



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜLTÜR ORTAMINDA FİBROBLASTLARIN VARLIĞINDA A-549  
AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTININ FARKLI KEMOTERAPİ  
İLAÇLARINA VERDİĞİ YANITIN ARAŞTIRILMASI**

**Didem KARAKAŞ**

Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE  
Prof. Dr. Engin ULUKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2013  
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Didem KARAKAŞ tarafından hazırlanan “Kültür Ortamında Fibroblastların Varlığında A-549 Akciğer Kanseri Hücre Hattının Farklı Kemoterapi İlaçlarına Verdiği Yanıtın Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman :** Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

**Başkan :** Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE  
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Prof. Dr. Engin ULUKAYA  
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**Üye:** Doç. Dr. Ferda ARI  
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Doç. Dr. Serap KASIMOĞULLARI (ÇELİKLER)  
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ  
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Ali Osman DEMİR**  
**Enstitü Müdürü**  
.././.....

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**26/07/2013**



**Didem KARAKAŞ**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KÜLTÜR ORTAMINDA FİBROBLASTLARIN VARLIĞINDA A-549 AKCİĞER  
KANSERİ HÜCRE HATTININ FARKLI KEMOTERAPİ İLAÇLARINA VERDİĞİ  
YANITIN ARAŞTIRILMASI

**Didem KARAKAŞ**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışmanlar:** Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE  
Prof. Dr. Engin Ulukaya

Akciğer kanseri günümüzde kadın ve erkeklerde en fazla ölüme neden olan kanser türüdür. Akciğer kanseri hastalarında beş yıllık sağkalım oranı %15'ten daha azdır ve tedavisinde yeni yaklaşımlara rağmen etkin bir başarı sağlanamamaktadır. Bu nedenle her geçen gün yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmektedir. Bu yaklaşımlardan biri de, kanser hücreleri ile birlikte tümör mikro çevresini de hedeflemektedir. Tümör mikro çevresi, tümöre pozitif ya da negatif katkı sağlayan stromal hücrelerden oluşmaktadır. Bu çalışmada, tümör mikro çevresi bileşenlerinden biri olan fibroblastlar ile A549 insan akciğer kanseri hücre hattının ko-kültür yöntemi ile etkileşimi sağlanmış ve bu etkileşimin A549 hücrelerinin kemoterapi yanıtı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak, fibroblast varlığında A549 hücrelerinin kemoterapi ilaçlarına yanıtında bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Akciğer kanseri, tümör mikro çevresi, fibroblast, ko-kültür

**2013, ix + 77 sayfa**

## **ABSTRACT**

MSc Thesis

### **INVESTIGATION OF THE RESPONSES OF LUNG CANCER CELLS TO DIFFERENT ANTICANCER DRUGS IN THE PRESENCE OF FIBROBLASTS GROWN IN CO-CULTURE**

**Didem KARAKAŞ**

Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisors:** Asst. Prof. Dr. Egemen DERE  
Prof. Dr. Engin Ulukaya

Lung cancer is the most common cause of cancer related death to date in both men and women. The overall five year survival rate for lung cancer is less than 15% and the outcome of patients is not satisfactory although new approaches introduced into the clinics. Thus, new treatment approaches are emerging. One of them is, targeting the tumor microenvironment besides the tumor cells. The tumor microenvironment consists of stromal cells that contributes positively or negatively to the tumor. In this study, the interaction between fibroblast, one of the major constituents of the microenvironment, and A549 human lung cancer cell line is provided by co-culture method and the effects of this interaction to the chemotherapeutic response is investigated in A549 cell line. As a result, it was determined that there is no differences in response of A549 cells to chemotherapy drugs in the presence of fibroblast.

**Keywords:** Lung cancer, tumor microenvironment, fibroblast, co-culture  
**2013, ix + 77 pages**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans süresince danışmanlığımı yapan, bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaşmaktan çekinmeyen ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE'ye,

Yüksek lisans tezimde yardımcı danışmanım olan, tez konumun seçilmesinden, deneylerin tamamlanmasına kadar her aşamada her daim yanımda olan, hem mesleğine, hem de hayata yaklaşımına her zaman saygı duyduğum ve örnek aldığım, bilgi ve deneyimleriyle yolumu aydınlatan ve ideallerim doğrultusunda ilerlememi sağlayanda değerli hocam sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Tüm çalışmalarımnda fikirlerinden ve deneyimlerinden yararlandığım, her ihtiyacım olduğunda güler yüzlerini esirgemedi yardımcı olan değerli hocalarım Doç. Dr. Ferda ARI ve Doç. Dr. Arzu Yılmaztepe ORAL'a,

Tez çalışmam boyunca moral ve desteklerini esirgemeyen, her konuda yardımcı olan ve birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım arkadaşlarım Mehmet SARIMAHMUT, Buse CEVATEMRE, Nazlıhan AZTOPAL, Merve ERKISA ve Şeyma AYDINLIK'a,

Beni bugünlere getiren, hem bu zorlu süreçte hem de hayatım boyunca yanımda olan, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, haklarını bir ömür ödeyemeyeceğim canım anneme ve babama, her zaman yanımda olduğunu hissettiren ve her koşulda destek olan, yalnız olmadığımı hissettiren biricik kardeşime

Çalışmam boyunca büyük bir sabır ve özveri ile yanımda olan, en zor zamanlarımda varlığı ve desteği ile güçlü durmamı sağlayan ve tüm bu sürecin tamamlanmasında en büyük destekçim olan Emre ZEYBEK'e,

SONSUZ TEŞEKKÜR EDERİM.

Didem KARAKAŞ

26/07/2013

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI</b> .....	i
<b>ÖZET</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>GİRİŞ</b> .....	1
<b>1. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	3
1.1.Akciğer Kanseri.....	3
1.1.1.Akciğer Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması.....	4
1.1.2.Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi.....	5
1.2.Apoptozis.....	7
1.2.1.Tümör mikro Çevresi ve Apoptozis.....	8
1.2.2.Apoptozisin İndüklenmesi.....	9
1.2.3.Apoptozis Sürecinde Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler.....	12
1.3.Tümör Mikro Çevresi.....	13
1.3.1.Tümör Mikroçevresi Temel Bileşenleri.....	17
1.3.1.1.EkstraselülerMatriks.....	18
1.3.3.2.Fibroblastlar.....	22
1.3.3.3.İmmün Hücreler.....	24
1.4.Ko-kültür yöntemi.....	25
1.5.Kemoterapi İlaçları.....	25
1.5.1. 5-Florourasil.....	26
1.5.2. Paklitakel.....	27
1.5.3. Doksetaksel.....	27
1.5.4.Etoposid.....	28
1.5.5. Vinorelbin.....	28
1.5.6. Cisplatin.....	29
1.5.7. Karboplatin.....	29
1.5.8. Gemsitabin.....	
<b>2.MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	31
2.1.Materyal.....	31
2.1.1.Kimyasal Maddeler.....	31
2.1.2.Sarf Malzemeler.....	31
2.1.3.Cihazlar.....	32
2.2.Yöntem.....	33
2.2.1.Kemoterapötiklerin Hazırlanması.....	33
2.2.2.Akciğer Kanseri Hasta Dokusundan Fibroblast İzolasyonu.....	33
2.2.3.Hücre Kültürü.....	33
2.2.3.1.Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması.....	33
2.2.3.2.Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması.....	34
2.2.3.3.Hücre Soylarının Pasajlanması.....	34
2.2.3.4.Hücre Soylarının Stoklanması.....	34
2.2.3.5.Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı.....	35
2.2.4.MTT (Metiltiazotetrazolium) Canlılık Metodu.....	35

2.2.5. ATP (Adenozintrifosfat) Canlılık Metodu.....	37
2.2.6.xCELLigence Teknolojisi ile Gerçek Zamanlı Empedans Analizi.....	47
2.2.7.Hoechst 33342, Propidiyum İyodür (PI) ile İkili Boyama yöntemi.....	52
2.2.8.Anneksin-V-FITC Boyama Yöntemi.....	56
<b>3.BULGULAR.....</b>	<b>45</b>
3.1.MTT ve ATP Canlılık Testi Bulguları.....	45
3.2. Gerçek zamanlı xCELLigence empedans analizi bulguları.....	62
3.3.Hoechst 33342, Propidium İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi Bulguları.	63
3.4.Anneksin-V-FITC BoyamaMetoduBulguları.....	65
<b>4.TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>59</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>62</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>77</b>



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	:Apoptosis indükleyici faktör (Apoptosisinducingfactor)
ATP	:Adenozintrifosfat (Adenosinetriphosphate)
BM	:Bazalmembran
CAF	:Karsinoma ile ilişkili fibroblast (CarcinomaAssociatedFibroblast)
DAMP	: Hasar ile ilişkili molekül (DamageAssociatedMoleculePattern)
DD	:Ölüm alanı (Death domain)
DISC	:Ölüm indükleyici sinyal kompleksi (Deathinducingsignallingcomplex)
DMEM	:Dulbecco'sModifiedEagle'sMedium
DMSO	:Dimetilsülfoksit (Dimethylsulfoxide)
dTMP	:Deoksitimidinmonofosfat
ECM	:Ekstraselülermatriks (ExtraCellularMatrix)
FADD	:Fas ilişkili ölüm alanı (Fas associateddeath domain)
FAP	:Fibroblast Aktivasyon Proteini
FBS	:Fetalsığırserumu (Fetalbovine serum)
HGF	:Hepatosit büyüme faktörü (HepatocyteGrowthFactor)
IL-8	:Interlökin-8
KHAK	:Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	:Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
MMP	:Matriksmetalloproteinaz
MOMP	:Mitokondri dış membranpermeabilizasyonu (mitochondrialoutermembranpermeabilization)
MTT	:3-(4,5-dimetiltiyazol -2)-2,5-difenil tetrazolyumbromid
PBS	:Fosfat tuz tamponu (Phosphatebufferedsaline)
PI	:Propidyum iyodür (Propidium iodide)
SDS	:Sodyum dodesil sülfat (Sodiumdodecylsulfate)
TAM	:Tümör ile ilişkili makrofaj(TumorAssociatedMacrophage)
TGF- $\beta$	:Transforme büyüme faktörü- $\beta$ (Transforminggrowthfactor)
TNF	:Tümörnekrozis faktör
TS	:Timidilatsentaz
VEGF-A	:Vaskülerendotelial büyüme faktörü-A (VascularEndothelialGrowthFactor-A)
5-FU	:5-Florourasil

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil.1.1. Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması.....	5
Şekil.1.2.Apoptozisin indüklenmesi.....	12
Şekil.1.3.Apoptotik hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler.....	13
Şekil.1.4.Tümör mikro çevresihücreleri.....	14
Şekil.1.5. ECM yapısı ve bileşenleri.....	17
Şekil.1.6. Tümör mikro çevresine ait CAF türleri, salgıladıkları faktörler ve tümör üzerine etkileri.....	19
Şekil.1.7.CAF'ların meydana gelme yolları.....	20
Şekil.1.8.TAM'ların oluşma süreci ve tümör üzerine etkileri.....	24
Şekil.1.9.Ko-kültür sistemi şeması.....	25
Şekil.1.10. 5-Florourasilin kimyasal yapısı .....	26
Şekil.1.11.Paklitakselin kimyasal yapısı.....	26
Şekil.1.12.Dosetakselin kimyasal yapısı.....	27
Şekil.1.13.Etoposidin kimyasal yapısı.....	27
Şekil.1.14. Vinorelbinin kimyasal yapısı.....	28
Şekil.1.15. Cisplatinin kimyasal yapısı.....	29
Şekil.1.16.Karboplatinin kimyasal yapısı.....	29
Şekil.1.17.Gemsitabinin kimyasal yapısı.....	30
Şekil.2.1.MTT reaksiyon şeması.....	35
Şekil.2.2.Lüsiferinin $Mg^{+2}$ iyonları ve ATP varlığında lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olması ile ışık (luminesans sinyal) oluşumu.....	38
Şekil.2.3. Empedans ölçüm şeması.....	40
Şekil.3.1. Farklı kemoterapi ilaçlarının 100 TDC dozuile muamele edilen fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği.....	45
Şekil.3.2.Farklı kemoterapi ilaçlarının 100 TDC dozu ile muamele edilen A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda canlılık yüzdelerinin grafiği.....	46
Şekil.3.3.1. A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda dosetaksele yanıtının xCELLigence grafiği.....	47
Şekil.3.3.2. A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda paklitaksele yanıtının xCELLigence grafiği.....	48

<b>Şekil.3.3.3.</b> A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda cisplatine yanıtının xCELLigence grafiği.....	<b>48</b>
<b>Şekil.3.3.4.</b> A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda karboplatine yanıtının xCELLigence grafiği.....	<b>49</b>
<b>Şekil.3.3.5.</b> A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda etoposide yanıtının xCELLigence grafiği.....	<b>50</b>
<b>Şekil.3.3.6.</b> A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda 5-FU'ya yanıtının xCELLigence grafiği.....	<b>50</b>
<b>Şekil.3.3.7.</b> A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda vinorelbineyanıtınınxCELLigence grafiği.....	<b>51</b>
<b>Şekil.3.3.8.</b> A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda gemsitabinyanıtınınxCELLigence grafiği.....	<b>52</b>
<b>Şekil.3.5.</b> 100 TDC dozlarında kemoterapötiklerin uygulandığı fibroblast hücrelerinin ilaçlarla 48 saat muamelesi sonrasındaki Hoechst 33342 ve PI boyama görüntüleri.....	<b>55</b>
<b>Şekil.3.6.</b> 100 TDC dozlarında kemoterapötiklerin uygulandığı A-549 hücrelerinin 24 saatlik muamele sonrasındaki Hoechst33342, Anneksin V-FITC ve PI boyama görüntüleri.....	<b>58</b>

## **GİRİŞ**

Günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biri olan akciğer kanseri, hem kadınlarda hem de erkeklerde en sık ölüme neden olan kanser türüdür (Greenlee ve ark. 2000, Roberts ve ark. 2003, Parkin ve ark. 2005).

Dünyada her yıl akciğer kanseri sebebiyle bir milyondan fazla kişi ölmektedir. Tüm dünyada 1985'ten beri, akciğer kanseri vakalarının sayısında erkeklerde %44, kadınlarda %76 artış olduğu belirlenmiştir (Parkin ve ark. 2005). Diğer kanser tiplerinde yıllar geçtikçe ölümler azalırken, akciğer kanserine bağlı ölümlerde ise 3 kat artış saptanmıştır (Yurdakul ve ark. 2002). Akciğer kanserinin prognozu, diğer kanser tiplerine göre daha kötüdür ve beş yıllık sağkalım oranı %15'ten daha azdır (Bunn 2002).

Kanser süreci, hücrelerin tek başına performansından ziyade hücreler topluluğu sürecidir. Kanser hücreleri bu süreçte malign dönüşümlerine katkı sağlayabilen normal hücreler ile birlikte rol alır. Tümör mikro çevresinde yer alan bu destekleyici hücreler arasında, stromal fibroblastlar, tümörün içine sızmış makrofajlar, kan ve lenf damar ağları ve ekstraselüler matriks sayılabilir. Normal hücreler tümöre pozitif ya da negatif katkı sağlayabilir. Bu hücreler kanser hücreleri tarafından çeşitli büyüme faktörleri, kemokinler ve proliferasyon ile metastaz süreçlerini arttıran matriks parçalayıcı enzimleri üretecek şekilde modifiye edilebilir (Joyce 2005). Bu nedenle, etkin bir kanser tedavisi için kanser hücreleri ile birlikte tümör mikro çevresinin de hedeflenmesi akılcı bir yaklaşımdır.

Tümör mikro çevresi hücrelerinden olan fibroblastlar normal koşullarda inaktif, düşük proliferasyon hızı ve minimum metabolik aktiviteye sahip hücrelerdir. Kanser sürecinde bu hücreler aktif hale gelir ve yüksek proliferatif aktivite kazanır. Aktifleşmiş bu fibroblastlar stromal hücreler ile kanser hücreleri arasındaki parakrin sinyal yolağında anahtar düzenleyici olarak görev alır (Lorusso ve Ruegg 2008, Polyak ve Kalluri 2010, Räsänen ve Vaheri 2010).

Bu bilgilerden yola çıkarak, bu çalışma A549 insan akciğer kanseri hücre hattı ile akciğer kanseri dokusundan izole edilen fibroblastların ko-kültür yöntemi ile indirekt etkileşimini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Bu amaçla A549 hücre hattının fibroblastlar ile ko-kültür yöntemi ile indirekt etkileşimi sağlanarak ve ortamda fibroblast varlığının A549 hücrelerinin kemoterapi ilaçlarına verdiği yanıtı değiştirip değiştirmediği incelenmiştir. A549 hücrelerine 8 farklı kemoterapi ilacı uygulanarak (dozetaksel, paklitaksel, cisplatin, karboplatin, etoposid, 5-florourasil, vinorelbin, gemesitabin) ortamda fibroblast varlığının ilaçların A549 hücreleri üzerindeki etkilerini değiştirip değiştirmediği incelenmiştir. Dolayısıyla bu çalışma, A549 akciğer kanseri hücre hattı ile akciğer dokusuna ait fibroblastların indirekt etkileşimini sağlayarak bir nevi tümör mikro çevresini taklit etmeyi amaçlamaktadır.

## **1.KAYNAK ÖZETLERİ**

### **1.1.Akciğer Kanseri**

Akciğer kanseri, yirminci yüzyılın başlarında ender görülen bir hastalık iken, günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir ve dünya genelinde kanser nedenli ölümlerin başında yer almaktadır (Greenlee ve ark. 2000, Roberts ve ark. 2003). Kalp hastalıklarından sonra genel ölüm nedenleri arasında ikinci sırayı alan akciğer kanseri, tüm kanser ölümlerinin %28'ini oluşturmaktadır (Bozkurt ve ark. 2004).

Akciğer kanseri kötü prognozlu bir hastalıktır ve tedavi sonrası 5 yıllık sağ kalım oranı %15'den daha azdır (Hirsch ve ark. 2001). Küresel insidansı her yıl %0,5 oranında artan akciğer kanseri 2001 yılında dünya genelinde 1 milyondan fazla kişinin ölümüne neden olmuştur (Spiro ve Porter 2002).

Akciğer kanseri erkeklerde ve kadınlarda tüm kanserler arasında ikinci en sık görülen kanser türüdür ve her iki cinste en sık ölüme neden olan kanser türüdür (Parkin ve ark. 2005). Günümüzde hem kadınlarda hem de erkeklerde kanser ölümlerinin yarısından akciğer kanseri sorumludur (Jemal ve ark. 2008). 2006 yılında Amerika'da yayınlanan akciğer kanseri raporuna göre; akciğer kanseri erkeklerde prostat kanserine kıyasla 3 kat daha fazla öldürücüyken, kadınlarda ise meme kanserine kıyasla yaklaşık 2 kat daha öldürücüdür. 2005 yılında yaklaşık 172,570 hasta akciğer kanseri tanısı almıştır ve bu hastaların 163,510 kişisi hayatını kaybetmiştir (Anonim 2006a).

Akciğer kanseri insidansı coğrafik varyasyon göstermektedir ve en yaygın olarak gelişmiş ülkelerde görülürken, Afrika gibi gelişmekte olan ülkelerde insidans daha düşüktür (Gilliland ve Samet 1994).

Akciğer kanseri, etiyolojisinde çok sayıda faktörün rol oynadığı bir hastalıktır. Etiyolojik faktörlerin başında; sigara, hava kirliliği, çevresel karsinojenler, diyet, geçirilmiş akciğer hastalıkları, genetik ve immünolojik faktörler ve viral enfeksiyonlar gelmektedir. Akciğer kanseri hastalarının birinci derece yakınlarında kanser riski artmaktadır (Anonim 2006b, Alberg ve Samet 2003).

Akciğer kanseri gelişiminden %94 oranında sigara sorumludur. Sigara içen kişilerde, içmeyenlere kıyasla akciğer kanseri riski 24-36 kat artmıştır.

Sigara içme süresi, sigaranın türü, içilen sigara sayısı ve sigara başlama yaşı akciğer kanseri gelişme riskini etkileyen faktörler arasındadır (Halilçolar ve ark 1999). Ayrıca, pasif içiciliğin akciğer kanseri riskini %15-25 oranında arttırdığı tahmin edilmektedir (Boffetta ve ark. 1998, Zhong ve ark. 2000, Fontham ve ark. 1994).

Asbest, bazı metaller (nikel, arsenik, kadmiyum vb.), radon ve iyonize radyasyona mesleki maruziyet riski arttırdığı bilinen faktörler arasındadır (Saracci ve ark. 1994). Özellikle asbest, arsenik ve radonun akciğer kanseri riskini sigara ile sinerjistik olarak arttırabileceği öne sürülmektedir (Anonim 1998, Anonim 1987). Akciğer kanserine neden olan diğer dışsal etmenler arasında ise kromatlar, klorometil eterler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar sayılabilir (Samet ve ark 1989, Coultas ve Samet 1992).

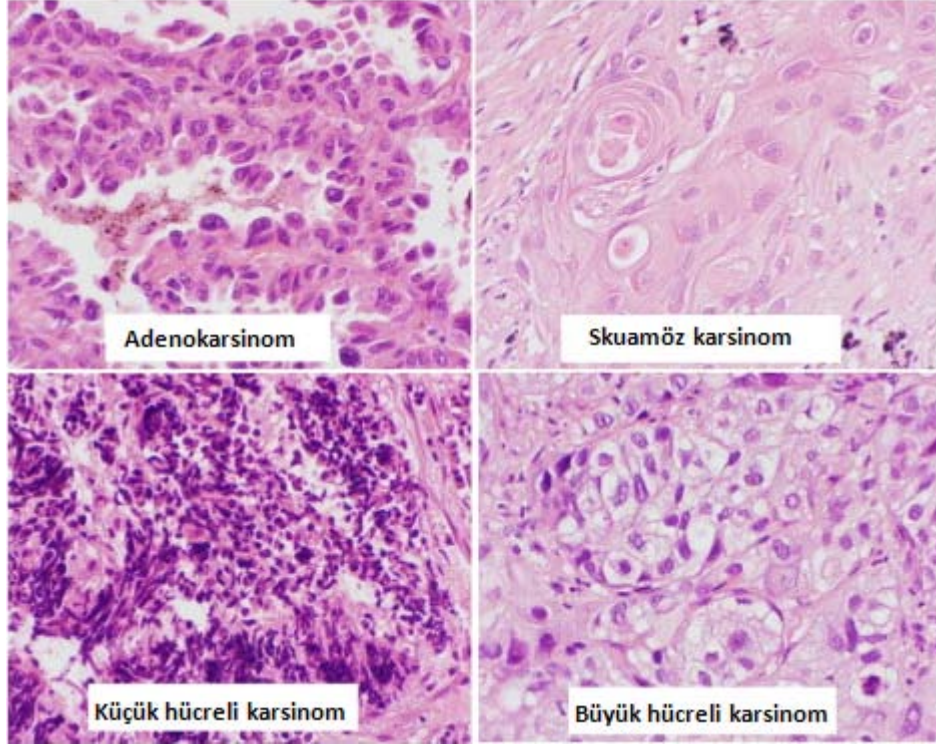
Akciğer kanseri, insidansı yaşla artan bir hastalık olup, hastaların %95'ini 50-70 yaş aralığındaki kişiler oluşturmaktadır (Halilçolar ve ark. 1999) ve 50 yaş altındaki kişilerde hastalığın görülme oranı %5-10'dur (Spiro ve Porter 2002, Radzikowska ve ark. 2001). 50 yaş altındaki hasta grubunda genellikle aile öyküsü bulunmaktadır (Spiro ve Porter 2002). Ayrıca, akciğer tüberkülozu geçiren olgularda akciğer kanseri gelişme riski 8 kat artmıştır (Tatar ve ark. 2000). Suçlanan genetik faktörlerden biri P 450 enzim sisteminde yer alan artmış aril hidrokarbon hidroksilaz enzim aktivitesidir ve bu artmış aktivite akciğer kanseri riskini 8 kat arttırmaktadır (Bilgel 2001).

Akciğer kanserinde diyetin %5 oranında etkili olduğu ileri sürülmektedir (Yesner ve ark. 1993). Akciğer kanseri ve diyet arasındaki ilişkiyi bu gösteren çalışmalar, genellikle antioksidan içerikli besinler yönünden zengin gıdalarla beslenen kişilerde akciğer kanseri riskinin azalması ile ilgilidir (Bouchardy ve ark. 2001).  $\beta$  karoten (provitamin A) ve A vitamini bakımından fakir diyet akciğer kanseri riskini arttırırken, özellikle vitamin E ve selenyumun ise antioksidan etkileriyle kanser riskini azalttığı ifade edilmektedir. Ayrıca yeşil çay da koruyucu etki göstermektedir (İtil 2000).

### **1.1.1. Akciğer Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması**

Akciğer kanserinin histolojik kriterler baz alınarak sınıflandırılması klinik yaklaşım ve hastalığın prognozu açısından önemlidir. Akciğer kanseri genel olarak 4 ana histolojik sınıfa ayrılabilir (Şekil 1.1). Bunlar; skuamöz hücre karsinomu, adenokarsinom, küçük hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomdur (Travis ve ark. 2004).

Akciğer kanseri birçok alt gruba ayrılrsa da, histolojik olarak en önemli fark Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) arasındadır. İki kanser alt türü arasındaki bu ayrım, klinikteki farklılıkları, metastatik yetenekleri ve tedaviye yanıtlarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Travis 2011).



**Şekil 1.1.** Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması (Motadi ve ark. 2007)

KHAK, kötü klinik seyirle giden ilerleyici bir tümördür. Yaygın evrede tedavisiz sağkalım ortalama 1-3 aydır. Fakat kemoterapi ve radyoterapiye çok iyi yanıt vermektedir (Aygenel 2005).

KHDAK için tedavi yaklaşımları ise cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve fotodinamik terapiyi kapsamaktadır, ancak tüm bu tedavi yaklaşımları genel olarak başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (Yang ve ark. 2005). Hastalığın 4. evresindeki bir KHDAK hastasının 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %1 iken, ortalama sağkalım süresi de yaklaşık 7 aydır (Jeremic ve ark. 2003, Vallieres 2007).

### **1.1.2. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi**

Akciğer kanseri, birçok sayısal kromozomal anomali (anöploidi) ile delesyonlar ve nonresiprokal translokasyonları kapsayan ve yapısal sitogenetik anomalileri barındıran bir hastalıktır (Fong ve ark. 1999).



Yapılan moleküler çalışmalar ile onkogenler, tümör supressör genleri ve DNA tamirinden sorumlu genlerde meydana gelen bazı değişikliklerin akciğer kanseri ile olan ilişkisi ortaya konulmuştur. 3 ve 11. kromozomların kısa kolundaki DNA sekans kayıpları, Myc ailesi (C-Myc, N-Myc ve L-Myc), Ras ailesi (K-ras, H-Ras, N-Ras) ve p53 tümör supresör genlerin amplifikasyonu kanser gelişiminde genetik faktörler olarak rol oynarlar (Economou ve ark. 1994, Rom ve ark. 2000, Alberg ve Samet 2003, Lynch ve ark. 2004).

p53 proteini TP53 geni tarafından kodlanan bir proteindir (Matlashewski ve ark. 1984). Genom mutasyonlarını önleyerek genomun stabilitesini koruyan ve bu nedenle “genomun koruyucusu” olarak adlandırılan p53, çok hücreli organizmalarda kritik öneme sahiptir. p53, hücre döngüsünü düzenler ve kansere karşı koruyucu olarak tümör baskılayıcı bir görev yapar (Read ve Strachan 1999). KHDAK'lerinin %50'sinde p53 mutasyona uğramış haldedir (Rom ve ark. 2000). p53 proteini hücre döngüsünü G1/S fazında inhibe eden bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. p53 mutasyona uğradığında hücre döngüsü süreci durmaksızın devam eder, dolayısıyla hücre proliferasyonunda artış meydana gelir. Ayrıca p53, pro-apoptotik bir protein olan Bax'ı indükleyerek apoptozise katkıda bulunabilir (Prives 1998).

K-Ras geni tarafından kodlanan K-Ras proteini normal doku sinyalizasyonunda esansiyel rol oynar ve bu gende meydana gelen mutasyonlar birçok kanser gelişiminde esansiyeldir (Kranenburg 2005). K-Ras mutasyonları akciğer kanserinin erken olaylarından biri olarak kabul edilmektedir ve akciğer adenokarsinomlarının üçte birinin erken aşamalarında K-Ras mutasyonu görülmektedir (Rodenhuis ve ark. 1987). KHDAK'lerinin %15-50'sinde görülen K-Ras mutasyonu sağkalım süresinde azalma, erken relaps ve kötü prognoz ile ilişkilidir (Groeger ve ark. 1997, Lecture 1996, Jacobson 1999, Fong ve ark. 1999, Spivack ve ark. 1997, Mabry 1998).

Myc genleri, hücre proliferasyonunda, farklılaşmasında ve DNA sentezinin başlatılmasında rol alan üç fosfoproteini kodlar. Bu fosfoproteinler C-Myc, N-Myc ve L-Myc'dir (Mabry 1998). Amplifikasyon ve transkripsiyonel bozukluk ile onkogen halini alan Myc genleri KHDAK'lerinin % 8-20'sinde aktive hale gelir (Köktürk ve ark 2003). C-Myc amplifikasyonu gerçekleşen hücrelerde büyüme faktörlerine gereksinim azalır, hücre siklusunda G1 fazı süresi kısalır ve bunun sonucunda proliferasyon artar.

C-Myc tümör büyüme hızında artış ve sağkalım süresinde kısalma ile ilişkilidir (Groeger ve ark. 1997, Mabry 1998, Fong ve ark. 1999).

Nöral hücre adezyon molekülü (NCAM) nöronal dokulardaki esas hücre-hücre kontakt proteini ve KHDAK hastalarının %20-30'u bu molekülü eksprese eder (Broers ve Ramaekers 1994). Kibbelaar ve ark., yaptıkları çalışma ile NCAM eksprese eden KHDAK hastalarının, bu molekülü eksprese etmeyen hastalara kıyasla belirgin oranda daha kısa sağkalım süresine sahip olduklarını göstermişlerdir (Kibbelaar ve ark. 1991)

p16, hücre döngüsünde G1-S geçişini kontrol eden p16-siklin D1-Cdk4-Rb yolağının bir parçasıdır. Hücre döngüsü düzenleyicisi bu kritik yolak akciğer kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanser türünde değişmiş ya da mutasyona uğramış haldedir (Fong ve ark. 2003). p16/pRb ve p53 yollarında meydana gelen değişiklikler KHDAK hücre hatlarında artmış proliferasyona neden olmuşlardır ve bu durum 5 yıl daha kısa yaşam süresi ve agresif tümör fenotipi ile ilişkilidir (Michalides ve ark. 1998).

## **1.2.Apoptozis**

Çok hücreli organizmalarda homeostazın düzenlenmesi yeni hücrelerin proliferasyonunun kontrolünün yanı sıra istenmeyen ya da hasarlı hücrelerin de yok edilmesini gerektirir (Messmer ve Pfeilschifter 2000). Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (Hıkım ve ark. 1995, Erdoğan 2003).

Köken olarak "apo-toe-sis" kelimesinden türetilen apoptozis terimi eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir (Touchette ve Fogle 1991).Çok hücreli organizmalarda hasarlanmış ve ihtiyaç duyulmayan hücrelerin yok edilmesine olanak sağlayan ve hücre intiharının morfolojik olarak farklı bir şekli olan apoptozis; hastalık ve sağlıkta esas olarak rol oynayan ve evrimsel olarak korunmuş bir hücre ölüm modudur (Jacobson ve ark. 1997, Fadeel ve ark. 1999, Dickens ve ark. 2012).

Apoptozis ile hücre ölümü, enerji kullanılarak hücresel yaralanma ve enflamasyon olmaksızın, ustaca gerçekleştirilir (Guimaraes ve Linden 2004). Embriyonik gelişimde ve yetişkin dokuların devamlılığında önemli rol oynayan apoptozis dengesinin bozulması kanser oluşumu, nörodejeneratif hastalıklar ve otoimmün hastalıklar gibi pek çok hastalık sürecine katkı sağlar (Dickens ve ark. 2012).

Hücre ölümü tesadüfi olarak gerçekleşirse bu süreç kontrolsüz hücre parçalanması ve ardından inflamatuvar yanıtla sonuçlanır. Bu şekildeki tesadüfi hücre ölümü “nekroz” olarak adlandırılır. Apoptotik hücre ölümü ise nekrozdan farklı bir ölüm modu olup, nükleer kondensasyon ve nükleer fragmentasyon ile karakterizedir. Bazı hücrelerde apoptozis sürecinde apoptotik cisimler de oluşur. Apoptozis sürecinde inflamatuvar yanıt oluşmaz çünkü apoptotik hücreler ya da cisimler, makrofajlar ya da dendritik hücreler gibi fagositik hücreler tarafından yok edilirler (Messmer ve Pfeilschifter 2000).

Apoptozis sürecinde gerçekleşen ana morfolojik değişiklik nükleusun yoğunlaşması ve ardından parçalara ayrılmasıdır (nükleer fragmentasyon) (Galle 1997). Hücre DNA’sı internükleozomal bölgelerden 180-200 baz çifti ya da katları şeklinde ayrılır ve bu durum agaroz jel elektroforezinde “ladder pattern” olarak adlandırılan merdiven görüntüsünün oluşumuna neden olur (Walker ve ark.1999).

### **1.2.1.Tümör mikro çevresi ve apoptozis**

Tümör mikroçevresi tarafından salgılanan faktörlerin tümör gelişimine katkı sağladığını ifade eden pek çok çalışma mevcuttur. Bu faktörlerin tümör gelişimini destekleme özelliğinin yanı sıra, apoptozisi baskılayarak kanser hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda buldukları düşünülmektedir.

Tümöral özellikte olmayan stromal hücreler tarafından salgılanan çözünebilir faktörlerden olan interlökin-6’nın tümörün hayatta kalmasına katkı sağladığı ve apoptozisi baskıladığı düşünülmektedir (Dalton 1999). Lotem ve Sachs (1992) yaptıkları çalışmada interlökin-6 ve diğer büyüme faktörlerinin bazı kemoterapötik ilaçlar tarafından indüklenen apoptozisi inhibe ettiğini ifade etmişlerdir (Lotem ve Sachs 1992). Ayrıca başka bazı çalışmalar ile interlökin-6’nın deksametazon, D3 vitamini ve Fas antagonisti antikorlar tarafından indüklenen apoptozise karşı da koruduğu belirtilmiştir (Hardin ve ark. 1991, Puthier ve ark. 1996).

Ek olarak, ekstraselüler matriks ligandlarının tümör mikroçevresine bağlanması integrin gibi hücre adezyon moleküllerini aktive edebilir ve bu etkileşim sonucu, ilaç ile indüklenen apoptozisi baskılayıcı sinyal iletileri aktive edebilir (Dalton 1999).Sethi ve ark. yaptıkları çalışmada  $\beta 1$  integrinin küçük hücreli akciğer kanserinde , hücreleri kemoterapi ile indüklenen apoptozise karşı koruduğunu ifade etmişlerdir (Sethi ve ark. 1999).

Mikro çevreye ait hücrelerin, tümör hücrelerinin apoptozisi üzerine etkisi olduğunu gösteren bazı çalışmalar mevcuttur. Olumi ve ark. yaptıkları çalışmada pankreatik fibroblastlar ile prostatik epitelyal hücre olan LNCaP zenograflarının kombinasyonu sonucu in vivo deneylerde daha büyük tümör oluşumu ve düşük apoptozis indeksi olduğunu belirlemiştir. Öte yandan, LNCaP zenografları tek başına kullanıldığında daha küçük tümör oluşumu ve yüksek apoptotik indeks belirlemiştir. Buradan yola çıkarak prostatik fibroblastların apoptozisi yavaşlatarak tümör gelişimine katkı sağladığını ifade etmişlerdir (Olumi ve ark. 1998). Kaler ve ark. ise 2010 yılında, HCT116, Hke-3, SW480 kolorektal karsinom hücre hatları ve THP1 insan monosit hücre hattını kullanarak yaptıkları çalışma sonucunda makrofaj kökenli interlökin-1 $\beta$ 'nin kolon kanserlerinde TRAIL ile indüklenen apoptozisi inhibe ettiğini ifade etmişlerdir (Kaler ve ark. 2009).

### **1.2.2. Apoptozisin İndüklenmesi**

Hücrelerde apoptozisin gerçekleşebilmesi için hücre içi ya da dışından gelen bir uyarın ile ilgili genetik mekanizmanın harekete geçmesi gerekmektedir. Hücre içi uyarınlar, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, Tümör Nekrozis Faktör (TNF), tümör baskılayıcı bir gen olan p53'ün DNA hasarı ile aktive olması, viral/bakteriyel enfeksiyonlar ve onkojenler olarak sayılabilir. Hücre dışı uyarınlar ise; hücre ölüm proteinleri, tümör nekrozis faktör, koloni uyarıcı faktörler, nöron büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, interlökinler gibi maddelerin ortamdaki düzeylerinin değişmesi, radyasyon, ilaçlar ve virüslerdir. Bu faktörlerin yanında apoptozisi uyarın ya da düzenleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (Öktem ve ark. 2001).

Apoptozis sürecinde rol alan anahtar bileşenlerden olan *Bcl-2 ailesi üyeleri*; apoptozis düzenleyici faktörlerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Bcl-2 proteinlerinin bazıları anti-apoptotiktir (Bcl-2, Bcl-X<sub>1</sub>, Bcl-1) ve mitokondri, endoplazmik retikulum veya nüklear membranda bulunmaktadır, bazıları ise pro-apoptotiktir (Bax, Bcl-X<sub>s</sub>, Bad, Bim, Bak, Bid). Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler kendi aralarında homo ya da heterodimerler oluştururlar. Hücrenin akıbetini belirleyen bu üyelerin rölatif oranıdır. Pro-apoptotik proteinler fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptozise daha yatkın, anti-apoptotik proteinler daha fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptozise daha dirençli olmaktadır.

Pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri hücrel hasar yada stresin algılayıcıları olarak genellikle sitozolde bulunmakta ve hücrel stres sonucu, anti-apoptotik proteinlerin bulunduğu mitokondri yüzeyine doğru yer değiştirmektedirler. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki etkileşim, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin normal işlevlerini bozar ve mitokondride porların oluşumuna, sitokrom c ve diğer pro-apoptotik moleküllerin zarlar arası bölgeden açığa çıkmasına neden olabilir. Bu da apoptozom oluşumu ve kaspaz kaskadı aktivasyonuna yol açmaktadır (Fan ve ark. 2005, Dash 2007).

*Kaspazlar*; hedef proteinleri spesifik aspartat kalıntılarında kırıran sistein proteaz ailesidir (Alnemri ve ark. 1996, Nicholson ve ark. 1995). Memeli hücrelerinde 14 adet kaspaz ailesi tanımlanmıştır (Cryns ve Yuan 1998). Bunlar zimojen (inaktif öncül) olarak bir pro-domain ve proteaz domaini içerirler (Cryns ve Yuan 1998, Thornberry ve Lazebnik 1998).

İçsel ya da dışsal uyaranlarla aktifleşen kaspazlar mitokondride membran hasarı oluşturduktan sonra zar, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine yol açan hasarlara neden olurlar (Gewis 2003, Holcik ve ark. 2005). Kaspazların bazıları (2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinmektedir. Başlatıcı kaspazların apoptotik uyarı ile başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletmesi ile apoptotik hücre morfolojisi meydana gelmektedir (Ulukaya 2003).

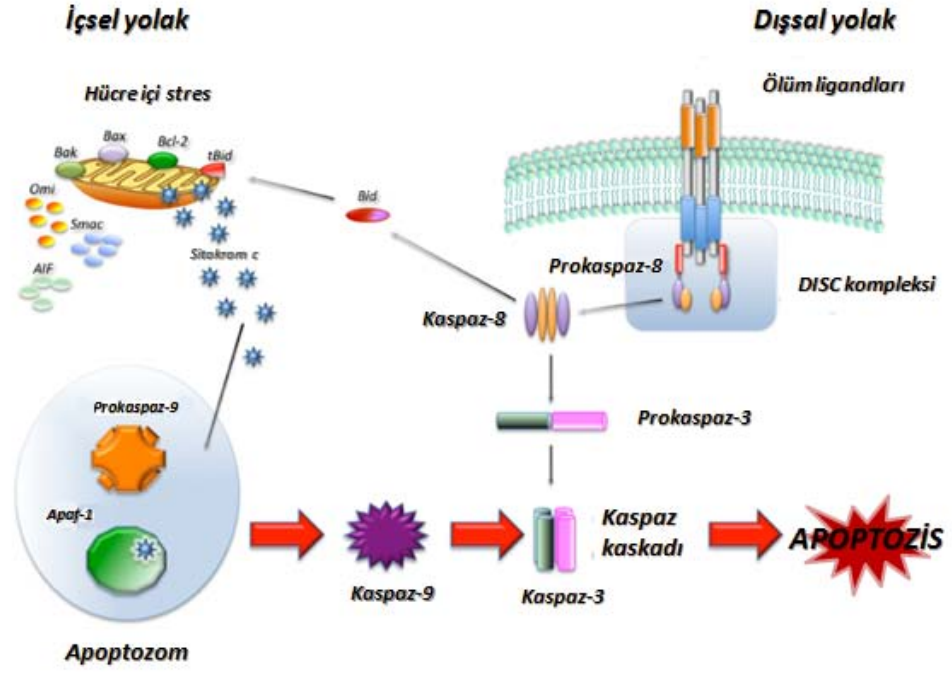
Apoptozis dışsal ve içsel yolak olmak üzere başlıca iki yol aracılığıyla gerçekleşir (Şekil 1.2). *Dışsal (ekstrinsik)/sitoplazmik yolak* hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ligandlarıyla bağlanması sonucu aktifleşir. Ölüm reseptörleri, apoptotik sinyalin iletimi için gerekli olan 80 amino asit uzunluğunda intraselüler ölüm domaini (Death Domain, DD) içerir. Sıklıkla çalışılan ölüm reseptörleri Fas (CD95/Apo-1), TNFR1, TRAIL-R1 (DR4) ve TRAIL-R2 (DR5/Killer/TRICK2)'dir. Reseptör ligand etkileşimi, Fas ile ilişkili ölüm domain proteini (Fas Associated Death Domain, FADD) gibi adaptör moleküllerin ve ardından kaspaz-8'in bağlanmasına yol açar ve ölüm indükleyici sinyal kompleksi (Death Inducing Signaling Complex, DISC) adı verilen kompleks oluşur. Bu durum kaspaz-8'in dimerizasyonuna ve aktivasyonuna yol açar. Kaspaz-8, kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi kırar ve aktifleştirir (Bodmer ve ark. 2000, Kischkel ve ark. 2001, Tait ve Green 2010, Dickens ve ark. 2012).

Kaspaz-8 ayrıca Bid'i de kırabilir. Kırılmış Bid (tBid) sonrasında mitokondriye geçer ve kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonuna neden olacak sitokrom c salınımını uyarır (Tait ve Green 2010).

*İçsel (intrinsik)/mitokondriyal yolak* ise; uyarıldığında mitokondriden sitokrom-c salınımına ve böylece ölüm sinyaline sebep olur. Her iki yolak da, düzenleyici ve yapısal molekülleri kıran ve bunun sonucunda hücrenin ölümüne sebep olan kaspaz denilen proteaz kaskadının aktivasyonunu içeren ortak bir yolda birleşir (Ghobrial ve ark. 2005). Mitokondriyal yolun kilit olayı mitokondri dış membran permeabilizasyonudur (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP). Permeabilizasyon sonucunda; sitokrom c, mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, apoptozis indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz D gibi mitokondri membran proteinleri sitozole salınır. Mitokondri iç membran yüzeyinden sitokrom c'nin sitozole salınması ile sitokrom c, sitoplazmik protein olan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, dATP/ATP'nin de ortamda bulunması ile Apaf-1/sitokrom c kompleksi heptamerik bir yapıya oligomerize olur. Bu yapının oluşması, prokaspaz 9'un Apaf-1 ile etkileşimini mümkün kılar ve apoptozom kompleksi oluşur.

Apoptozomun görevi, başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9'u aktive etmektir. Aktif kaspaz 9, kaspaz-3'ü veya diğer ilerletici kaspazları aktive ederek kaspaz kaskadına aracılık eder. Ayrıca kaspaz aktivitesini inhibe eden ve aktiviteleri Smac veya Omi/HtrA2 gibi fonksiyonel analoglar ile engellenmiş birçok IAPs (apoptozis inhibitörleri) vardır. Ölen hücrelerde Smac ve Omi/HtrA2 (mitokondriyal proteinler, pro-apoptotik proteinler) mitokondriden salındığında IAPs inaktive olmakta ve böylece ilerletici kaspazların inhibisyonu engellenerek hücrelerin apoptozise gitmeleri sağlanır (Ulukaya 2003, Riedl ve Salvesen 2007, Li ve ark. 2008, Duprez ve ark. 2009).

Bu içsel ve dışsal yol mekanizmaları kaspaz-bağımlı apoptozisi göstermektedir. Ayrıca kaspazlardan bağımsız olarak apoptozise neden olduğu düşünülen kaspaz aktivasyonunun gerçekleşmediği mekanizmada bulunmaktadır. Bu mekanizmada AIF (apoptoz indükleyici faktör) mitokondriden salınıp nükleusa geçmekte ve nükleazları aktifleştirerek DNA hasarına yol açmaktadır. AIF, steroidler, granzim B ve endonükleaz G kaspazlardan bağımsız olarak apoptozise neden olmaktadır (Ulukaya 2003).



Şekil 1.2. Apoptozisin indüklenmesi (Favaloro ve ark. 2012)

### 1.2.3. Apoptozis Sürecinde Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler

Apoptozis sürecindeki hücre ışık ya da elektron mikroskobu altında incelendiğinde çeşitli morfolojik değişiklikler tanımlanır (Hacker 2000). Apoptozisin erken evrelerinde, hücre büzülmesi ve piknozis olarak adlandırılan kromatin yoğunlaşması (kromatin kondensasyonu) olayları ışık mikroskobu ile görüntülenebilir (Kerr ve ark. 1972). Hücre büzülmesi ile hücrenin boyutları küçülür, sitoplazması yoğunlaşır ve organelleri daha sıkı paketlenir.

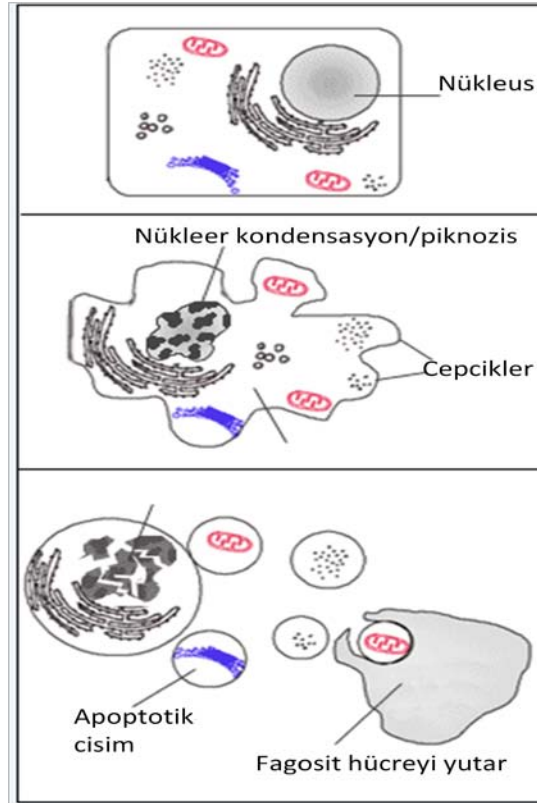
Piknozis, apoptozisin en karakteristik özelliğidir. Hematoksilen ve eozin boyamalarında apoptotik hücreler yuvarlak ya da oval görünümündedir, koyu eozinofilik sitoplazma ve yoğun mor nükleer kromatin fragmentleri (parçaları) gözlenir.

Hücrede meydana gelen değişiklikler elektron mikroskobu ile daha iyi görüntülenir. Erken evrede, nükleer materyalin karakteristik olarak nükleer membranın altında çevresel şekilde kümelendiği görüntülenir. Hücre çekirdeğinin parçalanması (karyoreksis) süreci ve hücre parçalarının apoptotik cisimler içinde ayrılması süreçlerini takiben hücre membranında “bleb” adı verilen cepcikler oluşur.

Apoptotik cisimcikler sitoplazma ve sıkı paketlenmiş organelleri içerirken, nükleer fragment içerebilir ya da içermeyebilir. Apoptotik cisimciklerde organel bütünlüğü korunur ve organeller sağlam bir plazma zarı ile çevrilidir.

Daha sonra bu cisimcikler makrofajlar, parenkimal hücreler ya da neoplastik hücreler tarafından fagosite edilir ve fagolizozomlar ile parçalanır (Şekil 1.3). Apoptozis sürecinde inflamatuvar reaksiyon gerçekleşmez çünkü,

- apoptotik hücreler hücresel bileşenlerini hücreler arası kısma salmazlar,
- kendilerini çevreleyen hücreler tarafından hızlıca fagosite edilirler,
- yutulan hücreler de anti-inflamatuvar sitokin üretmez (Savill ve Fadok 2000, Kurosaka ve ark. 2003).



Şekil 1.3. Apoptotik hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler (Anonim, 2010)

### 1.3.Tümör Mikro Çevresi

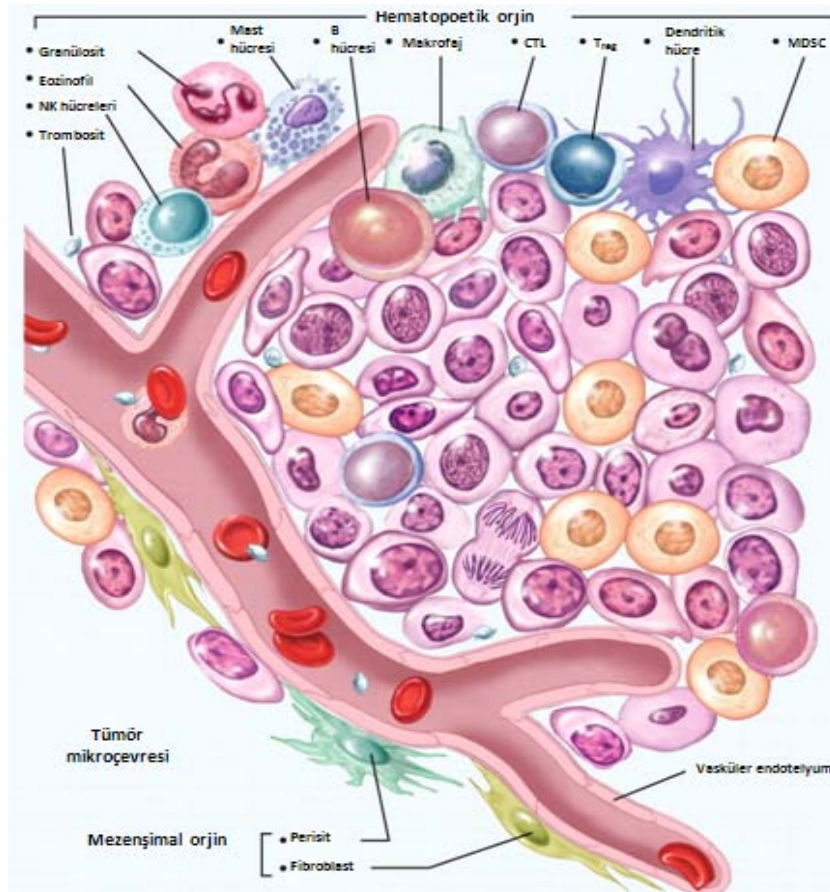
Karsinoma uzun yıllar boyunca sadece transforme olmuş epitelyal hücre hastalığı olarak görülmekteydi ve bu nedenle tedavi stratejileri sadece tümör hücrelerine odaklanmaktaydı.



Fakat günümüzde tümör progresyonunun sadece kanser hücrelerinin tek başına gelişimi ile gerçekleşmediği, kanser hücrelerinin yanında “*tümör mikroçevresi*” olarak adlandırılan stromal hücrelerinde bu süreçte anahtar rol oynadığı bilinmektedir(Bissell ve Radisky 2001).

Tümör stroması;

- fibroblast/miyofibroblast,
- gliyal hücreler,
- epitelyal hücreler,
- yağ hücreleri,
- immün hücreler,
- düz kas hücreleri
- ekstraselüler matriks (ECM),
- ekstraselüler moleküllerden oluşmaktadır(Li ve ark. 2007) (Şekil 1.4).



**Şekil 1.4.** Tümör mikro çevresi hücreleri(Kerkar ve Restifo 2012).

\* NK hücreleri; doğal öldürücü hücreler, CTL; sitotoksik T hücreleri, Treg; düzenleyici T hücreleri, miyeloid kökenli destekleyici hücreler.

Bu hücrelerin hiçbiri kendi başına malign hücreler değildir, ancak tümör mikro çevresinde birbiriyle ve kanser hücresiyle direkt ya da indirekt etkileşim sonucu anormal fenotip kazanırlar ve fonksiyonları değişir (Li ve ark. 2007).

Stromal hücreler tümöre hem pozitif hem de negatif yönden katkı sağlayabilir. Bu hücreler çeşitli büyüme faktörleri, kemokinler ve matriksi parçalayan enzimleri üretecek şekilde kanser hücreleri tarafından modifiye edilirler (Joyce 2005).

Sitokinler ve büyüme faktörleri stroma hücreleri tarafından salgılandığı gibi, aynı zamanda stroma içindeki kanser hücreleri tarafından da salgılanır. CXCR4 bazı kanser hücreleri tarafından eksprese edilen ve tümör hücrelerinde reseptör ligand etkileşimi fonksiyonu ile mitojen olarak görev yapan ve bölgesel invazyon ile sonuçlanan migrasyona katkı sağlayan bir kemokin reseptörüdür (Li ve ark. 2009).

Tümör ortamında pek çok büyüme faktörü tanımlanmış olmasına rağmen, tüm bu faktörlerin arasında en kritik olanı transforme büyüme faktörü-  $\beta$  (Transforme Growth Factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )'dır (Anzano ve ark. 1985). TGF- $\beta$  en iyi bilinen büyüme inhibitörü ve potansiyel immün baskılayıcı faktördür. Normal koşullarda TGF- $\beta$ , apoptozis ve proliferasyon üzerindeki etkisi ile doku homeostazının devamlılığını sağlar (Li ve ark. 2007). TGF- $\beta$  aynı zamanda doğal öldürücü hücre fonksiyonunu inhibe ederek oluşan T-hücre proliferasyonunu da kapsayan immün yanıt üzerinde güçlü inhibitör etkiye sahiptir. Daha önce yapılmış bir çalışma ile TGF- $\beta$ 'nın çift yönlü etkisinin tümör mikro çevresine bağlı olduğu ifade edilmiştir (Siegel ve ark. 2003).

Normal epitelyumda proliferasyon TGF- $\beta$  tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilirken, kanser hücreleri bu büyüme inhibe edici yanıtı kaybeder. Bu yanıtın değişikliğe uğraması ya da kaybolması sonucu birçok tümör, immün sistem tarafından gerçekleşen saldırılara karşı tümörü koruyan, tümör invazyonuna olanak sağlayan ve tümör büyümesini uyaran otokrin TGF- $\beta$  eksprese etme yeteneği kazanır (Li ve ark. 2007).

Dahası, TGF- $\beta$  fibroblastların miyofibroblastlara doğrudan farklılaşmasını sağlayan tek büyüme faktörüdür. Fakat, fibroblastlar miyofibroblastlara dönüştükten sonra TGF- $\beta$  antiproliferatif özellik sergiler (Desmouliere ve ark. 1993, Lieubeau ve ark. 1994).

Bu yüzden, TGF- $\beta$ 'nin fibroblastlar üzerindeki rolünün hücreyi farklılaştırıcı etkisinden çok proliferasyonu baskılayıcı etki şeklinde olduğu düşünülmektedir (Powell ve ark. 1999).

Akciğer, meme, mesane, prostat ve pankreas kanseri hücrelerinde TGF- $\beta$  ekspresyonu gözlenmiştir ve bu durumun hastalığın gelişimi ile korele olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (Annes ve ark. 2003, Gorsch ve ark. 1992, Friess ve ark. 1993, Kim ve ark. 2001). Yapılan bir çalışmada, fareye enjekte edilen prostat kanseri hücrelerinin farelerin sadece %8'inde tümör oluşturabildiği gözlenirken, prostat fibroblastları ve matrijel ile birlikte enjekte edilen pankreas hücreleri farelerin %100'ünde tümör oluşumuna neden olmuştur. Bu tümörler stroma bakımından zengindir ve iyi gelişmiş kan damarlarına sahip oldukları gözlenmiştir (Tuxhorn ve ark. 2002). Bu çalışmanın devamı olarak yapılan bir diğer çalışmada, TGF- $\beta$ , fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünün de dahil olduğu iki tümör arasındaki farklılıkların ana kaynağı olarak tanımlanmıştır (Tuxhorn ve ark. 2002). Ayrıca bu çalışmada TGF- $\beta$ 'nin yeni damarlanma oluşturma özelliğinin altı çizilmiştir.

TGF- $\beta$ 'nin aynı zamanda pro-metastatik özellikleri de olduğu düşünülmektedir. İnsan meme kanserinde TGF- $\beta$  sinyal yolunun kemik metastazı olasılığını artırması bu duruma örnek gösterilmektedir (Yin ve ark. 1999).

Kanser, kronik inflamasyon gibi durumlarda yeni damar oluşumu süreci değişir, kaotik bir hal alır ve damar ağları zayıf işleyen bir duruma gelir (McDonald ve Choyke 2003). Yeni damar oluşumu anlamına gelen anjiyogenez süreci aktif yeniden yapılanmayı ve yeni hücrelerin mevcut yapıya dahil olmalarını gerektiren bir süreçtir. Yeniden yapılanmaya olanak sağlamak için tümör stromasında yer alan fibroblastlar ve makrofajlar matriks metalloproteinazları (Matrix MetalloProteinase, MMP) eksprese eder ve salgılar (Li ve ark. 2009). Stromal hücreler tarafından bu moleküllerin salgılanması hücreler arası sinyal yolları ve çoklu ligandlarını kapsayan karmaşık bir tümör-stroma etkileşimine neden olur (Stuelten ve ark. 2005). MMP'ler dokuyu çevreleyen kollajen, laminin, elastin, fibrinojen, fibronektin ve vitronektinin dahil olduğu ekstraselüler proteinleri hidrolize eder (Sternlicht ve Werb, 2001, Boire ve ark. 2005). Ayrıca MMP'lerin epitelial mezenchimal dönüşüm ve genomik instabilitenin desteklenmesi süreçleriyle ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Radisky ve ark. 2005).

### 1.3.1.Tümör Mikroçevresi Temel Bileşenleri

#### 1.3.1.1.Ekstraselüler Matris

*Ekstraselüler matris (ECM)*; dokuların hacminin büyük kısmını oluşturan hücreler arası boşluktur ve kendini meydana getiren farklı fiziksel, biyokimyasal ve mekanik özelliklere sahip makromoleküllerin oluşturduğu karmaşık bir ağ ile kaplıdır (Lu ve ark. 2012). ECM; hücrelerin davranışını, gelişimini, göç etme ve proliferasyon yeteneğini, hücre şeklini ve fonksiyonlarını düzenleyici role sahiptir.

ECM'yi oluşturan bileşenler;

#### I. Proteoglikanlar

I.I. Heparan sülfat

I.II. Kondroitin sülfat

I.III. Keratan sülfat

#### II. Proteoglikan olmayan polisakkaritler

II.I. Hiyalüronik asit

#### III.Lifler

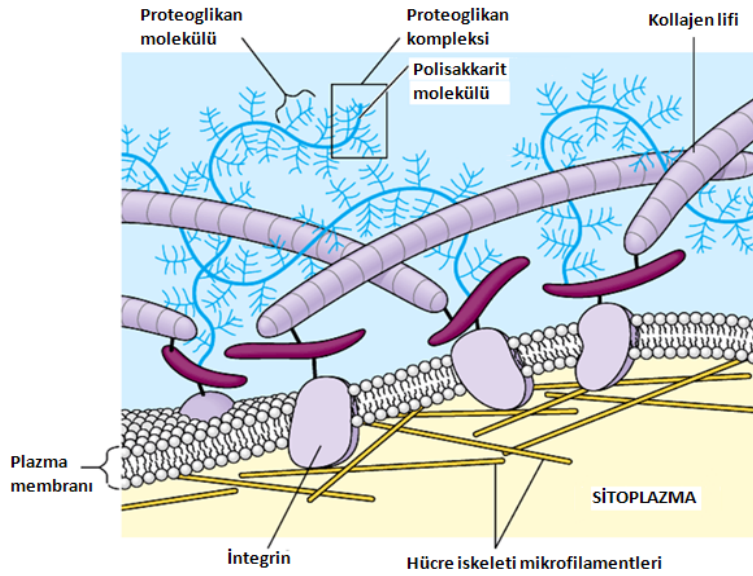
III.I. Kollajen

III.II. Elastin

#### IV. Diğerleri

IV.I. Fibronektin

IV.II. Laminindir (Järveläinen ve ark. 2009)(Şekil 1.5).



Şekil 1.5. ECM yapısı ve bileşenleri (Anonim, 2013a)

Neoplastik ya da neoplastik olmayan hücrelerden salınan veya hücre yüzeyine lokalize halde bulunan proteaz enzimleri ECM'yi modifiye eder ve yeniden yapılandırır. Böylelikle hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerinde önemli değişiklikler meydana gelir, hücre yüzeyinde yeni uyarı sinyalleri oluşur. Bu sinyaller gen ekspresyonuna etki eder ve sonuç olarak proliferasyon, farklılaşma, hayatta kalma ve hareket gibi kritik hücre özellikleri değişir (Mbeunkui ve Johann 2009). Bu yüzden pek çok kanser türünde ECM modifiye haldedir. Bu duruma kanıt olarak, DeWever ve Mareel tarafından yapılan çalışma örnek gösterilebilir. 2003 yılında yapılan çalışma sonucunda insan akciğer, meme, kolon ve prostat kanserlerinde ECM'nin modifiye olduğu belirlenmiştir (DeWever ve Mareel 2003).

Ayrıca ECM'nin yeniden yapılanması invazyon ve metastaz süreçlerinde de rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinin çevre dokuları istila edebilmesi ve metastaz yapabilmesi için göç edebilmeye uygun fenotip kazanmaları gerekmektedir ve bunun için de kendilerini çevreleyen ECM'nin yeniden yapılanması gerekmektedir (Pietras ve Östman 2010).

ECM'nin yıkımı (degradasyon) tümör büyümesi, invazyonu ve anjiyogenez süreçleri ile ilişkiliyken, büyüme faktörleri ve hücre yüzey adezyon molekülleri gibi ECM dışı bileşenlerin degradasyonu artmış proliferasyon, migrasyon ve epitelyal-mezenkimal dönüşüm ile ilişkilidir (Hynes 2009).

ECM'nin özelleşmiş bir formu olan bazal membran (BM) ise epitelyumu stromadan ayırır ve endotelyal hücreler, perisitler ve diğer hücre tiplerinin altında yer alır. BM ya da ECM'nin yeniden yapılanması sistein, serin ve matriks metalloproteinaz sınıflarını kapsayan proteazların yanı sıra heparanaz gibi endoglikosidazlar tarafından da kontrol edilir (Carmeliet 2003; Vlodavsky ve ark. 2002). BM/ECM degradasyonunun kontrolü anjiyogenez ve invazyon için gereklidir (Joyce 2005).

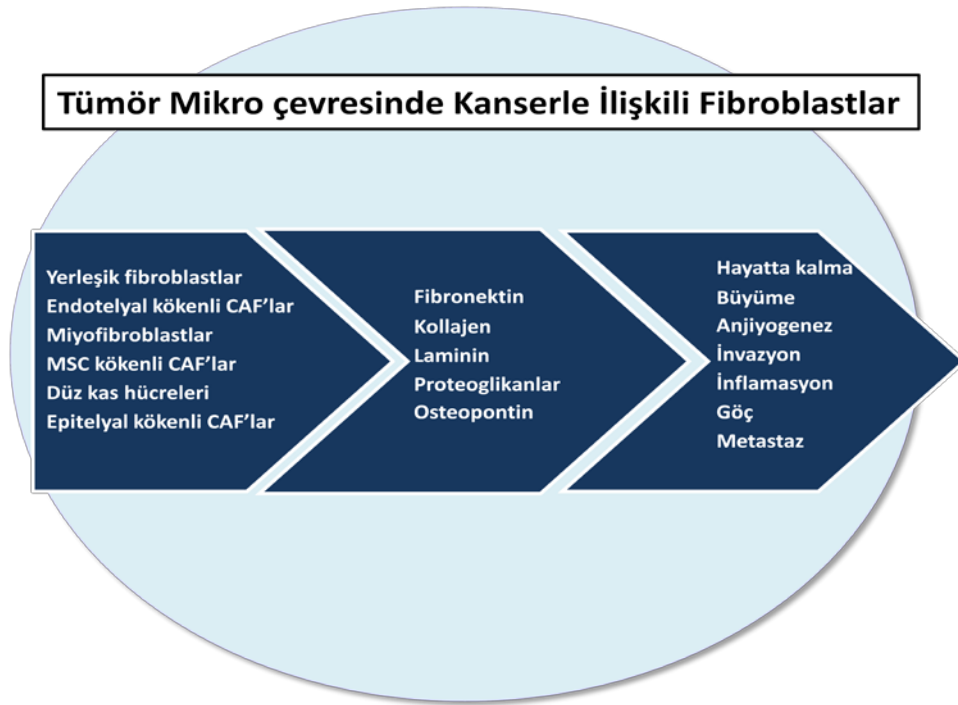
### **1.3.1.2.Fibroblastlar**

Bağ dokunun temel hücresel komponentlerinden olan fibroblastlar vasküler, epitelyal ve inflamatuvar olmayan hücrelerdir (Tarin, 1969). Yara iyileşmesinde, epitelyal farklılaşmada ve inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynarlar (Tomasek ve ark. 2002).

Normal kořullarda fibroblastlar inaktif ve durađan haldedir (Räsänen ve Vaheri 2010). Sađlıklı organlarda fibroblastlar dűřük proliferasyon hızına ve minimum metabolik kapasiteye sahiptir. Fakat yara iyileřmesi ve kanser sűreçlerinde fibroblastlar aktif hale gelir, proliferere olmaya bařlar, ECM bileřenlerini yűksek oranda salgılamaya bařlar ve kontraktıl özellikler ortaya çıkar (Polyak ve Kalluri 2010).

Tűmör bölgesindeki fibroblastlar normal dokudaki fibroblastlardan önemli oranda farklıdır, bu hücreler yűksek proliferatif aktiviteye sahip aktif hücrelerdir (Bhowmick ve ark. 2004b). Durađan fibroblastlar tűmör stromasında aktif hale gelir ve stromal hücreler ile kanser hücreleri arasındaki parakrin sinyal yolađında anahtar dűzenleyici olarak görev alır (Lorusso ve Ruegg 2008).

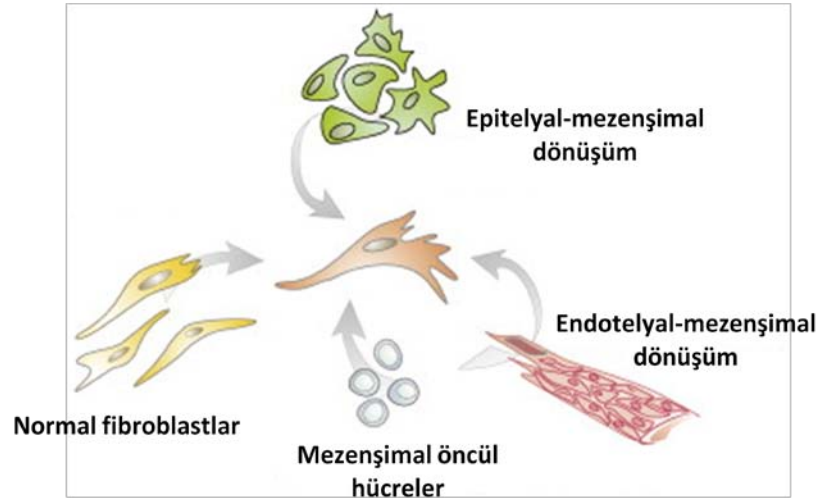
Karsinoma ile iliřkili fibroblast (Carcinoma Associated Fibroblast, CAF) olarak adlandırılan bu hücreler malign-epitelyal dűnűřűmű arttırmaktadır (Hayward ve ark. 2001, Olumi ve ark. 1999, Orimo ve ark. 2005, Bhowmick ve ark. 2004b).CAF'lar hem fibroblastları hem de doku hasarı sonrası fibroblastların farklılařarak meydana getirdiđi kasılabilen ve salgı yapabilen hücreleri (miyofibroblastlar) kapsar(Hinz ve ark. 2007, Shimoda ve ark. 2010) (řekil 1.6).



**řekil 1.6.** Tűmör mikro çevresine ait CAF tűrleri, salgıladıkları faktörler ve tűmör üzerine etkileri (Paraiso ve Smalley 2013'den deđiřtirilerek alınmıřtır).

CAF'lar farklı kaynaklardan köken alabilir. Bu hücreler;

- Normal fibroblastların genetik değişimi ile,
- Epitelyal-mezenşimal dönüşüm ile epitelyal hücrelerden,
- Mezenşimal hücrelerden,
- Endotelyal-mezenşimal dönüşüm ile endotelyal hücrelerden oluşabilirler (Xing ve ark. 2011) (Şekil 1.7).



**Şekil 1.7.** CAF'ların meydana gelme yolları (Östman ve Augsten 2009).

İmmün hücreler gibi, CAF'lar da tümör gelişiminin erken evrelerini inhibe eder. Bu inhibitör etkinin aktif fibroblastlar arasında oluşan açıklık bağlantıları aracılığı ile gerçekleştiği bilinmektedir (Trosko ve Ruch 1998, Omori ve ark. 2001). Tümör gelişimin sonraki evrelerinde ise CAF'lar tümör büyümesi ve gelişimine katkı sağlar (Orimo ve Weinberg 2006).

CAF'ların kanser başlatıcı özelliklerini doğrudan kanıtlayan çalışma Bhowmick ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Cre rekombinaz enzimi aktivitesi ile fibroblastlardan tip II TGF- $\beta$  reseptörü kesip çıkarılmıştır. Fibroblastlarında TGF- $\beta$  yanıt kaybı olan farelerde spontane olarak prostat neoplazisi ve işkembelelerinde invazif karsinom görülmüştür. Malign gelişim stromal genişleme ve HGF ekspresyonu artışı ile beraber gelişmiştir (Bhowmick ve ark. 2004b).

Fibroblastlar ekstraselüler matriks sentezi ve yıkımı için esansiyeldir (Rodemann ve ark. 1991). CAF'lar plazminojen aktivatörlerinin fazla oranda salgılanması, Matriks MetalloProteinazlar (MMP), ECM bileşenleri, büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığıyla stromayı değiştirir (De Wever ve ark. 2008) ve dolayısıyla salgıladıkları birçok faktör ile karsinogenez sürecine katkıda bulunurlar (Räsänen ve Vaheri 2010).

Olumi ve ark. yaptıkları bir çalışmada tümörjenik olmayan insan prostat epitelyal hücreleri ile insan prostat CAF hücrelerini ko-kültür metodu ile birlikte kültüre etmişlerdir. Çalışma sonucunda CAF'ların büyümeyi uyardığını ve epitelyal hücrelerin histolojisini değiştirdiğini göstermişlerdir (Olumi ve ark. 1999). Benzer şekilde Hayward ve ark. 2001 yılında yaptıkları çalışmada tümörjenik olmayan prostat hücre hattı BPH-1 ile CAF'ları birlikte kültüre etmiş ve epitelyal hücrelerde malign dönüşüm gerçekleştiğini ifade etmişlerdir (Hayward ve ark. 2001).

Kanser dokusunda yer alan CAF'lar sadece kanser hücresi büyümesini desteklemez, aynı zamanda sitokinler ve çeşitli inflamatuvar araçlar gibi farklı pro-invasif moleküller ve hücre-hücre etkileşimleri aracılığıyla kanser hücresinin invazif özelliğini artırır (Powell ve ark. 1999).

Ayrıca CAF'ların pro-anjiyogenik faktörleri sağladıkları bilinmektedir. Yapılan bir çalışma ile tümörden eksprese edilen vasküler endotelial büyüme faktörü-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A, VEGF-A) dışındaki diğer anjiyogenez indükleyici faktörlerin büyük oranda CAF'lar tarafından üretildiği gösterilmiştir (Thijssen ve ark. 2004).

Tümör stromasındaki fibroblastlar tip II transmembran proteini olan, serin proteaz olarak görev yapan ve tümör büyümesi ve metastatik potansiyel artışı ile ilişkili olan Fibroblast Aktivasyon Proteinini (FAP) sentezler. İnsan karsinomlarının %90'ında FAP ekspresyonu aktif haldedir (O'Brien ve O'Connor 2008). Özellikle meme, akciğer ve kolon karsinomlarında FAP'ın aşırı seviyede eksprese edildiği bilinmektedir (Scanlan ve ark. 1994).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar CAF'ların malign hücrelerin kemoterapi/radyoterapiye duyarlılığını da etkilediğini göstermektedir.



Yapılan bir çalışma ile pankreatik kanser hücreleri CAF'lar ile birlikte kültüre edildiğinde ya da fibroblastların büyütüldüğü besiyerinden elde edilen özel besiyerinde büyütüldüklerinde kemoterapiye daha az duyarlı hale geldikleri gösterilmiştir (Muerkoster ve ark. 2004, Hwang ve ark. 2008).

CAF'lar, TGF- $\beta$  ve hepatosit büyüme faktörü (Hepatocyte Growth Factor, HGF) salınımı ile tümör hücrelerinin epitelyal-mezenşimal dönüşümüne (EMT) katkı sağlar (Bhowmick ve ark. 2004a). EMT normal polarize epitelyal hücrelerin çoklu biyokimyasal değişikliklere uğrayarak göç etme ve invazif özellikler kazandığı ve hücre-hücre adezyonununun kaybedildiği bir süreçtir (Kajiyama ve ark. 2009).

EMT'nin kanser gelişimi ve metastaz sürecinde rol oynadığı düşünülmektedir (Soon ve ark. 2013). Yapılan birkaç çalışma ile epitelyal mezenşimal dönüşüme uğrayan tümörlerin kemoterapiye daha dirençli hale geldikleri belirtilmiştir (Yang ve ark. 2006, Kajiyama ve ark. 2009). Yang ve ark. 2006 yılında yaptıkları bir çalışma ile, kolon kanseri epitelyal hücre hattı oksaliplatine dirençli hale getirildiğinde hücrelerin mezenşimal fenotip (iğsi görünüm) kazandıklarını göstermiştir (Yang ve ark. 2006). Yine benzer şekilde ovaryum kanseri epitelyal hücre hattının da paklitaksele dirençli hale getirildiğinde mezenşimal morfoloji sergilediği belirtilmiştir (Kajiyama ve ark. 2007).

CAF'ların bir diğer görevi tamponlayıcı özellikleridir. CAF'lar toksik metabolitleri ortamdan uzaklaştırır ve kanser hücreleri tarafından meydana getirilen asiditeyi tamponlar (Koukourakis ve ark. 2006).

### **1.3.1.3. İmmün Hücreler**

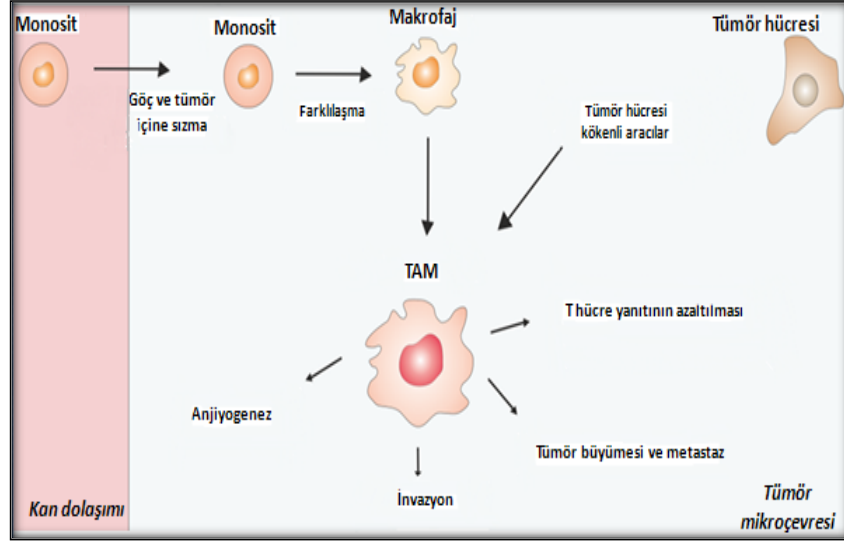
Kanser ve kronik inflamasyon klinik bağlamda birbirlerine oldukça yakındır ve kanser "asla iyileşmeyen yara" olarak tanımlanmaktadır (Dvorak 1986). Kanser hücreleri ve CAF'lardan salınan pro-inflamatuvar sitokinler çok fazla sayıda immün hücreyi kanser bölgesine doğru çeker. Makrofajlar, nötrofiller ve lenfositler CAF'lar tarafından salınan faktörler ile tümör stromasında toplanır. Nötrofil, eozinofil, bazofil, monosit/makrofaj, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler ve lenfositlerin dahil olduğu çok çeşitli lökosit grupları tam gelişmiş tümör stroması içine sızar (Lin ve Pollard 2004). Makrofajlar endotelyal hücre davranışlarını etkileyen VEGF ve HGF gibi bir takım

faktörlerin salınımından sorumludur. Nötrofiller ise VEGF, HGF, MMP2 ve IL-8 (interlökin-8) salınımı aracılığıyla anjiyogenezi uyarırlar (Li ve ark. 2007).

Yapılan çalışmalar ile mast hücrelerinin cilt kanserinde anjiyogenezi indüklediği gösterilirken (Coussens ve ark. 2000, Crivellato ve Ribatti 2005), eozinofillerin kolon, servikal, akciğer, meme ve bazı lenfoma türlerinde VEGF üretimi ile anjiyogenezi indüklediği gösterilmiştir (Li ve ark. 2007).

Makrofajlar; çevresel sinyallere yanıt olarak fenotiplerini değiştirebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Fizyolojileri hem doğal hem de adaptif bağışıklık yanıtları tarafından değiştirilebilir (Mosser ve Edwards 2008). Makrofajlar aktif M1 makrofajları ve aşırı aktifleşmiş M2 makrofajları olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Biswas ve ark. 2008). M1 makrofajları yüksek mikrobisidal ve tümörisidal aktivite gösteren ve pro-inflamatuvar faktörlerin yüksek ekspresyonu ile karakterize olan pro-inflamatuvar makrofajlardır (Allavena ve ark. 2008a). Öte yandan, M2 makrofajları immünosupresif özelliktedir ve anti-inflamatuvar sitokinleri yüksek seviyede üretirken pro-inflamatuvar sitokin üretimi düşük seviyededir. Ancak, *in vivo* koşullarda makrofajlar arasında tam olarak sınıflandırma yapmak mümkün değildir, çünkü tümör mikro çevresine bağlı olarak bazı hücre popülasyonları hem M1 hem de M2 makrofajlarına ait özellikleri sergiler (Tang 2013).

Tümör bölgesinin içine çekilen aktif makrofajlar endotelial hücrelerin özelliklerini etkileyen HGF, VEGF, MMP2 ve interlökin-8 gibi bazı faktörlerin salınımını sağlar. Tümöre ulaşan makrofaj, kanser hücrelerinin metastazını ve büyümesini arttıran tümör ile ilişkili makrofajlara (Tumor Associated Macrophages, TAM) farklılaşmaya başlar (Leek ve Harris 2002) (Şekil 1.8). Tümörün içine sızan TAM'lar genellikle neoplastik dokularda yer alır ve tümör gelişimi ve büyümesinde önemli rol oynar (Pollard 2004; Allavena ve ark. 2008b). Pek çok kanser türünde TAM sayısı ile kötü prognoz arasında korelasyon olduğu belirtilmiştir. Makrofaj ve tümör hücresi etkileşimi makrofaj kökenli sitokin, kemokin ve büyüme/hareket faktörlerinin salınmasına yol açar (Lorusso ve Ruegg 2008). İnflamatuvar sitokinler doğrudan epitelyal hücrelerinin proliferasyonunu arttırarak karsinogenez sürecinde başlatıcı ve devam ettirici rol oynarlar. İnflamasyon da immün sistem hücrelerinin fenotipini ve fonksiyonunu değiştirerek tümörigeneze indirekt olarak katkı sağlar (Rollins 2006).



Şekil 1.8. TAM'ların oluşma süreci ve tümör üzerine etkileri (Mallmann ve ark. 2010)

#### 1.4.Ko-kültür yöntemi

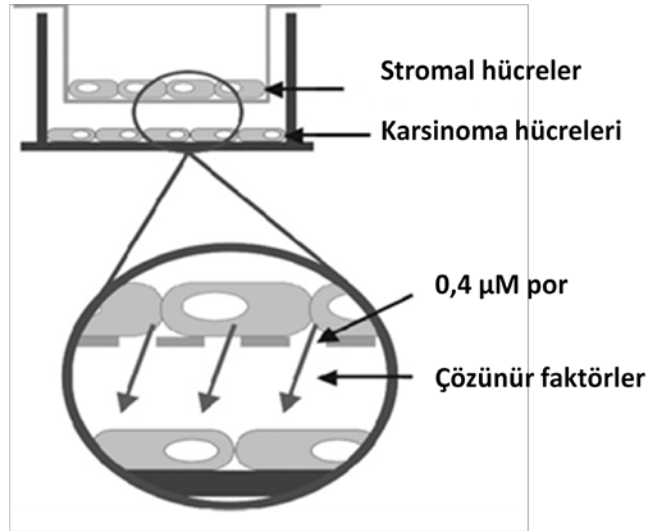
Cerrahi ya da biyopsi materyalleri ile tüm kanserlerin primer kültürünün yapılması kanser dokusu mikroçevresini anlama konusunda oldukça önemli bilgiler verebilir, fakat standart *in vitro* yöntemlere göre primer kültür metodunu uygulamak daha zordur. Bu yüzden en az iki farklı hücre tipinin (kanser hücresi+fibroblast ya da epitelyal hücre+lenfosit) birlikte kültüre edilmesi ile oluşturulan yöntem ile kanser mikroçevresinde hücre-hücre etkileşimi değerlendirilerek insan kanserlerinde *in vivo* mikroçevre büyük oranda taklit edilebilmektedir. Ko-kültür olarak adlandırılan bu yöntem iki ya da daha fazla hücre tipinin birlikte kültüre edilmesi esasına dayanmaktadır (Miki ve ark. 2012).

Literatürde fibroblastlar ve kanser hücreleri arasındaki etkileşimi ve iletişimi gösteren bazı çalışmalar mevcuttur ancak yine de kanser hücreleri ile yapılan çalışmaların çoğu mono-kültür şeklinde yapılmaktadır. Mono-kültür sistemlerinin en büyük dezavantajı, karsinoma hücreleri ile introtümöral stromal hücreler arasındaki etkileşimin gösterilememesidir. Diğer yandan, iki farklı hücre tipi ile (örneğin, kanser hücresi + fibroblast) yapılan “ko-kültür” çalışmaları ise mikroçevrede olduğu gibi hücre-hücre etkileşiminin gösterilmesine olanak sağlar (Miki ve ark., 2012).

Kanser hücreleri ile somatik hücreler arasındaki etkileşimi dolaylı olarak göstermenin bir diğer yolu kanser hücrelerinin “conditioned medium” olarak adlandırılan özel besiyerinde büyütülmesi esasına dayanır.

Bu özel besiyeri fibroblast gibi epitelyal hücrelerin büyütüldüğü besiyerinin toplanıp artıklardan uzaklaştırıldıktan sonra kanser hücrelerini büyütülmesinde kullanılır. 2006 yılında yapılan çalışma ile hücrelerin “conditioned medium” ortamında büyütülmesi ile direkt ko-kültür yöntemi karşılaştırılmış ve sonuç olarak ko-kültür metodunun daha üstün olduğu ifade edilmiştir (Malekshah ve ark. 2006).

Doğrudan ko-kültür hemen hemen tüm kültür kaplarında gerçekleştirilebilir ve fiziksel hücre-hücre temasının kanser invazyon mekanizmasında önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (DeWever ve Mareel 2003). Fakat, direkt ko-kültür metodu birçok teknik zorluğa sahiptir ve bu yüzden hücre kültürü “insert”leri olarak adlandırılan ve kültür kabının içine yerleşmiş haldeki porlu membranlar ile hücrelerin ayrılması ve bu şekilde kültüre edilmesine olanak sağlayan indirekt ko-kültür metodu daha uygun bir metoddur (Şekil 1.9). Bu metod ile tekrarlanabilir ve güvenilir in vitro sonuçlar elde edilmektedir.



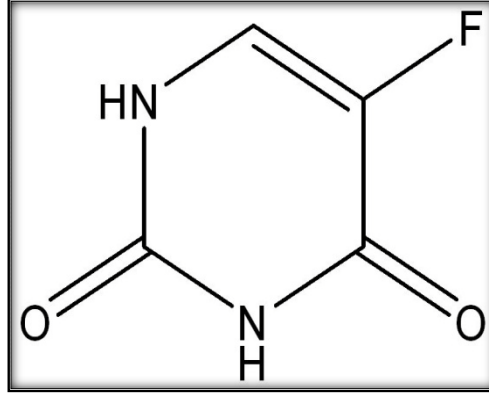
Şekil 1.9. Ko-kültür sistemi şeması (Miki ve ark. 2012)

### 1.5.Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılan Kemoterapi İlaçları 1.5.1.5-Florourasil (5-FU)

Bir pirimidin analogu olan (Şekil 1.10) bu ilaç hücre içi transport yollarını kullanarak hücreye rahatlıkla girebilmekte ve hücre içinde farklı sitotoksik metabolitlere dönüştürülmektedir. Daha sonra bu aktif metabolitler pirimidin nükleotid sentezinde hız sınırlayıcı bir enzim olan timidilat sentaz (TS) aktivitesini inhibe eder.

TS inhibisyonu sonucu daha az deoksitimidin monofosfat (dTMP) oluşur ve bunun sonucunda DNA onarımı ve sentezi inhibe edilir (Sobrero ve ark. 2000).

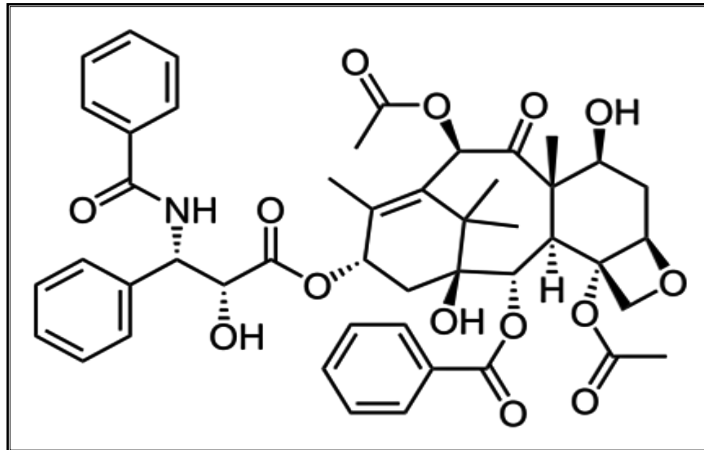
5-FU uygulaması dTMP kıtlığına neden olur ve böylelikle hızlı bölünen kanser hücreleri “timinsizlik” durumundan dolayı ölürlür (Longley ve ark. 2003).



Şekil 1.10. 5-Florourasilin kimyasal yapısı (Guerrero-Ramírez ve Issa Katime 2011)

### 1.5.2. Paklitaksel

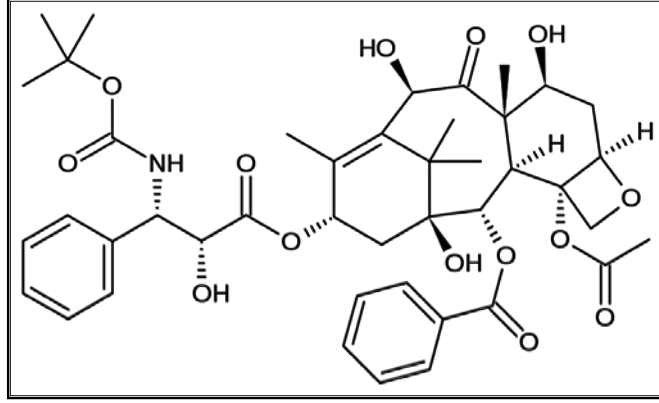
Pasifik porsuk ağacı *Taxus brevifolia*'nın ağaç kabuğundan elde edilmiştir (Jordan ve Vivien 2001). Kimyasal yapısı şekil 1.11'de gösterilen paklitaksel, tübülünleri hedefleyen bir hücre iskeleti ilacıdır. Paklitaksel uygulanan hücrelerde mitotik iğ ipliği birleşmesinde, kromozom ayrılmasında ve hücre bölünmesinde defektler gerçekleşir. Paklitaksel mikrotübül polimerlerini stabilize eder ve ayrılmalarını önler, böylelikle metafazda iğ ipliği yapılanması mümkün olmaz. Bu durumda mitoz bölünme devam edemez, mitotik kontrol noktalarının uzun süreli aktivasyonu sonucu ya apoptozis tetiklenir ya da hücre bölünmesi gerçekleşmeden G-fazına geri dönüş gerçekleşir (Rajnish ve Hongtao 2004, Brito ve ark. 2008).



Şekil 1.11. Paklitakselin kimyasal yapısı (Anonim 2007a).

### 1.5.3.Dosetaksel

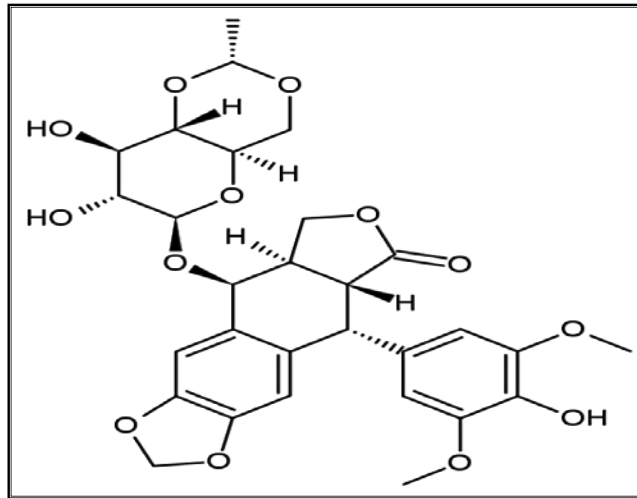
Taksan grubundan, paklitakselin yarı-sentetik analogu (Clarke ve Rivory 1999) (Şekil 1.12),antimitotik bir ajandır. Hücre içinde serbest tübülünlere bağlanır ve ardından tübülünlerin kararlı mikrotübüllere polimerizasyonunu destekler ve mikrotübül ayrılmasını inhibe eder, sonuç olarak hücrenin mitotik ve interfaz fonksiyonlarını bloke ederek hücre bölünmesini inhibe eder (Cortes ve Pazdur 1995, Pronk ve ark. 1995).



Şekil 1.12. Dosectaxelin kimyasal yapısı (Anonim 2006c)

### 1.5.4.Etoposid

DNA ve topoizomeraz II enzimi ile üçlü kompleks oluşturur. Kimyasal yapısı şekil 1.13'de gösterilen etoposid, DNA zincirlerinin yeniden bağlanmasını engeller ve böylelikle DNA zincirlerinin kırılmasına yol açar. Kanser hücreleri daha hızlı bölünen hücreler olduğundan topoizomeraz II enzimine sağlıklı hücrelerden daha fazla ihtiyaç duyarlar. Bu yüzden, etoposid uygulaması sonucu kanser hücrelerinde DNA sentezinde hatalar gerçekleşir ve apoptozis indüklenir (Hande 1998, Gordaliza ve ark. 2004).

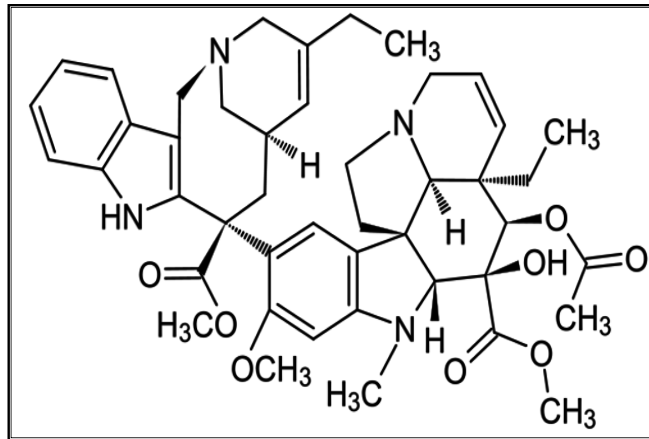


Şekil 1.13. Etoposidin kimyasal yapısı (Anonim, 2006d).

### 1.5.5. Vinorelbin

*Vinca rosea* bitkisinden elde edilen bitkisinden elde edilen vinblastinin ve diğer vinka alkaloidlerinin yarı-sentetik formudur (Anonim2002b) (Şekil 1.14).Vinka alkaloidleri, hücreleri mitozun metafaz evresinde durduran hücre döngüsüne spesifik ajanlardır. Vinka alkaloidleri mikrotübüllerin oluşumunu inhibe etmek için tübülün monomerlerine bağlanır.Yeterli sayıda fonksiyonel mikrotübül olmadığına yeni replike olmuş kromozomlar ayrılamaz ve hücre döngüsü baskılanır. Yarım kalan hücre döngüsü de hücre ölümünü tetikler (Capasso 2012).

Vinorelbinin ana etki mekanizması mitotik tutulma ve hücre ölümüne yol açan mikrotübül dinamiklerinin inhibe edilmesidir. Yüksek konsantrasyonda mikrotübüllerin yapısını bozan, mikrotübül depolimerizasyonu ve mitotik iğ ipliği yıkımını uyaran bir etki gösterirken, düşük konsantrasyonlarda mitotik gelişimi baskılayabilir (Capasso 2012).

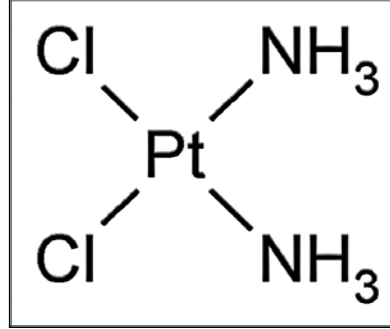


Şekil 1.14. Vinorelbinin kimyasal yapısı (Anonim 2010).

### 1.5.6. Cisplatin

*cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(Cl)<sub>2</sub>] bileşiği ilk kez Michele Peyrone tarafından tanımlandı ve uzun yıllar boyunca Peyrone tuzu olarak bilindi (Peyrone 1844). Yaklaşık 50 yıl sonra formülü Alfred Werner tarafından (Trzaska 2005) çözülen cisplatin günümüzde en yaygın kullanılan kemoterapi ilaçlarından biridir (Şekil 1.15). Cisplatinin sitotoksitesi DNA'ya bağlanması ve kovalent çapraz bağlantılar oluşturması özelliğinden kaynaklanmaktadır. Cisplatinin DNA'ya bağlanması helikal yapıda bozulmalara ve sonuçta DNA replikasyonu ve transkripsiyonunun bozulmasına neden olur (Jamieson ve ark. 1999, Ishida ve ark. 2002, Lin ve ark. 2002, Lee ve ark. 2002).

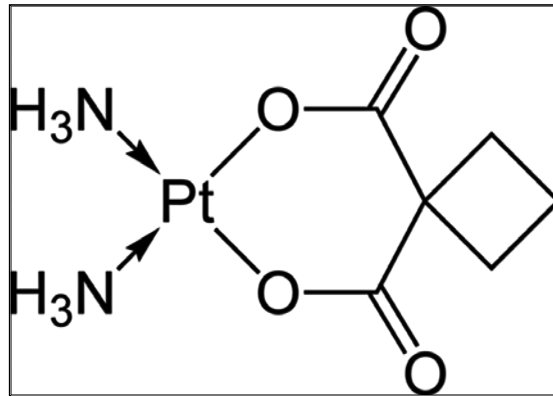
Cisplatin, endoplazmik retikulum stres yollarını uyararak apoptotik kaspazların aktifleşmesini (Mandic ve ark. 2003) ve apoptozisi inhibe eden proteinlerin ekspresyonunu engelleyerek apoptozisin artmasını sağlamaktadır (Li ve ark. 2001).



Şekil 1.15. Cisplatinin kimyasal yapısı (Anonim 2007b).

### 1.5.7.Karboplatin

Cisplatin ile birlikte platin-bazlı antineoplastik ajanlar grubuna ait bir kemoterapi ilacıdır (Şekil 1.16). Cisplatinden farkı, cisplatindeki iki klorid ligandı yerine bidentat dikarboksilat ligandı içermesidir. Karboplatin DNA onarımına müdahale ederek DNA ile etkileşime girer. Ancak, etki mekanizması henüz tam olarak açığa kavuşturulamamış olsa da bu ajanın genomik DNA, tubulin ya da diğer proteinler gibi hücresel hedeflerle etkileşerek biyolojik etkisini gösterdiği düşünülmektedir (Knox ve ark. 1986, Bose 2002, Dabrowiak 2009).



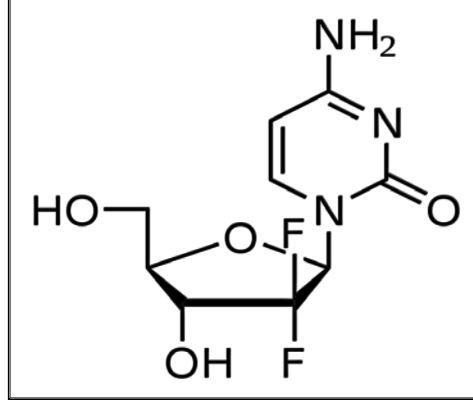
Şekil 1.16.Karboplatinin kimyasal yapısı (Anonim 2010c).

### 1.5.8.Gemsitabin

Nükleik asit yapımında sitidin yerine yer alır ve böylelikle yanlış nükleotid eklenmesi ile nükleik asit yapımı bloke olur, tümör büyümesi durur ve hücre apoptozise gider. Gemsitabinin bir diğer hedefi de ribonükleotid redüktaz (RNR) enzimidir. Gemsitabin RNR'nin aktif bölgesine bağlanır ve enzimi geri dönüşsüz olarak inaktive eder.



RNR inhibe olduğunda DNA replikasyonu ve onarımı için gerekli olan deoksiribonükleaz üretilmez ve hücrede apoptozis indüklenir (Cerqueira ve ark. 2007). Gemsitabinin kimyasal yapısı şekil 1.17’de gösterilmiştir.



Şekil 1.17.Gemsitabinin kimyasal yapısı (Anonim 2007c).

## **2.MATERYAL ve YÖNTEM**

### **2.1.Materyal**

#### **2.1.1.Kimyasal maddeler**

- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid), Sigma, Almanya
- Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco, USA
- Fosfat tuz tamponu (PBS), HyClone, Thermo Scientific, USA
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), HyClone, Thermo Scientific, USA
- SDS Molecular Biology grade, BioChemica Applicham, Almanya
- Ham's F12, Medium, PAA, USA
- 0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, USA
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya
- Triton X-100, Sigma, Almanya
- Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit, Sigma, Almanya
- Cell Viability Imaging Kit, Roche, İsviçre
- ATP Tumor Chemosensitivity Assay, DCS Innovative, Almanya
- Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries, İsrail
- Paklitaksel (Taksen), Koçak farma, Türkiye
- Doksetaksel(Taxotere, Sanofi Aventis, Türkiye
- Cisplatin, Koçak farma, Türkiye
- Karboplatin (Carboplatin-Teva), Med-ilaç, Türkiye
- Etoposid (Etosid), Koçak Farma
- 5-Florourasil, Koçak Farma
- Vinorelbin (Navelbine), Pierre Fabre İlaç A.Ş, Türkiye
- Gemstabin (Gemko), Koçak Farma, Türkiye

#### **2.1.2.Sarf malzemeler**

- 25cm<sup>2</sup> ve 75cm<sup>2</sup> lik flask, Thermo Scientific, USA
- 96 kuyulu flat plate, Corning Incorporated, USA
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Set inject, Çin
- 10µl'lik pipet uçları, Biohit, Finlandiya
- 100µl'lik pipet uçları, Expell

- 1000µl'lik pipet uçları, Ayset, Türkiye
- Steril santrifüj tüpleri (15ml), Orange Scientific, Belçika
- Steril santrifüj tüpleri (50ml), Nest, Çin
- Thoma lamı, Bright –Line, Haussier Scientific Horsham, PA, USA
- Kriyovial, Corning Incorporated, USA
- E-Plate 96, Roche, İsviçre
- E-Plate insert 96, Roche, İsviçre
- 10 ml'lik pastör pipetler, Corning Incorporated, USA
- 25 ml'lik pastör pipetler, Lp Italiana Spa, İtalya
- 2 ml'lik cam pastör pipetler, Heinz Herenz, Almanya
- 1 ml ve 5 ml'lik Kombi tip, Eppendorf, Almanya
- Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab, Almanya

### **2.1.3.Cihazlar**

- Spektrofotometre (FLASHScan S12, Analytik Jena, Almanya)
- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D
- Luminometre (FL×800 Mikroplate Floresans Okuyucu)
- CO<sub>2</sub> inkübatörü, Sanyo, Japonya
- Mikroplate inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph, Almanya
- Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye
- Steril kabin, ESCO, Singapur
- Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, Almanya
- Inverted mikroskop, Olympus CKX41, Japonya
- xCELLigence RTCA cihazı, Roche, Almanya
- Aspiratör, Rocker 300, Tayvan
- Kuru hava sterilizatörü, Elektro-mag M 420, Türkiye
- Santrifüj, Rotina 35R, Almanya
- 10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific
- 0,5-5ml pipet, Brand
- 10ml pipet, Eppendorf
- 5-50µl Transferpipet, Thermo Scientific
- Pipet boy, ISO fill
- 20-200µl Transferpipet, Brand, Almanya

## **2.2.Yöntem**

### **2.2.1. Kemoterapötiklerin Hazırlanması**

Tüm kemoterapötikler DMEM+Ham's F12 (1:1) besiyerinde 200 TDC (Test Drug Concentration) dozunda hazırladı ve hücrelere son konsantrasyonları 100 TDC olacak şekilde uygulandı. Kemoterapötiklerin 200 TDC hesaplamaları şu şekilde yapıldı; 5'er ml besiyeri içine paklitaksel (22.6µl), dosetaksel (22.5 µl), cisplatin (19 µl), karboplatin (15.7 µl), etoposid (24 µl), 5-FU (4.5 µl), vinorelbin (1.9 µl), gemsitabin (6.25 µl) eklendi.

### **2.2.2.Akciğer Kanseri Hasta Dokusundan Fibroblast İzolasyonu**

Akciğer kanseri hastasına ait dokuyu parçalamak için ATP-Tümör kemosenitivite testi (DCS Innovative Diagnostics, Almanya) kiti kullanıldı. Kit içerisinde bulunan enzim ile doku enzimatik olarak parçalandı ve hücrelerin tek tek ayrışması sağlandı. Bunun için kit içerisinde bulunan enzim doku ile 37<sup>0</sup>C, çalkalamalı inkübatörde, 15 ml'lik santrifüj tüpü içinde 8 saat muamele edildi. İnkübasyon sonunda hücreleri çöktürmek amacı ile santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet besiyeri ile süspansiyon edildikten sonra iki kez daha yıkama yapılarak hücreler 25cm<sup>2</sup> hücre kültür kabına Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, HyClone, USA) + Ham's F12(PAA, USA) besiyeri içerisine %10 FBS (Fetal Bovine Serum, PAA, USA), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000U/ml penisilin,10 mg/ml streptomisin, Gibco, USA), %1 L-glutamin (Gibco, USA) ilave edilerek büyütüldü ve mikroskopik olarak karakterize edildi.

### **2.2.3.Hücre kültürü**

Deneylerde A549 insan akciğer kanseri hücre soyu ve akciğer kanseri hastasına ait dokudan elde edilen ve kültür ortamında çoğaltılan fibroblastlar kullanıldı. A549 insan akciğer hücre hattı/1w Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan Hakan Akça'dan temin edilmiştir. Fibroblast hücreleri ise akciğer kanseri hastasından izole edilerek kültür ortamında çoğaltıldı.

#### **2.2.3.1.Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması**

A549 ve fibroblast hücreleri için kullanılan besiyeri şu şekilde hazırlandı: 1:1 oranında karıştırılarak hazırlanan Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, HyClone, USA) + Ham's F12(PAA, USA) besiyerine %10 FBS (Fetal Bovine Serum, PAA, USA), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000U/ml penisilin,10 mg/ml streptomisin, Gibco, USA), %1 L-glutamin (Gibco, USA) ilave edildi.

### **2.2.3.2.Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması**

Donmuş haldeki stok hücreleri çoğaltmak için, hücrelerin içerisinde saklandığı kriyovialler  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den alındı ve hızlı bir şekilde sıcak su banyosunda çözüldü. Çözülen hücre süspansiyonu; 15ml'lik santrifüj tüpünde bulunan % 10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM+Ham's F12 (1:1) besiyeri içine alındı. Santrifüj tüpü 800rpm'de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım aspire edildi ve hücre peleti üzerine 1ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon haline gelmesi sağlandı. Daha sonra tüp üzerine 4ml besiyeri ilave edildi ve 5ml'lik hücre süspansiyonu  $25\text{cm}^2$ 'lik hücre kültürü kapları (Thermo Scientific, USA) içerisine alınarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$  içeren ortamda inkübe edildi.

### **2.2.3.3.Hücre Soylarının Pasajlanması**

Hücrelerin pasajlanması işlemi, hücreler büyütüldükleri hücre kültürü kabının yüzeyini %80-90 oranında kapladığında gerçekleştirildi. Öncelikle hücre kültürü kabı içindeki besiyeri aspire edildi. Hücre artıklarının uzaklaştırılması ve hücrelerin serumdan arındırılması için  $25\text{cm}^2$ 'lik hücre kültürü kabının içerisine 2ml 1X PBS (Gibco) ilave edildi ve hücre kültürü kabının içi PBS ile yıkandı. Daha sonra PBS aspire edilerek ortamdaki uzaklaştırıldı ve 0.5ml %0,05 Tripsin-EDTA (HyClone, USA) solüsyonu kullanılarak hücre kültürü kabı  $37^{\circ}\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda 5dk inkübe edildi ve böylelikle kabın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskop ile kontrol edildikten sonra birkaç ml serumlu besiyeri eklenerek tripsinli hücreler, eklenen tripsin miktarının 10 katı besiyeri içeren 15ml'lik santrifüj tüpüne toplandı. Santrifüj tüpü 800rpm'e 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısmı aspire edildi ve hücre peleti 1ml hücre besiyerinde süspanse edildikten sonra 9ml besiyeri ilave edildi ve 10ml'lik hücre süspansiyonu  $75\text{cm}^2$ 'lik hücre kültürü kabına alınarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$  içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya ulaşmaya kadar çoğalmaları sağlandı.

### **2.2.3.4.Hücre Soylarının Stoklanması**

Hücreler büyütüldükleri kültür kabının yüzeyini %80-90 oranında kapladığında hücre stoklama işlemi gerçekleştirildi. İlk olarak flask içindeki besiyeri aspire edildi. Hücre artıklarının uzaklaştırılması ve hücrelerin serumdan arındırılması için hücre kültürü kabı içerisine 1X PBS (Gibco) ilave edildi ve kabın yüzeyi PBS ile yıkandı. Daha sonra PBS aspire edilerek ortamdaki uzaklaştırıldı ve %0,05 Tripsin-EDTA (HyClone, USA)

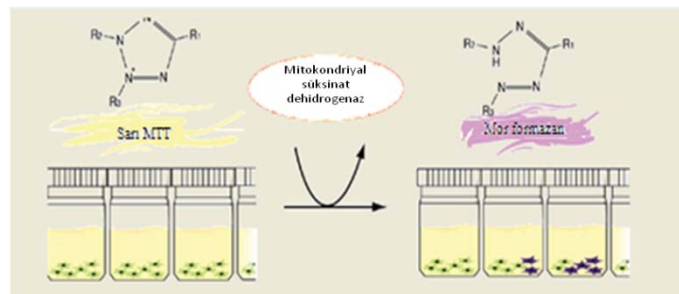
solüsyonu kullanılarak kültür kabu 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub>’li ortamda 5dk inkübe edildi ve böylelikle kabın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskop ile kontrol edildikten sonra birkaç ml serumlu besiyeri eklenerek tripsinli hücreler, eklenen tripsin miktarının 10 katı besiyeri içeren 15ml’lik santrifüj tüpüne toplandı. Santrifüj tüpü 800rpm’e 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve pelet üzerine her bir kriyovial için 1.5ml dondurucu medium (5ml DMSO, Sigma, Almanya + 5ml FBS + 40ml DMEM) karanlık ortamda ilave edildi. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılarak - 80°C’ye kaldırıldı..

### 2.2.3.5.Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10µl alınarak 96 kuyucuklu bir hücre kültürü kabının boş bir kuyusuna eklendi ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi (Biological Industries, İsrail) konarak iyice karışması sağlandı. Hematositometre distile su ile iyice temizlendi. Bu karışımdan 10µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

### 2.2.4.MTT (Metiltiazoltetrazolium) Canlılık Metodu

MTT yöntemi yaşayan hücrelerde gözlenen mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem, yaşayan hücrelerde sarı renkli MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tuzunun, mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi aktivitesi ile suda çözünmeyen mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmesi esasına dayanır (Sylvester 2011) (Şekil 2.1).Dolayısıyla indirgenme ve formazan kristallerinin oluşum bölgelerinin mitokondri olduğu kabul edilmektedir.



Şekil 2.1.MTT reaksiyon şeması (Anonim 2007d).

Hücre sitotoksik bir bileşen ile muamele edildiğinde hücre canlılığı, dolayısıyla MTT tetrazolium tuzunun formazana indirgenmesi azalmaktadır. Sonuç olarak MTT metodu ile canlı ve mitokondriyal fonksiyonları devam eden hücreler mavi-mor renk oluştururken, ölü ya da mitokondriyal fonksiyonları bozulmuş hücreler ise renk meydana getirmemektedir.

Mitokondriyal süksinat dehidrogenaz aktivitesi ile oluşturulan formazan kristalleri suda çözünür durumda değildir, bu kristalleri suda çözünür hale getirmek için SDS (steril distile su içinde %10 sodyum dodesil sülfat+0,01N HCl) kullanılır. Oluşturulan renk şiddeti spektrofotometre ile 570 nm dalga boyunda ölçülür. Ölçüm sonunda, ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerindeki renk şiddeti ile ilaca maruz kalan hücrelerdeki renk şiddeti oranlanarak hücrelerin canlılık oranı (yüzdesi) hesaplanır.

Ko-kültür yöntemi ile kemoterapötik ilaçların (doksetaksel, paklitaksel, cisplatin, karboplatin, etoposid, 5-florourasil, vinorelbin, gemitabin) ortamda fibroblast varlığı ve yokluğunda A549 hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için MTT metodu uygulandı. Bu amaçla, ko-kültür için tasarlanmış olan 96 kuyucuklu ko-kültür kabının taban kısmına A549 hücreleri 100µl içinde  $7.5 \times 10^3$  olacak şekilde ekildi. Ko-kültür kabının 0.4µm por genişliğine sahip olan ve “insert” olarak adlandırılan iç kuyularının yarısına fibroblast hücreleri  $1.5 \times 10^3$  50µl içinde ekilirken, diğer yarısına sadece 50µl besiyeri eklendi. Kör olarak kullanılan kuyuların tabanına 100µl, iç kuyularına 50µl besiyeri eklendi.

Sonuç olarak her bir ilaç için iki kuyu fibroblast varlığında, iki kuyu fibroblast yokluğunda değerlendirme yapılacak şekilde fibroblast ekimi gerçekleştirildi.

Hücrelerin yapışması için 37<sup>0</sup>C’de %5’lik CO<sub>2</sub>’li etüvde 24 saatlik inkübasyon sonrası tedaviler uygulandı. Kemoterapi ilacı uygulaması öncesi tabandaki A549 hücrelerinin her bir kuyusundan 50µl besiyeri uzaklaştırıldı. Tüm kemoterapi ilaçları son konsantrasyonları plazma dozuna karşılık gelen doz olan 100 TDC (test drug concentration) dozunda, hem A549 hücrelerine, hem de fibroblast hücrelerine son hacimler 100µl olacak şekilde uygulandı. Ardından hücreler, 48 saat 37<sup>0</sup>C, %5 CO<sub>2</sub>’li ortamda inkübasyona bırakıldı.

MTT kimyasalı, PBS tamponu içerisinde 5mg/ml ve pH=7.2 olacak şekilde stok olarak hazırlandı. Hazırlanan MTT çözeltisi filtre edilerek steril hale getirildi. 48 saat sonunda 96 kuyucuklu ko-kültür kabından iç kuyular uzaklaştırıldı ve tabandaki A-549 hücreleri için her bir kuyucuğa 10µl MTT boyası eklendikten sonra hücreler 37<sup>0</sup>C'de 4 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

Oluşan formazan kristallerini çözünür hale getirmek için bütün kuyucukların üzerine %10'luk SDS solüsyonundan 50µl eklenerek 18 saat 37<sup>0</sup>C'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde oluşan renk şiddeti spektrofotometrede (FLASHScan S12, Jena, Almanya) 570nm dalga boyunda ölçüldü ve okunan absorbanslar kullanılarak hücrelerin canlılık oranları belirlendi.

96 kuyucuklu ko-kültür kabının iç kuyucuklarında bulunan hücrelerin tek başına ilaçlara yanıtını belirlemek için fibroblast hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültürü kabına 10x10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde ekildi ve hücrelerin yapışması için 24saat 37<sup>0</sup>C'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kemoterapi ilaçları (doksetaksel, paklitaksel, cisplatin, karboplatin, etoposid, 5-florourasil, vinorelbin, gemitabin) son hacim 200µl ve son konsantrasyon 100 TDC olacak şekilde eklendi. Hücreler 37<sup>0</sup>C'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 48 saat inkübe edildi.

#### % Canlılık hesabı:

İlaç uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı %100 olarak kabul edilerek, ilaç uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

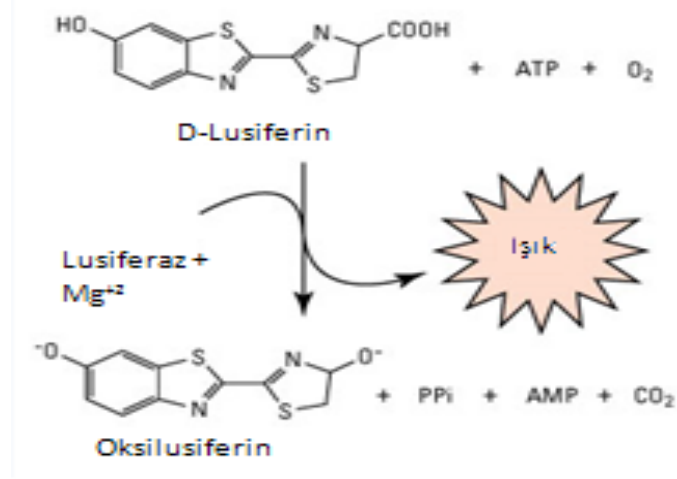
$$\% \text{ Canlılık} = [100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama})]$$

#### **2.2.5.ATP (Adenozin Trifosfat) Canlılık Metodu**

Bu yöntemin prensibi hücre kültüründe büyütülen kanser (veya herhangi bir çeşit) hücrelerindeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanır (Andreotti ve ark. 1995). ATP seviyesi ölçümü lüminesans teknolojisine dayandığı için canlı hücre sayısı ile mükemmel bir korelasyon göstermektedir ve kolorimetrik bir test olan MTT testine göre daha hassas ve güvenilirdir (Ulukaya ve ark. 2008).



ATP yöntemi; lüsiferinin  $Mg^{+2}$  iyonları ve ATP varlığında lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olup lüminesans sinyal oluşturmasına dayanmaktadır (Şekil 2.2). Lüminesans sinyal (ATP konsantrasyonu) ile hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Andreotti ve ark., 1995; Mueller ve ark., 2004).



**Şekil 2.2.** Lüsiferinin  $Mg^{+2}$  iyonları ve ATP varlığında lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olması ile ışık (luminesans sinyal) oluşumu (Anonim 2013b).

Hücrede herhangi bir neden (kemoterapötik ilaçlar ya da mitokondriyal toksinler vb.) öldürücü bir hasar meydana geldiğinde ATP düzeyi büyük ölçüde azalmaktadır.

Hücre sayısı ile ATP düzeyi korele olduğundan ko-kültür yöntemi ile kemoterapi ilaçlarının (doksetel, paklitaksel, cisplatin, karboplatin, etoposid, 5-florourasil, vinorelbin, gemsitabin) ortamda fibroblast varlığı ve yokluğunda A549 hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için ATP metodu uygulandı.

Bu amaçla, ko-kültür için tasarlanmış olan 96 kuyucuklu ko-kültür kabının taban kısmına A549 hücreleri 100µl içinde  $7.5 \times 10^3$  olacak şekilde ekildi. Ko-kültür kabının 0.4µm por genişliğine sahip olan ve “insert” olarak adlandırılan iç kuyularının yarısına fibroblast hücreleri  $1.5 \times 10^3$  50µl içinde ekilirken, diğer yarısına sadece 50µl besiyeri eklendi. Sonuç olarak her bir ilaç için iki kuyu fibroblast varlığında, iki kuyu fibroblast yokluğunda değerlendirme yapılacak şekilde fibroblast ekimi gerçekleştirildi.

Hücrelerin yapışması için 37<sup>0</sup>C’de %5’lik CO<sub>2</sub>’li inkübatörde 24 saatlik inkübasyon sonrası tedaviler uygulandı. Kemoterapi uygulaması öncesi tabandaki A549 hücrelerinin her bir kuyusundan 50µl besiyeri uzaklaştırıldı.

Daha sonra tüm kemoterapi ilaçları son konsantrasyonları plazma dozuna karşılık gelen doz olan 100 TDC (test drug concentration) dozunda, hem A549 hücrelerine, hem de fibroblast hücrelerine son hacimler 100µl olacak şekilde uygulandı. Ardından hücreler, 48 saat 37<sup>0</sup>C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

*Negatif kontrol* (maksimum canlılık, MO, muamele uygulanmamış hücre kontrolü) için 100µl besiyeri içerisine 7.5×10<sup>3</sup> A549 ve iç kuyucuklara 1.5×10<sup>3</sup> fibroblast ekildi.

*Pozitif kontrol* (minimum canlılık, MI, %100 öldüren doz) olarak, 100µl besiyeri içerisine 7.5×10<sup>3</sup> A549 ve iç kuyucuklara 1.5×10<sup>3</sup> fibroblast ekildi. 24 saatlik inkübasyon sonrası kemoterapi ilaçları uygulaması sırasında tabandaki A549 hücrelerinin her bir kuyusundan 50µl besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelerin üzerine hücre ölümünü %100 indüklediği bilinen %1'lik Triton X-100 (Sigma, Almanya) çözeltisinden son hacim 100µl olacak şekilde ilave edildi. Hücreler 37<sup>0</sup>C'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakıldı.

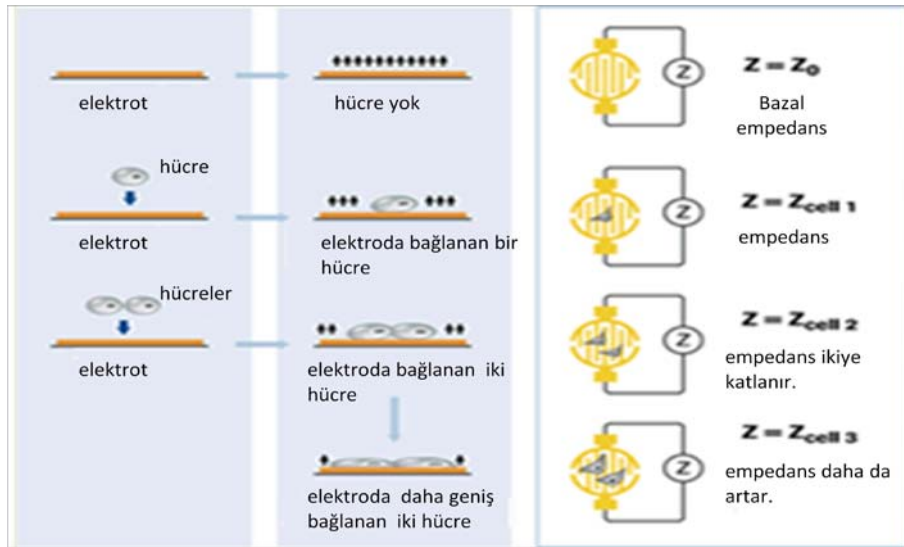
İnkübasyon süresi sonunda intraselüler ATP içeriğinin belirlenmesi için ATP kiti (Adenosine 5'-triphosphate bioluminescent somatic cell assay kit, Sigma, Almanya) kullanıldı. Öncelikle kit içerisinde yer alan hücre lizis tamponundan kuyu başına 50µl eklendi ve böylelikle hücre içindeki ATP'nin hücre dışına çıkması sağlandı. 20 dakika oda ısısında inkübasyon sonrası hücre süspansiyonundan 50'şer µl beyaz renkli 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına (Corning Incorporated, USA) aktarıldı ve her bir kuyuya 50µl lusiferin-lusiferaz enzimi içeren solüsyon eklendi. Reaksiyon sonunda oluşan ATP miktarı (lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla), ölçme zamanı 2 saniye olacak şekilde luminometre (Bio-Tek, Winooski, USA) kullanılarak ölçüldü. Böylece bileşiklerle muamele edilen ve edilmeyen hücrelerin RLU değerlerine göre, bileşiklerin sitotoksik/sitostatik etkileri hakkında bilgi edinildi.

% Canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Canlılık} = [100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbanası ortalaması} - \text{MI}) / (\text{Kontrol hücre absorbanası ortalaması} - \text{MI})]$$

### 2.2.6.xCELLigence Teknolojisi ile Gerçek Zamanlı Empedans Analizi

Hüresel olaylar xCELLigence sistemi ile hiçbir işaretleme yapmadan gerçek zamanlı olarak analiz edilebilmektedir. Sistem, hücre kültürü E-Plate'lerinin zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrodlar sayesinde, gerçek zamanlı hüresel durumu belirlemek için elektriksel empedans ölçer. Bu ölçüm sırasında elektrotlara uygulanan gerilim yaklaşık 20 mV civarındadır. Düşük voltajlı alternatif akım sinyallerinin uygulanması ile elektrodlar arasında bir elektrik alanı oluşmasına sebep olur. Sensör elektrodlarının elektronik empedansı; elektrotlar üzerindeki hücrelerin fiziksel değişikliklerinin izlenmesine ve belirlenmesine izin vermek için ölçülmektedir. Elektrotlar arasında ölçülen empedans, elektrot geometrisine, iyon konsantrasyonuna ve hücrelerin elektrotlara bağlı olup olmamasına bağlıdır (Şekil 2.3). Hücrelerin yokluğunda elektrot empedansı, elektrot çözeltisi ara yüzeyinde ve bütün çözeltideki iyon ortamı ile belirlenmektedir. Hücrelerin varlığında, elektrot sensörü yüzeyine hareket eden hücreler yalıtkanlar olarak davranmaktadır. Empedans okuması; hücre sayısı, hücre canlılığı, hücre ölümü, hücre morfolojisi ve adezyonundaki değişiklikleri belirler ve hücrelerin bu biyolojik durumları hakkında kantitatif bilgi verir (Urcan ve ark. 2010, Anonim, 2012a).



Şekil 2.3. Empedans ölçüm şeması (Anonim, 2012b)

xCELLigence gerçek zamanlı analiz sisteminde; hücreler altın mikroelektrodlarla kaplanmış olan ve "E-plate" olarak adlandırılan özel 96 kuyucuklu kültür kabına ekilir. Bu elektrotlar; kuyucuklar içerisindeki besiyerinin iyonik çevresi ile etkileşim halinde olduğundan elektrotları saran hücrelerin sayısı, morfolojisi ve yapışma gücüyle sürekli olarak değişebilir.

xCELLigence sistemi A549 hücrelerinin fibroblast varlığında ya da yokluğunda kemoterapi ilaçlarına olan yanıtını gerçek zamanlı olarak görüntüleyerek, hücre büyümesi, proliferasyonu, morfolojik değişiklikleri ve canlılığını görüntülemek için kullanılmıştır.

xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi için özel olarak dizayn edilmiş 96 kuyucuklu ko-kültür kabının taban kısmında her kuyuya 50 µl besiyeri koyuldu ve 30 dakika 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyonu takiben bazal ölçüm yapılmak üzere E-plate xCELLigence cihazına yerleştirildi. Bazal ölçüm sonrası A549 hücreleri 50 µl besiyeri içinde 7.5x10<sup>3</sup> olacak şekilde ekildi. Ko-kültür kabının 0.4µm por genişliğine sahip olan ve "insert" olarak adlandırılan iç kuyularının yarısına fibroblast hücreleri 1.5x10<sup>3</sup> 50µl içinde ekilirken, diğer yarısına sadece 50µl besiyeri eklendi. Sonuç olarak her bir ilaç için iki kuyu fibroblast varlığında, iki kuyu fibroblast yokluğunda değerlendirme yapılacak şekilde fibroblast ekimi gerçekleştirildi.

Hücrelerin yapışması için 37<sup>0</sup>C'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 24 saatlik inkübasyon sonrası tedaviler uygulandı. Kemoterapi uygulaması öncesi tabandaki A549 hücrelerinin her bir kuyusundan 50µl besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra tüm kemoterapi ilaçları son konsantrasyonları plazma dozuna karşılık gelen doz olan 100 TDC (test drug concentration) dozunda, hem A549 hücrelerine, hem de fibroblast hücrelerine son hacimler 100µl olacak şekilde uygulandı. Ardından hücreler, 37<sup>0</sup>C, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde xCELLigence cihazında 48 saat inkübasyona bırakıldı.

### **2.2.7.Hoechst 33342, Propidiyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi**

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatinini ve dolayısıyla nükleusu görünür hale getirmektedirler. Hoechst 33342, hücre membranından geçebilen ve DNA'ya bağlanabilen bir boyadır. Canlı ve ölü (apoptotik / nekrotik) hücrelerin nükleuslarını boyamak için kullanılmaktadır.

Propidium iyodür (PI), sadece membranı hasarlı hücrelere girebilen, dolayısıyla primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik hücreleri boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır.

Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır. Primer nekrozis (hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nükleusların gözlenmemesi) toksik koşullar (hipoksi, iskemi, hipertermi, vb.) altında gerçekleşen klasik ölüm şeklidir.

Sekonder nekrozis ise, piknotik ya da fragmente nukleus ile karakterize olup, apoptozisin geç safhasıdır.

Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları intakt (erken apoptozda) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptozis / sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde hücreler non-vital boyalar denilen (PI) boyalar ile boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen membran intakt olmasından dolayı bu boylarla boyanamazlar. Yani PI negatif ve Hoechst boyası pozitif boyanmaktadırlar. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla PI pozitif ve Hoechst pozitif boyanmaktadırlar (Ulukaya ve ark., 2011).

İkili boyama yöntemi kullanılarak bileşiklere maruz kalmış hücrelerin ölüm şekilleri, nükleus morfolojisine bakılarak yapılabilir. Apoptotik hücrelerde; çekirdeğin normal hücrelere göre daha küçük olma özelliği aranırken, nekrotik hücrelerde ise çekirdeğin normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özelliği aranmaktadır. Bu amaçla, ko-kültür yönteminde kullanılan fibroblastların kemoterapi ilaçlarına (dozetaksel, paklitaksel, cisplatin, karboplatin, etoposid, 5-florourasil, vinorelbin, gempitabin) yanıtının morfolojik olarak değerlendirilmesi için ikili boyama yöntemi kullanıldı.

İkili boyama yöntemi için, fibroblast hücreleri kuyu başına  $10 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 100µl besiyeri içinde ekildi.  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda 24 saat inkübasyonu takiben tüm kemoterapi ilaçları son konsantrasyonları plazma dozuna karşılık gelen doz olan 100 TDC (test drug concentration) dozunda, hücrelerin üzerine son hacimler 200µl olacak şekilde uygulandı. Ardından hücreler,  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında kit (Cell Viability Imaging, Roche, Almanya) içerisinde bulunan 2 bileşenin (Hoechst 33342, Propidium Iodide (PI)) oda ısısına gelmesi sağlandı ve her biri kısa süreli vorteks yapıldı. 5 ml Hoechst, 5ml PBS (1×,  $\text{CaCl}_2+$ ,  $\text{MgCl}_2+$ ) içerisine pipetlendi ve kısa bir vorteks yapıldı. PI hazırlanan karışım içine 25µl pipetlendi ve kısa bir vorteks yapıldı. 96 kuyucuklu kültür kabındaki hücreler üzerinden 50µl besiyeri

hücrelere zarar vermeden uzaklaştırıldı ve her kuyuya 50 µl hazırlanmış olan bu karışımdan ilave edildi. Her kuyuda hücreleri kaldırmamaya dikkat edilerek pipetaj yapıldı. Hücre kültür kabı 37°C, %5 CO<sub>2</sub> 'li ortamda 30 dk inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrasında floresan mikroskop altında değerlendirme yapıldı.

### **2.2.8. Anneksin-V-FITC Boyama Yöntemi**

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde membranın iç kısmında yerleşmiş olarak bulunan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne yer değiştirirler. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir.

Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir (Bratton ve ark. 1997, Gatti ve ark. 1998, Overbeeke ve ark. 1998, Tesarik ve ark. 1998, Zhang ve ark. 1997). Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Annexin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan propidium iodide (red fluorescence) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITC+PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin verir (Kockx ve ark. 1998, Overbeeke ve ark. 1998, Tesarik ve ark. 1998, Ulukaya ve ark. 2011).

Anneksin-V boyama yöntemi için, fibroblast hücreleri kuyu başına  $10 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 100µl besiyeri içinde ekildi. 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 24 saat inkübasyonu takiben tüm kemoterapi ilaçları son konsantrasyonları plazma dozuna karşılık gelen doz olan 100 TDC (test drug concentration) dozunda, hücrelerin üzerine son hacimler 200µl olacak şekilde uygulandı. Ardından hücreler, 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonunda hücreleri zedelemekten üzerlerinden tüm besiyeri (yaklaşık 180 µl) uzaklaştırılarak Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche, Mannheim, Germany) içeriğine uygun olarak çalışıldı. 500 µL Incubation Buffer içerisine 5 µL Annexin-V-Fluorescein ve 5 µL Propidium Iodide boyası pipetlendi. Ayrıca hücrelerin nükleus morfolojisini de bakmak amacıyla Hoechst 33342 (200 µg/ml) boyası son

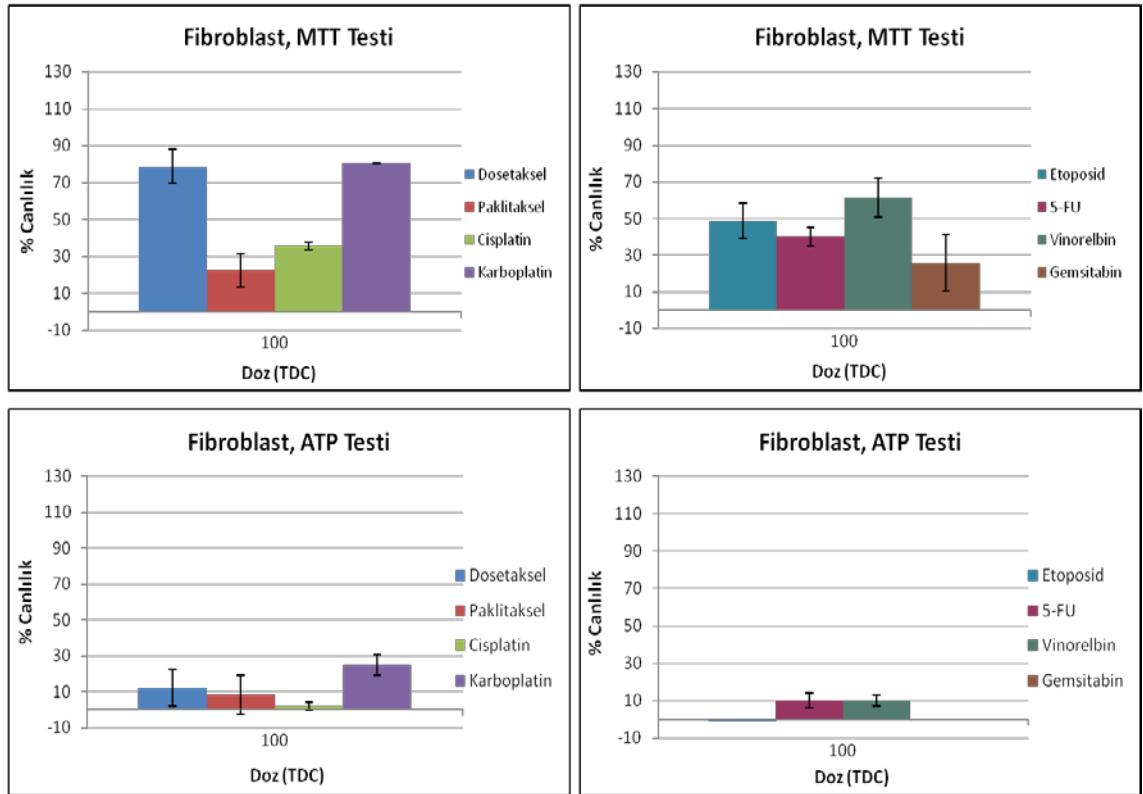
konsantrasyonu 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (40X sulandırılarak) olacak şekilde bu karışıma eklendi. Her kuyuya boya karışımından 30  $\mu\text{L}$  pipetlenerek yarım saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda floresan mikroskop altında değerlendirme yapıldı.

### 3.BULGULAR

#### 3.1.MTT ve ATP Canlılık Testi Bulguları

Hücre soylarına 48 saat süre ile 8 farklı kemoterapi ilacı (dosetaksel, paklitaksel, cisplatin, karboplatin, etoposid, 5-FU, vinorelbin, gemsitabin) 100 TDC dozunda uygulandığında ortaya çıkan sonuçlar Şekil 3.1 ve 3.2’de gösterilmiştir.

Ko-kültür yönteminde iç kuyularda yer alan fibroblastların tek başınayken ilaçlara verdiği yanıtı belirlemek için 96 kuyucuklu hücre kültürü kapları kullanıldı. Aynı kemoterapi ilaçları, aynı dozlarda tek başına fibroblastlara uygulanarak MTT ve ATP Canlılık testleri yapıldı. İlaçlara 48 saatlik maruziyet sonrası meydana gelen sonuçlar şekil 3.1’de gösterilmiştir



**Şekil 3.1.** Farklı kemoterapi ilaçlarının 100 TDC dozu ile muamele edilen fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir sütun üç tekrarlı, 2 bağımsız deney sonucunu temsil etmektedir.

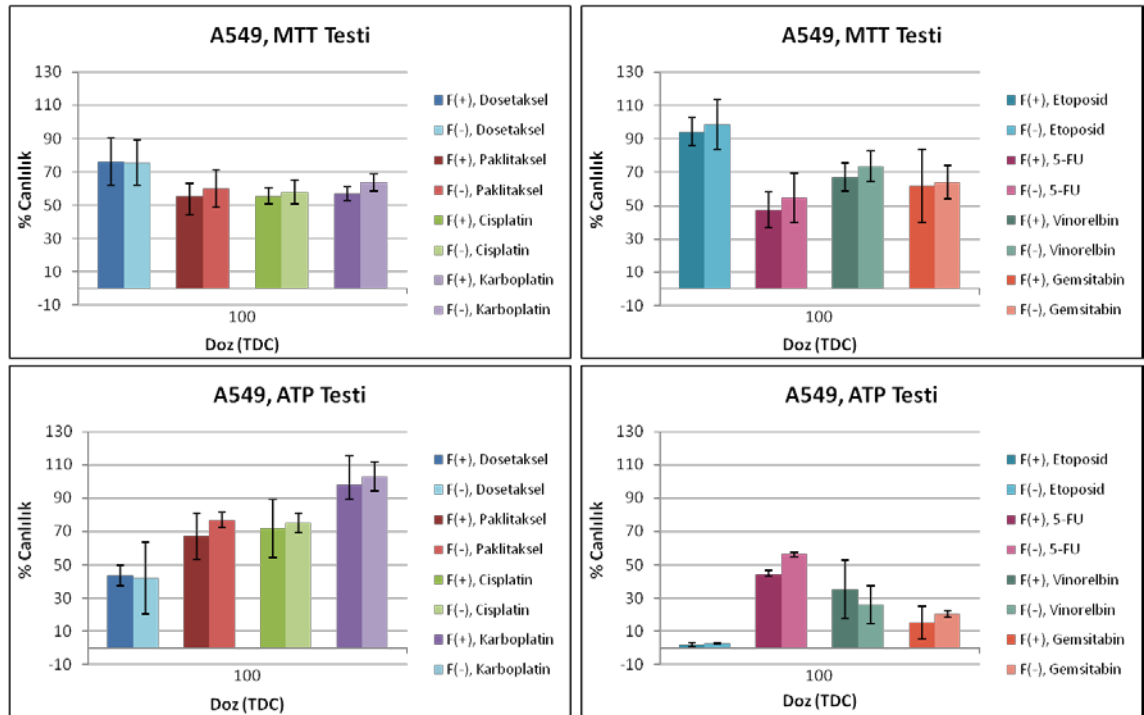
\*Üst satır MTT testi sonuçlarını, alt satır ATP testi sonuçlarını göstermektedir.



Fibroblastlar ile yapılan MTT ve ATP canlılık testi sonuçları incelendiğinde ATP testinin MTT testine kıyasla çok daha hassas olduğu gözlemlendi. MTT canlılık testi sonuçlarına göre, kemoterapi ilaçlarının 100 TDC dozundaki etkilerine bakıldığında fibroblast hücreleri için en etkili kemoterapötik ilaçların paklitaksel (%22 canlılık), gemsitabin (%26 canlılık) ve cisplatin (%35 canlılık) olduğu saptandı.

ATP canlılık testi sonuçlarına bakıldığında ise, tüm ilaçlar için hücre canlılığının önemli oranda azaldığı (%30'un altına düştüğü) görüldü.

Ardından ko-kültür yöntemi ile, A549 akciğer kanseri hücre hattı ile akciğer kanseri dokusundan izole edilen fibroblastların indirekt etkileşimi sağlandı. 100 TDC dozunda kemoterapi ilaçları (dosetaksel, paklitaksel, sisplatin, karboplatin, etoposid, 5-florourasil, vinorelbin, gemsitabin) 48 saat süreyle uygulandı. A549 hücrelerinin fibroblastların varlığında ilaçlara olan yanıtının değişip değişmediği (hücre ölümünü modifiye edip etmediği) MTT ve ATP canlılık testleri ile belirlendi. Sonuçlar şekil 3.2'de gösterilmiştir.



**Şekil.3.2.**Farklı kemoterapi ilaçlarının 100 TDC dozula muamele edilen A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda canlılık yüzdelерinin grafiğı. Her bir sütun iki tekrarlı, 2 bağımsız deney sonucunu temsil etmektedir.

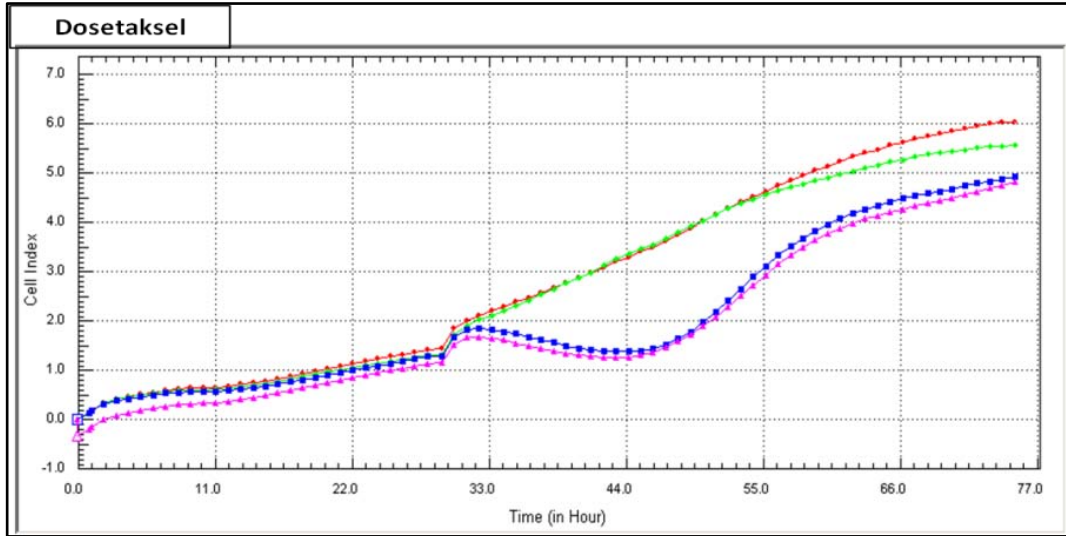
\*Üst satır MTT testi sonuçlarını, alt satır ATP testi sonuçlarını göstermektedir.

\*F(+); ortamda fibroblast varlığını, F(-); ortamda fibroblast bulunmadığını ifade etmektedir.

A549 hücreleri ile yapılan MTT ve ATP canlılık testi grafikleri incelendiğinde, fibroblast varlığı ya da yokluğunun A549 hücre ilaç yanıtı üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla kemoterapi ilaçları etkisiyle ölen fibroblast hücreleri A549 hücrelerinin canlılığında bir değişikliğe yol açmamıştır.

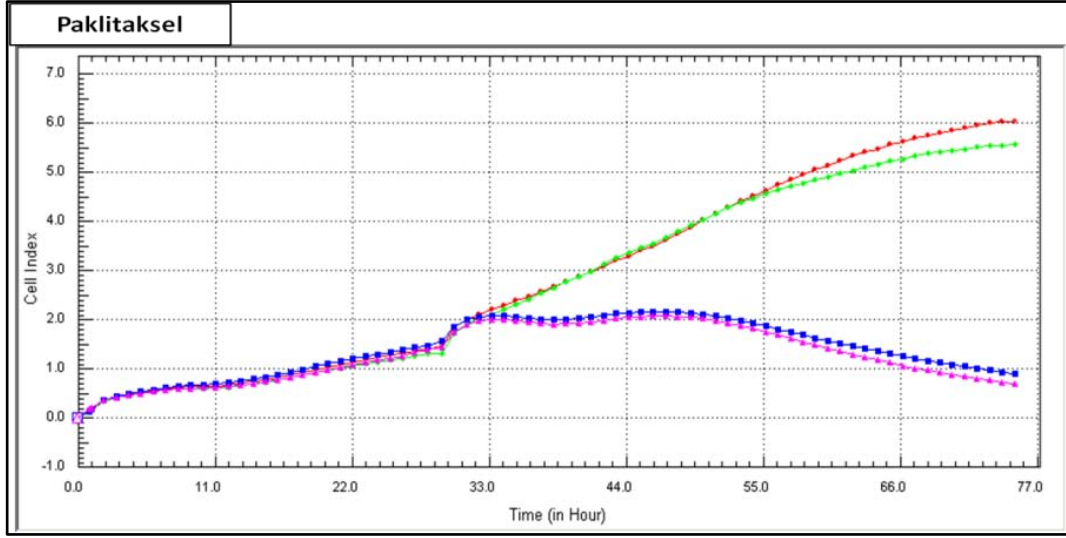
### 3.2. Gerçek zamanlı xCELLigence empedans analizi bulguları

A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda kemoterapi ilaçlarına (dosetaksel, paklitaksel, cisplatin, karboplain, etoposid, 5-FU, vinorelbin, gemitabin) olan yanıtı kökültür yönteminin xCELLigence sistemiyle birlikte uygulanması ile gerçek zamanlı olarak izlendi. Hücrelerin ilaca maruziyet sonrası empedans değişikliği şekil 3.3.1, şekil 3.3.2, şekil 3.3.3, şekil 3.3.4, şekil 3.3.5, şekil 3.3.6, şekil 3.3.7 ve şekil 3.3.8'de gösterildi.



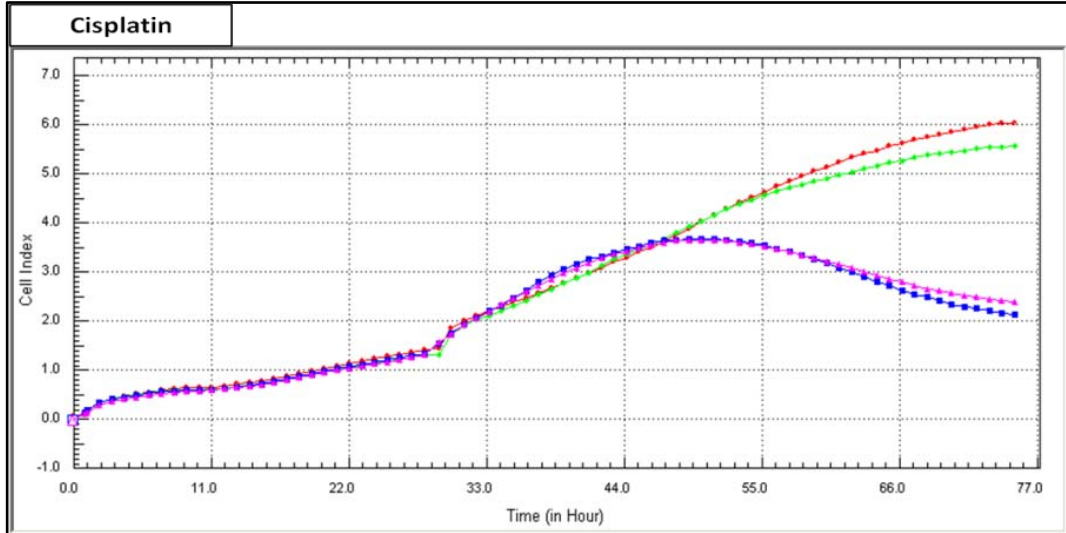
Şekil 3.3.1. A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda dosetaksele yanıtının xCELLigence grafiği.

Dosetaksel için, xCELLigence grafiğine bakıldığında, 28. saatte 100 TDC dosetaksel uygulamasını takiben fibroblastlı (mavi) ve fibroblastsız (pembe) hücrelerinin empedansı 44. saate kadar bir miktar azaldıktan sonra tekrar artmaya başladı. İlaç uygulanmayan kontrol hücrelerinde de [fibroblastsız (yeşil), fibroblastlı (kırmızı)], empedans artışı devam etti yani hücreler çoğalmaya devam etti.



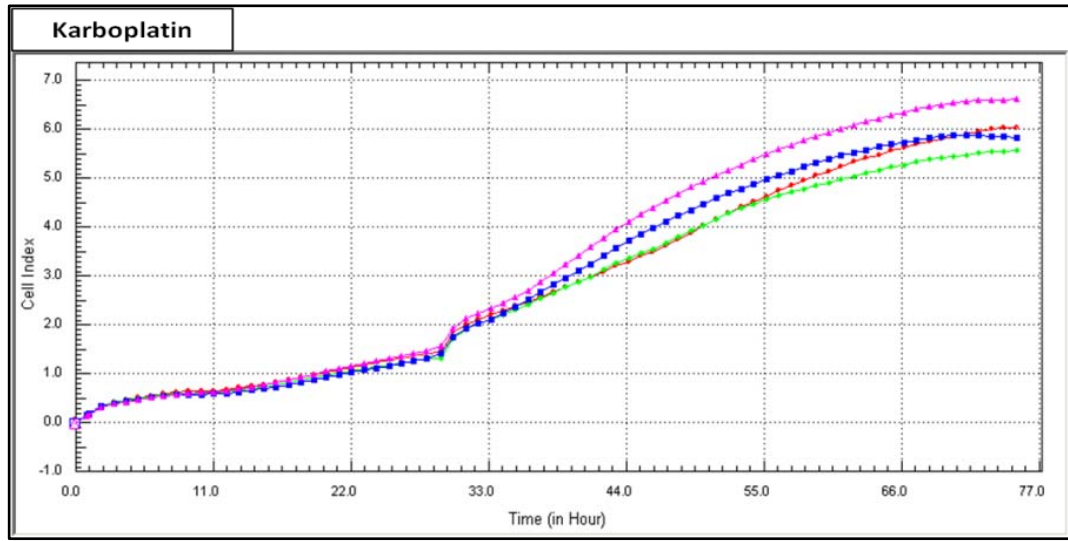
**Şekil 3.3.2.** A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda paklitaksele yanıtının xCELLigence grafiği.

Paklitaksel için, xCELLigence grafiğine bakıldığında, 28. saatte 100 TDC paklitaksel uygulamasını takiben fibroblastlı (mavi) ve fibroblastsız (pembe) hücrelerinin empedansı giderek azaldı. İlaç uygulanmayan kontrol hücrelerinde de [fibroblastsız (yeşil), fibroblastlı (kırmızı)], empedans artışı devam etti.



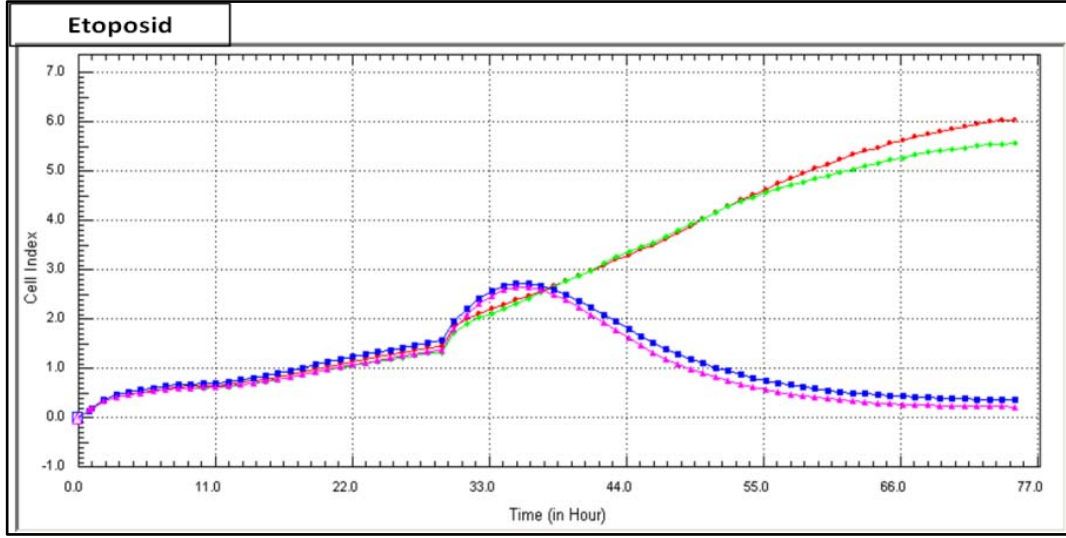
**Şekil 3.3.3.** A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda cisplatine yanıtının xCELLigence grafiği.

Cisplatin etkisini değerlendirmek için xCELLigence grafiğine bakıldığında, 28. saatte 100 TDC cisplatin uygulamasını takiben fibroblastlı (mavi) ve fibroblastsız (pembe) hücrelerinin empedansında bir süre değişiklik gözlenmedi, ancak 52. saatten itibaren empedans giderek azaldı. İlaç uygulanmayan kontrol hücrelerinde de [fibroblastsız (yeşil), fibroblastlı (kırmızı)], empedans artışı devam etti.



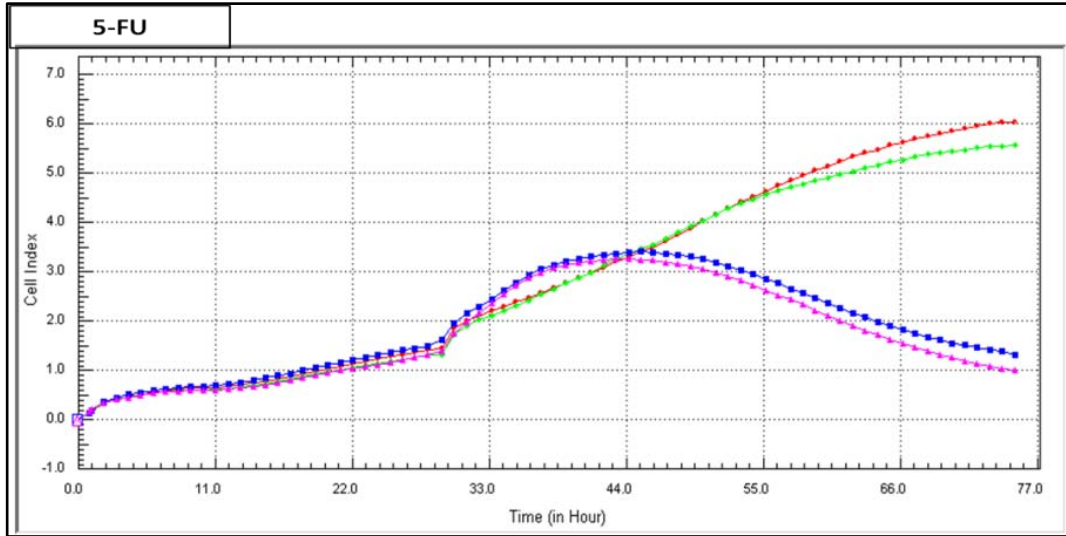
**Şekil 3.3.4.** A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda karboplatine yanıtının xCELLigence grafiği.

Karboplatin etkisini değerlendirmek için xCELLigence grafiğine bakıldığında, 28. saatte 100 TDC karboplatin uygulamasını takiben fibroblastlı (mavi) ve fibroblastsız (pembe) hücrelerinin empedansında bir süre değişiklik gözlenmedi, empedans kontrol hücrelerine benzer şekilde artmaya devam etti. İlaç uygulanmayan kontrol hücrelerinde de [fibroblastsız (yeşil), fibroblastlı (kırmızı)], empedans artışı devam etti.



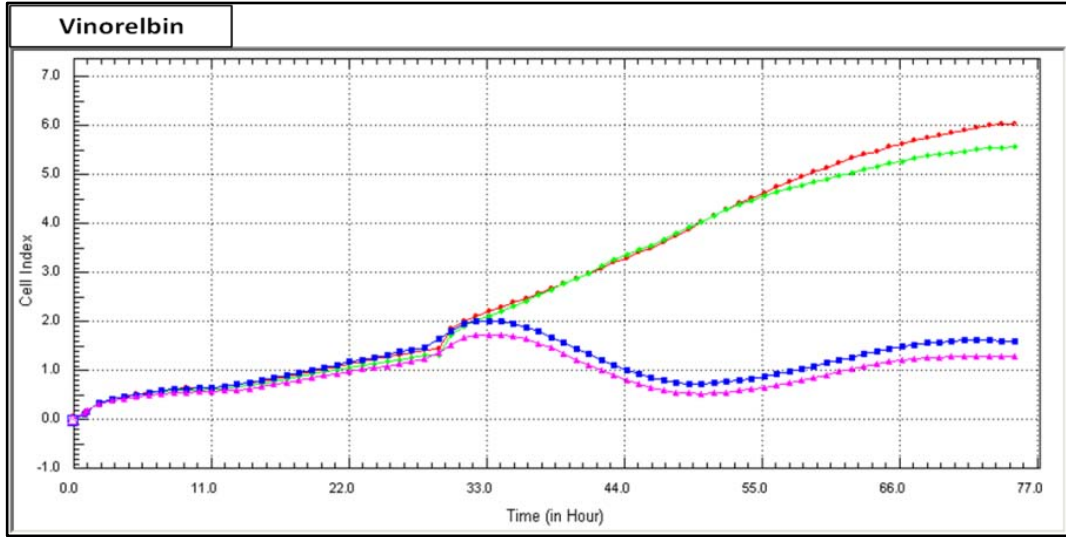
Şekil 3.3.5. A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda etoposide yanıtının xCELLigence grafiği.

Etoposid için xCELLigence grafiğine bakıldığında, 28. saatte 100 TDC etoposid uygulamasını takiben fibroblastlı (mavi) ve fibroblastsız (pembe) hücrelerinin empedansı giderek azaldı. İlaç uygulanmayan kontrol hücrelerinde de [fibroblastsız (yeşil), fibroblastlı (kırmızı)], empedans artışı devam etti.



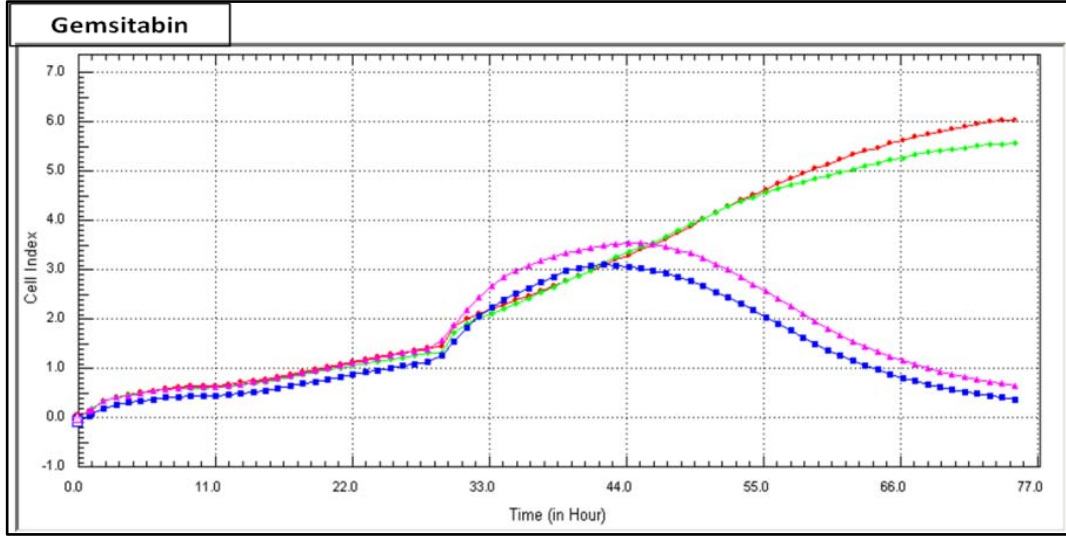
Şekil 3.3.6. A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda 5-FU'yanıtının xCELLigence grafiği.

5-FU etkisini değerlendirmek için xCELLigence grafiğine bakıldığında, 28. saatte 100 TDC 5-FU uygulamasını takiben fibroblastlı (mavi) ve fibroblastsız (pembe) hücrelerinin empedansı giderek azaldı. İlaç uygulanmayan kontrol hücrelerinde de [fibroblastsız (yeşil), fibroblastlı (kırmızı)], empedans artışı devam etti.



Şekil 3.3.7. A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda vinorelbine yanıtının xCELLigence grafiği.

Vinorelbine etkisini değerlendirmek için xCELLigence grafiğine bakıldığında, 28. saatte 100 TDC vinorelbine uygulamasını takiben fibroblastlı (mavi) ve fibroblastsız (pembe) hücrelerinin empedansı giderek azaldı. İlaç uygulanmayan kontrol hücrelerinde de [fibroblastsız (yeşil), fibroblastlı (kırmızı)], empedans artışı devam etti.



**Şekil 3.3.8.** A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda gemsitabin yanıtının xCELLigence grafiği.

Gemsitabin etkisini değerlendirmek için xCELLigence grafiğine bakıldığında, 28. saatte 100 TDC gemsitabin uygulamasını takiben fibroblastlı (mavi) ve fibroblastsız (pembe) hücrelerinin empedansı 44. saate kadar arttı. 44. Saatten itibaren ilaç uygulanan hücrelerin empedansı azalmaya başladı. İlaç uygulanmayan kontrol hücrelerinde de [fibroblastsız (yeşil), fibroblastlı (kırmızı)], empedans artışı devam etti.

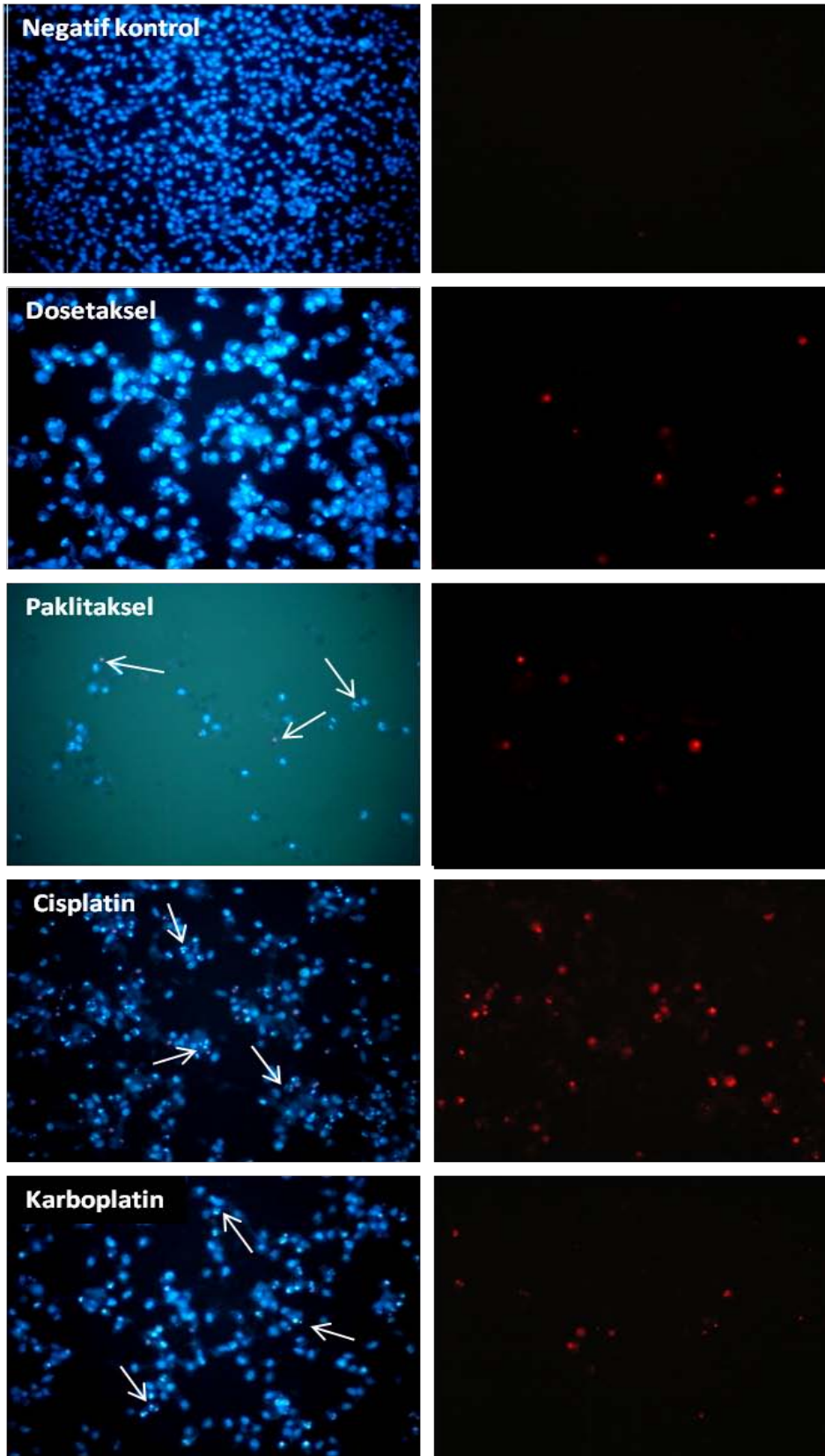
### **3.3.Hoechst 33342, Propidium İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi Bulguları**

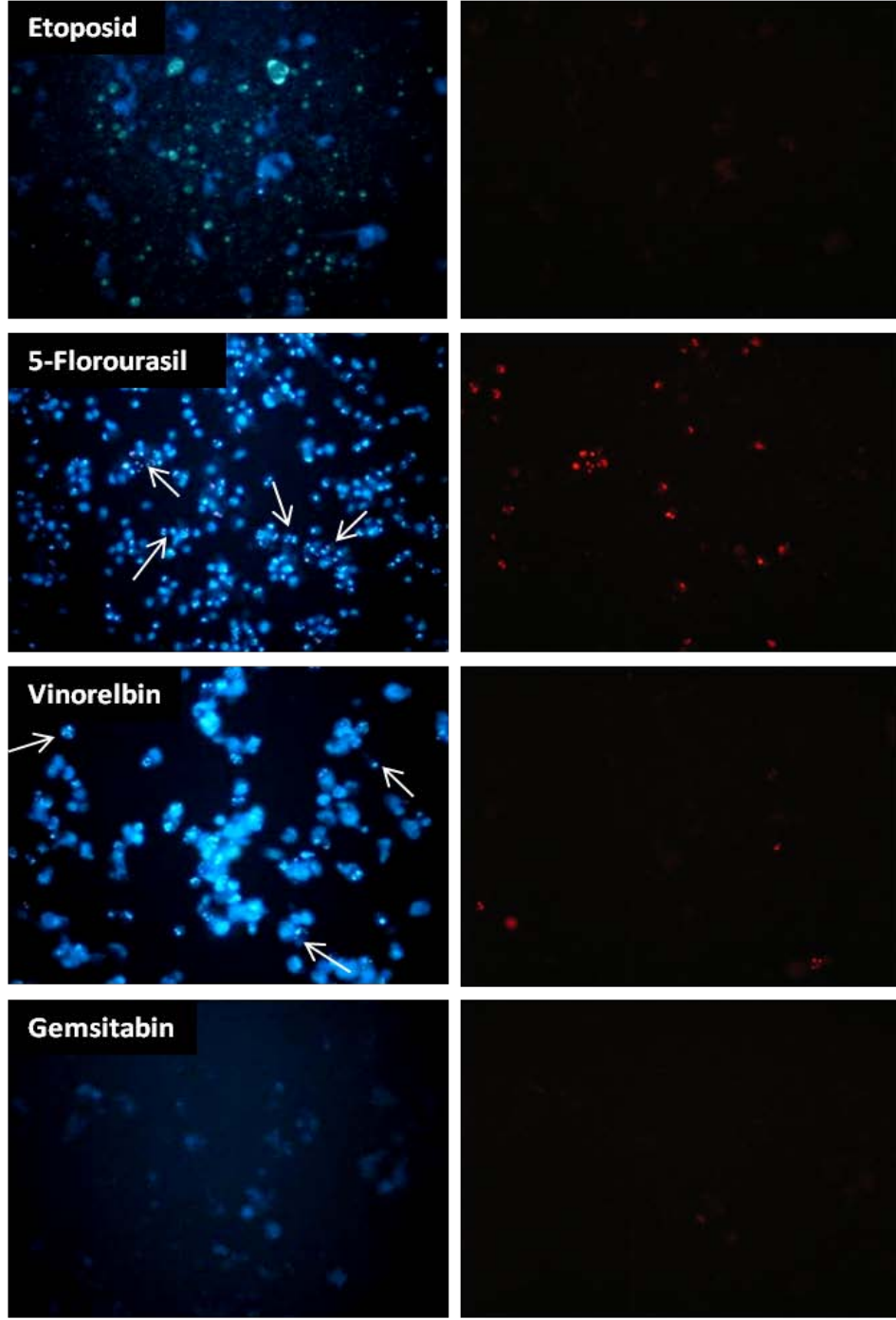
Ko-kültür yönteminde A549 hücrelerinin fibroblast varlığındaki etkilerini daha iyi değerlendirebilmek için fibroblastlar tek başına 48 saat süreyle çeşitlikemoterapötiklerle (dosetaksel, paklitaksel, cisplatin, karboplatin, etoposid, 5-florourasil, vinorelbin, gemsitabin ilaçları, 100 TDC dozunda) inkübe edildi.İnkübasyonu takiben, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen Hoechst 33342 boyası ile sadece ölü hücreleriboyayabilen propidyum iyodür, birlikte kullanıldı. İnkübasyon sonunda, nükleusları Hoechst 33342 boyasıyla mavi renk boyanmış canlı ve ölü hücreler ile nükleusları propidyum iyodür boyasıyla kırmızı renk boyanmış ölü hücreler, floresan mikroskopunda değerlendirildi. Boyanan hücrelerin fotoğraflanması 10x objektif ile floresan mikroskobu altında yapıldı (Şekil 3.5).

Boyama sonuçları incelendiğinde;

- Gemcitabin uygulanan kuyucuklarda 48 saatin sonunda hücre silüetlerinin neredeyse tamamen ortadan kaybolduğu gözlemlendi.
- Etoposid uygulanan kuyucuklarda kalan az sayıdaki hücrelerin birkaç tanesinde piknotik nükleus varlığı gözlemlendi.
- Cisplatin, 5-FU ve vinorelbine piknotik nükleus ve/veya fragmente nükleus varlığı belirlendi. Hoechst boyası ile nükleer fragmentasyon motifleri içerdiği gözlenen hücrelerin aynı zamanda PI ile de boyandığı görüldü. Bu durum hücre ölüm modunun geç apoptozis=sekonder nekroz olduğunu düşündürdü.
- Doksitaksel, paklitaksel ve karboplatine ise piknotik nükleusların sadece bir kısmının PI boyası ile pozitif boyandığı, dolayısıyla bu hücrelerin ölüm modunun geç apoptozis olduğu, piknotik varlığı gözlenen bazı alanların ise PI ile boyanmadığı ve bu hücrelerin de ölüm modunun erken dönem apoptozis olduğu belirlenmiştir.







**Şekil 3.5.** 100 TDC dozlarında kemoterapötiklerin uygulandığı fibroblast hücrelerinin ilaçlarla 48 saat muamelesi sonrasındaki Hoechst 33342 (sol sütun) ve PI (sağ sütun) boyama görüntüleri.

→ Hücre ölüm şekli olarak apoptozisi temsil eden piknotik ve/veyafragmentenükleus varlığını göstermektedir.

### 3.4. Anneksin-V-FITC Boyama Bulguları

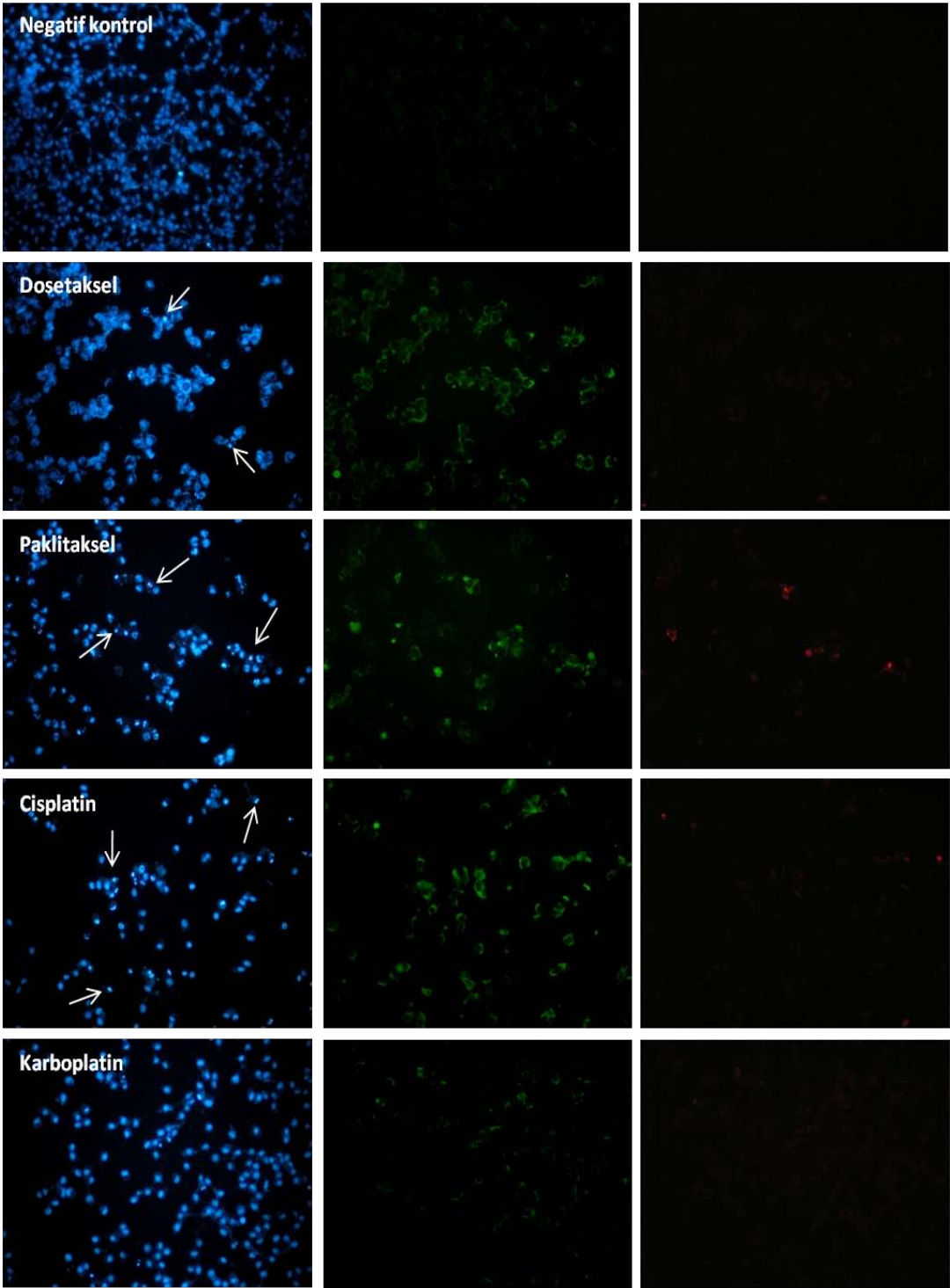
Apoptozisin erken dönem belirteci olarak kabul edilen Anneksin-V boyama yöntemindenekrotik hücreleri ayırmak için Anneksin-V-FITC boyasına ek olarak, propidyum iyodür de kullanıldı. Anneksin-V-FITC pozitif, propidyum iyodür negatif hücreler apoptozis, hem Anneksin-V-FITC pozitif, hem de propidyum iyodür pozitif hücreler nekrozis olarak değerlendirildi.

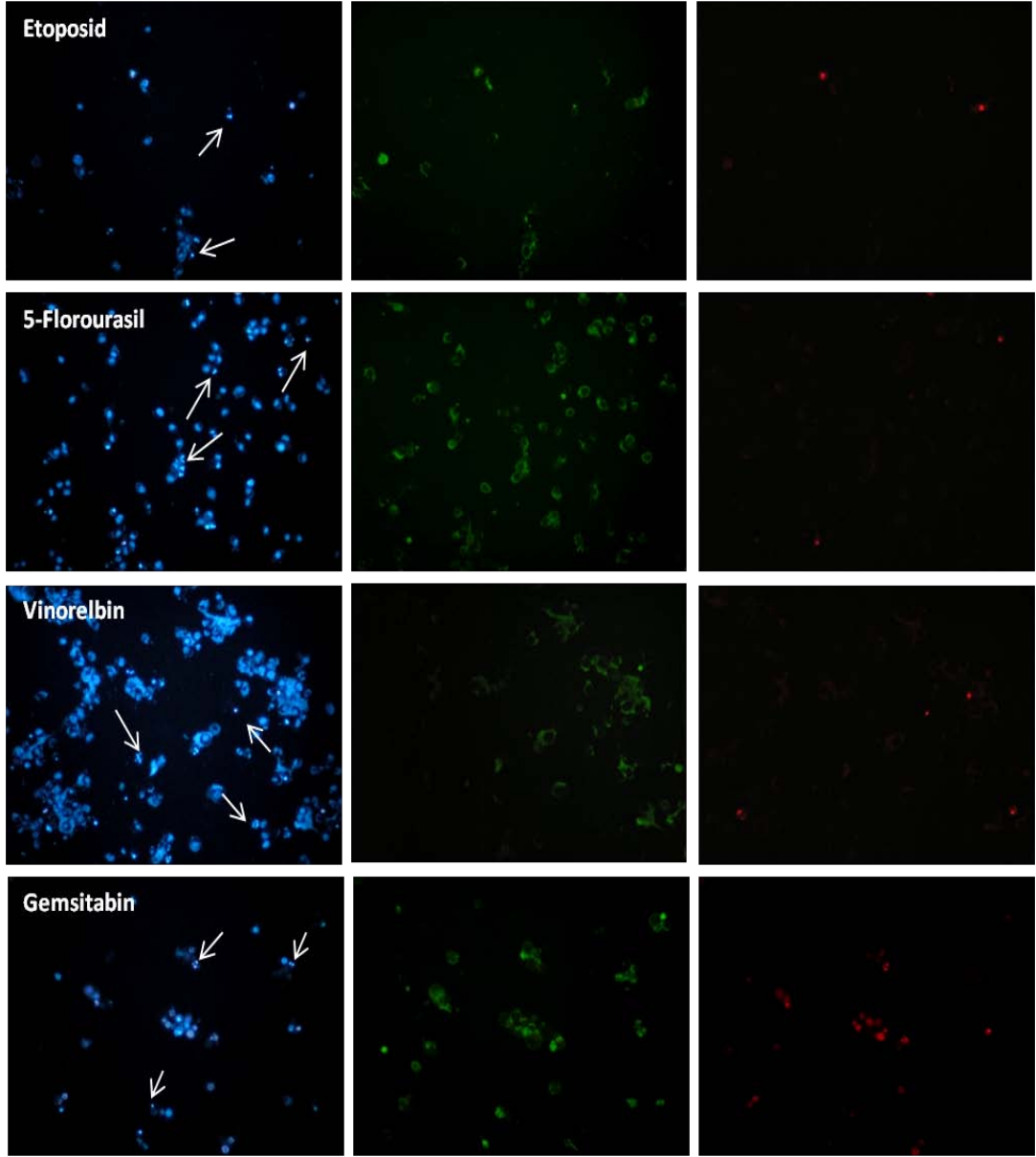
Çeşitli kemoterapötikler 24 saat süreyle fibroblast hücrelerine 100 TDC dozlarında uygulandığında hücre ölüm şekillerinin tedaviye göre değişkenlik gösterdiği bulunmuştur. (Şekil 3.6). Nükleus morfolojisinin gözlenmesi amacıyla kullanılan Hoechst 33342 boyası, yine bu hücrelerde piknozis varlığını göstermiştir.

Anneksin-V boyama sonuçları incelendiğinde;

- Dosetaksel, cisplatin, karboplatin, etoposid, 5-FU ve vinorelbin uygulanan kuyucuklar anneksin-V-FITC pozitif, PI negatif olarak görüntülendi (Erken dönem apoptozis)
- Gempitabin ve paklitaksel uygulanan kuyucuklarda ise anneksin-V-FITC pozitif, PI negatif olarak görüntülendi (Geç apoptozis=sekonder nekroz).

Özetle, anneksin-V boyama bulgularına göre, tedavilerin çoğunlukla apoptozisle sonuçlandığı fakat bazı tedavilerde (paklitaksel, gempitabin) sekonder nekroz varlığı gözlenmiştir.





**Şekil.3.6.100** TDC dozlarında kemoterapötiklerin uygulandığı A-549 hücrelerinin 24 saatlik muamele sonrasındaki Hoechst 33342 (sol sütun) Annexin V-FITC (orta sütun) ve PI (sağ sütun) boyama görüntüleri.

→ Hücre ölüm şekli olarak apoptozisi temsil eden piknotik ve/veya fragmentenükleus varlığını göstermektedir.

#### 4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, A549 akciğer kanseri hücreleri ile akciğer kanseri hastasına ait dokudan izole edilen fibroblastların ko-kültür metodu ile indirekt olarak etkileşimi sağlanmıştır. Böylelikle fibroblast varlığında A549 hücrelerinin farklı kemoterapi ilaçlarına (dosetaksel, paklitaksel, cisplatin, karboplatin, etoposid, 5-FU, vinorelbin, gempitabin) yanıtında değişiklik olup olmadığı incelenmiştir. Bu şekilde, A549 hücreleri ile fibroblastların etkileşimi sağlanarak bir nevi tümör mikro çevresini taklit etmek amaçlanmıştır.

Kanser hücreleri *in vivo* koşullarda homojen popülasyondan oluşmaz. Tümör mikro çevresi olarak adlandırılan stromal hücreler kanser hücrelerinin etrafını sarar ve kanser hücrelerinin malign dönüşümlerine katkı sağlayabilir (Martinez-Outschoorn ve ark. 2011, Joyce 2005). Tümör mikro çevresi ana hücrelerinden olan fibroblastlar normal koşullarda inaktif hücrelerdir. Bu hücreler normal şartlarda düşük proliferasyon hızı ve minimum metabolik aktiviteye sahip hücrelerdir. Ancak kanser sürecinde aktif hale gelirler ve yüksek proliferatif aktivite kazanırlar. Aktifleşmiş bu fibroblastlar stromal hücreler ile kanser hücreleri arasındaki parakrin sinyal yolağında anahtar düzenleyici olarak görev alır (Lorusso ve Ruegg 2008, Polyak ve Kalluri 2010, Räsänen ve Vaheri 2010).

Kanser dokusunda yer alan kanser ile ilişkili fibroblastlar (CAF) kanser hücresi büyümesini desteklerken, aynı zamanda sitokinler ve çeşitli inflamatuvar araçlar gibi farklı pro-invasif moleküller ve hücre-hücre etkileşimleri aracılığıyla kanser hücresinin invazif özelliğini de artırır (Powell ve ark. 1999).

CAF'ların tümör gelişimini başlatıcı ve destekleyici özelliklerini konu alan pek çok çalışma yapılmıştır. 2005 yılında yapılan bir çalışma ile Ras-transforme MCF7 meme kanseri hücrelerinin meme CAF'ları ile birlikte enjekte edildiğinde daha büyük zenograft tümörler oluşturduğu belirtilmiştir (Orimo ve ark. 2005). 2013 yılında yapılan bir başka çalışmada CAF'lar MCF7 insan meme kanseri hücre hattı ile birlikte kültüre edilmiş ve çalışma sonucunda CAF'ların daha malign meme kanseri fenotipi oluşumuna katkı sağladığı belirtilmiştir (Soon ve ark. 2013).

CAF'ların kanser hücrelerinin kemoterapi yanıtını etkilediği ve hücreleri kemoterapiye daha dirençli hale getirdiğini belirten çok sayıda çalışma mevcuttur. Soon ve ark. yaptıkları çalışmada MCF7 hücreleri ile CAF'ları birlikte kültüre etmiş ve hücreler arasındaki bu etkileşim sonucu MCF7 hücrelerinin kemoterapiye daha dirençli hale geldiğini belirtmişlerdir (Soon ve ark. 2013). 2007 ve 2008 yıllarında pankreas ve meme kanseri ile yapılan iki ayrı çalışmada ise kanser hücrelerinin CAF'lar ile birlikte kültüre edildiklerinde kemoterapi ilaçlarına olan duyarlılığının azaldığı belirtilmiştir (Li ve ark. 2007, DeWever ve ark. 2008).

Bu bilgilerden yola çıkarak, bu çalışmada öncelikle sadece fibroblast hücrelerinin kemoterapi ilaçlarına (dosetaksel, paklitaksel, cisplatin, karboplatin, etoposid, 5-FU, vinorelbin, gemsitabin) yanıtları değerlendirildi. MTT testine göre çok daha hassas bir test olan (Ulukaya ve ark. 2008) ATP testi verileri, fibroblastların kemoterapi ilaçları uygulaması sonucu canlılıklarında önemli oranda azalma olduğunu (%30'un altına düştüğü) gösterdi.

2011 yılında Tang ve ark. tarafından yapılan bir derleme ise fibroblastların tümör hücrelerinin canlılığını arttırdığını ifade eden çalışmaların aksini savunmaktadır. Bu derlemeye göre hücrelerin nekroz ile ölürken hasar ile ilişkili yapı molekülü (Damage Associated Molecule Pattern, DAMP) salgıladıklarını ve böylelikle tümör büyümesine katkı sağladıklarını ifade edilmektedir (Tang ve ark. 2011).

Tüm bu bilgilerin ışığında, A549 hücrelerinin fibroblast varlığında kemoterapi ilaçlarına (dosetaksel, paklitaksel, cisplatin, karboplatin, etoposid, 5-FU, vinorelbin, gemsitabin) yanıtları değerlendirildi. MTT ve ATP testi sonuçlarına göre A549 hücreleri ile fibroblastların indirekt etkileşiminin hücrenin ilaca verdiği yanıtta bir farklılığa neden olmadığı görüldü.

A549 hücrelerinin fibroblast varlığı ve yokluğunda kemoterapötik ilaçlara olan yanıtı ko-kültür yönteminin xCELLigence sistemiyle birlikte uygulanması ile gerçek zamanlı olarak izlendi. xCELLigence sistemi sonuçlarına göre, ilaç uygulamasını takiben dosetaksel ve karboplatin uygulanan hücrelerin empedansının kontrol hücreleri gibi arttığı, diğer ilaçlar için ise (paklitaksel, cisplatin, etoposid, 5-FU, vinorelbin, gemsitabin) empedansların azaldığı görüldü.

Ayrıca fibroblast ile indirekt etkileşim halinde olan ve olmayan A549 hücrelerinin empedansları arasında bir farklılık olmadığı gözlemlendi.

Farklılık oluşmamasının nedenlerinden biri olarak iç kuyularda yer alan fibroblastların, uygulanan kemoterapi ilaçları sonucunda öldüğü için kanser hücrelerini uyaracak faktörleri salgılayamadığı düşünülebilir. Ancak 2011 yılında Tang ve ark. tarafından yapılan çalışmaya göre nekroz ile ölen hücreler tümör büyümesine katkı sağlamaktadır.

Bu bilgi göz önüne alınarak fibroblastların ölüm modunu belirlemek için, aynı kemoterapi ilaçları ile 48 saat tedavi sonrası ikili boyama ve 24 saat tedavi sonrası Anneksin-V boyamaları gerçekleştirildi.

İkili boyama sonucuna bakıldığında, Hoechst 33342 boyası ile piknotik ve/veya fragmente nükleusların varlığı görüntülendi. İlaçların bir kısmının hücrelerde erken dönem apoptozise neden olurken (Hoechst pozitif, PI negatif), bir kısmının ise sekonder nekroz/geç apoptozise neden olduğu (Hoechst pozitif, PI pozitif) görüldü.

Anneksin-V boyama sonuçlarına göre ise, bazı ilaçlar için anneksin-V-FITC pozitif, PI negatif görülürken(erken dönem apoptozis), diğer ilaçlarda ise anneksin-V-FITC pozitif, PI pozitif olarak görüntülendi (geç dönem apoptozis = sekonder nekroz).

Özetle, her iki boyama sonucu birlikte değerlendirildiğinde fibroblastların ölüm şeklinin ilaca göre değiştiği, ancak ölüm şekilleri arasında nekroz olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle bu çalışmada Tang ve ark. tarafından savunulan düşünceyi destekleyen sonuçlar alınamamıştır.

Tüm sonuçlar birlikte ele alındığında, daha sonraki çalışmalar için fibroblast varlığında A549 hücrelerinin ölüm şeklinin morfolojik olarak değerlendirilebilmesi için floresan boyama metodları yapılmasına ve tümör dokusundan izole edilen fibroblast hücrelerinin özgün antikoları ile karakterizasyonu yapıldıktan sonra çalışmalara devam edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.



## KAYNAKLAR DİZİNİ

**Aboussekhra, A. 2011.** Role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer development and prognosis. *Int. J. Dev. Biol.*, 55: 841-849.

**Albanell, J., Lonardo, F., Rusch, V., Engelhardt, M., Langenfeld, J., Han, W., Klimstra, D., Venkatraman, E., Moore, M.A., Dmitrovsky, E. 1997.** High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 1609–1615.

**Alberg, A.J., Samet, J.M. 2003.** Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 123: 21-49.

**Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A. 2008a.** The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol. Rev.*, 222:155–161.

**Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C., Mantovani, A., 2008b.** The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 66: 1–9.

**Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. 1996.** Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*, 87: 171.

**Andreotti, P.E., Cree, I.A., Kurbacher, C.M., Hartmann, D.M., Linder, D., Harel, G., Gleiberman, I, Caruso, P.A., Ricks, S.H., Untch, M., Sartori, C., Bruckner, H.W., 1995.** Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian cancer. *Cancer Res.*, 55: 5276-5782.

**Annes, J.P., Rifkin, D.B., Munger, J.S. 2003.** Making sense of latent TGF beta activation. *J. Cell Sci.*, 116: 217–224.

**Anonim 1987.** International Agency for Research on Cancer. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1–42. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, supplement 7. IARC press, Lyon.

**Anonim 1998.** National Research Council. Committee on health risk of exposure to radon, Board on radiation effects research: health effects of exposure to radon (BEIR VI). DC: National Academy Press, Washington.

**Anonim 2002a.** Physician's Desk Reference, 56th ed., Medcial Economics: Thomson Healthcare.

**Anonim 2002b.** <http://en.wikipedia.org/wiki/Vinorelbine>

**Anonim 2006a.** Lung Cancer Alliance (LCA). Lung Cancer Alliance issues inaugural report on lung cancer. Retrieved April 25, 2006, from <http://www.lungcanceralliance.org/news/documents/Report%20Card%20Press%20Release%20FINAL%2001.19.06.pdf>

**Anonim 2006b.** Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu. Akciğer kanseri tanı ve tedavi rehberi. *Toraks Dergisi*, 7: 1-37.

**Anonim 2006c.** [http://www.itsbio.co.kr/main/goods\\_view.php?category2=57&no=119](http://www.itsbio.co.kr/main/goods_view.php?category2=57&no=119)

**Anonim 2006d.** <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Etoposide.svg>

**Anonim 2007a.** <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Taxol.svg>

**Anonim 2007b.** [http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_m17910.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m17910.html).

**Anonim 2007c.** <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Gemcitabine.svg>

**Anonim, 2007d.** [http://www.itsbio.co.kr/main/goods\\_view.php?category2=57&no=119](http://www.itsbio.co.kr/main/goods_view.php?category2=57&no=119)

**Anonim 2010a.**

[http://www.labspace.net/103644/Running\\_a\\_marathon\\_halts\\_cellular\\_suicide](http://www.labspace.net/103644/Running_a_marathon_halts_cellular_suicide).

**Anonim 2010b.** <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Vinorelbine.svg>

**Anonim, 2010c.** <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Carboplatin-2D-skeletal.png>

**Anonim 2012a.** *xCELLigence System*,

[http://roche-biochem.jp/products/transfection/xcelligence/xcelligence-technology/Cell\\_Index.html](http://roche-biochem.jp/products/transfection/xcelligence/xcelligence-technology/Cell_Index.html).

**Anonim 2012b.** <http://www.aceabio.com/theory.aspx>

**Anonim 2013a.** <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=0F98C8F5-9570-BAFC-368A-C7F6FC73944E>.

**Anonim, 2013b.** <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=0F98C8F5-9570-BAFC-368A-C7F6FC73944E>.

**Anzano, M.A., Roberts, A.B., Meyers, C.A., Komoriya, A., Lamb, L.C., Smith, J.M. 1985.** Increased secretion of type beta transforming growth factor accompanies viral transformation of cells. *Mol. Cell Biol.*, 5: 242–247.

**Aygenel, Ş.G., Oğuzülgen, İ.K., Öztürk, C. 2005.** Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Uzun Dönem Sağkalımda Prediktif ve Prognostik Faktörlerin Gözden Geçirilmesi. *Toraks Dergisi*, 6: 81-84.

**Betticher, D.C., Heighway, J., Hasleton, P.S., Altermatt H.J., Ryder W.D., Cerny T., Thatcher N. 1996.** Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, 73: 294–300.

**Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., Moses, H.L. 2004a.** Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression, *Nature*, 432 : 332–337.

**Bhowmick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A.E., Dumont, N., Shappell, S., Washington, M.K., Neilson, E.G., Moses, H.L. 2004b.** TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia, *Science*, 303: 848–851.

**Bilgel, N., 2001.** Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi: 6. Uludağ Onkoloji Sempozyumu Kitabı ve konsensus raporu, Editörler: Engin, K., Özyardımcı, N., Uludağ Üniversitesi Yayınları, Bursa, 35-38.

**Bissell, M.J., Radisky, D. 2001.** Putting tumours in context, *Nat. Rev. Cancer*, 1: 46–54.

**Biswas, S.K., Sica, A., Lewis, C.E. 2008.** Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms, *J. Immunol.*, 180: 2011–2017.

**Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo P. 2000.** TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell Biol.* 2: 241-243.

**Boffetta, P., Agudo, A., Ahrens, W., Benhamou, E., Benhamou, S., Darby, S.C., Ferro, G., Fortes, C., Gonzalez, C.A., Jöckel, K.H., Krauss, M., Kreienbrock, L., Kreuzer, M., Mendes, A., Merletti, F., Nyberg, F., Pershagen, G., Pohlmann, H., Riboli, E., Schmid, G., Simonato, L., Trédaniel, J., Whitley, E., Wichmann, H.E., Winck, C., Zambon, P., Saracci, R. 1998.** Multicenter case-control study of exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 1440–1450.

**Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherfi, S., Kuliopulos, S., 2005.** Par1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*, 120: 303–313.

**Bose, R.N. 2002.** Biomolecular targets for platinum antitumor drugs. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2: 103-11.

**Bouchardy, D., Benhamou, S., Jourenkova, N., Dayer, P., Hirvonen, A. 2001.** Metabolic genetic polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Lung Cancer*, 32: 109-112.

**Bozkurt, B., Selçuk, Z.T., Fırat, P., Kalyoncu, A.F., Artvinli, M. 2004.** 1972-2002 Döneminde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Akciğer Kanseri Tanısı Konulan Hastaların Histolojik ve Epidemiyolojik Değerlendirmesi. *Toraks Dergisi*, 5: 148-153.

**Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A., Henson, P.M. 1997.** Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flipflop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.*, 272: 26159–26165.

**Brito, D.A., Yang, Z., Rieder, C.L. 2008.** Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. *The Journal of Cell Biology*, 182: 623–6299.

- Broers, J.L., Ramaekers F.C. 1994.** Differentiation markers for lung-cancer sub-types. A comparative study of their expression *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Cancer Supplement*, 8: 134-137.
- Bunn, P.A. Jr, Franklin, W. 2002.** Epidermal growth factor receptor expression, signal pathway, and inhibitors in non-small cell lung cancer. *Semin. Oncol.*,29:38–44.
- Capasso, A. 2012.** Vinorelbine in Cancer Therapy. *Current Drug Targets*, 13: 1065-1071.
- Carmeliet, P. 2003.** Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.*, 9: 653–660.
- Cerqueira, N.M.F.S.A., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. 2007.** Understanding ribonucleotide reductase inactivation by gemcitabine. *Chemistry: A European Journal*, 13: 8507–8515.
- Clarke, S.J., Rivory, L.P. 1999.** Clinical pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Pharmacokinet*, 36: 99–114.
- Cortes, J.E., Pazdur, R. 1995.** Docetaxel. *J. Clin Oncol*, 13: 2643-2655.
- Coultas, D.B., Samet, J.M. 1992.** Occupational lung cancer. *Clin. Chest Med.*, 13: 341–354.
- Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D., Werb, Z. 2000.** MMP- 9 supplied by bone marrow derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, 103: 481–490.
- Crivellato, F., Ribatti, D. 2005.** Involvement of mast cells in angiogenesis and chronic inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm Allergy*,4: 9–11.
- Cryns, V., Yuan, J. 1998.** Proteases to die for. *Genes Dev.*, 12: 1551-1570.
- Dabrowiak, J.C. 2009.** Metals in Medicine Wiley, Chichester, UK .
- Dalton, W.S. 1999.** The tumor microenvironment as a determinant of drug response and resistance; *Drug Resist. Update*, 2: 285-288.
- Dash, P., 2007.** *Apoptosis*, <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/>
- DeWever O., Mareel, M. 2003.** Role of myofibroblasts at the invasion front. *Biol. Chem.*, 383: 55–67.
- De Wever, O., Demetter, P., Mareel, M., Bracke, M. 2008.** Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int. J. Cancer*, 123: 2229–2238.
- Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F.,Gabbiani, G.,1993.** Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.*,122:103–11.
- Dickens, L.S., Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Hughes, M.A., Robinson, G.L., Fairall, L., Schwabe, J.W., Cain, K., Macfarlane, M. 2012.** A death effector domain chain

DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Mol. Cell.* 47: 291-305.

**Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V., Vandenabeele, P. 2009.** Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection.* 11: 1050-1062.

**Dvorak, H.F. 1986.** Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 315: 1650–1659.

**Economou, P., Samet, J.M., Lechner, J.F. 1994.** Familial and genetic factors in the pathogenesis of lung cancer: Epidemiology of lung cancer, Editörler: Samet, J.M., Marcel Dekker Inc, New York, 353-396.

**Erdoğan, B.B. 2003.** Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*, 4: 165-174.

**Fadeel, B., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. 1999.** Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266:699-717.

**Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M. 1992.** Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, 148: 2207-2216.

**Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J. 2005.** Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37: 719–727.

**Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V., 2012.** Role of Apoptosis in disease. *AGING*, 4: 330-349.

**Fong, K.W., Sekido, Y., Minna, J.D. 1999.** Molecular pathogenesis of lung cancer. *J. Thorac Cardiovasc. Surg.*, 118: 1136-1152.

**Fong, K.M., Sekido, Y., Gazdar, A.F., Minna, J.D. 2003.** Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax*, 58: 892–900.

**Fontham, E.T.H., Correa, P., Reynolds, P., Wu-Williams, A., Buffler, P.A., Greenberg, R.S., Chen V.W., Alterman T., Boyd P., Austin D.F., Liff J. 1994.** Environmental tobacco smoke and lung cancer in nonsmoking women: a multicenter study. *JAMA*, 271: 1752–1759.

**Friess, H., Yamanaka, Y., Büchler, M., Ebert, M., Beger, H.G., Gold, L.I., Korc, M. 1993.** Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology*, 105: 1846–1856.

**Galle, P.R. 1997.** Apoptosis in Liver Disease. *Journal of Hepatology.* 27: 405-412.

**Gatti, R., Belletti, S., Orlandini, G., Bussolati, O., Dall’asta, V., Gazzola, G.C. 1998.** Comparison of Annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 46: 895–900.

**Gewis, A. (2003).** “Introduction to Apoptosis,” *ApoReview*, 1-26.

- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. 2005.** Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *Cancer J Clin.* 55: 178–194.
- Gilliland, F.D., Samet, J.M. 1994.** Lung cancer. *Cancer Surv.*,20: 175–195.
- Gordaliza, M., García, P.A., del Corral, J.M., Castro, M.A., Gómez-Zurita, M.A. 2004.** Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon*, 44: 441–459.
- Gorsch, S.M., Memoli, V.A., Stukel, T.A. et al. 1992.** Immuno- histochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res.*, 52: 6949–6952.
- Greenlee, R.T., Murray, T., Bolden, S., Wingpo, C.A. 2000.** Cancer statistics. *Cancer J. Clin.*,50: 7-33.
- Groeger, A.M., Esposito, V., Mueller, M.R., Caputi, M., Kaiser, H.E., Giordano, A. 1997.** Advances in the understanding of lung cancer. *Anticancer Research*, 17: 2519-2522.
- Guerrero-Ramírez, L.G., Katime, I. 2011.** Nano-Engineering of Complex Systems: Smart Nanocarriers for Biomedical Applications, Biomedical Engineering: Theory to Applications, Editörler: Fazel, R., ISBN: 978-953-307-637-9.
- Guimaraes, C.A., Linden, R. 2004.** Programmed cell death; apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.*, 271: 1638–1650.
- Hacker, G. 2000.** The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.*, 301: 5–17.
- Halilçolar, H., Tatar, D., Ertuğrul, G., Çakan, A., Gayafoglu, M., Kömürçüoğlu, B. 1999.** Epidemiyoloji: Akciğer kanseri multidisipliner yaklaşım, Editörler: Akkoçlu, A., Öztürk, C., Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 17-22.
- Hande, K. R. 1998.** Etoposide: Four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer* 34: 1514–1521.
- Hardin, J., MacLeod, S., Grigorieva, I. Chang, R., Barlogie, B, Xiao H, Epstein J. 1991.** Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood*, 84: 3063–3070.
- Hayward, S.W., Wang, Y., Cao, M., Hom, Y.K., Zhang, B., Grossfeld, G.D., Sudilovsky, D., and Cunha, G.R. 2001.** Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line. *Cancer Res.*, 61: 8135–8142.
- Hikim, A.P.S., Wang, C., Leung, A.R., Swerdloff, S. 1995.** Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin- releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*, 136: 2770-2775.
- Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.L., Gabbiani, G., 2007.** The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am. J. Pathol.*,170: 1807–1816.

**Hirsch, F.R., Franklin, W.A., Gazdar, A.F., Bunn, P.A. 2001.** Early Detection of Lung Cancer: Clinical Perspectives of Recent Advances in Biology and Radiology. *Clinical Cancer Research*, 7: 5–22.

**Holcik, M., Lacasse, E., Mackenzie, A. ve Korneluk, R. 2005.** Apoptosis in Health and disease, Cambridge, İngiltere, 246.

**Hwang, R.F., Moore, T., Arumugam, T., Ramachandran, V., Amos, K.D., Rivera, A., Ji, B., Evans, D.B., Logsdon, C.D. 2008.** Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res*, 68: 918-926.

**Hynes, R.O. 2009.** The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326: 1216–1219.

**İtil, O. 2000.** Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etyolojisi: Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi, Editörler: Haydaroğlu, A., Ege üniversitesi basımevi, İzmir, 15-34.

**Ishida, S., Lee, J., Thiele, DJ., Herskowitz, I. 2002.** Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 14298-14302.

**Jacobson, D.R. 1999.** Ras mutations in lung cancer. In: Brambilla C, Brambilla E, eds. Lung tumors fundamental biology and clinical management. New York, Marcel Dekker Inc, 139-156.

**Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. 1997.** *Cell*, 88:347–354.

**Jamieson, E.R., Lippard, S.J. 1999.** Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev.*,99: 2467-2498.

**Järveläinen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N., Penttinen, R. 2009.** Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy, *Pharmacol.Rev.*, 61: 198-223.

**Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M.J. 2008.** Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*, 58: 71-96.

**Jeremic, B., Milicic, B., Dagovic, A., Aleksandrovic, J., Nikolic, N. et al. 2003.** Pretreatment clinical prognostic factors in patients with stage IV non- small cell lung cancer (NSCLC) treated with chemotherapy, *J Cancer Res Clin Oncol*, 129:114–22.

**Jordan, G., Vivien, W. 2001.** The Story of Taxol: Nature and Politics in the Pursuit of an Anti-Cancer Drug. Cambridge University Press. p. 17. ISBN 0-521-56123.

**Joyce J.A. 2005.** Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 7: 513-520.

**Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Yamashita, M., Ino, K., Nawa, A., Kikkawa, F. 2007.** Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial–mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *Int. J. Oncol.*, 31: 277–283.

**Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Yamashita, M., Ino, K., Nawa, A. and Kikkawa, Kalluri, R., Weinberg, R.A. 2009.** The basics of epithelial–mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119: 1420–1428.

**Kaler, P., Augenlicht, L., Klampfer, L. 2009.** Macrophage-derived IL-1beta stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene*, 28: 3892–3902.

**Kerkar, S.P., Restifo, N.P. 2012.** Cellular Constituents of Immune Escape within the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.*, 72: 3125-3130.

**Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A.R. 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 4: 239-257.

**Kibbelaar, R.E., Moolenaar, K.E.C, Michalides, R.J.A.M, Bodegom, P.C, Vanderschueren, R.G.J.R.A., Wagenaar, S.S, Dingemans, K.P., Bitter-Suermann, D., Dalesio, O., Van Zandwijk, N., Mooi, W.J. 1991.** Neural cell adhesion molecule expression, neuro-endocrin differentiation, and prognosis in lung carcinoma. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 27: 431–435.

**Kim, J.H., Shariat, S.F., Kim, I.Y. Menesses-Diaz, A., Tokunaga, H., Wheeler, T.M., Lerner, S.P. 2001.** Predictive value of expression of transforming growth factor-beta(1) and its receptors in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer*, 92: 1475–1483.

**Kim H.T. Paraiso, Smalley K.S.M. 2013.** Fibroblast-mediated drug resistance in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 85: 1033–1041.

**Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P. 2001.** Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 276: 46639-46646.

**Knox, R.J., Friedlos, F., Lydall, D.A., Roberts, J.J. 1986.** Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res.*, 46: 1972-1979.

**Kockx, M. M., Muhring, J., Knaapen, M. W. M., de Meyer, G. R. Y. 1998.** RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 152: 885-888.

**Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Harris, A.L., Sivridis, E. 2006.** Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res.*, 66: 632-637.

**Köktürk, N., Kırışoğlu, C.E, Öztürk, C. 2003.** Akciğer kanseri moleküler biyolojisi. *Solunum*, 5: 127-138.

**Kranenburg, O. 2005.** The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1756: 81–82.



- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., and Kobayashi, Y. 2003.** Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J. Immunol.*, 171: 4672–4679.
- Lecture, G.F.F. 1996.** Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. *Chest*, 109: 14-19.
- Lee, K-B., Wang, D., Lippard, S.J., Sharp, P.A. 2002 .**Transcription-coupled and DNA damage-dependent ubiquitination of RNA polymerase II in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 4239-4244.
- Leek, R.D., Harris, A.L. 2002.** Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 7: 177–189.
- Li, J., Feng, Q., Kim, J.M., Schneiderman, D., Liston, P., Li, M., Vanderhyden, B., Faught, W., Fung, M.F., Senterman, M., Korneluk, R.G., Tsang, B.K. 2001.** Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins. *Endocrinology*, 142: 370–380.
- Li,H., Fan, X., Houghton, J.M. 2007.** Tumor Microenvironment: The Role of the Tumor Stroma in Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101: 805–815.
- Li, J., Yuan, J. 2008.** Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27: 6194-6206.
- Lieubeau, B., Garrigue, L., Barbieux, I., Meflah, K., Gregoire, M. 1994 .** The role of transforming growth factor beta 1 in the fibroblastic reaction associated with rat colorectal tumor development. *Cancer Res.*,54: 6526–6532.
- Lin, X., Okuda, T., Holzer, A., Howell, S.B. 2002.** The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Phar.*, 62: 1154-1159.
- Lin, E.Y., Pollard, J.W. 2004.** Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br. J. Cancer*, 90: 2053–2058.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G. 2003.** 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer*, 3: 330–338.
- Lorusso, G., Ruegg, C. 2008.** The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem. Cell Biol.*,130: 1091–1103.
- Lotem, J., Sachs, L. 1992 .** Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor b1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. *Blood*, 80: 1750–1757.
- Lu, P.,Weaver, V.M., Werb, Z. 2012.**The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *JCB*, 196: 395.
- Lynch, T.J. Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, E.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. Eng. J. Med.*, 350: 2129-2139.

**Mabry, M. 1998** .Activating oncogenes in lung cancer: Biology of lung cancer, Editörler: Kane, M.A., Bunn, P.A., Marcel Dekker Inc., New York, 391-412.

**Malekshah, A.K., Moghaddam, A.E., Daraka, S.E., 2006.** Comparison of conditioned medium and direct co-culture of human granulosa cells on mouse embryo development. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44: 189-192.

**Mallmann, M.R., Schmidt S.V., Schultze, J.L. 2012.** Macrophages in human cancer: Current and future aspects. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*, 16, 765-774.

**Mandic, A., Hansson, J., Linder, S., Shoshan, M.C. 2003.** Cisplatin induces endoplasmic reticulum stres and nucleus-independent apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.*, 278: 9100–9106.

**Martinez-Outschoorn, U.E., Pavlides, S., Howell, A., Pestell, R.G., Tanowitz, H.B., Sotgia, F., Lisanti, M.P. 2011.** Stromal-Epithelial Metabolic Coupling in Cancer: Integrating Autophagy and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 43: 1045–1051.

**Matlashewski, G., Lamb, P., Pim, D., Peacock, J., Crawford, L. 1984.** Benchimol S. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J.*,3: 3257–3262.

**Mbeunkui, F., Johann, D.J. 2009.** Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 63(4): 571–582.

**McDonald, D.M., Choyke, P.L. 2003.** Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat. Med.*, 9: 713–725.

**Messmer, U.K., Pfeilschifter, J. 2000.** New insights into the mechanism for clearance of apoptotiz cells. *BioEssays*, 22: 878-881.

**Michalides, R.J.A.M. 1998.** Deregulation of the cell cycle in lung cancer: Lung Biology in Health and Disease, Editörler Brambilla C., Brambilla E., Marcel Dekker Inc., New York, 211–225.

**Miki, Y., Ono, K., Hata, S., Suzuki, T., Kumamoto, H., Sasano, H. 2012.** The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 131: 68– 75.

**Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008.**Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 8: 958–969.

**Motadi, L.R., Misso, N.L., Dlamini, Z., Bhoola, K.D. 2007.** Molecular genetics and mechanisms of apoptosis in carcinomas of the lung and pleura: Therapeutic targets. *International Immunopharmacology*, 14: 1934–1947.

**Mueller, M.M., Fusenig, N.E. 2004.** Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 4: 839-849.

- Muerkoster, S., Wegehenkel, K., Arlt, A., Witt, M., Sipos, B., Kruse, M.L., Sebens, T., Kloppel, G., Kalthoff, H., Folsch, U.R., Schäfer, H. 2004** . Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res.*,64: 1331-1337.
- 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., Munday, N. A., Raju, S. M., Smulson, M. E., Yamin, T.-T., Yu, V. L. And Miller, D. K. 1995.** Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376: 37-43.
- O'Brien, P., O'Connor, B.F. 2008.** Seprase: an overview of an important matrix serine protease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1784: 1130–1145.
- Olumi, A.F., Dazin, P., Tlsty, T.D. 1998.** A Novel Coculture Technique Demonstrates That Normal Human Prostatic Fibroblasts Contribute to Tumor Formation of LNCaP Cells by Retarding Cell Death. *Cancer Res.*,58: 4525-4530.
- Olumi, A.F., Grossfeld, G.D., Hayward, S.W., Carroll, P.R., Tlsty, T.D. Cunha, G.R. 1999.** Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.*, 59: 5002–5011.
- Omori, Y., Zaidan Dagli, M.L. Yamakage, K., Yamasak, H. 2001.** Involvement of gap junctions in tumor suppression: analysis of genetically-manipulated mice, *Mutat. Res.*, 477 , 191–196.
- Orimo, A., Gupta, P.B., SgROI, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. 2005.** Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121: 335–348.
- Orimo, R.A. Weinberg. 2006.** Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*, 5: 1597–1601.
- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., Hanen, C. 1998.** Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3: 115-121.
- Öktem S., Özhan M.H, Özol D. 2001.** Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 2: 91-95.
- Östman, A., Augsten, M. 2009.** Cancer-associated fibroblasts and tumor growth-bystanders turning into key players, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 19: 67-73.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. 2005.**Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*,55: 74-108.
- Peyrone, M. 1844.** Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Ann Chemie Pharm* 51: 1–29.
- Pietras, K., Östman, A. 2010.** Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res.*,316: 1324-1331.

- Pollard, J.W. 2004.** Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 4: 71–78.
- Polyak, K. and Kalluri, R. 2010.** The Role of the Microenvironment in Mammary Gland Development and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2: a003244.
- Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D. et al. 1999.** Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am. J. Physiol.*, 277: C1–C9.
- Prives, C. 1998.** Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell*, 95: 1437–1443.
- Pronk, L.C., Stoter, G., Verweij, J. 1995.** Docetaxel (Taxotere): single agent activity, development of combination treatment, and reducing side effects. *Cancer Treatment Reviews*, 21: 463-78.
- Puthier, D., Bataille, R., Barille, S., Mellerin, M.P., Harousseau, J.L., Ponzio, A., Robillard, N., Wijdenes, J., Amiot, M. 1996.** Myeloma cell growth arrest, apoptosis, and interleukin-6 receptor modulation induced by EB1089, a vitamin D3 derivative, alone or in association with dexamethasone. *Blood*, 88: 4659–4666.
- Radisky, D.C., Levy, D.D., Littlepage, L.E., Liu, H., Nelson, C.M., Fata, J.E., Leake, D., Godden, E.L., Albertson, D.G., Nieto, M.A., Werb, Z., Bissell, M.J. 2005.** Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP3-induced EMT and genomic instability. *Nature*, 436:123–127.
- Radzikowska, E., Roszkowski, K., Glaz, P. 2001.** Lung cancer in patients under 50 years old. *Lung Cancer*, 33: 203-211.
- Rajnish, B., Hongtao, Y. 2004.** The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene*, 23: 2016–2027.
- Räsänen, K., Vaheri, A. 2010.** Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Experimental Cell Research*, 316: 2713-2722.
- Read, A. P., Strachan, T. 1999.** *Human molecular genetics 2*. Wiley, New York, ISBN 0-471-33061-2. Chapter 18.
- Riedl, S.J., Salvesen, G.S. 2007.** The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 405-413.
- Roberts, A.B., Wakefield, L.M. 2003.** The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 8621–8623.
- Rodemann, H.P., Muller, G.A. 1991.** Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am. J. Kidney Dis.*, 17: 684–686.
- Rodenhuis, S., Van De Wetering, M.L., Mooi, W.J., Evers, S.G., Van Zandwijk, N., Bos, J.L. 1987.** Mutational activation of the K-RAS oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *N. Engl. J. Med.*, 317: 929-935.

- Rollins, B.J. 2006.** Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur. J. Cancer*, 42: 760–767.
- Rom, W.N., Hay, J.G., Lee, T.C., Jiang, Y., Tchou-Wong, K.M. 2000.** Molecular and Genetic Aspects of Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161: 1355–1367.
- Samet, J.M. 1989.** Radon and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81: 745–757.
- Savill, J., Fadok, V. 2000.** Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407: 784–788.
- Scanlan, M.J., Raj, B.K., Calvo, B., Garin-Chesa, P., Sanz-Moncasi, M.P., Healey, J.H., Old, L.J., Rettig, W.J. 1994.** Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S A.*, 91: 5657–5661.
- Sethi, T., Rintoul, R., Moore, S., MacKinnon, A.C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E.R., Dransfield, I., Donnelly, S.C., Strieter, R., Haslett, C. 1999.** Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nature Med.*, 5: 662–668.
- Siegel, P.M., Shu, W., Cardiff, R.D. et al. 2003.** Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:8430–5.
- Sobrero, A., Guglielmi, A., Grossi, F., Puglisi, F., Aschele, C. 2000.** Mechanism of action of fluoropyrimidines: relevance to the new developments in colorectal cancer chemotherapy. *Semin. Oncol.*, 27: 72-77.
- Soon, P.S.H., Kim, E., Pon, C.K., Gill, A.J., Moore, K., Kaler, P., Galea, V., Augenlicht, L., Klampfer, L. 2010.** Tumor Associated Macrophages Protect Colon Cancer Cells from TRAIL-Induced Apoptosis through IL-1 $\beta$ - Dependent Stabilization of Snail in Tumor Cells. *PLoS One*, 5: 11700.
- Spiro S.G., Porter J.C. 2002.** Lung Cancer-Where Are We Today? Current Advances in Staging and Nonsurgical Treatment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 166: 1166–1196.
- Spivack, S.D., Fasco, M.J., Walker, V.E., Kaminsky, L.S. 1997.** The molecular epidemiology of lung cancer. *Crit. Rev. Toxicology*, 27: 319-365.
- Sternlicht, M.D., Werb, Z. 2001.** How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17: 463–516.
- Stuelten, C.H., Dacosta Byfield, S., Arany, P.R., Karpova, T.S., Stetler- Stevenson, W.G., Roberts, A.B. 2005.** Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. *J. Cell Sci.*, 118: 2143-2153.
- Sylvester, P.W. 2011.** Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol. Biol.*, 716: 157-168.

- Tait, S.W., Green, D.R. 2010.** Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11: 621-632.
- Tang, D., Lotze M.T., Kang, R., HJ Zeh, H.J. 2011.** Apoptosis promotes early tumorigenesis. *Oncogene*, 30: 1851–1854.
- Tang, X. 2013.** Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Letters*, 332: 3–10.
- Tarin, D. 1969.** Fine structure of murine mammary tumours: the relationship between epithelium and connective tissue in neoplasms induced by various agents. *Br. J. Cancer*, 23: 417-425.
- Tatar, D., Kılınç, O., Yorgancıoğlu, A., Aksel, N., Halilçolar, H., Özacar, R. 2000.** Akciğer tümörü ve akciğer tüberkülozu birlikteliği. *Solunum*, 2: 56-60.
- Tesarik, J., Greco, E., Cohen-Bacrie, P., Mendoza, C. 1998.** Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol. Hum. Reprod.*, 4: 757.
- Thijssen, V.L., Brandwijk, R.J., Dings, R.P., Griffioen, A.W. 2004.** Angiogenesis gene expression profiling in xenograft models to study cellular interactions. *Exp. Cell Res.*, 299: 286–293.
- Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y. 1998.** Caspases: enemies within. *Science*, 281: 1312-1316.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R.A. 2002.** Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3: 349-363.
- Touchette, N., Fogle, S. 1991.** Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNIH Res.*, 3: 75.
- Travis, W.D., Brambilla, E., Müller-Hermelink, H.K., Harris, C.C. 2004.** Pathology & Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press, Lyon, 8.
- Travis, W.D. 2011.** Pathology of Lung Cancer. *Clin. Chest Med.*, 32: 669–692.
- Trosko, J.E., Ruch, R.J. 1998.** Cell–cell communication in carcinogenesis. *Front. Biosci.*, 3: 208–236.
- Trzaska, S. 2005.** Cisplatin. *C&EN News*, 83(25).
- Tuxhorn, J.A., McAlhany, S.J., Dang, T.D., Ayala, G.E., Rowley, D.R. 2002.** Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Res.*, 62: 3298–3307.
- Ulukaya, E. 2003.** Apoptosis ders notları.  
[http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptosis\\_ders\\_notu.pdf](http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptosis_ders_notu.pdf)-(Erişim tarihi: 12 Mayıs 2011)
- Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Oral, A.Y., Demirci, M., 2008.** The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol. In Vitro*, 22(1):232-9.

- Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. 2011.** Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Func.* 29: 468-480.
- Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H. ve Reichl, F.X. 2010.**Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent. Mater.*,26: 51–58.
- Vallieres, E. 2007.** Role of adjuvant systemic therapy for stage I NSCLC. *Thorac. Surg. Clin.*,17: 279–285.
- Vlodavsky, I., Goldshmidt, O., Zcharia, E., Atzmon, R., Rangini-Guatta, Z., Elkin, M., Peretz, T., and Friedmann, Y. 2002.** Mammalian heparanase: Involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. *Semin. Cancer Biol.*, 12: 121–129.
- Walker, P.R., Leblanc, J., Smith, B., Pandey, S., Sikorska, M. 1999.** Detection of DNA fragmentation and Endonuclease in apoptosis. *Enzymology.* 17: 329-338.
- Xing, F., Saidou, J., Watabe, K. 2011.** Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci.*, 15: 166–179.
- Yang, P., Allen, M.S., Aubry, M.C., Wampfler, J.A., Marks, R.S., Edell, E.S. et al. 2005.** Clinical features of 5,628 primary lung cancer patients: experience at Mayo Clinic from 1997 to 2003. *Chest* ,128: 452–462.
- Yang, A.D., Fan, F., Camp, E.R., van Buren, G., Liu, W., Somcio, R., Gray, M.J., Cheng, H., Hoff, P.M. and Ellis, L.M. 2006.** Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clinical Cancer Research*, 12: 4147–4153.
- Yesner, R. 1993.** Pathogenesis and pathology. *Clin Chest Med.* 14(1):17-30.
- Yin, J.J., Selander, K., Chirgwin, J.M., Dallas, M., Grubbs, B.G., Wieser, R., Massagué, J., Mundy, G.R., Guise, T.A. 1999.** TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Invest.*,103: 197–206.
- Yurdakul, A.S., Çalışır, H.C., Demirağ, F., Taci, N., Öğretensoy, M. 2002.** Akciğer Kanserinin Histolojik Tiplerinin Dağılımı (2216 olgunun analizi). *Toraks Dergisi*, 3: 59-65.
- Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R., Yan, G .1997.** Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *Biotechniques*, 23: 525–531.
- Zhong, L., Goldberg, M.S., Parent, M.E., Hanley, J.A. 2000.** Exposure to environmental tobacco smoke and the risk of lung cancer: a meta- analysis. *Lung Cancer*, 27: 3–18.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Didem KARAKAŞ

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Kocaeli, 8 Şubat 1988

**Yabancı Dili:** İngilizce

### **Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

**Lise:** Merkez Bankası Derince Anadolu Lisesi (2002-2006)

**Lisans:** Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2006-2011)

**Yüksek Lisans:** Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,  
Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı (2011-2013)

### **Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : -**

**İletişim (e-posta):** didemmkarakass@gmail.com

**Yayımları: -**



