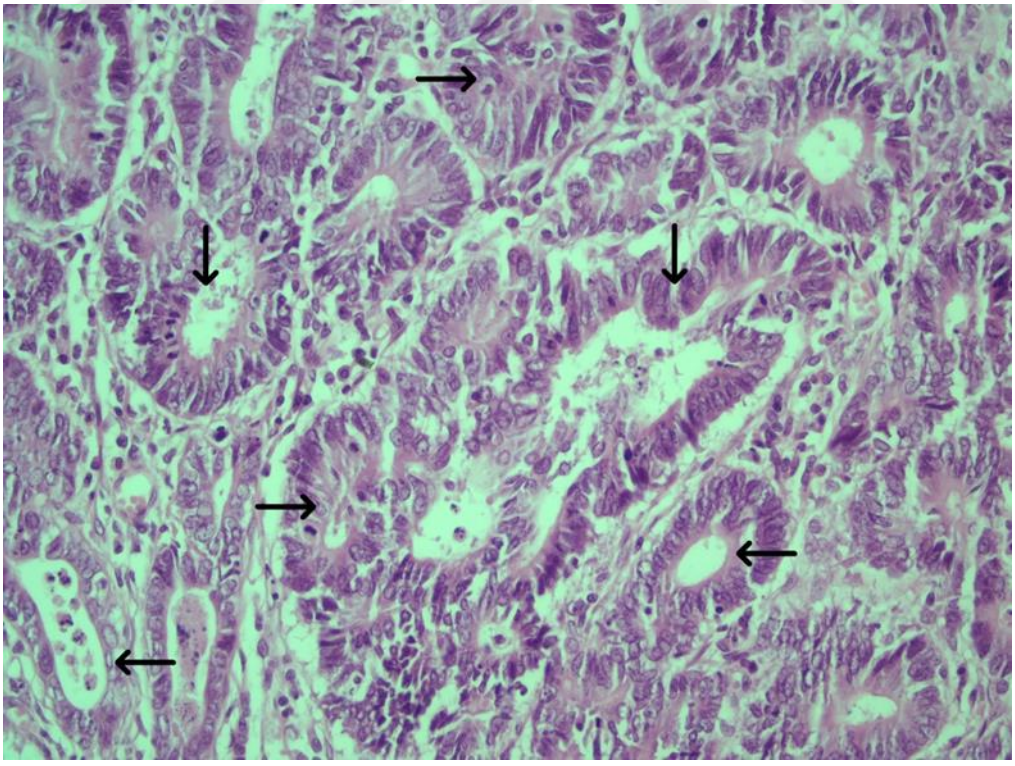
Şekil 3.1. Normal bağısak kesiti, SK grubu, x200, HxE.



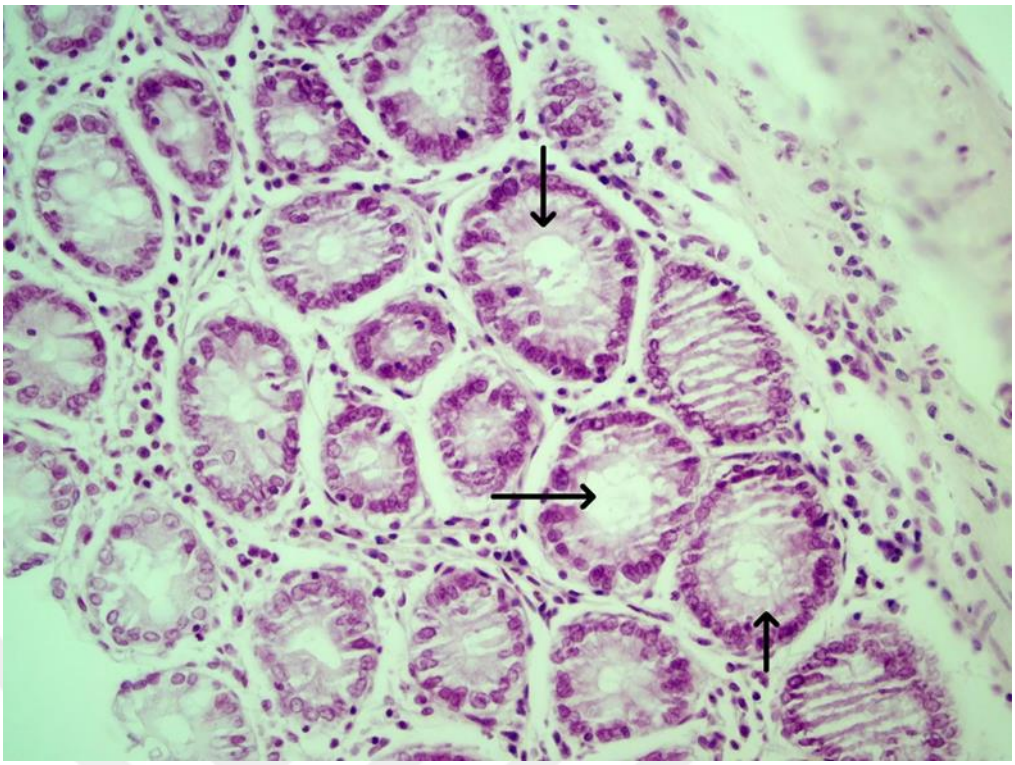
Şekil 3.2. Adenokarsinom şekillenmiş kolon kesiti (ok), KK grubu, x40, HxE.



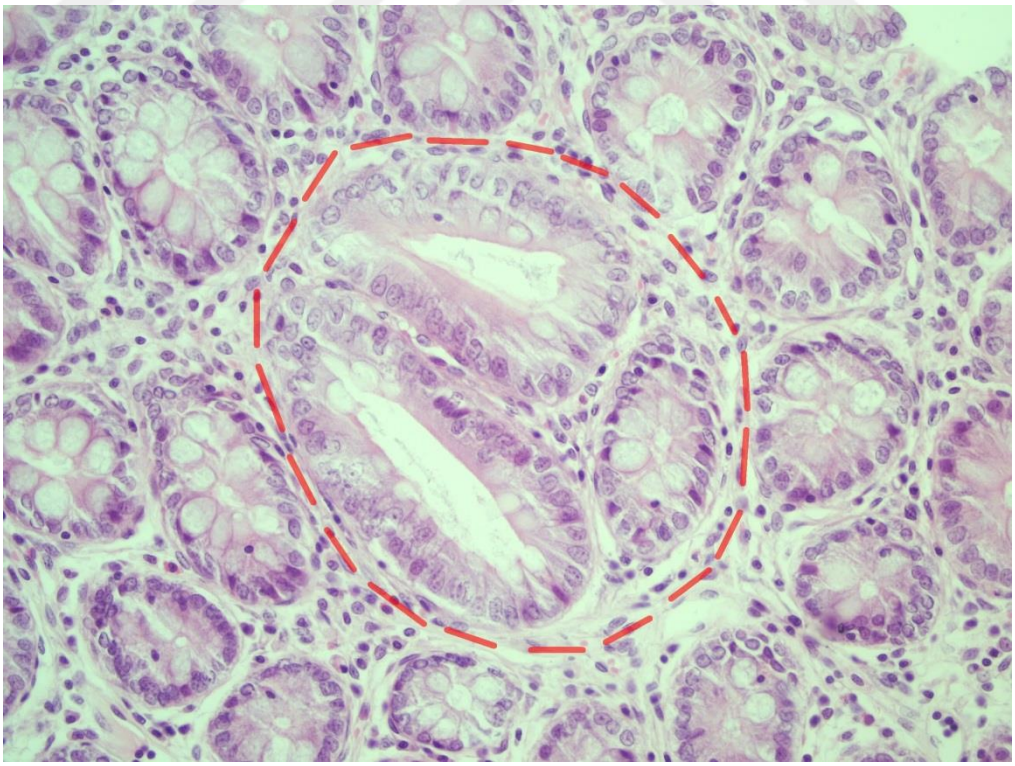
Şekil 3.3. Adenokarsinoma dönüşmüş displazik kriptler, KK grubu, x100, HxE.



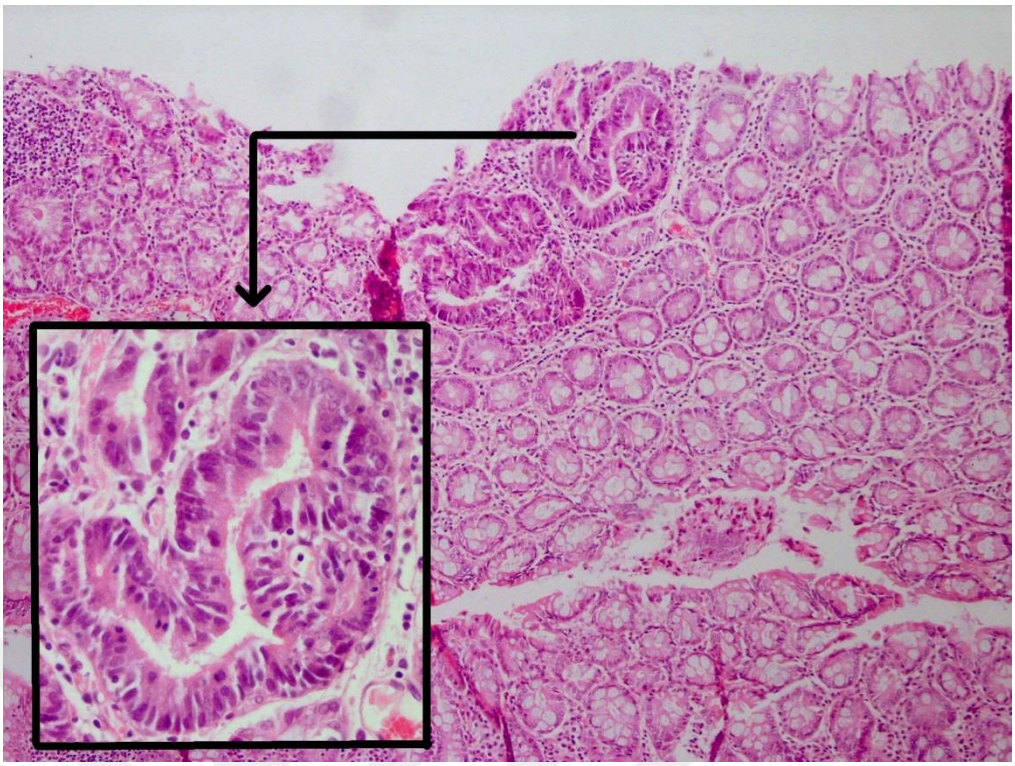
Şekil 3.4. Atipik hücre özellikleri belirgin displazik kriptler (oklar), KK grubu, x400, HxE.



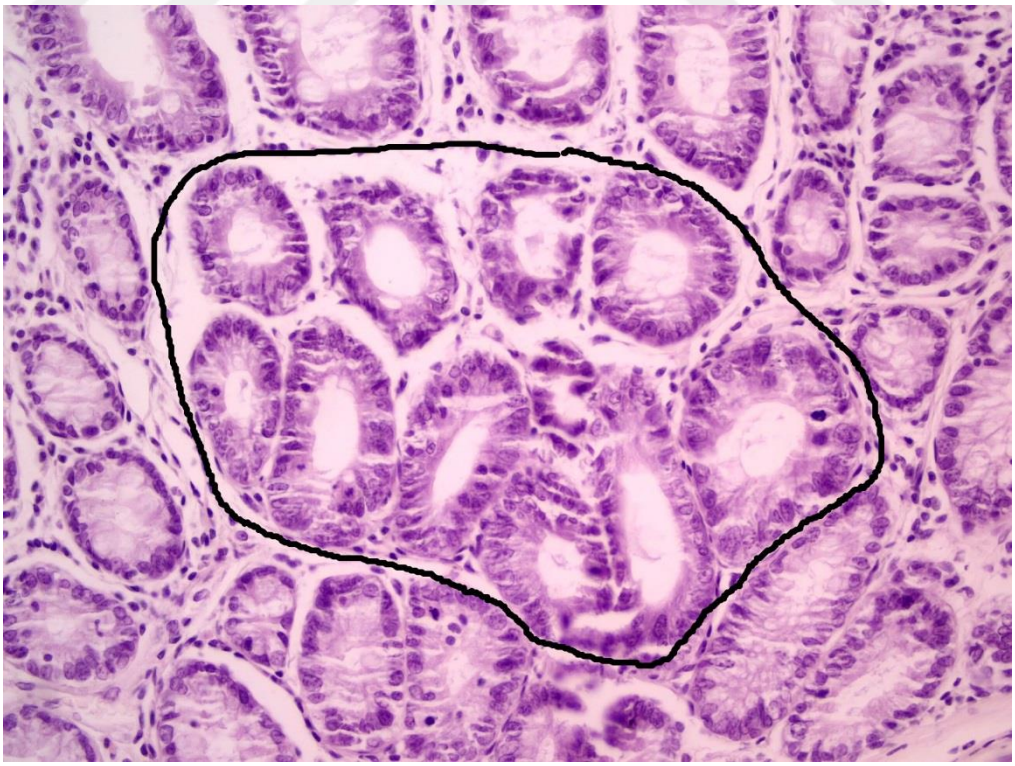
Şekil 3.5. Kriptlerde displazisiz hiperplazi (oklar), KK grubu, x400, HxE.



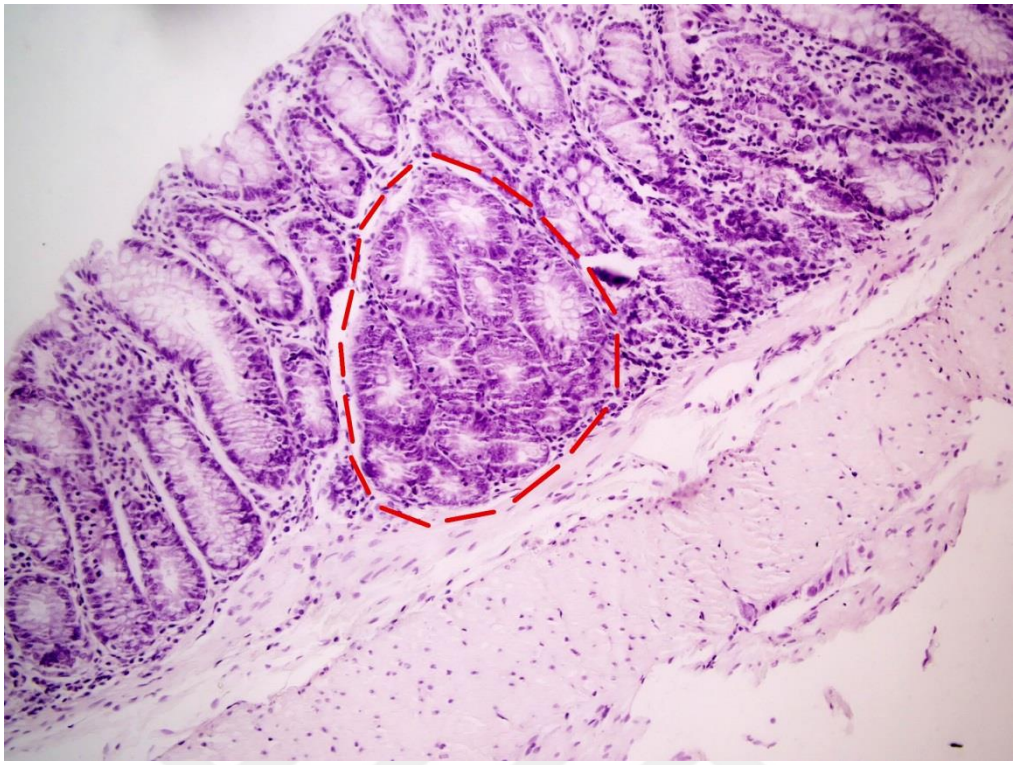
Şekil 3.6. Kriptlerde düşük-orta dereceli displazi içeren ACF (kırmızı çizgiler), KK grubu, x400, HxE.



Şekil 3.7. Yüksek dereceli displaziye sahip kriptlerin oluşturduğu ACF, KK grubu, x100, HxE. Küçük resim displazik kriptin (skor 3) yakından görünümü, x400, HxE.



Şekil 3.8. Hafiften orta şiddetliye kadar değişen displaziye (skor 2) sahip kriptlerin oluşturduğu ACF, K-TCAE grubu, x200, HxE.



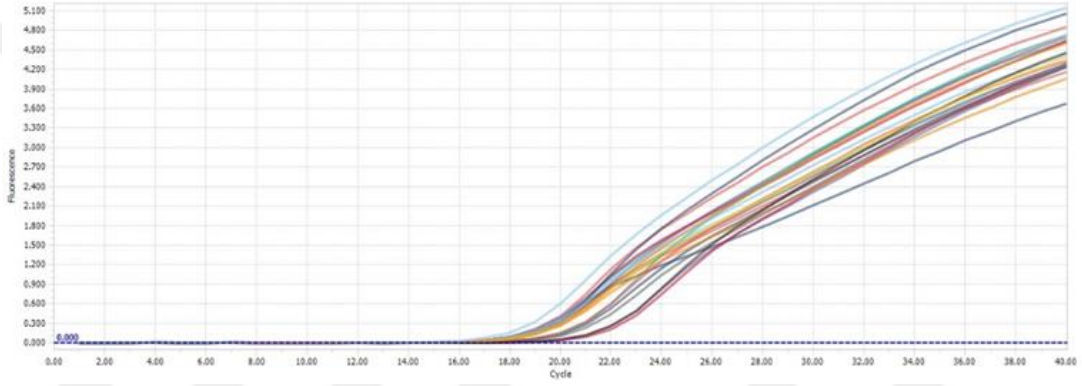
Şekil 3.9. Düşük-orta (skor2) ve yüksek dereceli (skor 3) displaziye sahip kriptlerin oluşturduğu ACF (kırmızı çizgiler), K-TCAE grubu, x200, HxE.



Şekil 3.10. Yüksek dereceli displaziye sahip (skor 3) kriptlerin oluşturduğu ACF, K-TCAE grubu, x200, HxE.

3.2. Real Time PCR Bulgular

Çalışmada araştırılan genlerin ekspresyon seviyeleri için ΔΔCt (Delta delta Ct) yöntemi ile analiz yapıldı. Çalışmada araştırılan her primer için elde edilen Ct değerinin, aynı dokuda GAPDH (housekeeping) için elde edilen Ct değerine (Şekil 3.11) oranlanmasıyla hesaplandı. GAPDH (housekeeping) elde edilen Crossing point değerleri sırasıyla Sağlıklı kontrol, Kanser Kontrol, Kanser+TCAE olmak üzere 21,85; 22,25; ve 21,8 olarak bulundu. Grupların Cp değerleri Şekil 3.12-15 arasında verilirken, grupların melting curve değeri Şekil 3.16'da ve analizi yapılan yolakların gruplara göre dağılımı da Şekil 3.17'de verildi.

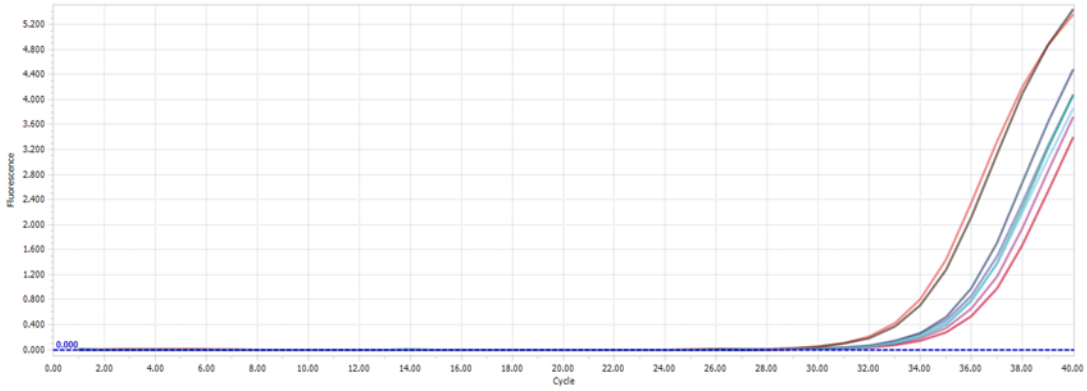


Sekil 3.11. GADPH primerinin Amplifikasyon eğrisi.

3.2.1. P53 mRNA ekspresyon değerleri

P53 mRNA ekpresyonu değerlendirildiğinde, AOM uygulanan kanser kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla azaldığı tespit edilirken, TCAE uygulanan K-TCAE grubunda ekpresyon değerinin, istatistiksel olarak önemsiz olmakla birlikte sağlıklı kontrol grubuna yakın olduğu görüldü ($P > 0,05$).

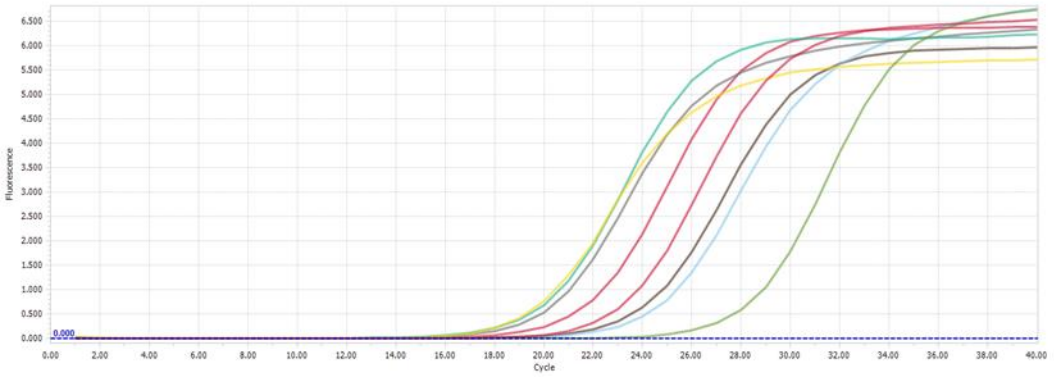
Crossing point değerleri sırasıyla 30,76±1,18; 34,30±3,33; 32,07±0,94 ($P < 0,05$) olarak belirlenirken, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 3835,57±2005,67; 2139,00±2547,92; 3499,33±1193,83 (10^{-8}) olarak belirlendi ($P > 0,05$, Şekil 3.12, Tablo 3.2).



Şekil 3.12. P53 geninin Amplifikasyon eğrisi.

3.2.2. KRAS mRNA ekspresyon değerleri

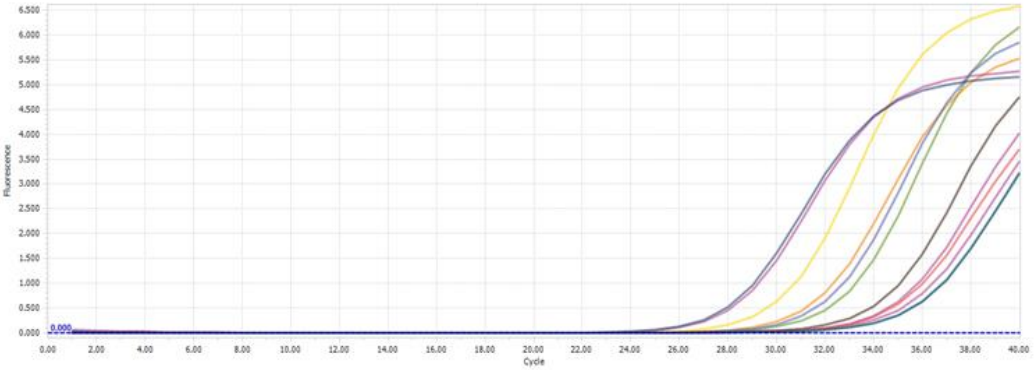
KRAS mRNA ekspresyonu değerlendirildiğinde, AOM uygulanan KK grubunda, SK kontrol grubuna kıyasla ekspresyon düzeyinin arttığı belirlenirken, K-TCAE grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu belirlendi (P < 0,01). Cp değerleri gruplar arasında sırasıyla 26,21±1,79; 25,41±1,41; 27,40±1,68 *(*P < 0,05) olarak tespit edildi. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri sırasıyla 766,29±826,10; 1213,00±290,63; 255,71±230,16 (10^{-5}) olarak saptandı (P < 0,01, Şekil 3.13, Tablo 3.2).



Şekil 3.13. KRAS geninin Amplifikasyon eğrisi.

3.2.3. APC mRNA ekspresyon değerleri

APC mRNA ekspresyonu değerlendirildiğinde KK grubunun değerlerinin SK grubuna kıyasla oldukça düşük olduğu belirlendi (*P<0,001*). K-TCAE grubunda ekspresyon düzeyi KK grubuna göre belirgin şekilde yükselerek SK grubuna yaklaştığı tespit edildi. Cp değerleri sırasıyla 27,79±0,48; 35,49±2,15; 29,78±2,60 (*P* < 0,001) olarak belirlendi. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri ise 227,29±69,77; 2,71±3,72; 98,71±82,91 (10^{-5}) olarak saptandı (*P* < 0,001, Şekil 3.14, Tablo 3.2).

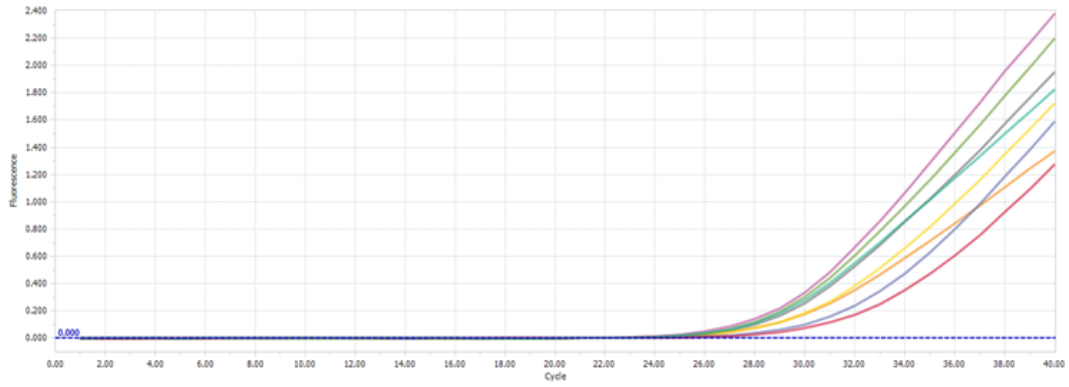


Şekil 3.14. APC geninin Amplifikasyon eğrisi.

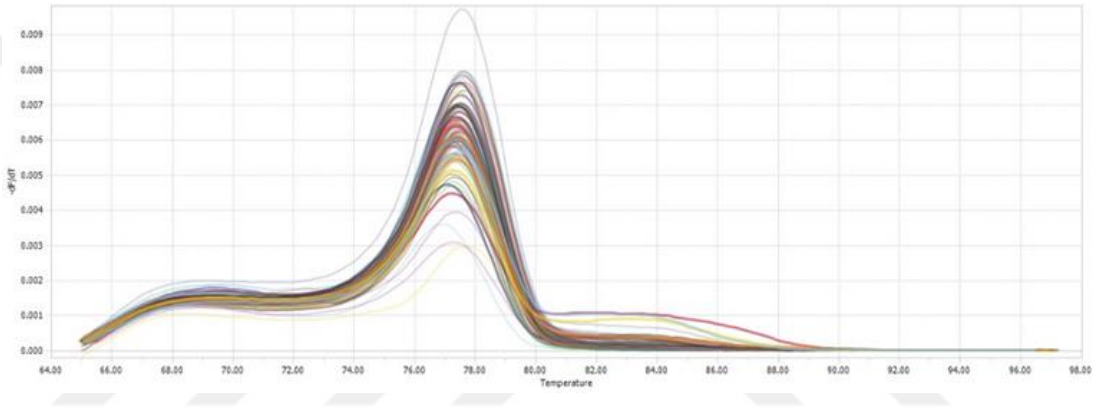
3.2.4. β-KATENİN mRNA ekspresyon değerleri

β-katenin ekspresyon değerlendirilmesinde, KK grubunda ekspresyon düzeyi, SK ve K-TCAE grubuna kıyasla yüksek olduğu görüldü (*P* < 0,005). K-TCAE grubunda ekspresyon düzeyinin istatistiksel fark olmasa da SK grubuna kıyasla daha düşük olduğu tespit edildi.

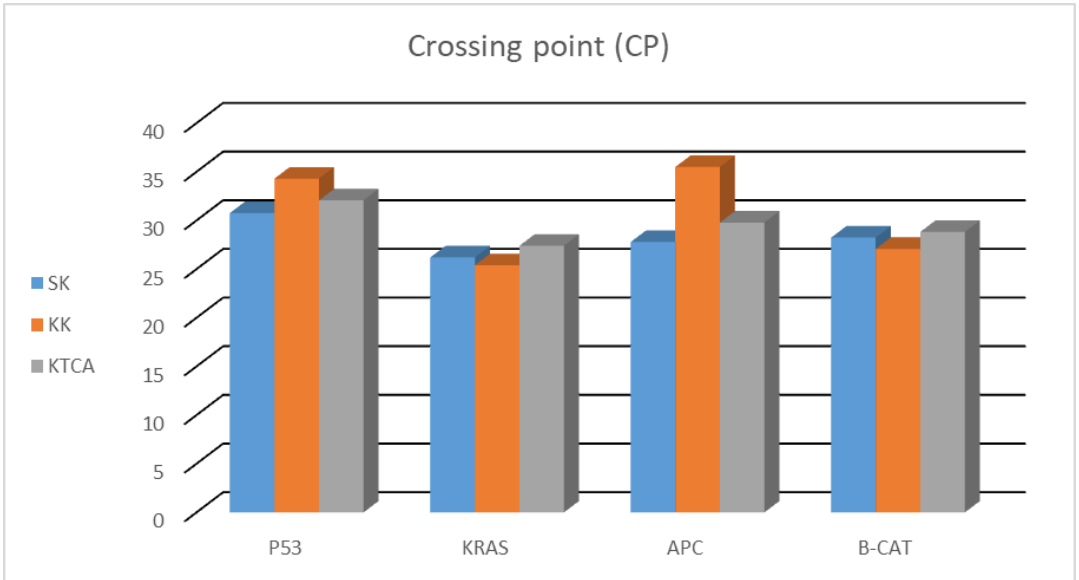
Cp değerleri sırasıyla 28,24±0,23; 27,08±0,78; 28,82±1.75 olarak belirlendi (*P*< 0,05). $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri sırasıyla 111535,71±60488,06; 359514,14±244362,05; 65733,29±55736,64 (10^{-8}) olarak bulundu (*P* < 0,005, Tablo 3.2, Şekil 3.15).



Şekil 3.15. β-CATENİN geninin Amplifikasyon eğrisi.



Şekil 3.16. Grupların erime noktası (Melting curve) analizi**.**



Şekil 3.17. P53, KRAS, APC ve β-CATENİN genlerinin gruplar arası Cp Seviyeleri.

Tablo 3.2. Deneysel kolon kanserinde, TCAE'nun tümör gelişim yolakları üzerine etkisi (mean ± SD).

		SK	KK	K-TCAE
P53	CP*	30,76 ± 1,18^{b}	34,30 ± 3,33^{a}	32,07 ± 0,94^{ab}
	$2^{-\Delta\Delta CT}$ (x10^{-8})	3835,57 ± 2005,67^{a}	2139,00 ± 2547,92^{a}	3499,33 ± 1193,83^{a}
KRAS	CP*	26,21 ± 1,79^{ab}	25,41 ± 1,41^{b}	27,40 ± 1,68^{a}
	$2^{-\Delta\Delta CT}$ (x10^{-5})**	766,29 ± 826,10^{ab}	1213,00 ± 290,63^{a}	255,71 ± 230,16^{b}
APC	CP****	27,79 ± 0,48^{b}	35,49 ± 2,15^{a}	29,78 ± 2,60^{b}
	$2^{-\Delta\Delta CT}$ (x10^{-5})****	227,29 ± 69,77^{a}	2,71 ± 3,72^{c}	98,71 ± 82,91^{b}
β-CATENİN	CP*	28,24 ± 0,23^{ab}	27,08 ± 0,78^{b}	28,82 ± 1,75^{a}
	$2^{-\Delta\Delta CT}$ (x10^{-8})***	111535,71 ± 60488,06^{b}	359514,14 ± 244362,05^{a}	65733,29 ± 55736,64^{b}

*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,005, ****: p<0,001. $^{a, b, c}$: aynı satırdaki değerler arasındaki istatistiksel önemi belirtir.

4. TARTIŞMA

Kolorektal kanser, gelişmiş birçok ülkede mortalitesi ve morbiditesinden dolayı büyük sorun oluşturmaktadır (Parker ve ark 1997). Kolorektal kanser küresel ölçekte, yaygın olarak kanserler arasında üçüncü sırada ölüme sebebiyet vermesinin yanı sıra her sene 1 milyondan fazla yeni KRK teşhisi konulması ve son 10 yılda artan prevelansından dolayı göz ardı edilmemelidir (Cunningham 2010, Chen ve ark 2016, Yang ve ark 2017). KRK etiyolojisinde %75-80 oranında çevresel faktörler rol oynarken, %20-25 oranında genetik faktörler rol oynamaktadır (Bruce ve ark 1993, Terzić ve ark 2010). KRK'de diyet önemli bir faktör oluşturmaktadır. Diyet düzenlemesi ile KRK'nin, %80 civarlarında önlenebileceği bildirilmiştir (Suzui ve ark 2013). KRK, küresel ölçekte başlıca ölüm nedenleri arasında olmasından dolayı, mevcut kemoterapi seçeneklerinden farklı yollar bulunması amacıyla çalışmalar halen devam etmektedir (Al-Henhena ve ark 2015). Yapılan literatür taramasında TCAE'nin, in vivo olarak AOM ile indüklenen KRK'de ACF ve bazı yangı mediatörleri üzerine etkileri değerlendirilmesine rağmen (Er ve ark 2019), KRK tümör gelişim yolakları üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Günümüzde sistemik olarak herhangi bir yan etkisi bulunmayan ve toksisiteye sebebiyet vermeyen, tümör büyümesi ve gelişimini inhibe edebilen kemopreventif bir takım ajanların geliştirilmesi önemli bir araştırma konusudur. AOM tarafından indüklenen kolon kanseri modeli, birçok ilacın kemopreventif etkisini değerlendirmek ve KRK'de mekanizmalarını aydınlatmak için güvenli olarak kullanılan bir modeldir (Hu ve ark 2009, Chiou ve ark 2010, Ferraz da Costa ve ark 2020). AOM tarafından indüklenen KRK modeli, insan KRK'leri ile karşılaştırıldığında klinik, patolojik ve moleküler düzeyde benzerlikler gözlenmektedir (Rogers ve Pegg 1977, Shivapurkar ve ark 1995, Reddy 2004). Bu çalışmada da insanlardaki KRK'leri modellemek için AOM kullanılmıştır. Roncucci ve ark (1991), karsinojenler ile indüklenen deneysel KRK modellerinde oluşan ACF'nin insanlarda gelişen KRK'ler ile aynı özellikler gösterebileceğini bildirmiştir. Ek olarak Metilen mavisi ile boyanma sonucu kolonun mukozal yüzeyindeki görülen ACF kriptlerinde yarık benzeri lümen varlığının, histolojik olarak displazinin varlığı ile korrele olduğunu, bu yapıların mikroadenomu tanımladığını bildirmiştir. Bu

çalışmanın dokularının alındığı çalışmada (Er ve ark 2019) Metilen mavisi ile ACF'ler belirlenerek skorlanmış, ancak histopatolojik incelemelerde ACF oluşturan kript sayısı ve kriplerdeki displazi dereceleri belirlenmemiştir. Bu çalışmada ise Hematoksilen-Eozin boyalı preparatlarda ACF yapıları incelenmiş ACF oluşturan kript sayısı ve kriplerdeki displazi dereceleri skorlanmıştır. Elde edilen bulgular, Er ve ark (2019)'nın bulgularına benzer şekilde TCAE uygulamasının kriplerdeki lezyon sayı ve skorlarını azalttığı görülmüştür. İnsanlarda ACF'lerde displazinin varlığı ve şiddetinin araştırıldığı bir çalışmada (Siu ve ark 1997), 28 hastalıklı bireyden alınan örneklerden oluşturulan 50 adet histopatolojik preparattan, 3 adetinde şiddetli displazi, 4 adetinde orta dereceli displazi, 20 adetinde hafif displazi ve 23 adetinde ise displazi varlığına rastlanılmadığı bildirilmiştir. Literatür bilgiler ışığında ACF, her ne kadar deneysel KRK modellerinde erken dönemde saptanan bir anormalik olarak ortaya konulsa da mikroadenom ya da adenom öncesi yapılarak olarak insanlarda da tanımlandığı, bunları oluşturan kriptlerdeki yapısal değişiklikler ve ilerleyen zamanlarda daha fazla genetik ve epigenetik değişiklikler ile karsinom yapısına ilerleyebileceği değerlendirilmektedir. KRK'li ve adenomlu bireylerde, ACF sayıları boyutu ve histolojik olarak ilerlemesinde kayda değer arttış olduğu bildirilmektedir (Stevens ve ark 2007). ACF yapısı sporadik kolon kanseri ve ailesel adenomatöz polipozis bulunan bireylerde daha sıklıkla bulunmaktadır (Takayama ve ark 2001). Yapılan çalışmalarda ACF'de KRAS mutasyonları sıklıkla meydana gelirken, APC mutasyonları ve microsatellite instability ise nadir olarak meydana geldiği bildirilmektedir (Losi ve ark 1996, Otori ve ark 1998, Greenspan ve ark 2007). Jen ve ark (1994) tarafından yapılan çalışmada 20 ACF'nin sadece 1 tanesinde APC mutasyonu ve displazik yapı görüldüğü bildirilmiştir. AOM uygulaması ile oluşturulan modelde insanlardaki KRK'den farklı olarak bölgesel lenf düğümleri ve karaciğere metastaz yapmadığı belirtilmektedir (Ahnen 1985). Ancak, Uyar ve ark (2021), daha fazla sıklıkta AOM uygulayarak deneysel KRK modelinde karaciğerde metastaz odakları oluştuğunu bildirmiştir. AOM uygulaması sonrasında CYP2E1 enzimi vasıtasıyla metilazoksimetanole metabolize olmakta ve bu da KRK'nin gelişimini indükleyen önemli sinyal yolaklarında bir dizi DNA mutasyonlarına sebebiyet vermektedir (Chen ve Huang 2009). Ayrıca AOM insan ve hayvanlarda preneoplastik kolon lezyonları olarak tanımlanan ACF'yi de indüklemektedir (Takahashi ve Wakabayashi 2004). AOM uygulamasının ardından

kolon epitel hücrelerinde, küçük lezyon olarak bilinen ACF, adenomadan, adenokarsinoma kadar gelişebilen patolojik değişikliğe uğrayabilmektedir (O'Toole ve ark 1993, Takahashi ve Wakabayashi 2004). Bu bağlamda çalışmamızda, AOM ile indüklenen deneysel KRK'de homeopatik bir ilaç olan TCAE'nin tümör gelişim yolakları üzerine etkileri Real Time PCR ile incelenmiştir.

ACF kolon kanserinde erken aşamasında meydana gelen prekanseröz lezyon olarak tanımlanmakta ve KRK'nin önemli bir biyomarkırı olarak kabul edilmektedir. ACF'nin boyutu ve sayısı ile KRK'nin şiddeti arasında pozitif korrelasyon olduğu bildirilmektedir (Bird ve Good 2000, Orlando ve ark 2008, Wargovich ve ark 2010). Ayrıca AOM insan ve hayvanlarda preneoplastik kolon lezyonları olarak tanımlanan ACF'yi de indüklemektedir (Takahashi ve Wakabayashi 2004). AOM tarafından indüklenenerek KRK oluşturulan çalışmamızda grupların histopatolojik incelemesinde KK ve K-TCAE grupların tüm bireylerinde ACF oluşumu gözlendi. Sağlıklı kontrol grubunda herhangi bir ACF oluşumu gözlenmedi. KK ve K-TCAE grubunda ACF oluşturan kript sayısı ($P < 0,05$) ve kriptlerde displazi varlığı ve derecelendirilmesinde ($P < 0,01$) gruplar arasında önemli fark tespit edildi. ACF sayıları ve displazinin derecelendirilmesinde K-TCAE grubunda, KK grubuna kıyasla skorların sırasıyla %21.6 ve %23 oranında azaldığı gözlendi. Bu bulgular daha önceki benzer çalışmalardaki kanser kontrol grubundaki bulgular ile örtüşmektedir (Harris ve ark 2001, Norazalina ve ark 2010, Sepporta ve ark 2016). Histopatolojik incelemede AOM ile indüklenen gruplarda ACF'lerin normal kript epitellerine kıyasla daha hiperkromatik ve farklı lumen şekillerine sahip olduğu görüldü. Önceki çalışmalarda, AOM uygulamasının antioksidan enzim aktivitesinde azalma ve glutatyonun tükenmesine bağlı olarak ROS seviyelerini arttırdığı ve böylece toplam antioksidan kapasitenin bozulduğu bir mekanizma ile kolon kanserini indüklediği bildirilmiştir (Al-Numair ve ark 2011, Lai ve ark 2013). Waly ve ark (2012) antioksidan enzimlerin (SOD, CAT) aktivitelerinin artmasının, oksidatif stresi azaltarak, AOM tarafından indüklenen KRK'nin bulgularını azalttığını bildirmişlerdir. Dik ve ark (2014)'nın da bildirdiği gibi çalışmamızda da K-TCAE grubundaki ACF sayılarının ve displazi derecelendirilmesindeki skorların azalmasına TCAE'nın antioksidan etkinliğinin de rol aldığı yorumlanabilir. KRAS geni tarafından kodlanan, KRAS protoonkogeni normal homeostazisde bir sinyal molekülü olarak temel bir işlev yerine getirmektedir. KRAS protoonkogeni çoğu

hücre tipinde hücresel proliferasyonu düzenlemekte olup, KRAS genindeki mutasyonlar, normal işlevini bozarak sürekli sinyalizasyona ve proliferasyona yol açmaktadır (Khan ve ark 2000, Iacopetta 2003, Abubaker ve ark 2009). KRAS onkogenik aktivasyonun RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT sinyal yolaklarının aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Kure ve ark 2009). Ayrıca onkojenik KRAS'ın, PI3K/AKT yolağı vasıtasıyla, GSK-3β inhibisyonuna sebebiyet vermesinin sonucu olarak nükleer β-katenin seviyelerini ve β-katenin-TCF4 oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (Li ve ark 2005). Bu bağlamda β-katenin-TCF4 kompleksinin oluşması hücre proliferasyonunu arttırmak için c-myc ve Siklin D1 teşvik etmektedir (Sears ve ark 2000). Ek olarak onkogenik KRAS, Ras/Raf/Mek/Erk/c-Jun vasıtasıyla apoptotik gen olarak bilinen PTEN'i baskıladığı gösterilmiştir (Vasudevan ve ark 2007). Bu çalışmada da AOM ile indüklenen KK grubunda KRAS ekspresyon seviyelerinin artmasının bu modelde KRAS yolunun tümör oluşumunda önemli bir yolak olduğunu göstermektedir.

AOM ile indüklenen KRK modelinde KRAS genindeki mutasyonlar farklı oranlarda gösterilmiştir. Hu ve ark (2009) tarafından sıçanlarda yapılan çalışmada, ACF'lerde %33 oranında mutasyon kaydedilmiştir. Khare ve ark (2003)' nın sıçanlardaki çalışmalarında ise mutasyon oranı %27 olarak belirlenmiş, ayrıca doğal tip KRAS'ın %23 oranında aktive edildiği gösterilmiştir. Takahashi ve ark (2000) çalışmasında bu oran hiperplastik ACF'lerin %70'inde, adenokarsinomlarda ise %26 olarak bildirilmiştir. Farklı bir çalışmada AOM indüksiyonu ile meydana gelen mutant ve/veya doğal tip KRAS efektörü olan MAPK sinyal yolağının da aktive edildiği gösterilmiştir (Bissonnette ve ark 2000). Literatür bilgilere dayanarak (Hall ve ark 1991, Shivapurkar ve ark 1994, Takahashi ve ark 2000), ACF'ler de KRAS mutasyonlarının belirlenmesi, adenomadan karsinoma geçiş sırasında erken tanıda bir moleküler belirteç olarak değerlendirilebilir. KRAS mutasyonlarının ve/veya doğal tip KRAS yapıcı aktivasyonlarının, kemopreventif maddeler tarafından modüle edilmesi iyi bir kanser önleme stratejisi olabilir. Bu çalışmada KRAS protoonkogeninin, Crossing Point değerleri sırası ile SK grubunda 26.21, KK grubunda 25.41, K-TCAE grubunda ise 27.40 olarak ($P < 0.05$), $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri ise sırasıyla 766.29; 1213; 255.71 (10^{-5}) olarak bulunmuştur ($P < 0.001$). Bu bulgularla, AOM ile indüklemenin, KRAS protoonkogenindeki mutasyonu ve/veya doğal tip KRAS gen ekspresyonun arttırdığını düşünmekteyiz. KK grubunda, sağlıklı kontrol

grubuna kıyasla Cp değerinin daha düşük (25,41) bulunması ekspresyon düzeyinin arttırdığını, K-TCAE grubunda bu değerin KK'ya göre yüksek (27,40) olması ekspresyon seviyelerini azalttığını göstermektedir. Bu bağlamda K-TCAE grubundaki ekspresyonun düşük olmasından hareketle, AOM tarafından indüklenen bir takım normal homeostazisdeki işlev bozukluklarının giderilmesi için TCAE'nin KRAS protoonkogeninin mRNA ekspresyon seviyelerini düşürdüğü ve ACF'lerin sayısının azalması ile arasında korelasyon olduğu düşünülebilir. Kanser hücreleri proliferasyon için enerjiye ihtiyaç duymaktadır ve bu enerjiyi PI3K/Akt/mTOR yolağının düzensiz fosforilasyonundan sağlamaktadır (Zhang ve ark 2009, Venkatachalam ve ark 2016). Zhang ve ark (2009) tarafından yapılan çalışmada PI3K/Akt/mTOR düzeyleri KRK'de yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada K-TCAE grubundaki KRAS gen ekspresyonunda azalmanın, ilave olarak hem RAS/RAF/ERK (MAPK) yolağının, hem de PI3K/AKT sinyal yolağını indüklenmesinde azalmaya yol açarak kanser hücrelerinde proliferasyonun engellendiği ve apoptoza yönlendirildiği yorumu yapılabilir.

Çalışmamızda, TCAE'nin KRAS mRNA ekspresyon düzeylerinin, SK ile benzer olmasından dolayı, TCAE'nin bu genin ekspresyon düzeyini olumlu yönde etkilediği söylenebilir. Literatür bilgilere göre AOM, KRAS geninde mutasyonlar oluşturmaktadır (Hu ve ark 2009, Khare ve ark 2003, Bissonnette ve ark 2000, Takahashi ve ark 2000). Fakat, çalışmada elde edilen veriler, doğal tip KRAS ekspresyonlarının ölçümüne dayalı olduğu için mutasyonlar hakkında herhangi bir yorum yapılamamaktadır. Farklı çalışmalarda kanserojen maddeler ile indüklenen deneysel kolorektal kanser modellerinde bazı kemopreventetif ajanların mutasyon sıklığını azaltarak etkiler gösterebileceği bildirilmektedir (Hu ve ark 2008, Hu ve ark 2009, Pallem ve ark 2020). TCAE'nın, mutasyon sıklığı üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını belirlemek için ilerleyen zamanlarda daha fazla moleküler çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Fichera ve ark (2007) tarafından AOM ile indüklenen deneysel bir çalışmada, EGFR sinyallerinin arttığı böylece doğal tip KRAS'ın indüklendiği bildirildi. Cohen ve ark (2006), insan ACF'lerinde EGFR sinyalinin yukarı regüle edildiğini ifade etmişlerdir. Ek olarak artmış EGFR sinyali, siklin D1 yukarı regülasyonunu da arttırdığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda KRAS mRNA ekspresyon seviyelerinin K-TCAE grubunda azalmasında, TCAE'nin EGFR sinyallinin üzerine olumlu etkisinin olduğunu düşünmekteyiz.

P53, tümör supresör gen olarak bilinmekte olup, p53 geninde meydana gelen mutasyonlar adenomdankarsinoma geçişinde önemli rol oynamaktadır (López ve ark 2012). Doğal tip p53 bir antionkogen özellik göstermekte olup, bir gen transkripsiyon faktörü olarak işlev gördüğü için çoğu hücre döngüsünün duraklatılmasına ve/veya apoptozu teşvik eden birçok genin indüksiyonuna sebep olmaktadır (Donehower ve Bradley 1993, Erster ve ark 2004, Halaby ve ark 2015). Literatür araştırmasında, p53 geni insanlarda KRK'de en sık mutasyona uğrayan genlerden biri olmasına rağmen (Khan ve ark 2000, Liu ve Bodmer 2006, Latif 2018), AOM ile indüklenen KRK'lerde p53 geninde mutasyon varlığına rastlanılmadığı bildirilmektedir (Shivapurkar ve ark 1995, Erdman ve ark 1997, Tanaka ve ark 2003, Perše ve Cerar 2010). Bu farklılığın insan ve şıçanlardaki p53 gen yapısındaki farklılıklardan kaynaklandığı ifade edilmektedir (Okamoto ve ark 1993, Shivapurkar ve ark 1995, Erdman ve ark 1997). İnsanlarda özellikle sporadik kolon kanserinde p53 mutasyon oran %40-50 civarındadır (Kim 2018). Çalışmamızda p53 geninin Cp değerleri SK, KK ve K-TCAE gruplarında 30,76; 34,30; 32,07 ($P < 0.05$) olarak, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri ise 3835,57; 2139; 3499.33 (10^{-8}) ($P > 0.05$) olarak bulunmuştur. Bulgularımıza göre KK grubunda en düşük p53 mRNA ekspresyon düzeyine sahip olduğu, SK grubunda ise en yüksek p53 mRNA ekspresyon düzeyine sahip olduğu dikkat çekse de istatistiksel olarak fark oluşmamıştır. Cp değerlerinde istatiksel fark bulunmasına rağmen Delta delta Ct değerlerinde istatiksel fark bulunmamasının örnekleme sayısından kaynakladığını düşünmekteyiz. Çalışmamızdaki KK bulguları, AOM ile indüklenerek KRK modeli oluşturulan pekçok çalışmanın bulgular ile örtüşmektedir (Fujita ve ark 2004, Hernández-Salazar ve ark 2013, Song ve ark 2019). P53, hedef genlerin transaktivasyonu ve transkripsiyondan bağımsız mekanizmalar yoluyla da apoptozu teşvik etmektedir. P53, Bax, Noxa ve Puma gibi Bcl-2 ailesinin üyelerini kodlayanlar dahil olmak üzere çeşitli proapoptotik genlerin transkripsiyonunu aktive etme yeteneğine sahiptir (Amaral ve ark 2010). Önceki çalışmalarda apoptotik genlerin (özellikle Fas, Bid ve Bax) doğal tip p53 tarafından yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (Toshiyuki ve Reed 1995, Müller ve ark 1998, Sax ve ark 2002). Ayrıca AOM/DSS ile indüklenen farklı bir çalışmada p53 ve Bax'ın mRNA ekspresyon seviyelerinin azaldığı ve Bcl-2 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Song ve ark 2019). TCAE ile ilgili çalışmalarda, TCAE'nın serbest oksijen radikallerini azalttığı,

ayrıca invitro çalışmalarda tümör hücrelerini kaspaz-3 üzerinden apoptoza uğrattığı bildirilmiştir (Gültiken ve Vural 2007). Farklı çalışmalarda TCAE'nin, köpeklerde oral papillom tedavisinde olumlu sonuçlar verdiği ve köpek meme adenokarsinomunda BCL-2 ve Ki-67 ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Gültiken ve Vural 2007, Karayannopoulou ve Lafioniatis 2016). Yukarıda da belirtildiği gibi AOM ile oluşturulan KRK modelimizde p53 geninde mutasyon bulunmaması durumunda; TCAE uygulamasının, p53 mRNA ekspresyon düzeyini arttırarak, proapoptik gen ekspresyonlarını artırdığı, antiapoptik gen ekspresyonları azaltığı ve böylece tümör hücrelerini apoptoza yönlendirdiği düşünülebilir.

Wnt yolağının temel bileşeni, proliferasyonun düzenlenmesinde ve KRK'de kritik bir rol oynayan sitoplazmik β-katenin olarak bilinmektedir. APC geni, GSK-3b ile yıkıcı kompleks yapısına katılarak, sitoplazmadaki β-katenin seviyelerini düzenlemektedir (Gregorieff ve Clevers 2005, Ashokkumar ve Sudhandiran 2011). APC ve β-katenin genindeki değişikliklerin KRK gelişiminde, hem insan hem de deneysel çalışmalarda bir gatekeeper rol üstlendiği bilinmektedir (Powell ve ark 1992, Takahashi ve ark 1998). Çekirdekte β-katenin, TCF/LEF ailesinin üyeleri etkileşimi sonrasında, transkripsiyon aktivatörü olarak işlev görerek, c-Myc ve Siklin D1 gibi genlerde ekspresyon düzeylerini arttırarak, yolağın onkojenik bir özellik almasını sağlamaktadır. c-Myc ve Siklin D1, proliferasyonu indükleyen genler olup, Wnt sinyal yolağının hedef genleri olarak bilinmektedir (Behrens ve ark 1996, Molenaar ve ark 1996, He ve ark 1998, Tetsu ve McCormick 1999). Wnt yolağı birçok doku ve/veya organ kanserinin başlaması ve ilermesi konusunda oldukça önemli sinyal yolağıdır. Bu bağlamda son zamanlarda, kanser kemoprevansiyonu için umut verici bir hedef haline gelmektedir (Herbst ve Kolligs 2007). AOM ile indüklenen deneysel KRK modelinde β-katenin mutasyonları sık görülmesine rağmen (Takahashi ve ark 1998, Takahashi ve ark 2000), APC'de mutasyonlar nadiren görülmektedir (Behrens ve ark 1996, Caderni 1997). Takahashi ve ark (2000) tarafından yapılan çalışmada β-katenin genindeki mutasyonu, üç displastik ACF'den ikisinde, altı adenomdan ikisinde ve 26 adenokarsinomdan 20'sinde şekillendiği gösterilmiştir. Çalışmamızdaki APC gen ekpresyonunda, Cp değerleri SK, KK, K-TCAE gruplarında sırasıyla 27,79; 35,49; 29,78 olarak ($P < 0,0001$), $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri sırasıyla 227,29; 2,71; 98,71 (10^{-5}) ($P < 0,0001$) olarak bulunmuştur. KK grubandaki APC mRNA gen ekspresyon düzeyi düşük olmasına rağmen, K-TCAE grubunda

ekspresyon düzeyinin arttığı görülmektedir. KK grubunda APC ekspresyonunun azalması literatür bilgi ile paralellik göstermektedir (Kishimoto ve ark 2000, Kishimoto ve ark 2002). β-katenin gen ekpresyonunda Cp değerleri sırasıyla 28,24; 27,08; 28,82 olarak ($P < 0,05$), $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri ise 111535,71; 359514,14; 65733,29 (10^{-8}) ($P < 0,005$) olarak bulunmuştur. KK grubundaki β-katenin ekpsresyon düzeyi diğer gruplara göre oldukça yüksek bulunmuş, K-TCAE grubunda ise ekspresyon düzeyinin oldukça azaldığı görülmüştür. Bu durumun APC ekspresyonlarıyla ters orantılı olduğu dikkati çekmiş ve bu modelde APC ve β-katenin yolaklarının çalıştığını ortaya koymuştur. Ayrıca TCAE uygulamasının bu yolaklar üzerinde de etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Literatür bilgiler ışığında, AOM ile indüklenen KRK'de APC mutasyonları nadir görülse de çalışmamızın bulguları değerlendirildiğinde, APC genindeki değişikliklerin bir adım önde olduğu ve bunu mutant olmayan doğal tip APC ekspresyonundaki artışla sağladığı görülmektedir. He ve ark (1998), doğal tip APC'nin, β-katenin ile TCF arasında kompleks oluşturmasını engellediğini ve böylece c-myc onkojenik hal almasını önlediğini bildirmişlerdir. Kishimoto ve ark (2002) tarafından yapılan çalışmada, artmış APC ekspresyon seviyesi ile azalmış c-myc ekspresyon seviyesi arasında korrelasyon olduğu bildirilmiştir. Dow ve ark (2015)'nın çalışmasında; KRK'li insanlarda APC geni restorasyonu sağlanır ise, TP53 ve KRAS'da mutasyonlar olsa bile tümörde iyileşmeye neden olduğu gösterilmiştir. Literatür bilgiler ışığında çalışmamızda, KK gruplarındaki APC ekspresyonlarının düzeylerinin düşük olması tümör gelişiminde etkili olduğunu ve K-TCAE grubundaki TCAE'nın APC mRNA gen ekspresyon düzeyini artırması sonucu, β-katenin modüle edilerek c-myc ve Siklin D1'in onkojenik bir durum almasını engellediğine yorumlanabilir. Ayrıca KK grubundaki kolonda azalmış APC mRNA ekpsresyonu mutasyondan ziyade artmış ACF ile ilgili olabilir. Bu bağlamda çalışmamızda, ACF ile ilgili K-TCAE grubundaki histopatolojik skorların azalması ile mRNA ekspresyon düzeyi paralellik göstermektedir. Ek olarak KRAS protoonkogenin mRNA ekspresyonunun azalması ve APC mRNA ekspresyon seviyelerinin artması arasında kombine etkili olarak β-katenin ekspresyon seviyelerini azalttığı ve böylece tümör gelişimi ve proliferasyonunu engellendiğine bağlanabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada sıçanlarda AOM ile indüklenen KRK'de, TCAE'nin etkileri moleküler olarak değerlendirilmiş olup, KRK gelişim yolaklarında meydana gelen bir takım değişikliklerin modüle edilerek, tümör gelişimini ve proliferasyonu önlediğini ve böylece kemopreventif olarak etkili bir ajan olduğu söylenebilir.

AOM ile indüklenen modellerde p53 ekspresyonunu istatistiksel fark oluşturmaması sonucu bu modelle ilgili çalışmalarda kullanımının uygun olmayabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca deneysel KRK modelleinde KRAS, APC ve β-katenin yolaklarında belirgin değişiklikler olduğu ve antitümöral tedavilerde bu yolaklardaki değişimlerin değerlendirme kriteri olarak kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

TCAE ile yapılan önceki çalışmada (Er ve ark 2019) TCAE'nın vücudun antioksidan kapasitesini artırması ve TNF aracılı apoptozis yolağını aktifleştirmesi bilgisi yanında, bu çalışmada da tümör baskılayıcı gen ekspresyonlarını artırması dikkate alındığında; TCAE'nın mutajenik olmayan tümör supresör genleri ve yolakları aktive ederek tümör hücrelerinde apoptoza neden olduğu ve böylece antitümöral etkinliğini gösterdiği yorumlanabilir.

Deneysel kanser çalışmalarında ve kemoterapi denemelerinde bu çalışmadaki gibi tek tip yolaklar yerine, bu yolak ve genlerin mutajenik ve mutajenik olmayan tiplerinin birlikte değerlendirilmesi kemoterapötik ajanın etkinliğini ortaya koymada daha faydalı olabilir.

6. KAYNAKLAR

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R, 1997. β-catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. Embo Rep, 16, 13, 3797-804.

Abubaker J, Bavi P, Al-Haqawi W, Sultana M, Al-Harbi S, Al-Sanea N, Abduljabbar A, Ashari LH, Alhomoud S, Al-Dayel F, 2009. Prognostic significance of alterations in KRAS isoforms KRAS-4A/4B and KRAS mutations in colorectal carcinoma, J Pathol, 219, 4, 435-45.

Addadi Y, Moskovits N, Granot D, Lozano G, Carmi Y, Apte RN, Neeman M, Oren M, 2010. p53 status in stromal fibroblasts modulates tumor growth in an SDF1-dependent manner. Cancer Res, 70, 23, 9650-8.

Ahnen DJ, 1985. Are animal models of colon cancer relevant to human disease. Dig. Dis. Sci, 30, 12, 103S-6S.

Al-Henhena N, Khalifa SA, Ying RPY, Ismail S, Hamadi R, Shawter AN, Idris AM, Azizan A, Al-Wajeeh NS, Abdulla MA, 2015. Evaluation of chemopreventive potential of Strobilanthes crispus against colon cancer formation in vitro and in vivo. BMC Complement Altern Med, 15, 1, 1-11.

Al-Numair KS, Waly MI, Ali A, Essa MM, Farhat MF, Alsaif MA, 2011. Dietary folate protects against azoxymethane-induced aberrant crypt foci development and oxidative stress in rat colon. Exp. Biol. Med, 236, 9, 1005-11.

Alemdaroğlu K, Akçal T, Buğra D, 2004. Kolon Rektum ve anal bölge hastalıkları. Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği yayını. İstanbul, s 150.

Allen JI, 1995. Molecular biology of colon polyps and colon cancer. Semin. Oncol, 399-405.

Alsner J, Jensen V, Kyndi M, Vrou Offersen B, Vu P, Børresen-Dale A-L, Overgaard J, 2008. A comparison between p53 accumulation determined by immunohistochemistry and TP53 mutations as prognostic variables in tumours from breast cancer patients. Acta Oncol, 47, 4, 600-7.

Altobelli E, D'Aloisio F, Angeletti PM, 2016. Colorectal cancer screening in countries of European Council outside of the EU-28. World J. Gastroenterol, 22, 20, 4946.

Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM, 2010. The role of p53 in apoptosis. Discov. Med, 9, 45, 145-52.

Andreyev H, Norman A, Cunningham D, Oates J, Dix B, Iacopetta B, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, 2001. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II'study. Br. J. Cancer, 85, 5, 692-6.

Ashokkumar P, Sudhandiran G, 2011. Luteolin inhibits cell proliferation during Azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis via Wnt/β-catenin pathway. Investigational new drugs, 29, 2, 273-84.

Bachelor MA, Bowden GT, 2004. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. Semın Cancer Bıol, 131-8.

Bader AG, Kang S, Vogt PK, 2006. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. Pnas, 103, 5, 1475-9.

Baker SJ, Vogelstein B, 2019. p53: a tumor suppressor hiding in plain sight. J. Mol. Cell Biol, 11, 7, 536-8.

Baas IO, Mulder JWR, Offerhaus GJA, Vogelstein B, Hamilton SR, 1994. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. J. Pathol, 172, 1, 5-12.

Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W, 1996. Functional interaction of β-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature, 382, 6592, 638-42.

Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh J-C, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R, 1996. A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. Nature, 382, 6588, 225-30.

Bian J, Dannappel M, Wan C, Firestein R, 2020. Transcriptional Regulation of Wnt/β-Catenin Pathway in Colorectal Cancer. Cells, 9, 9, 2125.

Binétruy B, Smeal T, Karin M, 1991. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. Nature, 351, 6322, 122-7.

Bird RP, Good CK, 2000. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. Toxicol. Lett, 112, 395-402.

Bissonnette M, Khare S, von Lintig FC, Wali RK, Nguyen L, Zhang Y, Hart J, Skarosi S, Varki N, Boss GR, 2000. Mutational and nonmutational activation of p21ras in rat colonic azoxymethane-induced tumors: effects on mitogen-activated protein kinase, cyclooxygenase-2, and cyclin D1. Cancer res, 60, 16, 4602-9.

Bode AM, Dong Z, 2007. The functional contrariety of JNK. Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center, Mol. Carcinog, 46, 8, 591-8.

Bodemann BO, White MA, 2008. Ral GTPases and cancer: linchpin support of the tumorigenic platform. Nat. Rev. Cancer, 8, 2, 133-40.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A, 2018. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA, 68, 6, 394-424.

Brembeck FH, Rosário M, Birchmeier W, 2006. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β-catenin. Curr. Opin. Genet. Dev, 16, 1, 51-9.

Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, 2002. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. Cancer Res, 62, 23, 6997-7000.

Bruce WR, Archer MC, Corpet DE, Medline A, Minkin S, Stamp D, Yin Y, Zhang X-M, 1993. Diet, aberrant crypt foci and colorectal cancer. Mutat Res-Fund Mol M for Abstracting, 290, 1, 111-8.

Brugge J, Hung M-C, Mills GB, 2007. A new mutational aktivation in the PI3K pathway. Cancer cell, 12, 2, 104-7.

Buchert M, Athineos D, Abud HE, Burke ZD, Faux MC, Samuel MS, Jarnicki AG, Winbanks CE, Newton IP, Meniel VS, 2010. Genetic dissection of differential signaling threshold requirements for the Wnt/β-catenin pathway in vivo. Plos Genet, 6, 1, e1000816.

Bulavin DV, Fornace AJ, 2004. p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. Adv Cancer Res, 92, 95-118.

Caderni G. APC mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors induced by azoxymethane in rats. Proc Am Assoc Cancer Res, 467.

Cadigan KM, Liu YI, 2006. Wnt signaling: complexity at the surface. J. Cell Sci,119, 3, 395-402.

Cam Y, Kibar M, Atasever A, Atalay Ö, Beyaz L, (2007). Efficacy of levamisole and Tarantula cubensis venom for the treatment of bovine cutaneous papillomatosis, Br Med J, 7;160(14):486-8.

Chambard J-C, Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P, 2007. ERK implication in cell cycle regulation. Bba-Mol Cell Res, 1773, 8, 1299-310.

Chen X, Yang J, Evans PM, Liu C, 2008. Wnt signaling: the good and the bad. Acta Biochim. Biophys. Sin, 40, 7, 577-94.

Chen J, Huang X-F, 2009. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. Cancer Biol. Ther, 8, 14, 1313-7.

Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, Jemal A, Yu XQ, He J, 2016. Cancer statistics in China, 2015. CA, 66, 2, 115-32.

Chiou Y-S, Tsai M-L, Wang Y-J, Cheng A-C, Lai W-M, Badmaev V, Ho C-T, Pan M-H, 2010. Pterostilbene inhibits colorectal aberrant crypt foci (ACF) and colon carcinogenesis via suppression of multiple signal transduction pathways in azoxymethane-treated mice. J. Agric. Food Chem, 58, 15, 8833-41.

Christie M, Jorissen R, Mouradov D, Sakthianandeswaren A, Li S, Day F, Tsui C, Lipton L, Desai J, Jones I, 2013. Different APC genotypes in proximal and distal sporadic colorectal cancers suggest distinct WNT/β-catenin signalling thresholds for tumourigenesis. Oncogene, 32, 39, 4675-82.

Clevers H, Loh KM, Nusse R, 2014. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. Science, 346, 6205.

Cohen G, Mustafi R, Chumsangsri A, Little N, Nathanson J, Cerda S, Jagadeeswaran S, Dougherty U, Joseph L, Hart J, 2006. Epidermal growth factor receptor signaling is up-regulated in human colonic aberrant crypt foci. Can. Res, 66, 11, 5656-64.

Compton CC, Greene FL, 2004. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. Cancer J. Clin, 54, 6, 295-308.

Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A, 2002. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. J Clin Invest, 109, 8, 987-91.

Costigan DC, Dong F, 2020. The extended spectrum of RAS-MAPK pathway mutations in colorectal cancer. Genes Chromosom. Cancer, 59, 3, 152-9.

Cottu PH, Muzeau F, Estreicher A, Fléjou J-F, Iggo R, Thomas G, Hamelin R, 1996. Inverse correlation between RER+ status and p53 mutation in colorectal cancer cell lines. Oncogene, 13, 12, 2727.

Cox AD, Der CJ, 2003. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. Oncogene, 22, 56, 8999-9006.

Crawford L, Pim D, Bulbrook R, 1982. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. Int. J. Cancer Res, 30, 4, 403-8.

Cruz-Correa M, Giardiello FM, 2003. Familial adenomatous polyposis. Gastrointest. Endosc, 58, 6, 885-94.

Cuadrado A, Nebreda AR, 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. Biochem. J, 429, 3, 403-17.

Cuenda A, Rousseau S, 2007. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Bba-Mol Cell Res, 1773, 8, 1358-75.

Cui J, Jiang W, Wang S, Wang L, Xie K, 2012. Role of Wnt/β-catenin signaling in drug resistance of pancreatic cancer. Current pharmaceutical design, 18, 17, 2464-71.

Cummings J, 1990. The amount and composition of large bowel contents in man. Gas, 98, A408.

Cunningham D, 2010. atkin W, Lenz H, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. The Lancet, 375, 9719, 1030-47.

Çorum O, 2016. Halofuginonun deneysel kolon kanserinde etkinliğinin belirlenmesi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Damalas A, Kahan S, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Oren M, 2001. Deregulated β-catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. Embo Rep, 20, 17, 4912-22.

Davies RJ, Miller R, Coleman N, 2005. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. Nat. Rev. Cancer, 5, 3, 199-209.

Day C, Saxton J, 1998. Veterinary homeopathy: Principles and practice. Bmc Complement Altern. Med, 485-513.

De la Chapelle A, 2004. Genetic predisposition to colorectal cancer. Nat. Rev. Cancer, 4, 10, 769-80.

De Lau W, Barker N, Low TY, Koo B-K, Li VS, Teunissen H, Kujala P, Haegebarth A, Peters PJ, van de Wetering M, 2011. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. Nature, 476, 7360, 293-7.

De Lau W, Peng WC, Gros P, Clevers H, 2014. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. Genes Dev, 28, 4, 305-16.

De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N, 2012. The Ras/Raf/Mek/Erk and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. Expert Opin. Ther. Targets, 16, S17-S27.

DeFazio A, Chiew YE, Sini RL, Janes PW, Sutherland RL, 2000. Expression of c-erbB receptors, heregulin and oestrogen receptor in human breast cell lines. Int. J. Cancer Res, 87, 4, 487-98.

Demirkan NÇ, Bir F, Erdem Ö, Düzcan E, 2007. Immunohistochemical expression of β-catenin, E-cadherin, cyclin D1 and c-myc in benign trichogenic tumors. Journal of cutaneous pathology, 34, 6, 467-73.

Dik B, Er A, Corum O, 2014. Effect of alcoholic extract of Tarantula cubensis (Theranekron®) on serum thiobarbituric acid-reactive species concentrations in sheep. Eurasian J Vet Sci, 30, 2, 68-71.

Donehower LA, Bradley A, 1993. The tumore suppressor p53. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 1155, 2, 181-205.

Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, O'Rourke K, Koeppen H, Dixit VM, 2004. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. Nature, 429, 6987, 86-92.

Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, Tschaharganeh DF, van Es JH, Clevers H, Lowe SW, 2015. Apc restoration promotes cellular differentiation and reestablishes crypt homeostasis in colorectal cancer. Cell, 161, 7, 1539-52.

Downward J, 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. Nat. Rev. Can, 3, 1, 11-22.

Doyle B, Morton JP, Delaney DW, Ridgway RA, Wilkins JA, Sansom OJ, 2010. p53 mutation and loss have different effects on tumourigenesis in a novel mouse model of pleomorphic rhabdomyosarcoma. J. Pathol, 222, 2, 129-37.

Drabsch Y, Ten Dijke P, 2012. TGF-β signalling and its role in cancer progression and metastasis. Cancer Metastasis Rev, 31, 3, 553-68.

Dragan Y, Sargent L, Xu Y-D, Xu Y-H, Pitot H, 1993. The initiation-promotion-progression model of rat hepatocarcinogenesis. Sebm, 202, 1, 16-24.

Drost J, Van Jaarsveld RH, Ponsioen B, Zimberlin C, Van Boxtel R, Buijs A, Sachs N, Overmeer RM, Offerhaus GJ, Begthel H, 2015. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. Nature, 521, 7550, 43-7.

Duronio V, 2008. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. Biochem, 415, 3, 333-44.

Duz E, Icen H, Arserrim NB, Cakmak F, Bakir B, Uysal E, 2012. Comparison of classic, theranekron and classic-plus theranekron treatment on the foot and mouth disease lesions in cattle in Van, Diyarbakir and Ankara regions in Turkey. J Anım Vet Adv, 11, 18, 3258-61.

Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David J-P, Rath M, Wagner EF, 2003. Liver tumor development: c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. Cell, 112, 2, 181-92.

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B, 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell, 75, 4, 817-25.

Elliott RL, Blobe GC, 2005. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. J. Clin. Oncol, 23, 9, 2078-93.

Emerling BM, Platanias LC, Black E, Nebreda AR, Davis RJ, Chandel NS, 2005. Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling. Mol. Cell. Biol, 25, 12, 4853-62.

Enbergs H, Sensen B, 2007. Zur Effizienz homöopathischer Behandlungen chronischer Endometritiden von Milchkühen. Prakt. Tierarzt, 10, 7, 534-43.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC, 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. Nat. Rev. Gen., 7, 8, 606-19.

Engelman JA, 2009. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. Nat. Rev. Cancer, 9, 8, 550-62.

Er A, Ozdemir O, Coskun D, Dik B, Bahcivan E, Faki HE, Yazar E, 2019. Effects of Tarantula cubensis alcoholic extract and Nerium oleander distillate on experimentally induced colon cancer development, Rev Med Vet, 45, 47.

Erdman SH, Wu HD, Hixson LJ, Ahnen DJ, Gerner EW, 1997. Assessment of mutations in ki-ras and p53 in colon cancers from azoxymethane-and dimethylhydrazine-treated rats. Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center, Mol. Carcinog, 19, 2, 137-44.

Erer H, Kıran M, 2005. Veteriner Onkoloji, 6. basım. Damla Ofset AŞ, sf, 38-41.

Erer H, Kıran M, 2005. Veteriner Onkoloji, 6. basım. Damla Ofset AŞ, sf, 1-2..

Erster S, Mihara M, Kim RH, Petrenko O, Moll UM, 2004. In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation Mol. Cell. Biol, 24, 15, 6728-41.

Fang JY, Richardson BC, 2005. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. Lancet Oncol, 6, 5, 322-7.

Fayard E, Tintignac LA, Baudry A, Hemmings BA, 2005. Protein kinase B/Akt at a glance. J. Cell Sci, 118, 24, 5675-8.

Fearon ER, Vogelstein B, 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, 61, 5, 759-67.

Fearon ER, 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. Annu Rev Pathol, 6, 479-507.

Ferraz da Costa DC, Pereira Rangel L, Martins-Dinis MMDdC, Ferretti GDdS, Ferreira VF, Silva JL, 2020. Anticancer potential of resveratrol, β-lapachone and their analogues. Molecules, 25, 4, 893.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM, 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int. J. Cancer Res , 127, 12, 2893-917.

Fiala ES, 1977. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1, 2-dimethylhydrazine and azoxymethane. Cancer, 40, S5, 2436-45.

Fichera A, Little N, Jagadeeswaran S, Dougherty U, Sehdev A, Mustafi R, Cerda S, Yuan W, Khare S, Tretiakova M, 2007. Epidermal growth factor receptor signaling is required for microadenoma formation in the mouse azoxymethane model of colonic carcinogenesis. Cancer Res, 67, 2, 827-35.

Forman D, Ferlay J, Stewart B, Wild C, 2014. The global and regional burden of cancer. Cancer Rep, 2014, 16-53.

Freed-Pastor WA, Prives C, 2012. Mutant p53: one name, many proteins. Genes Dev, 26, 12, 1268-86.

Friedman E, Gold LI, Klimstra D, Zeng Z, Winawer S, Cohen A, 1995. High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer. Cancer Epıdem Bıomar, 4, 5, 549-54.

Fujita K-i, Matsuda E, Sekine K, Iigo M, Tsuda H, 2004. Lactoferrin modifies apoptosis-related gene expression in the colon of the azoxymethane-treated rat Cancer Lett, 213, 1, 21-9.

Gao Y, Tao J, Li MO, Zhang D, Chi H, Henegariu O, Kaech SM, Davis RJ, Flavell RA, Yin Z, 2005. JNK1 is essential for CD8+ T cell-mediated tumor immune surveillance. J. Immunol. Res. ,175, 9, 5783-9.

Ghasemi-Dizgah A, Nami B, Amirmozafari N, 2017. Tarantula cubensis venom (Theranekron®) selectively destroys human cancer cells via activating caspase-3-mediated apoptosis. Acta Medica Int, 4, 1, 74.

Giaccia AJ, Kastan MB, 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. Genes Dev, 12, 19, 2973-83.

Giannakis M, Hodis E, Mu XJ, Yamauchi M, Rosenbluh J, Cibulskis K, Saksena G, Lawrence MS, Qian ZR, Nishihara R, 2014. RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. Nat. Genet, 46, 12, 1264-6.

Giles RH, Van Es JH, Clevers H, 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 1653, 1, 1-24.

Glinka A, Dolde C, Kirsch N, Huang YL, Kazanskaya O, Ingelfinger D, Boutros M, Cruciat CM, Niehrs C, 2011. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/β-catenin and Wnt/PCP signalling. Embo Rep, 12, 10, 1055-61.

Gregorieff A, Clevers H, 2005. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. Genes Dev, 19, 8, 877-90.

Greenspan, E. J., Cyr, J. L., Pleau, D. C., Levine, J., Rajan, T. V., Rosenberg, D. W., and Heinen, C. D. (2007) Microsatellite instability in aberrant crypt foci from patients without concurrent colon cancer. Carcinogenesis 28 , 769 – 776.

Gültiken N, Vural MR, 2007. The effect of Tarantula cubensis extract applied in pre and postoperative period of canine mammary tumours. J. İstanbul vet. sci, 2, 13-23.

Gultiken N, Guvenc T, Kaya D, Agaoglu AR, Ay SS, Kucukaslan I, Emre B, Findik M, Schäfer-Somi S, Aslan S, 2015. Tarantula cubensis extract alters the degree of apoptosis and mitosis in canine mammary adenocarcinomas, J. Vet. Sci, 16, 2, 213.

Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ, 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. Embo Rep, 15, 11, 2760-70.

Halaby M-J, Harris BR, Miskimins WK, Cleary MP, Yang D-Q, 2015. Deregulation of internal ribosome entry site-mediated p53 translation in cancer cells with defective p53 response to DNA damage. Mol. Cell. Biol, 35, 23, 4006-17.

Hall C, Badawi A, O'Connor PJ, Saffhill R, 1991. The detection of alkylation damage in the DNA of human gastrointestinal tissues. Br. J. Cancer, 64, 1, 59-63.

Hamilton D. Homeopathic Care for Cats and Dogs: Small Doses for Small Animals. Berkley: North Atlantic Books;1999. p. 237–272.

Hao H-X, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M, Lei H, Mickanin C, Liu D, Ruffner H, 2012. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. Nature, 485, 7397, 195-200.

Harris G, Gupta A, Nines R, Kresty L, Habib S, Frankel W, LaPerle K, Gallaher DD, Schwartz S, Stoner G, 2001. Effects of lyophilized black raspberries on azoxymethane-induced colon cancer and 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine levels in the Fischer 344 rat. Nutr. Cancer, 40, 2, 125-33.

Harris SL, Levine AJ, 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. Oncogene, 24, 17, 2899-908.

Hart M, Concordet J, Lassot I, Albert I, Del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R, 1999. The F-box protein β-TrCP associates with phosphorylated β-catenin and regulates its activity in the cell. Curr, 9, 4, 207-11.

He T-C, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, Da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW, 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science, 281, 5382, 1509-12.

Hemann MT, Lowe SW, 2007. p53 links tumor development to cancer therapy. In: 25 Years of p53 Research. Eds: Springer, p. 339-51.

Herbst A, Kolligs FT, 2007. Wnt signaling as a therapeutic target for cancer. Target Discovery and Validation Reviews and Protocols, 63-91.

Hernández-Salazar M, Guevara-González RG, Cruz-Hernández A, Guevara-Olvera L, Bello-Pérez LA, Castaño-Tostado E, Loarca-Piña G, 2013. Flaxseed (Linum usitatissimum L.) and its total non-digestible fraction influence the expression of genes involved in azoxymethane-induced colon cancer in rats. Plant Foods Hum. Nutr, 68, 3, 259-67.

Hisamuddin IM, Yang VW, 2006. Molecular genetics of colorectal cancer: an overview. Curr. Colorectal Cancer Rep, 2, 2, 53-9.

Hocevar B, Mou F, Rennolds J, Morris S, Cooper J, Howe P, 2003. Regulation of the Wnt signaling pathway by disabled-2 (Dab2). The EMBO journal, 22, 12, 3084-94.

Hollstein M, Rice K, Greenblatt M, Soussi T, Fuchs R, Sørlie T, Hovig E, Smith-Sørensen B, Montesano R, Harris C, 1994. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. Nucleic Acids Res., 22, 17, 3551.

Hounnou G, Destrieux C, Desme J, Bertrand P, Velut S, 2002. Anatomical study of the length of the human intestine. Surgical and radiologic anatomy, 24, 5, 290-4.

Honda R, Yasuda H, 1999. Association of p19ARF with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. Embo Rep, 18, 1, 22-7.

Hoosein NM, McKnight MK, Levine AE, Mulder KM, Childress KE, Brattain DE, Brattain MG, 1989. Differential sensitivity of subclasses of human colon carcinoma cell lines to the growth inhibitory effects of transforming growth factor-β1. Exp. Cell Res, 181, 2, 442-53.

Hu Y, McIntosh GH, Le Leu RK, Woodman R, Young GP, 2008. Suppression of colorectal oncogenesis by selenium-enriched milk proteins: apoptosis and K-ras mutations. Cancer Res, 68, 12, 4936-44.

Hu Y, Le Leu RK, Young GP, 2009. Detection of K-ras mutations in azoxymethane-induced aberrant crypt foci in mice using LNA-mediated real-time PCR clamping and mutant-specific probes. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen, 677, 1-2, 27-32.

Hyytiäinen M, Penttinen C, Keski-Oja J, 2004. Latent TGF-β binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-β activation. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci, 41, 3, 233-64.

Iacopetta B, 2003. TP53 mutation in colorectal cancer. Hum. Mutat, 21, 3, 271-6.

Icen H, Sekin S, Simsek A, Kochan A, Tunik S, 2011. The efficacy of Tarantula cubensis extract (Theranekron) in treatment of canine oral papillomatosis. Asian J Anim Vet Adv, 6, 7, 744-9.

Imran A, Qamar HY, Qurban A, Naeem H, Mariam R, Saima A, Kanwal N, Fawad A, Sabar MF, Nasir IA, 2017. Role of molecular biology in cancer treatment: A review article. Iran. J. Public Health, 46, 11, 1475.

Ingham PW, 1996. Has the quest for a Wnt receptor finally frizzled out? Trends Genet, 12, 10, 382-4.

Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, ten Dijke P, 2000. Signaling of transforming growth factor-β family members through Smad proteins. Eur. j. biochem, 267, 24, 6954-67.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ, 2008. Cancer statistics, Cancer J. Clin, 58, 2, 71-96.

Johnson GL, Lapadat R, 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science, 298, 5600, 1911-2.

Johnson RL, Fleet JC, 2013. Animal models of colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev, 32, 1, 39-61.

Johnston SR, 2001. Farnesyl transferase inhibitors: a novel targeted therapy for cancer. Lancet Oncol, 2, 1, 18-26.

Kadowaki T, Wilder E, Klingensmith J, Zachary K, Perrimon N, 1996. The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. Genes Dev, 10, 24, 3116-28.

Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Sato T, Matsuoka K, Arai K, Nakai T, Hasegawa A, Inoue N, Watanabe N, 2005. Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria. J. Immunol. Res, 175, 10, 6900-8.

Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. Nature, 502, 7471, 333-9.

Kang S, Bader AG, Vogt PK, 2005. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. Pnas, 102, 3, 802-7.

Kanneganti M, Mino-Kenudson M, Mizoguchi E, 2011. Animal models of colitis-associated carcinogenesis. J Biomed Biotechnol, 2011.

Karabacak M, Eraslan G, Kanbur M, Sarıca ZS, 2015. Effects of Tarantula cubensis D6 on aflatoxin-induced injury in biochemical parameters in rats. Homeopathy, 104, 3, 205-10.

Karayannopoulou M, Lafioniatis S, 2016. Recent advances on canine mammary cancer chemotherapy: A review of studies from 2000 to date. Breast Cancer Res, 29, 32, 43.

Karin M, Gallagher E, 2005. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. Iubmb life, 57, 4-5, 283-95.

Karnoub AE, Weinberg RA, 2008. Ras oncogenes: split personalities. Nat. Rev. Mol. Cell Biol, 9, 7, 517-31.

Kaserer K, Schmaus J, Bethge U, Migschitz B, Fasching S, Walch A, Herbst F, Teleky B, Wrba F, 2000. Staining patterns of p53 immunohistochemistry and their biological significance in colorectal cancer. The Journal of Pathology: J. Pathol, 190, 4, 450-6.

Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace Jr AJ, 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. Cell, 71, 4, 587-97.

Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stannek P, Niehrs C, Wu W, 2004. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/β-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. Dev. Cell., 7, 4, 525-34.

Kennedy NJ, Davis RJ, 2003. Role of JNK in tumor development. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2, 3, 199.

Khan ZA, Jonas SK, Le-Marer N, Patel H, Wharton RQ, Tarragona A, Ivison A, Allen-Mersh TG, 2000. P53 mutations in primary and metastatic tumors and circulating tumor cells from colorectal carcinoma patients. Clin. Cancer Res, 6, 9, 3499-504.

Khare S, Cerda S, Wali RK, Von Lintig FC, Tretiakova M, Joseph L, Stoiber D, Cohen G, Nimmagadda K, Hart J, 2003. Ursodeoxycholic acid inhibits Ras mutations, wild-type Ras activation, and cyclooxygenase-2 expression in colon cancer. Cancer Res, 63, 13, 3517-23.

Kim EK, Choi E-J, 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. Biochim. Biophys. Acta, 1802, 4, 396-405.

Kim NK, 2018. Biomarkers That Predict The Response to Chemo-radiotherapy in Rectal Cancer. Curr Med Res Opin, 1, 2.

Kinch MS, Clark GJ, Der CJ, Burridge K, 1995. Tyrosine phosphorylation regulates the adhesions of ras-transformed breast epithelia. J. Cell Biol, 130, 2, 461-71.

Kinzler KW, Nilbert MC, Su L-K, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, 1991. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. Science, 253, 5020, 661-5.

Kinzler KW, Vogelstein B, 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell, 87, 2, 159-70.

Kishimoto Y, Takata N, Jinnai T, Morisawa T, Shiota G, Kawasaki H, Hasegawa J, 2000. Sulindac and a cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac, increase APC mRNA in the colon of rats treated with azoxymethane. Gut, 47, 6, 812-9.

Kishimoto Y, Yashima K, Morisawa T, Shiota G, Kawasaki H, Hasegawa J, 2002. Effects of cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 on APC and c-myc expression in rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane. J. Gastroenterol, 37, 3, 186-93.

Klug W, Cummings M, Spencer C, 2011. Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kanser. Öner C, Sümer S, Öner R, Öğüş A, Açık L. Genetik Kavramlar. 8th ed. Ankara: Palme Yayıncılık, 434-56.

Koch H, Stein M, 1980. Konservative Behandlung von Neoplasmen der Milchdruse des Hundes mit Theranekron. Prakt Tierarzt, 61, 424 – 430. 6.

Koçak N, Yıldırım İH, Yıldırım SC, 2011. p53 ve p53 gen ailesi üyeleri olan p63 ve p73'ün hücresel işlevleri, 38 (4): 530-535.

Kolch W, 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. J. Biochemical, 351, 2, 289-305.

Koo B-K, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, van de Wetering M, van Es JH, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, 2012. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. Nature, 488, 7413, 665-9.

Kararli TT, 1995. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. Biopharm Drug Dispos, 16, 5, 351-80.

Kumar S, Boehm J, Lee JC, 2003. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. Nat. Rev. Drug Discov, 2, 9, 717-26.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC, 2017. Robbins basic pathology e-book, Elsevier Health Sciences, tenth edition.

Kure S, Nosho K, Baba Y, Irahara N, Shima K, Ng K, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S, 2009. Vitamin D receptor expression is associated with PIK3CA and KRAS mutations in colorectal cancer. Cancer epıdem bıomar, 18, 10, 2765-72.

Lai CS, Li S, Liu CB, Miyauchi Y, Suzawa M, Ho CT, Pan MH, 2013. Effective suppression of azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in mice with citrus peel flavonoids. Mol Nutr Food Res, 57, 3, 551-5.

Lambert JM, Lambert QT, Reuther GW, Malliri A, Siderovski DP, Sondek J, Collard JG, Der CJ, 2002. Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI3K-independent mechanism. Nat. Cell Biol, 4, 8, 621-5.

Latif AH, 2018. Realtime qRT-PCR Expression of P53, KRAS, and human Telomerase genes in circulating tumor cells, as potential biomarkers for early detection of sporadic colorectal cancer. Iraqi j. cancer med. genet, 8, 2.

Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Müller R, Pouysségur J, 1996. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. J. Biol. Chem, 271, 34, 20608-16.

Lee EY, Muller WJ, 2010. Oncogenes and tumor suppressor genes. Cold Spring Harb Perspect Biol., 2, 10, a003236

Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Keys JR, Strickler JE, 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. Nature, 372, 6508, 739-46.

Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, Parant JM, Lozano G, Hakem R, Benchimol S, 2003. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. Cell, 112, 6, 779-91.

Leslie A, Carey F, Pratt N, Steele R, 2002. The colorectal adenoma–carcinoma sequence. Br J Surg ,89, 7, 845-60.

Levine A, Hu W, Feng Z, 2006. The P53 pathway: what questions remain to be explored? Cell Death Differ, 13, 6, 1027-36.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. Science, 275, 5308, 1943-7.

Li J, Mizukami Y, Zhang X, Jo W-S, Chung DC, 2005. Oncogenic K-ras stimulates Wnt signaling in colon cancer through inhibition of GSK-3β. Gastroenterology, 128, 7, 1907-18.

Lin J, Chen Y, Wei L, Shen A, Sferra TJ, Hong Z, Peng J, 2013. Ursolic acid promotes colorectal cancer cell apoptosis and inhibits cell proliferation via modulation of multiple signaling pathwayst. J. Oncol, 43, 4, 1235-43.

Liu Y, Bodmer WF, 2006. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. Pnas, 103, 4, 976-81.

López I, Oliveira LP, Tucci P, Álvarez-Valín F, Coudry RA, Marín M, 2012. Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer. Gene, 499, 1, 81-7.

Losi, L., Roncucci, L., di Gregorio, C., de Leon, M. P., and Benhattar, J. (1996) K-ras and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. J Pathol, 178, 259 – 26.

Lotfollahzadeh S, Mr A, Mr MD, 2007. A study on therapeutic effects of Theranekron (Tarantula cubensis poison extract) on the Foot and Mouth Disease (FMD) lesions in cattle. VII. Ulusal Veteriner İç Hastal klar Kongresi, Kemer-Antalya, 5, 1-4.

Lowe SW, Sherr CJ, 2003. Tumor suppression by Ink4a–Arf: progress and puzzles. Curr Opin Genetics Dev, 13, 1, 77-83.

Lowy DR, Willumsen BM, 1993. Function and regulation of Ras. Annu. Rev. Biochem., 62, 1, 851-91.

Luna L, 1968. Routine staining procedures. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3, 33-46.

Luo J, Manning BD, Cantley LC, 2003. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. Cancer cell, 4, 4, 257-62.

Lynch HT, De la Chapelle A, 1999. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. J. Med. Genet, 36, 11, 801-18.

Macejova D, Brtko J, 2001. Chemically induced carcinogenesis: a comparison of 1-methyl-1-nitrosourea, 7, 12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (minireview). Endocr. Regul, 35, 1, 53-60.

Madsen KL, Jijon H, 2003. IL-10 and IL-2 Knockout Mice. In: Cytokine Knockouts. Eds: Springer, p. 237-51.

Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T, 2015. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9–mediated engineering of human intestinal organoids. Nat. Med, 21, 3, 256-62.

Mattiuzzi C, Lippi G, 2019. Current cancer epidemiology. Clin Epidemiol Glob Health, 9, 4, 217.

McCormick F, 1999. Signalling networks that cause cancer. Trends Genet., 15, 12, M53-M6.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. Bba-Mol Cell Res, 1773, 8, 1263-84.

Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC, 2006. Cancer as an evolutionary and ecological process. Nat. Rev. Cancer, 6, 12, 924-35.

Mezger J, 1977. Prospected homeopathic pharmaceutical product device. Issue II, 1418-21.

Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F, 2011. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. J Biomed Biotechnol, 2011.

Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D, 2012. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. J. Biotechnol, 2012.

Molenaar M, Van De Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destrée O, Clevers H, 1996. XTcf-3 transcription factor mediates β-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos. Cell, 86, 3, 391-9.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW, 1997. Activation of β-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β-catenin or APC. Science, 275, 5307, 1787-90.

Muller PA, Vousden KH, 2013. p53 mutations in cancer. Nat. Cell Biol, 15, 1, 2-8.

Muller PA, Vousden KH, 2014. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. Cancer cell, 25, 3, 304-17.

Munkholm P, 2003. The incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. Aliment. Pharmacol. Ther, 18, 1-5.

Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, 1998. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. J. Exp. Med, 188, 11, 2033-45.

Nakayama M, Oshima M, 2019. Mutant p53 in colon cancer. J. Mol. Cell Biol, 11, 4, 267-76.

Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, de Gramont A, 2015. Targeting the TGFβ pathway for cancer therapy. Pharmacol. Ther, 147, 22-31.

Norazalina S, Norhaizan M, Hairuszah I, Norashareena M, 2010. Anticarcinogenic efficacy of phytic acid extracted from rice bran on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. Toxicol. Pathol, 62, 3, 259-68.

O'Toole SM, Pegg AE, Swenberg JA, 1993. Repair of O6-methylguanine and O4-methylthymidine in F344 rat liver following treatment with 1, 2-dimethylhydrazine and O6-benzylguanine. Cancer res, 53, 17, 3895-8.

Okamoto M, Ohtsu H, Miyaki M, Yonekawa H, 1993. No allelic loss at the p53 locus in 1, 2-dimethylhydrazine-induced mouse colon tumors: PCR-SSCP analysis with sequence-tagged microsatellite site primers. Carcinogenesis, 14, 7, 1483-6.

Oren M, 2003. Decision making by p53: life, death and cancer. Cell Death Differ, 10, 4, 431-42.

Oren M, Rotter V, 2010. Mutant p53 gain-of-function in cancer. Cold Spring Harb. Perspect. Biol, 2, 2, a001107.

Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW, 1997. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of β-catenin. J. Biol. Chem, 272, 40, 24735-8.

Orlando FA, Tan D, Baltodano JD, Khoury T, Gibbs JF, Hassid VJ, Ahmed BH, Alrawi SJ, 2008. Aberrant crypt foci as precursors in colorectal cancer progression. J. Surg. Oncol, 98, 3, 207-13.

Otori, K., Konishi, M., Sugiyama, K., Hasebe, T., Shimoda, T., Kikuchi-Yanoshita, R., Mukai, K., Fukushima, S., Miyaki, M., and Esumi, H. (1998) Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. Cancer 83 , 896 – 900

Padua D, Massagué J, 2009. Roles of TGFβ in metastasis. Cell Res, 19, 1, 89-102.

Pallem PVSP, Bodiga S, Bodiga VL, 2020. Dietary phytate lowers K-ras mutational frequency, decreases DNA-adduct and hydroxyl radical formation in azoxymethane-induced colon cancer. Iran. J. Basic Med. Sci, 23, 1, 20.

Papageorgis P, 2015. TGFβ signaling in tumor initiation, epithelial-to-mesenchymal transition, and metastasis. J. Oncol, 2015.

Papanikolaou A, Wang Q-S, Papanikolaou D, Whiteley HE, Rosenberg DW, 2000. Sequential and morphological analyses of aberrant crypt foci formation in mice of differing susceptibility to azoxymethane-induced colon carcinogenesis. Carcinogenesis, 21, 8, 1567-72.

Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA, 1997. Cancer statistics, 1997. CA: Cancer J. Clin, 47, 1, 5-27.

Peifer M, Polakis P, 2000. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. Science, 287, 5458, 1606-9.

Perše M, Cerar A, 2010. Morphological and molecular alterations in 1, 2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. J. Biotechnol, 2011.

Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res, 29, 9, e45-e.

Pfaffl MW, Hageleit M, 2001. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. Biotechnol. Lett, 23, 4, 275-82.

Polakis P, 2000. Wnt signaling and cancer. Genes Dev, 14, 15, 1837-51.

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW, 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature, 359, 6392, 235-7.

Pruitt K, Der CJ, 2001. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. Cancer Lett, 171, 1, 1-10.

Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR, 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. Nature, 353, 6345, 670-4.

Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D, 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. Nat. Rev. Cancer, 11, 11, 761-74.

Qi J, Zhu Y-Q, Luo J, Tao W-H, 2006. Hypermethylation and expression regulation of secreted frizzled-related protein genes in colorectal tumor. World J. Gastroenterol., WJG, 12, 44, 7113.

Qureshi Uf, Aslam Mn, Ansarı Mn, Khan M, 2018. Role of Aspırın as Prophylaxıs agaınst Colorectal Cancer. J. Postgrad. Med, 29, 1, 16-9.

Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE, 2002. RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. Nature, 418, 6901, 934-.

Rasola A, Fassetta M, De Bacco F, D'alessandro L, Gramaglia D, Di Renzo MF, Comoglio P, 2007. A positive feedback loop between hepatocyte growth factor receptor and β-catenin sustains colorectal cancer cell invasive growth. Oncogene, 26, 7, 1078-87.

Reddy BS, 2004. Studies with the azoxymethane–rat preclinical model for assessing colon tumor development and chemoprevention. Environ. Mol. Mutagen., 44, 1, 26-35.

Refaat B, El-Shemi AG, Kensara OA, Mohamed AM, Idris S, Ahmad J, Khojah A, 2015. Vitamin D3 enhances the tumouricidal effects of 5-Fluorouracil through multipathway mechanisms in azoxymethane rat model of colon cancer. J. Exp. Clin. Cancer Res, 34, 1, 1-15.

Rennick DM, Fort MM, Davidson NJ, 1997. Studies with IL-10-/-mice: an overview. J. Leukoc. Biol., 61, 4, 389-96.

Richardson-Boedler C, 2002. The brown spider Loxosceles laeta: source of the remedy Tarentula cubensis? Homeopathy, 91, 03, 166-70.

Robson H, Anderson E, James RD, Schofield PF, 1996. Transforming growth factor β 1 expression in human colorectal tumours: an independent prognostic marker in a subgroup of poor prognosis patients. Br. J. Cancer, 74, 5, 753-8.

Rogers KJ, Pegg AE, 1977. Formation of O6-methylguanine by alkylation of rat liver, colon, and kidney DNA following administration of 1, 2-dimethylhydrazine. Cancer res, 37, 11, 4082-7.

Roncucci L, Stamp D, Medline A, Cullen JB, Bruce WR, 1991. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. Human pathology, 22, 3, 287-94.

Roncucci L, Medline A, Bruce WR, 1991. Classification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon. Cancer Epıdem Bıomar , 1, 1, 57-60.

Roman C, Saha D, Beauchamp RD, 2001. TGF-β and colorectal carcinogenesis. Microsc. Res. Tech, 52, 4, 450-7.

Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T, 2009. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. Carcinogenesis, 30, 2, 183-96.

Rowan A, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, Bicknell D, Bodmer W, Tomlinson I, 2000. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational “hotspot” and interdependence of the “two hits”. Pnas, 97, 7, 3352-7.

Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT, Smyrk TC, 2002. AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. Carcinogenesis, 23, 1, 201-5.

Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N, 2005. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53

mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. Am. J. Clin. Oncol, 23, 30, 7518-28.

Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH, 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. Curr. Opin. Cell Biol, 13, 3, 332-7.

Rychahou PG, Jackson LN, Silva SR, Rajaraman S, Evers BM, 2006. Targeted molecular therapy of the PI3K pathway: therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma. Ann. Surg., 243, 6, 833.

Saleh HA, Jackson H, Banerjee M, 2000. Immunohistochemical expression of bcl-2 and p53 oncoproteins: correlation with Ki67 proliferation index and prognostic histopathologic parameters in colorectal neoplasia. Appl Immunohısto M M , 8, 3, 175-82.

Samuels Y, Diaz Jr LA, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, Rago C, Huso DL, Lengauer C, Kinzler KW, 2005. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. Cancer Cell, 7, 6, 561-73.

Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK, 2012. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. Expert Opin. Ther. Targets, 16, 1, 103-19.

Sanz V, Arozarena I, Crespo P, 2000. Distinct carboxy-termini confer divergent characteristics to the mitogen-activated protein kinase p38α and its splice isoform Mxi2. Febs Lett, 474, 2-3, 169-74..

Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS, 2002. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. Nat. Cell Biol, 4, 11, 842-9.

Sever, R, Brugge, JS. 2015. Signal transduction in cancer. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 5(4), a006098.

Schubbert S, Shannon K, Bollag G, 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nat. Rev. Cancer, 7, 4, 295-308.

Schulz WA, 2007. Cancer pathways. Molecular Biology of Human Cancers: An Advanced Student's Textbook, 113-44.

Schulz WA, 2007. Cancer pathways. Molecular Biology of Human Cancers: An Advanced Student's Textbook, 278-271.

Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR, 2000. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. Genes Dev, 14, 19, 2501-14.

Segditsas S, Tomlinson I, 2006. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. Oncogene, 25, 57, 7531-7.

Sepporta MV, Fuccelli R, Rosignoli P, Ricci G, Servili M, Fabiani R, 2016. Oleuropein prevents Azoxymethane-induced Colon crypt dysplasia and leukocytes DNA damage in a/J mice. J. Med. Food, 19, 10, 983-9.

Seshagiri S, Stawiski EW, Durinck S, Modrusan Z, Storm EE, Conboy CB, Chaudhuri S, Guan Y, Janakiraman V, Jaiswal BS, 2012. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. Nature, 488, 7413, 660-4.

Shen J, Vakifahmetoglu H, Stridh H, Zhivotovsky B, Wiman K, 2008. PRIMA-1 MET induces mitochondrial apoptosis through activation of caspase-2. Oncogene, 27, 51, 6571-80.

Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ, 2000. Understanding Ras:'it ain't over'til it's over'. Trends Cell Biol, 10, 4, 147-54.

Shivapurkar N, Tang Z, Ferreira A, Nasim S, Garett C, Alabaster O, 1994. Sequential analysis of K-ras mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors induced by azoxymethane in Fischer-344 rats on high-risk diet. Carcinogenesis, 15, 4, 775-8.

Shivapurkar N, Belinsky SA, Wolf DC, Tang Z, Alabaster O, 1995. Absence of p53 gene mutations in rat colon carcinomas induced by azoxymethane. Cancer Lett, 96, 1, 63-70.

Song G, Lu Y, Yu Z, Xu L, Liu J, Chen K, Zhang P, 2019. The inhibitory effect of polysaccharide from Rhizopus nigricans on colitis-associated colorectal cancer. Biomed Pharmacother, 112, 108593.

Soravia C, Bapat B, Cohen Z, 1997. Familial adenomatous polyposis (FAP) and hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC): a review of clinical, genetic and therapeutic aspects. Schweiz. Med, 127, 16, 682.

Spencer E, Jiang J, Chen ZJ, 1999. Signal-induced ubiquitination of IκBα by the F-box protein Slimb/β-TrCP. Genes Dev, 13, 3, 284-94.

Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, Nik-Zainal S, Martin S, Varela I, Bignell GR, 2012. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. Nature, 486, 7403, 400-4.

Stevens RG, Swede H, Heinen CD, Jablonski M, Grupka M, Ross B, Parente M, Tirnauer JS, Giardina C, Rajan TV, 2007. Aberrant crypt foci in patients with a positive family history of sporadic colorectal cancer. Cancer Lett, 248, 2, 262-8.

Stommel JM, Wahl GM, 2004. Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. Embo Rep, 23, 7, 1547-56.

Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, 1998. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. Embo Rep, 17, 17, 5001-14.

Suzui M, Morioka T, Yoshimi N, 2013. Colon preneoplastic lesions in animal models J. Toxicol. Pathol, 26, 4, 335-41.

Syed V, 2016. TGF-β Signaling in Cancer. J. Cell. Biochem, 117, 6, 1279-87.

Takahashi M, Fukuda K, Sugimura T, Wakabayashi K, 1998. β-Catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. Cancer Res, 58, 1, 42-6.

Takahashi M, Mutoh M, Kawamori T, Sugimura T, Wakabayashi K, 2000. Altered expression of β-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. Carcinogenesis, 21, 7, 1319-27.

Takahashi M, Wakabayashi K, 2004. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. Cancer Sci, 95, 6, 475-80.

Takayama T, Okamura S, Okahisa T, Kaji M, Takeuchi H, Kimura T, 2008. Cancer chemoprevention-basic and clinical aspects. Gan to kagaku ryoho. Cancer Chemother. Pharmacol, 35, 7, 1067-71.

Tam SY, Wu VW, Law HK, 2019. Dynamics of oxygen level-driven regulators in modulating autophagy in colorectal cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun, 517, 2, 193-200.

Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H, 2003. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. Cancer Sci, 94, 11, 965-73.

Taupin D, Podolsky DK, 1999. Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. Gastroenterology, 116, 5, 1072-80.

Teo J-L, Kahn M, 2010. The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: a tale of two coactivators. Adv. Drug Deliv. Rev, 62, 12, 1149-55.

Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M, 2010. Inflammation and colon cancer. Gastroenterology, 138, 6, 2101-14. e5.

Tetsu O, McCormick F, 1999. β-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature, 398, 6726, 422-6.

Theodoratou E, Timofeeva M, Li X, Meng X, Ioannidis JP, 2017. Nature, nurture, and cancer risks: genetic and nutritional contributions to cancer. Annu. Rev. Nutr, 37, 293-320.

Toshiyuki M, Reed JC, 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell, 80, 2, 293-9.

Tuteja N, Ahmad P, Panda BB, Tuteja R, 2009. Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. Mutat Res Rev Mutat Res, 681, 2-3, 134-49.

Uhlirova M, Jasper H, Bohmann D, 2005. Non-cell-autonomous induction of tissue overgrowth by JNK/Ras cooperation in a Drosophila tumor model. Pnas, 102, 37, 13123-8.

Uyar A, Doğan A, Yaman T, Keleş ÖF, Yener Z, Çelik İ, Alkan EE, 2021. The Protective Role of Urtica dioica Seed Extract Against Azoxymethane-Induced Colon Carcinogenesis in Rats. Nutr. Cancer, 1-14.

Vasudevan KM, Burikhanov R, Goswami A, Rangnekar VM, 2007. Suppression of PTEN expression is essential for antiapoptosis and cellular transformation by oncogenic Ras. Cancer Res, 67, 21, 10343-50.

Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT, 2003. A second canon: functions and mechanisms of β-catenin-independent Wnt signaling. Dev. Cell , 5, 3, 367-77.

Venkatachalam K, Gunasekaran S, Namasivayam N, 2016. Biochemical and molecular mechanisms underlying the chemopreventive efficacy of rosmarinic acid in a rat colon cancer. Eur. J. Pharmacol., 791, 37-50.

Vincent TL, Gatenby RA, 2008. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. Int. J. Oncol, 32, 4, 729-37.

Vivanco I, Sawyers CL, 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer. Nat. Rev. Cancer, 2, 7, 489-501.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ, 2000. Surfing the p53 network. Nature, 408, 6810, 307-10.

Vogelstein B, Kinzler KW, 2004. Cancer genes and the pathways they control. Nat. Med., 10, 8, 789-99.

Wagner EF, Nebreda ÁR, 2009. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. Nat. Rev. Cancer, 9, 8, 537-49.

Waly MI, Ali A, Guizani N, Al-Rawahi AS, Farooq SA, Rahman MS, 2012. Pomegranate (Punica granatum) peel extract efficacy as a dietary antioxidant against azoxymethane-induced colon cancer in rat. Asian Pac. J., 13, 8, 4051-5.

Wang HL, Lopategui J, Amin MB, Patterson SD, 2010. KRAS mutation testing in human cancers: The pathologist's role in the era of personalized medicine. Adv. Anat. Pathol, 17, 1, 23-32.

Wang Y, Suh Y-A, Fuller MY, Jackson JG, Xiong S, Terzian T, Quintás-Cardama A, Bankson JA, El-Naggar AK, Lozano G, 2011. Restoring expression of wild-type p53 suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in mice with a p53 missense mutation. J Clin Invest, 121, 3, 893-904.

Waniczek D, Śnietura M, Młynarczyk-Liszka J, Pigłowski W, Kopeć A, Lange D, Rudzki M, Arendt J, 2013. PTEN expression profiles in colorectal adenocarcinoma and its precancerous lesions. Pol J Pathol, 64, 1, 15-20.

Wargovich MJ, Brown VR, Morris J, 2010. Aberrant crypt foci: the case for inclusion as a biomarker for colon cancer. Cancers, 2, 3, 1705-16.

Watanabe M, Ishiwata T, Nishigai K, Moriyama Y, Asano G, 2000. Overexpression of keratinocyte growth factor in cancer cells and enterochromaffin cells in human colorectal cancer. Pathol. Int, 50, 5, 363-72.

Watson AJ, Collins PD, 2011. Colon cancer: a civilization disorder. J. Dig. Dis, 29, 2, 222-8.

Weber GF, 2007. Molecular mechanisms of cancer, Springer Science & Business Media.

Willert K, Jones KA, 2006. Wnt signaling: is the party in the nucleus? Genes Dev, 20, 11, 1394-404.

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL, 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiological reviews, 79, 1, 143-80.

Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW, 1999. The SCFβ-TRCP–ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IκBα and β-catenin and stimulates IκBα ubiquitination in vitro. Genes Dev, 13, 3, 270-83.

Xi H-Q, Zhang K-C, Li J-Y, Cui J-X, Zhao P, Chen L, 2017. Expression and clinicopathologic significance of TUFM and p53 for the normal–adenoma–carcinoma sequence in colorectal epithelia. World J Surg Oncol, 15, 1, 90.

Xu K, Shu H-KG, 2007. EGFR activation results in enhanced cyclooxygenase-2 expression through p38 mitogen-activated protein kinase–dependent activation of the SP1/SP3 transcription factors in human gliomas. Cancer Res, 67, 13, 6121-9.

Yamada T, Takaoka AS, Naishiro Y, Hayashi R, Maruyama K, Maesawa C, Ochiai A, Hirohashi S, 2000. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/β-catenin complex in early colorectal carcinogenesis. Cancer Res, 60, 17, 4761-6.

Yamamoto S, Nishimura O, Misaki K, Nishita M, Minami Y, Yonemura S, Tarui H, Sasaki H, 2008. Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. Dev. Cell, 15, 1, 23-36.

Yang AD, Fan F, Camp ER, van Buren G, Liu W, Somcio R, Gray MJ, Cheng H, Hoff PM, Ellis LM, 2006. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. Clin. Cancer Res, 12, 14, 4147-53.

Yang L, Lin C, Liu Z-R, 2006. P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from β-catenin. Cell, 127, 1, 139-55.

Yang Y-P, Ting W-C, Chen L-M, Lu T-L, Bao B-Y, 2017. Polymorphisms in MicroRNA Binding Sites Predict Colorectal Cancer Survival., Int. J. Med. Sci, 14, 1, 53.

Yuan T, Cantley L, 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. Oncogene, 27, 41, 5497-510.

Yuen ST, Davies H, Chan TL, Ho JW, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Tsui WW, ChanAS, 2002. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. Cancer Res, 62, 22, 6451-5.

Zhan Q, 2005. Gadd45a, a p53-and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. Mutat Res-Fund Mol M, 569, 1-2, 133-43.

Zhang W, Liu HT, 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Res, 12, 1, 9-18.

Zhang B, Ougolkov A, Yamashita K, Takahashi Y, Mai M, Minamoto T, Kaname Y, Masayoshi M, Toshinari M, Yutaka T, (2004). B-catenin and ras oncogenes detect most human colorectal cancer, AACR, 64,7.

Zhang Y-J, Dai Q, Sun D-F, Xiong H, Tian X-Q, Gao F-H, Xu M-H, Chen G-Q, Han Z-G, Fang J-Y, 2009. mTOR signaling pathway is a target for the treatment of colorectal cancer. Ann. Surg. Oncol, 16, 9, 2617-28.

Zhang J, Roberts TM, Shivdasani RA, 2011. Targeting PI3K signaling as a therapeutic approach for colorectal cancer. Gastroenterology, 141, 1, 50-61.

Zhang Y-Z, Li Y-Y, 2014. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. World J. Gastroenterol, 20, 1, 91.

Zhao JJ, Liu Z, Wang L, Shin E, Loda MF, Roberts TM, 2005. The oncogenic properties of mutant p110α and p110β phosphatidylinositol 3-kinases in human mammary epithelial cells. Pnas , 102, 51, 18443-8.

Zhu JW, DeRyckere D, Li FX, Wan YY, DeGregori J, 1999. A role for E2F1 in the induction of ARF, p53, and apoptosis during thymic negative selection. Cancer Res, 10, 12, 829-38.