



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

**Kolorektal Kanserde Nilco İnhibisyonunun, Çoklu İlaç
Direncinden Sorumlu Genler Üzerine Olası Etkileri**

Proje No: 202011D11

HIZLI DESTEK Proje

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Adı Soyadı: Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP
Birimi/Bölümü: Tıp Fakültesi/Temel Tıp

Araştırmacılar

Araş. Gör. Mete ÖZKURT, Yüksek lisans öğrencisi Aysel GÜLTEKİN
Birimi/Bölümü: Tıp Fakültesi/Temel Tıp

Aralık 2021

ESKİŞEHİR

TEŞEKKÜR

Bu çalışma ESOGÜ BAP Birimi tarafından desteklenmiştir. Bu desteği nedeniyle T.C. ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ' ne teşekkür ederiz. Projede Yürütücü olarak Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP, Araştırmacı olarak Araş. Gör. Dr. Mete ÖZKURT, Yüksek lisans öğrencisi Aysel GÜLTEKİN görev almıştır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No:
ÖZET.....	5
ABSTRACT	6
GİRİŞ.....	7
GENEL BİLGİLER.....	8
GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
BULGULAR.....	14
TARTIŞMA.....	30
SONUÇ	36
REFERANSLAR	37

ÖZET

Kolorektal kanser (KRK), dünya çapında kanser türleri arasında erkek ve kadınlarda ikinci sırada ölüme neden olmaktadır. KRK tedavisinde kemoterapi önemli rol oynar ve bunun etkinliğini de kemoterapötik ajana karşı gelişen çoklu ilaç direnci (Multidrug Resistance, MDR) etkiler. MDR, kemoterapi tedavisinin önünde bir engel oluşturarak kanser gelişimi ve hastanın sağ kalım oranını büyük ölçüde etkiler. Bu direnci açıklayan ana mekanizmalardan birisi ABC transmembran proteinleri ile ilişkilidir. Bu transmembran proteinleri kemoterapötik ajanların hücre dışına doğru akışına neden olarak hücrenin hayatta kalmasını sağlar. ABC transmembran ailesinden birisi olan MDR1 geni ve onun kodladığı P-glikoprotein ekspresyon seviyelerindeki artış birçok kanserde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bazı çalışmalarda çoklu ilaç direncini azaltmak ve kemoterapinin etkinliğini artırmak için kemoterapi ve siRNA aracılı gen susturma yöntemi birlikte kullanılmıştır.

Literatürde kanser hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, anjiyojenez ve metastazında etkili olduğu gösterilen Notch, IL-1 ve leptin (NILCO) genleri arasındaki etkileşim ve aşırı ekspresyonlarının KRK dahil birçok kanser türünde önemli olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda Caco-2 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatlarında, Notch, IL-1 ve leptin genleri siRNA ile tek tek susturularak kemorezistans rol oynayan MDR1 ve NILCO gen ekspresyonlarındaki değişimi göstermeyi hedefledik. Aynı zamanda, NILCO ilişkili genlerin çeşitli kanser türlerinde MMP2 ve VEGFA'nın aşırı ekspresyonuna neden olarak hücre invazivliği ve anjiyojenezini indüklediği bildirilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda MMP2 ve VEGFA mRNA düzeylerinin analizi de hedeflenmiştir.

Sonuçlarımıza göre; NILCO etkileşiminde rol oynayan genlerin siRNA ile susturulması sonucunda kemoterapötik ajan olarak Paclitaxel (PTX) uyguladığımız hücrelerdeki MDR1 gen ekspresyonu, NILCO genlerinin siRNA ile susturulduğu hücrelerde azalmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, kolorektal kanser gelişimi üzerinde rol oynayan NILCO'nun MDR1 ekspresyonu üzerindeki etkisine dair literatüre bilgi kazandıracak gibi kolon kanserinde gelişen kemorezistans ile başa çıkabilmek için bu hedef yolların inhibisyonu ve MDR ilişkisi göz önüne alınarak yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesine olanak sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, KRK, Notch, Leptin, IL-1, NILCO, çoklu ilaç direnci, MDR, Paclitaxel, PTX

ABSTRACT

Chemotherapy is the most commonly used treatment in management of CRC and multidrug resistance (MDR) reduces the effectiveness of chemotherapeutic agents. Development of MDR causes shorter patient survival along with relapse in treatment. One of the main mechanisms explaining this resistance is associated with ABC transmembrane proteins. These transmembrane proteins ensures cell survival by causing chemotherapeutic agents to flow out of the cell. Increased expression levels of the MDR1 gene has been associated with poor prognosis in many cancers. Combination of chemotherapy and siRNA-mediated gene silencing to reduce multidrug resistance and increase sensitivity to chemotherapy is successful therapeutic strategie to overcome MDR.

It has been reported that the interaction and overexpression of Notch, IL-1 and leptin (NILCO) genes, which have been shown to be effective in proliferation, migration, angiogenesis and metastasis of cancer cells, are important in many cancer types, including CRC. The relationship between Notch, IL-1, leptin and MDR, which may cause chemoresistance in colorectal cancer, has not been fully understand. We aimed to show the changes in MDR1 and NILCO gene expressions, which play a role in chemoresistance, by silencing the Notch, IL-1 and leptin genes one by one with siRNA in Caco-2 and HT-29 colorectal cancer cell lines. At the same time, it has been reported that NILCO-related genes induce cell invasiveness and angiogenesis by causing overexpression of MMP2 and VEGFA in various cancer types. Therefore, the analysis of MMP2 and VEGFA mRNA levels was also targeted in our study.

Knockdown of NILCO genes with siRNA decreased MDR1 gene expression in cells treated with Paclitaxel (PTX). Based on our results; NILCO is a potential biomarker for chemoresistance considering NILCO-knockdown regulates MDR expression and targeting NILCO may be a promising approach for overcoming resistance to thereapies in colorectal cancer.

Keywords: Colorectal cancer, CRC, Notch, Leptin, IL-1, NILCO, multidrug resistance, MDR, Paclitaxel, PTX

1. GİRİŞ

Çoklu ilaç direnci, kanser hastalarının kemoterapötik tedavisinin etkinliğini azaltan önemli bir sorundur. Bazı kanser hücreleri kemoterapötik ajanlara karşı başlangıçta dirençli olurken bazıları kullanılan kemoterapötik ajana uzun süreli maruz kaldıktan sonra direnç geliştirir. İlaç direncine farklı mekanizmalar aracılık etmekle birlikte ABC ailesinin taşıyıcıları direnç gelişiminde etkin rol oynamaktadır. Kanser ilerlemesinde ve tedavisinde önemli etkileri olan P-glikoprotein, ABC ailesine aittir ve MDR1 geni tarafından kodlanır. MDR1 geninin ekspresyonundaki artış birçok kanser türünde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir.

Kolorektal kanser de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalarda Notch, leptin ve IL-1 etkileşiminin (NILCO) kanser hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu ve metastazında ayrıca pro-anjiyojenik moleküllerin ekspresyonlarında etkili rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca leptin tarafından indüklenen NILCO'nun endometriyal kanser hücrelerinde kemorezistansda etkili olduğu, leptin inhibitörü verildiğinde ise hücrelerin kemoterapötik ajana karşı duyarlılığının arttığı bildirilmiştir. Bu amaçla kolorektal kanser hücre hatlarında Notch, IL-1 ve leptin genleri siRNA ile tek tek susturularak MDR1 gen ekspresyon değişiminin nasıl etkileyeceğine dair bir çalışma planladık. Çalışmamızda Caco-2 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatlarında NILCO inhibisyonunun MDR1 ve bu yolaktaki hedef genler üzerine etkileri mRNA düzeyinde ve HT-29 için protein düzeyinde de analiz edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, KRK'de rol oynayan NILCO'nun MDR1 ekspresyonu üzerine olan etkisine dair literatüre bilgi kazandıracağı gibi kolon kanserinde gelişen kemorezistansın düzenlenmesinde bu hedef yolların inhibisyonu ve MDR ilişkisi göz önüne alınarak yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesine olanak sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Kolorektal kanser, dünya çapında kanser türleri arasında hem erkek hem de kadınlarda sıklık açısından üçüncü, mortalite açısından ikinci sırada yer almaktadır (Bray vd., 2018). Kemoterapi, kolorektal kanser tedavisinde kullanılan tedavi türlerinden biri olmakla birlikte, kemoterapinin başarısını etkileyen birçok faktör bulunur. Bu faktörlerden en önemlisi tedaviye karşı gelişen çoklu ilaç direncidir. (MDR, multidrug resistance). İlaça olan dirençlilik, kemoterapinin etkinliğini azaltarak hastanın klinik durumunu kötü etkileyebilir (Szakács, Paterson, Ludwig, Booth-Genthe ve Gottesman, 2006; Zheng, 2017). Çoklu ilaç direncine neden olan faktörler arasında P-glikoprotein (ABCB1 veya MDR-1 olarak da bilinir) gibi ABC transmembran proteinlerinin aşırı ekspresyonu yer alır (Altenberg, 2004; Szakács vd., 2014). Bu çoklu ilaç direnci gösteren transmembran proteinleri, kemoterapi ajanlarının hücre içinde birikimini azaltırlar ve böylece ilacın toksik seviyelerinde bile hücrenin hayatta kalmasını sağlarlar (Altenberg, 2004). Örneğin paclitaxel ve doxorubicin ilaçları ABCB1 transmembran proteinlerinin substratıdır (Ji vd., 2019). Bu ilaçlar MDR-1 geninin aşırı eksprese olmasına neden olarak kemoterapinin etkinliğini azaltabilir. Paclitaxel, çok çeşitli solid tümörlerin kemoterapötik tedavisi için kullanılır ve yüksek antineoplastik etkinliğe sahip olmasına rağmen ortaya çıkan ilaç direnci ile kısıtlanır (Podolski-Renić vd., 2011). Paclitaxel'e yönelik gelişen direnç için çeşitli mekanizmalar bildirilmiştir ve bunlardan biri P-glikoproteininin aşırı eksprese olmasıdır (Orr, Verdier-Pinard, McDaid ve Horwitz, 2003).

Kanser hücrelerinin gelişimine çok sayıda farklı gen ve sinyalizasyon yolağı katkıda bulunur. Yapılan bazı çalışmalarda siRNA aracılı gen susturma ve kemoterapinin birlikte kullanımının çoklu ilaç direncini azaltmada ve kemoterapinin etkinliğini artırmada önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir (Chen vd., 2009; Hua, Mutch ve Herzog, 2005; Navarro vd., 2012; Susa vd., 2010; Yhee vd., 2015).

NILCO; Notch, IL-1 ve leptin sinyalizasyonu arasındaki etkileşimin sonucu olarak ilk meme kanserinde ortaya çıkan ve karsinogenez sürecini açıklamaya çalışan bir modeldir. Meme kanserinde Notch, IL-1 ve leptinin (NILCO) aşırı ekspresyonu kötü prognoz ve metastazla ilişkilidir (Guo ve Gonzalez-Perez, 2011). Yapılan meme kanseri çalışmalarında Notch1 ve onun ligantı olan Jag1' in anjiyojenik protein olan VEGFR2 seviyelerinin artışıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Guo, Colbert, Fuller, Zhang ve Gonzalez-Perez, 2010; Nakopoulou vd., 2002).

VEGF, doku farklılaşması ve fonksiyonu için gerekli olan kan damarlarının oluşumu ve gelişiminde önemli bir düzenleyicidir. VEGF birkaç izoforma sahiptir ama VEGF-A en çok

bulunan izoformudur. VEGFR-2, VEGF'in bilinen en önemli hücresel cevapları vermesinde etkili olan reseptördür (Ruben R Gonzalez-Perez vd., 2010).

IL-1 sisteminin bileşenlerinden olan IL-1 α/β ligantları ile IL-1R tI reseptörü ve IL-1Ra'nin seviyeleri meme kanserinde artmıştır (Apte vd., 2006). Kolon kanserinde yapılan bir çalışmada ise IL-1 β 'nın VEGF ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Akagi vd., 1999). Voronov ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da tümör büyümesi, metastaz ve anjiyogeneze IL-1' in rolü olduğu gösterilmiştir (Voronov vd., 2003).

Esas olarak adipositlerden salgılanan leptin, çeşitli kanser türlerinde kanser hücreleri tarafından salgılanarak tümör büyümesini ve anjiyogenezi indükler (Daley-Brown, Harbuzariu, Kurian, Oprea-Ilieş ve Gonzalez-Perez, 2019). Gonzalez-Perez ve arkadaşlarının 2010 yılında meme kanserinde yaptığı çalışmada leptinin VEGF proteini ve mRNA'sını artırdığı, leptin sinyalizasyonunun inhibisyonunun tümör büyümesini geriletlediği ve anjiyogenezi VEGF üzerinden inhibe ettiği gösterilmiştir (Ruben R Gonzalez-Perez vd., 2010). Başka bir çalışmada ise, leptin tarafından indüklenen Notch ve IL-1' in meme kanser hücrelerinin yaşam süreleri ve proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynadıkları gösterilmiştir (Gillespie, Quarshie, Penichet ve Gonzalez-Perez, 2012).

Tümör hücrelerinin yayılması, migrasyon, hücre döngüsünü düzenleyen genlerdeki mutasyonlar, adezyon moleküllerinin ve proteolitik enzimlerin gen ekspresyonundaki değişikliklerden kaynaklanır. Migrasyona uğrayan tümör hücreleri serin ve sistein proteazları, matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) ve plazminojen aktivatörlerini salgılayarak bazal membranı geçmektedir. MMP2' nin artan aktivitesi, tümör büyümesinde, invazyon ve metastazında önemli bir rol oynamaktadır (Walkiewicz vd., 2016). Ayrıca leptin, tümör anjiyogeneze MMP' lerin indüksiyonu aracılığıyla katkıda bulunabilir. Leptinin, insan aterosklerotik lezyonlarında, rat korneasında, glioma hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinde MMP2'yi artırarak anjiyogeneze, migrasyon ve proliferasyona neden olduğu bildirilmiştir (Ruben Rene Gonzalez-Perez, Lanier ve Newman, 2013).

Bu genel bilgilerin ışığı altında kolorektal kanser hücre hatları (HT-29 ve Caco-2) üzerinde NILCO ilişkili genleri siRNA ile susturarak bunun ilaç direnci gelişimine etkisi olan gen düzeylerini nasıl değiştireceğini, uygulayacağımız kemoterapik ajana olan duyarlılığı nasıl etkileyeceğini ve anjiyogeneze, proliferasyon, migrasyon ve invazyon üzerine olası etkilerini gösterebilmeyi hedefledik.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

A) Kolon Kanser Hücre Hattı ve Besi ortamı

İnsan kökenli 2 ayrı kolon kanser hücre hattı olan HT-29 ve Caco-2 kullanıldı. Bu hücreler iç ortamı % 5 CO₂, % 95 nem ve 37 °C olan bir inkübatör içinde yaşatıldı. Kolon hücreleri için besi ortamı RPMI-1640 Medium içermiştir.

B) Hücrelerin ekimi ve yaşatılması

İnkübatörde bulunan flasklar, ilk iki gün yerinden oynatılmamak koşuluyla, kuluçka süresince inverted mikroskop (Olympus) ile kontrol edilerek hücrelerin çoğalmaları gözlemlendi. Eskiye besiyerleri pipet yardımıyla boşaltılarak, içerisinde 0.1 mL penisilin + streptomisin, 1mL FBS ve 8.9 mL RPMI-1640 Medium bulunan besiyeriyle 2-3 günde bir yenilendi. Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra deneye alındı. Yeterli çoğalma sağlandıktan sonra hücreler tripsin+EDTA ile yüzeyden söküldü, RPMI-1640 Medium, %10 FBS ve %1 penisilin + streptomisin karışımını içeren santrifüj tüpü içinde 1000 devir /dakika ve 4 °C’de 5 dakika döndürüldü. Üstteki medium atılarak dipteki hücreler, içerisinde besiyeri bulunan flasklara tekrar ekilerek 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatöre kondu.

C) Hücrelerin sayılması ve 24 kuyucuklu kaplara ekilmesi: Flaskların tabanını tamamen kaplayan hücrelerin besiyerleri pipet yardımıyla ortamdan uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkanarak flaskta kalan proteinler uzaklaştırıldı. Flasklarda üretilen hücreler % 0,25 tripsin ile 15 dakika yıkanarak tabandan kopmaları sağlandı. Tüp içerisine alınan hücreler 4 °C ve 1200 devir/dk da soğutmalı santrifüjde 5-10 dakika döndürüldü. İşlem sonrasında üstte kalan sıvı atılarak altta kalan hücre çözeltisinden 1-3 damla pipet yardımı ile alınarak hücre sayımı yapıldı ve 1 mililitrede bulunan hücre sayısı belirlendi. Her bir kuyucuğa 2x10⁵ hücre gelecek şekilde 24 kuyucuklu kaplara ekim yapıp 24 saatlik kuluçka süresinin ardından hücreler deneye alındı. Paclitaxel’ e karşı gelişen ilaç dirençliliğinde Notch, IL1 ve leptin’in etkisini gösterebilmek için siRNA’lar ile birlikte paclitaxel tedavisi uygulandı.

D) Deney gruplarının belirlenmesi: Paclitaxel’ e karşı gelişen dirençte Notch, IL-1 ve leptin’ in etkisini gösterebilmek için siRNA transfeksiyonlarıyla kültür koşullarında genetik susturma yapıldı. Bu amaçla Notch-siRNA, leptin-siRNA ve IL-1-siRNA kullanıldı.

- **Kontrol grupları:** Her iki hücre hattı için (HT-29 ve Caco-2) ayrı ayrı kontrol grubu oluşturuldu ve bunlara sadece besiyeri uygulandı.

- **Notch1 siRNA grubu:** Her iki hücre hattı için (HT-29 ve Caco-2) ayrı ayrı Notch1 siRNA grubu oluşturuldu ve 30 nM olacak şekilde Notch1 siRNA'sı kuyucuklara eklendi.
- **Leptin siRNA grubu:** Her iki hücre hattı için (HT-29 ve Caco-2) ayrı ayrı Leptin siRNA grubu oluşturuldu ve 30 nM olacak şekilde Leptin siRNA'sı kuyucuklara eklendi.
- **IL-1 β siRNA grubu:** Her iki hücre hattı için (HT-29 ve Caco-2) ayrı ayrı IL-1 β siRNA grubu oluşturuldu ve 30 nM olacak şekilde IL-1 β siRNA'sı kuyucuklara eklendi.
- **Paclitaxel (PTX) grubu:** Her iki hücre hattı için (HT-29 ve Caco-2) ayrı ayrı PTX grubu oluşturuldu ve HT-29 için 100 nM, Caco-2 için 130 nM olacak şekilde PTX dozu kuyucuklara eklendi.
- **Notch1 siRNA + Paclitaxel grubu:** HT-29 ve Caco-2 için oluşturulan Notch1 siRNA+PTX grubuna final konsantrasyonu 30 nM Notch1 siRNA olacak şekilde eklendi. Transfeksiyon için verilen sürenin sonunda HT-29 için 100 nM Caco-2 için 130 nM olacak şekilde PTX kuyucuklara eklendi.
- **Leptin siRNA + Paclitaxel grubu:** HT-29 ve Caco-2 için oluşturulan Leptin siRNA+PTX grubuna final konsantrasyonu 30 nM Leptin siRNA olacak şekilde eklendi. Transfeksiyon için verilen sürenin sonunda HT-29 için 100 nM Caco-2 için 130 nM olacak şekilde PTX kuyucuklara eklendi.
- **IL-1 β siRNA + Paclitaxel grubu:** HT-29 ve Caco-2 için oluşturulan IL-1 β siRNA+PTX grubuna final konsantrasyonu 30 nM IL-1 β siRNA olacak şekilde eklendi. Transfeksiyon için verilen sürenin sonunda HT-29 için 100 nM Caco-2 için 130 nM olacak şekilde PTX kuyucuklara eklendi.

3.2. MTT

MTT yöntemi; hücre canlılığının belirlenmesi için sık kullanılan kolorimetrik, spektrofotometrik bir yöntemdir. MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen, formazana indirgenen bir maddedir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile orantı gösterir.

MTT, fosfat ile dengelenmiş tuz çözeltisi içinde çözünerek hazırlandı ve filtre edildi. 96 kuyucuklu kapların her bir kuyucuğuna 1/10 oranında MTT eklenerek hücreler 37°C'de 4 saat

inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuktaki besiyeri pipetle çekilerek 100 µl DMSO eklendi ve kaplar ısıtılmalı çalkalayıcıda 5-8 dk çalkalandı. Oluşan formazan boya absorbansı çok kuyucuklu kap okuyucusu bir spektrofotometri ile 550nm dalga boyunda okunacaktır. si-RNA ve/veya paclitaxel verilen kuyucuklardan okunan optik yoğunluk, kontrole karşı yaşayan hücrelerin yüzdesine dönüştürüldü.

3.3. qRT-PCR

1×10^6 hücre/flask olarak ekimi önceden yapılmış flasklara toksik olmadığı belirlenen si-RNA ve paclitaxel dozları eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bekleme süresinin ardından hücrelerden total RNA izolasyonu yapılacaktır. RNA'nın miktarı ve saflığı 260 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplandı. cDNA sentezi firmanın talimatlarına göre yapıldı. qRT-PCR üretici firmanın tavsiyelerine göre laboratuvarımızda kullandığımız metod doğrultusunda gerçekleştirildi. Hedef genlerden; leptin, Notch1 reseptör, IL-1 β , VEGF-A, MMP-2, MDR-1 ve β aktin (referans gen) mRNA düzeyleri, Syber Green prob kullanılarak Thermo StepOnePlus Real Time PCR System ile ölçüldü.

3.4. İMMÜNOFLORESAN

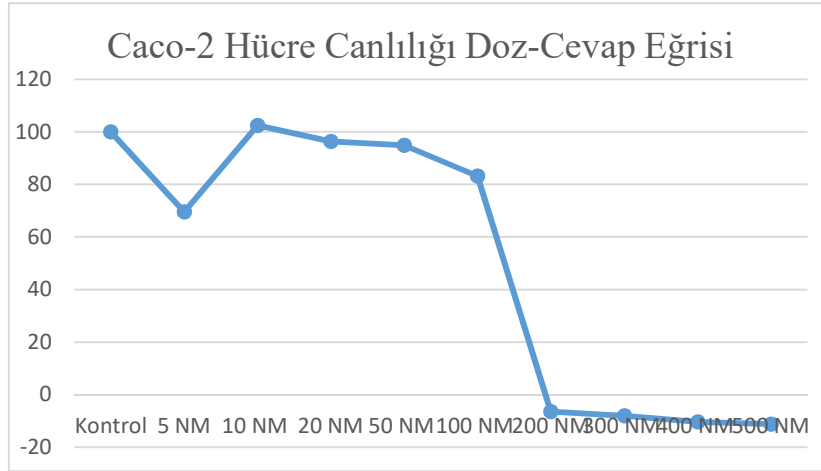
Poly-L-lysine ile kaplanarak UV ile sterilize edilen yuvarlak lameller kültür plakalarına yerleştirildikten sonra her bir kuyucuğa yaklaşık 5×10^4 hücre ekildi. Hücreler lamellerin yüzeyine yapışmaları ve yeni ortama alışmaları için 24-48 saat boyunca 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırıldı, siRNA'ların MTT testi ile belirlenen dozlarını içeren taze besiyerlerinde belirlenen süre boyunca inkübe edildi. PBS ile yıkanan hücreler %4'lük paraformaldehit ile fiks edildi. Sitrat tamponu solüsyonu içerisine alınan hücrelere 95 °C'de antijen retrieval uygulandı. Hücreler soğutulduktan sonra %0.1 Triton X-100 solüsyonu ile permeabilize edildi. 1% BSA içeren PBST içinde 30 dakika inkübasyon ile spesifik olmayan antikor bağlanmaları bloke edildi. Ardından oda sıcaklığında 1 saat veya 4°C'de gece boyunca istenen konsantrasyonlarda dilüe edilmiş Notch1 reseptör, leptin, IL-1 β , MDR1 primer antikorları ile inkübasyon gerçekleştirildi. Yıkamanın ardından hücreler karanlık ortamda 1 saat floresan ile işaretli sekonder antikorlar ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tekrar yıkanan lameller kapatma mediumu ile kapatılarak preparatlar hazırlandı ve floresan mikroskobu altında değerlendirildi.

3.5. İSTATİSTİK

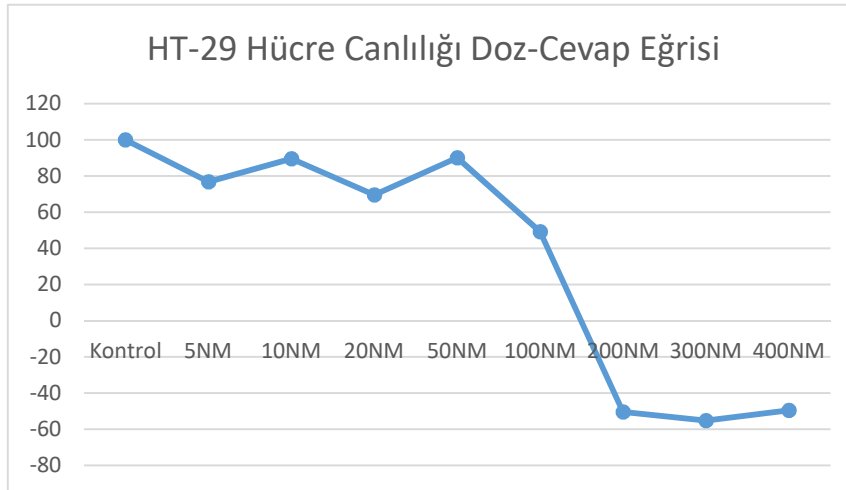
İstatistiksel değerlendirme için GraphPad Prism6 programı kullanıldı. Öncelikle gruplar Shapiro-Wilk Normality Test kullanılarak normal dağılım gösterip göstermediğine göre analiz edildi. Farklı gruplardan elde edilen ve normal dağılım gösteren veriler tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklar Tukey testi ile analiz edildi. p değeri 0.05'den küçük olanlar anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. MTT Sonuçları



Şekil 4.1.1. Caco-2 hücre hattının paclitaxel dozlarına karşı gösterdiği hücre canlılığı cevabı



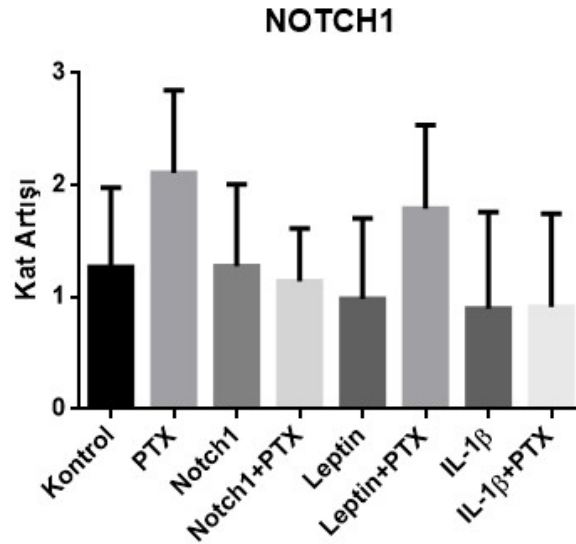
Şekil 4.1.2. HT-29 hücre hattının paclitaxel dozlarına karşı gösterdiği hücre canlılığı cevabı

Her iki grafiğe göre veriler analiz edilmiş ve deneyde kullanılacak PTX dozuna HT-29 için 100 nM, Caco-2 için 130 nM doz belirlenmiştir.

4.2. qRT-PCR Sonuçları

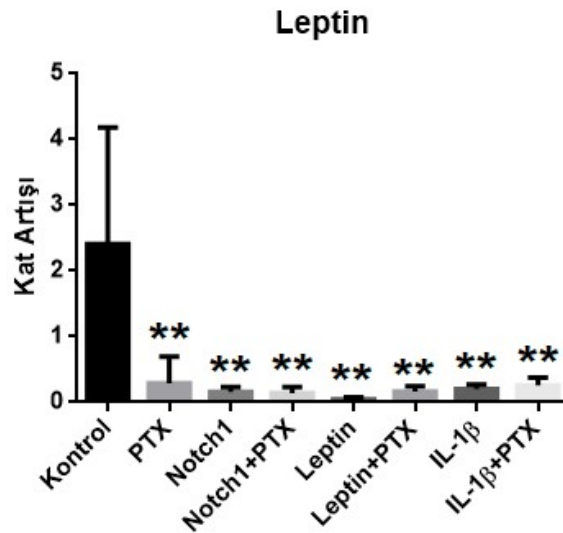
4.2.1. Caco-2 qRT-PCR Sonuçları

Sonuçlarımıza göre; Caco-2 hücrelerinde siRNA uygulanan Notch1, Leptin ve IL-1 β grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Notch1 mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$; Şekil 4.2.1). Ayrıca siRNA+PTX dozları uygulanan Notch1+PTX, Leptin+PTX ve IL-1 β +PTX grupları PTX grubu ile karşılaştırıldığında Notch1 mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$; Şekil 4.2.1).



Şekil 4.2.1. Caco-2 hücre hattında Notch1 geninin siRNA ve/veya PTX verilen gruplardaki mRNA ekspresyon seviyeleri

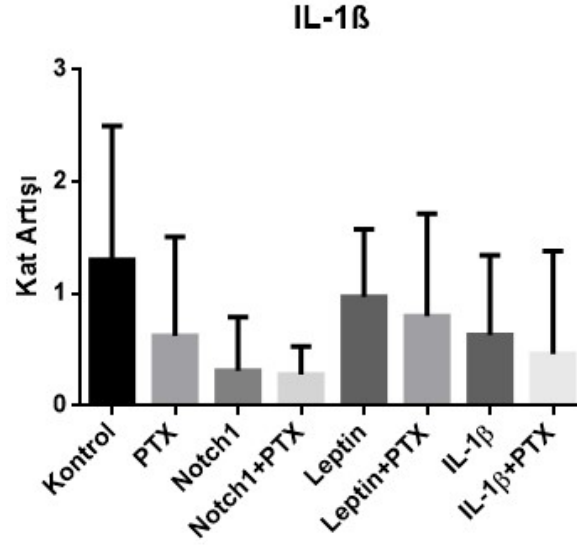
Caco-2 hücre hattında siRNA uygulanan Notch1, Leptin ve IL-1 β gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Leptin gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0.01$ **; Şekil 4.2.2). siRNA+PTX uygulanan Notch1+PTX, Leptin+PTX ve IL-1 β +PTX gruplarıyla PTX grubu karşılaştırıldığında Leptin mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$; Şekil 4.2.2).



Şekil 4.2.2. Caco-2 hücre hattında Leptin geninin siRNA ve/veya PTX verilen gruplardaki mRNA ekspresyon seviyeleri (*:Kontrol grubu ile karşılaştırılan gruplar, $p < 0.01$ **)

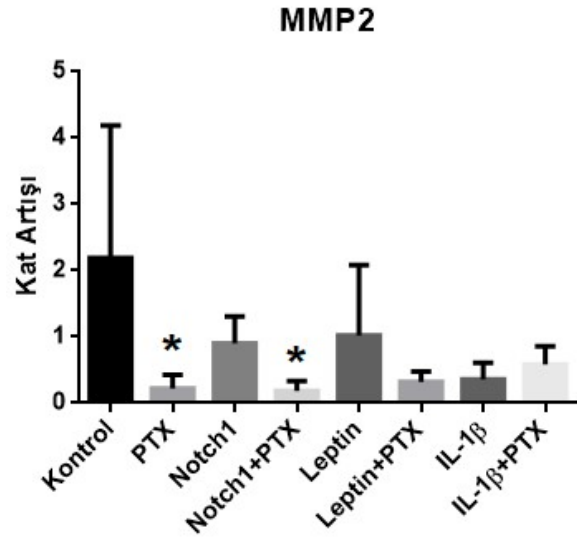
Caco-2 hücrelerinde siRNA uygulanan Notch1, Leptin ve IL-1 β grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında IL-1 β mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$; Şekil 4.2.3). Ayrıca siRNA+PTX dozları uygulanan Notch1+PTX,

Leptin+PTX ve IL-1 β +PTX grupları PTX grubu ile karşılaştırıldığında IL-1 β mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$; Şekil 4.2.3).



Şekil 4.2.3. Caco-2 hücre hattında IL-1 β geninin siRNA ve/veya PTX verilen gruplardaki mRNA ekspresyon seviyeleri

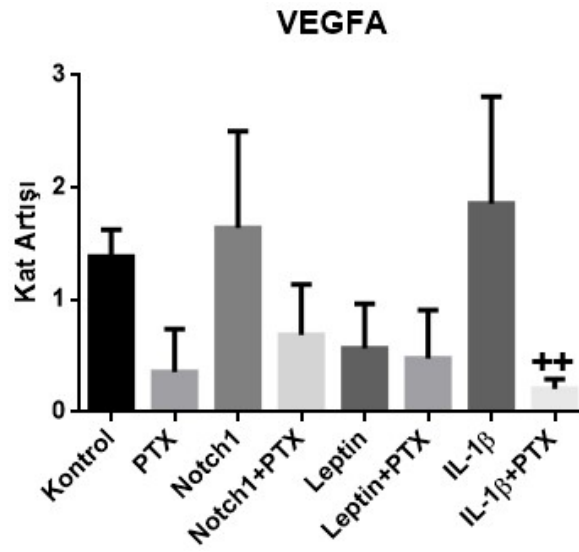
Caco-2 hücrelerinde PTX ve Notch1+PTX grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MMP2 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır ($p<0.05$ *; Şekil 2.1.4). Bununla birlikte siRNA uygulanan Notch1, Leptin ve IL-1 β grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MMP2 gen ekspresyon seviyelerinde azalma görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$; Şekil 4.2.4).



Şekil 4.2.4. Caco-2 hücre hattında MMP2 geninin siRNA ve/veya PTX verilen gruplardaki mRNA ekspresyon seviyeleri

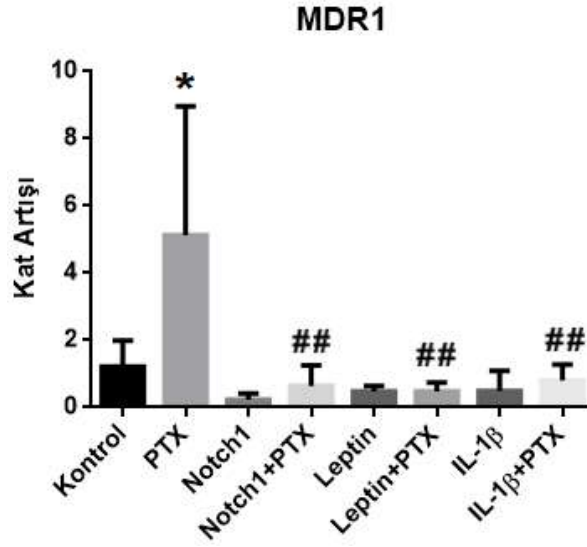
Caco-2 hücrelerinde kontrol grubu ve PTX grubu karşılaştırıldığında VEGFA gen ekspresyonunda azalma vardır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$;

Şekil 4.2.5). siRNA uygulanan Notch1, Leptin ve IL-1 β grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında VEGFA mRNA seviyelerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$; Şekil 4.2.5). siRNA+PTX dozları uygulanan Notch1+PTX, Leptin+PTX ve IL-1 β +PTX grupları PTX grubu ile karşılaştırıldığında VEGFA mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$; Şekil 4.2.5). Buna ilaveten IL-1 β siRNA verilen IL-1 β grubu ile siRNA+PTX verilen IL-1 β +PTX grubu kıyaslandığında IL-1 β +PTX grubunun VEGFA mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0.01^{++}$; Şekil 4.2.5).



Şekil 4.2.5. Caco-2 hücre hattında VEGFA geninin siRNA ve/veya PTX verilen gruplardaki mRNA ekspresyon seviyeleri (++: IL-1 β grubu ile kıyaslanan grup, $p<0.01^{++}$)

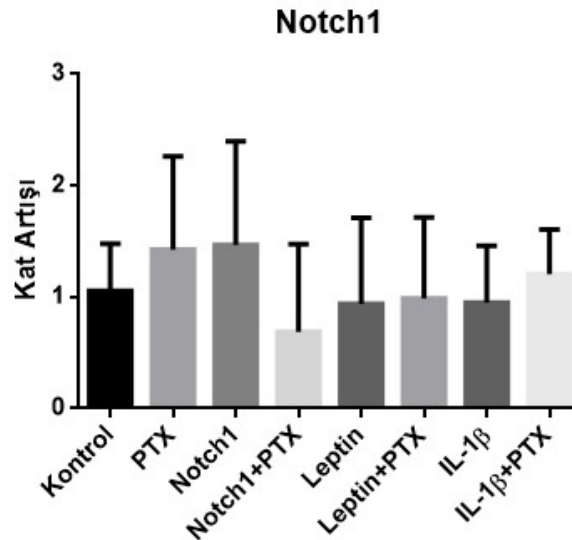
Caco-2 hücrelerinde PTX grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında PTX dozu verilen grupta MDR1 gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermiştir ($p<0.05^*$; Şekil 4.2.6). Kontrol grubuyla siRNA verilen Notch1, Leptin ve IL-1 β grupları karşılaştırıldığında siRNA verilen grupların mRNA seviyelerinde bir miktar azalma olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$; Şekil 4.2.6). Bununla birlikte siRNA+PTX uygulanan Notch1+PTX, Leptin+PTX ve IL-1 β +PTX grupları PTX grubuyla karşılaştırıldığında MDR1 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0.01^{##}$; Şekil 4.2.6).



Şekil 4.2.6. Caco-2 hücre hattında MDR1 geninin siRNA ve/veya PTX verilen gruplardaki mRNA ekspresyon seviyeleri (*: Kontrol grubu ile karşılaştırılan gruplar, $p < 0.05$ *; #: PTX grubu ile karşılaştırılan gruplar, $p < 0.01$ ##)

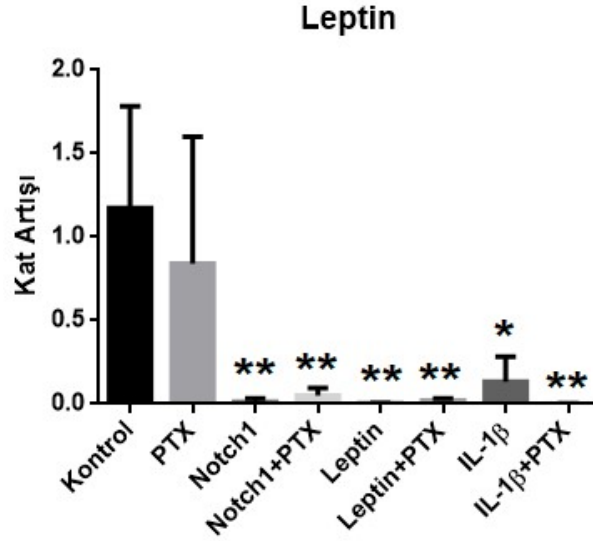
4.3. HT-29 qRT-PCR Sonuçları

Sonuçlarımıza göre; HT-29 hücrelerinde sadece siRNA uygulanan Notch1, Leptin ve IL-1 β grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Notch1 mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$; Şekil 4.3.1). Ayrıca siRNA+PTX dozları uygulanan Notch1+PTX, Leptin+PTX ve IL-1 β +PTX grupları sadece PTX uygulanan PTX grubu ile karşılaştırıldığında Notch1 mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$; Şekil 4.3.1).



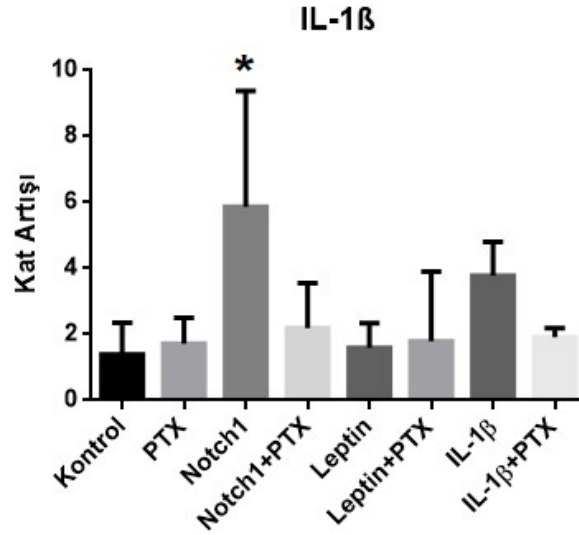
Şekil 4.3.1. HT-29 hücre hattında Notch1 geninin siRNA ve/veya PTX verilen gruplardaki mRNA ekspresyon seviyeleri

HT-29 hücre hattında Notch1 siRNA ve Leptin siRNA uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Leptin mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma görülmüştür ($p<0.01$ **; Şekil 4.3.2). Ayrıca IL-1 β siRNA uygulanan grupta da kontrol grubuna göre Leptin mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmüştür ($p<0.05$ *; Şekil 4.3.2).



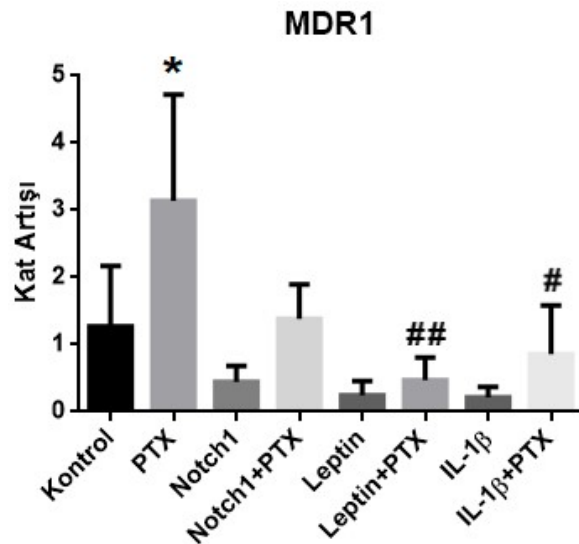
Şekil 4.3.2. HT-29 hücre hattında Leptin geninin siRNA ve/veya PTX verilen gruplardaki mRNA ekspresyon seviyeleri (*:Kontrol grubu ile karşılaştırılan gruplar, $p<0.05$ *, $p<0.01$ **)

HT-29 hücrelerinde sadece siRNA uygulanan Notch1 grubunda kontrole göre IL-1 β mRNA seviyelerinde fark vardır ($p<0.05$ *; Şekil 4.3.3). Leptin ve IL-1 β grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında IL-1 β mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$; Şekil 4.3.3). Ayrıca siRNA+PTX dozları uygulanan Notch1+PTX, Leptin+PTX ve IL-1 β +PTX grupları sadece PTX uygulanan PTX grubu ile karşılaştırıldığında IL-1 β mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$; Şekil 4.3.3).



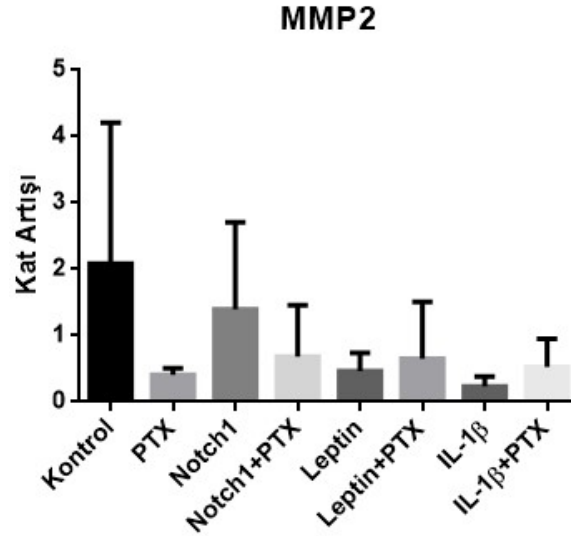
Şekil 4.3.3. HT-29 hücre hattında IL-1Beta geninin siRNA ve/veya PTX verilen gruplardaki mRNA ekspresyon seviyeleri

HT-29 hücre hattında PTX grubunda, MDR1 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0.05$ *; Şekil 4.3.4). Buna ilaveten PTX grubu, Leptin siRNA+PTX dozu uygulanan grup ile karşılaştırıldığında MDR1 mRNA seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüş göstermiştir ($p < 0.01$ ##; Şekil 4.3.4). Yine PTX grubuna göre IL-1β+PTX uygulanan grubun MDR1 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır ($p < 0.05$ #; Şekil 4.3.4). Notch1+PTX grubu PTX grubu ile kıyaslandığında MDR1 gen ekspresyonunda azalma görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$; Şekil 4.3.4).



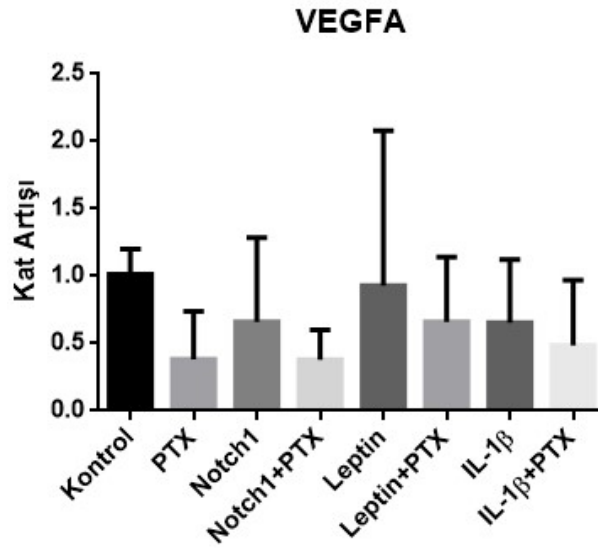
Şekil 4.3.4. HT-29 hücre hattında MDR1 geninin siRNA ve/veya PTX verilen gruplardaki mRNA ekspresyon seviyeleri (*: Kontrol grubu ile karşılaştırılan gruplar, $p < 0.05$ *; #: PTX grubu ile karşılaştırılan gruplar, $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##)

HT-29 hücrelerinde siRNA uygulanan Notch1, Leptin ve IL-1 β grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MMP2 mRNA seviyelerinde azalma görülmekle birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$; Şekil 4.3.5). Ayrıca siRNA+PTX dozları uygulanan Notch1+PTX, Leptin+PTX ve IL-1 β +PTX grupları PTX grubu ile karşılaştırıldığında MMP2 mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$; Şekil 4.3.5).



Şekil 4.3.5. HT-29 hücre hattında MMP2 geninin siRNA ve/veya PTX verilen gruplardaki mRNA ekspresyon seviyeleri

HT-29 hücrelerinde kontrol grubu ve PTX grubu karşılaştırıldığında VEGFA gen ekspresyonunda azalma vardır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$; Şekil 4.3.6). Sadece siRNA uygulanan Notch1 ve IL-1 β grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise VEGFA mRNA seviyelerinde azalma görülmekle birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlılık yaratmamıştır ($p>0.05$; Şekil 4.3.6). Ayrıca siRNA+PTX dozları uygulanan Notch1+PTX, Leptin+PTX ve IL-1 β +PTX grupları sadece PTX uygulanan PTX grubu ile karşılaştırıldığında VEGFA mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$; Şekil 4.3.6).



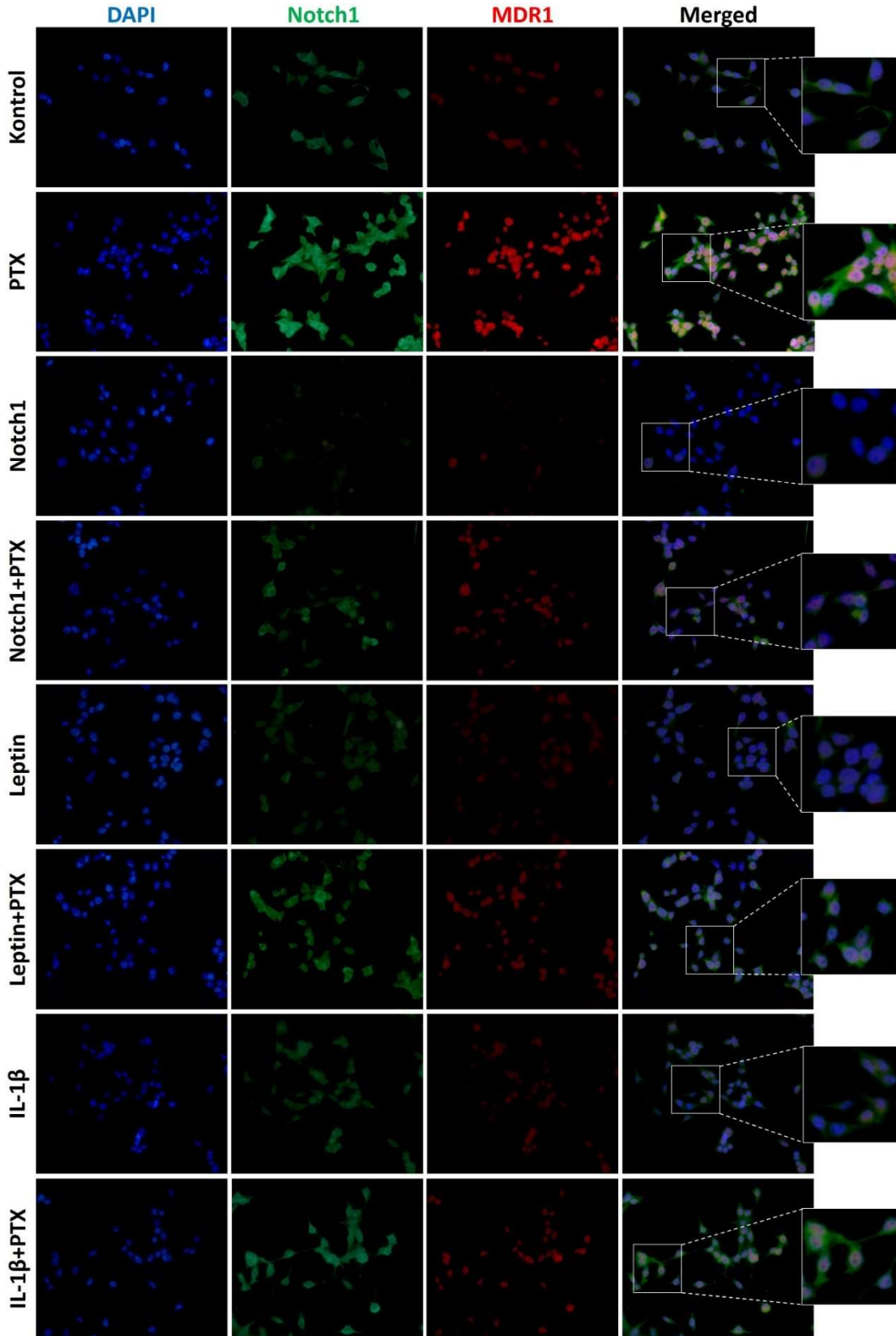
Şekil 4.3.6. HT-29 hücre hattında VEGFA geninin siRNA ve/veya PTX verilen gruplardaki mRNA ekspresyon seviyeleri

4.4. İmmunofloresan Görüntüleri

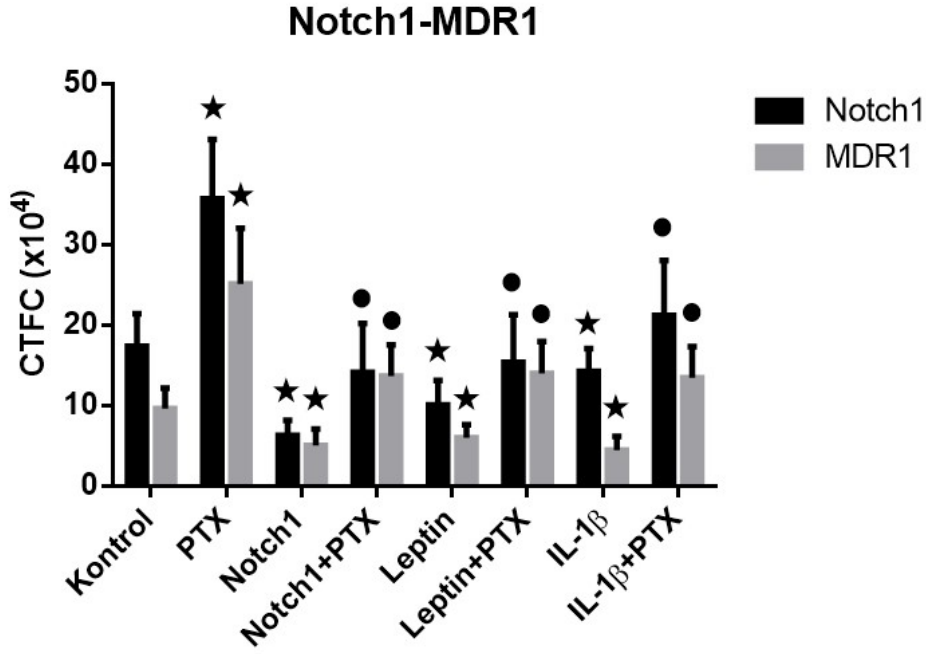
24 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiş polilizin ile kaplı yuvarlak lameller üzerine ekilen HT-29 hücreleri 48 saat süreyle Notch1, IL-1 β , ve Leptin siRNA'ları ve sonrasında 24 saat süreyle Paclitaxel ile inkübe edildikten sonra %4'lük paraformaldehit ile fiks edildi. Hücreler TritonX-100 (%0,1) ile permeabilize edildikten sonra Notch1, IL-1 β , Ob-R antikorum ve MDR1 antikoru ile ikili immunofloresan yöntemiyle boyandı. Çekirdek boyaması için DAPI kullanıldı. Boyanan hücreler floresan mikroskopta görüntülenerek x400 büyütmede fotoğraflandı. ImageJ programı yardımıyla hücrelerin (her gruptan en az 50 hücre değerlendirildi) entegre floresan yoğunlukları ölçüldü ve düzeltilmiş toplam hücresel floresan (corrected total cell fluorescence; CTCF) değerleri hesaplandı. Elde edilen bulgular, Paclitaxel'in hücrelerdeki Notch1, IL-1 β ve Ob-R protein seviyelerinin arttırdığını gösterdi. Paclitaxel aynı zamanda MDR1 protein miktarının da artmasına neden oldu. siRNA uygulamaları sonucu hücrelerin hem Notch1, IL-1 β , ve Leptin, hem de MDR1 proteinlerinde kontrole kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlendi. Yalnız Paclitaxel uygulanan grupla kıyaslama yapıldığında Notch1, IL-1 β ve Leptin genleri susturulduğunda uygulanan Paclitaxel'in neden olduğu Ob-R, Notch1 ve IL-1 β protein seviyelerindeki artış ve MDR1 protein ekspresyon artışı anlamlı bir şekilde baskılanmıştır. Bu yeni bir bilgi olup literatürde bununla ilgili bir kaynağa rastlanmamıştır. Daha sonra yapacağımız çalışmalarımızda bu konu dikkate alınıp mekanizması araştırılmak üzere planlanacaktır.

4.4.1. HT29 hücrelerinde Notch1 ve MDR1 protein seviyelerini gösteren immunofloresan boyama görüntüleri

Notch1 (yeşil) ve MDR1 (kırmızı) proteinlerinin hücrelerin nükleus ve sitoplazmalarında lokalize olduğu görülüyor. Proteinlerin floresan yoğunluklarının Paclitaxel (PTX) uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine kıyasla arttığı, Notch1, Leptin ve IL-1 β genleri susturulduğunda kontrole kıyasla azaldığı izleniyor. PTX ile birlikte uygulanan siRNA'nın (Notch1+PTX, Leptin+PTX ve IL-1 β +PTX), yalnız PTX uygulanan hücelere göre Notch1 ve MDR1 floresan yoğunluklarında azalmaya neden olduğu görülüyor (büyütme; x400) (Şekil 4.4.1). İmmunofloresan boyama görüntülerinin grafiksel hali Şekil 4.4.2' de gösterilmiştir.

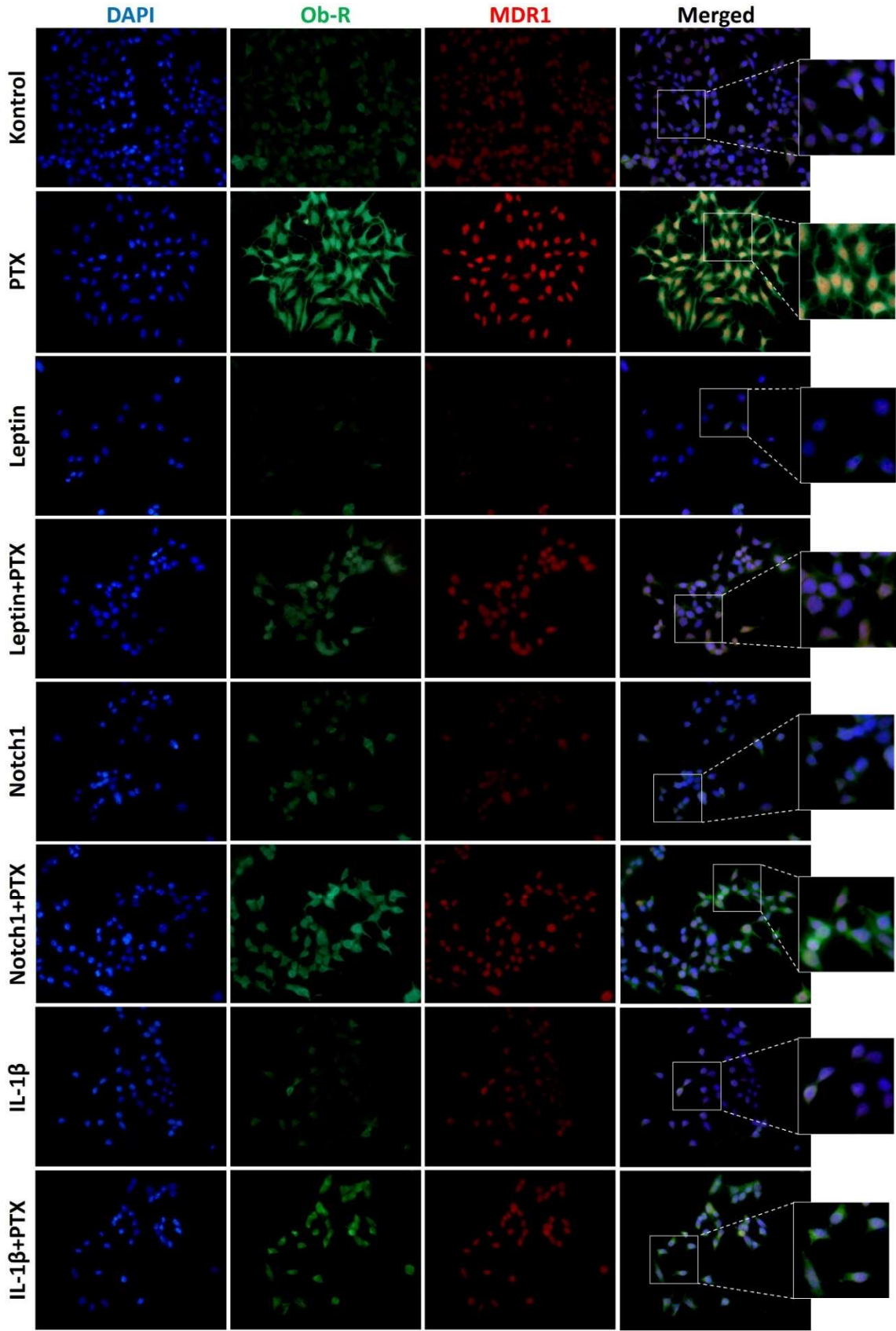


Şekil 4.4.1. HT-29 hücre hattında Notch1 ve MDR protein seviyelerinin immunofloresan boyama görüntüleri

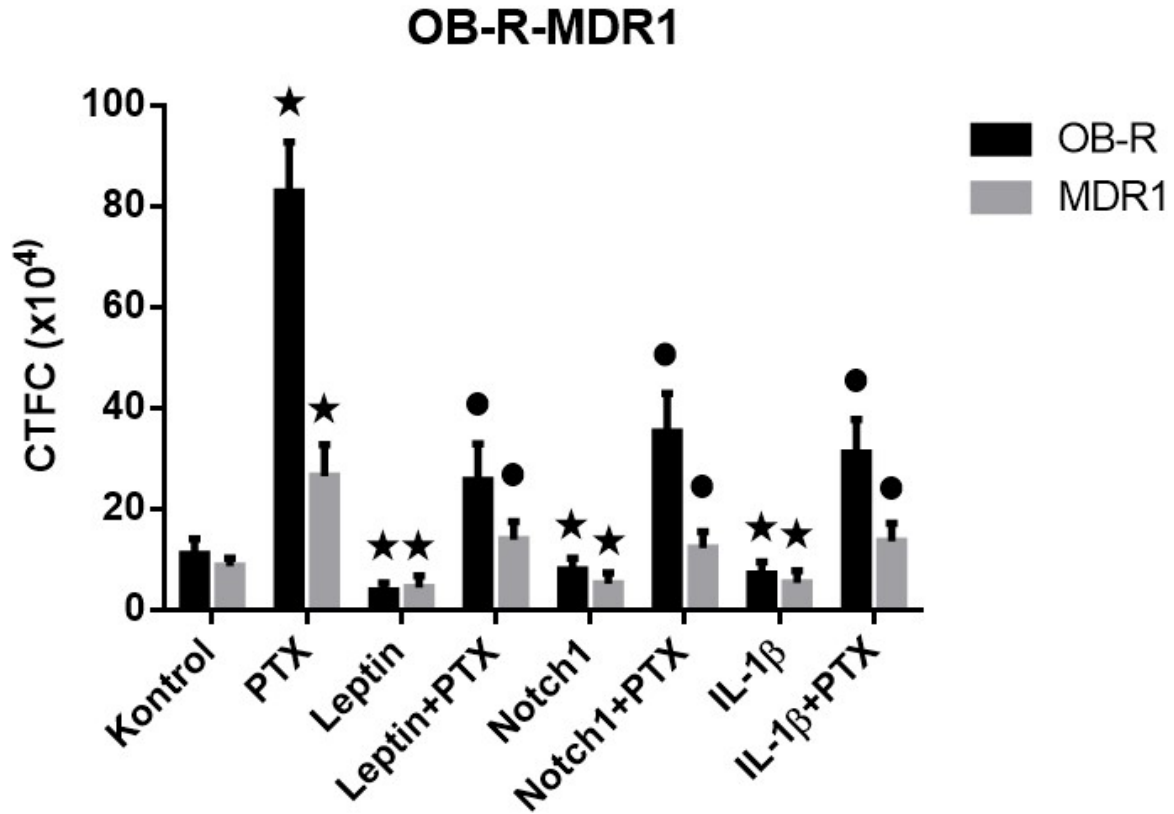


Şekil 4.4.2. HT-29 hücre hattında Notch1 ve MDR protein seviyeleri (★ : Kontrol grubu ile kıyaslanan grupları ifade etmektedir, $p < 0.0001$ ****; ● :PTX grubu ile kıyaslanan grupları ifade etmektedir, $p < 0.0001$ ****)

HT29 hücrelerinde Ob-R ve MDR1 protein seviyelerini gösteren immunofloresan boyama görüntüleri. Ob-R (yeşil) ve MDR1 (kırmızı) proteinlerinin hücrelerin nükleus ve sitoplazmalarında lokalize olduğu görülüyor. Proteinlerin floresan yoğunluklarının Paclitaxel (PTX) uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine kıyasla arttığı, Leptin, Notch1 ve IL-1 β genleri susturulduğunda kontrole kıyasla azaldığı izleniyor. PTX ile birlikte uygulanan siRNA'nın (Notch1+PTX, Leptin+PTX ve IL-1 β +PTX), yalnız PTX uygulanan hücrelere göre Ob-R ve MDR1 floresan yoğunluklarında azalmaya neden olduğu görülüyor (büyütme; x400) (Şekil 4.4.3). İmmunofloresan boyama görüntülerinin grafiksel hali Şekil 4.4.4' de gösterilmiştir.

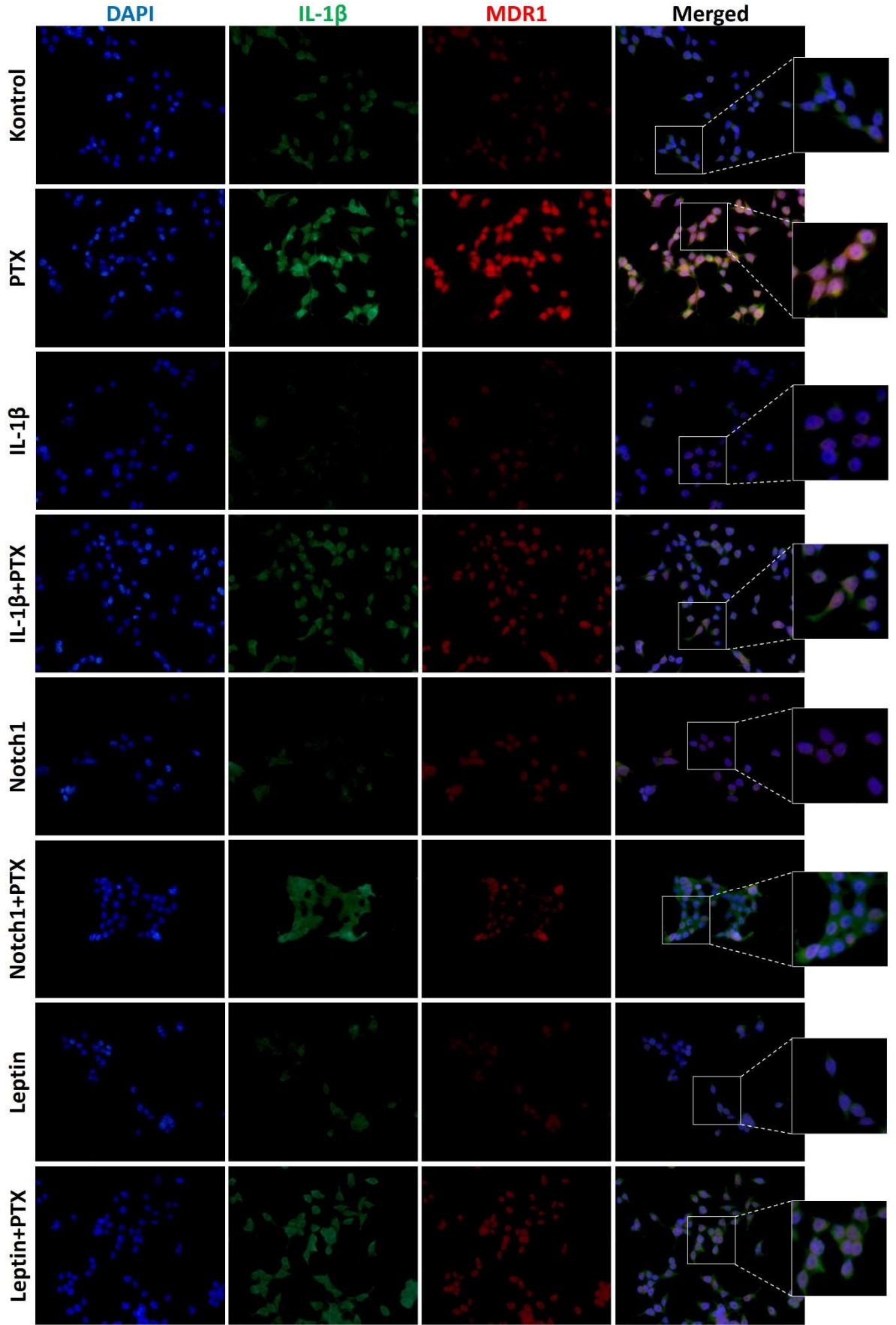


Şekil 4.4.3. HT-29 hücre hattında Notch1 ve MDR protein seviyelerinin immunofloresan boyama görüntüleri



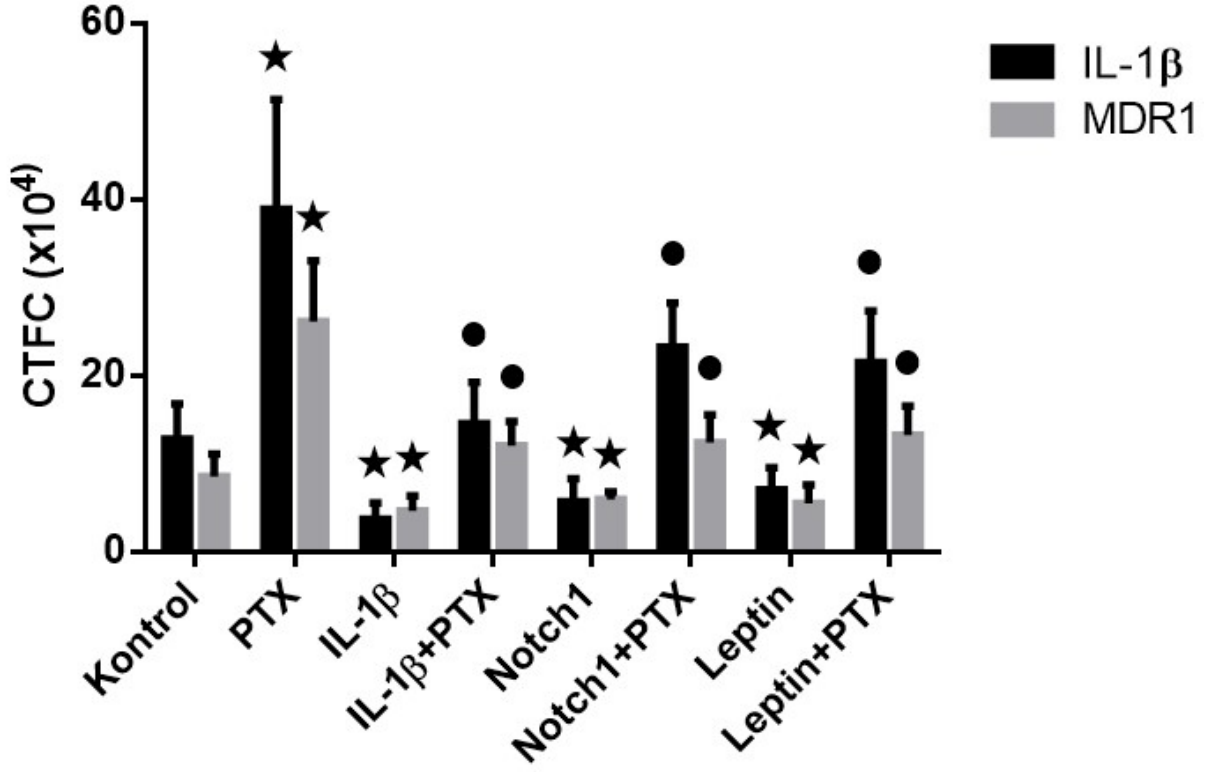
Şekil 4.4.4. HT-29 hücre hattında Notch1 ve MDR protein seviyeleri (★ : Kontrol grubu ile kıyaslanan grupları ifade etmektedir, $p < 0.0001$ ****; ● :PTX grubu ile kıyaslanan grupları ifade etmektedir, $p < 0.0001$ ****)

HT29 hücrelerinde IL-1 β ve MDR1 protein seviyelerini gösteren immunofloresan boyama görüntüleri. IL-1 β (yeşil) ve MDR1 (kırmızı) proteinlerinin hücrelerin nükleus ve sitoplazmalarında lokalize olduğu görülüyor. Proteinlerin floresan yoğunluklarının Paclitaxel (PTX) uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine kıyasla arttığı, IL-1 β , Notch1 ve Leptin genleri susturulduğunda kontrole kıyasla azaldığı izleniyor. P ile birlikte uygunan siRNA'nın (Notch1+PTX, Leptin+PTX ve IL-1 β +PTX), yalnız PTX uygulanan hücelere göre IL-1 β ve MDR1 floresan yoğunluklarında azalmaya neden olduğu görülüyor (büyütme; x400) (Şekil 4.4.5). İmmunofloresan boyama görüntülerinin grafiksel hali Şekil 4.4.6' de gösterilmiştir.



Şekil 4.4.5. HT-29 hücre hattında Notch1 ve MDR protein seviyelerinin immunofloresan boyama görüntüleri

IL-1 β -MDR1



Şekil 4.4.6. HT-29 hücre hattında Notch1 ve MDR protein seviyeleri (★ : Kontrol grubu ile kıyaslanan grupları ifade etmektedir, $p < 0.0001$ ****; ● :PTX grubu ile kıyaslanan grupları ifade etmektedir, $p < 0.0001$ ****)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın sonuçlarına göre, NILCO etkileşiminde rol oynayan Notch, IL-1 ve leptin'in siRNA ile tek tek susturulması her iki KRK hücre hattında (HT29 ve Caco-2) kemorezistansta etkili olan MDR1 gen ekspresyonu değişikliklerine yol açmıştır. Kendine ait siRNA uygulanan gruplar, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MDR1 mRNA seviyeleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermese de azalmıştır. Kendine ait siRNA+PTX uygulanan gruplar, sadece PTX uygulanan grup ile kıyaslanınca anlamlı olarak azalmıştır. Ancak bu azalma HT29 hücre hattı Notch1+PTX grubunda istatistiksel olarak anlamlı değildir. HT29 hücre hattında yapılan protein analizinde siRNA verilen gruplarda (Notch, IL-1 ve leptin) kontrole göre anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir. Aynı şekilde siRNA+PTX uygulanan gruplar PTX grubu ile karşılaştırıldığında hipotezimize uygun olarak NILCO genleri ve MDR1 gen ekspresyonlarında azalma gözlenmiştir. Bu durum bize deneylerin analizi sırasında hücre içi olaylarda sadece mRNA düzeylerinin değil aynı zamanda protein seviyelerinin de birlikte değerlendirilmesi gerektiğini tekrar göstermiştir. Ancak çalışmamızda Caco-2 hücre hattında protein seviyelerinin ölçülmesi de hedeflenmiş ve iki kez tekrarlanmış olmakla birlikte immünofloresan boyamalarından sonuç alınamamıştır. Bu analizlerin Caco-2' nin tarafımızca tekrar temini ile çalışılması planlanmaktadır.

Notch, IL-1 ve leptin (NILCO) kanserde proliferasyon, anjiyogenez ve antiapoptoz gibi onkogenik yolları etkileyen proinflamatuvar ve proanjiyogenik sinyallerle etkileşime giren bir mekanizmadır. İnsan kolorektal kanser dokusu ile yapılmış bir çalışmada, normal doku tümörlü dokuda ile karşılaştırıldığında tümörlü dokuda Notch1, IL-1 ve leptin mRNA ekspresyonları artmıştır (Nilufer Erkasap vd., 2021).

Kemoterapötik ajanlar kanser tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmakla birlikte kanser hastalarında uygulanan kemoterapinin başarısızlığını etkileyen önemli nedenlerden biri ilaca karşı gelişen çoklu ilaç direncidir (Zheng, 2017). Bazı kanser hücreleri kemoterapötik ajanlara karşı başlangıçta dirençli olurken bazıları kullanılan kemoterapötik ajana uzun süreli maruz kaldıktan sonra direnç geliştirirler (Majidinia vd., 2020). İlaç direncine farklı mekanizmalar aracılık etmekle birlikte ABC ailesinin taşıyıcıları direnç gelişiminde etkin rol oynamaktadır. Kanser ilerlemesinde ve tedavisinde önemli etkileri olan P-glikoprotein, ABC ailesinin üyesidir ve MDR1 geni tarafından kodlanır (Amawi vd., 2019). MDR1 geninin ekspresyonundaki artış birçok kanser türünde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (F. Zhang vd., 2014).

Kemoterapötik ajanlardan biri olan PTX, MDR1 geninin substratıdır ve hücre PTX ile tedavi edildiğinde MDR1 geninin ekspresyonunda artış olur (Ji vd., 2019). Bu gen ekspresyonunun artışı, ilaca karşı gelişen direnci artırarak kullanılan kemoterapötik ajanın etkisini azaltır. Projemizde bu bilgilerle uyumlu olarak her iki KRK hücre hatlarında kemoterapötik ajan olan PTX'in uygulanmasıyla kemorezistansa etkili olan MDR1 gen ekspresyonu artış göstermiştir. H. Li ve arkadaşları Caco-2 hücre hattının, MDR1 gibi ABC transmembran ailesindeki taşıyıcı proteinleri aşırı eksprese edilebileceğini bildirmişlerdir (H. Li, Krstin ve Wink, 2018). Çalışmamızda da buna uygun olarak Caco-2'nin PTX uygulanan grupta MDR1 ekspresyonunun HT-29'a göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Notch sinyal yolağı çeşitli malignitelerle ilişkilidir ve hücre tipine bağlı olarak onkojen veya tümör baskılayıcı gen olarak davranabilir (Wu vd., 2014). Kolorektal kanserde yapılan in vitro ve in vitro çalışmalarda, Notch1'in kolorektal kanserde yüksek oranda eksprese edildiği ve Notch1 ekspresyonunun çeşitli sinyal yolları aracılığıyla tümörjenezini desteklediği gösterilmiştir (Chu vd., 2010; Chu vd., 2009; Fender vd., 2015; Rodriguez vd., 2015). İntrahepatik kolanjiyokarsinoma hücre hatlarında yapılan bir çalışmada Notch1'in siRNA ile susturulması MDR1'in ekspresyonunu azaltmıştır (Wu vd., 2014). Bizim çalışmamızda da bununla uyumlu olarak her iki hücre hattında Notch1 siRNA uygulanan grup, kontrol grubu ile kıyaslandığında MDR1 seviyelerinde azalma mevcut olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ancak HT-29 hücre hattında yapılan immunofloresan boyamada Notch1 siRNA verilen grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MDR1 protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma mevcuttur.

Bizim çalışmamızda her iki hücre hattında da siRNA+PTX uygulanan gruplar sadece PTX uygulanan grupla karşılaştırıldığında, HT29 hücre hattı Notch1+PTX grubu hariç diğer gruplarda MDR1 gen ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma gözlenmiştir. Wu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Notch1 siRNA uygulanan grupların gen ekspresyon sonuçları kontrol grubu ile kıyaslandığında Notch1 mRNA seviyelerinin düşük olduğu gözlenmiştir (Wu vd., 2014). Ancak bizim çalışmamızda her iki KRK hücre hattında Notch1 siRNA uygulanan gruplar kontrol grubuyla kıyaslandığında Notch1 mRNA seviyelerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Buna ilaveten her iki hücre hattında, Notch1+PTX grubu PTX grubu ile kıyaslandığında Notch1 gen ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir miktar azalma gözlenmiştir. HT-29 hücre hattında yapılan immunofloresan boyama sonuçlarına göre Notch1 siRNA uygulanan grupta kontrole

kıyasla ve Notch1+PTX grubunda PTX grubuna kıyasla Notch1 protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır.

Bizim çalışmamızda Notch1 gen ekspresyonunda değişiklik gözükmemekle birlikte literatürler ile uyumlu olarak Notch1 siRNA ve Notch1 siRNA+PTX uygulanan gruplarda direnç geni olan MDR1 gen ekspresyon seviyelerinde azalma gözlenmektedir. Ayrıca HT-29 immunofloresan analizinde Notch1 siRNA uygulanan gruplarda Notch1 protein seviyeleri ve MDR1 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bu da bize hipotezimizle uyumlu olarak çalışmamızda kullandığımız siRNA'nın etkili olduğunu göstermektedir.

Leptin anjiyogenez, metastaz, tümöröjeniz ve apoptoza karşı hayatta kalma, kemorezistans gibi birçok kanserde karsinogenez süreçlerinde yer alan pro-inflamatuar, pro-anjiyogenik ve pro-tümörjenik bir adipokindir (Candelaria, Rampoldi, Harbuzariu ve Gonzalez-Perez, 2017). Erkasap ve arkadaşlarının KRK'li hastalarda yapmış oldukları bir çalışmada tümörlü ve metastatik tümörlü hastaların serum leptin düzeyleri karşılaştırıldığında metastatik tümörlü hastaların serum leptin düzeylerinde artış gözlenmiştir (N Erkasap vd., 2013). Yapılan kolorektal kanser ksenograft modelinde Notch inhibitörü olan DAPT ve IL-1 inhibitörü olan Anakinra kullanılan tedavi gruplarında leptin gen ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Özyurt, 2019). Bizim çalışmamızda da buna uygun olarak her iki KRK grubunda Notch1 siRNA ve IL-1 β siRNA kullanılan gruplarda leptin ekspresyonu anlamlı düzeyde baskılanmıştır. Aynı zamanda HT-29 hücre hattında siRNA uygulanan tüm gruplarda kontrole göre, siRNA+PTX uygulanan gruplarda PTX grubuna göre Ob-R protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalma vardır.

Endometriyal kanser hücre hattı ile yapılan bir çalışmada leptin ile tedavi edilen hücrelerde PTX'e karşı direnc artarken, leptin inhibitörü verildiğinde hücreler PTX'in sitotoksik etkilerine karşı yeniden daha duyarlı hale gelmiştir (Daley-Brown vd., 2019). Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da her iki KRK hücre hattında leptin siRNA uygulanan gruplarda leptin mRNA seviyeleri düşmüş ve leptin siRNA+PTX uygulanan gruplarda MDR1 mRNA düzeyleri PTX uygulanan gruba karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş göstermiştir. Her iki KRK hücre hattında da kontrol grubuna kıyasla leptin siRNA uygulanan grupta MDR1 mRNA düzeyleri azalmakta olup bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bununla birlikte HT-29 hücre hattında yapılan immunofloresan boyamalarda siRNA uygulanan tüm gruplarda kontrole göre ve siRNA+PTX uygulanan tüm gruplarda PTX grubuna göre MDR1 protein seviyelerinde istatistiksel düzeyde anlamlı azalma mevcuttur.

Sistemik inflamasyon ve bu süreçte rol oynayan sitokinler kolon kanserinin gelişimi, ilerlemesi, invazivliği ve metastaz gibi süreçlerle bağlantılıdır (Long ve Raufman, 2011). KRK hastalarında, proinflamatuvar sitokinlerin seviyeleri ölçülerek yapılan bir çalışmada IL-1 β 'nın serum seviyeleri ve adenokarsinom dokudaki ekspresyonu yüksek bulunmuştur. Bu ekspresyon artışının KRK gelişim riski ve prognozuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Chang vd., 2016). Literatürde proinflamatuvar sitokinlerin, MDR1 de dahil olmak üzere farklı ilaç taşıyıcılarının ekspresyonunu ve aktivitesini düzenlediğini bildiren çalışmalar vardır (Bertilsson, Olsson ve Magnusson, 2001; Hirsch-Ernst vd., 1998; Mosaffa, Lage, Afshari ve Behravan, 2009; Piquette-Miller, Pak, Kim, Anari ve Shahzamani, 1998).

Bizim çalışmamızda IL-1 β siRNA+PTX verilen gruplar PTX grubuyla karşılaştırıldığında her iki KRK hücre hattında da MDR1 geninde anlamlı düzeyde azalma yaratmıştır. Kontrol grubuyla IL-1 β siRNA verilen grupları karşılaştırdığımızda ise MDR1 mRNA seviyelerinde azalma görülmekle birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Caco-2 ve HT-29 hücre hatlarında IL-1 β siRNA uygulanan grupta IL-1 β mRNA seviyelerinde anlamlı bir azalma olmamıştır. HT-29 hücre hattında yapılan immunofloresan boyamada IL-1 β siRNA uygulanan grupta kontrole göre, IL-1 β siRNA+PTX uygulanan grupta ise PTX grubuna kıyasla IL-1 β ve MDR1 protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma görülmüştür. Bu durum çalışmamızda kullandığımız siRNA'nın etkili olduğunu göstermektedir.

Kanser hücrelerinin metastaz sürecinde primer tümörden köken alırlar ve bu süreçte bazal membranların, hücre dışı matriksin bütünlüğü bozulur, invazyon gerçekleşir ve tümör hücreleri bağışıklık tepkilerinden kaçınarak primer tümörden uzak bölgelere yayılırlar (Yu vd., 2012). Bazal membranların ve hücre dışı matriksin yıkılmasında matriks metalloproteinazlar (MMP) rol oynarlar. MMP2, tümör hücrelerinin invazyon yeteneğinde önemli rol oynar (Wei vd., 2014). KRK'de doku ve serumdaki MMP2 seviyelerindeki artışın, KRK'nin invazyonu ve metastazında önemli rol oynadığı ve ayrıca KRK hastalarının sağ kalım sürecinde etkili olduğu gösterilmiştir (Grobewska vd., 2014).

Notch sinyal yolunun da MMP'leri düzenleyebildiğine dair çalışmalar vardır. Hepatosellüler karsinom hücrelerinde Notch sinyalizasyonu DAPT mediatörü ile farklı dozlar kullanılarak inhibe edilmiş ve doza bağımlı olarak MMP2 protein ekspresyonlarının azaldığı görülmüştür (L. Zhou vd., 2012). Epitelyal over kanserinde tümörlü dokuda Notch1 ve MMP2'nin normal over dokusuna göre daha fazla eksprese olduğu görülmüş ve epitelyal over kanser hücre hattında Notch1'in siRNA ile susturulmasıyla MMP2 protein seviyesinde belirgin

bir azalma görülmüştür (Qian vd., 2020). Kanser hücrelerinde Notch1 ve MMP2 arasındaki bu ilişki kanser hücrelerinin invazivlik yeteneğinde ve kemorezistansında azalma ile sonuçlanmıştır. Bizim çalışmamızda da her iki hücre hattında Notch1 siRNA kullandığımız grupların MMP2 mRNA düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Literatürde birkaç çalışma, leptinin çeşitli kanser türlerinde MMP2'nin aşırı ekspresyonunun hücre invazivliği ve migrasyonunu indüklediğini bildirmiştir. Meme kanseri hücre hattında uygulanan leptin dozlarının MMP2 mRNA ve protein ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir (McMurtry, Simeone, Nieves-Alicea ve Tari, 2009). Bizim çalışmamızda hipotezimizle uyumlu olarak Leptin siRNA kullandığımız gruplarda leptin gen ekspresyonu baskılanması ile MMP2 mRNA miktarı istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubuna göre her iki KRC hücre hattında da azalmıştır.

IL-1 β , MMP'lerin ekspresyonunu ve aktivasyonunu düzenleyebilir (Schönbeck, Mach ve Libby, 1998). Hücre dışı matriksin bozulmasında önemli rol oynayan MMP2 seviyesi IL-1 β tarafından artırılır (Roy, Sarkar ve Felty, 2006). Meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada IL-1 β ile uyarılan hücrelerde aktif MMP2 seviyeleri ve bu hücrelerin invazyon yetenekleri artmıştır (Franco-Barraza vd., 2010). Çalışmamızda IL-1 β siRNA uygulanan HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde kontrol grubuna göre MMP2 mRNA seviyelerinde azalma olmakla birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.

VEGF ve reseptörleri (VEGFR), patolojik anjiyogenezde önemli rol oynayan ve malign tümörlerin oluşumu, gelişimi, invazyonu ve metastazı ile yakından ilişkili olan pro-anjiyogenik faktörlerdendir (Q. Zhang vd., 2019). Leptinin regülasyonundaki artış ve leptin tarafından indüklenen NILCO etkileşiminin meme kanseri hücrelerinde VEGF/VEGFR-2 ekspresyonundaki artışta önemli bir etkisinin olduğu bildirilmiştir (Guo ve Gonzalez-Perez, 2011). Kolorektal kanser dokusunda yapılan bir çalışmada NILCO genleri ve VEGF/VEGFR-2 ekspresyonları normal dokuya göre tümörlü dokuda yüksek bulunmuştur (Nilufer Erkasap vd., 2021). Notch1'in tümör hücrelerinde anjiyogenez sürecinde kritik roller oynadığı bilinmektedir. Meme kanseri hücre hattında yapılan bir çalışmada Notch1 verilmesi ile kanser hücrelerinde hücre invazivliği ve anjiyogenez oluşumu artmıştır. Aynı zamanda Notch1 siRNA verilmesi ile hücrelerde VEGFA ekspresyonu azalmıştır (Y. Liu, Su, Shan, Yang ve Ma, 2016). Kolorektal kanser ksenograft model üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise Notch yolağı inhibitörü ve leptin reseptör antagonisti kullanıldığında Notch yolağının ve leptinin VEGFA üzerindeki etkisi baskılanarak VEGFA mRNA seviyelerinde azalma yaratmıştır (Özyurt, 2019). IL-1 β 'nin, VEGFA'nın ekspresyonunu indüklediği bilinmektedir (Carmi vd., 2013; Konishi

vd., 2005). IL-1 β knockout farelerde yapılan bir çalışmada anjiyogenezde ve VEGF seviyelerinde azalma olmuştur (Carmi vd., 2013; Voronov vd., 2003). Çalışmamızda HT29 hücre hattında, Notch1 siRNA ve IL-1 β siRNA gruplarında ve Caco-2 hücre hattında ise Leptin siRNA grubunda kontrol grubuna kıyasla VEGFA mRNA seviyelerinde bir miktar azalma görülmüştür ancak bu azalma istatistiksel değildir.

Kolorektal kanser hücre hattında yapılan bir çalışmada Paclitaxel'in, VEGF ekspresyonunu inhibe ederek tümör anjiyogenez sürecinde de rol oynayabileceği gösterilmiştir (Toiyama vd., 2009). Çalışmamızda da bu bilgiler ile uyumlu olarak her iki KKK hücre hattında PTX kullanılan tüm gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da VEGFA mRNA seviyelerinde azalma mevcuttur. Caco-2 hücre hattında ise IL-1 β siRNA ve IL-1 β siRNA+PTX kullanılan gruplar arasında VEGFA mRNA seviyesindeki azalışta istatistiksel olarak anlamlılık vardır.

6. SONUÇ

Çalışmamızda KKK hücre hatlarında, NILCO genlerinin baskılanması MDR1 gen ekspresyon düzeylerinde azalmaya neden olmuştur. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, kolorektal kanser gelişimi üzerinde rol oynayan NILCO'nun MDR1 ekspresyonu üzerindeki etkisine dair literatüre bilgi kazandıracığı gibi kolon kanserinde gelişen kemorezistans ile başa çıkabilmek için bu hedef yolakların inhibisyonu ve MDR ilişkisi göz önüne alınarak yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesine olanak sağlayacaktır.

7. REFERANSLAR

- Akagi, Y., Liu, W., Xie, K., Zebrowski, B., Shaheen, R., & Ellis, L. (1999). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin-1 β . *British journal of cancer*, 80(10), 1506-1511.
- Altenberg, G. A. (2004). Structure of multidrug-resistance proteins of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 4(1), 53-62.
- Amawi, H., Sim, H.-M., Tiwari, A. K., Ambudkar, S. V., & Shukla, S. (2019). ABC transporter-mediated multidrug-resistant cancer. In *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity* (pp. 549-580): Springer.
- Apte, R. N., Dotan, S., Elkabets, M., White, M. R., Reich, E., Carmi, Y., . . . Voronov, E. (2006). The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(3), 387-408.
- Bertilsson, P. M., Olsson, P., & Magnusson, K.-E. (2001). Cytokines influence mRNA expression of cytochrome P450 3A4 and MDRI in intestinal cells. *Journal of pharmaceutical sciences*, 90(5), 638-646.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Candelaria, P. V., Rampoldi, A., Harbuzariu, A., & Gonzalez-Perez, R. R. (2017). Leptin signaling and cancer chemoresistance: Perspectives. *World Journal of Clinical Oncology*, 8(2), 106.
- Carmi, Y., Dotan, S., Rider, P., Kaplanov, I., White, M. R., Baron, R., . . . Apte, R. N. (2013). The role of IL-1 β in the early tumor cell-induced angiogenic response. *The Journal of Immunology*, 190(7), 3500-3509.

- Chang, P. H., Pan, Y. P., Fan, C. W., Tseng, W. K., Huang, J. S., Wu, T. H., . . . Yeh, K. Y. (2016). Pretreatment serum interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α levels predict the progression of colorectal cancer. *Cancer medicine*, 5(3), 426-433.
- Chen, A. M., Zhang, M., Wei, D., Stueber, D., Taratula, O., Minko, T., & He, H. (2009). Co-delivery of doxorubicin and Bcl-2 siRNA by mesoporous silica nanoparticles enhances the efficacy of chemotherapy in multidrug-resistant cancer cells. *Small*, 5(23), 2673-2677.
- Chu, D., Li, Y., Wang, W., Zhao, Q., Li, J., Lu, Y., . . . Xie, H. (2010). High level of Notch1 protein is associated with poor overall survival in colorectal cancer. *Annals of surgical oncology*, 17(5), 1337-1342. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1245%2Fs10434-009-0893-7>
- Chu, D., Wang, W., Xie, H., Li, Y., Dong, G., Xu, C., . . . Lu, Z. (2009). Notch 1 expression in colorectal carcinoma determines tumor differentiation status. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 13(2), 253-260.
- Daley-Brown, D., Harbuzariu, A., Kurian, A. A., Oprea-Ilie, G., & Gonzalez-Perez, R. R. (2019). Leptin-induced Notch and IL-1 signaling crosstalk in endometrial adenocarcinoma is associated with invasiveness and chemoresistance. *World journal of clinical oncology*, 10(6), 222.
- Erkasap, N., Ozkurt, M., Erkasap, S., Yasar, F., Uzuner, K., Ihtiyar, E., . . . Bolluk, O. (2013). Leptin receptor (Ob-R) mRNA expression and serum leptin concentration in patients with colorectal and metastatic colorectal cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(3), 306-310. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3854369/pdf/1414-431X-bjmb-46-03-306.pdf>
- Erkasap, N., Ozyurt, R., Ozkurt, M., Erkasap, S., Yasar, F., Ihtiyar, E., . . . Colak, E. (2021). Role of Notch, IL-1 and leptin expression in colorectal cancer. *Experimental and therapeutic medicine*, 21(6), 1-11.

- Fender, A. W., Nutter, J. M., Fitzgerald, T. L., Bertrand, F. E., & Sigounas, G. (2015). Notch-1 promotes stemness and epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 116(11), 2517-2527.
- Franco-Barraza, J., Valdivia-Silva, J. E., Zamudio-Meza, H., Castillo, A., García-Zepeda, E. A., Benítez-Bribiesca, L., & Meza, I. (2010). Actin cytoskeleton participation in the Onset of IL-1 β induction of an invasive mesenchymal-like phenotype in epithelial MCF-7 Cells. *Archives of medical research*, 41(3), 170-181.
- Gillespie, C., Quarshie, A., Penichet, M., & Gonzalez-Perez, R. (2012). Potential role of leptin signaling in DMBA-induced mammary tumors by non-responsive C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Carcinogene Mutagene*, 3(132), 20-23.
- Gonzalez-Perez, R. R., Lanier, V., & Newman, G. (2013). Leptin's pro-angiogenic signature in breast cancer. *Cancers*, 5(3), 1140-1162.
- Gonzalez-Perez, R. R., Xu, Y., Guo, S., Watters, A., Zhou, W., & Leibovich, S. J. (2010). Leptin upregulates VEGF in breast cancer via canonic and non-canonical signalling pathways and NF κ B/HIF-1 α activation. *Cellular signalling*, 22(9), 1350-1362.
- Groblewska, M., Mroczko, B., Gryko, M., Pryczynicz, A., Guzińska-Ustymowicz, K., Kędra, B., . . . Szmitkowski, M. (2014). Serum levels and tissue expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2) in colorectal cancer patients. *Tumor Biology*, 35(4), 3793-3802.
- Guo, S., Colbert, L. S., Fuller, M., Zhang, Y., & Gonzalez-Perez, R. R. (2010). Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1806(1), 108-121.
- Guo, S., & Gonzalez-Perez, R. R. (2011). Notch, IL-1 and leptin crosstalk outcome (NILCO) is critical for leptin-induced proliferation, migration and VEGF/VEGFR-2 expression in breast cancer. *PloS one*, 6(6), e21467.

- Hirsch-Ernst, K. I., Ziemann, C., Foth, H., Kozian, D., Schmitz-Salue, C., & Kahl, G. F. (1998). Induction of *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein expression by tumor necrosis factor alpha in primary rat hepatocyte cultures. *Journal of cellular physiology*, 176(3), 506-515.
- Hua, J., Mutch, D. G., & Herzog, T. J. (2005). Stable suppression of MDR-1 gene using siRNA expression vector to reverse drug resistance in a human uterine sarcoma cell line. *Gynecologic oncology*, 98(1), 31-38.
- Ji, N., Yang, Y., Cai, C.-Y., Lei, Z.-N., Wang, J.-Q., Gupta, P., . . . Chen, Z.-S. (2019). Selonsertib (GS-4997), an ASK1 inhibitor, antagonizes multidrug resistance in ABCB1-and ABCG2-overexpressing cancer cells. *Cancer letters*, 440, 82-93.
- Konishi, N., Miki, C., Yoshida, T., Tanaka, K., Toiyama, Y., & Kusunoki, M. (2005). Interleukin-1 receptor antagonist inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma. *Oncology*, 68(2-3), 138-145.
- Li, H., Krstin, S., & Wink, M. (2018). Modulation of multidrug resistant in cancer cells by EGCG, tannic acid and curcumin. *Phytomedicine*, 50, 213-222.
- Liu, Y., Su, C., Shan, Y., Yang, S., & Ma, G. (2016). Targeting Notch1 inhibits invasion and angiogenesis of human breast cancer cells via inhibition Nuclear Factor- κ B signaling. *American journal of translational research*, 8(6), 2681.
- Long, T. M., & Raufman, J.-P. (2011). The diagnostic and prognostic role of cytokines in colon cancer. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy*, 1, 27-39.
- Majidinia, M., Mirza-Aghazadeh-Attari, M., Rahimi, M., Mihanfar, A., Karimian, A., Safa, A., & Yousefi, B. (2020). Overcoming multidrug resistance in cancer: Recent progress in nanotechnology and new horizons. *IUBMB life*, 72(5), 855-871. Retrieved from <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/iub.2215>

- McMurtry, V., Simeone, A.-M., Nieves-Alicea, R., & Tari, A. M. (2009). Leptin utilizes Jun N-terminal kinases to stimulate the invasion of MCF-7 breast cancer cells. *Clinical & experimental metastasis*, 26(3), 197-204.
- Mosaffa, F., Lage, H., Afshari, J. T., & Behravan, J. (2009). Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha increase ABCG2 expression in MCF-7 breast carcinoma cell line and its mitoxantrone-resistant derivative, MCF-7/MX. *Inflammation research*, 58(10), 669-676.
- Nakopoulou, L., Stefanaki, K., Panayotopoulou, E., Giannopoulou, I., Athanassiadou, P., Gakiopoulou-Givalou, H., & Louvrou, A. (2002). Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1 in breast carcinomas: correlation with proliferation. *Human pathology*, 33(9), 863-870.
- Navarro, G., Sawant, R. R., Biswas, S., Essex, S., Tros de Ilarduya, C., & Torchilin, V. P. (2012). P-glycoprotein silencing with siRNA delivered by DOPE-modified PEI overcomes doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Nanomedicine*, 7(1), 65-78.
- Orr, G. A., Verdier-Pinard, P., McDaid, H., & Horwitz, S. B. (2003). Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*, 22(47), 7280-7295.
- Özyurt, R. (2019). Ksenograft kolorektal kanserde notch, IL-1 ve leptin (NILCO) inhibisyonunun etkisi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Piquette-Miller, M., Pak, A., Kim, H., Anari, R., & Shahzamani, A. (1998). Decreased expression and activity of P-Glycoprotein in rat liver during acute inflammation. *Pharmaceutical research*, 15(5), 706-711.
- Podolski-Renić, A., Anđelković, T., Banković, J., Tanić, N., Ruždijić, S., & Pešić, M. (2011). The role of paclitaxel in the development and treatment of multidrug resistant cancer cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 65(5), 345-353.

- Qian, X.-q., Tang, S.-s., Shen, Y.-m., Chen, L.-l., Cheng, X.-d., & Wan, X.-y. (2020). Notch1 affects chemo-resistance through regulating epithelial-mesenchymal transition (EMT) in epithelial ovarian cancer cells. *International journal of medical sciences*, 17(9), 1215.
- Rodriguez, J. M., Miranda, D., Bunout, D., Ronco, A. M., de la Maza, M. P., & Hirsch, S. (2015). Folates induce colorectal carcinoma HT29 cell line proliferation through Notch1 signaling. *Nutrition and cancer*, 67(4), 706-711.
- Roy, D., Sarkar, S., & Felty, Q. (2006). Levels of IL-1 beta control stimulatory/inhibitory growth of cancer cells. *Front Biosci*, 11, 889-898.
- Schönbeck, U., Mach, F., & Libby, P. (1998). Generation of biologically active IL-1 β by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 β processing. *The Journal of Immunology*, 161(7), 3340-3346.
- Susa, M., Iyer, A. K., Ryu, K., Choy, E., Hornicek, F. J., Mankin, H., . . . Duan, Z. (2010). Inhibition of ABCB1 (MDR1) expression by an siRNA nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma. *PloS one*, 5(5), e10764.
- Szakács, G., Hall, M. D., Gottesman, M. M., Boumendjel, A. n., Kachadourian, R., Day, B. J., . . . Di Pietro, A. (2014). Targeting the Achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance. *Chemical reviews*, 114(11), 5753-5774.
- Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., & Gottesman, M. M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 5(3), 219-234.
- Toiyama, Y., Inoue, Y., Hiro, J., Ojima, E., Watanabe, H., Narita, Y., . . . Kusunoki, M. (2009). Paclitaxel inhibits radiation induced VEGF secretion and enhances radiosensitizing effects in human colon cancer cell HT29. *Cancer Therapy*, 7(1).

- Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., . . . Apte, R. N. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2645-2650.
- Walkiewicz, K., Koziel, P., Bednarczyk, M., Błażelonis, A., Mazurek, U., & Muc-Wierzgoń, M. (2016). Expression of migration-related genes in human colorectal cancer and activity of a disintegrin and metalloproteinase 17. *BioMed research international*, 2016.
- Wei, G., Chang, Y., Zheng, J., He, S., Chen, N., Wang, X., & Sun, X. (2014). Notch1 silencing inhibits proliferation and invasion in SGC-7901 gastric cancer cells. *Molecular medicine reports*, 9(4), 1153-1158.
- Wu, W.-R., Zhang, R., Shi, X.-D., Zhu, M.-S., Xu, L.-B., Zeng, H., & Liu, C. (2014). Notch1 is overexpressed in human intrahepatic cholangiocarcinoma and is associated with its proliferation, invasiveness and sensitivity to 5-fluorouracil in vitro. *Oncology reports*, 31(6), 2515-2524.
- Yhee, J. Y., Song, S., Lee, S. J., Park, S.-G., Kim, K.-S., Kim, M. G., . . . Jeong, J. H. (2015). Cancer-targeted MDR-1 siRNA delivery using self-cross-linked glycol chitosan nanoparticles to overcome drug resistance. *Journal of Controlled Release*, 198, 1-9.
- Yu, B., Wei, J., Qian, X., Lei, D., Ma, Q., & Liu, Y. (2012). Notch1 signaling pathway participates in cancer invasion by regulating MMPs in lingual squamous cell carcinoma. *Oncology reports*, 27(2), 547-552.
- Zhang, F., Zhang, H., Wang, Z., Yu, M., Tian, R., Ji, W., . . . Niu, R. (2014). P-glycoprotein associates with Anxa2 and promotes invasion in multidrug resistant breast cancer cells. *Biochemical pharmacology*, 87(2), 292-302. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006295213007181?via%3Dihub>

- Zhang, Q., Zhang, J., Zhang, J., Aerxiding, P., Quhai, A., Chen, C., & Shan, L. (2019). The biological-behavioral effect of neuritin on non-small cell lung cancer vascular endothelial cells via VEGFR and Notch1. *OncoTargets and therapy*, 12, 9747.
- Zheng, H.-C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, 8(35), 59950.
- Zhou, L., Wang, D.-S., Li, Q.-J., Sun, W., Zhang, Y., & Dou, K.-F. (2012). Downregulation of the Notch signaling pathway inhibits hepatocellular carcinoma cell invasion by inactivation of matrix metalloproteinase-2 and-9 and vascular endothelial growth factor. *Oncology reports*, 28(3), 874-882.