

Kolorektal Kanserde Rapamisin ve Vemurafenib'in Apoptotik Etkilerinin Karşılaştırılması

Hilal NAKKAŞ¹, Tuba ÖZDEMİR SANCI¹, Beyza Ecem ÖZ BEDİR², Emine TERZİ²

¹ Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Kolorektal kanser (KRK), dünyada en sık görülen üçüncü kanser türüdür. KRK'de ilk tedavi seçeneği cerrahi ve kemoterapidir. Ancak, kullanılan ilaçlara karşı gelişen direnç, uygulanan kemoterapinin başarısız olmasına yol açmaktadır. Son yıllarda yeni teröpatik ajan arayışları, KRK gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan farklı moleküler mekanizmalar üzerinde yoğunlaşmaktadır. mTOR ve MAPK sinyal yollarının KRK gelişiminde anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışmada, KRK hücrelerinde mTOR yolağı inhibitörü Rapamisin (RAPA) ve MAPK yolağı inhibitörü Vemurafenib (VMF)'in apoptoz üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, insan KRK hücrelerinde üretilen HT29 hücre hattı kültüre edilmiştir. RAPA ve VMF'nin HT29 KRK hücreleri üzerindeki uygun dozunun belirlenmesi için WST-1 testi ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi amacıyla da akım sitometrisi yöntemi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre, HT29 hücrelerine uygulanacak olan RAPA ve VMF dozu 24. saatte sırasıyla 46,97 μM ve 35,84 μM olarak bulunmuştur. HT29 hücrelerinde RAPA'nın apoptotik süreç üzerinde VMF'den daha etkin olduğu bulunmuştur (RAPA için; $p < 0.0001$, VMF için; $p < 0.01$). Sonuç olarak, çalışmamızda RAPA ve VMF'nin HT29 kolorektal kanser hücrelerinin canlılığını azalttığı ve apoptozu kaspaz 3/7 yolu ile indüklediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, mTOR, MAPK, Rapamisin, Vemurafenib.

Comparison of Apoptotic Effects of Rapamycin and Vemurafenib in Colorectal Cancer

ABSTRACT

The third most prevalent cancer in the world is colorectal cancer (CRC). Chemotherapy and surgery are the primary CRC treatments. Patients with CRC develop resistance to the chemotherapy treatments, which leads to the chemotherapy's failure. Due to this, various molecular processes that contribute to the development and progression of CRC have come into attention recently. mTOR and MAPK signaling pathways are crucial for the growth of CRC and mTOR pathway inhibitor RAPA and the MAPK pathway inhibitor VMF affected the apoptosis of CRC cells. Human CRC cells HT29 were cultured. The WST-1 test was used to identify the optimum dose of RAPA and VMF on HT29 CRC cells. To determine the apoptotic effects of RAPA and VMF on HT29 cells, flow cytometry was performed. Statistical significance level was accepted as $p \leq 0.05$. According to the data we obtained, the dose of RAPA and VMF to be applied to HT29 cells was found to be 46.97 μM and 35.84 μM , respectively, at the 24th hour. RAPA was found to have a greater impact on apoptosis in HT29 cells than VMF ($p < 0.0001$ for RAPA, $p < 0.01$ for VMF). In summary, our study found that RAPA and VMF decreased the viability of HT29 colorectal cancer cells and caused apoptosis via the caspase 3/7 pathway.

Keywords: Colorectal cancer, mTOR, MAPK, Rapamycin, Vemurafenib.

Geliş Tarihi: 16.Ekim.2023

Kabul Tarihi: 21.Kasım.2023

Dr. Emine TERZİ
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
Ankara
Tel: 0539 513 71 06
E-posta: emineterzi1990@hotmail.com

Yazarların ORCID Bilgileri:

Hilal NAKKAŞ: 0000-0003-0901-8875
Tuba ÖZDEMİR SANCI: 0000-0002-9468-4719
Beyza Ecem ÖZ BEDİR: 0000-0002-0596-834X
Emine TERZİ: 0000-0001-9106-3848

Kolorektal kanser (KRK), genetik ve çevresel etiyolojiye sahip olan kanser türlerinden biridir¹. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre KRK, dünyada en sık görülen üçüncü kanser türüdür². Tüm kanserlerin %10'u ve kanserden meydana gelen ölümlerin %9.4'ünü oluşturmaktadır³. KRK, kolon veya rektumda glandüler epitel hücrelerinin anormal çoğalmasından kaynaklanır. KRK, sporadik, kalıtsal ve kolitle ilişkili olabilir. Hem çevresel hem de genetik faktörler KRK gelişme riskini belirler. Uzun süredir devam eden ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olan hastalarda KRK gelişme riski yaşla birlikte artmaktadır⁴. KRK için ana risk faktörünün yaş olduğu belirtilmiştir. Beslenme ve fiziksel aktivite gibi yaşam tarzı ile ilişkili bazı aktiviteler de risk faktörleri arasındadır. Sigara ve alkol tüketiminin de KRK riskini arttırdığı gösterilmiştir⁵.

KRK'de teşhis, invaziv bir uygulama olan kolonoskopiye dayanır. Bunun yanında dışkıda gizli kan ve kan biyobelirteçleri (Karsinoembriyonik antijeni (CEA), Kanser antijen 19-9 (CA 19-9), C-Reaktif Protein (CRP)) KRK teşhisinde kullanılır⁶. KRK'de hastalar uzun yıllardır hastalığa karşı ilk basamak tedavi olarak bilinen cerrahi ve kemoterapiyle tedavi edilmektedir. İlk basamak ve adjuvan tedavideki gelişmeler KRK için hayatta kalma süresini artırmaktadır. KRK vakalarının yaklaşık dörtte birine ileri aşamada teşhis konulmaktadır, bu da cerrahi tedavi ile hastalığı kontrol altına almayı zorlaştırmaktadır. Bu nedenle kemoterapi tümörün küçültülmesine veya stabilize edilmesine yardımcı olmak için ameliyat ile kombine halde uygulanır⁷.

KRK'nin gelişiminde ve ilerlemesinde farklı moleküler mekanizmalar rol oynar. Genetik ve epigenetik değişiklikler, KRK'yı metastaz aşamasına ilerletebilen sinyal iletim yollarının aktivasyonuna yol açabilir⁸. Fosfatidilinositol-3-kinaz/Protein kinaz B/Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (PI3K/Akt/mTOR) sinyal yolağı hücre büyümesini, hareketliliğini, sağkalımını, metabolizmasını ve anjiyogenezini düzenleyip, tümör gelişimine katkıda bulunan hücre içi sinyal iletim yollarından birisidir⁹. Bu sinyal yolağında yer alan mTOR, kritik anabolik süreçleri uyararak, büyüme için besinleri ve hormonları tespit ederek ve çeşitli çevresel sinyallere yanıt vererek hücre büyümesini ve proliferasyonu kontrol eden bir serin/treonin protein kinazdır. mTOR'un kolorektal kanser tedavisi için etkili bir hedef olduğu *in vitro* ve klinik öncesi araştırmalarla kanıtlanmıştır. Bunun yanında mTOR inhibitörlerinin etkileri çeşitli KRK modellerinde de rapor edilmiştir¹⁰. *Streptomyces hygroscopicus* bakterisinden elde edilen bir antibiyotik olan Rapamisin (RAPA), bilinen en eski mTOR inhibitörüdür. RAPA, antifungal, immünosupresif ve antiproliferatif özellikleri olan bir ajandır. RAPA kullanımı 1999 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. RAPA ve analogları günümüzde kanser tedavisi için klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Klinik öncesi çalışmalarda, çeşitli kanserlerde antiproliferatif aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir¹¹. RAPA, umut verici bir kanser tedavisi seçeneğidir.

KRK hastalarının yaklaşık %10'unda BRAF mutasyonları bulunur ve ortalama sağkalım süresi bir yıldan kısa olup kötü bir prognozla karakterize edilir. BRAF mutasyonlu KRK tümörleri, KRK patogeneğinde klinik ve moleküler bir heterojenite ile karakterize edilir. BRAF mutasyonlarının KRK'de nadir olması nedeniyle, mevcut veriler yetersizdir ancak; KRK'nın iki farklı moleküler fenotipi tanımlanabilmiştir: BRAF V600E ve V600 mutasyona uğramamış¹². Ticari adı Zelboraf olan Vemurafenib (VMF), 2011 yılında FDA tarafından onay almış, primer hedefi B-Raf proteini olan ve BRAFV600E

mutasyonuna özgü kullanılan bir ilaçtır¹³. VMF, mutasyona uğramış BRAF monomerinin ATP bağlayıcı bölgesini bloke ederek Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağını inhibe eder^{14,15}. MAPK sinyal yolları, büyüme faktörleri tarafından aktive edilebilir ve ayrıca KRK gelişiminde anahtar rol oynamaktadır¹⁶. BRAF mutasyonunu taşıyan melanom hücrelerinin VMF'ye güçlü bir yanıt vermesine karşın, KRK hücrelerinin VMF'ye yanıt vermediği yapılan çalışmalarda görülmüştür. Bu nedenle BRAF mutasyonunu taşıyan KRK'nin tedavisi için VMF ve Epidermal büyüme faktörü (EGFR)'den oluşan bir kombinasyon terapisi geliştirilmiştir¹⁷.

Bu çalışmada, kültüre edilen HT29 kolorektal kanser hücrelerine mTOR yolağı inhibitörü RAPA ve MAPK yolağı inhibitörü VMF uygulanmıştır. RAPA ve VMF'nin kolon kanseri hücrelerinde apoptoz sürecine olan etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ek olarak, bu inhibitörlerin, kolorektal kanser hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü

İnsan KRK hücreleri HT29, Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonun'dan (ATCC, HTB-38TM) satın alınmıştır. HT29 hücreleri BRAFV600E mutasyonu barındırır. %10 Fetal Bovin Serum (FBS, sıcaklık inaktif, Capricorn, CP17-1756), %1 penisilin-streptomisin (Capricorn, CP17-1828) ve %1 non-esansiyel aminoasit (Biowest, MS00LD2019) içeren yüksek glikoz DMEM (Biowest, L0102) besiyerinde 37°C ve %5 CO₂ koşullarında kültüre edilmiştir. Besiyeri, iki günde bir değiştirilmiştir. Hücrelerin yoğunluğu %80-90'a ulaştığında pasajlama yapılmıştır. Pasajlama yaparken hücreleri kaldırmak için Tripsin-EDTA (Gibco, 25200-056) kullanılmıştır.

Inhibitörlerin Hazırlanması

RAPA ve VMF, sırasıyla Cayman Chemical ve SelleckChem'den satın alınmıştır. Bu inhibitörlerin stok çözeltileri 300 µM olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu inhibitörler, 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM'lık konsantrasyonlarda 24. ve 48. saatlerde test edilmiştir.

Sitotoksikite Analizi

RAPA ve VMF, HT29 kolorektal kanser hücreleri üzerindeki etkin dozunun belirlenmesi için 2- (4-iyodofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disülfenil) -2 H tetrazolyum monosodyum tuzu (WST-1) testi kullanılmıştır. Bu test, tetrazolyum tuzu olan WST-1'in, mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından formazan kristallerine dönüştürülmesi prensibine dayanır. HT29 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara ekilip inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelere sırasıyla 0, 2.5,

KRK'da RAPA ve VMF'nin Apoptotik Etkileri

5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM'lık konsantrasyonlarda hazırlanan RAPA ve VMF uygulanmıştır. Hücre canlılığı 24. ve 48. saatlerde değerlendirilmiştir. Her bir kuyucuğa 10 µL WST-1 solüsyonu (Cayman Chemical, 10008883) ilave edilip hücreler, 37°C'de 2-4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Testin son aşamasında 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Hücrelerin %50'sini inhibe eden inhibitör dozu (IC₅₀) değerleri Graphpad Prism 9.1.0 programında hesaplanmıştır.

Annexin V/PI Analizi

RAPA ve VMF 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM dozlarında HT29 hücrelerine uygulanarak 24 ve 48 saat süreyle muamele edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılmıştır. Toplanan tüm hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 1:1 oranında bağlama tamponu eklenmiştir. Hücreler 12x75 mm'lik polistren bir tüpe alınmıştır. Daha sonra, 1X Annexin Binding buffer ile 5'er µl Annexin V-Floresan İzotiyosiyanat (Annexin V-FITC) ve Propidyum İyodür (PI) eklenmiştir. Hücreler, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra ACEA novocyte akım sitometri cihazı (Agilent) ile ölçüm yapılmıştır. Analizler sonrasında canlı olan hücreler PI (-), Annexin V (-); erken apoptotik hücreler PI (-), Annexin V (+); geç apoptotik hücreler PI (+), Annexin V (+) ve nekrotik hücreler PI (+), Annexin V (-) şeklinde değerlendirmeye alınmıştır.

Kaspaz 3/7 Analizi

HT29 hücrelerinin kaspaz 3/7 apoptotik yolağını kullandığını göstermek için The Muse® Caspase-3/7 Kiti kullanılmıştır. HT29 hücreleri RAPA ve VMF ile muamele edilip inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, toplanan canlı ve ölü hücreler Muse Caspase-3/7 kiti protokolüne göre çalışılmıştır. ACEA Novocyte (Agilent) akım sitometri cihazında ölçüm yapılmıştır.

İstatistiksel Analiz

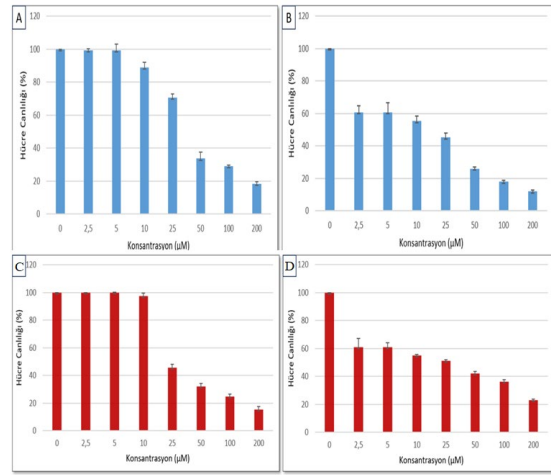
İstatistiksel analiz, Student's t testi ve two way ANOVA kullanılarak GraphPad Prism 9.1.0 programında yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

RAPA ve VMF'nin HT-29 kolorektal kanser hücreleri üzerine olan etkin dozunun belirlenmesi

HT-29 kolorektal kanser hücrelerine 24. ve 48. saat dilimlerinde 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM dozlarında RAPA ve VMF uygulaması yapılmıştır ve hücreler için uygun olan sitotoksik doz belirlenmiştir. WST-1 sonuçlarına göre RAPA ile 24 saat muamele edilen HT-29 hücreleri için 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında sırasıyla canlılık

oranları %100, %99, %99, %89, %70, %33, %29 ve %18 olarak bulunmuştur (Şekil 1A). RAPA ile 48 saat muamele edilen HT-29 hücreleri için 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında sırasıyla canlılık oranları %100, %60, %60, %55, %44, %26, %18 ve %12 olarak bulunmuştur (Şekil 1B). VMF ile 24 saat muamele edilen HT-29 hücreleri için 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında sırasıyla canlılık oranları %100, %100, %100, %97, %45, %32, %24 ve %15 olarak bulunmuştur (Şekil 1C). VMF ile 48 saat muamele edilen HT-29 hücreleri için 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında sırasıyla canlılık oranları %100, %61, %61, %55, %51, %42, %36 ve %23 olarak bulunmuştur (Şekil 1D). Bu verilere göre HT-29 hücrelerine uygulanacak olan RAPA ve VMF dozları 24. saatte sırasıyla 46,97 ve 35,84 µM olarak bulunmuştur.



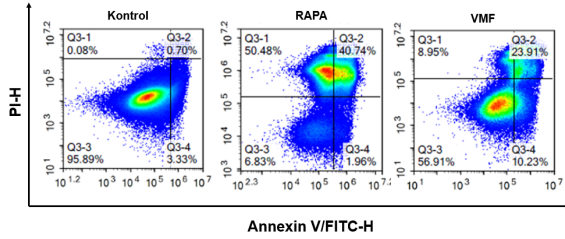
Şekil 1.

A. Farklı konsantrasyonlarda RAPA ile 24 saat müdahale edilmiş HT29 hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği. **B.** Farklı konsantrasyonlarda RAPA ile 48 saat müdahale edilmiş HT29 hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği. **C.** Farklı konsantrasyonlarda VMF ile 24 saat müdahale edilmiş HT29 hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği. **D.** Farklı konsantrasyonlarda VMF ile 48 saat müdahale edilmiş HT29 hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği.

RAPA ve VMF'nin HT-29 hücrelerinin canlılığı ve apoptozu üzerine olan etkilerinin Annexin V/PI Analizi ile Belirlenmesi

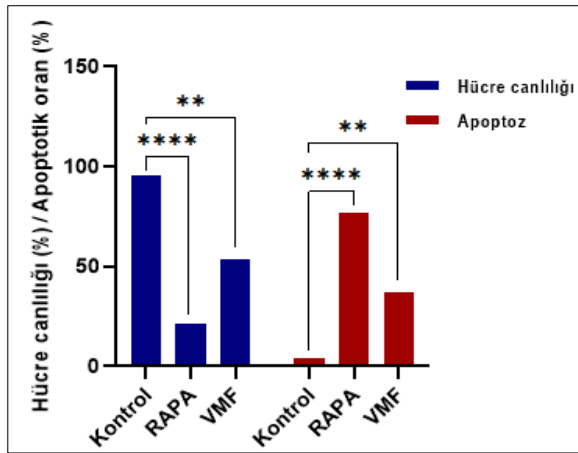
RAPA ve VMF'nin HT-29 hücrelerinde apoptoz ve hücre canlılığı üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için propidyum iyodür (PI) ve Annexin V/FITC kullanılarak akım sitometrisi yapılmıştır (Şekil 2). Hücreler kontrol grubu, RAPA uygulanan grup ve VMF uygulanan grup olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. RAPA ve VMF uygulanmış gruplar

kontrol grubuyla kıyaslandığında apoptozda anlamlı bir şekilde artış görülmüştür. Ancak RAPA'daki artış VMF'den daha anlamlı bulunmuştur (RAPA için; $p < 0.0001$, VMF için; $p < 0.01$). Ayrıca, RAPA ve VMF uygulanan HT-29 hücrelerinde hücre canlılığında anlamlı bir şekilde azalma gözlenmiştir. Ancak RAPA'daki azalma VMF'den daha anlamlı bulunmuştur (RAPA için; $p < 0.0001$, VMF için; $p < 0.01$) (Şekil 3).



Şekil 2.

RAPA ve VMF'nin HT29 kolorektal kanser hücrelerinde Annexin V-PI boyaması yapılarak apoptoz üzerine etkilerinin belirlenmesi.

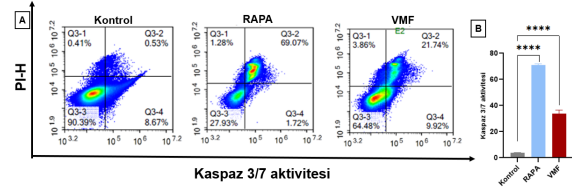


Şekil 3.

RAPA ve VMF, HT29 kolorektal kanser hücrelerinde hücre canlılığını azaltır (RAPA için; $p < 0.0001$, VMF için; $p < 0.01$). RAPA ve VMF, HT29 kolorektal kanser hücrelerinde apoptozu uyarır (RAPA için; $p < 0.0001$, VMF için; $p < 0.01$).

RAPA ve VMF'nin HT-29 kolorektal kanser hücre ölümü üzerindeki etkisinin kaspaz 3/7 Analizi ile Belirlenmesi

Annexin V/PI analizleri sonrasında akım sitometrisi ile kontrol grubu, RAPA uygulanan ve VMF uygulanan gruplarda kaspaz 3/7 aktivasyonuna bakılmıştır. RAPA uygulanan ve VMF uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış kaspaz 3/7 aktivitesi görülmüştür ($p < 0.0001$) (Şekil 4).



Şekil 4.

A) HT29 kolorektal kanser hücrelerine uygulanan RAPA ve VMF'nin kaspaz 3/7 aktivitesi üzerine etkilerinin akım sitometrisi ile gösterilmesi. B) RAPA ve VMF, HT29 kolorektal kanser hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesini arttırmıştır ($p < 0.0001$).

Tartışma ve Sonuç

KRK, dünyadaki en ölümcül ve en yaygın maligniteler arasında yer almaktadır. Cerrahi ve kemoterapi uzun süredir KRK hastaları için ilk tercih olmuştur. Ancak KRK'nın prognozu, özellikle metastatik lezyonları olan hastalar için hiçbir zaman tatmin edici olmamıştır¹⁸. PI3K/Akt/mTOR ve MAPK yolağı gibi birçok onkogenik sinyal yolağı KRK'nın başlamasına, prognozuna ve migrasyonuna aracılık eder. Eğer bu sinyal yollarının spesifik biyolojik etkileşimlerine tamamen müdahale edilebilirse KRK tedavisinde önemli bir adım atılmış olabilir¹⁹. Mevcut veriler bu yolakları inhibe ettiği bilinen sayılı sayıda inhibitörün klinikte kullanıldığını ifade etmektedir. Diğer ajanların büyük bir kısmı klinik öncesi veya deneme aşamasında kalmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda FDA onaylı inhibitörlerin kolorektal kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini karşılaştırdık.

RAPA, *Streptomyces hygroscopicus*'tan elde edilen ve antifungal özellikleri olduğu bilinen bir metabolittir. Daha sonra bu metabolitin memeli hücrelerinde immüsupresan ve antiproliferatif özelliklere sahip olduğu keşfedilmiştir. RAPA, FK506 koruyucu protein olan FKBP12 ile PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunda yer alan mTOR proteininin alt birimi olan FK506'ya bağlanarak inhibisyon gerçekleştirir. RAPA'nın antitümör potansiyeli oldukça ilgi çekmektedir. Günümüzde RAPA ve türevlerinin antikanser ajan olarak kliniklerde kullanımı yaygındır²⁰. Alayev ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada meme kanserinde RAPA'nın resveratrol ile kombine uygulamasının Akt aktivasyonunun ve otofajinin düzenlenmesini önleyerek apoptozu neden olduğunu göstermektedir²¹. Dai ve ark.'ları ise, RAPA'nın pankreatik kanser hücrelerinde proliferasyonu etkili bir şekilde inhibe edebildiğini ve apoptoz ve otofajiyi indükleyebildiğini göstermiştir²². Shafer ve ark.'ları ise RAPA'nın endometriyal kanser hücrelerinde paklitakselin etkilerini hücre çoğalmasının inhibisyonu ve apoptozun uyarılması yoluyla güçlendirdiğini gösterilmiştir²³. RAPA'nın KRK üzerindeki ilk antiproliferatif etkisi Eng ve

KRK'da RAPA ve VMF'nin Apoptotik Etkileri

ark.ları tarafından gösterilmiştir²⁴. Li ve ark.ları ise RAPA'nın kolon kanseri hücreleri olan HCT-116 hücrelerinin apoptozunu indüklediğini belirtmiştir²⁵.

VMF, B-Raf mutasyonu olan kanserlerde onaylanmış ilk FDA onaylı ilaçtır. Mutant B-Raf proteini, tüm melanomların yaklaşık yarısı dahil olmak üzere tüm solid tümörlerin %6-8'inde bulunur. Klinik öncesi çalışmalar VMF'nin metastatik melanomlu hastalarda kullanılmasını desteklemiştir. Daha sonra B-Raf mutant metastatik melanomun tedavisi için VMF kullanımının onayı alınmıştır²⁶. VMF'nin antikanser etkisinin en fazla BRAFV600E mutasyonu barındıran metastatik melanomlu hastalarda görüldüğü rapor edilmiştir. Diğer kanser türlerindeki etkileri ise henüz tam olarak bilinmemektedir. Kopetz ve ark.ları yaptıkları çalışmada VMF'nin BRAFV600E mutasyonu barındıran KRK'lı hastalardaki etkisini görmeyi amaçlamıştır. Çalışmanın sonucunda VMF'nin KRK'lı hastalarda metastatik melanomlu hastalarda olduğu kadar anlamlı bir klinik aktivite göstermediği belirtilmiştir²⁷. Hu ve ark.ları VMF'nin tek yada başka ajanlarla kombine halinde kullanımının KRK hücrelerinde apoptozu indükleyeceğini göstermiştir²⁸. Hong ve ark.ları, Vemurafenib'in Cetuximab ve İrinotekan ile kombine halinde kullanımının hastaların sağkalımını artırdığını belirtmişlerdir²⁹. Zhi ve ark.'larının yaptıkları çalışmada PHA-665752 ve vemurafenib ile kombine tedavi, in vitro ve in vivo CRC hücre büyümesini, her iki ajanın tek başına kullanıldığı tedaviye göre daha etkili bir şekilde baskılamıştır. Bu yaklaşımın BRAFV600E mutasyonu olan KRK hastalarının tedavisinde etkili bir yaklaşım olabileceği belirtilmiştir³⁰.

Yaptığımız çalışmada yukarıda bahsedilen PI3K/Akt/mTOR ve MAPK yolağının FDA onaylı inhibitörleri olan RAPA ve VMF'nin HT-29 kolon kanseri üzerindeki apoptotik etkilerinin karşılaştırmayı amaçladık. Ayrıca kaspaz 3-7 aktivite seviyelerini belirledik. Literatürde daha önce bu iki inhibitörün apoptoz üzerine olan etkilerini karşılaştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmanın sonucunda yukarıda bahsedilen çalışmalara paralel olarak RAPA'nın HT-29 hücrelerinde VMF'ye göre apoptozu daha anlamlı bir şekilde indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca hem RAPA hem de VMF uygulanan hücre gruplarında Kaspaz 3/7 aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur. Bu da apoptozun Kaspaz 3/7 yolu ile indüklediğini göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda RAPA ve VMF'nin HT29 kolorektal kanser hücrelerinin canlılığını azalttığı ve apoptozu kaspaz 3/7 yolu ile indüklediği görülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde, RAPA'nın HT29 kolorektal kanser hücrelerine uygulandığında oldukça etkili sonuçlar verdiğini tespit ettik. Çalışmamız literatürdeki ilişkili çalışmalarla

uyumlu olup gelecek çalışmalara ışık tutacak niteliktedir. Bunlara ek olarak, kolorektal kanser hücrelerine farklı kemoterapötik ajanların tek ve/veya kombine halde uygulanması kolon kanserinin klinik öncesi çalışmaları için yol gösterici olacaktır.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Çalışmamızda hücre kültürü yapıldığı için etik kurul onayına ihtiyaç duyulmamıştır.

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: H.N., E.T.; Veri toplama ve işleme: B.E.Ö.B., T.Ö.S, E.T.; Analiz ve verilerin yorumlanması: H.N., B.E.Ö.B., T.Ö.S, E.T.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: B.E.Ö.B., E.T.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Makale Yazarlarının destek ve teşekkür beyanı yoktur.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Katsaounou K, Nicolaou E, Vogazianos P, Brown C, Stavrou M, Teloni S, Hatzis P, Agapiou A, Fragkou E, Tsiaoussis G, Potamitis G, Zaravinos A, Andreou C, Antoniadis A, Shiammas C, Apidianakis Y. Colon Cancer: From Epidemiology to Prevention. *Metabolites*. 2022 May 30;12(6):499
2. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec;16(12):713-732. doi: 10.1038/s41575-019-0189-8.
3. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021 Apr 5.
4. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi J, John A, Lim YC, Kibria KMK, Mohiuddin AKM, Ming LC, Goh KW, Hadi MA. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar 29;14(7):1732. doi: 10.3390/cancers14071732
5. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 19;18(1):197. doi: 10.3390/ijms18010197.
6. Karl J, Wild N, Tacke M, Andres H, Garczarek U, Rollingner W, et.al. Improved diagnosis of colorectal cancer using a combination of fecal occult blood and novel fecal protein markers. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Oct;6(10):1122-8.
7. Messersmith WA. NCCN Guidelines Updates: Management of Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2019 May 1;17(5.5):599-601. doi: 10.6004/jnccn.2019.5014.
8. Farooqi AA, de la Roche M, Djamgoz MBA, Siddik ZH. Overview of the oncogenic signaling pathways in colorectal cancer: Mechanistic insights. *Semin Cancer Biol*. 2019 Oct;58:65-79.
9. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer*. 2019 Feb 19;18(1):26. doi: 10.1186/s12943-019-0954-x.
10. Afzal O, Altamimi ASA, Mubeen B, Alzarea SI, Almalki WH, Al-Qahtani SD, Atiya EM, Al-Abbasi FA, Ali F, Ullah I, Nadeem MS, Kazmi I. mTOR as a Potential Target for the Treatment of Microbial Infections, Inflammatory Bowel

- Diseases, and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 18;23(20):12470. doi: 10.3390/ijms232012470.
11. Hua H, Kong Q, Zhang H, Wang J, Luo T, Jiang Y. Targeting mTOR for cancer therapy. *J Hematol Oncol.* 2019 Jul 5;12(1):71. doi: 10.1186/s13045-019-0754-1.
 12. Caputo F, Santini C, Bardasi C, Cerma K, Casadei-Gardini A, Spallanzani A, Andrikou K, Cascinu S, Gelsomino F. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 28;20(21):5369. doi: 10.3390/ijms20215369.
 13. Hertzman Johansson C, Egyhazi Brage S. BRAF inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics,* 2014, 142(2):176-82.
 14. Roskoski R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacological Research,* 2019, 144:19-50.
 15. Zaman A, Wu W, Bivona TG. Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future, *Cancers (Basel),* 2019, 11(8):1197.
 16. Stefani C, Miricescu D, Stanescu-Spinu II, Nica RI, Greabu M, Totan AR, Jinga M. Growth Factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK Signaling Pathways in Colorectal Cancer Pathogenesis: Where Are We Now? *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 23;22(19):10260. doi: 10.3390/ijms221910260.
 17. Kikuchi K, Hoshino D. Sensitization of HT29 colorectal cancer cells to vemurafenib in three-dimensional collagen cultures. *Cell Biol Int.* 2020 Feb;44(2):621-629. doi: 10.1002/cbin.11262.
 18. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Mar 20;5(1):22. doi: 10.1038/s41392-020-0116-z.
 19. Tiwari A, Saraf S, Verma A, Panda PK, Jain SK. Novel targeting approaches and signaling pathways of colorectal cancer: An insight. *World J Gastroenterol.* 2018 Oct 21;24(39):4428-4435. doi: 10.3748/wjg.v24.i39.4428.
 20. Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab.* 2014 Mar 4;19(3):373-9. doi: 10.1016/j.cmet.2014.01.001.
 21. Alayev A, Berger SM, Kramer MY, Schwartz NS, Holz MK. The combination of rapamycin and resveratrol blocks autophagy and induces apoptosis in breast cancer cells. *J Cell Biochem.* 2015 Mar;116(3):450-7.
 22. Dai ZJ, Gao J, Ma XB, Kang HF, Wang BF, Lu WF, et.al. Antitumor effects of rapamycin in pancreatic cancer cells by inducing apoptosis and autophagy. *Int J Mol Sci.* 2012 Dec 21;14(1):273-85.
 23. Shafer A, Zhou C, Gehrig PA, Boggess JF, Bae-Jump VL. Rapamycin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. *Int J Cancer.* 2010 Mar 1;126(5):1144-54.
 24. Eng CP, Sehgal SN, Vézina C. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo).* 1984 Oct;37(10):1231-7. doi: 10.7164/antibiotics.37.1231.
 25. Li S, Yang G, Zhu X, Cheng L, Sun Y, Zhao Z. Combination of rapamycin and garlic-derived S-allylmercaptocysteine induces colon cancer cell apoptosis and suppresses tumor growth in xenograft nude mice through autophagy/p62/Nrf2 pathway. *Oncol Rep.* 2017 Sep;38(3):1637-1644.
 26. Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K, Hirth P. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Nov;11(11):873-86. doi: 10.1038/nrd3847.
 27. Kopetz S, Desai J, Chan E, Hecht JR, O'Dwyer PJ, Maru D, Morris V, Janku F, Dasari A, Chung W, Issa JP, Gibbs P, James B, Powis G, Nolop KB, Bhattacharya S, Saltz L. Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2015 Dec 1;33(34):4032-8. doi: 10.1200/JCO.2015.63.2497.
 28. Hu M, Yu Z, Mei P, Li J, Luo D, Zhang H, Zhou M, Liang F, Chen R. Lycorine Induces autophagy-associated apoptosis by targeting MEK2 and enhances vemurafenib activity in colorectal cancer. *Aging (Albany NY).* 2020 Jan 3;12(1):138-155. doi: 10.18632/aging.102606.
 29. Hong DS, Morris VK, El Osta B, Sorokin AV, Janku F, Fu S, et.al. Phase IB Study of Vemurafenib in Combination with Irinotecan and Cetuximab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer with BRAFV600E Mutation. *Cancer Discov.* 2016 Dec;6(12):1352-1365.
 30. Zhi J, Li Z, Lv J, Feng B, Yang D, Xue L, et.al. Effects of PHA-665752 and vemurafenib combination treatment on in vitro and murine xenograft growth of human colorectal cancer cells with BRAFV600E mutations. *Oncol Lett.* 2018 Mar;15(3):3904-3910.