

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARBOPLATİNİN ETOPOSİTE DİRENÇLİ A549 HÜCRE HATTINDA
SİTOTOKSİK VE ANTİ-METASTATİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

AYKUT KURUOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2017

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARBOPLATİNİN ETOPOSİTE DİRENÇLİ A549 HÜCRE HATTINDA
SİTOTOKSİK VE ANTİ-METASTATİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

AYKUT KURUOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından FYL-2015-974 nolu proje ile desteklenmiştir.)**

2017

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARBOPLATİNİN ETOPOSİTE DİRENÇLİ A549 HÜCRE HATTINDA
SİTOTOKSİK VE ANTİ-METASTATİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aykut KURUOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 06/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Esra AYDEMİR

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

ÖZET

KARBOPLATİNİN ETOPOSİTE DİRENÇLİ A549 HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK VE ANTI-METASTATİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

AYKUT KURUOĞLU

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Esra AYDEMİR

Ocak 2017, 53 sayfa

Akciğer kanseri, erkeklerde ve kadınlarda kanserden ölümlerin en büyük yüzdesini oluşturmaktadır. Görülme sıklığının yüksek olması ile birlikte, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), hastaların yaşam kaliteleri ve ömür uzunluklarını önemli derecede etkileyen ölümcül hastalıklardan biridir. Bu hastalıkta kemoterapötik ajan olarak verilen ilaçlara ilkin kazanılan edinsel dirençlilik de hastalarda oldukça olumsuz etkiler göstermektedir. Edinsel dirençliliği sağıaltmak amacıyla yapılan adjuvan terapiler ömür uzunluğu ve yaşam kalitesini arttırmada önemlidir. KHDAK hastaları için klinikte en sık kullanılan kemoterapötiklerden biri etopositir. Tedavide ilkin olumlu yanıtlar alınsa da, kanserli hücreler zamanla etoposite karşı da direnç geliştirebilmektedir. Karboplatin de yine küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) tedavisinde kullanılan platin türevli bir ilaçtır. Adjuvan tedavide kullanımında, sıklıkla başarı gözlenmiştir.

Bu çalışmada, ilk hedef olarak A549 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattında etoposite direnç geliştirdik. A549 atasal formu ve onun direnç geliştirmiş alt kültürü olan A549/90E hücre hatlarına karboplatin çeşitli dozlarıyla uygulanarak sitotoksikite taraması gerçekleştirdik. Karboplatin için belirlediğimiz IC₅₀ değerinde, her iki hücre hattında da kaspaz-3 ve MMP-2 enzim aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler ölçümlendi.

Sonuç olarak, atasal ve direnç geliştiren A549 hücre hatlarında karboplatin doza ve zamana bağlı yüksek sitotoksik etki gösterdi. Karboplatin 72 saat için 15 µg/mL'lik konsantrasyonda A549/P hücre hattında kaspaz-3 enzim aktivitesinde 2.3 kat artış gösterirken, A549/90E hücre hattında 12 µg/mL'lik konsantrasyonda kaspaz-3 enzim aktivitesinde 13 kat artış gösterdi. A549/P hücre hattı için 72 saatlik 15 µg/mL'lik karboplatin uygulaması MMP-2 enzimi seviyesinde 1.95 kat azalış gösterirken, A549/90E hücre hattında 12 µg/mL'lik karboplatin konsantrasyonunda 2.38 kat azalış gösterdi.

ANAHTAR KELİMELELER: Etoposit, Karboplatin, A549, MMP-2, Kaspaz-3.

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Esra AYDEMİR (Danışman)

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC AND ANTI-METASTATIC EFFECTS OF CARBOPLATIN ON ETOPOSIDE-RESISTANT A549 CELL LINE

Aykut KURUOGLU

MSc Thesis in Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Esra AYDEMİR

January 2017, 53 pages

Lung cancer constitute the largest percentage of deaths from cancer in men and women. In addition to its high incidence, non-small cell lung cancer (NSCLC) is one of the deadly diseases that significantly affects quality of life and longevity of patients. In these disease, firstly acquired resistance to drugs administered as chemotherapeutic agents also show highly negative results in patients. Adjuvant therapies for treatment of acquired resistance is very important in increasing quality of life and longevity of patients. Etoposide is one of most used chemotherapeutics in clinics for NSCLC patients. In spite of positive results for treatments, cancer cells can develop resistance against etoposide over time. Carboplatin is a platin-derived drug also used for non-small cell lung cancer (NSCLC) treatment. Its use in adjuvant therapy often demonstrates success.

In this study, we first developed etoposide resistance on A549 non-small cell lung carcinoma cell line. We examined the cytotoxic effects of various doses of carboplatin on parental A549 cell line and etoposide-resistant A549/90E cell line. At IC₅₀ values for carboplatin We determined changes in caspase-3 and MMP-2 enzyme activities in both cell lines at the determined doses of carboplatin.

As a result, carboplatin were shown dose and time-dependent high cytotoxic effect on parental and resistant A549 cell lines. Carboplatin showed a 2.3-fold increase in caspase-3 enzyme activity on the A549/P cell line at a concentration of 15 µg/mL for 72 hours and a 13-fold increase in caspase-3 enzyme activity at the 12 µg/mL concentration on the A549/90E cell line. It showed a 1.95 fold decrease in MMP-2 enzyme activity on A549/P cell line at a concentration of 15 µg/mL for 72 hours and a 2.38-fold decrease in MMP-2 enzyme activity at the 12 µg/mL concentration on the A549/90E cell line.

KEYWORDS: Etoposide, Carboplatin, A549, MMP-2, Caspase-3

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Esra AYDEMİR (Supervisor)

Prof. Dr. Kayahan FISKIN

Assoc. Prof. Dr. Ayşe Gul MUTLU GULMEMIS

ÖNSÖZ

KHDAK, agresif seyreden ve sağkalım oranı yüksek olmayan, tanı anında çoğunlukla yaygın hastalık evresinde olan, uzak organ metastazı ve bölgesel lenf bezi tutulumu yapabilen sistemik bir hastalıktır. Hastalığın genetik ve moleküler özelliklerini araştıran çalışmalar her geçen gün artsa da, sınırlı hastalık evresinde uygulanan kemoterapi standardı uzun yıllardır değişmemiştir. Yaygın hastalıkta, yeni tedavi arayışları ise sürmektedir.

En yaygın akciğer tümörü olarak bilinen KHDAK, diğer akciğer tümörleri ile karşılaştırıldığında, kemoterapi ve radyoterapide en başarılı sonuçların alındığı kanser grubunu oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda, farklı kemoterapi rejimlerinin tedavi programlarına eklenmesi sayesinde sağkalım süresinde belirgin avantajlar elde edildiği gösterilmiştir. Öte yandan kullanılan tedavide başarı elde edilmişken, hücrelerde kemoterapötik ilaca karşı direnç gelişmesi tedavi başarısını önemli ölçüde azaltmakta, tedavi rejiminin değişmesine ve bu nedenle de hastalığın tamamen sağaltımının gecikmesine yol açmaktadır. Bu denli tehditkâr olan bu kanser tipine yakalanmış hastalarda gelişen dirençliliği aşabilmeyi sağlayacak yeni tedavi yaklaşımları oluşturabilmek için yapılacak olan her çalışma, hastalığın sağaltımı açısından önem arz etmektedir. Karboplatin, akciğer kanseri tedavisinde, gerek maliyeti gerekse tedavi başarısı göze alındığında tercih edilen kemoterapötiklerden biridir. Bu tez önerisini hazırlamak için yaptığımız ayrıntılı literatür taramalarında etoposide direnç gelişen hücrelerde karboplatin tedavisini *in vitro* yada *in vivo* test eden bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tez kapsamında etoposide dirençli hale getirdiğimiz A549 hücrelerine karboplatin uygulayarak, dirençli hücrelerin ikinci ilaca verecekleri sitotoksik yanıtları araştırmayı hedefledik. Kemoterapötik ilaçların etki mekanizmaları arasında hücrede sitotoksik etki yaratarak, hücreyi apoptoza yönlendirmek yer almaktadır. Karboplatinin dirençli A549 hücrelerindeki sitotoksik etkisi, öncelikle hücre canlılığının belirlenmesi ve ardından apoptoz mekanizmasında anahtar rol oynayan kaspaz-3 enzim aktivitesindeki değişikliklerin saptanması ile ortaya konmuştur. Bunların yanı sıra, etoposide karşı kazandığı direnç sayesinde daha agresifleşen yani başka bir deyişle metastatik özelliği artan bu hücrelerde, karboplatinin anti-metastatik bir etki yaratıp yaratmadığı, metastaz sürecinin araştırılmasında sıklıkla tercih edilen MMP-2 enzim aktivitesindeki değişikliklerin araştırılması ile belirlenmiştir.

Etoposid dirençliliği geliştirilmesi hedeflenen A549 hücre hattında ilacın kademeli olarak uygulanması ile yürüttüğümüz dirençlilik çalışmalarında, % 95 ölümün gerçekleştiği 90 µg/mL'lik dozda hücreler ilaca dirençli hale gelmiştir. Her iki hücre hattı için yapılan sitotoksikite deneyleri sonucunda, direnç geliştirmiş hücre hattının parental formuna kıyasla, karboplatine daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Adjuvan terapide hedeflenen ikincil ilaç tedavisi için, etoposite direnç geliştirmiş akciğer kanseri hücrelerinde daha düşük konsantrasyonlarda karboplatin tedavisi uygulanabileceği varsayılabilir. Etoposite direnç geliştirmiş akciğer kanseri hücrelerinde, karboplatinin kaspaz-3 seviyelerini arttırarak apoptozu tetiklediği de gösterilmiştir. Kaspaz-3 seviyesinin artışına bağlı olarak dirençlilik mekanizmalarının aydınlatılmasına ışık tutulmuştur. Birçok kanser türünde dirençlilik mekanizmaları tümörü daha agresif ve daha metastatik hale getirirken, etoposid direnci geliştiren bu hücre hattında metastatik aktivite gözlenmemiştir.

Bana lisans döneminden beri hayalini kurduğum yüksek lisans yapabilme fırsatını sunan, tez çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmakta oldukça cömert olan sevgili hocam, akademik danışmanım Yrd. Doç. Dr. Esra AYDEMİR'e, lisans döneminde bana laboratuvarında çalışma fırsatı sunan ve bu yola ilk adımımı atmamı sağlayan saygıdeğer Sayın Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN'a, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, Sayın Yrd. Doç. Dr. Nilüfer İMİR'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK'e, tüm bildiklerini aktararak çizdiğim yolda daima yanımda duran sevgili ablam Cansu KİLİT'e, her başım sıkıştığında desteğini esirgemeyen, 9 yıl boyunca her kahrımı çeken, dosttan öte kardeşim Bircan ÖNEL'e, bu yolda birlikte yürüdüğüm, tüm buhranlarıma neşe kaynağı olan, kardeşim, dostum, kardeşim Orhan KOÇAK'a, hayatımın en büyük anlamı, biricik kardeşim Narin Duygu KURUOĞLU'na ve eğitim hayatım boyunca kendilerinden çok beni düşünen, her ne olursa olsun yanımda olan, her durumda sonsuz anlayış gösteren ve benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babam Rahim KURUOĞLU'na ve annem Zennuriye KURUOĞLU'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Akciğer kanseri.....	6
2.2. Akciğer Kanseri Tedavileri.....	8
2.2.1. Etoposit	10
2.2.2. Karboplatin	11
2.3. Kemoterapik İlaç Dirençliliği	12
3. MATERYAL VE METOT.....	18
3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları	18
3.2. Dojindo Hücre Proliferasyon Kiti-8 (CCK-8)	18
3.3. Dirençli Hücre Kültürünün Hazırlanması.....	19
3.4. İlaçların Uygulanması	20
3.5. Kaspaz-3 Kolorimetrik Proteaz Test Kiti	20
3.6. MMP-2 Kolorimetrik Eliza Kit.....	21
3.7. İstatistiksel Analizler	21
4. BULGULAR	22
4.1. Etoposit'in A549 Hücre Hattı Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler	22
4.2. Etoposite Dirençli A549 Hücre Hatlarının Geliştirilmesi	24
4.3. Karboplatin'in A549/P ve A549/90E Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler.....	26
4.4. Karboplatin'in A549/P ve A549/90E Hücrelerinde Kaspaz-3 Enzimi Üzerindeki Etkisi	31
4.5. Karboplatin'in A549/P ve A549/90E Hücrelerinde MMP-2 Enzimi Üzerindeki Etkisi.....	32
5. TARTIŞMA.....	34
6. SONUÇLAR	39
7. KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
g	Yerçekimi Katsayısı
kDA	Kilo Dalton
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
µg	Mikrogram

Kısaltmalar

2D	2 Boyutlu
37LRP	37 Kilo Dalton Laminin Reseptör Öncüsü
3D	3 Boyutlu
5-FU	5-Florourasil
A172	Glioblastoma Hücre Hattı
A549	Akciğer Adenokarsinoma Hücre Hattı
A549/90E	Akciğer Adenokarsinoma 90 µg/mL Etoposite Dirençli Hücre Hattı
A549/P	Akciğer Adenokarsinoma Parental Hücre Hattı
ABC	ATP bağlı kaset taşıyıcıları
ABCB1	ATP Bağlı Kaset B Alt Ailesi Üye 1
ABCC1	ATP Bağlı Kaset C Alt Ailesi Üye 1
ABCG2	ATP Bağlı Kaset G Alt Ailesi Üye 2
Ac-DEVD-pNA	Asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilit
AdenoKA	Adenokarsinoma
AGS3	G-protein Sinyali 3'ün aktivatörü
AIS	Adenokarsinoma in situ
ALK	Anaplastik lenfoma kinaz
ALT	Telomerlerin Alternatif Uzaması
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATP	Adenozin Tri-fosfat
Bad	Bcl-2 ilişkili ölüm proteini
BAK	Bcl-2 homolog antagonist öldürücü
BARD-1	BARC1 ilişkili HALKA domaini 1
Bax	Bcl-2 ilişkili X proteini

BCL-2	B Hücre Lenfoma 2
Bcl-xL	B hücre lenfoma-extra large
BCR-ABL	Philadelphia Kromozomu-Füzyon Gen
BCRP	Meme Kanseri Dirençlilik Proteini
BEL/5-FU	Hepatoma hücre hattı
BHAK	Büyük hücre anaplastik karsinoma
BMP4	Kemik morfojenik protein 4
BRAF	Serin/treonin-protein kinaz B-Raf
BRCP	Meme kanseri dirençlilik proteini
BSA	Bovin Serum Albumin
BTCS	Bazal tümör hücresi izolasyonu
BYL179	Fosfoinositid 3-Kinaz alfa Seçici İnhibitör
CCK-8	Hücre Sayım Kiti-8
CDKN2A	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
CO ₂	Karbondioksit
CTLA4	Sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein 4
DDR2	Discoidin domain içeren reseptör 2
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksirio Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FBS	Fetal Bovin Serum
FGFR	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
FGR	Gardner-Rasheed kedi sarkomu viral (v-fgr) onkogen homologu
FHIT	Kırılgan histidin üçlü protein
FZD7	Frizzled-7 proteini
G ₀	Hücre Döngüsü Dinlenme Fazı
G1	Hücre Döngüsü Fazı
H2AFX	H2A histon ailesi üyesi X
HCC	Hepatosellüler Karsinoma
HDAC10	Histon deasetilaz 10
HEK 293T	İnsan Embriyonik Böbrek Epitel Hücre Hattı
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HIF-1	Hipoksi İndükleyici Faktör-1
hTERT	İnsan telomeraz ters transkriptaz
IC ₅₀	% 50 İnhibisyon Konsantrasyonu
KEAP1	Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KRAS	Kirsten rat sarkoma viral onkogen homologu
LRP	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein
MDR	Çoklu İlaç Dirençliliği Proteini

MEK	MAP/ERK1 yolađı
MET	Tirozin-protein kinaz Met
MIA	Mimal invaziv adenokarsinoma
miRNA	Mikro RNA
MLL2	Mixed-soy lösemi proteini-2
MM	Multipl-Myeloma
MMP	Matriks Metalloproteaz
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MRP-1	Çoklu İlaç dirençliliği ilişkili protein
MTS	Mitokondriyal Tetrazolyum Tuzu
MYC	V-Myc kuş miyelositomatozis viral onkogen homolog
NBN	Nibrin
NCI-H460	KHDAK hücre hattı
NCI-H460R	İlaç dirençli KHDAK hücre hattı
NFE2L2	Nükleer faktör (eritroid türevli-2) benzeri-2
NFκB	Nükleer faktör kappa B hücre proteini
NOTCH1	Translokasyon ilişkili notch protein tan-1
NTHL1	Endonükleaz III- benzeri protein 1
NTRK	Nörotropik reseptör tirozin kinaz 1
OD	Optik dansite
P53	53 kDa'luk protein
PBS	Fosfat Tampon Tuzu
PD1	Programlı hücre ölümü 1
PGP	Fosfolikolat fosfataz
PI3K	Fosfoinositidil 3 Kinaz
PI3KCA	Fosfotidil inositol-4,5-bifosfat 3-kinaz catalitik altünite alfa
PKN1	Protein Kinaz N1
pNA	P-Nitroanilit
PORT	Postoperatif radyoterapi
PRKC	Protein Kinaz C
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
RASSF1A	Ras ilişkili domain içeren protein 1
RB1	Retinoblastoma-1 Proteini
RET	Reseptör tirozin kinaz
RHOC	Ras homolog ailesi üyesi C
RI	Dirençlilik indeksi
RNA	Ribonükleik Asit
ROS1	Proto-onkogen tirozin protein kinaz
RPA12	RNA polimeraz I altünitesi
RPMI	Roswell Park Memorial Enstitü Besi Ortamı
SEM	Standart Hata Oranı
SGC7901	İnsan gastrik hücre hattı

SHAK	Skuamoz hücreli akciğer kanseri
SIRT1	Sirtuin-1 geni
siRNA	Küçük İnterferans RNA
STAT3	Sinyal dönüştürücü ve transkripyon aktivatörü 3
STK11	Serin/treonin kinaz 11
TKI	Tirozin kinaz inhibitörü
TMB	Tetrametilbenzidin
VCR	Vinkristin
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WST	Suda çözünebilir tetrazolyum tuzu
XTT	2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sülfofenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksanilit
ZNRD1	Bakır kurdele domaini içeren 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanserde kazanılmış yetenekler	4
Şekil 2.2. Sisplatin ve Karboplatin açık formüllüleri	11
Şekil 4.1. Etoposit'in 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549 hücre hattı üzerine etkisi.	22
Şekil 4.2. Etoposit'in 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549 hücre hattı üzerine etkisi.	23
Şekil 4.3. Etoposit'in 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549 hücre hattı üzerine etkisi.	23
Şekil 4.4. Etoposit'in 1,95 -1000 µg/mL arasında denenilen dozlarının A549 hücre hattında yol açtığı ölüm oranları (%).	24
Şekil 4.5. 1.95 -1000 µg/mL arasında etoposit uygulanan A549/90E hücre hattında hücre canlılığı oranları (%).	25
Şekil 4.6. Karboplatin'in 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549/P hücre hattı üzerine etkisi	26
Şekil 4.7. Karboplatin'in 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549/P hücre hattı üzerine etkisi	27
Şekil 4.8. Karboplatin'in 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549/P hücre hattı üzerine etkisi	27
Şekil 4.9. Karboplatin'in 1,95 -1000 µg/mL arasında denenilen dozlarının A549/P hücre hattında yol açtığı ölüm oranları (%).	28
Şekil 4.10. Karboplatin'in 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549/90E hücre hattı üzerine etkisi.	29
Şekil 4.11. Karboplatin'in 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549/90E hücre hattı üzerine etkisi.	29
Şekil 4.12. Karboplatin'in 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549/90E hücre hattı üzerine etkisi.	30

Şekil 4.13. Karboplatin'in 1,95 -1000 µg/mL arasında denenilen dozlarının A549/90E hücre hattında yol açtığı ölüm oranları (%).	30
Şekil 4.14. 40 µg/mL etoposid ve 15 µg/mL karboplatin'in A549/P hücre hattında kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri.	31
Şekil 4.15. 40 µg/mL etoposid ve 15 µg/mL karboplatin'in A549/90E hücre hattında kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri.	32
Şekil 4.16. 40 µg/mL etoposid ve 15 µg/mL karboplatin'in A549/P hücre hattında MMP-2 enzim aktivitesi üzerine etkileri.	33
Şekil 4.17. 40 µg/mL etoposid ve 15 µg/mL karboplatin'in A549/90E hücre hattında MMP-2 enzim aktivitesi üzerine etkileri.	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Dirençli altkültürlerin gelişimi için etoposit uygulanma süreleri (hafta) ... 25

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerde anormal proliferasyon ile tanımlanan kompleks bir hastalıktır. Bir hücrenin kanser hücresine dönüşebilmesi için; büyüme sinyallerinin normale oranla artmış olması, büyümeyi engelleyen sinyallere karşı duyarsızlaşması, apoptoza direnç geliştirmesi, invazyon, anjiyogenez ve metastaz özelliklerini kazanmış olması gerekmektedir (Hanahan ve Weinberg 2000). Tüm dünyada, erkeklerde yılda 1.1 milyon vaka ile en yaygın, kadınlar arasında yılda 516,000 vaka ile dördüncü sırada yer alan akciğer kanseri, kansere bağlı ölümlerin dörtte birini oluşturmaktadır (Siegel vd 2014). Akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere ikiye ayrılır. Üç alttipi bulunan KHDAK, histolojik olarak KHAK'ya oranla daha büyük hücrelere sahiptir ve yıllık akciğer kanseri vakalarının yaklaşık % 80'ini, akciğer kanserinden ölümlerin ise % 75'ini oluşturur (Sher vd 2008). KHDAK alttıplerin hücreleri boyut, şekil ve kimyasal yapı olarak birbirlerinden tamamen farklıdır. Ancak, tedavi ve prognoz yaklaşımları sıklıkla çok benzer olduğundan birlikte gruplandırılır.

Bazı tümörlerde (KHDAK) ilkin uygulanan kemoterapötik ajan hücrede başarılı sitotoksik yanıtlar oluştururken sonradan gelişen 'edinsel direnç' nedeniyle tedavideki başarı oranı zaman içerisinde belirgin ölçüde azalmaktadır. Kemoterapötik ajanlara karşı primer veya edinsel direnç oluşumunda, tümör hücrelerinin proliferatif özelliği ile birlikte, MDR, PGP, LRP gibi intrinsik faktörler de önemli etkenlerdir. Bunun yanı sıra tümör hücrelerinin çevre faktörleriyle ilişkisi, ilaca karşı direnç gelişmesinde rol oynamaktadır. Tümör ve normal doku hücrelerinin ilaçlara karşı sergilediği 'intrinsik duyarlılık' farklıdır ve hatta aynı tümör içerisindeki farklı hücrelerde bile ilaca karşı farklı duyarlılık gözlenebilir. Klinik uygulamalarda tedaviden elde edilebilecek başarıyı engelleyen nedenlerden biri, tedavi sırasında 'ilaca dirençli hücre popülasyonunun' gelişmesidir. İlaça dirençli hale gelen popülasyondaki tümör hücre sayısı başlangıçta az olsa bile, tedavi sürecinde söz konusu dirençli hücre grubunun kısa zaman içerisinde dominant hale gelmesi beklenir (Özgüroğlu 2003).

Etoposit, *Podophyllum peltatum* tarafından üretilen, podofillotoksin türevli semi-sentetik bir antikanser ajandır. Kemoterapide; Kaposi sarkoma, Ewing sarkoma, akciğer kanseri, testiküler kanser, lenfoma, nonlenfomatik lösemi ve glioblastoma sağaltımında kullanılmaktadır. Başka ilaçlarla (testiküler kanserde asbleomisin gibi) kombine edilerek de kullanılan (Hande 1998) ve 'Topoizomeraz II zehirleri' grubu altında sınıflandırılan etoposit, DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda önemli rolü olan topoizomeraz II enzimini hedef alır. Etoposit toksik etkisini, katalitik döngüsü boyunca topoizomeraz II tarafından DNA'da oluşturulan geçici çift zincir kırıklarını stabilize ederek gösterir; böylece DNA hasarına hücresel yanıtı ve apoptozu başlatır (Alpsoy vd 2014). KHDAK'de DNA çift zincir kırıkları oluşturan etoposit, hastaların % 70'inde tümör hacminde küçülme sağlayan etkili bir kemoterapik ilaçtır. Ancak, tedavi sürecinde etopositte karşı gelişen hücresel direnç, aşılması gereken en önemli bariyerdir

ve tedaviden elde edilmesi beklenen başarıyı önemli ölçüde azaltmaktadır (Hansen vd 2003). KHDAK hücrelerinde çeşitli mekanizmalarla etoposite *in vitro* direnç geliştirebilir. Direnç gelişen hücreler apoptozdan kaçabilir ve hızla proliferasyona devam eder. Topoizomeraaz II α proteininin hem kantitatif hem de kalitatif değişimi ve enzimin etoposite duyarlılığının azalması, P-glikoproteini gibi ilaç atım pompalarının aşırı ekspresyonu (Robert ve Larsen 1998, Schneider vd 1994), DNA yanlış eşleşme tamirinden sorumlu genlerin ekspresyonunun azalması (Fedier vd 2001, Kaplan ve Gündüz 2012), MDR1 ve MRP1 gibi ABC taşıyıcı proteinlerinin ekspresyonunun artması (Szak vd 2009), etoposit dirençliliğiyle bağlantılı bulunmuştur.

Karboplatin veya cis-diammine (1,1-cyclobutanecarboxylato) platinum (II), kanser tedavisinde kullanılan platin türevli bir anti-kanser ilaçtır. Ovaryum, akciğer ve baş-boyun kanserleri için kemoterapide sıklıkla tercih edilmektedir. İlaç, biyolojik etkisini genomik DNA ile etkileşerek gösterir. Sisplatin benzer şekilde, iki klorür ligandı bulundurur. Klorür iyonları hücre içine yayıldığında DNA zincirinde özellikle guanin grupları ile çapraz bağlar oluşturur. DNA'nın farklı bir iyonla çapraz bağlanması replikasyonun, transkripsiyonun ve translasyonun inhibisyonuyla sonuçlanır. Karboplatin, sisplatin ek olarak, bir organik karboksilat grubu daha içerir. Bu grup karboplatine hızla suda çözünme ve daha yavaş hidroliz olma özelliği kazandırmaktadır. Yavaş hidroliz olabildiği için karboplatinin vücuttan atılma süresi uzamakta ve etkilerini daha uzun süreli sergileyebilmektedir. Dolayısıyla sisplatin oranla daha az nörotoksik ve nefrotoksik bir ilaçtır (Dasari ve Tchounwou 2014). Yapılan birçok çalışma, adjuvan tedavide karboplatin kullanımının kanser hastalarının yaşam kalitesi ve hayatta kalma süresini arttırdığını ve tümörün ilerleme zamanı ve metastaz risk oranını azalttığını göstermektedir (Fuji vd 2007, Kondo vd 2007, Darcy vd 2007, Chung vd 2006, Codegani vd 1997). Smith ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada, ovaryum kanserli hastalara uygulanan karboplatin adjuvan tedavisi sayesinde hayatta kalımın 40 aydan 60 aya çıktığını bildirmektedir. KHDAK hastalarına uygulanan karboplatin adjuvan tedavisinde ise hayatta kalım süresinin ortalama 6 ay arttığı ve tümör ilerlemesinin yaklaşık 18 ay daha geciktiği gösterilmiştir (Hwang vd 2007, Olausson vd 2006). Buradan yola çıkarak, biz de etoposite dirençli hale getirdiğimiz A549 hücrelerine adjuvan terapi olarak karboplatin uygulamayı ve bu ikincil tedavinin dirençli hücreler üzerinde sergileyebileceği sitotoksik etkileri incelemeyi amaçladık. Hedefimiz, dirençli hale gelerek bir kat daha agresifleşen küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinin karboplatin uygulamasına verecekleri apoptotik ve anti-metastatik cevapları araştırmaktır.

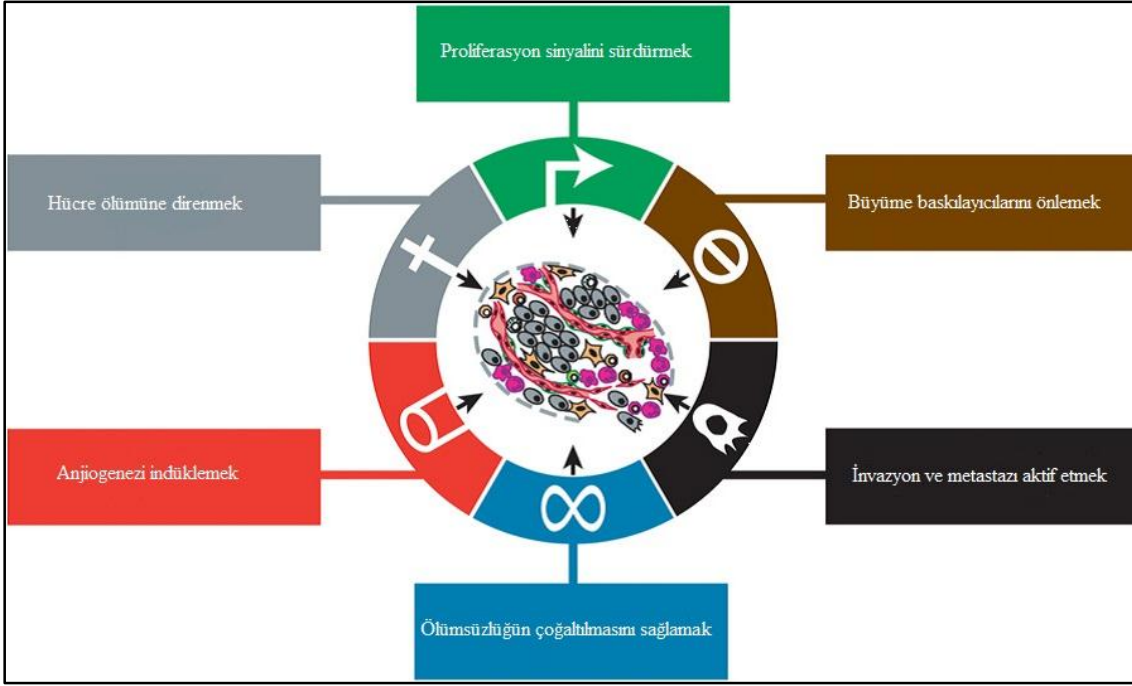
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Kanser

Kanser, hücre döngüsünün kontrolündeki işlev bozuklukları ve mutasyonların birikimi nedeni ile ölmesi gereken hasarlı ve mutant hücrelerin hücre döngüsü boyunca ilerlemesi; hücrede meydana gelen genetik veya epigenetik değişikliklerin birikmesi sonrasında ortaya çıkabilen genetik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Kansere hücrelerinde, sağlıklı hücrelerde meydana gelen büyüme, sağkalım ve invazyon/hareketlilik gibi normal hücre fonksiyonları kontrol eden genlerin ifadeleri artırılır ve bu fonksiyonları baskılayan genlerin çoğu işlevsizleştirilir (Hanahan ve Weinberg 2011). Son yıllarda epigenetik (non-mutasyonel) değişikliklerin rolü önem kazansa da, mutasyonların birikmesi hala kanser oluşumunun ana sebeplerinden biridir (Harrington 2015).

Kansere, her biri normal hücrelerde görevli iki sınıf gen grubu, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, tarafından kontrol edilir. Onkogenler; hücre proliferasyonu, sağkalım ve invazyon/hareketliliği kontrol eden proto-onkogen adı verilen genlerin mutant versiyonlarıdır. Normal hücrelerde, kontrolsüz hücre bölünmesinden kaçmak için proto-onkogenlerin ekspresyonu dikkatli bir şekilde düzenlenir. Proto-onkogenlerin değişimi ile ortaya çıkan ve onkogen olarak adlandırılan bazı genler, kanserde aktif mutasyonlar ile sağkalım ve yayılmayı arttıran kontrolsüz hücre büyümesine neden olur. Onkogenler kansere 3 yolla sebep olurlar: (1) bir gen dizisinin mutasyon ile biyolojik fonksiyonunu arttırabilir (pankreas, akciğer ve kolorektal kanserde RAS); (2) bir gen dizisi, kromozomda çoklu tekrarlanarak gen amplifikasyonuna sebep olabilir (nöroblastomada N-MYC); (3) bir gen dizisinin normal kromozomal lokasyonundan yeni, daha aktif bir promotör tarafından kontrol edilen, füzyon bir protein üretebilecek yeni kromozomal lokasyona taşınmasıyla olabilir (kronik miyeloid lösemide BCR-ABL). Tümör baskılayıcı genler normal hücrelerde hücre döngüsünün ilerlemesi ve programlı hücre ölümü/apoptoz kontrolünde görev yaparlar. Her iki kopyasının fonksiyonel olarak mutant olmasıyla kanseri ilerletir ve kalıtsal kanser sendromlarından sorumludur. Ailesel kanser sendromlarında, bireylerdeki tümör baskılayıcı genlerden herhangi birinin bir allelinde meydana gelen germline mutasyon kalıtılabilir (Harrington 2015).

Hanahan ve Weinberg (2000) yayınladıkları derlemede, kanserde malignan davranışı büyük ölçüde açıklayan altı temel değişikliği (büyüme faktörü bağımsızlığı, büyüme baskılayıcılarından kaçış, hücre ölümünden kaçış, replikatif potansiyelin korunması, anjiyogenez, invazyon/metastaz) belirledi. Bu tanımlamaları iki değişiklik (enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi, immün yıkımdan kaçış) ve iki etkinlik kazanan özelliğin (genomik instabilite, inflamasyon) eklenmesiyle güncellendi (Hanahan ve Weinberg 2011).



Şekil 2.1. Kanserde kazanılmış yetenekler (Hanahan ve Weinberg 2011).

Kanser moleküler biyolojisinin bir parçası olarak, iki önemli etkin özellik belirlenmiştir: genomik instabilite ve inflamasyon. İlki, kanser hücrelerinin genetik materyal bütünlüğünün kontrolünü kaybetmesi durumuyla ilişkilidir ve biyolojisini değiştiren mutasyonların artışı gerektirir ve kanserin özgünlüğünü artırır. Bu “mutator fenotip” olarak adlandırılmıştır. İkinci özellik, tümör büyümesi ve yayılmasını destekleyen ve arttıran immün sistemin komponentlerinin etkinleştirilmesi ve aktivasyonu boyunca premalignant ve daha kötüsü malignant lezyonların bir inflamatuvar durumunu uyardığı yaygın durumlarda belirlenir (Hanahan ve Weinberg 2011, Harrington 2015).

Normal hücrelerde, büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonu (ligandların sentezi, salınımı) çok sıkı düzenlenir. Kanser hücreleri zaten normal büyüme faktörü sinyal yollarını bozar ve onları kontrolsüz hücre bölünmesini hızlandırmak için kullanır. Kanser hücreleri 3 ana mekanizmayla büyüme faktörlerinde kendine yetmeyi başarır: (1) kendi reseptörlerini (otokrin) ve komşu hücrelerin reseptörlerini (parakrin) stimüle etmek için büyüme faktörleri salar; (2) yüzeyleri üzerindeki büyüme faktörü reseptörlerinin sayısı, yapısı ve fonksiyonunu değiştirir; (3) kalıcı olarak açık tutmak için reseptörün downstream sinyal yollarının regülasyonunu bozarlar (Rogers vd 2005).

Anti-büyüme sinyalleri kontrolsüz hücresel büyüme için fonksiyon gösterir. Hücrelerin yeniden hücre döngüsüne girmemesini sağlayacak şekilde hasarlı hücrelerin hücre döngüsünün G0 evresinde tutulmasını ya da terminal farklılaşmayı

sağlar. Anti-büyüme sinyal yollarının düzensizleşmesi kanserde son derece yaygındır ve hücre döngüsü boyunca kanserin ilerlemesinde önemli rol oynar (Rieger 2004).

Normal hücreler pro- ve anti-sağkalım sinyallerinin dengesini kontrol altında tutarak hücrenin canlılığını sağlar. Endojen (replikasyon boyunca) ve ekzojen (genotoksik olaylar) DNA hasarı, proliferasyonda engele sebep olarak DNA tamirinin potansiyelini belirler. Hasarın derecesi tamir kapasitesini aşarsa, pro- ve anti-sağkalım sinyallerinin dengesi bir yana yatar ve hücre programlı hücre ölümüne (apoptoz, otofaji vb.) sürüklenir. Bu durum DNA hasarının onarımını sağlar ve bu sayede mutasyonların birikmesi engellenir. Kanser gelişimi için de çok güçlü bir bariyer oluşturmaktadır. Kanser hücreleri ekstrinsik yolk boyunca gönderilen sinyalleri reddetme yeteneğiyle veya hücre içi pro- ve anti-sağkalım moleküllerinin dengesini apoptozun inhibisyonu lehinde ayarlayarak apoptozdan kaçır. Apoptozu atlayarak, kanser hücreleri hücre ölümüne sebep olmaksızın, DNA hasarını sürdürebilir. Bu yüzden, normal apoptotik sinyalleri atlatmayı başaran kanser hücreleri anti-kanser tedavilere doğal olarak daha dirençlidir (Wu vd 2001, Harrington 2015).

Normal hücrelerde, yeni kan damarlarının büyümesi pro- ve anti-anjiyogenik sinyaller arasındaki dengeyle, sıkı bir şekilde kontrol edilir. Kanser ilerlemesi yeterli niktarda oksijen sağlayabilmesi için gerekli yeni kan damarının oluşumu ile yakından ilişkilidir. Kanser hücreleri pro- ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengeyi bozmayı başararak yeni kan damarları oluşturur. Esas olarak, kanser hücreleri vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi pro-anjiyogenik proteinlerin üretimini upregüle ederek ve/veya angiostatin gibi anti-anjiyogenik proteinlerin üretimini downregüle ederek “anjiyogenik fenotip”e değişir (Carmeliet 2005).

Uzak metastazlar kanserden ölümlerin % 90’ından sorumludur. İnvazyon ve metastaz, ardışık olarak meydana gelen kompleks biyolojik süreçleri içerir: (1) tümör hücrelerinin lokal bölgedeki stroma ve yakın komşularından ayrılması; (2) spesifik yönlendirme hareketliliğini (tek bir hücre veya grup halinde) takiben ekstrasellüler matriksin enzimatik degradasyonu; (3) kan veya lenfatik damarlar ve tümör embolizasyonunun penetrasyonu (intravazasyon); (4) uygun büyüme faktörlerinin tedariki için seçilebilecek olan metastatik bölgeye varana kadar sirkülasyonda hayatta kalması; (5) varış noktasında kan damarları endoteliumuna bağlanması ve damarlardan içeri girişi ve; (6) yeni lokasyonuna invazyonu, burada proliferasyonu ve yeni kan damarlarının sağlanması. Epitelial tümörlerin invazyonu ve metastazının altında yatan anahtar süreçlerden biri epitel dokudan mezenchimal dokuya geçiştir. Farklı kanserlerin spesifik organlara (meme kanseri karaciğer, kemik ve beyine; akciğer kanseri beyin ve böbreküstü bezine gibi) metastazı rastgele değildir. Ancak kemokin reseptörlerinin ekspresyonundaki artışın, tümör hücrelerinin koloni oluşturmak için uygun bir çevre aramaları ile ilişkili olduğu görülmüştür (Talmadge ve Fidler 2010).

2.1.1. Akciğer kanseri

Akciğer kanseri, oldukça invaziv ve hızla metastaz yapabilen ve yaygın bir kanserdir. Amerika Birleşik Devletlerinde kadınlarda ve erkeklerde en öldürücü olmakla birlikte 2014 itibariyle 224,210 yeni vaka ve 159,260 ölüm kayıtlara geçmiştir (American Cancer Society, 2014). Bu rakamlar, akciğer kanserinin sebep olduğu ölümlerin, en ölümcül 4 kanser tipinden (kolon/rektal, meme, pankreas ve prostat) daha fazla olduğunu göstermektedir. Akciğer kanserinin insidansı ve ölüm oranı, sigara içimiyle yakından ilişkilidir. Sigaranın indüklediği akciğer kanserine bireysel duyarlılık kompetitif gen-enzim etkileşimlerine dayalı olabilir. Akciğer kanseri anatomik lokasyonuna bağlı olarak çok farklı bölgelerde ortaya çıkabilen ve çok çeşitli semptomlarla kendini belli eden oldukça heterojen bir kanser türüdür. Akciğer kanseri tanısı konulan hastaların % 70'i hastalığın ilerleyen aşamalarını (aşama III veya IV) gösterir (Lemjabbar-Alaoui vd 2015).

Skuamoz hücreli akciğer kanseri (SHAK) tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 25-30'unu oluşturur ve bronşlar ve bronşların omurgaya doğru uzayan kısımlarından ortaya çıkma eğilimindedir. Adenokarsinomalar (AdenoKA) tüm akciğer kanserlerinin ortalama % 40'ını oluşturur ve periferik bronşlarda tümör oluşumuna dayanır. Adenokarsinoma in situ (AIS) ve minimal invaziv adenokarsinoma (MIA) içinde yeniden sınıflandırılan brankialveolar kanserler (BAK), alveollerde oluşur ve interalveollere doğru yayılır. AIS ve MIA tüm rezeksiyon sonrası (% 100'e yaklaşan 5 yıllık oran) sağkalım oranı artmaktadır (Travis vd 2013). Küçük hücreli akciğer kanserleri (KHAK) akciğerin hormonal hücrelerinden türevlenir, en farklılaşmamış kanserlerdir ve merkez mediastinal tümörler olmaya eğilimlidir. KHAK, akciğer kanserlerinin % 10-15'ini kapsar ve submukozal lenfatik damarlar ve bölgesel lenf nodüllerinde son derece hızlı bir şekilde agresif yayılır ve bronşlara invazyon yapmaz. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinin (KHDAK) aksi belirtilmeyen (not otherwise specified=NOS) diye adlandırılan büyük hücre anaplastik karsinomalar (BHAK) lokasyonda daha çok proksimaldir ve lokasyon olarak mediastinum ve onun ilkin yapılarına saldırma eğilimindedir. KHDAK-NOS tüm KHDAK'lerinin % 10'unu kapsar ve ölümcül hızda yayılımıyla KHAK'e benzer şekilde davranır. Pankost kanseri üst sulkuslarda ortaya çıkar ve juxta-karşıtı yapılarda lokal invazyonla ilerler. Tüm akciğer kanseri tipleri meydana geldiği lobda multifokal oluşur ve akciğerin merkezinde veya boyunca yayılır. Karaciğer, beyin veya kemik gibi uzak bölge metastazı temel akciğer lezyonunun diagnozundan önce görülebilir (Lemjabbar-Alaoui vd 2015).

Akciğer kanseri hücreleri, normal hücre proliferasyonu ve homeostasisi yöneten düzenleyici devrelerde bozukluklara sahiptir. Normal bir hücreden malignant akciğer kanseri fenotipine dönüşümün, bir dizi genetik ve epigenetik değişiklikleri ve nihayetinde klonal büyümeyle invaziv kansere evrilmesini içeren çok basamaklı bir durumda meydana geldiği düşünülmektedir. Primer kanser gelişimini takiben, klonal

büyüme boyunca kazanılan genetik ve epigenetik anomalilerin devamlı birikimi; invazyon, metastaz ve kanser tedavisine dirençlilik süreçlerini etkiler (Lemjabbar-Alaoui vd 2015).

Kanser Genom Atlası (TCGA) Projesi Araştırma Ağı bünyesinde çalışmalarını sürdüren bilim insanları 230 tip akciğer adenokarsinomunun moleküler profillemesini tamamladı. Buna göre bütün ekzon sekanslamalarında mutasyon (DNA megabazı başına 8.7 mutasyon) görüldüğü bildirilmiştir. Daha önce benzer bir şekilde analiz edilen 182 AdenoKA tümörlerindeki gibi yukarıda belirtilen 230 AdenoKA vakasında da 18 genin önemli derecede mutasyonlu olduğu belirlenmiştir. Genetik değişiklikler, nokta mutasyonları (missen ve nonsense mutasyonlar, çerçeve kayması ve kayan bölge değişimleri) ve somatik kopya sayısı değişiklikleri gibi yeniden düzenlemelerdir (transvesiyonlar ve transisyonlar) (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Bu çalışmada 7000 tümörde (20 solid kanser tipi) RNA-seq analizi kullanarak, yeni ve yinelenen kinaz füzyon durumları tanımlanmıştır. Akciğer adenokarsinomalarında (513 örnek), füzyon olguları ROS1, RET, PRKCB, NTRK, MET ve ALK genlerinde bulunmuş ve akciğer skuamoz hücre karsinomasında (492 örnek) da PRKCB, PRKCA, PKN1, FGR, FGFR1, FGFR2 ve FGFR3 genlerinde bulunmuştur (Stransky vd 2014). Bu bulguların önemli klinik etkiye sahip olabileceği ve yeni terapötik yaklaşımlar için bu değişikliklerin hedeflenebileceği düşünülmektedir. Bir başka büyük sistematik genomik çalışmada 3527 tümör vakasından (DNA kopya sayısı, DNA metilasyonu, mRNA ekspresyonu, microRNA ekspresyonu, protein ekspresyonu ve somatik nokta mutasyonu) sekanslanan verilere dayanarak 11 alttipin içinde 12 tümör tipi yeniden sınıflandırılmıştır. KEAP1 ve STK11 gibi somatik mutasyonlar, akciğer adenokarsinoma vakalarının çoğunu kapsayan LUAD'la zenginleştirilmiş tümör gruplarında da mutasyonludur. CDKN2A, NOTCH1, MLL2 ve NFE2L2 akciğer skuamoz hücre karsinomaları vakalarının çoğunu kapsayan skuamoz benzeri tümör gruplarında mutasyonlu bulunmuştur. Skuamoz benzeri tümörler de CDKN2A, RB1 ve Tp53'ün kaybını ve sık Myc amplifikasyonunu göstermiştir (Hoadley vd 2014).

Akciğer kanseri için çeşitli genetik değişiklikler tanımlanmıştır (Shtivelman vd 2014): (1) KRAS, EGFR, BRAF, PI3K, MEK ve HER2 gibi bir grup proto-onkogende mutasyonların aktive olması. Özellikle, EGFR normal hücre proliferasyonu, apoptoz ve diğer hücre fonksiyonları düzenlemede kritik bir rol oynar. Birleşik Devletlerde KHDAK hastalarının yaklaşık % 10'u ve Doğu Asya'da % 35'i EGFR mutasyonu ilişkili tümöre sahiptir (Lynch vd 2004, Paez vd 2004, Pao vd 2004). (2) ALK, ROS1 ve muhtemelen RET'de yapısal yeniden düzenlemeler. (3) Adenokarsinomalarda MET, skuamoz hücreli akciğer karsinomalarında FGFR1 ve DDR2 gibi proto-onkogenlerin amplifikasyonu. (4) miRNA'lar tarafından onkogenik genlerin aşırı ekspresyonu. (5) Tp53, Rb1, CDKN2A, FHIT, RASSF1A ve PTEN gibi tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu. (6) Var olan telomerazların (KHAK'nin % 100'ü ve KHDAK'nin % 85'e % 80'i) uzaması ve telomerlerin de novo sentezi boyunca telomer uzunluğunu

koruyarak hücrelölümsüzlüğe katkıda bulunan telomeraz aktivitesinin artması. hTERT geni KHDAK'nin % 57'sinde amplifiye edilmektedir.

Adı geçen tüm sapmaların sayıları, akciğer kanserinde önemli belirteçler olarak kabul edilir. KHDAK tümörleri sıklıkla VEGF gibi tümör anjiyogenezini arttıran pro-anjiyogenik faktörlerin salınımına öncülük eden hipoksik alanları gösterir (De Pas vd 2012). Irk ve cinsiyet farklılıkları ve hastaların tütün kullanımı kanser gelişimi ile doğru orantılı olduğu da bildirilmiştir (Lemjabbar-Alaoui vd 2015). Akciğer kanserinde, kadınlar erkeklere göre daha düşük insidansa ve ölüm oranına sahiptir. Afro-Amerikan erkekler Birleşik Devletlerde en yüksek insidans ve ölüm oranına sahiptir. Bunu takiben sırasıyla Beyazlar, Amerikan Kızılderili veya Alaska yerlileri, Asyalı Amerikan veya Pasifikliler ve Hispanik/Latin erkekler gelir. Kadınlarda ise en yüksek oran beyaz kadınlarda daha sonra Amerikan Kızılderili veya Alaska Yerlileri ve Afro-Amerikanlar, Asyalı Amerikan veya Pasifikliler ve Hispanik/Latin gruplar olarak sıralanabilir (Lemjabbar-Alaoui vd 2015). Dahası, klinik denemeler Asya kökenlilerin, tütün kullanım geçmişlerine bakılmaksızın KHDAK hastalarında ortalama sağkalım için bağımsız olumlu bir prognostik faktör olduğunu göstermiştir. Aktifleşen EGFR mutasyonlarının sıklığı Kafkas hastalara kıyasla Doğu Asyalı hastalarda daha yüksektir. Bir çalışmada Asya kökenli EGFR mutasyon-pozitif hastaların, özellikle adenokarsinomali ve hiç sigara içmemiş olanlarında EGFR tirozin kinaz inhibitörleriyle (TKI) yapılan tedavide daha etkili sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir. Aksine, K-ras mutasyonlarının yaygınlığı Asyalı hastalarda daha düşüktür (Zhou ve Christiani 2011). Bu irksal eşitsizliği deşifre etmek, genetik polimorfizmler ve gen-çevre etkileşimleri gibi multi-irk, multietnik gruplarda akciğer kanseri için risk faktörlerinin tanımlanmasını gerektirir.

Sosyoekonomik durum kadar çevresel (coğrafi) faktörler de akciğer kanserine olan duyarlılığı, tedavi sonuçlarını ve sağkalım oranlarını etkileyebilir (Howington vd 2013). Cerrahi operasyonla müdahale edilmiş erken evre KHDAK'li Beyaz ve Afro-Amerikan hastalar birbirlerine yakın sağkalım oranlarına sahipken, cerrahi operasyon geçirmeyen (sigortasız, sağlık kurumlarına ulaşım sıkıntısı, diağnoz korkusu veya inançlar) Afro-Amerikanların ise daha düşük sağkalım oranına sahip oldukları gösterilmiştir (Bach vd 1999).

2.2. Akciğer Kanseri Tedavileri

Cerrahi müdahale, erken evre (I-II) ve evre IIIA KHDAK'li hastalar için ilk tercih edilen tedavidir (Scott vd 2007). Geniş kitleler üzerinde yürütölen çalışmalarda T1N0 KHDAK'lı hastalar için lobektominin, sınırlı rezeksiyona kıyasla daha başarılı bir tedavi protokolü olduğu gösterilmiştir (Ginsberg ve Rubinstein 1995). Bu yüzden, evre I ve II KHDAK'li hastalarda lobektomi veya daha büyük rezeksiyon, sublobar rezeksiyondan (kama rezeksiyonu veya segmentektomi) daha çok tavsiye edilir (Scott vd 2007). Ciddi riskli pulmoner fonksiyonu, ilerlemiş yaşı veya başka eşzamanlı

hastalığı olan hastalarda, tam bir lobektomi tolere edilemeyebilir, ancak daha sınırlı bir sublobar operasyon tavsiye edilir (Mery vd 2005). İleri evrede seyreden tümörlü hastalarda, tümörün rezeksiyonu lobektomiyle başarılammış ise pnömonektomi üzerine gerçekleştirilecek pulmoner fonksiyonu koruyan sleeve lobektomi tavsiye edilir (Scott vd 2007).

Erken evre KHDAK'li hastalar için cerrahi müdahale ilkin tercih edilen tedavi olmasına rağmen yeterli olmayabilir. Cerrahi müdahalenin yeterli olamamasının sebepleri olarak ilerlemiş yaş, ciddi eşzamanlı hastalık varlığı ve hastanın tedaviyi reddi gösterilebilir. Cerrahi müdahalenin yeterli etkiyi göstermediği hastalarda, cerrahi müdahale ile kıyaslandığında daha düşük sağkalım oranları sağlamasına rağmen radyoterapi alternatif bir tedavi olarak kullanılmaktadır (Rowell ve Williams 2001).

Son zamanlarda yapılan randomize adjuvan klinik denemelerden çıkan veriler (Winton vd 2005, Douillard vd 2006) ve bir meta-analiz çalışması (Pignon vd 2008) tam rezekte edilmiş KHDAK'li hastalar için tedavi standartlarını değiştirmiştir. Akciğer Adjuvan Sisplatin Değerlendirme veritabanında kayıtlı 4584 hastayla yapılan beş randomize denemenin (Arriagada vd 2004, Waller vd 2004, Winton vd 2005, Douillard vd 2006, Scagliotti vd 2008) meta-analizi adjuvan kemoterapi ile sağkalım oranının arttığını (5 yılda % 5.4 oranında) doğrulamıştır (Pignon vd 2008). Sağkalım artışı aşamaya göre değişmekte, özellikle adjuvan kemoterapi uygulanan aşama II ve IIIA'daki hastalar için belirleyici olmaktadır. Adjuvan kemoterapi uygulanan evre IB hastalarında sağkalım artış oranı istatistiki bir öneme ulaşmazken, aşama IA hastaları için hastalığın daha ilerlediği görülmüştür (Arriagada vd 2010).

KHDAK'lı hastaların üçte birinde tümör lokal olarak toraksta bulunur ve henüz yayılmamıştır. Bu hastalar için en uygun tedavi cerrahi müdahaledir. Rezeksiyon yapılmamış evre III KHDAK'lı hastalar için eşzamanlı uygulanan kemo-radyoterapi standart tedavi olarak kabul edilir (Robinson vd 2007). Randomize faz III denemelerinden elde edilen sonuçlar, kemoterapi ve radyoterapinin eşzamanlı uygulanmasının ardışık uygulanmasına oranla daha uzun sağkalım sağladığını göstermektedir (Furuse vd 1999).

Kemoterapi, evre IV KHDAK'LI hastalar için de temel tedavidir. 2714 hastanın dahil olduğu 16 randomize faz III denemesinin data meta-analizi en iyi destek tedaviye kıyasla kemoterapinin 12 ayda sağkalım oranını % 9 arttırdığını göstermiştir. İkili kemoterapi başlangıçta tekli bir kemoterapötik ajandan çok daha üstündür (Lilenbaum vd 2005, Delbaldo vd 2004) ve üçlü ilaç kombinasyonları ikili tedavilere kıyasla ortalama sağkalımın lehine herhangi bir fayda sağlamamıştır (Delbaldo vd 2004). Amerikan Klinik Onkoloji Derneği, platinsiz tedaviye kıyasla sisplatin bazlı ikili kemoterapötikler yıllık sağkalım artışı sağladıkları için tavsiye etmektedir (Azzoli vd 2009). Platinsiz tedaviler, platin bazlı tedaviyi tolere edemeyecek hastalara bir alternatif sunar. Randomize faz III denemelerinde, farklı ikili kombinasyonların kıyaslanması;

herhangi bir ikilinin diğerinden üstün olmadığını göstermiştir (Schiller vd 2002). Bu yüzden hiçbir ikili tedavi “altın standart” olarak tavsiye edilmez. Scagliotti ve arkadaşları (2008) yaptıkları bir faz III çalışmasında, tümörün tedaviye verdiği yanıtın tümör histolojisi ile yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada 1725 kemoterapi almamış evre IIIB/V’li KHDAK hastasına sisplatin/gemcitabin veya sisplatin/pemetrekset denenmiştir. Adenokarsinomalı ve büyük hücre karsinomlu hastalarda denenilen ikili kombinasyonun hiçbiri diğerinden daha başarılı sonuçlar vermezken skuamoz hücreli tümörlerde sisplatin/gemcitabin ikilisi diğerine oranla sağkalımda önemli bir artış sağlamıştır (Pallis 2012).

2.2.1. Etoposit

Etoposit son 30 yıldır klinikte kullanılan, *Podophyllum peltatum* bitkisinden üretilen podofilotoksin türevli bir yarı sentetik antikanser bir ilaçtır (Burden ve Osheroff 1998). Taksanlar ortaya çıkana kadar, dünyada kanser tedavisinde en yaygın verilen antikanser ilaçlar arasında yer almakta idi. Kemoterapide; Kaposi sarkoma, Ewing sarkoma, akciğer kanseri, testiküler kanser, lenfoma, nonlenfomatik lösemi ve glioblastoma sağaltımında kullanılır. Sıklıkla başka ilaçlarla (testiküler kanserde asbleomisin gibi) kombine edilerek de kullanılır (Hande 1998).

Etopositin başlıca hücrenel hedefi topoizomeraz II’dir (Wilstermann ve Osheroff 2001). Bu enzim, bir nükleik asit segmentini ayırmada meydana gelen geçici çift zincir kırığı boyunca intakt bir çift heliksi geçerek DNA’nın topolojisini değiştirir (Walker ve Nitiss 2002). Enzim, DNA rekombinasyonu ve replikasyonu gibi normal hücrenel süreçlerde genetik materyalde meydana gelebilecek ilmi ve düğümleri çözmek için gereklidir. Topoizomeraz II yokluğunda, hücreler kardeş kromatitleri ayıramaz ve mitotik başarısızlıktan ölür (Burden ve Osheroff 1998).

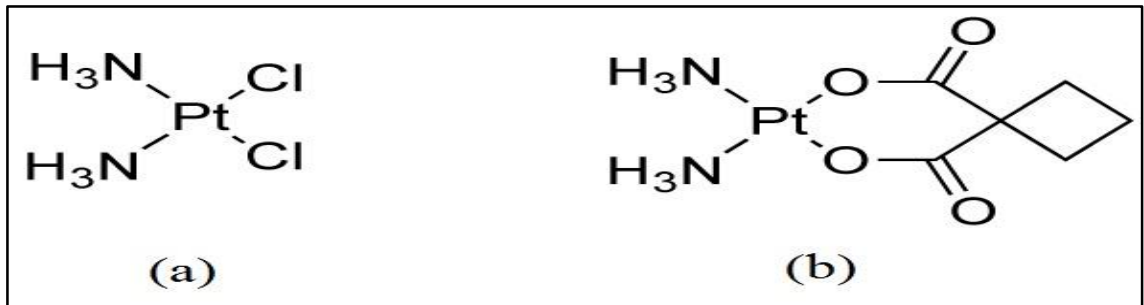
Spesifik enzimleri hedefleyen çoğu ilaçların aksine, etoposit ve diğer topoizomeraz II hedefli antikanser ajanlar, sinsi bir tutumla hareket eder. Bu enzimin aktivitesini bloklamaktan ziyade etoposit; topoizomeraz II-DNA bağlanma komplekslerinin konsantrasyonunu azaltarak hücreleri öldürür (Burden ve Osheroff 1998). İlacın bu etkisi, topoizomeraz II’yi genomu fragmente eden potansiyel bir hücrenel toksine dönüştürür. Sonuç olarak, etoposit enzimin toplam katalitik aktivitesini inhibe eden ilaçlardan ayırmak için bir topoizomeraz II zehiri olarak adlandırılır (Bromberg vd 2003).

Etopositin nükleik asit moleküllerini bağlamak için enzimin yeteneğini inhibe ederek topoizomeraz II ilişkili çift zincir DNA kırıklarını stabilize ettiği on yılı aşkın süredir bilinmekte (Bromberg vd 2003, Alpsy vd 2014) ancak, ilacın moleküler mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

Diğer taraftan, tamir edilmeyen zincir kırıkları da DNA hasarı yanıtını başlatır ve sonucunda ölüme sebep olur. Yine de, hücreler apoptozdan kaçabilir ve etopositin indüklediği stres altında prolifer olmaya devam edebilir ve bu sayede ilaca dirençli hale gelebilir. Daha önce yapılan çalışmalar, hücrelerde etoposite direnç geliştiğinde; topoizomeraz II ekspresyonunun değiştiğini, topoizomeraz II'nin etoposite duyarlılığının azaldığını (Schneider vd 1994), DNA yanlış eşleşme tamirine dahil olan genlerin ekspresyonunun azaldığını (Fedier vd 2001, Kaplan ve Gündüz 2012), etoposit dirençliliğinden sorumlu olabileceği düşünülen MDR1 ve MRP1 gibi ABC taşıyıcılarının ekspresyonlarının arttığını (Szak vd 2009) bildirmiştir.

2.2.2. Karboplatin

Karboplatin veya cis-diammine (1,1-cyclobutanecarboxylato) platinum (II), kanser tedavisinde kullanılan platin türevli bir anti-kanser ilaçtır. Ovaryum, akciğer ve baş-boyun kanserleri için kemoterapide sıklıkla tercih edilmektedir. Karboplatin, 1970'li yılların başında ilk platin türevi antikanser ilaç olan sisplatinin klinik verimini arttırmak üzere Barnett Rosenberg ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Ticari olarak Paraplatin adı altında 1989 yılında kemoterapötik ajan olarak onaylanmıştır (Di Pasqua vd 2013). İlaç, biyolojik etkisini genomik DNA ile etkileşerek gösterir. Sisplatine benzer şekilde, iki klorür ligandı bulundurur. Klorür iyonları hücre içine yayıldığında DNA zincirinde özellikle guanin grupları ile çapraz bağlar oluşturur. DNA'nın farklı bir iyonla çapraz bağlanması replikasyonun, transkripsiyonun ve translasyonun inhibisyonuyla sonuçlanır (Payne ve Miles 2008). Karboplatin, sisplatine ek olarak, bir organik karboksilat grubu daha içerir (Şekil 2.2). Bu grup karboplatine hızla suda çözünbilme ve daha yavaş hidroliz olma özelliği kazandırır. Yavaş hidroliz olabildiği için karboplatinin vücuttan atılma süresi uzamakta ve etkilerini daha uzun süreli sergileyebilmektedir. Dolayısıyla sisplatine oranla daha az nörotoksik ve nefrotoksik bir ilaçtır (Dasari ve Tchounwou, 2014).



Şekil 2.2. a) Sisplatin ve
b) Karboplatin açık formülü.

Yapılan birçok çalışma, adjuvan terapide karboplatin kullanımının kanser hastalarının yaşam kalitesi ve toplam hayatta kalım süresini arttırdığını ve tümörün ilerleme zamanı ve risk oranını ise düşürdüğünü göstermektedir (Codegoni vd 1997, Chung vd 2006, Fuuji vd 2007, Kondo vd 2007, Darcy vd 2007). Smith ve arkadaşları

(2007) yaptıkları çalışmada ovaryum kanserli hastalara uygulanan karboplatin adjuvan tedavisinde hayatta kalımın 40 aydan 60 aya çıktığını bildirmektedir. KHDAK hastalarına uygulanan karboplatin adjuvan tedavisinde ise hayatta kalımın ortalama 6 ay arttığı ve tümör ilerlemesinin yaklaşık 18 ay daha geciktiği gösterilmiştir (Olaussen vd 2006, Hwang vd 2007).

2.3. Kemoterapik İlaç Dirençliliği

Çoklu ilaç dirençliliği, kanser hücrelerinin farklı yapı ve etki mekanizmalarına sahip kemoterapötiklere karşı dirençliliği olarak tanımlanır (Fojo vd 1987). Çoklu ilaç dirençliliği bir kere başarıldığında, kemoterapötiklerin anti-kanser etkileri azalır ve kanser kemoterapötikleri başarısızlıklarının, metastazın ve kanserin tekrarlamasının en önemli sebebidir. Özellikle, kanser hücreleri yapısal ve fonksiyonel olarak ilişkisiz olan, daha önce maruz kalmadığı ilaçlara bile bir kere dirençlilik kazanınca, çoklu ilaç dirençliliği fenotipine sahip olurlar (Kaye 1988). Bir tümörün kimyasala dirençliliği, kemoterapötik ilaçların kullanımından önce ortaya çıkan temel dirençlilik ve kemoterapötiklere maruziyetten sonra meydana gelen kazanılmış dirençlilik olmak üzere ikiye ayrılır.

Potansiyel ilaç dirençliliği mekanizmaları; ABC transport ailesi, apoptoz indüksiyonu, otofaji indüksiyonu, kanser kök hücre regülasyonu, miRNA regülasyonu, hipoksi indüksiyonu, DNA hasarı ve tamiri ve epigenetik düzenlemeler olarak sayılabilir.

ABC transport ailesi insanlarda en az 48 üyeye sahiptir (Gillet vd 2007) ve bunların 12'si varsayılan ilaç taşıyıcıları olarak tanımlanmıştır (Lage 2003): ABCB1 geni tarafından kodlanan P-glikoproteini (Pgp), ABCC1 geni tarafından kodlanan MDR-ilişkili protein 1 (MRP1) ve ABCG2 geni tarafından kodlanan BCRP meme kanseri dirençlilik proteini olarak bilinen ABC altailesi G üyesi 2 (Dean vd 2001). Kemoterapiye yanıt vermeyen hastalar sıklıkla, dirençli hale gelmiş hücre membranının sitoplazmik tarafında lokalize olmuş çeşitli ABC taşıyıcı pompaların ekspresyonunda artışa sahiptir. Bu çeşitli ABC taşıyıcı pompaların keşfi, kemoterapi dirençliliğinin, farmakolojik down-regülasyonu için bu pompaları hedef haline getirmiştir (Schaffer vd 2012).

Apoptoz kemoterapötik ilaçların hücreleri öldürdüğü ana mekanizmalardan biridir. Ancak, çoğu kanser hücresi için kimyasal dirençlilikle sonuçlanan, apoptoza karşı temel veya kazanılmış dirençlilik bulunmaktadır. Örneğin, yeni ve spesifik bir PI3KCA inhibitörü olan BYL-719'un, temel multipl miyelom (MM) hücrelerinin sağkalımını inhibe ettiği, MM hücrelerinin apoptozunu indüklediği ve G1 bloklaması ile hücre döngülerini inhibe ettiği bilinmektedir. BYL719, PI3K sinyalini inhibe eder, proliferasyonu ve hücre döngüsü sinyalini azaltır ve MM hücrelerinde apoptoz sinyalini artırır. Sonuç olarak, BYL719 bortezomib ve karfilzomib ile sinerjistik etki göstererek

kemik iliği stroması tarafından indüklenen ilaç dirençliliğinin üstesinden gelmiştir (Azab vd 2014). Shao ve arkadaşları (2014) MM'de doksorubisin tarafından indüklenen apoptotik modeli geliştirerek MM'de AGS3'ün anti-apoptotik rolünü göstermişlerdir. Hücre apoptozunda AGS3'ün negatif rolü AGS3'ün sessizleştirilmesiyle daha sonra onaylanmıştır. Tümör mikroçevresinin de kemoterapiye yanıtta tümör hücresi fenotipini etkilediği görülmüştür. AGS3 siRNA, yüksek oranda MM hücre adezyonunu tersine çevirerek doksorubisin, mitoksantron ve deksametazona ilaç dirençliliğini azalttığı gösterilmiştir (Shao vd 2014).

Otofaji, sitoplazmik komponentlerin hücre içi ve hücre dışı baskılara yanıt olarak degradasyon için lizozomlara teslim edildiği proses olarak adlandırılır. Otofaji hücrenin homeostazisinin sağlanması için evrimsel olarak korunmuş bir mekanizmadır (Vinod vd 2013). Otofajinin kimyasal dirençlilikte önemli roller oynadığı kanıtlanmıştır. Kemoterapötik ilaçlar apoptozla birlikte otofajiyi azaltır ve otofaji, kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasına yardım etmek için ilaç moleküllerini yıkarak hücreyi koruyucu bir etki sağlamaktadır (Vinod vd 2013). 5-flourourasil (5-FU) ve sisplatin yanıtında, ilaca duyarlı hücre hatları apoptoz sergilerken, ilaca dirençli popülasyonlar ise tip II programlı hücre ölümüne benzeyen bir morfoloji ile otofaji gösterir. Otofaji indüklenerek ilaçlara yanıt veren hücre popülasyonları daha dirençli hale gelir ve kemoterapötiklerin atılımından sonra hücre yenilenmektedir (O'Donovan vd 2011). Tamoksifen yanıtında, duyarlı hücrelerde üzerine ilaç dirençliliği oluşturan 31 kinaz tanımlandı. Bu kinazlardan biri olan Heat shock protein beta-8 ekspresyonu bir grup hastada olumsuz klinik sonuçlar göstermiştir. Sonraki çalışmalar p53'ün bazal seviyesinin besin yoksunu hepatosellüler karsinoma (HCC) hücrelerinde otofaji aktivasyonu için önemli olduğunu göstermiştir. Dahası, p53 inhibisyonu ile birlikte besin kıtlığı veya 5-FU tedavisi, reaktif oksijen türevleri üretimi ve mitokondriyal hasarda belirli bir artışla sonuçlanmıştır. Antioksidanlar, p53 inhibisyonundan sonra, HCC'nin 5-FU indüklü hücre ölümünü veya besin kıtlığını azaltmıştır. Sonuç olarak, p53'ün otofaji aktivasyonunu modüle ederek besin kıtlığı şartları altında HCC'de kimyasal dirençlilik yarattığı ve hücre sağkalımına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Guo vd 2014).

Kanser kök hücreleri, kendini yenileme ve farklılaşma özellikleri ile kanser hücrelerinin altpopulasyonları ya da orijini olarak bilinir. Xue ve arkadaşları (2012) kemoterapötik bir ilaç olan vinkristini kullanarak gastrik kanser hücre hattı SGC7901'den kanser kök hücresine benzer hücreler elde etmişlerdir. Elde edilen kök hücrede, E-kaderin'in down-regüle ve Snail, Twist ve vimentin'in up regüle edildiği gösterilmiştir. Matrijel bazlı farklılaşma testi kullanarak, kök hücreler farklılaşmış gastrik kriplere benzeyen 2D tüp formu ve 3D kompleks lümen benzeri yapılar oluşturmuştur. Daha ilginç olanı, ilaç dirençlilik testleri ve ksenograft deneyleri ile bu hücrelerin *in vivoda* önemli tümörjenisite ve çoklu ilaç dirençliliği geliştirdiği

gösterilmiştir (Xue vd 2012). Bu bulgular kanser kök hücreleri ile çoklu ilaç dirençliliği arasında doğrudan ilişki olduğunu göstermektedir.

Kanser kök hücrelerinin çoklu ilaç dirençliliğinden sorumlu olduğu yapılan son çalışmalarla kanıtlandığından, kanser tedavisi için kanser kök hücrelerini yok etmek en temel yaklaşımdır. Çoklu ilaç dirençliliğinin üstesinden gelmek ve kanser hastalarında başarılı bir prognoza yardım etmek için bu kuram oldukça ikna edicidir. Örneğin, melatonin ile kemoterapötik ilaçların (gliomada kullanılan temozolomit) kombinasyonu beyin tümörü kök hücreleri ve A172 malignant glioma hücreleri üzerinde sinerjistik toksik etkiye sahiptir. Bu etki ABC transport ABCG2/BRCP'nin fonksiyonu ve ekspresyonunun downregülasyonu ile koreledir (Martin vd 2013). Ovaryum kanserinde, oldukça proliferatif olan CD44(+)/CD117(+) kök hücreleri düşük derecede farklılaşmaya sahiptir ve kemoterapötiklere dirençlidir. Cheng ve arkadaşları (2012), miR-199a'nın ovaryum kanseri kök hücrelerinde sisplatin, paklitaksel ve adriyamisine dirençliliği önemli derecede arttırdığını ve ABCG2'nin mRNA ekspresyonunu azalttığını bulmuştur (Cheng vd 2012).

miRNA'lar, hedef genlerin 3' ifade edilmeyen bölgesine bağlanarak ekspresyonunu düzenleyen, kodlanmayan 18-24 nükleotitlik RNA'lardır. Malignant fenotipte, miRNA'ların metastaz, çoklu ilaç dirençliliği, proliferasyon/kendini yenileme veya kanser kök hücrelerinin farklılaşması gibi roller oynadığı bildirilmiştir. miRNA'lar hedef genlerinin anormal fonksiyonlarını modüle ederek malignant fenotipi düzenleme eğilimindedir. Örneğin, miR-17-92 kümesinin üyeleri olan miR-19a ve miR-19b'nin çoklu ilaç dirençliliği geliştirilmiş hücre hatlarında upregüle olduğu ve PTEN'i hedefleyerek gastrik kanser hücrelerinde çoklu ilaç dirençliliğini modüle ettiği bulunmuştur (Wang vd 2013). Bir başka örnekte, miRNA profillemeye ile miR-153'ün kolorektal kanserde oldukça eksprese olduğu açıklanmıştır. Elli ay takip edilen kolorektal kanser hastalarında, yüksek seviyede miR-153 eksprese eden 30 hastanın 21'inde, düşük seviyede miR-153 eksprese eden hastalara kıyasla, tümör büyümesi gözlenmiştir. miR-153 upregülasyonunun, kolorektal kanserin invazivliğini ve oksaliptatin ve sisplatine dirençliliğini hem *in vivo* hem de *in vitro* da arttırdığı gösterilmiştir. miR-153'ün MMP-9 üretimini indükleyerek indirekt olarak invazivliği arttırdığı ve Forkhead transkripsiyon faktörü Forkhead box O3a'yı inhibe ederek de ilaç dirençliliğine direkt olarak aracılık ettiği belirlenmiştir (Zhang vd 2013).

OnkomiRNA'lar hariç bazı tümör baskılayıcı miRNA'ların kanser tedavisinde çoklu ilaç dirençliliği için hassas olduğu bulunmuştur. Xia ve arkadaşları (2008) miR-15/16 ailesinin üyeleri olan miR-15b ve miR-16'nın parental SGC7901 hücrelerine kıyasla çoklu ilaç dirençliliği geliştirilmiş gastrik kanser hücre hattı SGC7901/VCR'de down regüle olduğunu göstermişlerdir. *In vitro* ilaç dirençliliği duyarlılık testleri, miR-15b ve miR16 aşırı ekspresyonunun SCG7901/VCR üzerinde antikanser ilaçlara duyarlılık sağlayabileceğini, ancak antisens oligonükleotitler kullanarak bu faktörlerin

inhibe edilmesiyle de SGC7901 hücrelerinde çoklu ilaç dirençliliği sağlandığını göstermişlerdir. Dahası, miR-15b ve miR-16 aşırı ekspresyonu BCL2'yi hedefleyerek SGC7901/VCR hücrelerini VCR indüklü apoptoza duyarlılaştırabilir (Xia vd 2008). Bir başka örnekte, Shang ve arkadaşları (2013) miR-508-5p aşırı ekspresyonunun tümörleri *in vitro*'da çoklu ilaç dirençliliğini tersyüz etmekte yararlı olduğunu ve *in vivo*'da kemoterapiye duyarlılaştırdığını bulmuştur. Dahası, miR-508-5p, ABCB1 ve ZNRD1'in (DNA idareli RNA polimeraz I altünite RPA12) 3' ifade edilmeyen bölgesini direkt olarak hedefleyebilir (Shang vd 2013). BEL/5-FU hücrelerini miR-27a taklitleriyle transfekte ederek miR-27a'nın aşırı ekspresyonu sağlanmış, MDR1/P-glikoproteini ve β -katenin ekspresyonları azaltılmış ve 5-FU'ya bu hücrelerin duyarlılığı ile 5-FU indüklü apoptozu arttırılmıştır. RNA interferans tarafından FZD7'nin redüksiyonunun, miR-27a'ya benzer şekilde MDR1/P-glikoprotein ve β -kateninin ekspresyonunu inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Chen vd 2013).

Çalışmalar miRNA'ların sadece çoklu ilaç dirençliliği fenotipini duyarlılaştırma ve regüle etmediğini aynı zamanda çoklu ilaç dirençliliği için de diagnostik markırlar olarak hizmet edebileceğini göstermektedir. Direnç gelişmiş kolorektal kanser hastalarının serumlarında miR-19a'nın önemli derecede up-regüle olduğu belirlenmiştir. Serum miR-19a'nın kanser embriyojenik antijeni için tamamlayıcı değere sahip olduğu da gösterilmiştir. Daha sonra yapılan analizler ile serum miR-19a'nın hem içsel hem de kazanılmış ilaç dirençliliğine sebep olabileceği açıklanmıştır (Chen vd 2013).

Hipoksi indükleyici faktör 1 (HIF-1) yolağının radroterapiye yanıtta ve kemoterapik dirençlilikte önemli roller oynayabileceği gösterilmiştir. Örneğin, hipoksi durumunda aktive edilen en büyük transkripsiyonel faktör olan HIF-1'in, normoksik şartlar altında vinkristin-dirençli gastrik kanser hücreleri SGC7901/VCR'de aşırı eksprese edildiğini ve dolayısıyla HIF-1'in gastrik kanser hücrelerinde ilaç dirençliliği ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Liu vd 2008). Gastrik kanser hücrelerinde siRNA tarafından MGr1-Ag/37LRP'nin ekspresyonunun bloklanması, hipoksi tarafından indüklenen çoklu ilaç dirençliliği fenotipini etkili bir şekilde tersine çevirirken, MGr1-Ag/37LRP up regülasyonu, siRNA ile HIF-1 inhibisyonu tarafından ortadan kaldırıldığı bulunmuştur (Liu vd 2007, 2009).

Çoğu antikanser terapileri, tümör hücre DNA'sına ya doğrudan ya da dolaylı hasar verir (Casorelli vd 2012). Bir DNA tamir yolağının disfonksiyonu bir başka telafi edici DNA hasarı yanıtı yolağının fonksiyonuyla etkisiz hale gelebilir ve bu durum DNA'ya zarar veren kemoterapötiğe dirençliliğe katkıda bulunabilir. Örneğin, endoglinin inhibisyonu hücre canlılığını azaltır, apoptozu arttırır, çift zincirli DNA hasarını indükler ve sisplatin duyarlılığını arttırır. Endoglin hedeflemesi, BARD1, H2AFX, NBN, NTHL1 ve SIRT1 gibi sayısız DNA tamir geninin ekspresyonunu down regüle eder. BARD1'in de platin dirençliliği ile ilişkili olduğu ve platin maruziyetiyle indüklendiği bulunmuştur (Ziebarth vd 2013). Metnaz, homolog olmayan uç birleştirici

DNA çift zincir kırık tamiri yolağının bir komponentidir. Akut miyeloid lösemi ve meme kanseri hücrelerinde metnaz ekspresyon seviyesinin topoizomeraz II- α inhibitörlerine dirençlilikte rol oynayabileceği, bu yüzden metnazın küçük molekül interferans için potansiyel bir terapötik hedef olduğu bulunmuştur (Wray vd 2009a, 2009b). Daha sonra, olası Metnaz inhibitörleri olarak 8 bileşik tanımlanmıştır. Bunların arasında siproflaksin Metnazın DNA'yı parçalama özelliğini ve Metnaz bağlı DNA tamirini inhibe eder. İlginç bir şekilde, siprofloksasin kendi başına DNA hasarını indüklememiş ama kemoterapiye dirençli hücrelerde DNA hasarı tamirini baskılamıştır. Siprofloksasin klinik olarak ilgili kemoterapiyi takiben uygulandığında kanser hücrelerinin hem *in vitro* hem *ex vivo* kemoterapiye duyarlılığını arttırmıştır (Williamson vd 2012).

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi epigenetik değişikliklerin de çoklu ilaç dirençliliği gibi malignant fenotipleri düzenlediği bilinmektedir. Bazı tümör baskılayıcı genlerin demetilasyonu veya düşük metilasyonu kanser hücrelerinde çoklu ilaç dirençliliği gelişmesine yol açabilir. Beyin tümörü kök hücrelerinin, ABC ailesi taşıyıcılarının üyelerini aşırı eksprese ettiği ve bu aşırı ekspresyonun çoklu ilaç dirençliliği ve tümör nüksetmesinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Melatonin ve kemoterapötik ilaçların (temozolomid gibi) kombinasyonları BTCS ve A172 malignant glioma hücreleri üzerine sinerjistik bir toksik etkiye sahiptir. Melatonin, ABCG2/BCRP promotörünün metilasyon seviyelerini arttırmış ve ABCG2/BCRP ekspresyonu ve fonksiyonundaki etkileri, DNA-metil transferaz inhibitörü ile engellenmiştir (Martin vd 2013). Sisplatin dirençliliğini belirleyen genleri saptamak için, 20 gastrik kanser hücre hattı ile gen ekspresyonu profillemeye, DNA metilasyonu profillemeye ve ilaç yanıtı testleri çalışılmıştır. Epigenetik analizler ile epigenetik mekanizmalarca düzenlenen BMP4 geninin sisplatin dirençli hücre hatlarındaki ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Primer tümörlerde, BMP4'ün promotörünün metilasyon seviyeleri BMP4 ekspresyonu ile koreledir ve BMP4 eksprese eden tümörlü hastalar dikkate değer bir şekilde daha kötü prognoz sergiler. Terapötik olarak BMP4'ün hedeflenmiş genetik inhibisyonu, gastrik kanser hücrelerinin sisplatine duyarlılığına sebep olmuştur (Ivanova vd 2013). Diğer bir taraftan, histon deasetilaz 10'un nöroblastoma hücrelerinde otofaji aracılı sağkalımı arttırdığı *in vitro* ve *in vivo* kanıtlarla desteklenmiştir. HDAC10'un hem bozulması hem de inhibisyonu, transforme olmamış hücrelerin aksine oldukça malignant N-Myc amplifiye hücre hatları panelinde sitotoksik ilaç tedavisine duyarlılığıyla ilişkili otofajiyi efektif olarak bozmuştur (Oehme vd 2013).

Günümüzde, çoklu ilaca dirençli tümör fenotiplerinin çoğu, primer dokulardan kanser hücrelerini izole ederek ve kemoterapötik ilaçlara *in vivo* toleranslarını test ederek belirlenebilir. Yaygın bir şekilde kullanılan tümör dirençliliği indikatörleri; inhibitör konsantrasyonunun yarısı (IC50), dirençlilik indeksi (RI), sitotoksik ilaç dışarı pompalama oranı, hücre proliferasyonu indeksi, hücre büyümesi eğrisi ve apoptoz indeksidir. Tümör hücre dirençliliğini test etmek için yaygın olarak kullanılan testler

MTT testi, doksorubisin birikimi ve tutulması deneyleri, ilaç duyarlılık testleri, çoklu ilaç dirençliliği genleri ve yolaklarının belirlenmesi, yüksek içerikli cihaz teknolojileri, gençip teknolojisi ve yüksek verimli tarama teknolojisidir (Wu vd 2014).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları

Çalışmamız kapsamında ATCC'den temin edilen A549 hücre hattı (akciğer karsinoma, ATCC CCL-185) deney grubu, HEK 293T hücre hattı (böbrek epitel hücre hattı, ATCC CRL-11268) ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Hücre hatlarının her ikisi de % 10 FBS ve % 2 L-glutamin ile desteklenmiş RPMI 1640 besiyerinde çoğaltılarak, % 5 CO₂'li atmosferde 37°C'de inkübe edildi. Hücreler, ATCC'nin önerdiği şekilde % 0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımı ile kaldırılıp 1:2 ya da 1:3 oranında olacak şekilde pasajlandı. Deney süresince kullanılmayan hücreler % 95 besi ortamı ve % 5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan solüsyon içerisinde bir gece -20°C'de bekletildikten sonra -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.2. Dojindo Hücre Proliferasyon Kiti -8 (CCK-8)

Hücre proliferasyonu ve sitotoksikite deneylerinde hücre canlılığını belirlemek amacıyla kullanılan WST-8 hücre proliferasyon kiti (Dojindo, NC0314243) oldukça hassas kolorimetrik bir testtir. Çalışmamızda bu kit kullanılarak ilaçların sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Dojindo'nun suda yüksek çözünürlük gösteren WST-8 (tetrazolyum) tuzu, hücredeki dehidrogenaz aktivitesi ile parçalanarak hücrelerin besiyerinde çözünebilir sarı renkli formazanlar oluşturur. Oluşan formazan miktarı dehidrogenaz aktivitesine bağlıdır ve bu da hücre canlılığını doğrudan gösterir. CCK-8'in MTT, XTT, MTS ya da WST-1 gibi diğer tetrazolyum tuzlarından daha hassas olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Narazaki vd 2010, Larrayoz vd 2010, Liu vd 2012).

A549 hücre hattı stoktan açılarak küçük petri kaplarında çoğaltıldı ve petri kapları % 80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekildi. 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından besiyerleri uzaklaştırıldı. Etoposit için belirlenen en yüksek doz olan 1000 µg/mL'den başlayarak, % 1 serumlu besiyeri içerisinde, yarı yarıya sulandırılan ilaçlar, her birine 100 µl olacak şekilde kuyucuklara eklendi ve ardından 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerince % 5 CO₂'li atmosferde 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

Her bir inkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki ilaçlı besiyerleri uzaklaştırılıp 90 µl serumsuz besiyeri ve 10 µl WST-8 solüsyonu eklendi ve 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda plakların absorbans değerleri Elisa Kit Okuyucu multiskan spektrofotometrede (Thermo Scientific Multiskan Go), 450 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi.

3.3. Dirençli Hücre Kültürünün Hazırlanması

Etoposite dirençli A549 hücre hattının büyümesine izin veren uygun başlangıç dozunu belirlemek için geniş spektrumda etoposit konsantrasyonları test edilmiştir. IC (İnhibisyon konsantrasyonu), tedavi edilmemiş kontrollere kıyasla, ilacın hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini ortaya koymaya yarayan ve inhibitör konsantrasyonu olarak tanımlanan bir parametredir. Bu parametre kullanılarak bir ilacın herhangi bir hücre hattında sergileyeceği sitotoksik etkiler (sitotoksik indeks) belirlenebilir. Bu sayede ilaca karşı gelişen dirençlilik de belirlenebilir. Shang ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışma baz alınarak: Hücre ölümü (%) = $1 - [(OD_{450}Örnek/OD_{450}Kontrol) \times 100]$ formülüne dayanarak IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Hansen ve arkadaşlarının (2003) yaptığı çalışma referans alınarak, hücrelerin ilaca verdiği yanıt değerlendirildi ve sitotoksik indeksi \geq % 50 (IC₅₀) olanları etoposite duyarlı, \leq % 50 olanları ise etoposite dirençli kabul ettik. A549 hücre hattında etopositin başlangıçtaki sitotoksik etkisini belirlemek için yapılan sitotoksitite çalışmasında, hücrelere 1000 µg/mL'den başlayarak 1,95 µg/mL'ye kadar sulandırılmış etoposit konsantrasyonları uygulandı. Her biri kendi içinde dört kez olmak üzere tekrarlı 3 deney seti hazırlandı. Her bir deney seti 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda CCK-8 kiti sonlandırıldı. Yapılan hesaplamalar sonucu IC₅₀ değeri olarak 72. saatte 40 µg/mL konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Buna göre, stoktan açılıp çoğaltılan 2 petri A549 hücresi, en az % 80 doluluğa ulaştığında, % 1 serum içeren besi ortamında hazırlanan 40 µg/mL etoposit konsantrasyonu her iki petriye de uygulanmıştır. Her 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücreler mikroskopta incelenerek, besi ortamı ilaçlı % 1'lik besi ortamı ile tazelenmiştir. Sık yapılan mikroskop gözlemleri sonucunda petri kaplarındaki doluluğun hızla azalıp, yaklaşık % 20 doluluğa kadar düştüğü görülmüştür. Belli bir süre bu doluluk oranında sabitlenen hücreler, artık ilaçlı besi ortamına dirençli hale gelmiş ve sayılarını arttırmaya başlamışlardır. Petri kaplarındaki doluluk yaklaşık % 80'e ulaştığında, 90 µg/mL olarak hazırlanan etoposit konsantrasyonu, eski besi ortamı değiştirilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda, hızla doluluğu azalan petri kapları, tekrar 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrası daha yüksek konsantrasyonda ilaç içeren besi ortamı ile tazelenmiş ve belli bir süre sonra hücreler bu ilaç konsantrasyonuna da direnç geliştirerek sayılarını arttırmaya başlamışlardır. Yaklaşık 4 ay süren bu denemeler sonrası her iki petri kabı da % 80-90 doluluk oranına geldiğinde, dirençliliğin başarılı olduğu anlaşılmıştır. 90 µg/mL etoposit konsantrasyonuna dirençli hale gelen bu yeni A549 hücre hattı, A549/90E olarak isimlendirildi. Hücreler, % 0,25 tripsin, % 0,03 EDTA karışımı ile kaldırılıp, 1:2 oranında pasajlanmıştır. Pasajlama işlemlerini takiben üretilen yeni nesil etoposit dirençli hücreler, deneylerde kullanılmak üzere yeterince sayıda stoklanmıştır.

3.4. İlaçların uygulanması

Karboplatin, % 1 serum içeren besiyeri içerisinde hazırlanan 1000 µg/µl'lik başlangıç dozunda alikotlanarak -20°C'lik derin dondurucuda saklandı. Dirençli hale getirilen A549/90E hücre hattı ve onun atasal formu olan A549/P yeterli stok elde edildikten sonra 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekildi. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra besiyerleri uzaklaştırılıp Karboplatin'in 1000 µg/mL'den başlayarak 1,95 µg/mL'ye kadar % 1 serum içeren besiyerinde yarı yarıya sulandırılmış dozları, hücrelere uygulandı. İlaç uygulamasının ardından tek bir sıra kuyucuktaki hücre canlılığı WST-8 kiti ile saptandı (Başlangıç zamanı). Her biri kendi içinde 4 kez olmak toplamda üç farklı deney seti hazırlandı. 24, 48 ve 72 saat olarak belirlenen inkübasyon süreleri sonrasında hücrelerin canlılığı yukarıda belirtilen WST-8 kiti ile değerlendirildi.

3.5. Kaspaz-3 Kolorimetrik Eliza Kit

Bu kit (Invitrogen, KHZ0022) kullanılarak kaspaz-3 aktivitesinde değişiklik olup olmadığı belirlenmiştir. Kitin esası, kaspaz-3'ün peptit karakterli Ac-DEVD-pNA substratını hidroliz etmesi sonucunda kromofor özelliği olan pNA'nın açığa çıkarılarak, miktarının 405 nm dalga boyunda elde edilecek absorbans değerleri ile belirlenmesidir (Jaeschke vd 1998).

Kaspaz-3 enzim aktivitesi ölçümü için hücreler, kitin protokolünde önerildiği üzere 3×10^6 hücre/örnek olacak şekilde 100 mm'lik petri kaplarına ekildi. A549/P hücre hattı için 15 µg/mL, A549/90E hücre hattı için 12 µg/mL olarak belirlenen karboplatin IC₅₀ konsantrasyonları, % 1 serum içeren besiyerinde hazırlanıp, her biri ikişer tekrarlı olan petrilere, petri başına 5 mL uygulanarak 72 saat için 37 °C'de % 5 CO₂'li atmosferde inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonunda petrilereki besiyerleri uzaklaştırılıp, tripsin-EDTA yardımıyla hücreler yapıştıkları yüzeyden kaldırıldı. Toplanan hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra pelet 1 mL PBS ile çözüldü. Hücrelere buz içerisinde bekletilen lizis tamponundan 50 µl eklendi ve on dakika buzda bekletildi. Ardından beş dakika buz/alkol karışımında ardından beş dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hücreler 10000 g'de bir dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar alınarak yeni ependorflara aktarıldı. Elde edilen süpernatantlardaki protein miktarlarını belirlemek için Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Kat. No: 23225) kullanıldı. Bovine serum albümin 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL'lik konsantrasyonlarda hazırlanarak standart protein olarak kullanıldı. Spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda örneklerin absorbansları ölçüldü ve yapılan hesaplamalarla içerdikleri protein miktarları belirlendi. Her bir örnek, 50 µL'de 200 µg/mL protein olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı. Kaspaz-3 kolorimetrik eliza kit (Invitrogen, KHZ0022) protokolü izlenerek kaspaz-3 aktiviteleri belirlendi.

3.6. MMP-2 Kolorimetrik Eliza Kit

Bu kit hücre kültürü süpernatantlarında MMP-2'nin hem pro- hem de aktif formunun kantitatif olarak belirlenmesini sağlamaktadır. Kit içerisinde MMP-2'yi hapsedebilen özel bir antikorla kaplanmış kuyucuklar bulunmaktadır. İnkübasyon süresi sonunda, kontrol grupları ve A549/P için 15 µg/mL, A549/90E için 12 µg/mL'lik karboplatin uygulanan deney grupları hücrelerinin besiyerlerinden 100'er µl alınarak bu kuyucuklara eklendi ve ardından biotinlenmiş MMP-2 antikoru üzerlerine ilave edilmiştir. Enzim bağlı streptavidin ve hemen ardından TMB substratının eklenmesi sonucunda, kuyucuklara bağlanan MMP-2'nin miktarına bağlı olarak mavi renk oluşumu gözlenmiştir. Durdurma solüsyonu eklenmesi ile sonlandırılan reaksiyon sonucunda önceden oluşmuş olan mavi renk sarıya döndü ve oluşan sarı rengin yoğunluğu 450 nm'de spektrofotometrik olarak tespit edildi. Renk yoğunluğundaki artış örneklerdeki MMP-2 konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Woessner 1991).

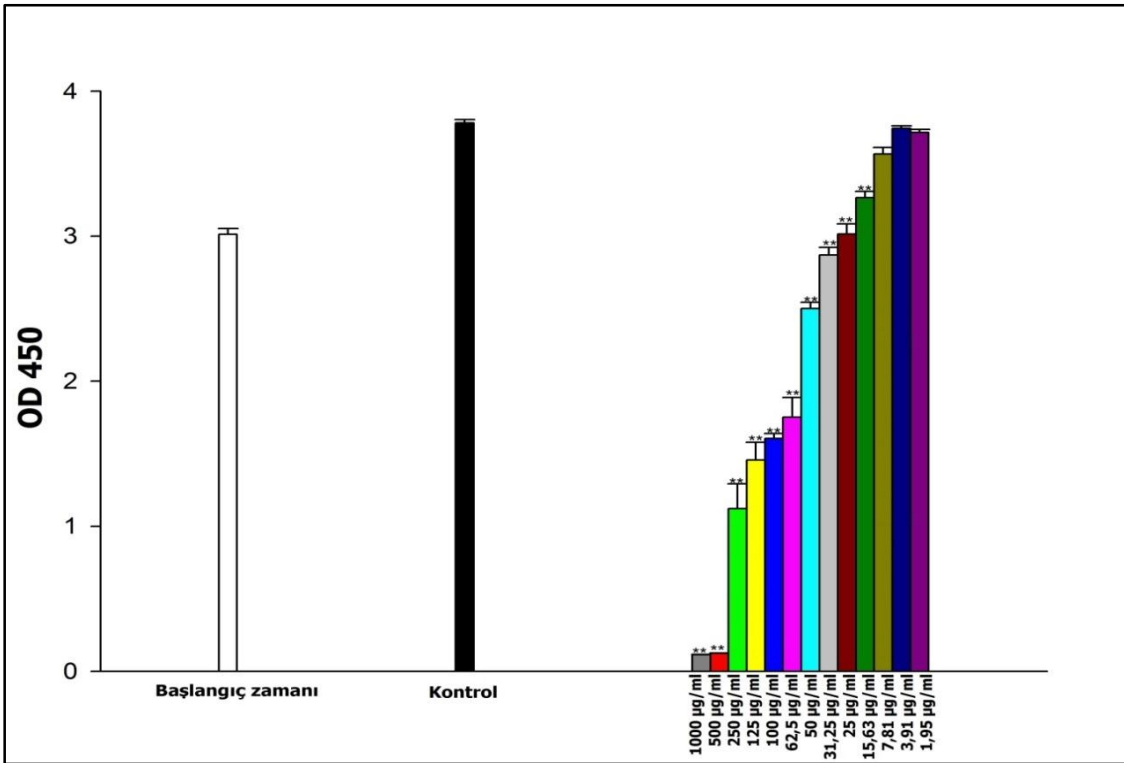
3.7. İstatistiksel Analizler

Deney sonuçlarında elde edilen verilerde, kontrol grubu ve deney grubu arasındaki farklılık Graph-pad InStat istatistik programında, Tek Yönlü Anova Testi ve ardından Dunnett Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak değerlendirildi. IC₅₀ değerinin belirlenmesi için Sigma Plot 10.0 programı kullanıldı. Enzim aktiviteleri ile ilgili deneylerden elde edilen veriler ise Graph-pad InStat istatistik programında, Tek Yönlü Anova Testi ve tüm grupların birbiri ile karşılaştırılmasını sağlayan Tukey Testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm veriler ortalama ±SEM değerleri halinde, Sigma Plot 10.0 programı kullanılarak grafik haline getirildi.

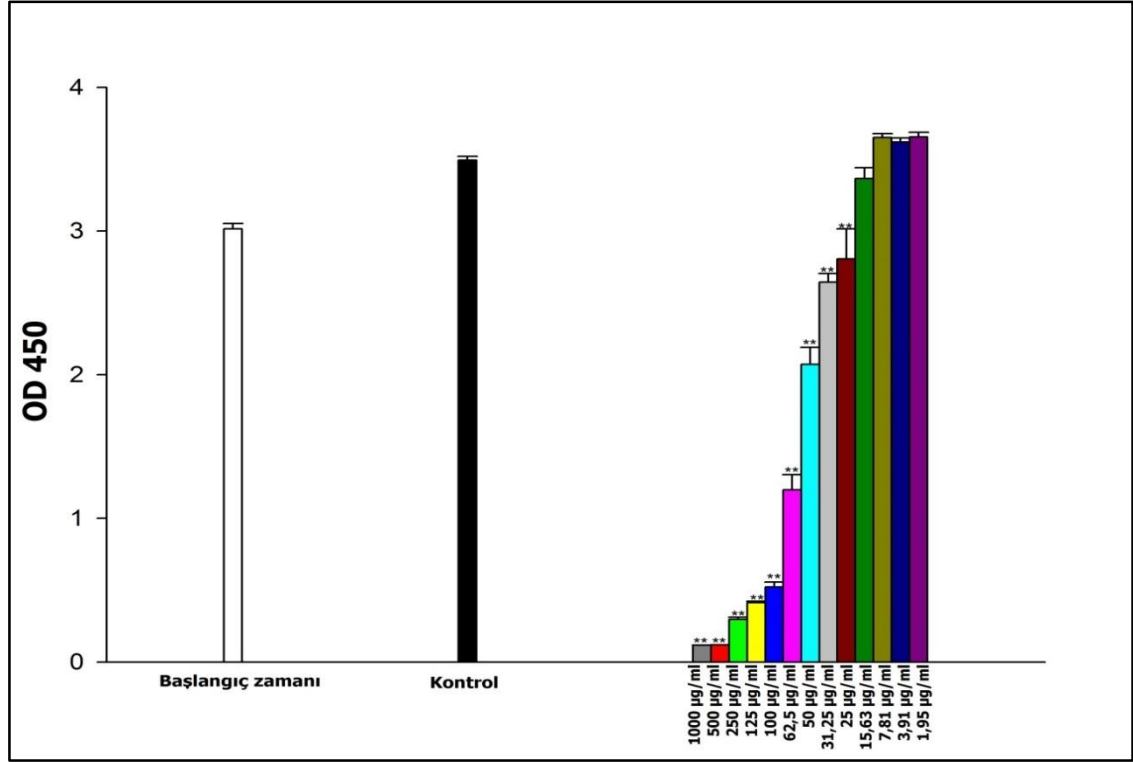
4. BULGULAR

4.1. Etoposit'in A549 Hücre Hattı Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler

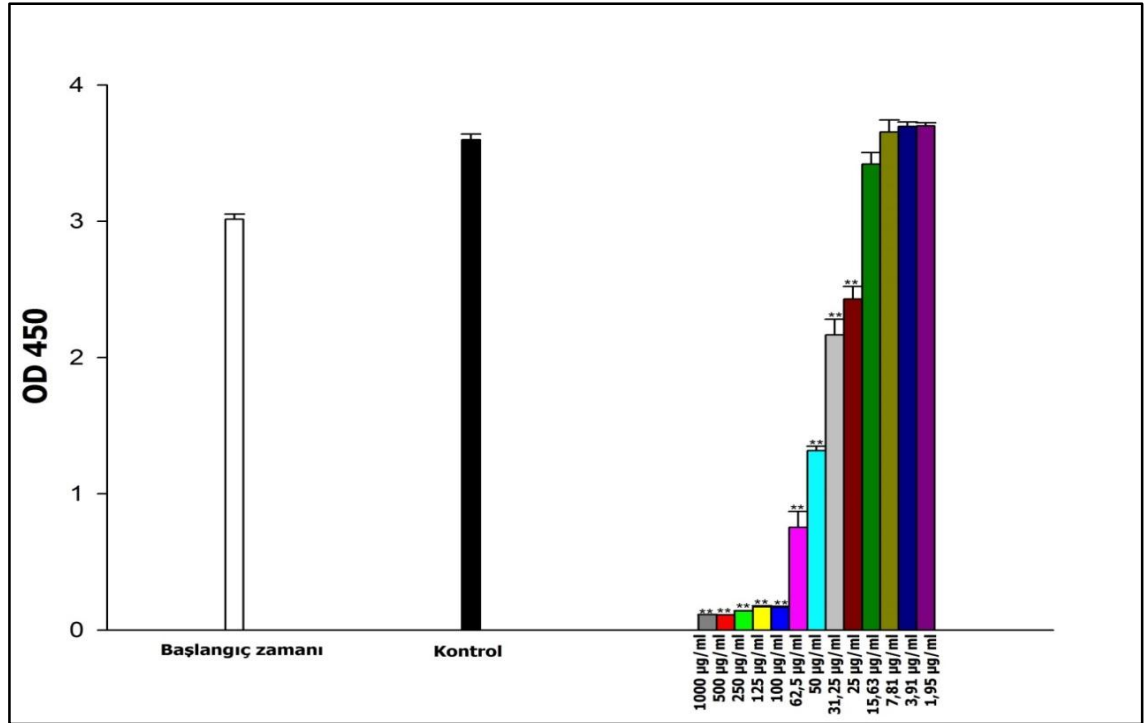
Kendi içerisinde dört tekrar ve birbirinden bağımsız üç deney seti halinde gerçekleştirilen başlangıç doz tarama çalışmalarında, etoposit A549 hücre hattı üzerine her bir inkübasyon süresi için farklı dozlarda sitotoksik etkiler sergiledi. Etoposit'in 1.95 - 1000 µg/mL aralığında konsantrasyonları hücrelere uygulandı. 24 saatlik inkübasyon süresi için 1000 µg/mL ve 500 µg/mL etoposit konsantrasyonları, 48 saatlik inkübasyon süresi için 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL ve 100 µg/mL etoposit konsantrasyonları ve 72 saatlik inkübasyon süresi için 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 100 µg/mL ve 62.5 µg/mL etoposit konsantrasyonları A549 hücre hattında canlılığı önemli ölçüde azalttı (**, p<0.01). Etoposit'in, her bir inkübasyon süresi için A549 hücre canlılığı üzerindeki etkisi grafiklendirilerek (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3) aşağıda gösterildi. Sitotoksikite testinden elde edilen absorbans değerleri kullanılarak her bir doz için hücre ölümü hesaplanarak grafiklendi (Şekil 4.4).



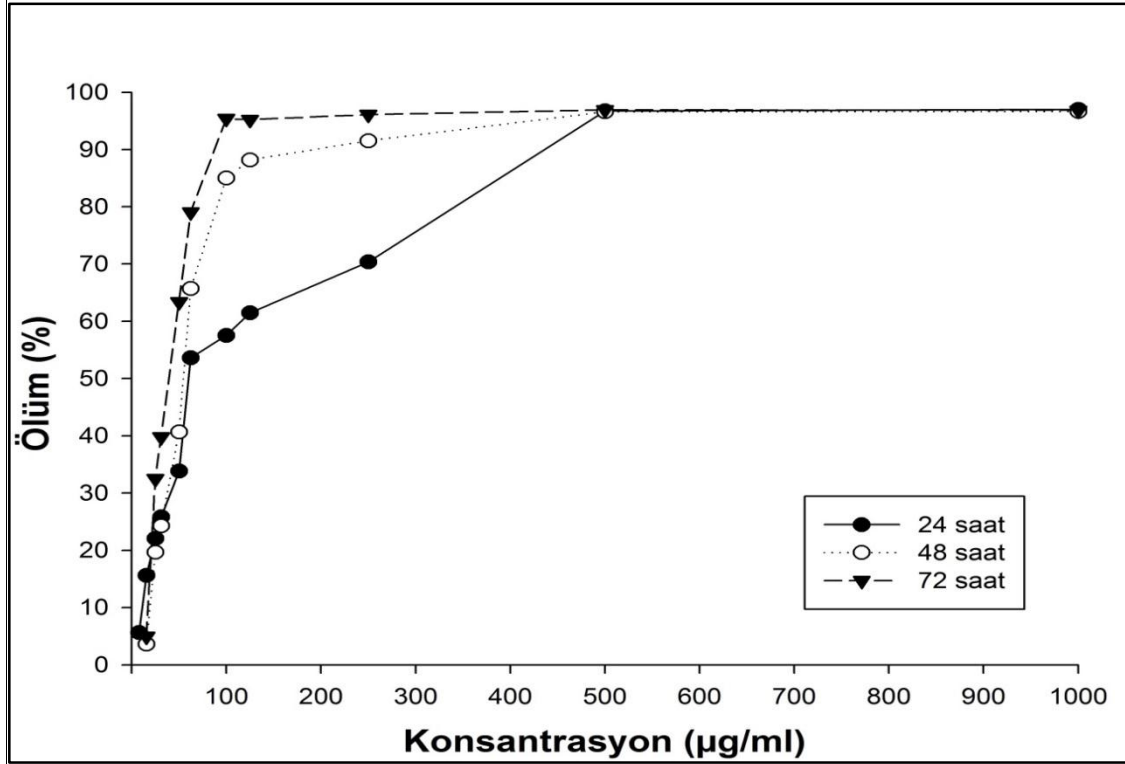
Şekil 4.1. Etoposit'in 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549 hücre hattı üzerine etkisi.



Şekil 4.2. Etoposid'in 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549 hücre hattı üzerine etkisi.



Şekil 4.3. Etoposid'in 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549 hücre hattı üzerine etkisi.



Şekil 4.4. Etoposit'in 1.95 -1000 µg/mL arasında denenilen dozlarının A549 hücre hattında yol açtığı ölüm oranları (%).

Yukarıda verilen grafik doğrultusunda etoposit'in A549 hücre hattı üzerine gösterdiği etkiler değerlendirildikten sonra; 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 86.97 (~87) µg/mL, 55.00 µg/mL ve 40.14 (~40) µg/mL olarak hesaplandı. Bir sonraki dönemde geliştirilmesi planlanan dirençli hücre kültürünün 72 saatlik inkübasyon süresi için belirlenen IC₅₀ değeri 40 µg/mL'lik konsantrasyon ile başlatılmasına karar verilmiştir.

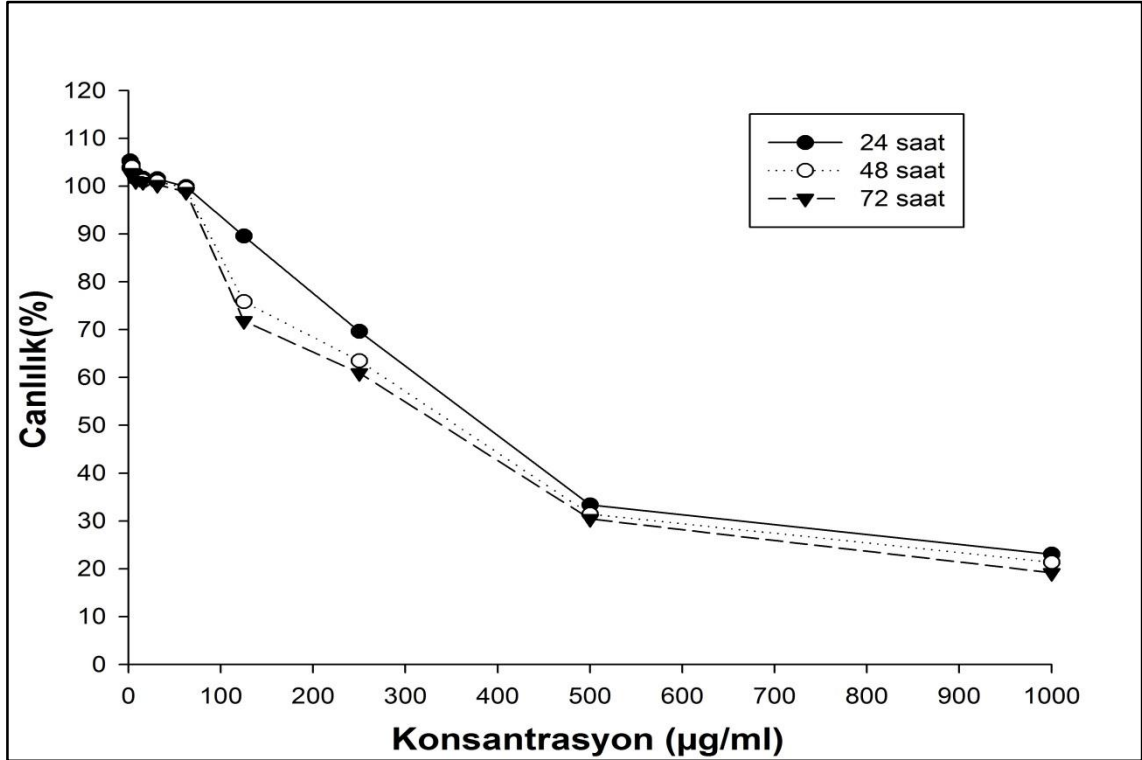
4.2. Etoposite Dirençli A549 Hücre Hatlarının Geliştirilmesi

Yapılan sitotoksite taramaları sonucu IC₅₀ değeri olarak belirlenen 40 µg/mL etoposit konsantrasyonu petrilere uygulandı. Her 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücrelerin besi ortamı, ilaçlı % 1'lik besi ortamı ile tazelenmiştir. Petri kaplarındaki doluluk hızla azalmış, belli bir süre sonra ilaçlı besi ortamına dirençli hale gelip, sayılarını arttırmaya başlamışlardır. Petri kaplarındaki doluluk yaklaşık % 80'e ulaştığında, hücre hattı 40 µg/mL etoposite dirençli olarak kabul edilmiştir. Aynı petri kaplarından devam edilen çalışmada petri kapları 90 µg/mL etoposit konsantrasyonu ile muamele edilmiştir. Petriler, 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası 90 µg/mL etoposit içeren besi ortamı ile tazelenmiş ve belli bir süre sonra hücreler bu ilaç konsantrasyonuna da direnç geliştirerek sayılarını arttırmaya başlamışlardır. Her iki konsantrasyona dirençlilik için geçen süre aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Dirençli altkültürlerin gelişimi için etoposit uygulanma süreleri (hafta)

Etoposit Dirençli A549 Hücre Hatlarının Geliştirilmesi		
Etoposit ($\mu\text{g/mL}$)	40	90
Hafta	6	12
	A549/40E	A549/90E

Geçen 18 haftalık sürenin ardından, geliştirilen A549/90E hücre hattı üzerine 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'den başlayarak yarı yarıya sulandırılmış etoposit konsantrasyonları uygulandı. Etoposit'in A549/90E hücre hattında, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 4.5'de verilmiştir.

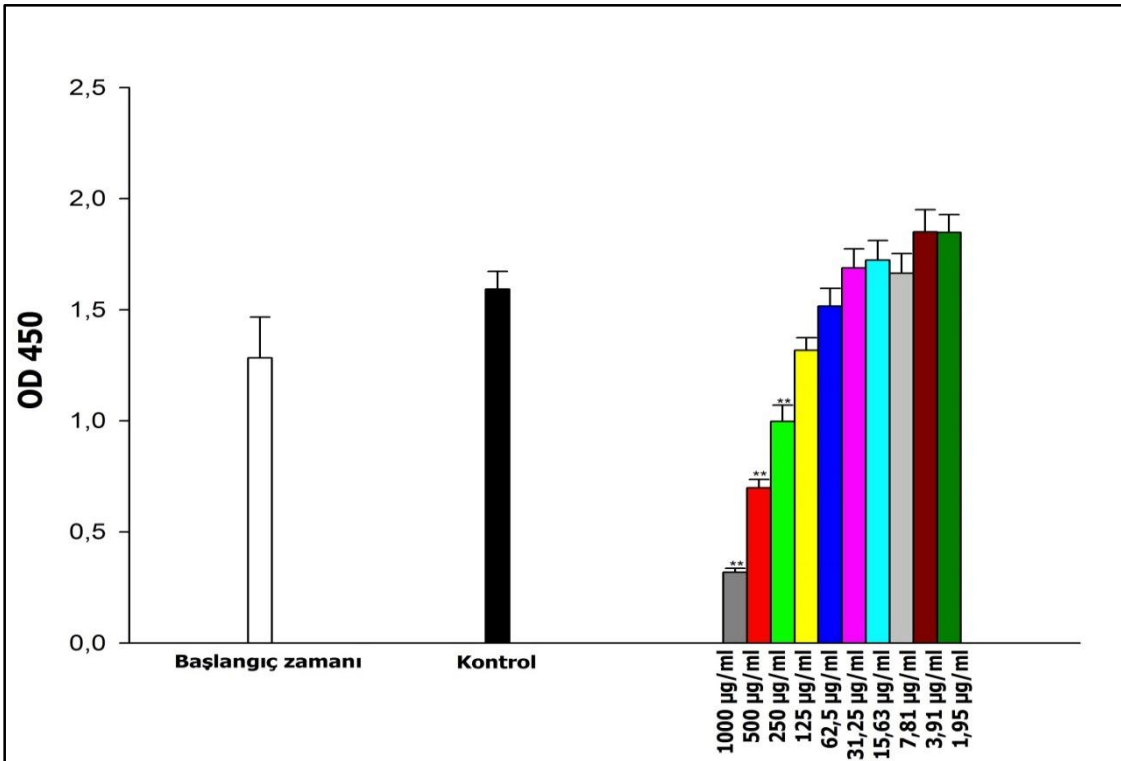


Şekil 4.5. 1.95 - 1000 $\mu\text{g/mL}$ arasında etoposit uygulanan A549/90E hücre hattında hücre canlılığı oranları (%).

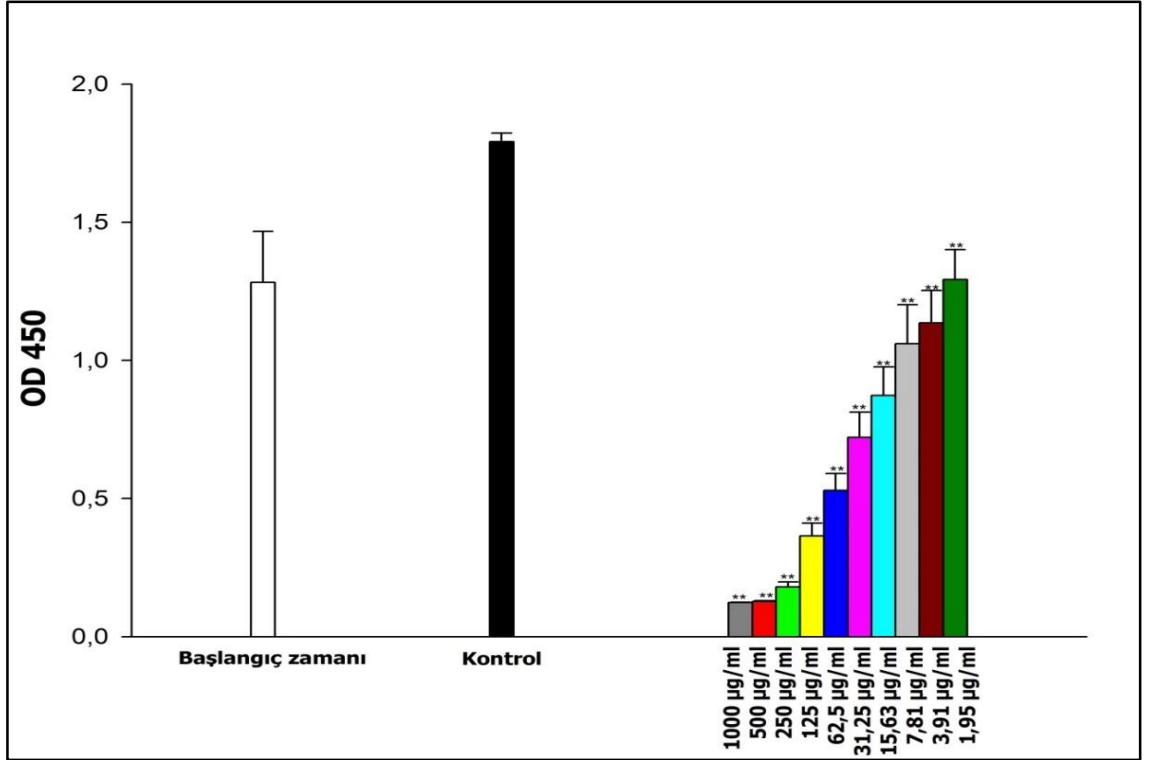
Yukarıda verilen grafik doğrultusunda etoposit'in A549/90E hücre hattı üzerine gösterdiği etkiler değerlendirildikten sonra; 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için IC_{50} değerleri sırasıyla 383.87 (~384) $\mu\text{g/mL}$, 355.82 (~356) $\mu\text{g/mL}$ ve 338.96 (~339) $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda dirençlilik indeksi hesaplandı. Buna göre, A549/90E hücre hattı, A549/P hücre hattına kıyasla etoposite 8.44 kat daha dirençlidir.

4.3. Karboplatin'in A549/P ve A549/90E Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler

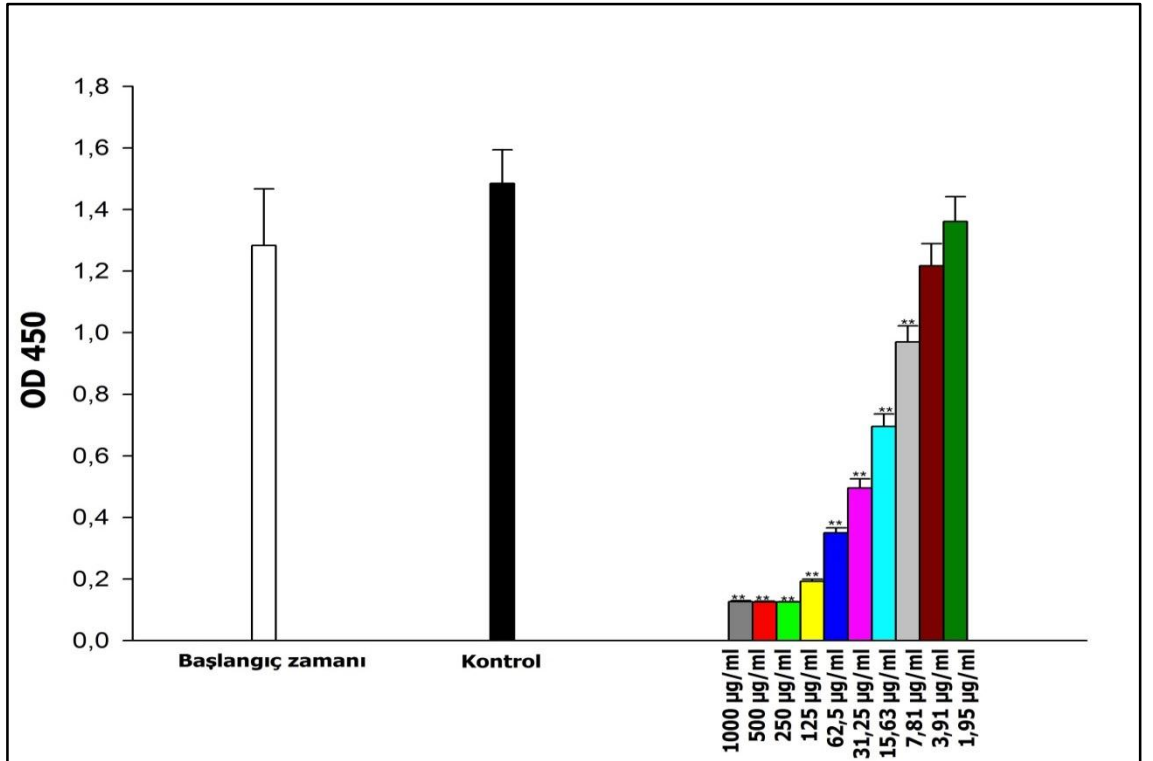
Tüm inkübasyon süreleri sonunda, 1,95 - 1000 µg/mL aralığında denenen dozlardan 24 saatlik inkübasyon süresi için 1000 µg/mL karboplatin konsantrasyonu, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL ve 62.5 µg/mL karboplatin konsantrasyonları A549/P hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttı (**, p<0.01). Karboplatin'in A549/P hücre canlılığı üzerindeki etkisi tüm inkübasyon süreleri için ayrı ayrı grafiklendirilerek (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7) aşağıda gösterildi. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan hücre ölümünün yüzde değeri Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



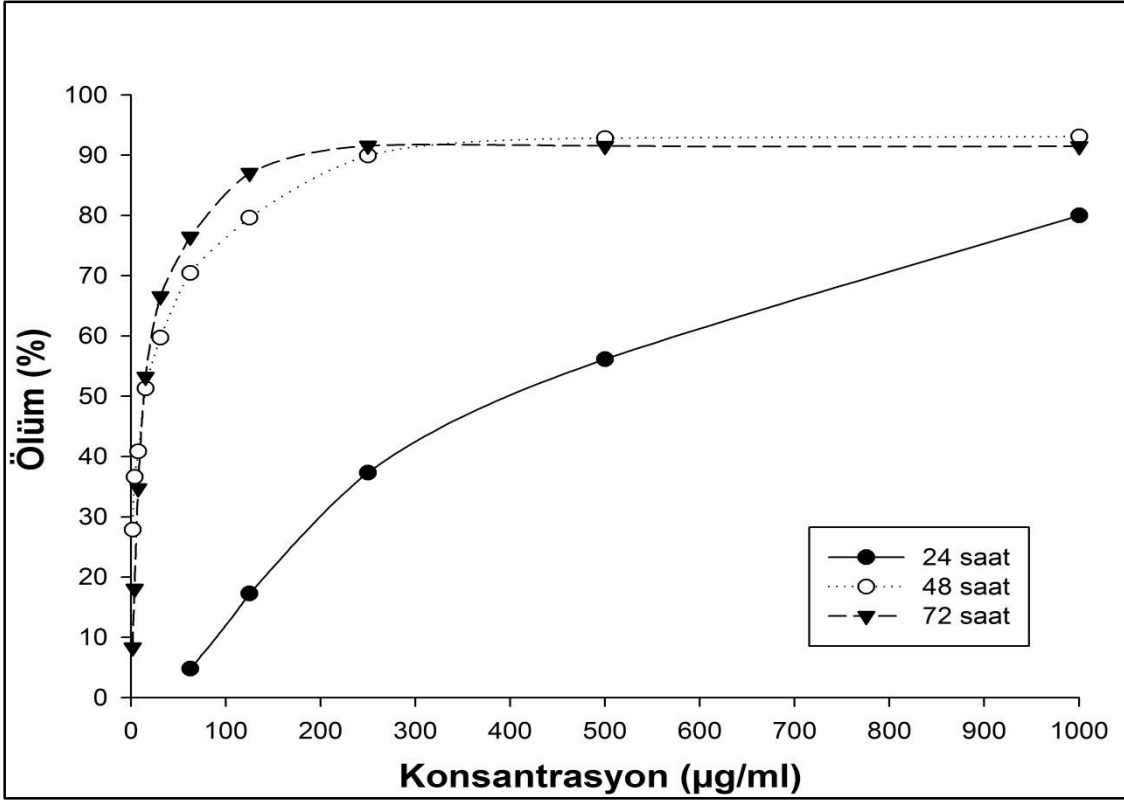
Şekil 4.6. Karboplatin'in 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549/P hücre hattı üzerine etkisi.



Şekil 4.7. Karboplatin'in 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549/P hücre hattı üzerine etkisi.



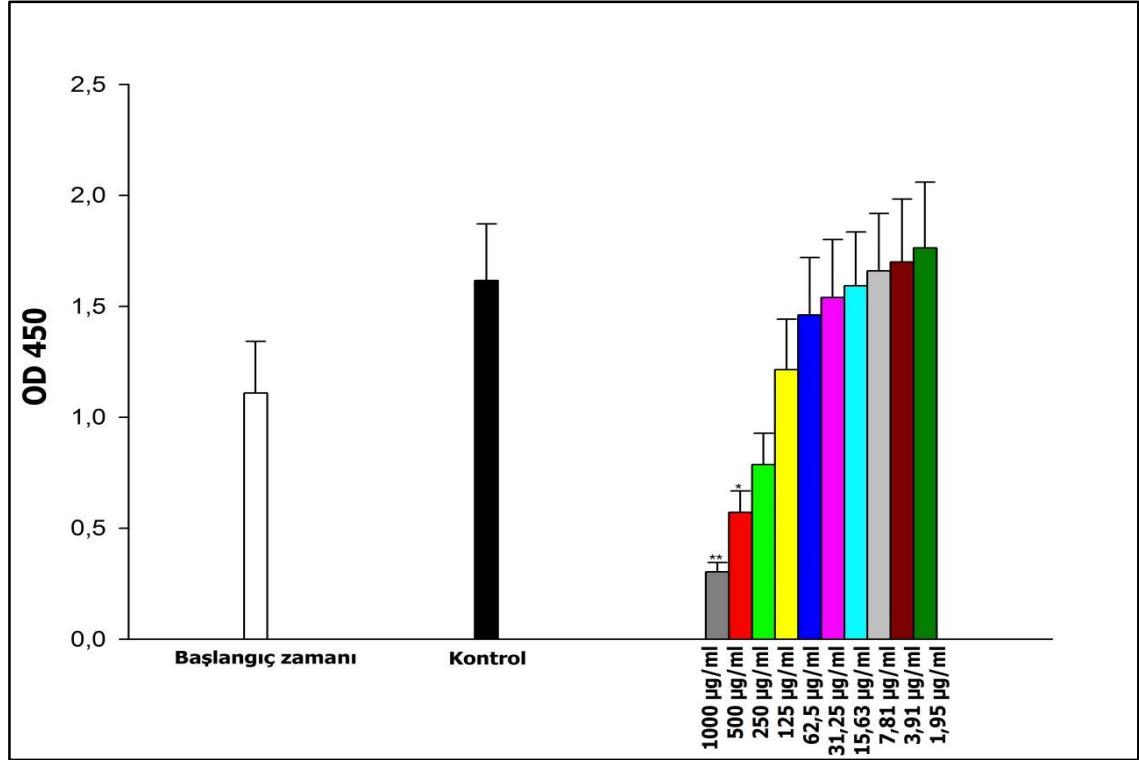
Şekil 4.8. Karboplatin'in 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549/P hücre hattı üzerine etkisi.



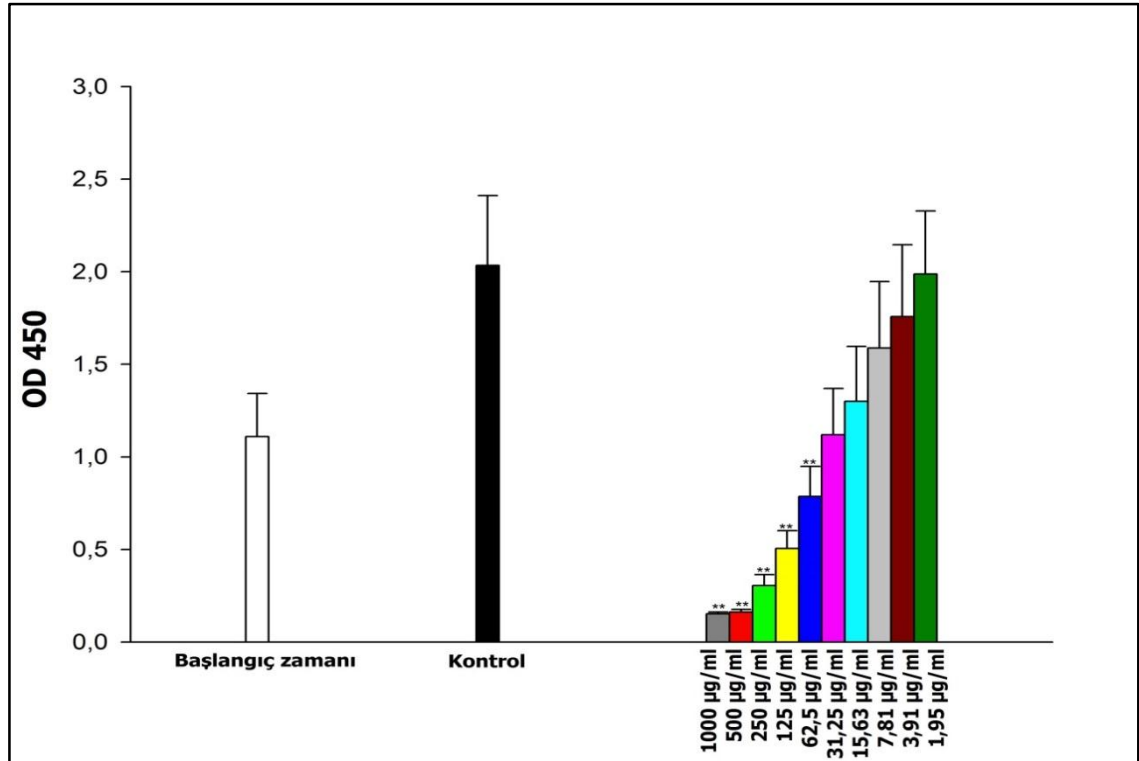
Şekil 4.9. Karboplatin'in 1,95 -1000 µg/mL arasında denenen dozlarının A549/P hücre hattında yol açtığı ölüm oranları (%).

Yukarıda verilen grafik doğrultusunda karboplatin'in A549/P hücre hattı üzerine gösterdiği etkiler değerlendirildikten sonra; 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 419.281 (~419) µg/mL, 182.88 (~183) µg/mL ve 14.90 (~15) µg/mL olarak hesaplandı. Bu hücre hattı için bir sonraki dönemde yapılması planlanan çalışmaların 72 saatlik inkübasyon süresi için belirlenen IC₅₀ değeri olan 15 µg/mL'lik konsantrasyon ile yürütülmesine karar verilmiştir.

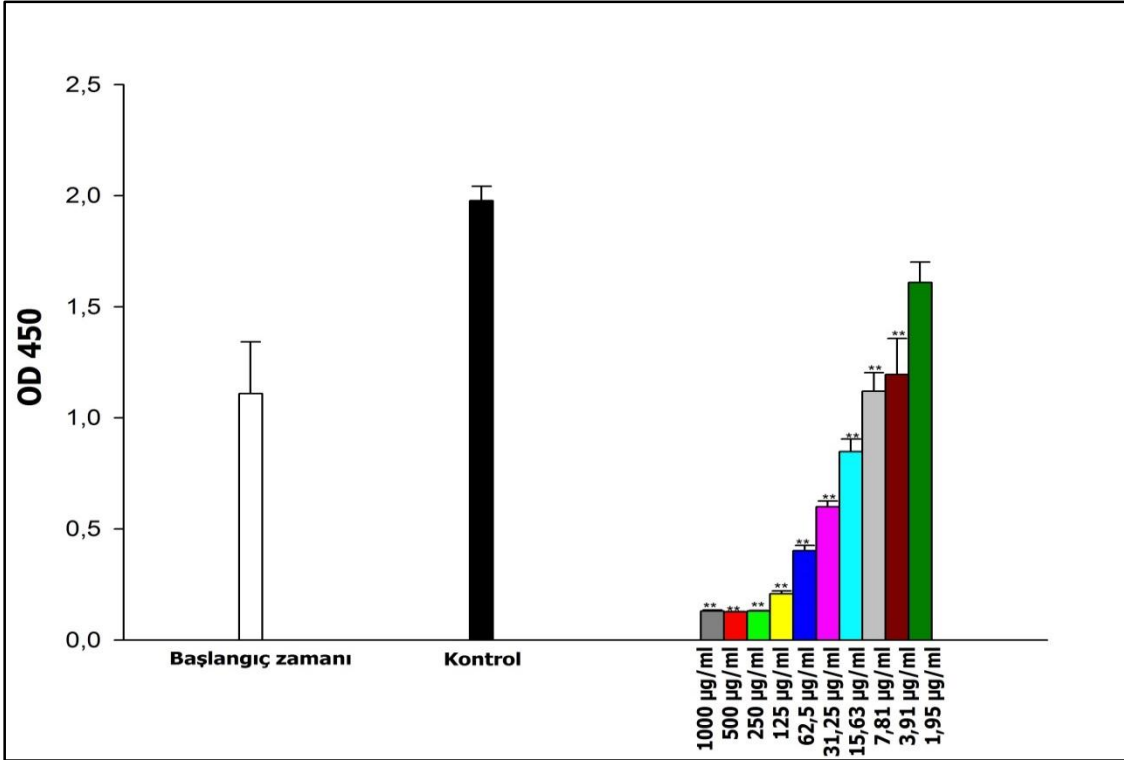
Direnç geliştirilmiş A549/90E hücre hattında karboplatinin sitotoksik etkileri üzerine yapılan deneyler sonucu, doz artışına bağlı sitotoksik etkinin arttığı görüldü. A549/90E hücre hattında 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 1000 µg/mL karboplatin konsantrasyonunda, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL ve 125 µg/mL karboplatin konsantrasyonlarında ve 72 saatlik inkübasyon süresi için 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL ve 62.5 µg/mL karboplatin konsantrasyonlarında sitotoksik etkinin önemli oranda arttığı da gözlemlendi (**, p<0.01). Karboplatin'in A549/90E hücre canlılığı üzerindeki etkisi tüm inkübasyon süreleri için ayrı ayrı grafiklendirilerek (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11) aşağıda gösterildi. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan hücre ölümünün yüzde değeri Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



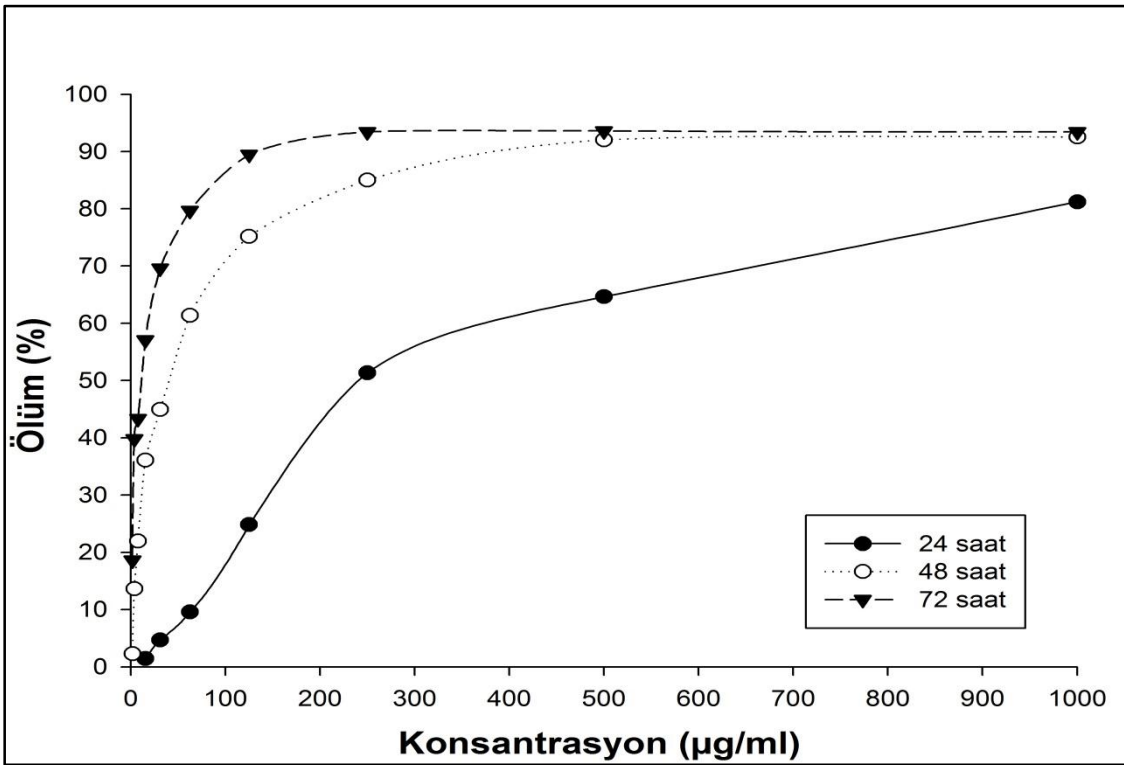
Şekil 4.10. Karboptatin'in 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549/90E hücre hattı üzerine etkisi.



Şekil 4.11. Karboptatin'in 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549/90E hücre hattı üzerine etkisi.



Şekil 4.12. Karboplatin'in 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, A549/90E hücre hattı üzerine etkisi.



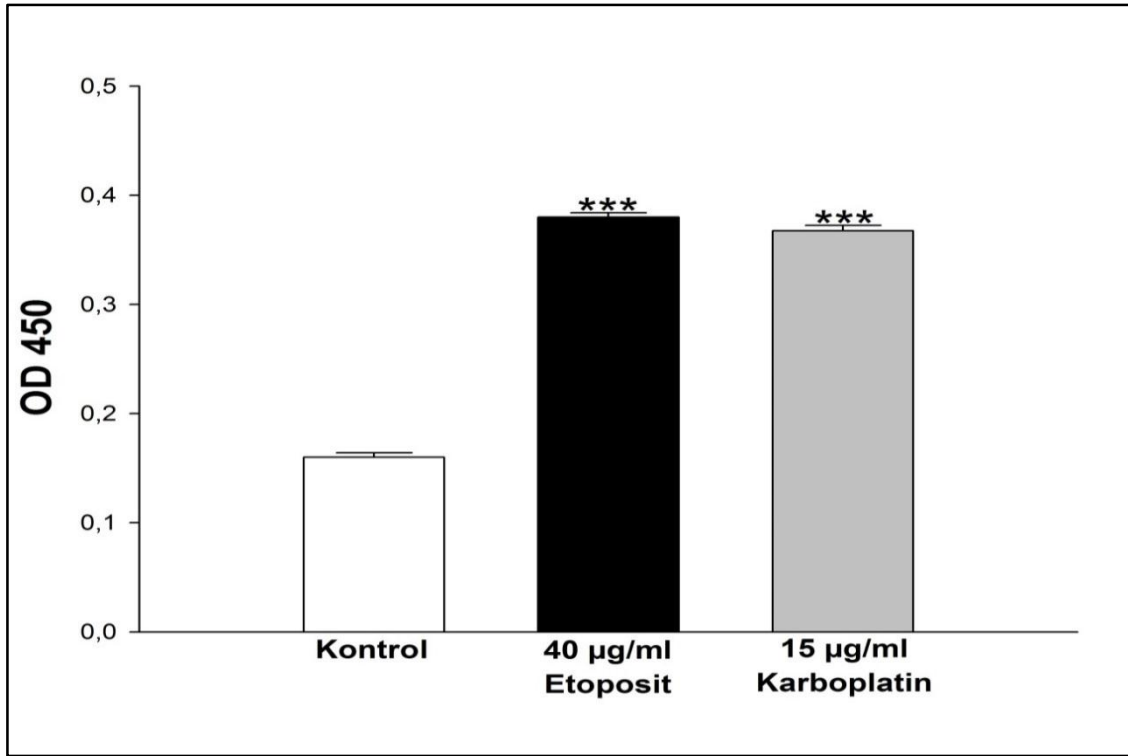
Şekil 4.13. Karboplatin'in 1,95 -1000 µg/mL arasında denenilen dozlarının A549/90E hücre hattında yol açtığı ölüm oranları (%).

Yukarıda verilen grafik doğrultusunda karboplatin'in A549/90E hücre hattı üzerine gösterdiği etkiler değerlendirildikten sonra; 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 241.21 (~241) µg/mL, 40.70 (~41) µg/mL ve 11.81 (~12) µg/mL olarak hesaplandı. Bu hücre hattı için bir sonraki dönemde yapılması planlanan çalışmaların 72 saatlik inkübasyon süresi için IC₅₀ değeri olarak belirlenen 11,81 (~12) µg/mL'lik konsantrasyon ile yürütülmesine karar verilmiştir.

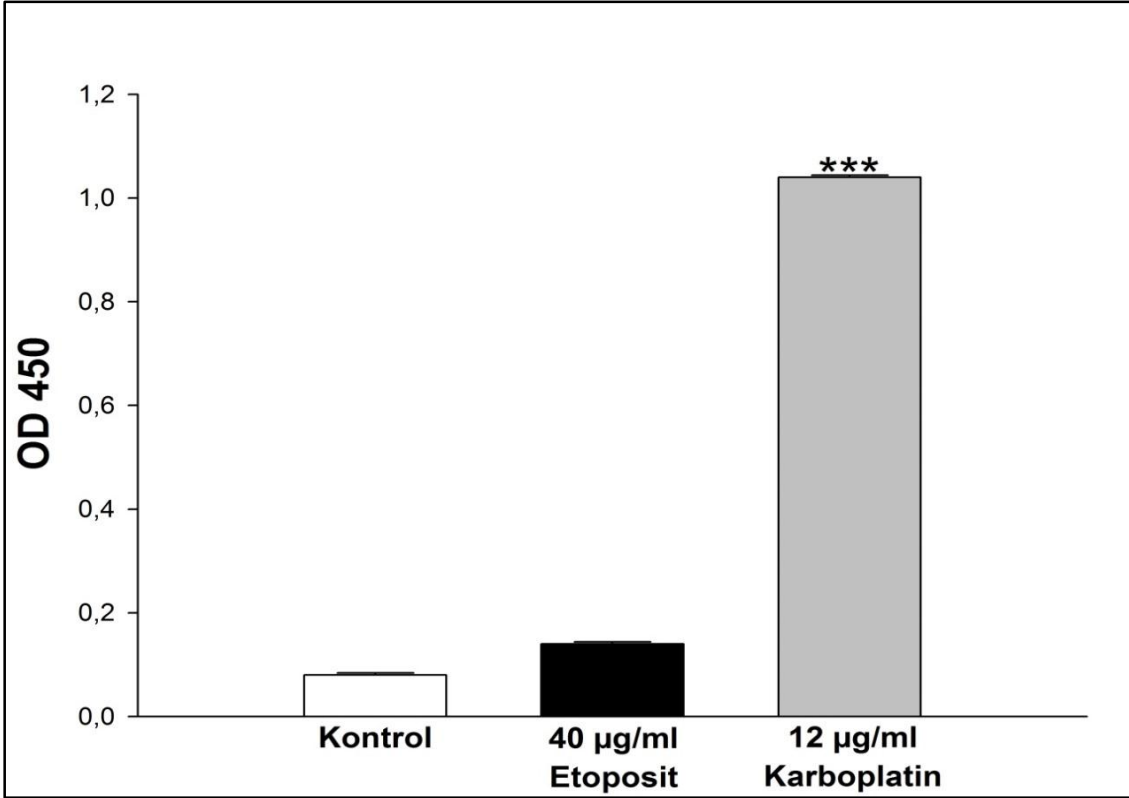
4.4. Karboplatin'in A549/P ve A549/90E Hücrelerinde Kaspaz-3 Enzimi Üzerindeki Etkisi

72 saat inkübasyon süresi sonunda, 40 µg/mL etoposid uygulanan A549/P hücre hattında, kaspaz-3 aktivitesinde 2.38 kat artış gözlenirken (***, p < 0.001), 15 µg/ml karboplatin uygulanan A549/P hücre hattında 2.3 kat artış gözlendi (***, p < 0.001). Karboplatin'in A549/P hücre hattında, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkisi aşağıdaki gibi grafiklendi (Şekil 4.13).

72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, 40 µg/mL etoposid uygulanan A549/90E hücre hattında, kaspaz-3 enzim aktivitesinde gözlenen 1.75 katlık artış istatistiksel anlamda önem göstermezken (p > 0.05), 12 µg/mL karboplatin uygulanan A549/90E hücre hattında 13 kat artış gözlendi (p < 0.001). Karboplatin'in A549/90E hücre hattında, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkisi aşağıdaki gibi grafiklendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. 40 µg/mL etoposid ve 15 µg/mL karboplatin'in A549/P hücre hattında kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri.

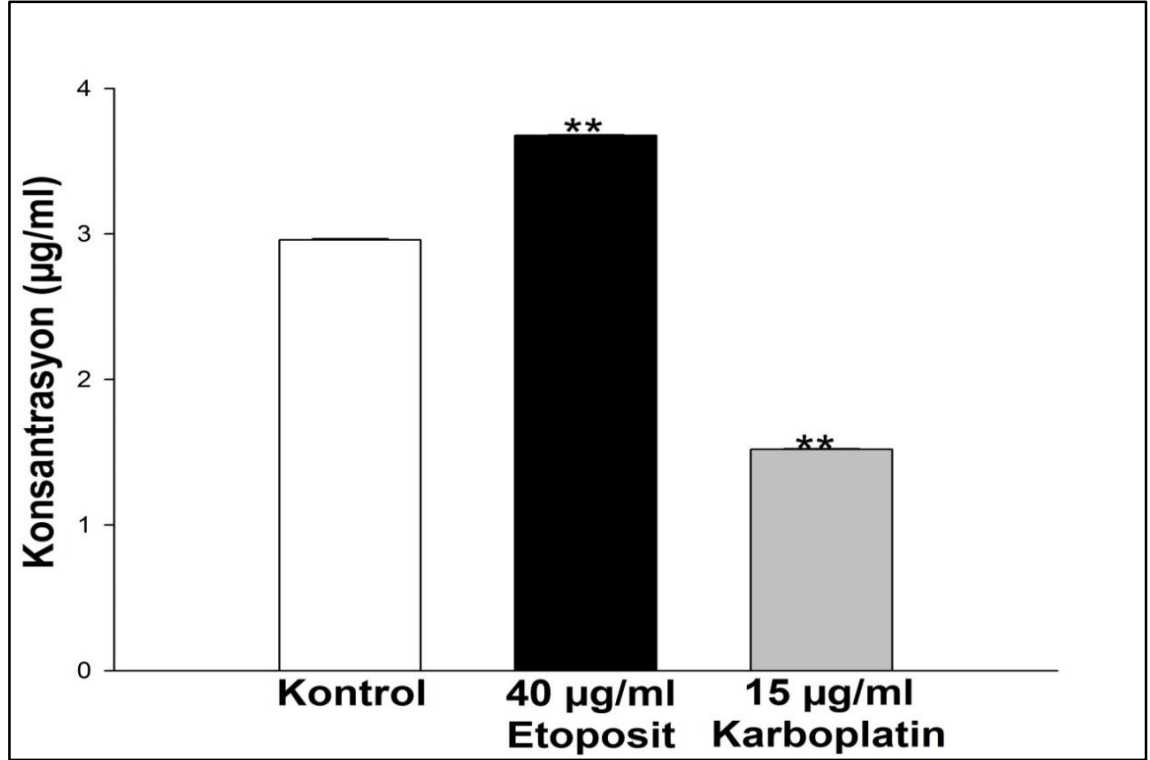


Şekil 4.15. 40 µg/mL etoposid ve 12 µg/mL karboplatin'in A549/90E hücre hattında kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri.

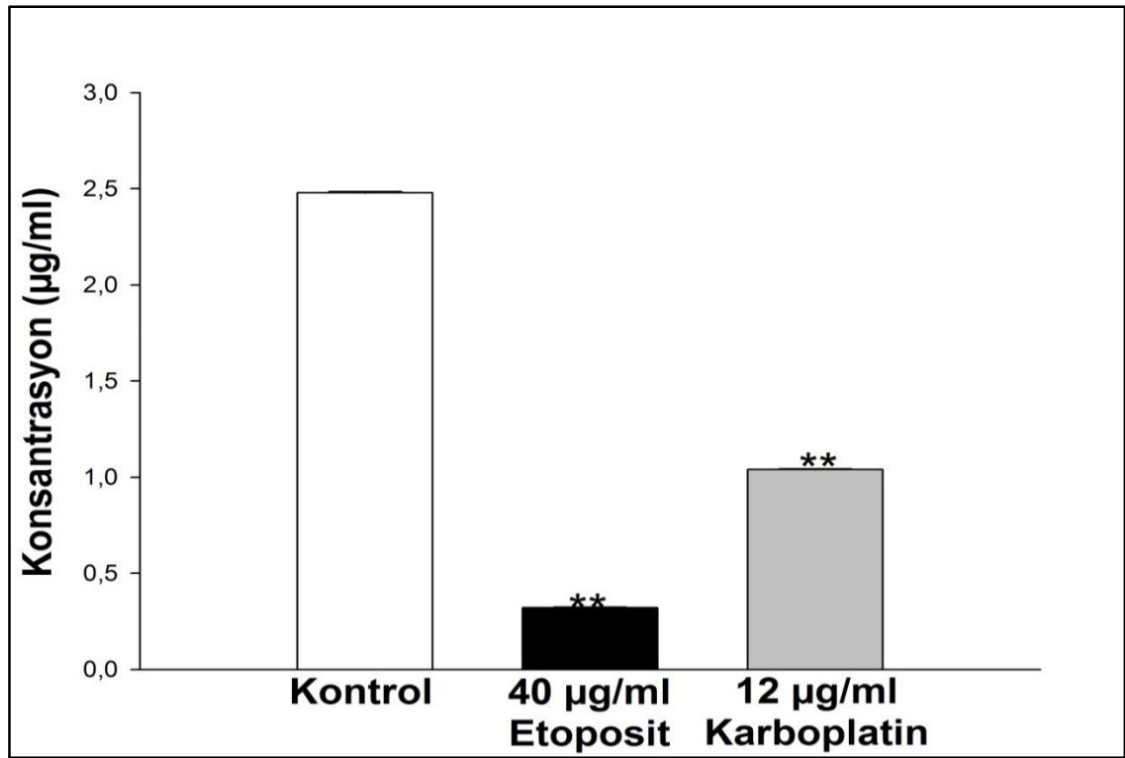
4.5. Karboplatin'in A549/P ve A549/90E Hücrelerinde MMP-2 Enzimi Üzerindeki Etkisi

72 saat inkübasyon süresi sonunda, 40 µg/mL etoposid uygulanan A549/P hücre hattında, MMP-2 aktivitesinde 1.24 kat artış gözlenirken (**, $p < 0.01$), 15 µg/mL karboplatin uygulanan A549/P hücre hattında 1.95 kat azalma gözlemlendi (**, $p < 0.01$). Karboplatin'in A549/P hücre hattında, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MMP-2 enzim aktivitesi üzerine etkisi aşağıdaki gibi grafiklendi (Şekil 4.15).

72 saat inkübasyon süresi sonunda, 40 µg/mL etoposid uygulanan A549/90E hücre hattında, MMP-2 aktivitesinde 7.72 kat azalma gözlenirken (**, $p < 0.01$), 12 µg/mL karboplatin uygulanan A549/90E hücre hattında 2.38 kat azalma gözlemlendi (**, $p < 0.01$). Karboplatin'in A549/90E hücre hattında, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MMP-2 enzim aktivitesi üzerine etkisi aşağıdaki gibi grafiklendi (Şekil 4.16).



Şekil 4. 16. 40 µg/mL etoposit ve 15 µg/mL karboplatin'in A549/P hücre hattında MMP-2 enzim aktivitesi üzerine etkileri.



Şekil 4. 17. 40 µg/mL etoposit ve 12 µg/mL karboplatin'in A549/90E hücre hattında MMP-2 enzim aktivitesi üzerine etkileri.

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, tüm kanser türleri arasında cinsiyet farkı gözetmeksizin en ölümcül kanser türüdür. Akciğer kanseri, 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken, günümüzde her iki cinsiyette de kanserden ölümlerinin başında yer almaktadır. Dünya genelinde sigara içme alışkanlıklarındaki değişmeye bağlı olarak akciğer kanserinin histolojik alttiplerinin oranında değişiklik yaşanmıştır. Tarihsel olarak çoğunlukla erkeklerde görülen bu kanser türü, zaman içinde kadınların sigara kullanımının artmasıyla kadınlarda meme kanseri, yumurtalık ve yumurtalık tüpü kanserleri toplamından daha yaygın bir hal kazanmıştır (Köktürk vd 2004). Vücudun hemen hemen her bölgesine metastaz yapabilme özelliği nedeniyle hastanın yaşam kalitesini düşürmekte, ömür uzunluğunu da önemli ölçüde azaltmaktadır (Sher vd 2008).

Akciğer kanserlerinin büyük bir çoğunluğu karsinomdur; epitel hücrelerinden köken almaktadır. Akciğer karsinomları, histolojik kriterler temel alındığında küçük hücreli dışı ve küçük hücreli olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomları; skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere üç sınıfta toplanır (Travis vd 1995). Tez çalışmamızda kullandığımız A549 hücreleri adenokarsinom karakterli, insan alveolar bazal epitel hücreleridir. Skuamöz özelliğe sahip bu hücreler lesitin sentezlemekte ve hücre membranı fosfolipitleri açısından oldukça önemli olan doymamış yağ asitlerinden fazlaca içermektedir (Thomas vd 1998). *In vitro* ilaç metabolizması çalışmalarında ve transfeksiyon denemelerinde tip II pulmonar epitel hücre modeli olarak sıklıkla tercih edilmektedir (Lin vd 1998).

Kanser tedavisinde en sık kullanılan tedavi yöntemi olan kemoterapi, metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde de ilk tercihtir. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde sıklıkla; sisplatin veya karboplatin ve buna ek olarak gemsitabin, paklitaksel, doketaksel, etoposide veya vinorelbin adlı kemoterapötiklerden biri kullanılır (Clegg vd 2002). Yardımcı (adjuvan) kemoterapi, ameliyat sonrasında uygulanan kemoterapidir ve sisplatin veya karboplatin gibi platinum ajanları tercih edilir (Tsuboi vd 2007). Kanserli hücre ve dokulara uygulanan antikanser ajanlara karşı tedavinin başında veya ilerleyen dönemlerinde gelişen hücresel dirençlilik mekanizmaları, kanser tedavisinde başarıyı önemli ölçüde engelleyen ciddi bir problemdir (Özgüroğlu 2003).

Yapılan kaynak tarama çalışmalarında, akciğer kanseri tedavisinde sıklıkla tercih edilen etoposide karşı direnç geliştiğine dair çalışmalar ile karşılaşmıştır. Etoposid dirençliliği farklı kanser türlerinde de görülmektedir. Çalışmamızda, KHDAK modeli olan A549 hücre hattına etoposid dirençliliği geliştirmeyi hedefledik. Bu hedefle, A549 hücre hattı üzerine 1000 µg/mL'den başlayarak yarı yarıya sulandırılmış etoposid konsantrasyonları uyguladık. A549 hücre hattında ciddi sitotoksik yanıtlar sergileyen

etoposite direnç geliştirebilmek için öncelikle IC₅₀ değeri hesaplandı. A549 hücre hattında 72. saat sonunda 40,14 µg/mL (~40) etoposit konsantrasyonunun hücrelerin % 50'sini öldürdüğüne karar verildi.

Paul ve arkadaşları (2016), etoposit'in akciğer kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini gösterdikleri çalışmalarında, benzer şekilde A549 hücre hattını kullanmış ve IC₅₀ değeri belirlemişlerdir. Sitotoksikite deneylerini 3000 hücre/kuyucuk üzerinde gerçekleştirmişler ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda 14.5 ± 1.6 µg/mL'lik IC₅₀ değeri elde etmişlerdir.

Hansen ve arkadaşları (2003) KHDAK hücre hatlarını etoposite dirençli hale getirmek için yaptıkları çalışmada, hücrelerin ilaca verdiği yanıtı değerlendirmiş ve sitotoksik indeksi ≥ 50 (IC₅₀) olanları etoposite duyarlı, < 50 olanları ise etoposite dirençli kabul etmişlerdir. Başlangıçta 40 µg/mL etoposit konsantrasyonu ile muamele ettiğimiz A549 hücrelerinde belli bir süre sonra ölüm azalmış ve hücreler tekrar petri kabında çoğalmaya başlamıştır. Bunun üzerine belirlediğimiz hedef doğrultusunda, kademeli konsantrasyon artışı ile hücrelerde başlangıçta yaklaşık % 90 ölüme sebep olan 90 µg/mL etoposit konsantrasyonunda nihai dirençli kültür elde edildi. Bu aşamada yapılan sitotoksikite çalışması ile direnç geliştirilen A549/90E hücre hattının etoposite verdiği yanıtlar araştırıldı. Etoposit'in A549/90E hücre hattı üzerinde 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda belirlenen IC₅₀ değeri 338.96 (~339) µg/mL olarak hesaplandı. Buna göre, A549/90E hücre hattının, A549/P hücre hattına kıyasla etoposite 8.44 kat daha dirençli hale geldiği bulunmuştur.

Kemoterapide kullanılan ve hüresel dirençliliğin geliştiği ilaçlara ek tedaviler, gelişen dirençliliği azaltmak ve tedavide olumlu sonuçlara gidebilmek adına önem kazanmaktadır. Bu gibi durumlarda ikinci bir kemoterapötik ajan kullanılarak tedaviyi desteklemek gereklidir. Yapılan beş randomize klinik çalışmada, adjuvan kemoterapinin KHDAK'nde sağkalımı artırdığı bildirilmiştir (Arriagada vd 2004, Kato vd 2004, Strauss vd 2008, Winton vd 2005, Douillard vd 2006). Karboplatin, akciğer kanseri tedavisinde gerek maliyeti gerekse tedavi başarısı göze alındığında tercih edilen kemoterapötiklerden biridir. Yapılan randomize klinik çalışmalar ve meta analizlerle diğer ilaçlardan daha avantajlı bir adjuvan kemoterapötüğü olduğu doğrulanmamış olsa da, ABD'de adjuvan terapide en yaygın kullanılan ilaçtır (Kelly vd 2001, Schiller vd 2002, Hotta vd 2004, Lilenbaum vd 2005, Ardizzoni vd 2007).

Çalışmamızda karboplatinin, adjuvan terapideki etkinliği göz önüne alınarak, geliştirdiğimiz dirençli kültür olan A549/90E üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. 1000 µg/mL konsantrasyondan başlayarak yarı yarıya sulandırılan ve uygulanan karboplatin, hem A549/P hem de A549/90E hücrelerinde önemli sitotoksik etkiler yaratmıştır. Her bir hücre hattı için, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde yapılan deneyler sonucu, yüksek konsantrasyonların inkübasyon süresi arttıkça sergiledikleri ölüm oranının % 90'ı aştığı görülmektedir. Kemoterapik bir ajan olarak

KHDAK tedavisinde sıkça kullanılan karboplatinin, A549/P hücrelerinde bu denli ciddi sitotoksik etkiler yaratmasını bekliyorduk. Ancak, çalışmamızın en önemli başarılarından birisi, etoposite karşı direnç geliştirdiğimiz A549/90E hücrelerinde de ciddi sitotoksik etkiler yaratmış olmasıdır. Bununla birlikte, her bir inkübasyon süresi için, A549/90E hücre hattında karboplatin IC₅₀ değerinin, A549/P hücre hattına kıyasla daha düşük olduğu da görülmüştür. A549/P hücre hattı için, 24, 48 ve 72 saat sonundaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 419.28, 182.88, 14.90 µg/mL'dir. A549/90E hücre hattı için ise, 24, 48 ve 72 saatlik IC₅₀ değerleri sırasıyla 241.21, 40.70 ve 11.81 µg/mL'dir. Kemoterapi tedavilerinde kabul edilir gerçeklerden birisi ilaç konsantrasyonlarının normal hücreler üzerinde minimum toksisite yaratabilecek düzeyde olması gerektiğidir. Bu bağlamda, çalışmamızın sonuçları daha düşük konsantrasyonlarla adjuvan kemoterapiden yarar sağlanabileceğini göstermektedir.

Hande (2008) derlemesinde platin türevli ilaçların DNA'ya girme potansiyellerinin yanısıra, topoizomeraz II'yi hedefleyebildiklerine dikkat çekmiştir. Platin türevli ilaçlar, sitotoksik aktivitelerini kovalent bir DNA-topoizomeraz II kompleksi oluşumuyla gerçekleştirebilir. Topoizomeraz II proteininin hem kantitatif hem de kalitatif değişimi ve enzimin etoposide duyarlılığının azalması, etoposite dirençliliğinde sıklıkla gözlenen bir durumdur (Robert ve Larsen 1998, Schneider vd 1994). Bu bağlamda, yaptığımız çalışmada karboplatinin, etoposite direnç geliştiren A549/90E hücre hattında yarattığı ciddi sitotoksik etkilerin, topoizomeraz II ile alakalı olabileceğini düşündürmektedir.

Platin bileşiklerini hücre membranından içeri taşıyan MDR1'e homolog çeşitli membran taşıyıcıları bilinmektedir. MRP ve ATP7A/B gibi efflux ATPazlar ve CTR1 gibi çözülmüş madde taşıyıcıları, P-glikoprotein olarak bilinen ATP bağlayıcı kaset taşıyıcısı MDR1'e çok benzeyen özellikler sergilemektedir (Johnson vd 1996, Shen vd 2012). MDR1 ve MRP1 gibi ABC taşıyıcı proteinlerinin ekspresyonunun artması (Szak vd 2009) etoposite dirençliliğiyle bağlantılı bulunmuştur. Bu bilgileri derlediğimizde, etoposite dirençli A549/90E hücre hattında, karboplatinin yüksek derecede sitotoksik etki göstermesini, direnç gelişen hücre hattında ekspresyonunun arttığını tahmin ettiğimiz MRP1 seviyesi ile bağdaştırabiliriz.

Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, gelişme ve normal hücrel süreçler sırasında hücrelerde meydana gelen önemli bir fizyolojik süreçtir (Abedin vd 2007). Apoptoz, mitokondriden apoptoz aktivatörlerinin salınması gibi olayların kaskatına yol açan, mitokondriyal permeabiliteyi değiştirebilen, çeşitli hücrel sinyalle indüklenir (Xiang vd 2015). NF-kB yolağının, Bad veya Bax gibi pro-apoptotik faktörlerin kaybı veya Bcl-2, Bcl-xL gibi anti-apoptotik faktörlerin aktivasyonu ile apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir (Yang vd 2008, Weber 2010, Berrak vd 2016). Dahası, NF-kB bağlanma alanları Bcl-2, Bcl-xL'nin promotorunda bulunmuştur (Sohma vd 2011). Anti-apoptotik moleküller Bcl-2 veya Bcl-xL'in aşırı ekspresyonu, antikanser ilaçlara direnç gösterebilir. Bad/Bcl-2 heterodimerizasyonu,

Bcl-2'yi izole eder ve hem dış hem de iç mitokondriyal membranlarda Bax nüfuz ederek sitokrom c'nin salınmasına ve kaspaz-3'ün kesilerek aktifleştirilmesi ile sonuçlanan kaspaz kaskadının downstream aktivasyonuna yol açar (O'Neill vd 2016).

Kaspaz-3, ölüm kaskadı'nın başlatılması ile bağlantılı "efektör" kaspaz olarak ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, hücrenin apoptotik sinyal yoluna girme noktasının önemli bir işaretidir (Nicholson vd 1995). Kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 tarafından harekete geçirilir ve farklı sinyal yolları için bir çakışma noktası oluşturduğu için, apoptoz varlığını belirlemek için en uygun belirteçtir.

Karboplatinin A549/P ve A549/90E hücre hatları üzerinde % 50 ölüm gerçekleştirdiği (sırasıyla; A549/P için 15 µg/mL ve A549/90E için 12 µg/mL) konsantrasyonlarda, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. İlk olarak her iki hücre hattının kontrol grupları birbirleriyle kıyaslandığında, eşit miktarda protein alınarak yapılan deneyler sonucu A549/90E hücre hattında kaspaz-3 enzim aktivitesinin, A549/P hücre hattındaki kaspaz-3 enzim aktivitesine oranla 2 kat azaldığı görülmektedir. Bu durum bize, dirençli kültür geliştirme deneylerimizin başarılı şekilde ilerlediğini göstermektedir. A549/P hücre hattında 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, başlangıçta belirlenen 40 µg/mL'lik etoposid uygulaması, kontrol grubuna oranla, kaspaz-3 enzim aktivitesinde 2.38 kat artışa neden olmuştur. Aynı hücrelerde ve inkübasyon süresi sonunda, karboplatin'in 15 µg/mL'lik konsantrasyonu ise kaspaz-3 enzim aktivitesinde 2.3 kat artışa neden olmuştur. Her iki ilacın % 50 ölüme sebep olan konsantrasyonlarının aynı seviyede aktivite göstermiş olması, deneyimizin kontrollü ilerlediğine işaret etmektedir. A549/90E hücre hattında ise, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 40 µg/mL'lik etoposid uygulaması, kontrol grubuna oranla, kaspaz-3 enzim aktivitesinde 1.75 kat artışa neden olmuştur. Aynı hücrelerde ve inkübasyon süresi sonunda, karboplatin'in 12 µg/mL'lik konsantrasyonu ise kaspaz-3 enzim aktivitesinde 13 kat artışa neden olmuştur. Her iki hücre hattı birbiriyle kıyaslandığında parental hücre hattına kıyasla dirençli hücre hattında 2.83 kat artış gözlenmiştir.

Paul ve arkadaşları (2016) KHDAK hücre hattı NCI-H460 üzerine etoposid dirençliliği geliştirdikleri çalışmalarında, akciğer kanserinde kemoterapik dirençlilik gelişmesinde RHOC isimli proteinin önemli rolü olduğunu keşfetmişlerdir. RHOC, NCI-H460R (etoposid dirençli NCI-H460 hücre hattı) hücrelerinde önemli ölçüde upregüle olmuştur. Tümör hücresi invazyonunu ve metastazı teşvik etme potansiyeline sahip, metastatik ve patolojik olarak farklı kanserlerde de benzer şekilde davranmaktadır (Clark vd 2000, Srivastava vd 2010). RHOC proteininin susturulması, STAT3 ve Bcl-xL'in transkripsiyon düzeyinde bastırılmasına ve çok hücreli koruma yollarında yer aldığı bilinen Bax ve kaspaz-3 gibi pro-apoptotik proteinlerin yükselmesine yol açar (Kawata vd 2014). Benzer şekilde, RHOC proteininin izoformunun, NCI-H460R hücre hattında önemli ölçüde artmış olduğunu gösterilmiştir. Bu proteinin susturulması, NCI-H460R hücre hattındaki dirençliliğin azalmasına yol

açarak kemoterapötik ilaç direncindeki rolünü düşündürmektedir (Paul vd 2016). Akciğer kanserinde ilaç dirençliliğinde rolü aydınlatılan bu protein kaspaz-3 ile yakından ilişkilidir. Geri dönüp bakıldığında, çalışmamızda kaspaz-3 seviyesindeki artışın sebeplerinden birinin, gelişen dirençli A549/90E hücre kültüründe RHOC proteini ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2), 72 kDa'luk bir protein olup, jelatinaz A, 72 kDa jelatinaz ve 72 kDa tip IV kollajenaz olarak da bilinir. MMP-9 ile birlikte bazal membranın ana bileşeni olan tip IV kollajeni degrades eder, elastin ve fibronektin gibi diğer kollajen tiplerini de denatüre edebilir (Ra ve Parks 2007). MMP-2, metastaz yapan tümörlerin invazyonunu önleyen stromal hücrelerde aşırı eksprese edilir. MMP-2'nin aktivasyonu malign potansiyelin kazanılmasında önemli bir olaydır. MMP-2'nin tümör invazyonu, anjiyogenezis ve metastaza katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Kawasaki vd 2008).

Yapılan doz tarama çalışmalarını takiben, karboplatinin belirlenen IC₅₀ değerlerinde, A549/P ve A549/90E hücre hatlarında MMP-2 enzim aktivitesi üzerine olan etkileri incelenmiştir. A549/P hücre hattında etopositin 40 µg/mL'lik uygulanmasında kontrole kıyasla, MMP-2 miktarı 1.24 kat artarken, karboplatinin 15 µg/mL'lik uygulamasında MMP-2 miktarı 1.95 kat azalmıştır. A549/90E hücre hattında ise etopositin 40 µg/mL'lik uygulamasında kontrole kıyasla, MMP-2 miktarı 7.72 kat azalırken, karboplatinin 15 µg/mL'lik uygulamasında MMP-2 miktarı 2.38 kat azalmıştır.

A549 hücre hattı hem mRNA seviyesinde hem de protein seviyesinde MMP-2 aktivitesine sahip değildir (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000087245-MMP2/cell>). Bu bilgiye dayanarak, çalışmamızda A549/90E hücre hattında metastatik aktivitenin gelişip gelişmediği MMP-2 enzim miktarları ölçülerek tayin edildi. A549/P hücre hattına oranla A549/90E hücre hattında, MMP-2 miktarında 1.19 kat azalma saptandı. Geliştirilen dirençli kültürün de parental formu gibi metastatik aktiviteye sahip olmadığı görülmektedir. Hem etopositin tedavisi hemde karboplatin tedavisi uygulanan A549/90E hücre hattında MMP-2 aktivitelerin azaldığı görülmüştür.

6. SONUÇ

Tüm bu verilerle birlikte;

1. Tez kapsamında gerçekleştirilen başlangıç hücre canlılığı test sonuçlarına göre; A549 hücre hattında etopositin 40 µg/mL'lik dozda 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığında % 50 azalmaya sebep olmuştur.

2. Etoposit dirençliliği geliştirilmesi hedeflenen A549 hücre hattında ilacın kademeli olarak artırılarak uygulanması ile yürüttüğümüz dirençlilik çalışmalarında, % 95 ölümün gerçekleştiği 90 µg/mL'lik dozda hücreler ilaca dirençli hale gelmiştir. Etoposit direnci geliştirilen A549/90E hücre hattının, A549/P hücre hattına kıyasla 8.44 kat daha dirençli olduğu yapılan dirençlilik indeksi ile bulunmuştur.

3. Her iki hücre hattı için yapılan sitotoksosite deneyleri sonucunda, direnç geliştirmiş hücre hattının parental formuna kıyasla, karboplatine daha duyarlı olduğu gösterilmiştir.

4. Adjuvan terapide hedeflenen ikincil ilaç tedavisi için, etoposite direnç geliştirmiş akciğer kanseri hücrelerinde daha düşük konsantrasyonlarda karboplatin tedavisi uygulanabileceği varsayılabilir.

5. Etoposite direnç geliştirmiş akciğer kanseri hücrelerinde, karboplatinin kaspaz-3 seviyelerini artırarak apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. Kaspaz-3 seviyesinin artışına bağlı olarak dirençlilik mekanizmalarının aydınlatılmasına ışık tutulmuştur.

6. Birçok kanser türünde dirençlilik mekanizmaları tümörü daha agresif ve daha metastatik hale getirirken, etoposit direnci geliştiren bu hücre hattında metastatik aktivite gözlenmemiştir.

7. KAYNAKLAR

- ABEDIN, M.J., WANG, D., MCDONNELL, M.A., LEHMANN, U., KELEKAR, A. 2007. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ*, 14: 500-510.
- ALPSOY, A., YASA, S., GÜNDÜZ, U. 2014. Etoposide resistance in MCF-7 breast cancer cell line is marked by multiple mechanisms. *Biomed Pharmacother*, 68: 351–355.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. 2014. Cancer Facts & Figures 2014, *American Cancer Society*, Atlanta.
- ARDIZZONI, A., BONI, L., TISEO, M., FOSSELLA, F.V., SCHILLER, J.H., PAESMANS, M., RADOSAVLJEVIC, D., PACCAGNELLA, A., ZATLOUKAL, P., MAZZANTI, P., BISSET, D., ROSELL, R. 2007. Cisplatin-versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 99 (11): 847-857.
- ARRIAGADA, R., AUPERIN, A., BURDETT, S., HIGGINS, J.P., JOHNSON, D.H., LE CHEVALIER, T., LE PECHOUX, C., PARMAR, M.K., PIGNON, J.P., SOUHAMI, R.L., STEPHENS, R.J., STEWART, L.A., TIERNEY, J.F., TRIBODET, H., VAN MEERBEECK, J. 2010. Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *Lancet*, 375 (9722): 1267-1277.
- ARRIAGADA, R., BERGMAN, B., DUNANT, A., LE CHEVALIER, T., PIGNON, J.P., VANSTEENKISTE, J. 2004. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 350 (4): 351-360.
- AZAB, F., VALI, S., ABRAHAM, J., POTTER, N., MUZ, B., DE LA PUENTE, P., FIALA, M., PAASCH, J., SULTANA, Z., TYAGI, A., ABBASI, T., VIJ, R., AZAB, A.K. 2014. PI3KCA plays a major role in multiple myeloma and its inhibition with BYL719 decreases proliferation, synergizes with other therapies and overcomes stroma-induced resistance. *Brit J Hematol*, 165 (1): 89-101.
- AZZOLI, C.G., BAKER JR, S., TEMIN, S., PAO, W., ALIFF, T., BRAHMER, J., JOHNSON, D.H., LASKIN, J.L., MASTERS, G., MILTON, D., NORDQUIST, L., PFISTER, D.G., PIANTADOSI, S., SCHILLER, J.H., SMITH, R., SMITH, T.J., STRAWN, J.R., TRENT, D., GIACONNE, G. 2009. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Chemotherapy for Stage IV Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 27 (36): 6251-6266.

- BACH, P.B., CRAMER, L.D., WARREN, J.L., BEGG, C.B. 1999. Racial differences in the treatment of early-stage lung cancer. *N Engl J Med*, 341 (16) 1198-1205.
- BERRAK, Ö., AKKOÇ, Y., ARISAN, E.D., ÇOKER-GÜRKAN, A., OBAKAN-YERLİKAYA, P., PALAVAN-ÜNSAL N. 2016. The inhibition of PI3K and NFkB promoted curcumin-induced cell cycle arrest at G2/M via altering polyamine metabolism in Bcl-2 overexpressing MCF-7 breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 77: 150-160.
- BROMBERG, K.D., BURGİN, A.B., OSHEROFF, N. 2003. A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase IIalpha. *J Biol Chem*, 278: 7406-7412.
- BURDEN, D.A., OSHEROFF, N. 1998. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1400 (13): 139-154.
- CARMELET, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438 (15): 932-936.
- CASORELLI, I., BOSSA, C., BIGNAMİ, M. 2012. DNA damage and repair in human cancer: molecular mechanisms and contribution to therapy-related leukemias. *Int J Environ Res Public Health*, 9: 2636-2657.
- CHEN, Z., MA, T., HUANG, C., ZHANG, L., LV, X., XU, T., HU, T., LI, J. 2013. MiR-27a modulates the MDR1/P-glycoprotein expression by inhibiting FZD/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Signal*, 25: 2693-2701.
- CHENG, W., LIU, T., WAN, X., GAO, Y., WANG, H. 2012. MicroRNA-199a targets CD44 to suppress the tumorigenicity and multidrug resistance of ovarian cancer-initiating cells. *FEBS J*, 279: 2047-2059.
- CHUNG, H., KIM, M., KIM, J., PARK, N.H., SONG, Y.S., KANG, S.B., LEE, H.P. 2006. XRCC1 R399Q polymorphism is associated with response to platinum-based neoadjuvant chemotherapy in bulky cervical cancer. *Gyn Oncol*, 103: 1031-1037.
- CLARK, E.A., GOLUB, T.R., LANDER, E.S., HYNES, R.O. 2000. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, 406: 532-535.
- CLEGG, A., SCOTT, D.A., HEWITSON, P., SIDHU, M., WAUGH, N. 2002. Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Thorax*, 57 (1): 20-28.

- CODEGONI, A.M., BROGGINI, M., PITELLI, M.R., PANTAROTTO, M., TORRI, V., MANGIONI, C., D'INCALCI, M. 1997. Expression of genes of potential importance in the response to chemotherapy and DNA repair in patients with ovarian cancer. *Gyn Oncol*, 65: 130-137.
- DARCY, K., TIAN, C., REED, E. 2007. A gynecologic oncology group study of platinum–DNA adducts and excision repair cross complementation group 1 expression in optimal, stage III ovarian cancer treated with platinum-taxane chemotherapy. *Cancer Res*, 67(9): 4474-4481.
- DASARI, S., TCHOUNWOU, P.B. 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, 740: 364–378.
- De PAS, T., GIOVANNINI, M., RESCIGNO, M., CATANIA, C., TOFFALORIO, F., SPITALERI, G., DELMONTE, A., BARBERIS, M., SPAGGIARI, L., SOLLI, P., VERONESI, G., De BRAUD, F. 2012. Vaccines in non-small cell lung cancer: rationale, combination strategies and update on clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol*, 83 (3): 432-443.
- DEAN, M., RZHETSKY, R., ALLIKMETS, R. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*, 11: 1156-1166.
- DELBALDO, C., MICHVELS, S., SYZ, N., SORIA, J.C., LE CHAVALIER, T., PIGNON, J.P. 2004. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer, *J Clin Oncol*, 292 (4): 470-484.
- DI PASQUA, A.J., GOODISMAN, J., DABROWIAK J.C. 2013. Understanding how the platinum anticancer drug carboplatin works: From the bottle to the cell. *Inorganica Chim Acta*, 389: 29-35.
- DOUILLARD, J.Y., ROSELL, R., DE LENA, M., CARPAGNANO, F., RAMLAU, R., GONZALES LARRIBA, J.L., GRODZKI, T., PEREIRA, J.R., GROUMELLE, A.L., LORUSSO, V., CLARY, C., TORRES, A.J., DAHABREH, J., SOUQUET, P.J., ASTUDILLO, J., FOURNEL, P., ARTAL-CORTES, A., JASSEM, J., KOUBKOVA, L., HIS, P., RIGGI, M., HURTELOUP, P. 2006. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB–IIIA non-smallcell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet*, 7 (9): 719-727.
- FEDIER, A., SCHWARZ, V.A., WALT, H., CARPINI, R.D., HALLER, U., FINK, D. 2001. Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *Int J Cancer*, 93 (4): 571–576.

- FOJO, A., HAMILTON, T.C., YOUNG, R.C., OZOLS, R.F. 1987. Multidrug resistance in ovarian cancer. *Cancer*, 60: 2075-2080.
- FURUSE, K., FUKUOKA, M., KAWAHARA, M., NISHIKAWA, H., TAKADA, Y., KUDOH, S., KATAGAMI, N., ARIYOSHI, Y. 1999. Phase III Study of Concurrent Versus Sequential Thoracic Radiotherapy in Combination With Mitomycin, Vindesine, and Cisplatin in Unresectable Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 17 (9): 2692-2699.
- FUJII, T., TOYOOKA, S., ICHIMURA, K., FUJIWARA, Y., HOTTA, K., SOH, J. 2007. ERCC1 predicts the response of cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 08: 25.
- GILLET, J.P., EFFERTH, T., REMACLE, J. 2007. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochim Biophys Acta*, 1775: 237-262.
- GINSBERG, R.J., RUBINSTEIN, L.V. 1995. Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 60 (3): 615-623.
- GUO, X.L., HU, F., ZHANG, S.S., ZHAO, Q.D., ZONG, C., YE, F., GUO, S.W., ZHANG, J.W., LI, R., WU, M.C., WEI, L.X. 2014. Inhibition of p53 increases chemosensitivity to 5-FU in nutrient-deprived hepatocarcinoma cells by suppressing autophagy. *Cancer Lett*, 346: 378-384.
- HANAHAHAN, D. and WEINBERG, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- HANAHAHAN, D. and WEINBERG, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.
- HANDE, K.R. 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*, 34 (10): 1514-1521.
- HANDE, K.R. 2008. Topoisomerase II inhibitors. *Update Cancer Ther*, 3: 13-26.
- HANSEN, L.T., LUNDIN, C., SPANG-THOMSEN, M., PETERSEN, L.N., HELLEDAY, T. 2003. The role of RAD51 in etoposide (VP16) resistance in small cell lung cancer. *Int J Cancer*, 105: 472-479.
- HARRINGTON, K.J. 2015. The biology of cancer. *Medicine*, 44 (1): 1-5.
- HOADLEY, K.A., YAU, C., WOLF, D.M., CHERNIACK, A.D., TAMBORERO, D., NG, S., LEISERSON, M.D., NIU, B., McLELLAN, M.D., UZUNANGELOV, V., ZHANG, J., KANDOTH, C., AKBANI, R., SHEN, H., OMBERG, L., CHU,

- A., MARGOLIN, A.A., VAN'T VEER, L.J., LOPEZ-BIGAS, N., LAIRD, P.W., RAPHAEL, B.J., DING, L., ROBERTSON, A.G., BYERS, L.A., MILLS, G.B., WEINSTEIN, J.N., VAN WAES, C., CHEN, Z., COLLISSON, E.A., BENZ, C.C., PEROU, C.M., STUART, J.M. 2014. Multi-platform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. *Cell*, 158 (4): 929-944.
- HOTTA, K., MATSUO, K., UEOKA, H., KIURA, K., TABATA, M., TANIMOTO, M. 2004. Meta-analysis of randomized clinical trials comparing Cisplatin to Carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 22 (19): 3852-3859.
- HOWINGTON, J.A., BLUM, M.G., CHANG, A.C., BALEKIAN, A.A., MURTHY, S.C. 2013. Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer, diagnosis and management of lung cancer. *Chest*, 143 (5): 278-313.
- <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000087245-MMP2/cell>
- HWANG, I.G., AHN, M.J., PARK, B.B., PARK, S., LEE, S.C., AHN, Y.C., KIM, K., KIM, J., HAN, J.H., PARK, K., CHOI, Y.S., SHIM, Y.M., AHN, J.S. 2007. ERCC1 expression as a predictive marker in stage IIIA, N2 positive non-small lung cancer patients treated with neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy followed by surgery. *J Thorac Oncol*, 2: 367.
- IVANOVA, T., ZOURIDIS, H., WU, Y., CHENG, L.L., TAN, I.B., GOPALAKRISHNAN, V., OOI, C.H., LEE, J., QIN, L., WU, J., LEE, M., RHA, S.Y., HUANG, D., LIEM, N., YEOH, K.G., YONG, W.P., TEH, B.T., TAN, P. 2013. Integrated epigenomics identifies BMP4 as a modulator of cisplatin sensitivity in gastric cancer. *Gut*, 62: 22-33.
- JAESCHKE, H., FISHER, M.A., LAWSON J.A., SIMMONS C.A., FARHOOD, A., JONES D.A. 1998. Activation of Caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF- α -induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J Immunol*, 160 (7): 3480-3486.
- JOHNSON, B.E., RUSSELL, E., SIMMONS, A.M., PHELPS, R., STEINBERG, S.M., IHDE, D.C., GAZDAR, A.F. 1996. MYC family dna amplification in 126 tumor cell lines from patients with small cell lung cancer. *J Cell Biochem*, 24: 210-217.
- KAPLAN, E., GÜNDÜZ, U. 2012. Expression analysis of TOP2A, MSH2 and MLH1 genes in MCF-7 cells at different levels of etoposide resistance. *Biomed Pharmacother*, 66 (1): 29-35.
- KATO, H., ICHINOSE, Y., OHTA, M., HATA, E., TSUBOTA, N., TADA, H., WATANABE, Y., WADA, H., TSUBOI, M., HAMAJIMA, N., OHTA, M.

2004. A Randomized Trial of Adjuvant Chemotherapy with Uracil–Tegafur for Adenocarcinoma of the Lung. *N Engl J Med*, 350: 1713-1721.
- KAWASAKI, Y., XU, Z.Z., WANG, X., PARK, J.Y., ZHUANG, Z.Y., TAN, P.H., GAO, Y.J., ROY, K., CORFAS, G., LO, E.H., JI, R.R. 2008. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and latephase development of neuropathic pain. *Nat Med*, 14 (3): 331-336.
- KAWATA, H., KAMIAKITO, T., OMOTO, Y., MIYAZAKI, C., HAZUMI, Y., TANAKA, A. 2014. RhoC upregulation is correlated with reduced E-cadherin in human breast cancer specimens after chemotherapy and in human breast cancer MCF-7 cells. *Horm Cancer*, 5 (6): 414-423.
- KAYE, S.B. 1988. The multidrug resistance phenotype. *Br J Cancer*, 58: 691-694.
- KELLY, K., CROWLEY, J., BUNN, P.A., PRESANT, C.A., GREVSTAD, P.K., MOINPOUR, C.M., RAMSEY, S.D., WOZNIAK, A.J., WEISS, G.R., MOORE, D.F., ISRAEL, V.K., LIVINGSTON, R.B., GANDARA, D.R. 2001. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non--small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol*, 19 (13): 3210-3218.
- KONDO, K., FUJINO, H., TAKIZAWA, H., MIYOSHI, T., HIROSE, Y. NAGAO, T., NAKAGAWA, Y., TOBA, H., YOSHIDA, M., KENZAKI, K., SAKIYAMA, S., TANGOKU, A. 2007. ERCC1 expression is one of prognostic factors in completely resected non-small cell lung cancer patients with an adjuvant-platinum based chemotherapy. 12th World Conference on Lung Cancer, Seoul, Korea, *J Thorac Oncol*, 2 (8): 646.
- KÖKTÜRK, N., YEĞİN, D., ULUKAVAK ÇİFTÇİ, T., BİLGİN MULLAOĞLU, S., ÖZTÜRK, C. 2004. Akciğer Kanserlerinde Epidemiyolojik Özellikler Yıllar İçinde Değişim Gösteriyor mu? *Türk Toraks*, 5 (3), 137-142.
- LAGE, H. 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob*, 22: 188-199.
- LARRAYOZ, I.M., HUANG, J.D., LEE, J.W., PASCUAL, I., RODRIGUEZ, I.R. 2010. 7-Ketocholesterol-Induced Inflammation: Involvement of Multiple Kinase Signaling Pathways via NFkB but Independently of Reactive Oxygen Species Formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51 (10): 4942-4955.
- LEMJABBAR-ALAOUI, H., HUSSAN, O.U., YANG, Y.W., BUCHANAN, P. 2015. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta*, 1856: 189-210.

- LILENBAUM, R.C., HERNDON, J.E., LIST, M.A., DESCH, C., WATSON, M., MILLER, A.A., GRAZIANO, S.L., PERRY, M.C., SAVILLE, W., CHAHINIAN, P., WEEKS, J.C., HOLLAND, J.C., GREEN, M.R. 2005. Single-Agent Versus Combination Chemotherapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: The Cancer and Leukemia Group B (study 9730). *J Clin Oncol*, 23 (1): 190-196.
- LIN, Y., ZHANG, M., BARNES, P.F. 1998. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*, 66 (3): 1121-1126.
- LIU, L., NING, X., SUN, L., SHI, Y., HAN, S., GUO, C., CHEN, Y., SUN, S., YIN, F., WU, K., FAN, D. 2007. Involvement of MGr1-Ag/37LRp in the vincristine-induced HIF-1 expression in gastric cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 303: 151-160.
- LIU, L., NING, X., SUN, L., ZHANG, H., SHI, Y., GUO, C., HAN, S., LIU, J., SUN, S., HAN, Z., WU, K., FAN, D. 2008. Hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Sci*, 99: 121-128.
- LIU, L., SUN, L., ZHANG, H., LI, Z., NING, X., SHI, Y., GUO, C., HAN, S., WU, K., FAN, D. 2009. Hypoxia-mediated up-regulation of MGr1-Ag/37LRP in gastric cancers occurs via hypoxia-inducible-factor-1-dependent mechanism and contributes to drug resistance. *Int J Cancer*, 124: 1707-1715.
- LIU, W., ONDA, M., KIM, C., XIANG, L., WELDON, J.E., LEE, B., PASTAN, I. 2012. A recombinant immunotoxin engineering for increased stability by adding a disulfide bond has decreased immunogenicity. *Protein Eng Des Sel*, 25 (1): 1-6.
- LYNCH, T.J., BELL, D.W., SORDELLA, R., GURUBHAGAVATULA, R.A., OKIMOTO, R.A., BRANNIGAN, B.W., HARRIS, P.L., HASERLAT, S.M., SUPKO, J.G., HALUSKA, F.G., LOUIS, D.N., CHRISTIANI, D.C., SETTLEMAN, J., HABER, D.A. 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 350 (21): 2129-2139.
- MARTIN, V., SANCHEZ-SANCHEZ, A.M., HERRERA, F., GOMEZ-MANZANO, C., FUEYO, J., ALVAREZ-VEGA, M.A., ANTOLIN, I., RODRÍGUEZ, C. 2013. Melatonin-induced methylation of the ABCG2/BCRP promoter as a novel mechanism to overcome multidrug resistance in brain tumour stem cells. *Br J Cancer*, 108: 2005-2012.

- MERY, C.M., PAPPAS, A.N., BUENO, R., COLSON, Y.L., LINDEN, P., SUGARBAKER, D.J., JAKLITSCH, M.T. 2005. Similar long-term survival of elderly patients with non-small cell lung cancer treated with lobectomy or wedge resection within the surveillance, epidemiology, and end results database. *Chest*, 128 (1): 237-245.
- NARAZAKI, M., SEGARRA, M., HOU, X., TANAKA, T., LI, X., TOSATO, G. 2010. Oligo-guanosine nucleotide induces neuropilin-1 internalization in endothelial cells and inhibits angiogenesis. *Blood*, 116 (16): 3099-3107.
- NICHOLSON, D.W., ALI, A., THORNBERRY, N.A., VAILLANCOURT, J.P., DING, C.K., GALLANT, M., GAREAU, Y., GRIFFIN, P.R., LABELLE, M., LAZEBNIK, Y.A., MUNDEY, N.A., RAJU, S.M., SMULSON, M.E., YAMIN, T., YU, V.L., MILLER, D.K. 1995. Identificatin and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376: 37-43.
- O'DONOVAN, T.R., O'SULLIVAN, G.C., MCKENNA, S.L. 2011. Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics. *Autophagy*, 7: 509-524.
- O'NEILL, K.L., HUANG, K., ZHANG, J., CHEN, Y., LUO, X. 2016. Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane. *Genes Dev*, 30: 973-988.
- OEHME, I., LINKE, J.P., BOCK, B.C., MILDE, T., LODRINI, M., HARTENSTEIN, B., WIEGAND, I., ECKERT, C., ROTH, W., KOOL, M., KADEN, S., GRONE, H.J., SCHULTE, J.H., LINDNER, S., HAMACHER-BRADY, A., BRADY, N.R., DEUBZER, H.E., WITT, O. 2013. Histone deacetylase 10 promotes autophagy-mediated cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 2592-2601.
- OLAUSSEN, K., DUNANT, A., FOURET, P., BRAMBILLA, E., ANDRÉ, F., HADDAD, V., TARANCHON, E., FILIPITS, M., PIRKER, R., POPPER, H.H., STAHEL, R., SABATIER, L., PIGNON, J.P., TURSZ, T., LE CHEVALIER, T., SORIA, J.C. 2006. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*, 335: 983-991.
- ÖZGÜROĞLU, M. 2003. Akciğer kanserinde ilaç direnci. *Solunum*, 5 (3): 180-183.
- PAEZ, J.G., JANNE, P.A., LEE, J.C., TRACY, S., GREULICH, H., GABRIEL, S., HERMAN, P., KAYE, F.J., LINDEMAN, N., BOGGON, T.J., NAOKI, K., SASAKI, H., FUJII, Y., ECK, M.J., SELLERS, W., JOHNSON, B.E., MEYERSON, M. 2004. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 304 (5676): 1497-1500.

- PALLIS, A. 2012. A Review of treatment in Non-small cell lung cancer. *Eur Oncol Haematol*, 208-212.
- PAO, W., MILLER, V., ZAKOWSKI, M., DOHERTY, J., POLITI, K., SARKARIA, I., SINGH, B., HEELAN, R., RUSCH, V., FULTON, L., MARDIS, E., KUPFER, D., WILSON, R., KRIS, M., VARMUS, H. 2004. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 101 (36): 13306-13311.
- PAUL, D., CHANUKUPPA, V., REDDY, P.J., TAUNK, K., SRIVASTAVA, S., SANTRA, M.K., RAPOLE, S. 2016. Global proteomic profiling identifies etoposide chemoresistance markers in non-small cell lung carcinoma. *J Proteomics*, 138: 95-105.
- PAYNE, S., MILES, D. 2008. Mechanisms of anticancer drugs. Scott-Brown's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery 7Ed, pp. 34-46, Boca Raton, Florida.
- PIGNON, J.P., TRIBODET, H., SCAGLIOTTI, G.V., DOUILLARD, J.Y., SHEPHERD, F.A., STEPHENS, R.J., DUNANT, A., TORRI, V., ROSELL, R., SEYMOUR, L., SPIRO, S.G., ROLLAND, E., FOSSATI, R., AUBERT, D., DING, K., WALLER, D., LE CHEVALIER, T. 2008. Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation: A Pooled Analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol*, 26 (21): 3552-3559.
- RA, H.J., PARKS, W.C. 2007. Control of Matrix Metalloproteinase Catalytic Activity. *Matrix Biol*, 26 (8): 587-596.
- RIEGER, P.T. 2004. The biology of cancer genetics. *Seminars in Oncology Nursing*, 20 (3): 145-154.
- ROBERT, J., LARSEN, A.K. 1998. Drug resistance to topoisomerase II inhibitors. *Biochimie*, 80: 247-254.
- ROBINSON, L.A., RUCKDESCHEL, J.C., WAGNER, H.J., STEVENS, C.W. 2007. Treatment of non-small cell lung cancer-stage IIIA: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132 (3): 243-265.
- ROGERS, S.J., HARRINGTON, K.J., RHYS EVANS, P., O-CHAROENRAT, P., ECCLES, S.A. 2005. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 24: 47-69.

- ROWELL, N.P., WILLIAMS, C. 2001. Radical radiotherapy for stage I/II non-small cell lung cancer in patients not sufficiently fit for or declining surgery. *Cochrane Collaboration*, 1-39.
- SCAGLIOTTI, G.V., PARIKH, P., VON PAWEL, J., BIESMA, B., VANSTEENKISTE, J., MANEGOLD, C., SERWATOWSKI, P., GATZEMEIER, U., DIGUMARTI, R., ZUKIN, M., LEE, J.S., MELLEMGAAARD, A., PARK, K., PATIL, S., ROLSKI, J., GOKSEL, T., DE MARINIS, F., SIMMS, L., SUGARMAN, K.P., GANDARA, D. 2008. Phase III Study Comparing Cisplatin Plus Gemcitabine With Cisplatin Plus Pemetrexed in Chemotherapy-Naive Patients With Advanced-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 26 (21): 3543-3551.
- SCHAFFER, B.C., GILLET, J.P., PATEL, C., BAER, M.R., BATES, S.E., GOTTESMAN, M.M. 2012. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resist Update*, 15: 62-69.
- SCHILLER, J.H., HARRINGTON, D., BELANI, C.P., LANGER, C., SANDLER, A., KROOK, J., ZHU, J., JOHNSON, D. 2002. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 346 (2): 92-98.
- SCHNEIDER, E., HORTON, J.K., YANG, C., NAKAGAWA, M., COWAN, K.H. 1994. Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF-7 cell line selected for etoposide resistance. *Cancer Res*, 54: 152-158.
- SCOTT, W.J., HOWINGTON, J., FEIGENBERG, S., MOUSAS, B., PISTERS, K. 2007. Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132 (3): 234-242.
- SHANG, D., LIU, Y., LIU, Q., ZHANG, F., FENG, L., LV, W., TIAN, Y. 2009. Synergy of 5-aza-20-deoxycytidine (DAC) and paclitaxel in both androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines. *Cancer Lett*, 278: 82-87.
- SHANG, Y., ZHANG, Z., LIU, Z., FENG, B., REN, G., LI, K., ZHOU, L., SUN, Y., LI, M., ZHOU, J., AN, Y., WU, K., NIE, Y., FAN, D. 2013. MiR-508-5p regulates multidrug resistance of gastric cancer by targeting ABCB1 and ZNRD1. *Oncogene*, 33 (25): 3267-3276.
- SHAO, S., HUANG, X., WANG, Y., HE, S., XU, X., ZHU, X., YANG, X., DING, Z., YAO, L., HUANG, Y., WANG, C. 2014. A role for activator of G-protein signaling 3 (AGS3) in multiple myeloma. *Int J Hematol*, 99: 57-68.

- SHEN, D.W., POULIOT, L.M., HALL, M.D., GOTTESMAN, M.M. 2012. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev*, 64 (3): 706-721.
- SHER, T., GRACE, K., ADJEI, A.A. 2008. Small Cell Lung Cancer. *Mayo Clin Proc*, 83 (3): 355-367.
- SHTIVELMAN, E., HENSING, T., SIMON, G.R., DENNIS, P.A., OTTERSON, G.A., BUENO, R., SALGIA, R. 2014. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer. *Oncotarget*, 5 (6): 1392-1433.
- SIEGEL, R., MA, J., ZOU, Z., JEMAL, A. 2014. Cancer Statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 64: 9-29.
- SMITH, S., SU, D., RIGAULT DE LA LONGRAIS, I., SCHWARTZ, P., PUOPOLO, M., RUTHERFORD, T.J., MOR, G., YU, H., KATSAROS, D. 2007. ERCC1 genotype and phenotype in epithelial ovarian cancer identify patients likely to benefit from paclitaxel treatment in addition to platinum-based therapy. *J Clin Oncol*, 25: 5172-5179.
- SOHMA, I., FUJIWARA, Y., SUGITA, Y., YOSHIOKA, A., SHIRAKAWA, M., MOON, J.H., TAKIGUCHI, S., MIYATA, H., YAMASAKI, M., MORI, M., DOKI, Y. 2011. Parthenolide, An NF- κ B Inhibitor, Suppresses Tumor Growth and Enhances Response to Chemotherapy in Gastric Cancer. *Cancer Genomics Proteomics*, 8: 39-48.
- SRIVASTAVA, S., RAMDASS, B., NAGARAJAN, S., REHMAN, M., MUKHERJEE, G., KRISHNA, S. 2010. Notch1 regulates the functional contribution of RhoC to cervical carcinoma progression. *Br J Cancer*, 102: 196-205.
- STRANSKY, N., CERAMI, E., SCHALM, S., KIM, J.L., LENGAUER, C. 2014. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun*, 5: 4846.
- STRAUSS, G.M., HERNDON, J.E., MADDAUS, M.A., JOHNSTONE, D.W., JOHNSON, E.A., HARPOLE, D.H., GILLENWATER, H.H., WATSON, D.M., SUGARBAKER, D.J., SCHILSKY, R.L., VOKES, E.E., GREEN, M.R. 2008. Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *J Clin Oncol*, 26 (31): 5043-5051.
- SZAK, G., KIN, K., TO, W., POLG, O., ROBEY, R.W., BATES, S.E. 2009. Multidrug resistance mediated by MDR-ABC transporters. Springer, p. 1-20.

- TALMADGE, J.E. and FIDLER, I.J. 2010. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*, 70: 5649-5669.
- THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. 2014. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nat*, 511: 543-550.
- THOMAS, L.H., FRIEDLAND, J.S., SHARLAND, M., BECKER, S. 1998. Respiratory Syncytial Virus-Induced RANTES Production from Human Bronchial Epithelial Cells Is Dependent on Nuclear Factor- κ B Nuclear Binding and Is Inhibited by Adenovirus-Mediated Expression of Inhibitor of κ B α . *J Immun*, 161 (2): 1007-1016.
- TRAVIS, W.D., BRAMBILLA, E., RIELY, G.J. 2013. New Pathologic Classification of Lung Cancer: Relevance for Clinical Practice and Clinical Trials. *J Clin Oncol*, 31 (8): 992-1001.
- TRAVIS, W.D., TRAVIS, L.B., DEVESA, S.S. 1995. Lung cancer. *Cancer*. 75 (1): 191-202.
- TSUBOI, M., OHIRA, T., SAJI, H., MIYAJIMA, K., KAJIWARA, N., UCHIDA, O., USUDA, J., KATO, H. 2007. The present status of postoperative adjuvant chemotherapy for completely resected non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 13 (2): 73-77.
- VINOD, B.S., MALIEKAL T.T., ANTO, R.J. 2013. Phytochemicals as chemosensitizers: from molecular mechanism to clinical significance. *Antioxid Redox Signal*, 18: 1307-1348.
- WALKER, J.V., NITISS, J.L. 2002. DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Invest*, 20: 570-589.
- WALLER, D., PEAKE, M.D., STEPHENS, R.J., GOWER, N.H., MILROY, R., PARMAR, M.K., RUDD, R.M., SPIRO, S.G. 2004. Chemotherapy for patients with non-small cell lung cancer: the surgical setting of the Big Lung Trial. *Eur J Cardiothorac Surg*, 26 (1): 173-182.
- WANG, F., LI, T., ZHANG, B., LI, H., WU, Q., YANG, L., NIE, Y., WU, K., SHI, Y., FAN, D. 2013. MicroRNA-19a/b regulates multidrug resistance in human gastric cancer cells by targeting PTEN. *Biochem Biophys Res Commun*, 434: 688-694.
- WEBER, M.L. 2010. Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. *Cancer Lett*, 332: 304-312.

- WILLIAMSON, E.A., DAMIANI, L., LEITAO, A., HU, C., HATHAWAY, H., OPREA, T., SKLAR, L., SHAHEEN, M., BAUMAN, J., EANG, W., NICKOLOFF, J.A., LEE, S.H., HROMAS, R. 2012. Targeting the transposase domain of the DNA repair component Metnase to enhance chemotherapy. *Cancer Res*, 72: 6200-6208.
- WILSTERMANN, A.M., OSHEROFF, N. 2001. Base excision repair intermediates as topoisomerase II poisons. *J Biol Chem*, 276: 46290-46296.
- WINTON, T., LIVINGSTON, R., JOHNSON, D., RIGAS, J., JOHNSTON, M., BUTTS, C., CORMIER, Y., GOSS, G., INCULET, R., VALLIERES, E., FRY, W., BETHUNE, D., AYOUB, J., DING, K., SEYMOUR, L., GRAHAM, B., TSAO, M.S., GANDARA, D., KESLER, K., DEMMY, T., SHEPHERD, F. 2005. Vinorelbine plus Cisplatin vs. Observation in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 352: 2589-2597.
- WOESSNER, J.F. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, 5, 2145.
- WRAY, J., WILLIAMSON, E.A., ROYCE, M., SHAHEEN, M., BECK, B.D., LEE, S.H., NICKOLOFF, J.A., HROMAS, R. 2009b. Metnase mediates resistance to topoisomerase II inhibitors in breast cancer cells. *PLoS ONE*, 4: 5323.
- WRAY, J., WILLIAMSON, E.A., SHEEMA, S., LEE, S.H., LIBBY, E., WILLMAN, C.L., NICKOLOFF, J.A., HROMAS, R. 2009a. Metnase mediates chromosome decatenation in acute leukemia cells. *Blood*, 114: 1852-1858.
- WU, M., DING, H., FISHER, D.E. 2001. Apoptosis: Molecular Mechanisms. *eLS*, 1-8.
- WU, Q., YANG, Z., NIE, Y., SHI, Y., FAN, D. 2014. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches. *Cancer Lett*, 347: 159-166.
- XIA, L., ZHANG, D., DU, R., PAN, Y., ZHAO, L., SUN, S., HONG, L., LIU, J., FAN, D. 2008. MiR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. *Int J Cancer*, 123: 372-379.
- XIANG, X., WU, M., ZHANG, H., LI, J., LU, B., GUO, Y., ZHOU, T., GUO, H., PENG, R., LI, X., TIAN, Q., WANG, Y. 2015. Atg5 SiRNA inhibits autophagy and enhances norcantharidin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, 47 (4): 1321-1328.
- XUE, Z., YAN, H., LI, J., LIANG, S., CAI, X., CHEN, X., WU, Q., GAO, L., WU, K., NIE, Y., FAN, D. 2012. Identification of cancer stem cells in vincristine preconditioned SGC7901 gastric cancer cell line. *J Cell Biochem*, 113: 302-312.

- YANG, M., HUANG, J., PAN, H., JIN, J. 2008. Triptolide overcomes dexametharsone resistance and enhanced PS-341-induced apoptosis via PI3k/Akt/NF-kB pathways in human multiple myeloma cells. *Int J Mol Med*, 22 (4): 489-496.
- ZHANG, L., PICKARD, K., JENEI, V., BULLOCK, M.D., BRUCE, A., MITTER, R., KELLY, G., PARASKEVA, C., STREFFORD, J., PRIMROSE, J., THOMAS, G.J., PACKHAM, G., MIRNEZAMI, A.H. 2013. MiR-153 supports colorectal cancer progression via pleiotropic effects that enhance invasion and chemotherapeutic resistance. *Cancer Res*, 72: 6435-6447.
- ZHOU, W., CHRISTIANI, D.C. 2011. East meets West: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviors of lung cancer between East Asians and Caucasians. *Chin J Cancer*, 30 (5): 287-292.
- ZIEBARTH, A.J., NOWSHEEN, S., STEG, A.D., SHAH, M.M., KATRE, A.A., DOBBIN, Z.C., HAN, H.D., LOPEZ-BERESTEIN, G., SOOD, A.K., CONNER, M., YANG, E.S., LANDEN, C.N. 2013. Endoglin (CD105) contributes to platinum resistance and is a target for a tumor-specific therapy in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 19: 170-182.

ÖZGEÇMİŞ



Aykut KURUOĞLU 1989 yılında İzmir'de doğdu. İlk ve orta öğrenimi Ertuğrul Gazi İlköğretim okulunda, lise öğrenimini ise Balçova Salih Dede Lisesinde tamamladı. 2007 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2012 yılında Biyolog olarak mezun oldu. 2014 yılı, Ocak ayı itibari ile Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Eğitimine başladı.