



**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**HİPOKSİ KOŞULLAR ALTINDA MİDE KANSERİNDE  
VİNCRİSTİNE’NİN APOPTOZ VE OTOFAJİ ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan  
Betül CEYLANER**

**Danışman  
Prof. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

**İstanbul 2019**



**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**HİPOKSİ KOŞULLAR ALTINDA MİDE KANSERİNDE  
VİNCRİSTİNE’NİN APOPTOZ VE OTOFAJİ ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan  
Betül CEYLANER**

**Danışman  
Prof. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

**İstanbul 2019**

## LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Betül CEYLANER tarafından hazırlanan “*Hipoksi Koşullar Altında Mide Kanserinde Vincristine’nin Apoptoz ve Otofaji Üzerine Etkisi*” konulu çalışması jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25.06.2019

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu):

İmzası

Jüri Üyesi : Prof.Dr.Burcu IRMAK YAZICIOĞLU  
: Haliç Üniversitesi (Danışman)

Jüri Üyesi : Prof.Dr.Hülya YILMAZ AYDOĞAN  
: İstanbul Üniversitesi

Jüri Üyesi : Dr.Öğr.Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR  
: Haliç Üniversitesi

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Nur TUNALI  
Vekil Müdür

## HIPOKSİ KOŞULLAR ALTINDA MİDE KANSERİNDE VİNCRİSTİNE'NİN APOPTOZ VE OTOFAJİ ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

%8

BENZERLİK ENDEKSİ

%4

İNTERNET  
KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%7

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%2
2	www.google.com.br İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	%1
4	Submitted to Karadeniz Teknik University Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to Pamukkale Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
7	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to University College London Öğrenci Ödevi	<%1

Bölüm Başkanı V.  
Dr. Öğr. Üy. Aygub Ebrakim  
Ebrakim

24/06/2019

### TEZ ETİK BEYANI

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Hipoksi Koşullar Altında Mide Kanserinde Vincristine’nin Apoptoz ve Otofaji Üzerine Etkisi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

*B. Ceylaner*

Betül CEYLANER

## ÖNSÖZ

Bu çalışma 2018-2019 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Öncelikle lisans eğitimimden sonra yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmam boyunca benden yardımını esirgemeyen, ne zaman ihtiyacım olsa yanımda olan, çok zorlandığım anlarda her zaman sakinliğini koruyabilen ve akademik başarılarımı örnek aldığım çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Deneyle ilgili en ince ayrıntıları bile rahatça sorabildiğim ve her daim tezimle ilgili rahatsız etmeme rağmen üstün bir sabırla yardımcı olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ'ye ve teze başlarken her türlü kararsızlığımda beni yüreklendiren, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bir şeyleri başaramadığımı düşündüğümde her zaman modumu yükseltip bana enerji veren değerli yüksek lisans arkadaşlarım Havva KAŞIKÇI, Seval TURNA, Gizem SÜMER ve Özge BARIM'a,

Haliç Üniversitesi araştırma görevlisi Anıl CEBECİ, Şafak ŞENER ve Hatice KURNAZ'a

Beni koşulsuz seven, her anımda destekleyen, mutsuz olmamı asla istemeyen ve beni bugünlere kadar özenle yetiştirmiş olan aileme; özellikle annem Filiz CEYLANER, babam Kazım CEYLANER ve canım kardeşim Beyza CEYLANER'e sonsuz teşekkür ederim.

Haziran, 2019

Betül CEYLANER

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>II</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>III</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÇİZELGELER</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>X</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI</b> .....	<b>3</b>
2.1. Kanser ve Özellikleri .....	3
2.2. Mide Kanseri .....	4
2.2.1. Kromozomal İnstabilite (CIN) .....	5
2.2.2. Mikrosatellit İnstabilitesi (MSI).....	6
2.2.3. Genom Kararlılığı (GK).....	6
2.2.4. Epstein-Barr Virüsü (EBV).....	6
2.3. Vincristine ve Mide Kanseri.....	6
2.4. Apoptoz .....	7
2.4.1. Mide Kanserinde Apoptoz .....	9
2.5. Otofaji.....	9
2.5.1. Otofaji ve Mide Kanseri.....	12
2.5.2. Vincristine ve Otofaji .....	13
2.6. Hipoksi .....	13
2.6.1. Mide Kanserinde Hipoksi .....	14
2.6.2. Hipoksi ve Otofaji .....	14
2.6.3. Hipoksi ve Vincristine.....	14
2.6.4. Mide Kanserinde Hipoksi-indüklenebilir Faktör 1 $\alpha$ ve Vasküler Endotel Büyüme Faktörü .....	15
2.7. Bcl-2 Ailesi, Bax Geni ve Mide Kanseri .....	16
2.8. Beclin-1 Geni ve Mide Kanseri .....	17
2.9. LC3-II ve Mide Kanseri .....	17
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>19</b>
3.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları.....	19

3.2. Kullanılan Ticari Kitler.....	19
3.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyon ve Besiyerleri .....	19
3.4. Sarf Malzemeler .....	20
3.5. Cihazlar.....	22
3.6. Çoğaltmada Kullanılan Primer Dizileri .....	23
3.7. Kullanılan Boyalar .....	24
3.8. VCR Stok Solüsyonun Hazırlanışı .....	24
3.9. Hücre Kültürü.....	25
3.9.1. Hücre Çözdürme İşlemi .....	25
3.9.2. Hücre Pasajlama.....	25
3.9.3. Hücre Dondurma.....	26
3.9.4. Hücrelerin Sayılması.....	26
3.10. MTT Analizi ile Hücrelerin Canlılığının Belirlenmesi .....	27
3.11. AGS ve MKN45 Hücre Hatlarına Vincristine Uygulaması .....	27
3.12. Hücrelerin Toplanması .....	28
3.13. RNA İzolasyonu .....	28
3.14. cDNA Sentezi.....	29
3.15. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR .....	30
3.16. Hoechst ve Akridin Orange Boyaması .....	30
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>32</b>
4.1. AGS ve MKN45 Hücre Hatlarında MTT Testi Sonuçları.....	32
4.1.1. AGS Hücre Hattında Vincristine'in Sitotoksosite Sonuçları.....	32
4.1.2. MKN45 Hücre Hattında Vincristine'in Sitotoksosite Sonuçları .....	34
4.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Uygulaması .....	36
4.2.1. VEGF Gen Ekspresyon Düzeyi .....	36
4.2.2. HIF-1 $\alpha$ Gen Ekspresyon Düzeyi.....	38
4.2.3. Bax Gen Ekspresyon Düzeyi .....	39
4.2.4. Bcl-2 Gen Ekspresyon Düzeyi.....	40
4.2.5. Beclin-1 Gen Ekspresyon Düzeyi.....	41
4.2.6. LC3-II Gen Ekspresyon Düzeyi .....	42
4.3. AGS ve MKN45 Hoechst ve Akridine Orange Boyaması Mikroskop Görüntüleri .....	44
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>49</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>55</b>
<b>7. KAYNAKÇA.....</b>	<b>57</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>65</b>



## KISALTMALAR

<b>24s hip+VCR+24s hip.</b>	: 24 saat hipoksi koşulda (%1 O <sub>2</sub> ) bekletilip daha sonra 300 nM VCR eklenmiş ve 24 saat hipoksi uygulanmış hücreler
<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>Atg</b>	: Otofaji ile bağlantılı protein
<b>AVO</b>	: Asidik Veziküler Organel
<b>cDNA</b>	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
<b>CIN</b>	: Kromozomal İnstabilite
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	: Deiyonize su
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Distile su
<b>Dk</b>	: Dakika
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>EBV</b>	: Epstein-Barr Virüsü
<b>GK</b>	: Genom Kararlılığı
<b>HIF1-<math>\alpha</math></b>	: Hipoksi İndüklenebilir Faktör
<b>HRE</b>	: Hipoksiye Duyarlı Elementler
<b>MK</b>	: Mide Karsinomu
<b>MSI</b>	: Mikrosatellit İnstabilitesi
<b>MTT</b>	:3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difenil Tetrazolyum Bromür
<b>PI3K</b>	: Fosfatidilinositol-3-OH kinaz
<b>Sn</b>	: Saniye
<b>TGF</b>	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
<b>VCR</b>	: Vincristine
<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

## ŞEKİLLER

### Sayfa No.

Şekil 2. 1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri (Demetriou et al., 2017).....	3
Şekil 2. 2. Cinsiyete Göre Tahmini Yeni Kanser Olguları ve Ölümleri için On Öncü Kanser Türü, ABD, 2019 (Siegel R, Miller K, Jemal A. 2019).....	4
Şekil 2. 3. (a) Yoğunlaştırılmış kromatin, hücre büzülmesi ve hücrenin apoptotik gövdelere parçalanması. (b). Apoptoza girmiş hücrelerin jel görüntüsü (Cotter, 2009). .....	8
Şekil 2. 4. Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yolları. Ekstrinsik yol, ligandın plazma zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla başlatılır. İntrinsik yola mitokondriyal yol da denir. Her iki yol, kaspazların aktivasyonuna yol açar. (Li and Sheng, 2012). .....	8
Şekil 2. 5. Makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji (Tanida, 2011)....	10
Şekil 2. 6. Mayalarda otofaji yolağının morfolojisi (Wang and Klionsky, 2003). ....	11
Şekil 2. 7. Otofaji yolağı (InvivoGen, 2017). .....	12
Şekil 4. 1. MTT testi ile AGS hücre hattına 24 saat VCR muamelesi sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (**p<0.005).....	33
Şekil 4. 2. MTT testi ile AGS hücre hattına 48 saat VCR muamelesi sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (**p<0.005).....	33
Şekil 4. 3. MTT testi ile AGS hücre hattına 72 saat VCR muamelesi sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (**p<0.005).....	34
Şekil 4. 4. MTT testi ile MKN45 hücre hattına 24 saat VCR muamelesi sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (**p<0.005).....	35
Şekil 4. 5. MTT testi ile MKN45 hücre hattına 48 saat VCR muamelesi sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (**p<0.005).....	35
Şekil 4. 6. MTT testi ile MKN45 hücre hattına 72 saat VCR muamelesi sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (**p<0.005).....	36
Şekil 4. 7. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde VEGF ekspresyonu seviye değişimi (**p<0.0001). .....	37
Şekil 4. 8. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde VEGF ekspresyonu seviye değişimi (**p<0.0001). .....	37

<b>Şekil 4. 9.</b> Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde HIF-1 $\alpha$ ekspresyonu seviye değişimi (**p<0.0001).....	38
<b>Şekil 4. 10.</b> Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde HIF-1 $\alpha$ ekspresyonu seviye değişimi (**p<0.005).....	38
<b>Şekil 4. 11.</b> Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde Bax ekspresyonu seviye değişimi (**p<0.0001).....	39
<b>Şekil 4. 12.</b> Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde Bax ekspresyonu seviye değişimi (**p<0.05).....	39
<b>Şekil 4. 13.</b> Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde Bcl-2 ekspresyonu seviye değişimi (**p<0.05).....	40
<b>Şekil 4. 14.</b> Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde Bcl-2 ekspresyonu seviye değişimi (**p<0.0001).....	40
<b>Şekil 4. 15.</b> Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde Beclin-1 ekspresyonu seviye değişimi (**p<0.05).....	41
<b>Şekil 4. 16.</b> Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde Bcl-2 ekspresyonu seviye değişimi (**p<0.0001).....	41
<b>Şekil 4. 17.</b> Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde LC3-II ekspresyonu seviye değişimi (**p<0.05).....	42
<b>Şekil 4. 18.</b> Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde LC3-II ekspresyonu seviye değişimi (**p<0.0001).....	42
<b>Şekil 4. 19.</b> AGS hücrelerinin 48 saat kontrolünün floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.....	44
<b>Şekil 4. 20.</b> AGS hücrelerinin 48 saat kontrolünün floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı. ....	44
<b>Şekil 4. 21.</b> AGS hücrelerinin 48 saat 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme bakıldı.....	44
<b>Şekil 4. 22.</b> AGS hücrelerinin 48 Saat 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı. ....	44
<b>Şekil 4. 23.</b> AGS hücrelerinin 24 saat hipoksik kontrolünün floresans mikroskopta görüntüsü. Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.....	45
<b>Şekil 4. 24.</b> AGS hücrelerinin 24 saat hipoksik kontrolünün floresans mikroskopta görüntüsü. Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı. ....	45

<b>Şekil 4. 25.</b> AGS hücrelerinin 24 Saat hipoksik koşulda 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.....	45
<b>Şekil 4. 26.</b> AGS hücrelerinin 24 Saat hipoksik koşulda 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.....	45
<b>Şekil 4. 27.</b> AGS hücrelerinin 24s hip+VCR+24s hip. uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.....	46
<b>Şekil 4. 28.</b> AGS hücrelerinin 24s hip+VCR+24s hip. uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı. ....	46
<b>Şekil 4. 29.</b> MKN45 hücrelerinin 24 Saat kontrolünün floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.....	46
<b>Şekil 4. 30.</b> MKN45 hücrelerinin 24 Saat kontrolünün floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı. ....	46
<b>Şekil 4. 31.</b> MKN45 hücrelerinin 24 Saat 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.....	47
<b>Şekil 4. 32.</b> MKN45 hücrelerinin 24 Saat 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı. ....	47
<b>Şekil 4. 33.</b> MKN45 hücrelerinin 24 Saat hipoksi kontrolünün floresans mikroskopta görüntüsü. Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.....	47
<b>Şekil 4. 34.</b> MKN45 hücrelerinin 24 Saat hipoksi kontrolünün floresans mikroskopta görüntüsü. Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı. ....	47
<b>Şekil 4. 35.</b> MKN45 hücrelerinin 24 Saat hipoksi koşulda 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.....	48
<b>Şekil 4. 36.</b> MKN45 hücrelerinin 24 Saat hipoksi koşulda 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.....	48
<b>Şekil 4. 37.</b> MKN45 hücrelerinin 24s hip+VCR+24s hip. uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.....	48
<b>Şekil 4. 38.</b> MKN45 hücrelerinin 24s hip+VCR+24s hip. uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı. ....	48

## ÇİZELGELER

### Sayfa No.

Çizelge 2. 1. MK Risk Faktörleri .....	5
Çizelge 3. 1. Kullanılan Ticari Kitler.....	19
Çizelge 3. 2. Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar ve Besiyerleri .....	20
Çizelge 3. 3. Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyon ve Besiyerlerinin İçerik ve Miktarları.....	20
Çizelge 3. 4. Sarf Malzemeler.....	21
Çizelge 3. 5. Cihazlar.....	22
Çizelge 3. 6. Primer Dizileri .....	23
Çizelge 3. 6. Primer Dizileri (devam).....	24
Çizelge 3. 7. Kullanılan Boyalar.....	24
Çizelge 3. 8. Hücre ekimi ve pasajda kullanılan malzemeler .....	26
Çizelge 3. 9. cDNA Sentez Reaksiyon Koşulları ve Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri .....	29
Çizelge 3. 10. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR'da kullanılan reaktif miktarları .....	30
Çizelge 3. 11. Gerçek zamanlı PZR işlemi için reaksiyon koşulları .....	30
Çizelge 4. 1. Elde Edilen Bulgular.....	43

## ÖZET

### HİPOKSİ KOŞULLAR ALTINDA MİDE KANSERİNDE VİNCRİSTİNE’NİN APOPTOZ VE OTOFAJİ ÜZERİNE ETKİSİ

Kanser, dünyada çokça ölüm sebebine neden olan multifaktöriyel ve agresif bir hastalıktır. Mide kanseri de dünya üzerindeki ölümlerin en yaygın dördüncü nedenidir. Hastalığın seyrinde ise apoptoz ve otofaji gibi ölüm mekanizmaları büyük ölçüde işlev görmektedir.

Vincristine ise, tübülün dimerlerine bağlanarak kanserli hücrelerin apoptoza gitmesine sebebiyet veren kemoterapötik bir ilaçtır. Fakat Vincristine aynı zamanda oral kanser hücrelerini apoptozdan koruyarak bu hücrelerin otofajiye gitmesini sağlar ve bunun da kanserin ileri evrelerinde kanseri daha da agresif hale getirdiği düşünülmektedir.

Mide kanserinde Vincristine’nin hipoksik koşullarda otofaji üzerine etkisi ilk defa gösterilerek, ilacın kullanımının mide kanseri hücre hatları üzerine etkisinin gösterilmesi ve hücre davranışının anlaşılması hedeflenmiştir.

Bu amaçla, p53’ü mutant olan AGS hücreleri ile daha az agresif olan MKN45 hücreleri uygun koşullarda kültüre edildi. Hipoksi ve Vincristine ile muamele edildikten sonra apoptozda görev alan Bax ve Bcl-2 genleri, otofajide görev alan Beclin-1 ve LC3-II genleri ve hipokside görev alan HIF-1 $\alpha$  ve VEGF genlerinin ekspresyonları analiz edilerek kullanılan Vincristine’nin kanser hücrelerini tedavi etmedeki başarısı gözlemlenmiştir.

Yapılan çeşitli analizler sonucunda Vincristine’nin mide kanserinde otofajiyi indüklediği ve asidik veziküler organel oluşumuna neden olduğu gözlemlenmiştir. Her iki hücre hattında da Beclin-1 ve LC3-II ekspresyonlarında kontrole göre artış fark edilirken AGS hücre hattında pro-apoptotik Bax geninde azalma, anti-apoptotik Bcl-2 geninde artma gözlemlenmiştir. MKN45 hücrelerinde ise Bax ve Bcl-2 genlerinde artma gözlemlenmiştir. VEGF ekspresyonunun iki hücre hattında da arttığı fakat HIF-1 $\alpha$ ’nın AGS hücrelerinde arttığı, MKN45 hücrelerinde azaldığı bulunmuştur. Hipoksi koşullar kontrole göre kıyaslandığında AGS hücrelerinde VEGF dışındaki tüm genlerde artış olurken, MKN45 hücrelerinde VEGF, Bax ve

Beclin-1 genlerinin ekspresyonu artmış, HIF-1 $\alpha$ , Bcl-2 ve LC3-II genlerinin ekspresyonları azalmıştır. Hipoksi ve Vincristine'nin birlikte uygulandığı durumlarda ise AGS hücrelerinde çalışılan tüm genlerin ifadesinin arttığı, MKN45 hücrelerinde de VEGF harici çalışılan tüm genlerin ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir.

Bunun sonucu olarak Vincristine'nin hipoksik koşullarda AGS hücre hattına kıyasla, daha az agresif olan MKN45 hücre hattında otofajiyi indüklediği bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Mide kanseri, Vincristine, Otofaji, Apoptoz, Hipoksi

### **Teşekkür**

Haliç Üniversitesi'nin 2018-2019 yılları arasında bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği desteğe çok teşekkür ederiz.

## ABSTRACT

### EFFECT OF VINCRISTINE ON APOPTOSIS and AUTOPHAGY IN GASTRIC CANCER UNDER HYPOXIC CONDITIONS

Cancer is a multifactorial and aggressive disease that causes many deaths in the world. Stomach cancer is the fourth most common cause of death in the world. In the course of the disease, death mechanisms such as apoptosis and autophagy function largely.

Vincristine, on the other hand, is a chemotherapeutic drug that binds to tubulin dimers, causing cancer cells to go to apoptosis. However, Vincristine also protects cancer cells from apoptosis, allowing them to go into autophagy, making cancer even more aggressive in late stages of cancer.

In this study, the effects of Vincristine on autophagy under hypoxic conditions are shown for the first time and it is aimed to show the effects of drug use on gastric cancer cell lines and to understand cellular behavior.

For this purpose, AGS cells which is p53 mutant and less aggressive MKN45 cells were cultured under appropriate conditions. After treatment with hypoxia and Vincristine, Bax and Bcl-2 genes which in apoptosis, Beclin-1 and LC3-II genes which in autophagy, and HIF-1 $\alpha$  and VEGF genes involved in hypoxia, the success of Vincristine used in treating cancer cells have been observed.

As a result of various analyzes, it has been observed that Vincristine induces autophagy and causes acidic vesicular organel formation in gastric cancer. In both cell lines, an increase in Beclin-1 and LC3-II expressions were observed compared to control, whereas decrease in pro-apoptotic Bax gene and increase in anti-apoptotic Bcl-2 gene were observed in only AGS cell line. An increase in Bax and Bcl-2 genes was observed in MKN45 cells. It was found that VEGF expression increased in both cell lines but HIF-1 $\alpha$  increased in AGS cells and decreased in MKN45 cells. In AGS cells, all genes expressions increased under hypoxic conditions except VEGF gene but in MKN45 cells, VEGF, Bax and Beclin-1 genes expressions increased and HIF-1 $\alpha$ , Bcl-2 and LC3-II genes expressions decreased.



In cases where hypoxia and Vincristine were combined, expression of all genes were increased in AGS cells and expression of all genes were increased except VEGF was observed in MKN45 cells.

As a result, Vincristine was found to induce autophagy in the less aggressive MKN45 cell line compared to the AGS cell line under hypoxic conditions.

**Keywords:** Gastric Cancer, Vincristine, Autophagy, Apoptosis, Hypoxia

### **Acknowledgements**

We would like to thank Haliç University for its support in scientific research and application studies between 2018-2019.



## 1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz olarak bölünmesi ve başka yerlere göç etmesi sonucu organizmayı ölüme götüren multifaktöriyel ve agresif bir hastalıktır. Mide kanseri ise, dünyadaki ölümlerin dördüncü nedeni olarak bilinmektedir (Yang et al., 2015). Proliferatif sinyal yollarının gereğinden fazla aktive olması ya da tümör baskılayıcı genlerin işlevlerini yitirmesi sonucu ortaya çıkabilmektedir.

Hücre ölümünü sağlayan belli başlı mekanizmalar olmasına rağmen en çok bilinenleri apoptoz ve otofajidir. Apoptoz, programlı hücre ölümü olup ökaryotların gelişiminde büyük rol taşır. Otofaji ise, kritik bir öneme sahip olan hücre ölüm mekanizmasıdır. Fakat buna karşılık kanserin ilerleyen evrelerinde otofaji gerçekleşmesi kanserin agresifleşmesine sebep olur. Genomik kararsızlık ilk evrelere göre artar ve çevre dokuda nekroza sebebiyet verir (Demetriou et al., 2017). Hücrelerin apoptozdan korunması, kanserli hücrelerin otofajiye gitmesine sebebiyet verir, bu da agresif kanserler için büyük bir tehlikedir.

Kemoterapik ilaçların kanserli hücreleri hücre ölümüne götürdüğü bilinmektedir. Vincristine de birçok kanser türünde tedavi amaçlı olarak kullanılan, mikrotübülleri engelleyerek tümör büyümesini durduran bir ajandır (Johnson et al., 1963).

Vincristine'nin oral kanser hücrelerini apoptozdan korumak için otofajiyi indüklemesi ile ilgili sadece bir yayın bulunmaktadır (Hsich et al., 2015). Ayrıca Vincristine'nin hipoksik koşullarda otofaji üzerine etkisini araştıran yayınlara literatürde rastlanmamıştır.

Yapılan bu çalışmada ilk defa hipoksi koşullar altında mide kanseri hücreleri olan MKN45 ve AGS hücrelerinde proapoptotik Bax geni ve antiapoptotik Bcl-2 geni; otofajik genler olan Beclin-1, LC3-II'in; hipokside artış gösteren hipoksi indüklenebilir faktör alfa ve vasküler endotel büyüme faktörü gen ekspresyonlarını incelemek amaçlanmaktadır. Bu sayede, mide kanserinde Vincristine'nin hipoksik koşullarda otofaji üzerine etkisi ilk defa gösterilerek, ilacın kullanımının mide

kanseri hücre hatları üzerine etkisinin gösterilmesi ve hücresel davranışın anlaşılması hedeflenmiştir.

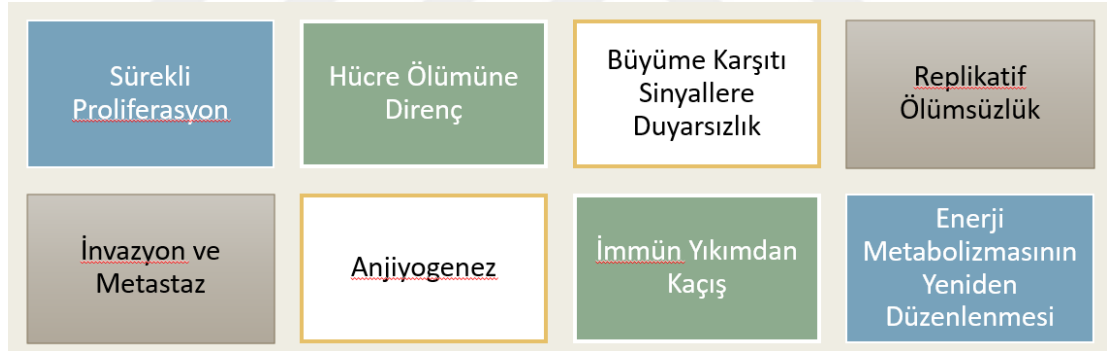


## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

### 2.1. Kanser Ve Özellikleri

Karsinogenez; hücrelerin bir büyüme faktörü olmadan veya reseptör aktivasyonuna ihtiyaç duymadan, düzensiz olarak bölünüp çoğalmasını ve başka yerlere invazyon ve metastaz yapmasını içeren çok basamaklı genetik kökeni olan bir hastalıktır.

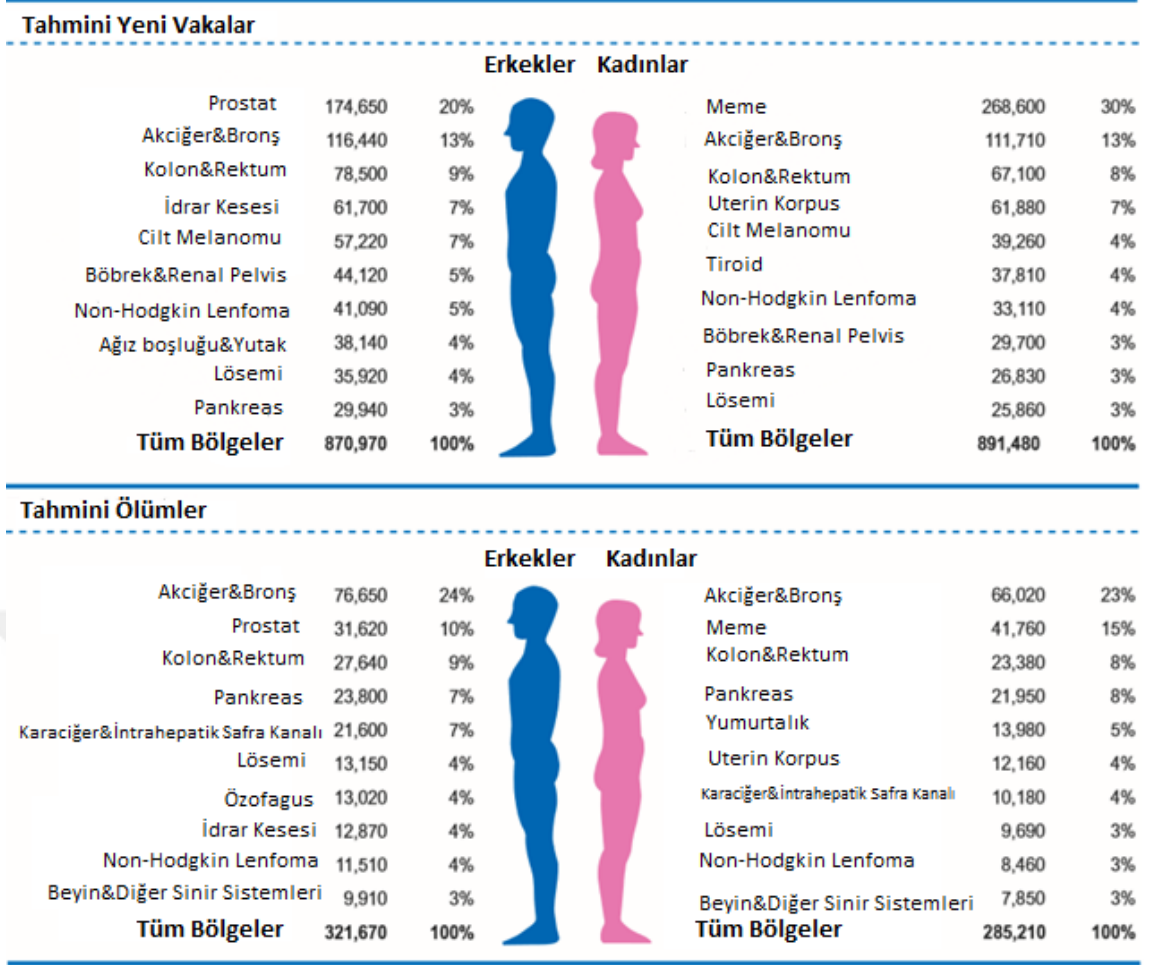
Kanserin, kanser yolaklarının karışıklığı ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Kanserde genel olarak genetik değişimler göz önünde bulundurulsa da sürekli proliferasyon, hücre ölümüne direnç, büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık, replikatif ölümsüzlük, invazyon, metastaz ve anjiyogenez gibi olaylar gerçekleşir (Şekil 2.1) (Demetriou et al., 2017).



Şekil 2. 1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri (Demetriou et al., 2017).

Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi için, hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenleyen genlerde değişimin meydana gelmiş olması gerekir. Etkilenen genler; onkogenler, hücre büyümesi ve çoğalmasını arttıran ve tümör baskılayıcı genler, hücre bölünmesini ve yaşamasını inhibe eden genler olarak iki geniş kategoriye ayrılmıştır (Hanahan and Weinberg, 2011).

Kanser, dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur ve Amerika'da ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Cinsiyete göre tahmini yeni kanser olguları ve ölümleri için on öncü kanser türü Şekil 2.2'de gösterilmiştir (Siegel et al., 2019).



Şekil 2. 2. Cinsiyete Göre Tahmini Yeni Kanser Olguları ve Ölümleri için On Öncü Kanser Türü, ABD, 2019 (Siegel R et al., 2019).

Kanser tedavisinde mortaliteyi azaltmak ve sağkalımı arttırmak için; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi-hormon tedavisi, immünoterapi, sinyal transdüksiyon inhibitörleri, gen terapisi ve anjiyogenez inhibitörleri olmak üzere birçok farklı tedavi çeşidi kullanılır (Dellabona et al., 1999).

## 2.2. Mide Kanseri

Yirminci yüzyılın ortasına kadar, mide kanseri çoğu ülkede kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni idi (Tan et al., 2019). Yaklaşık bir milyon teşhis edilmiş vaka ve yılda 700.000'den fazla ölüm göz önüne alındığında, mide karsinomu (MK) dünya genelinde kanser ölümlerinin en yaygın dördüncü nedenidir (Fonkoua and Nelson, 2018). Dünya çapında MK erkeklerde en yaygın dördüncü kanser (akciğer, prostat ve kolorektal kanserler sonrası) ve kadınlarda beşinci en yaygın kanser (meme, servikal, kolorektal ve akciğer kanserinden sonra) olarak görülür. 2015 yılında mide kanseri

ölümlerin en yaygın ikinci sebebi iken bu sıralama 2018 yılında dörde kadar gerilemiştir (Yang et al., 2015).

Gastrik adenokarsinom, son zamanlarda genetik olarak, kromozomal instabilite, mikrosatellit instabilitesi, genom kararlılığı ve Epstein-Barr virüsü-pozitif olmak üzere dört moleküler alt gruba ayrılmıştır. (Molaei et al., 2018). MK'nin başlıca risk faktörlerinden bazıları, Helicobacter pylori enfeksiyonu ve atrofik gastrit, tütün kullanımı, diyet tuzu ve gıda koruma, pernisiyöz anemi ve E-kaderin genindeki anormallikler dahil olmak üzere Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

### 2.2.1. Kromozomal İnstabilite (CIN)

CIN, MK tümörlerinin %71'inde TP53'te, ardından ARID1A, KRAS, PIK3CA, RNF43, ERBB2 ve APC genlerinde mutasyon bulundurur. TP53 değişiklikleri daha önce gastrik prekanseröz lezyonlarla ilişkilendirilmiştir; bu da p53 fonksiyonunun kaybının mide karsinogenezinde erken bir olayı temsil edebileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 2. 1. MK Risk Faktörleri (Molaei et al., 2018)

<b>H. pylori enfeksiyonu</b>	En önemli risk faktörü, uzun süreli enfeksiyon, kronik atrofik gastrit ve kanser öncesi değişikliklere yol açar. Birinci sınıf karsinojendir. MK'li kişiler daha yüksek oranda H. pylori enfeksiyonuna sahiptir.
<b>Sigara</b>	Sigara içmenin MK riskini artırdığı çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir.
<b>E-kadherin geni</b>	CDH1 genindeki mutasyonun neden olduğu kalıtsal MK, E-kadherini şifreler.
<b>Pernisiyöz anemi</b>	Pernisiyöz anemisi olan kişilerin MK riskini artırdığı gözlenmiştir. Bu durumu doğrulamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.
<b>Diyet</b>	Diyet, MK'nin önlenmesinde veya geliştirilmesinde önemli rol oynar. Tuz ve tuz korunmuş gıdalar MK riskini artırır.
<b>Epstein-Barr virüsü</b>	MK'lerin %5 ila %10'u EBV ile ilişkilidir. Mekanizması DNA metilasyonudur (gen susturulması).

CIN alt tipinin bir başka önemli özelliği, anormal hücre büyümesinin teşvik edilmesine yol açan tirozin kinazların reseptörlerini kodlayan genlerin sık genomik amplifikasyonudur (Riquelme et al., 2015).

### **2.2.2. Mikrosatellit İnstabilitesi (MSI)**

MSI, nispeten daha yaşlı kadınlarda oluşan MK hastaları ile ilişkili olan genomik instabilitenin ana fenotiplerinden biridir. MSI vakaları genellikle diğer kanserlerde tanımlanmış olan sorunlu bölgelerinde bulunan mutasyonlarla birlikte PIK3CA, ERBB3, ERBB2 ve EGFR'de mutasyonların birikmesi ile karakterize edilir (Schwartz et al., 1997).

### **2.2.3. Genom Kararlılığı (GK)**

GK alt tipi tipik olarak daha genç hastalarda teşhis edilir, oldukça düşük bir TP53 mutasyon sıklığına ve CIN'e kıyasla anoploidiye sahiptir. CDH1 ve RHOA genlerindeki mutasyonlar, sırasıyla %13-37 ve GK adenokarsinomlu vakaların %14-25'inde saptanmıştır, böylece bu histolojik tipteki karsinogenezde değiştirilmiş hücre adezyonunun önemi vurgulanmıştır (Riquelme et al., 2015).

### **2.2.4. Epstein-Barr Virüsü (EBV)**

Gastrik adenokarsinomların yaklaşık %9-10'u EBV için pozitifdir ve bu vakaların çoğu erkek hastaları ve fundus veya mide gövdesindeki adenokarsinomların lokalizasyonunu içerir (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). EBV-pozitif tümörlerin yaklaşık %80'i, PI3Ka proteinini kodlayan PIK3CA genindeki mutasyonları barındırır (Arcaro and Guerreiro, 2007).

Gelişmiş beslenme, besin korunması, kişinin daha iyi korunması, erken tanı ve tedavi nedeniyle görülme sıklığı azalmakla birlikte, hastalık hala kötü bir prognoz taşır. Genellikle ileri aşamalarda teşhis edilir. Tedavinin esasına uygun durumlarda kemoterapi veya kemoradyasyon ile cerrahi rezeksiyondur (Carcas, 2014).

## **2.3. Vincristine ve Mide Kanseri**

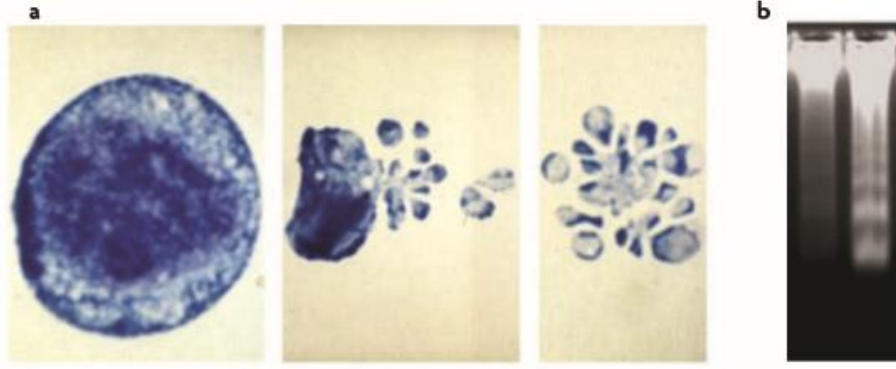
Vincristine (VCR), hücre bölünmesi ve çoğalması için gerekli olan mitotik iğlerin gelişimini engelleyerek neoplastik kanserleri hedef alan bir vinka alkaloid kemoterapötiktir (Winship et al., 2019). Vinka alkaloidleri, tubulin üzerindeki

spesifik bir tanıma bölgesinde, tubulin dimerlerine bağlanır. VCR'ye maruz kalan hücreler, zayıf oluşmuş mitotik bileşen nedeniyle mitotik yeteneklerini kaybeder (Taghizadehghalehjoughi et al., 2019) ve daha sonra bölünemeyen hasarlı (hedef) hücreleri askıya alır ve apoptoza yollar (Winship et al., 2019). Çeşitli kanser türlerini tedavi etmek için kullanılır (Taghizadehghalehjoughi et al., 2019). Kemoterapötik ilaçlara duyarlılık bakımından çeşitli tümörler farklılık gösterir ve ilaç direnci kemoterapi ile tetiklenebilir. VCR, mide kanserinde apoptozu tetikler (Chen et al., 2004).

#### **2.4. Apoptoz**

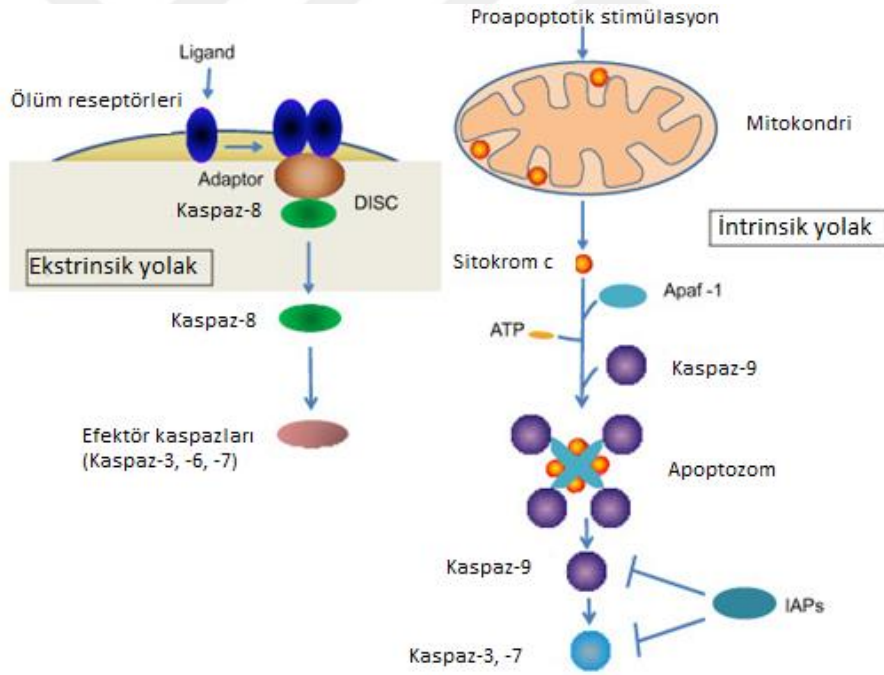
Programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü veya hücre intiharı olarak da bilinen apoptoz, gelişim süreçlerinde ve ökaryotlarda homeostazın korunmasında hayati bir rol oynar (Kerr et al. 1972; Elmore, 2007; Gültekin ve ark. 2008). Hücrede gelişen sinyaller sonucunda hiçbir patojenik durum veya immün tepkiye sebep olmadan hücre ölümü gerçekleşir. Eğer hücre, etrafındaki hücrelerle ilişkisini kaybeder veya onarılmayacak bir hasara uğrarsa apoptoz mekanizması başlar (Meier et al., 2000). Hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, nükleer ve hücre parçalanması ile karakterize edilir. Bu özellikler, daha sonra komşu fagositik hücreler tarafından yutulan apoptotik cisimlerin oluşumu sonuçlanır (Şekil 2.3.a). Internükleozomal DNA bölünmesi, apoptozun biyokimyasal bir işareti olan elektroforetik jelde yürütülür (Şekil 2.3.b). Apoptozun bir diğer özelliği, membran lipit fosfatidilserin, plazma zarının iç tarafından dışına doğru hareket etmesidir, burada fagositik hücrelerin apoptotik hücreleri içine alması için bir tanıma sinyali olarak işlev görür (Cotter, 2009).





**Şekil 2. 3.** (a) Yoğunlaştırılmış kromatin, hücre büzülmesi ve hücrenin apoptotik gövdelere parçalanması. (b). Apoptoza girmiş hücrelerin jel görüntüsü (Cotter, 2009).

Apoptoz, memeli hücrelerinde iki ana yolla kontrol edilir; Ekstrinsik ve intrinsik yol. Ekstrinsik yolakta ölüm reseptörleri görev alırken intrinsik yolakta reseptörler bulunmaz (Hanahan and Weinberg, 2011) (Şekil 2.4).



**Şekil 2. 4.** Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yolları. Ekstrinsik yol, ligandın plazma zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla başlatılır. İntrinsik yola mitokondriyal yol da denir. Her iki yol, kaspazların aktivasyonuna yol açar. (Li and Sheng, 2012).

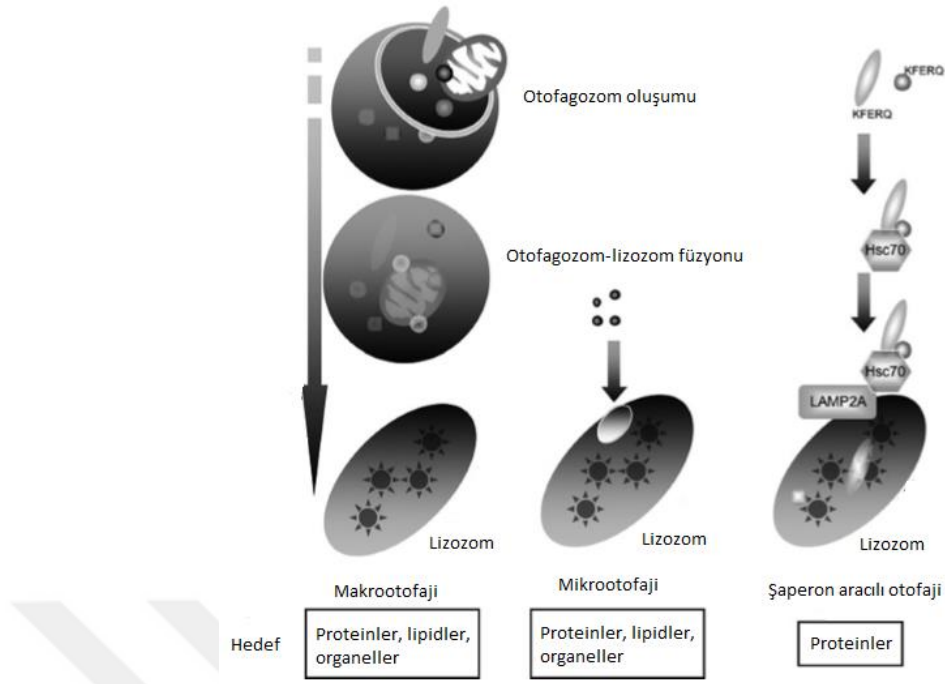
#### **2.4.1. Mide Kanserinde Apoptoz**

Apoptoza aracılık etmede birçok onkogen ve tümör baskılayıcı gen yer alır. Tümör baskılayıcı gen olan p53, G1/S sınırına yakın DNA replikasyonunun başlangıcını düzenleyen kritik genlerden biridir. p53 seviyeleri, G1 seviyesinde askıya alınmada veya apoptozu tetikleyen DNA hasarına cevaben artar. Diğer malign tümörlerde olduğu gibi, p53 gen mutasyonları mide kanserinde sıklıkla gözlenir. Bu mutant p53 molekülleri artık hücre büyümesini durdurmaz veya apoptozu tetiklemez (Fan et al., 2001).

#### **2.5. Otofaji**

Otofaji, tüm çekirdekli hücrelerde işlev gösteren ve hücre içi dengenin sağlanmasında kritik öneme sahip olan bir hücresel yıkım yolağıdır. Ayrıca hücre içi parazitler, endoplazmik retikulum ve mitokondriler gibi organellerin sindirilmesini sağlar (Mizushima et al., 2011). Ubikitin-proteozom sistemi ile kısa ömürlü proteinler parçalanırken, hücre içi organeller ve büyük proteinler, otofaji ile aminoasitler gibi daha küçük yapıtaşlarına ayrılırlar ve hücre kullanımı için yeniden kullanılırlar (Ohsumi, 2001). Genel olarak, otofaji, büyüme faktörü yoksunluğu nedeniyle açlık veya stres dönemlerinde gerekli olan hücre homeostazında hayatta kalma yanlısı bir rol oynar (Ouyang et al., 2012).

Mikro ve makrotofajinin yanı sıra şaperon aracılı otofaji dahil olmak üzere çeşitli otofajiler vardır ve bunlar mekanizmaları ve fonksiyonlarında farklılıklar gösterir (Şekil 2.5) (Mizushima et al., 2008). Bugüne kadar, memeli hücrelerinde makro-otofaji, mikro-otofaji, şaperon aracılı otofaji ve alternatif makro-otofaji olmak üzere dört çeşit otofaji tarif edilmiştir (Giansanti et al., 2011).

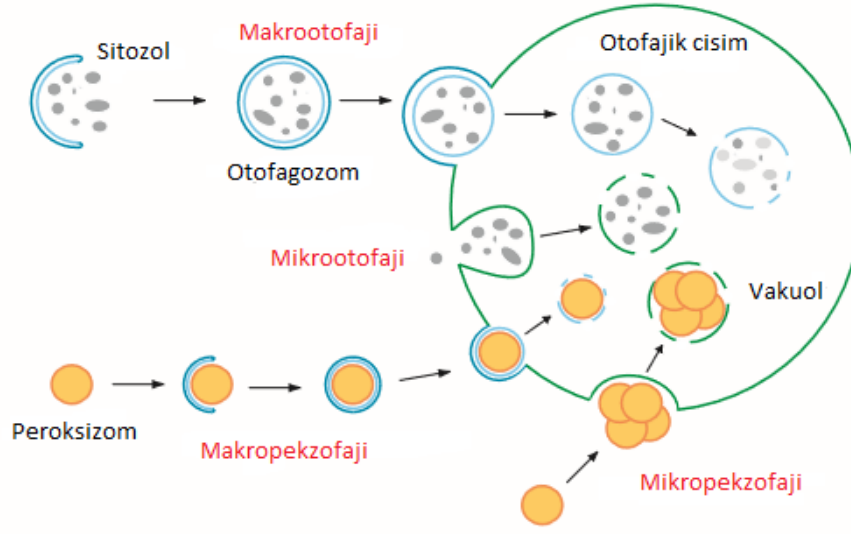


Şekil 2. 5. Makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji (Tanida, 2011).

Mikrotofaji, sitoplazmanın veya bütün organellerin doğrudan vakuol membrandan alımını içerir. Mikrotofajinin aksine, makrotofaji, vakuol zarından ayrı başlatılan bir ayrılma olayı içerir (Wang and Klionsky, 2003). Otofaji sırasında hücreler, lizozomun dağıtılması için organelleri, proteinleri veya sitoplazmanın kısımlarını ayıran çift membranlı vezikülleri, otofagozomları oluşturur (Kroemer et al., 2010). Hem mikro hem de makrotofaji, nihayetinde vakuol lümeni içinde parçalanarak tek membranlı bir otofajik cisim üretir (Şekil 2.6) (Wang and Klionsky, 2003).

Günümüzde otofajinin fizyolojik olarak birkaç farklı seviyede düzenlenebileceği fikrini destekleyen kanıtlar artmaktadır:

1. Otofajinin upstream bölgesinde hareket eden sinyal yolları
2. Otofagozom oluşumu
3. Otofagozomların olgunlaşması ve lizozomlarla füzyonu (Mehrpour et al., 2010).

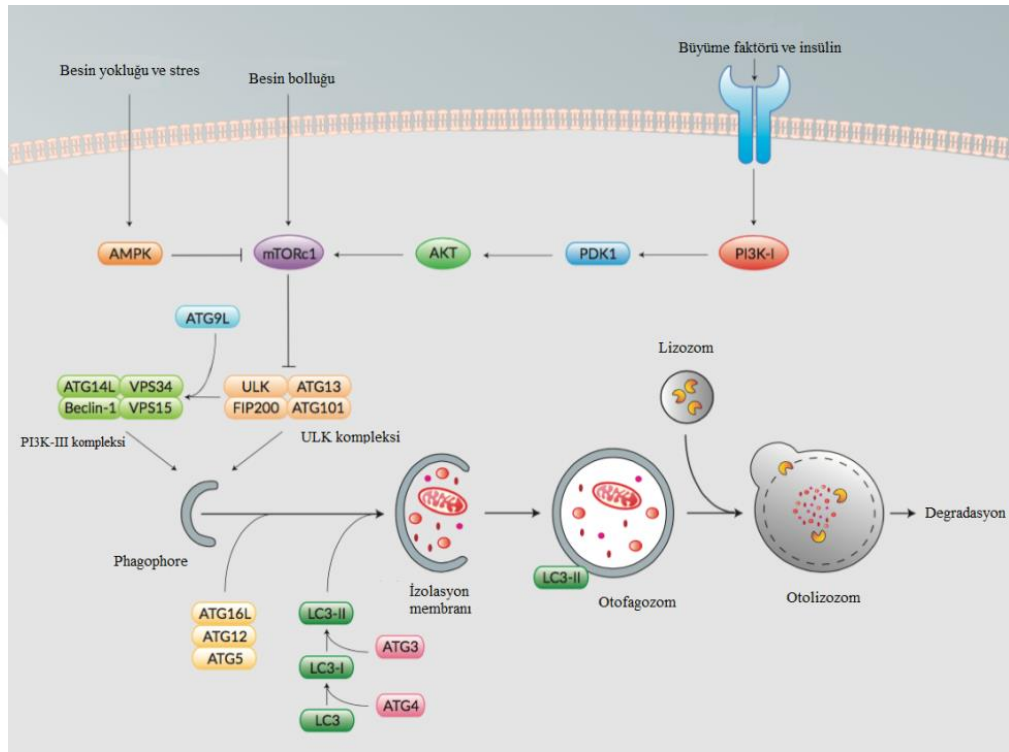


Şekil 2. 6. Mayalarda otofaji yolağının morfolojisi (Wang and Klionsky, 2003).

Makro-otofaji, bir otofagozom olan sitozolik çift membranlı vezikül oluşumunu içerir. Otofagozomlar, vakuol lümeni içinde tek membranlı otofajik gövdeyi salarak vakuol membranı ile birleşir. Otofajik gövde, vakuollü hidrolazlar ile parçalanır. Mikro-otofaji sırasında, ayrılma olayı doğrudan vakum yüzeyinde meydana gelir. İşlem, vakuol içinde parçalanarak tek membranlı vezikül ile sonuçlanır. Peroksizomlar, özel bir otofaji türü olan pekzofaji yolu ile ayrıştırılmak üzere vakuol içine seçici olarak alınabilir. Makro-pekfzofaji, sitozolde ayırıcı bir vezikül oluşumunu gerektirdiğinden, mikro-otofaji doğrudan vakuol yüzeyinde meydana gelir (Wang and Klionsky, 2003).

Otofaji mekanizmalarındaki proteinlerin çoğu otofaji ile bağlantılı proteinler (Atg) olarak adlandırılır ve mayalardan elde edilmişlerdir (Xie and Klionsky, 2007). Klasik otofaji yolağı, evrimsel olarak korunmuş bir dizi genin uyumlu hareketini gerektirir (<https://www.invivogen.com/review-autophagy>, Erişim tarihi: 5 Mart 2019). Otofajinin başlaması serin/treonin kinaz Atg1'i (memelilerde Ulk1 ve 2) gerektirir. Otofajinin uyarılmasından sonra Atg1, Atg13, 200 kDa'lık FAK familyası kinaz-etkileşimli proteini ve ATG101 izolasyon membranında bir kompleks oluşturur ve bu kompleks, rapamisin kompleksi 1'in (TORC1) hedefi ile negatif olarak düzenlenir. Atg1 kompleksinin kinaz aktivitesi, otofagosomal yapıların oluşumunu çekirdeklediği düşünülmektedir. Atg1, Atg9'u fosforile ederek Atg 8'in ön otofagozomal yapıya (PAS) bağlanmasını tetikleyen Atg18 ile olan etkileşimine izin verdiği için otofaji açısından çok gereklidir (Anding and Baehrecke, 2015).

Vezikül çekirdeklenmesi, Beclin-1, koful ayırma proteini (Vps34) ve diğer proteinler tarafından oluşturulan sınıf III fosfatidilinositol-3-OH kinaz (PI3K) kompleksine bağlıdır. Atg7, Atg5'in Atg12'ye konjugasyonu ve LC3'ün fosfatidiletanolamin (PE) konjuge LC3-II formuna dönüşümü olmak üzere iki ubikuitin benzeri konjugasyon yoluna katılır. Atg5-Atg12 konjugatı, Atg16L1 proteini ile büyük bir kompleks oluşturur. Her iki konjugasyon sistemi, otofagozom oluşumu için gereklidir (Şekil 2.7.) (<https://www.invivogen.com/review-autophagy>, Erişim tarihi: 5 Mart 2019).



Şekil 2. 7. Otofaji yoluğu (<https://www.invivogen.com/review-autophagy>, Erişim tarihi: 5 Mart 2019).

### 2.5.1. Otofaji ve Mide Kanseri

Otofaji, kanser gelişimi, ilerlemesi ve tedaviye yanıt olarak iki ucu keskin bir kılıç olarak kabul edilmiştir. Bunu destekleyen doğrudan kanıtlar, otofajinin inhibisyonunun tümör oluşumunu desteklediği, oysa yerleşik tümörlerde artmış otofajinin hücre sağkalımını desteklediği bulgularından gelir (Zhan et al, 2012).

Bazı stres koşullarında, otofaji kuvvetle tetiklenir ve hücrelerin strese adapte olmasını sağlayan ve hücrel stres giderilinceye kadar belirli bir süre boyunca hayatta kalmalarını sağlayan bir pil gibi davranır. Ayrıca, mide kanseri hücrelerinde, anormal veya aşırı otofajik aktivite sitotoksisite üretebilir ve sonuçta otofajik hücre ölümü ile sonuçlanan ve tümör gelişimini baskılayan, tümör hücresinin hayatta

kalması için gerekli olan hücre içi bileşenlerin yanlış bir şekilde bozulmasına katkıda bulunabilir. Artmış otofaji, kanser hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde azaltabilir (Chao et al., 2019).

Otofajinin tümör metastazındaki rolünün hem pro-metastatik hem de anti-metastatik olduğuna inanılmaktadır. Mide kanseriyle ilgili olarak, otofajik hücre ölümü metastazı engelleyebilse de, mevcut bulguların çoğu otofajinin çeşitli yönleri etkileyerek tümör metastazını kolaylaştırdığı fikrini desteklemektedir.

Aktif hale geçmiş otofaji, sırasıyla, tümör anjiyogenezini teşvik ederek, besin kaynağı sağlayarak ve enflamatuvar tepkileri düzenleyerek tümör mikroçevresini şekillendirir (Qian and Yang, 2016). Kanser korunumu sırasında, otofaji yolağının aktivitesi çoğu zaman upregüledir. Bu düzenleme, yeterli enerjiyi sağlar ve hipoksi ve metastaz gibi stres sırasında hayatta kalmaya katkıda bulunur (Folkerts et al., 2018).

### **2.5.2. Vincristine ve Otofaji**

Otofagosomların lizozomlarla füzyonu mikrotübül bağımlıdır (Zheng et al., 2015). VCR, tübülünleri hedef alarak otofajinin füzyon evresinde otofagosomların lizozomla birleşmesi sırasında görev alır ve otofajinin etkisinin azalmasına neden olur (Hansen and Jäättelä, 2008). Oral kanser üzerinde ise VCR'nin otofaji tetikleyici bir etkisi vardır (Hsich et al., 2015).

## **2.6. Hipoksi**

Oksijen, temel olarak çoğu ökaryotik organizmanın aerobik metabolizmaları için gereklidir. Bununla birlikte, kardiyovasküler, pulmoner ve hematolojik hastalıklarda oksijen iletimi kesintiye uğradığında, bu enerji metabolizması ciddi şekilde bozulur. Bu nedenle, organizmalar hücrelerin oksijen tüketen koşullarda hayatta kalmalarını sağlamak için sayısız uyarlanabilir mekanizma geliştirmiştir. Hipoksik adaptasyon, refleks hiperventilasyonu, kırmızı kan hücrelerinin üretimini artmasını ve kombinasyon halinde atmosferden dokulara oksijen verilmesini artıran yeni damar oluşumunu içerir (Yeo et al., 2004). Hücresel seviyede adaptasyon, oksidatif fosforilasyondan anaerobik glikolize, glukoz alımını artıran ve hücrenin hayatta kalması veya ölümü ile ilgili stres proteinlerinin ifadelerini değiştiren bir enerji metabolizması anahtarını içerir (Bunn and Poyton, 1996).

### 2.6.1. Mide Kanserinde Hipoksi

MK, gastrik epitel hücrelerinde ortaya çıkar ve diğer tümör türlerine benzer şekilde bir Warburg etkisi gösterir. Bu etki, aerobik koşullar altında enerji sağlamak için oksidatif fosforilasyondan ziyade yüksek miktarda glikoz alımı, glikoliz ve yüksek miktarda piruvatın laktik aside metabolize edilmesini içerir. Warburg etkisinin egemen olduğu metabolik değişikliklere son zamanlarda metabolik yeniden programlama deniyor ve bu değişikliklerin çalışmaları tümör hücresi metabolizmasının daha derin bir şekilde anlaşılmasını sağlamıştır. Örneğin, MK hücrelerinin ve normal hücrelerin sadece glukoz metabolizmasında değil, aynı zamanda lipidlerin ve amino asitlerin metabolizmasında da metabolik farklılıklar gösterdiği gösterilmiştir (Liu et al., 2019). Hipoksi, mide kanseri gibi katı tümörlerin bir büyüme özelliği türüdür. HIF-1 $\alpha$ , tümör hücrelerinin hipoksik ortama adapte olmaları için bir dizi regülatör yanıtındaki en önemli ve merkezi regülatördür (Fu et al., 2019).

### 2.6.2. Hipoksi ve Otofaji

Hipoksi, oksidatif fosforilasyon yolunun inhibisyonu yoluyla ATP seviyelerini azalttığı bilinen enerji sınırlayıcı strestir. Daha önce, “metabolik stres” (besin yoksunluğu ile birlikte hipoksinin) otofajiye neden olduğu gösterilmiştir (Azad et al., 2007). Tümör hipoksi sıklıkla kötü sonuçlarla ilişkilidir ve tümörlerdeki hipoksik hücreler sonunda ölmekle birlikte, bunların apoptoza dirençli olduklarına dair kanıtlar vardır. Hipoksinin, farklı hücresel ortamlarda otofajiyi indüklediği gösterilmiştir ve otofajinin, hücresel bileşenlerin geri dönüşümü yoluyla hipoksik hücreler için hayatta kalma mekanizması olarak işlev görebileceği gösterilmiştir (Tan et al., 2016). Hipoksinin neden olduğu otofaji, tümör hücresinin hayatta kalmasını teşvik edebilen önemli bir sitoprotektif ve ilaç direnç mekanizmasıdır (Lai et al., 2016).

### 2.6.3. Hipoksi ve Vincristine

Hipoksik koşullar altında, HIF-1 $\alpha$ , stabil hale gelir ve aktif bir transkripsiyon faktörü oluşturmak için HIF-1 $\beta$  ile dimerize olur. Daha sonra dimer, hedef genlerin promotöründe bulunan HRE'ye bağlanır. Bu daha sonra VEGF de dahil olmak üzere tümör büyümesini ve anjiyogenezini teşvik eden faktörlerin yükselmesine neden olur

(Park et al., 2016). Yapılan araştırmalar sonucunda VCR'nin mikrotübül bozucu bir ilaç olduğu ve HIF-1 $\alpha$ 'nın kararlılığını azalttığı gözlenmektedir (Chen and Sang, 2016). VCR'nin, hem HIF-1 $\alpha$  proteinini hem de VEGF mRNA ekspresyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Hipoksik koşullar altında, VCR, glioblastoma hücrelerinde HIF-1 $\alpha$  protein seviyelerini önemli ölçüde düşürmüştür (Park et al., 2016).

#### **2.6.4. Mide Kanserinde Hipoksi-indüklenebilir Faktör 1 $\alpha$ ve Vasküler Endotel Büyüme Faktörü**

Hipoksi, günümüzde malignite gelişimini yönlendiren önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir ve hücrelerin değişen oksijen seviyelerine yanıtındaki ana düzenleyici protein, hipoksi ile indüklenebilen faktör-1 alfadır (HIF-1 $\alpha$ ) (Zhu et al., 2013). HIF-1 $\alpha$ , anjiyogenez ve glikolizin indüklenmesi yoluyla oksijen ve besinlerin dağıtımını kontrol ettiği bilinen birçok gen için bir transkripsiyon faktörüdür (Oh et al., 2008).

HIF-1 $\alpha$ ,  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinden oluşan bir heterodimerdir. HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu, hücrel oksijen durumu ile ilgilidir, oysa HIF-1 $\beta$  alt birimi, yapısal olarak hücrel hipoksiden bağımsız olarak eksprese edilir. HIF-1 $\alpha$  çekirdekte HIF-1 $\beta$  ile dimerleşir ve hipoksiye duyarlı elementlere (HRE'ler) bağlanarak transkripsiyonel olarak birkaç geni aktive eder (Zhu et al., 2013). Tümör anjiyogenezinde kilit bir faktör olan vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)'nin transkripsiyonunu ve hipoksik koşullar altında tümör hücresinin hayatta kalmasını teşvik edebilen büyüme faktörlerinin ifadesini aktive eder (Urano et al., 2006). HIF-1 çok sayıda aşağı akış hedef geninin transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla çeşitli biyolojik etkileri tetikler, böylece tümör hücreleri hipoksik ortama adapte olur ve hayatta kalmaya devam eder, bunu takiben kötü huylu transformasyon, proliferasyon, metastaz ve radyoterapi ve kemoterapi gerçekleşir (Fu et al., 2019).

Anjiyogenik süreç, çok sayıda pro- ve anti-anjiyogenik faktör dizisini dengelemek suretiyle hassas bir şekilde kontrol edilir. Bunlar arasında, VEGF, endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve göcünü destekleyebilen ve vasküler geçirgenliği artıran en güçlü tümör anjiyogenik faktörlerinden biridir (Huang et al., 2005).

Tümör anjiyogenez ve neovaskülarizasyon VEGF ekspresyonu gerektirir ve HIF-1 $\alpha$ 'nın VEGF promotörüne bağlanması, hipoksik koşullar altında VEGF ekspresyonunun indüklenmesine neden olan ana yoldur. Tümör VEGF



ekspresyonunun, birkaç kanserde klinikopatolojik değişkenlerden bağımsız olarak tümör tekrarı veya azalmış sağkalım için önemli bir belirteç olduğu gösterilmiştir. Mide kanseri vakalarında, VEGF ekspresyonu ile lenfatik istila arasında pozitif bir ilişki vardır (Oh et al., 2008).

VEGF, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak güçlü bir anjiyogenez uyarıcısıdır ve VEGF ekspresyonunun hipoksi sırasında HIF-1 $\alpha$ 'ya aracılık ettiği kabul edilir. VEGF geni, düzenleme bölgesinde çok sayıda HIF-1-bağlayıcı bölge içerir ve HIF-1 $\alpha$ , VEGF promotörünü *in vitro* olarak aktive edebilir (Kuwai et al., 2003).

VEGF, endotel proliferasyonu ve göç, vasküler lümen oluşumu ve vasküler geçirgenlik dahil anjiyogenezde yer alan işlemlerin çoğunu destekleme işlevi gördüğünden, VEGF indüksiyonunun, MK anjiyogenezini arttırdığı ana stratejilerden biri olabileceği önerilmektedir (Huang et al., 2005).

## **2.7. Bcl-2 Ailesi, Bax Geni ve Mide Kanseri**

Bcl-2 ailesi apoptozun ana düzenleyicilerini içerir ve molekül birçok kanser hücresi türünde aşırı eksprese edilir. Düşük Bcl-2 ekspresyonu, antikanser ilaçlara apoptotik tepkileri arttırırken, Bcl-2 ekspresyonunun artması, kemoterapötik ilaçlara ve radyasyon tedavisine direnç sağlar (Ouyang et al., 2012). Anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin yükselmesi, kanserde yaygın bir özelliktir ve bunlar, onkogeniz sırasında tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak indüklenen pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerini inhibe etmeye yarar (Llambi and Green, 2011). Bütün Bcl-2 ailesi, Bax, Bak, Bad, Bcl-XS, Bid, Bik, Bim ve Hrk gibi birkaç pro-apoptotik üyeden ve ayrıca Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve McI-1 gibi birkaç anti-apoptotik üyelere oluşur (Ouyang et al., 2012).

Anormal Bcl-2 protein ekspresyonu mide kanserojen dizisinde sıralı bir şekilde gösterilmiştir (Lauwers et al., 1995). Bax'ın aşırı ekspresyonunun hücre ölümünü hızlandırdığı, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonunun Bax'ın ölüm fonksiyonunu baskıladığı mide kanseri çalışmalarında gösterilmiştir. Bu nedenle, Bcl-2/Bax oranı, bir hücrenin apoptoz geçirme eşiğinin kritik bir faktöründen biri olabilir. Yine yapılan bir çalışmada Bax'ın Bcl-2'ye bağlanarak sınırlandırılan sitokrom c salınımına yol açtığı tespit edilmiştir (Zhao et al., 2004).

İyi farklılaşmış gastrik kanserlerde Bcl-2 geninde heterozigotluğun kaybı mevcuttur (Krajewska et al., 1996). Bcl-2 familyası proteinlerinin değişimi, mide

kanserinde karmaşık ancak önemlidir. Gastrik kanserlerin % 72'si Bcl-2'yi aşırı eksprese eder. Bax çerçeve kayması mutasyonları, yüksek düzeyde mikrosatellit kararsızlığı olan mide kanserlerinin %33-40'ında bulunmuştur. Gastrik kanser hücre hatlarında, Bcl-2 aşırı ekspresyonu, mitokondri ve kaspaz-3 aktivasyonundan sitokrom c salınımını inhibe ederek apoptozu kuvvetle bloke eder. Öte yandan, Bax'ın aşırı ekspresyonu, sitokrom c'nin mitokondriden salınımını artırarak kemoterapötik ajan kaynaklı apoptoza duyarlı hale getirir (Zhou et al., 2001).

## **2.8. Beclin-1 Geni ve Mide Kanseri**

Beclin-1 hücre ölümüne ve hücre bağlama bağlı olarak hücre sağkalımında farklı rollere sahiptir. Bugüne kadar, Beclin-1'in çeşitli mekanizmalarının, nokta mutasyonu ve ekspresyon kaybının yanı sıra, allel silinmesi ve Bcl-2 aşırı ekspresyonu dahil, kanserde inaktivasyona uğradığı bilinmektedir (Ahn et al., 2007). Ayrıca Beclin-1 otofajik bir düzenleyici ve tümör baskılayıcı özelliği olan bir genidir ve ilişkili karsinomlarda Beclin-1'in aşırı ekspresyonu çok sık görülen bir olaydır (Koukourakis et al., 2010).

Azalan Beclin-1, embriyonik gelişimde olduğu kadar erişkinlerde de otofajide azalmaya ve apoptozis artışına neden olur (Anding and Baehrecke, 2015). Kolorektal ve mide kanserlerinde Beclin-1 ekspresyonu, otofajik hücre ölümünün indüklenmesine katkıda bulunabilir, böylece kanser gelişimi ve ilerlemesi sırasında hücre ölümünü geçersiz kılmak için seçici bir basınç üretebilir (Ahn et al., 2007). Beclin-1 ekspresyonu primer mide tümörlerinde yükselmiş olarak gözlenir. Gastrik kanserlerde Beclin-1 ekspresyonu, otofajik hücre ölümünün indüklenmesine katkıda bulunur, böylece kanserin gelişimi sırasında hücre ölümünü geçersiz kılmak için seçici bir basınç oluşturur (Geng et al., 2012).

## **2.9. LC3-II ve Mide Kanseri**

LC3, LC3-II olarak bilinen çözünebilir bir forma bölünür. Açlık, hipoksi ve kemoterapi gibi çeşitli streslerle otofajinin başlatılması, LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünü uyarır. Bu nedenle, LC3, özellikle LC3-II, otofajinin özel bir belirteçidir.

LC3, kanserli olmayan epitelyal hücrelere kıyasla, gastrik karsinom gibi birçok gastrointestinal kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir. Otofajinin

indüklenmesi, LC3 ekspresyonuna bağlı olarak mide kanserlerinde tümörjenez için avantajlı olduğunu göstermektedir (Jiang et al., 2012).



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

Bu çalışmada MKN45 ve AGS mide kanseri hücre hatları kullanılmıştır. American Type Culture Collection (ATCC)'den elde edilmiştir.

#### 3.2. Kullanılan Ticari Kitler

Deneyde uygulanan RNA izolasyonu, cDNA sentezi, Gerçek zamanlı PZR işlemleri için kullanılan ticari kitler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 1. Kullanılan Ticari Kitler

Kullanılan Ticari Kitler		
Kit	Marka	Kullanım Alanı
NucleoSpin RNA İzolasyon Kit	Machery-Nagel	mRNA İzolasyonu
cDNA Sentez Kiti	Sigma-Aldrich	cDNA Sentezi
SensiFAST SYBR No-ROX Kit	Bioline	Real time PZR reaksiyonu
Hücre Proliferasyon Kit (MTT)	Roche	MTT testi

#### 3.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyon ve Besiyerleri

İki hücre hattında da kullanılan solüsyonlar ve besiyerleri Çizelge 3.2'de, bu solüsyonların içerik ve miktarları ise Çizelge 3.3'te listelenmiştir.

**Çizelge 3. 2.** Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar ve Besiyerleri

Solüsyonlar	Marka
Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco
Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) Medyum (1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco
Fetal Bovin Serum (FBS) (South America) (1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco
Penisilin/Steptomisin (1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco
Fosfat Buffer Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Gibco
Tripsin-EDTA (%0,05)	Thermo Fisher Scientific, Gibco
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich

**Çizelge 3. 3.** Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyon ve Besiyerlerinin İçerik ve Miktarları

Solüsyonlar	İçerik ve Miktarları
Zenginleştirilmiş DMEM/F-12 Besiyeri	%10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F-12 besiyeri
Zenginleştirilmiş RPMI 1640 Besiyeri	%10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri
PBS	1X
Tripsin-EDTA	%0,05 – 1X
DMEM/F-12 Dondurma Besiyeri	%40 FBS, %10 DMSO içeren DMEM/F-12 besiyeri
RPMI 1640 Dondurma Besiyeri	%40 FBS, %10 DMSO içeren RPMI 1640 besiyeri

### 3.4. Sarf Malzemeler

Tüm tez çalışması boyunca laboratuvarında kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3. 4. Sarf Malzemeler

Sarf Malzemeler	Marka	Kullanım Alanı
Flask (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Corning (Sigma-Aldrich)	Hücre Kültürü
Cam Pastör Pipet	Marienfeld	Hücre Kültürü
Serolojik Pipetler (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning Costar Stripette Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
Filtreli Pipet Ucu (10µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Isolab	Hücre Kültürü
Pipet Ucu (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Isolab	Hücre Kültürü
Eppendorf (0.5 ml, 1.0 ml, 1.5 ml, 2.0 ml)	Axygen	Hücre Kültürü
96-well plate	Corning, Axygen	Hücre Kültürü
6 well plate	Corning, Axygen	Hücre Kültürü
Corning Vacuum Filter (150 ml, 250 ml, 500 ml)	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
Thoma Lamı	Mariendfeld	Hücre Kültürü
Kriyotüp	Greiner-Bio-one	Hücre Kültürü
Filtreler (0,2 µm)	Millipore Corporation SCIOLOGEX	Hücre Kültürü
Platemax Ultra Clear Sealing Film	Axygen	PZR Reaksiyonları
PZR Stripe Tüpler	Axygen	PZR Reaksiyonları
PZR Microplate	Axygen	PZR Reaksiyonları
Seals	Corning, Axygen	PZR Reaksiyonları
Mikropipet Seti	Thermo Scientific, Finnipipette	Genel

**Çizelge 3.4.** Sarf Malzemeler (devam)

PZR tüpü (0.2 ml)	Axygen	Genel
Falkon (15 ml, 50 ml)	Isolab	Genel
Rack	Isolab	Genel
Parafilm	BEMIS	Genel
Mezür (50 ml, 500ml, 1000 ml)	Isolab	Genel
Beher	Isolab	Genel
Erlen (250 ml, 500 ml, 2000 ml)	Isolab	Genel
Eldiven	Beybi	Genel

### 3.5. Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan tüm cihazlar ve markaları Çizelge 3.5’te verilmiştir.

**Çizelge 3. 5.** Cihazlar

Cihazlar	Marka
Laminar Flow Kabin	FASTER, SafeFAST Classic
Elektronik Pipet	Thermo Scientific, S1 Pipet Filler
CO <sub>2</sub> İnkübatörü	Memmert
Santrifüjler	Hettich, Universal 320R
Inverted Mikroskop	Zeiss, Axio Vert. A1
Su Banyosu	Memmert
Multiskan Go Mikroplate Spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific
BioRad Real Time Sistem	Bio-Rad, CFX Connect Realtime System
Vorteks	Stuart
pH Metre	Memmert

Çizelge 3.5. Cihazlar (devam)

Minispin	Four E's Scientific
Güç Kaynakları	Amersham Pharmacia Biotech
Otoklav	BES Dik Tip Otoklav
Manyetik Karıştırıcılar	Heidolph, MR3001
Buz Makinesi	Scotsman AF80
Buzdolapları	Arçelik, BEKO, Haier Biomedical
Aspirasyon	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Cam Pastör Pipeti	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Sıvı Nitrojen Tankı	Thermo Scientific
Thermo Cycler	Bio-Rad T100 Thermal Cycler
Tartılar	Precia XB220A
Görüntüleme Sistemleri	ER Biyotek, GEN-Box ImagER Fx

### 3.6. Çoğaltmada Kullanılan Primer Dizileri

Bu tezde kullanılan primer dizileri NCBI, Primerblast ve Primer3 web sitelerinden hazırlanmıştır. Bu primerler Çizelge 3.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 3. 6. Primer Dizileri

Hedef Gen Bölgesi	Tasarlanan Primer Dizisi (5'-3')
<b>GAPDH</b>	
İleri Primer	CGAGATCCCTCCAAAATCAA
Geri Primer	TTCACACCCATGACGAACAT
<b>VEGF</b>	
İleri Primer	CCCACTGAGGAGTCCAACAT
Geri Primer	CAAATGCTTTCTCCGCTCTGA
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	
İleri Primer	ATTTTGGCAGCAACGACACA
Geri Primer	CAGGGTCAGCACTACTTCGA
<b>Bax</b>	
İleri Primer	CCCTTTTGCTTCAGGGTTTCA
Geri Primer	ATCCTCTGCAGCTCCATGTT



Çizelge 3. 7. Primer Dizileri (devam)

**Bcl-2**

**İleri Primer**

**GGAGGATTGTGGCCTTCTTT**

**Geri Primer**

**ACAGTTCCACAAAGGCATCC**

**Beclin-1**

**İleri Primer**

**GGTTGAGAAAGGCGAGACA**

**Geri Primer**

**AATTGTGAGGACACCCAAGC**

**LC3-II**

**İleri Primer**

**AGAAGGCGCTTACAGCTCAA**

**Geri Primer**

**CCAATTCATCCCGAACGTCT**

### 3.7. Kullanılan Boyalar

AGS ve MKN45 hücrelerinde çekirdek boyaması için Hoecsht ve otofagozom oluşumunu göstermek için Akridin Orange boyaları kullanıldı. Bunlar Çizelge 3.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 8. Kullanılan Boyalar

Boya Adı	Marka
Hoecsht	Thermo Scientific
Acridine Orange (10 mg/mL suda)	Thermo Fisher

### 3.8. VCR Stok Solüsyonun Hazırlanışı

1 mg VCR, son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 1.08 ml otoklavlanmış ddH<sub>2</sub>O (deiyonize su) içerisinde çözdürüldü. 0,22 µm’lik filtreden geçirildikten sonra 5 µl ve 10 µl olarak 0,2 ml’lik eppendorf tüplere alıquotlandı. pH ölçümü için 10 µl’lik solüsyon alınarak 10 ml ddH<sub>2</sub>O içerisinde homojenize edildi. pH metre ile pH değeri ölçülerek pH 3.5-4.5 olması sağlandı. Aliquotlanmış tüpler alüminyum folyoya sarılarak -80°C’ye kaldırıldı. Sadece bir kere ve karanlıkta kullanıldı. Uygulanmak istenen doz ayarı için 1 mM stok solüsyondan dilüsyon sağlandı.

### 3.9. Hücre Kültürü

Her hücrenin büyüyebileceği besiyeri ortamı farklıdır. Bu çalışmada MKN45 ve AGS olmak üzere iki mide kanseri hücre hattı kullanıldı. MKN45 hücre hattı %89 RPMI 1640 besiyeri, %10 Fetal bovin serum (FBS) ve %1 Penisilin-Streptomisin (PS); AGS hücre hattı ise %89 DMEM/F12 besiyeri, %10 FBS ve %1 PS ile %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemde 37°C’de inkübe edildi. Besiyeri hazırlanırken besiyerleri, FBS ve PS 500 ml 0,22 µm’lik filtrelerden geçirilerek sterilize edildi.

#### 3.9.1. Hücre Çözdürme İşlemi

Hücre açma işlemi sırasında -196°C’de sıvı azotta bulunan hücreler, 37°C’de bulunan su banyosunda son buz kristali gözlenene kadar ısıtıldı. UV ile temizlenmiş laminar akış kabinine alındı. 15 ml’lik falkonlara 5 ml RPMI 1640-DMEM/F12 medyumunu kondu. Kriyovial tüplerde bulunan hücreler, pipet ile çekilerek besiyerlerinin üzerine eklendi. 5 dakika boyunca 1500g’de santrifüj edildi. Supernatant atılarak DMSO uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 1 ml besiyeri konarak çözülmesi sağlandı. T25 flasklara 5 ml besiyeri konduktan sonra hücreler pipetle çekildi ve flasklara ekildi.

#### 3.9.2. Hücre Pasajlama

MKN45 hücrelerinin pasajı 3-4 günde gerçekleşirken AGS hücreleri gün aşırı pasajlandı. Medyum sarardığında, fosfat buffer saline (PBS) tamponu ile iki kez yıkanarak medyum değişikliği yapıldı. Pasajlama işlemi esnasında hücrelerin üzerindeki besiyeri cam pasteur pipetleri ile çekildi. Flask boyutuna göre belirlenen PBS miktarı ile iki kez yıkandı. Flasktaki hücrelerin üzerine %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek hücrelerin kaldırılması için 37°C %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde 3-4 dakika boyunca tutuldu. Invert mikroskop ile hücrelerin flaskın tabanından kalkıp kalkmadığı gözlemlendi. Eğer kalkmadıysa flaska mekanik kuvvet uygulanarak hareket etmeleri sağlandı. Hücreler kalktığında flaska konan Tripsin-EDTA’nın iki katı olacak şekilde besiyeri eklendi. Besiyeri konarken flaskın tamamına degecek şekilde pipetaj yapıldı. Tüm içerik toplanarak falkona kondu ve +4°C 300g’de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve pelet besiyeri ile çözüldü. Yeni flaska ekildi, mikroskopta bakıldıktan sonra 24 saat boyunca etüvde bırakıldı.

Hücrelerin çözünmesi, pasajı, kullanılan medyum, PBS ve Tripsin-EDTA miktarları Çizelge 4.1’de belirtildi. İşlemler tek kullanımlık serolojik pipetler ile uygulandı.

Çizelge 3. 9. Hücre ekimi ve pasajda kullanılan malzemeler

	PBS	Tripsin	Medyum
<b>T-25 Flask</b>	2 ml	1 ml	5 ml
<b>T-75 Flask</b>	5 ml	2 ml	15 ml
<b>T-175 Flask</b>	10 ml	5 ml	25 ml
<b>6-Well Plate</b>	1 ml	0,5 ml	2 ml
<b>150 Dish</b>	6 ml	3 ml	22 ml

### 3.9.3. Hücre Dondurma

Hücre dondurma işleminde hücreler ilk olarak iki kez PBS ile yıkandı. Daha sonra flaskın boyutuna göre Tablo 3.8’de gösterilen şekilde Tripsin-EDTA eklendi ve 3-4 dakika inkübatörde bekletildi. 4 dakikanın sonunda mikroskopla hücrelerin kalkıp kalkmadığı gözlemlendi. Hücreler kalktığında eklenen Tripsin-EDTA miktarının iki katı kadar medyum eklenip tüm içerik falkona aktarıldı. +4°C’de 300g’de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı. %50 medyum %40 FBS ve %10 DMSO içerikli dondurma besiyeri hazırlandı ve 2 ml’lik kriyotüplere aktarıldı. DMSO toksik bir madde olduğundan en son ve yavaşça eklendi. Hücreler önce bir gece boyunca -80°C’de bekletildi daha sonra -196°C olan sıvı azota aktarıldı.

### 3.9.4. Hücrelerin Sayılması

Kondukları flaska yapışan hücreler, Tripsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra santrifüj yapıldı ve pellet fresh medyumda çözüldü. Thoma lamına çözüldükten 20 µl alındı ve ışık mikroskopunda 10X objektifle sayım yapıldı. Sayımdan sonra şu formül kullanıldı:

Hücre sayısı / ml = Thoma lamının üzerinde sayılan hücre x 10<sup>4</sup> x Sulandırma Katsayısı

### 3.10. MTT Analizi ile Hücrelerin Canlılığının Belirlenmesi

3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) analizi, 1980'de Mosmann tarafından geliştirilmesinden bu yana hücre canlılığı ve çoğalmasının saptanması için altın standart haline gelmiştir. Bu deney, endoplazmik retikulum gibi başka organellerde bulunan indirgeyici maddeler ve enzimler de dahil olmakla birlikte, canlı hücrelerin mitokondrilerinde oluşan dehidrojenazlar tarafından sarı renkli tetrazolyum bileşiğinin suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine enzimatik dönüşümü ile hücre yaşayabilirliğini ölçer (Tonder et al., 2015).

Çalışmalarda, hücre hatlarına uygulanan vincristine (VCR) kimyasal ajanının hücre yaşayabilirliğine etkisi MTT analizi ile incelendi. İşlemler, Cell Proliferation Kit I (MTT) kitine uygun olarak gerçekleştirildi.

Hücreler, kuyu başı 4000 hücre olacak şekilde 96 well plate'e ekildi ve hücrelerin kuyucuklara yapışması için 37°C %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde 24 saat beklendi. 24 saatin ardından hücre medyumunu aspirasyonla uzaklaştırıldı ve hücrelere 3 tekrarlı olarak 200 nM, 300nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 900 nM ve 1000 nM VCR eklenerek son hacim 100 µl olacak şekilde uygulandı. Bu işlem 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulandı.

24. 48. ve 72. saatlerin sonunda VCR uygulanmış hücreler üzerine 10 µl MTT Reagent eklendi ve 3-4 saat 37°C %5 CO<sub>2</sub>'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından reaksiyonun durdurulması için kuyulara 100 µl MTT Solubilization Solution eklendi ve bir gece boyunca 37°C %5 CO<sub>2</sub>'de inkübe edildi. ELISA okuyucuda 550-600 nm'de okuma gerçekleştirildi ve SkanIt RE 4.1 programında sonuçlar alındı. Hem AGS hem de MKN45 hücre hattı için de 2 biyolojik, 3 teknik tekrar yapıldı.

AGS ve MKN45 hücre hatları için aynı işlemler uygulandı. Kontrol grubunda uygulama yapılmamış hücreler bulunurken blank grubunda yalnızca hücrelerin büyütüldüğü medyum bulunmaktadır.

### 3.11. AGS ve MKN45 Hücre Hatlarına Vincristine Uygulaması

Kültür besiyerindeki hücreler tripsin ile kaldırılarak santrifüj edildi. Pellet besiyer ile çözündürülerek Thoma lamı ile sayıldı ve kuyucuk başına son hacim 2 ml

ve  $4 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür tabağına ekildi. Bir gün boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra 5 deney grubuna ayrıldı. Gruplar sırasıyla;

- 1) VCR uygulanmamış AGS ve MKN45 hücreleri
- 2) 300 nM VCR uygulanmış ve  $37^{\circ}\text{C}$  %5  $\text{CO}_2$  inkübatörde 24 ve 48 saat bekletilmiş hücreler
- 3) VCR uygulanmamış ve  $37^{\circ}\text{C}$  %1  $\text{O}_2$  inkübatörde 24 saat bekletilmiş hücreler
- 4) 300 nM VCR uygulanmış ve  $37^{\circ}\text{C}$  %1  $\text{O}_2$  inkübatörde 24 saat bekletilmiş hücreler
- 5) 24 saat hipoksi koşulda (%1  $\text{O}_2$ ) bekletilip daha sonra 300 nM VCR eklenmiş ve 24 saat daha inkübatörde bekletilmiş hücreler

### **3.12. Hücrelerin Toplanması**

Belirlenen saat boyunca inkübatörde duran hücreler gerekli zamanda toplandı. Her bir kuyucuktaki besiyerleri aspirasyon ile uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 1X PBS ile (1 ml) 2 kere yıkandı. 500  $\mu\text{l}$  tripsin eklenerek 6 kuyucuklu kültür tabağı  $37^{\circ}\text{C}$  %5  $\text{CO}_2$  inkübatörde 4-5 dakika beklendi. Hücrelerin kalktığı mikroskop altında gözlendikten sonra kuyulara 1 ml besiyeri eklenerek tripsin inhibe edildi ve hücreler 15 ml'lik falkona alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve pellet daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere sıvı azotla şoklandı ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### **3.13. RNA İzolasyonu**

Hücreler toplandıktan sonra diğer aşama olan RNA izolasyonuna geçildi. Pellet üzerine Nucleospin RNA İzolasyon kitinden çıkan 350  $\mu\text{l}$  RA1 solüyonu ve 3.5  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Merkaptoetanol eklenip hızlıca vortekslendi. Viskoziteyi azaltmak için mor renkli NucleoSpin® Filtre 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve vortekslenen lizat bu tüpün içine aktarılır. 1 dakika (dk) boyunca 11,000g'de santrifüj edildi.

Mor filtre atıldıktan sonra toplama tüpünün üzerindeki karışıma 350  $\mu\text{l}$  %70'lik etanol eklendi ve yaklaşık 5 kez pipetaj yapıldı. Yine aynı kitte bulunan mavi filtre, koleksiyon tüpüne kondu ve etanol eklenmiş lizat mavi filtreye aktarıldı. 30 saniye (sn) boyunca 11,000g'de santrifüj edildi. Mavi filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.

350 µl MDB (Membran Desalting Buffer, membran tuz uzaklaştırma tamponu) eklendi ve 1 dk boyunca 11,000g'de santrifüj edildi. Bu esnada DNase Reaksiyon karışımı hazırlandı. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 10 µl sulandırılmış rDNase ve 90 µl rDNase için Reaksiyon tamponu eklendi ve karıştırıldı, bu karışımdan 95 µl alındı ve direkt olarak mavi filtrenin üzerine aktarıldı. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.

İlk yıkamada 200 µl RAW2 tamponu mavi filtre üzerine eklendi. 30 saniye boyunca 11,000g'de santrifüj edildi. Mavi filtre yeni toplama tüpüne yerleştirildi ve ikinci yıkama için 600 µl RA3 tamponu eklendi. 30 sn boyunca 11,000g'de santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı ve mavi filtre tekrar yerleştirildi. Üçüncü yıkamada ise 250 µl RA3 tamponu eklendi ve 2 dk boyunca 11,000g'de santrifüj edildi.

Mavi filtre kitten çıkan 1,5 ml'lik nükleaz-free toplama tüpüne kondu, RNA'nın tüpe aktarılması için 60 µl RNase-free H<sub>2</sub>O eklendi ve 1 dk boyunca 11,000g'de santrifüj edildi. Elde edilen RNA'nın µDrop ile konsantrasyonu ölçüldükten sonra hızlı bir şekilde -80°C'e kaldırıldı ve kullanılabildiği kadar burada muhafaza edildi.

### 3.14. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, üretici firmanın talimatına göre yapılmıştır. Sentezde kullanılan reaksiyon ve koşulları tablo 3.9'da gösterilmiştir.

**Çizelge 3. 10.** cDNA Sentez Reaksiyon Koşulları ve Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri

cDNA Sentez Reaksiyon Koşulları			
<b>İlk denatürasyon</b>	94°C, 5 dk		
<b>İnkübasyon</b>	42°C, 60 dk		
<b>Enzim İnaktivasyonu</b>	80°C, 5 dk		
Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri			
Reaktifler	Stok Konsantrasyonu	Kullanılan Miktar	Çalışma Konsantrasyonu
<b>Oligo d(T) VN</b>	50 µM	2 µl	5 µM
<b>M-MuLV enzim karışımı</b>	10X	2 µl	1X
<b>M-MuLV reaksiyon karışımı</b>	2X	10 µl	1X
<b>Nükleaz free su</b>	-	20 µl tamamlama	-
<b>Son hacim</b>	-	20 µl	-

### 3.15. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR

VEGF, HIF1, Bax, Bcl2, Beclin-1 ve LC3-II genlerinin ekspresyonları Kantitatif gerçek zamanlı PZR işlemi ile analiz edildi. GAPDH internal kontrol olarak kullanıldı. Kantitatif gerçek zamanlı PZR’da kullanılan reaktif miktarları Çizelge 3.10’da, Kantitatif gerçek zamanlı PZR’ın çalışması için gerekli koşullar ise Çizelge 3.11’de gösterilmiştir. Hem AGS hem de MKN45 hücre hattı için de 2 biyolojik, 2 teknik tekrar yapıldı.

Çizelge 3. 11. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR’da kullanılan reaktif miktarları

Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR’da gerekli olan reaktif miktarları			
Reaktifler	Stok Konsantrasyon	Kullanılan Miktar	Son Konsantrasyon
SensiFAST SYBR No-Rox karışımı	2X	5 µl	1X
İleri Primer	10 µM	1 µl	2,5 µM
Geri Primer	10 µM	1 µl	2,5 µM
dH <sub>2</sub> O	-	10 µl tamamlanır	-
Son Hacim	-	10 µl	-

Çizelge 3. 12. Gerçek zamanlı PZR işlemi için reaksiyon koşulları

Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Koşulları		
Polimeraz Enzim Aktivasyonu	95°C, 2dk	
Denatürasyon	95°C, 5 sn	Döngü Sayısı: 40
Bağlanma	55°C, 10 sn	
Uzama	72°C, 15 sn	
Erime Eğrisi Analizi	55°C-95°C, 5 sn	

### 3.16. Hoechst ve Akridin Orange Boyaması

6 kuyucuklu kültür tabağına iki ayrı hücre hattı için  $2 \times 10^5$  hücre ekildikten sonra bir gün inkübatörde bekletildi. Ertesi gün 5 ayrı deney grubunun VCR uygulaması yapıldı. 24 saat sonra hücrelerin medyumunu uzaklaştırıldı. 500 µl PBS ile

kuyucuklar yıkandı. Üzerlerine fiksasyon için 500 µl %4'lük formaldehit eklendi ve 15 dakika boyunca inkübe edildi. 15 dakika sonra formaldehit aspire edildi ve PBS ile yıkama yapıldı. 1 µg/ml Akridin Orange ve 1 µg/ml Hoechst kuyucuklara eklendi. 15 dakika karanlıkta inkübe edildi. Görüntüler floresan mikroskopta DAPI ve Tex-Red filtreleri ile incelendi.





## **4. BULGULAR**

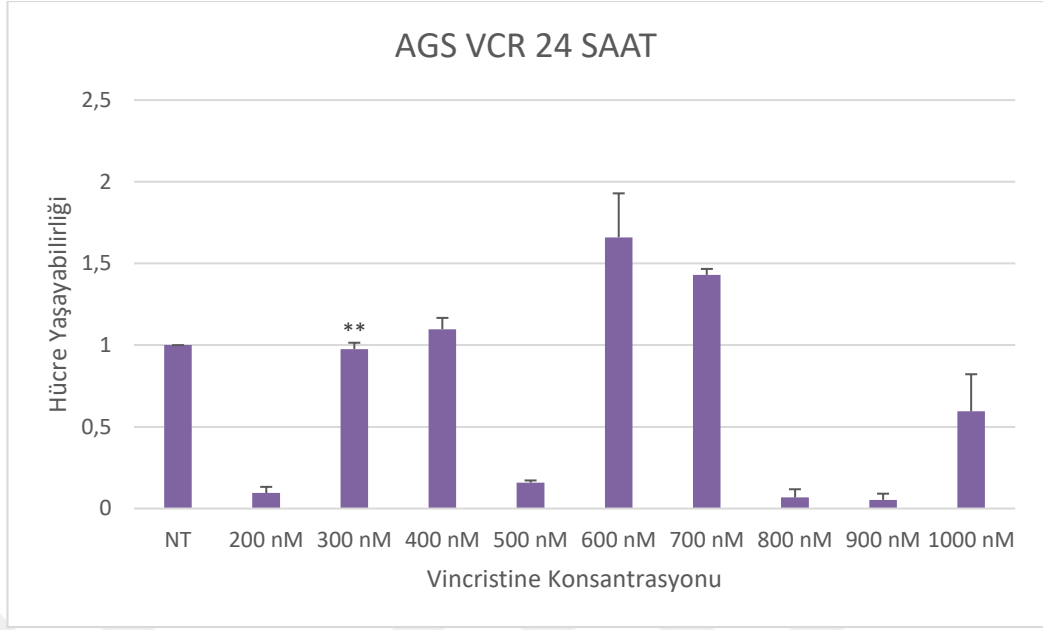
### **4.1. AGS ve MKN45 Hücre Hatlarında MTT Testi Sonuçları**

Vincristine kemoterapötik ilacının hücrelerde sitotoksik etki oluşturup oluşturmadığı belirlendi. Bu amaçla AGS ve MKN45 mide kanseri hücre hatlarına MTT testi uygulandı. Uygulamadan önce her bir hücre hattına 200 nM-1000 nM VCR ile muamele edildi. VCR uygulanmış hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca 37°C %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde bırakıldı ve hücre yaşayabilirliği ölçüldü.

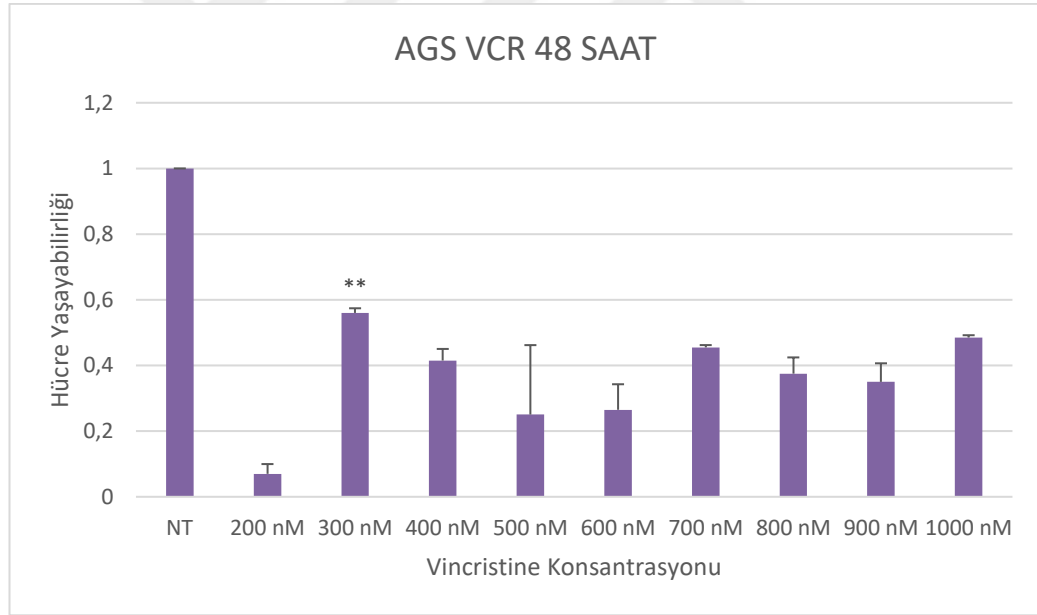
Elde edilen bulgularda AGS ve MKN45 hücre hatları için 300 nM VCR uygulanması uygun görüldü.

#### **4.1.1. AGS Hücre Hattında Vincristine'in Sitotoksikite Sonuçları**

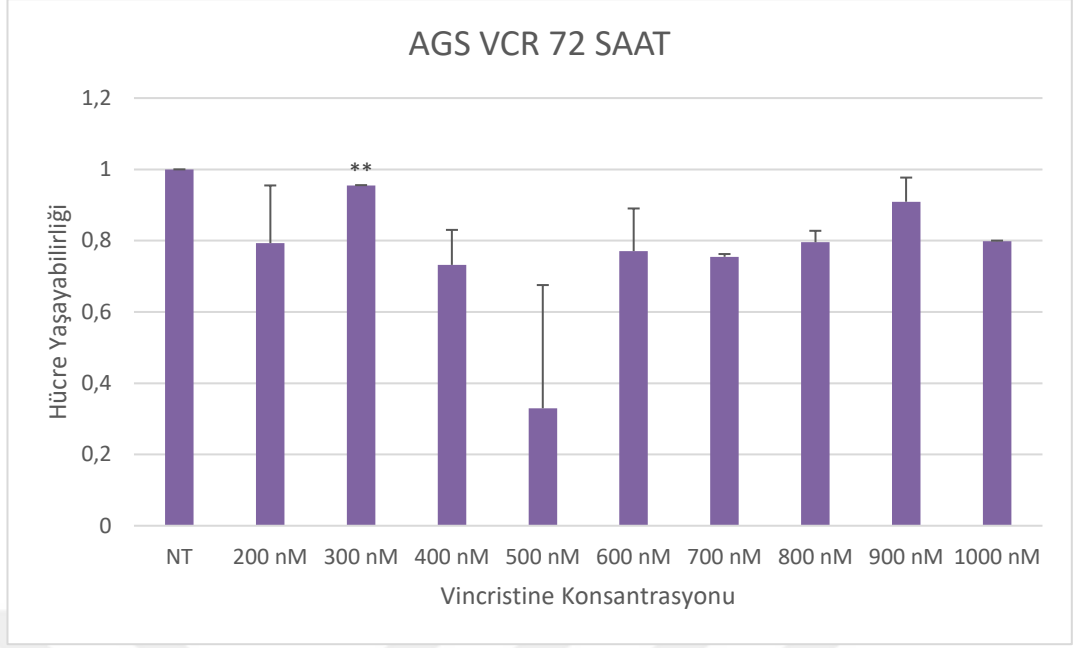
Elde edilen bulgulara göre, VCR'nin 200 nM-1000 nM arasındaki tüm konsantrasyonlarında ve 24, 48 ve 72. saat boyunca hücre yaşayabilirliğinde düşüş gözlemlenmiştir. 24. ve 48. saatlerde 300 nM konsantrasyonunda istatistik olarak anlamlı ( $p < 0.005$ ) hücre ölümü gerçekleşmiştir. Hücre ölümünün istatistiki olarak anlamlı şekilde saptandığı konsantrasyon olan 300 nM VCR dozu olarak seçilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir. MTT testi iki biyolojik, üç teknik tekrar olmak üzere uygulanmıştır. İstatistik analiz için MKN45 hücrelerinde ANOVA, AGS hücrelerinde Kruskal Wallis testi kullanılmıştır.



**Şekil 4. 1.** MTT testi ile AGS hücre hattına 24 saat VCR muamelesi sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\*p<0.005)



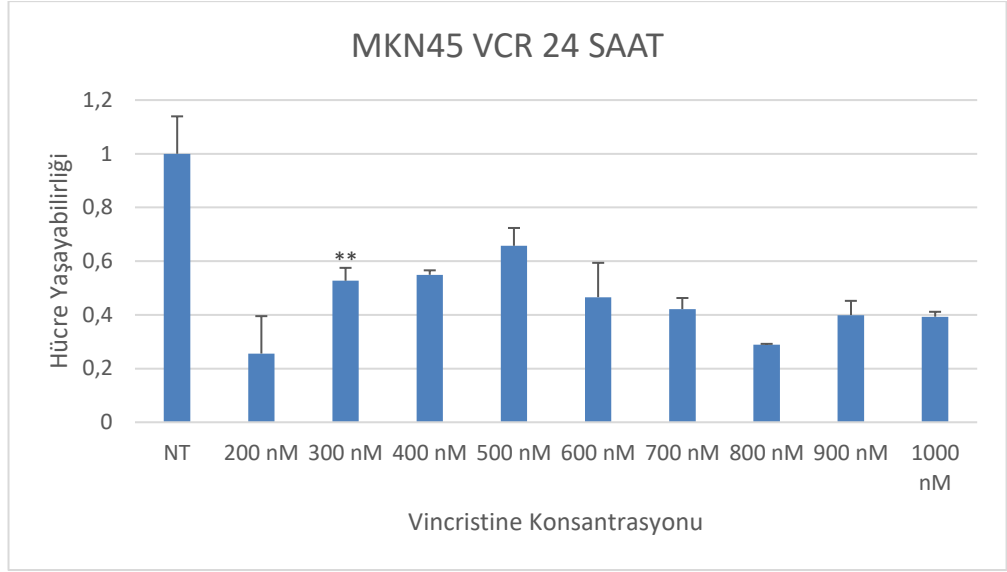
**Şekil 4. 2.** MTT testi ile AGS hücre hattına 48 saat VCR muamelesi sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\*p<0.005)



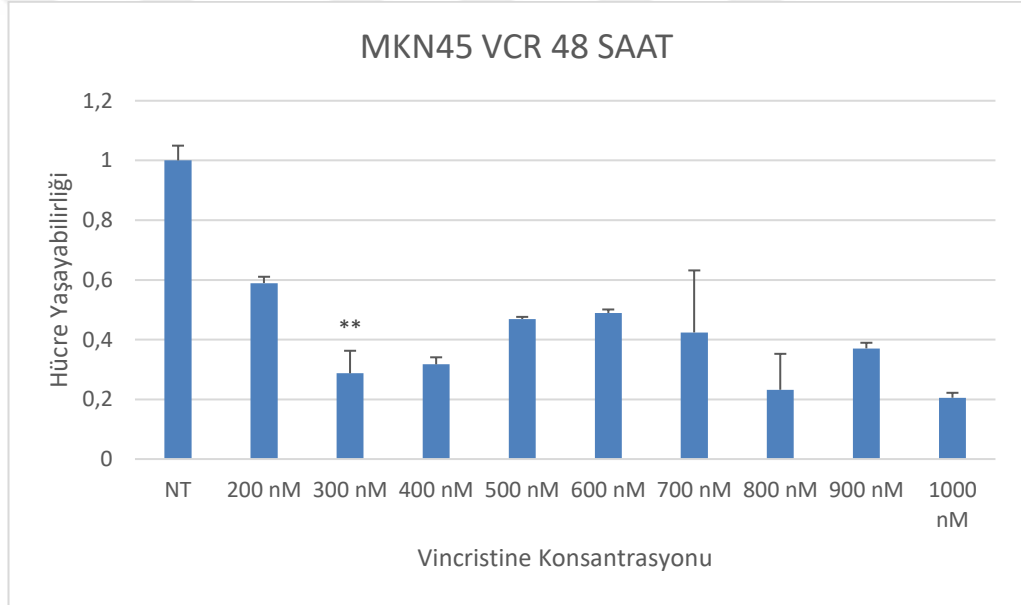
**Şekil 4. 3.** MTT testi ile AGS hücre hattına 72 saat VCR muamelesi sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\*p<0.005)

#### 4.1.2. MKN45 Hücre Hattında Vincristine'in Sitotoksisite Sonuçları

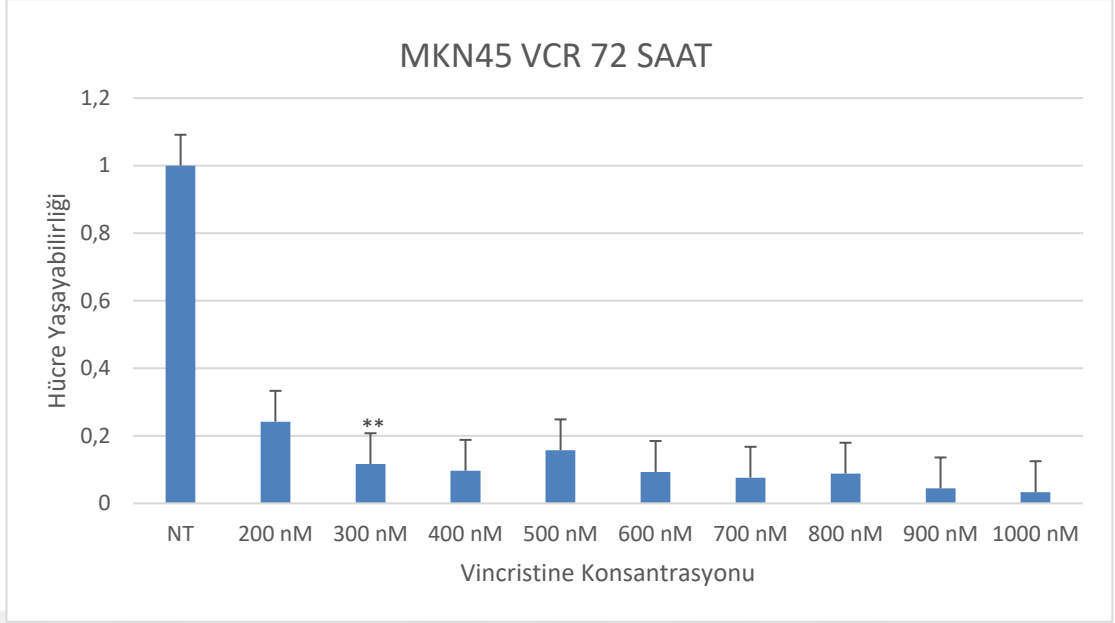
Elde edilen bulgulara göre, VCR'nin 200 nM-1000 nM arasındaki tüm konsantrasyonlarında ve 24, 48 ve 72. saat boyunca hücre yaşayabilirliğinde düşüş gözlemlenmiştir. 24. Saatte 300 nM konsantrasyonunda istatistik olarak anlamlı ( $p<0.005$ ) hücre ölümü gerçekleşmiştir. Hücre ölümünün istatistiki olarak anlamlı şekilde saptandığı konsantrasyon olan 300 nM VCR dozu olarak seçilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir. MTT testi iki biyolojik, üç teknik tekrar olmak üzere uygulanmıştır. İstatistik analiz için ANOVA testi kullanılmıştır.



**Şekil 4. 4.** MTT testi ile MKN45 hücre hattına 24 saat VCR muamelesi sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\* $p < 0.005$ )



**Şekil 4. 5.** MTT testi ile MKN45 hücre hattına 48 saat VCR muamelesi sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\* $p < 0.005$ )



**Şekil 4. 6.** MTT testi ile MKN45 hücre hattına 72 saat VCR muamelesi sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\*p<0.005)

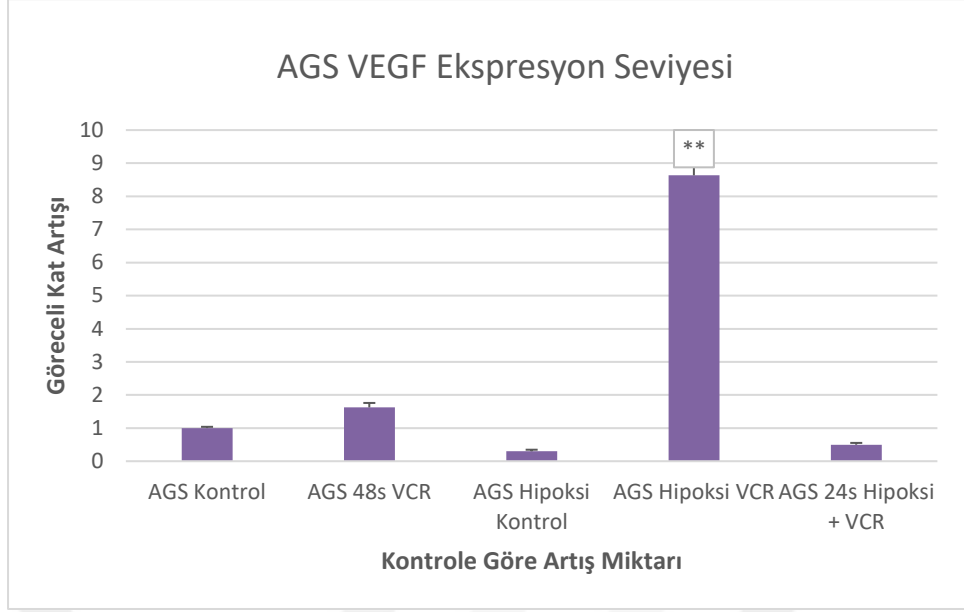
AGS ve MKN45 hücre hatlarına uygulanan vincristine'nin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için MTT testi uygulanmıştır. AGS hücre hattında 24. ve 48. saatlerde, MKN45 hücre hattında ise 24. saatte 300 nM VCR uygulaması sonucu hücreler daha düşük konsantrasyona oranla kurtarılmıştır ve bu istatistiki olarak anlamlıdır. Bu nedenle hücrelerin kendilerini kurtarmaya gittiği saat ve doz, çalışma dozu olarak belirlenmiştir.

## 4.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Uygulaması

Yapılan bu çalışmada, VEGF, HIF-1 $\alpha$ , Bax, Bcl-2, Beclin-1 ve LC3-II genlerinin ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. İstatistik analizleri için ANOVA testi kullanılmıştır.

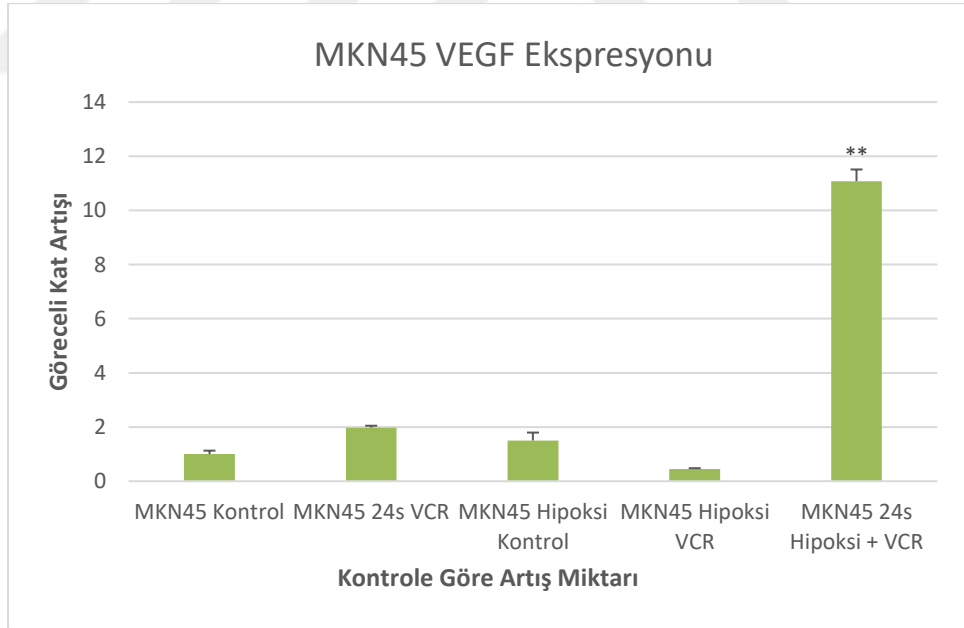
### 4.2.1 VEGF Gen Ekspresyon Düzeyi

AGS hücrelerine uygulanan 300 nM VCR ve 24 ve 48 saat hipoksi uygulaması sonucunda,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak ekspresyon seviyesi ölçülen VEGF'in ekspresyon seviyesi Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



**Şekil 4. 7.** Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde VEGF ekspresyonu seviye değişimi (\*\*p<0.0001).

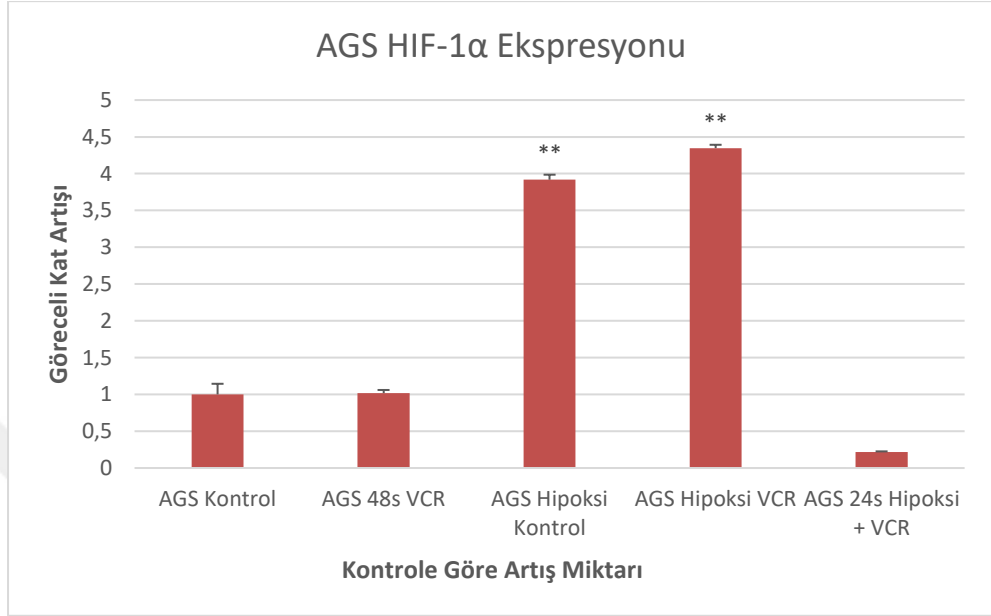
MKN45 hücrelerine uygulanan 300 nM VCR ve 24 ve 48 saat hipoksi uygulaması sonucunda,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodu kullanılarak ekspresyon seviyesi ölçülen VEGF'in ekspresyon seviyesi Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



**Şekil 4. 8.** Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde VEGF ekspresyonu seviye değişimi (\*\*p<0.0001).

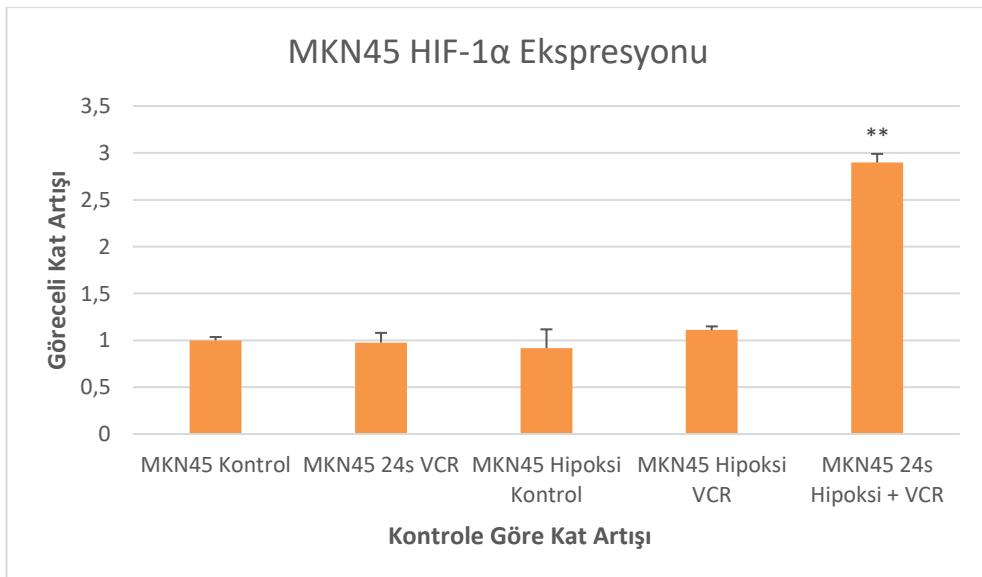
#### 4.2.2. HIF-1 $\alpha$ Gen Ekspresyon Düzeyi

AGS hücrelerine uygulanan 300 nM VCR ve 24 ve 48 saat hipoksi uygulaması sonucunda,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak ekspresyon seviyesi ölçülen HIF1'in ekspresyon seviyesi Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 9. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu seviye değişimi (\*\*p<0.0001).

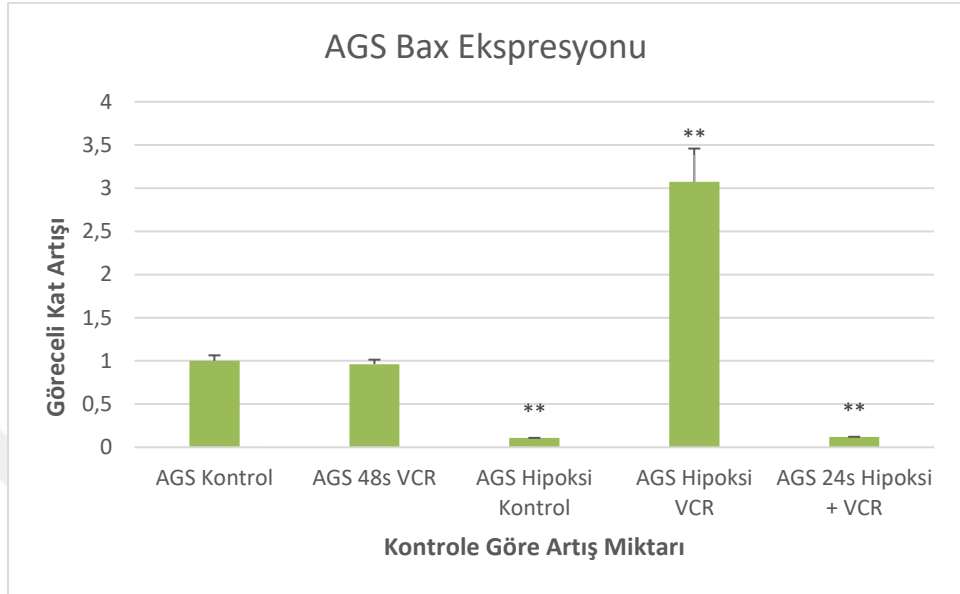
MKN45 hücrelerine uygulanan 300 nM VCR ve 24 ve 48 saat hipoksi uygulaması sonucunda,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak ekspresyon seviyesi ölçülen HIF-1 $\alpha$ 'nın ekspresyon seviyesi Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 10. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu seviye değişimi (\*\*p<0.005).

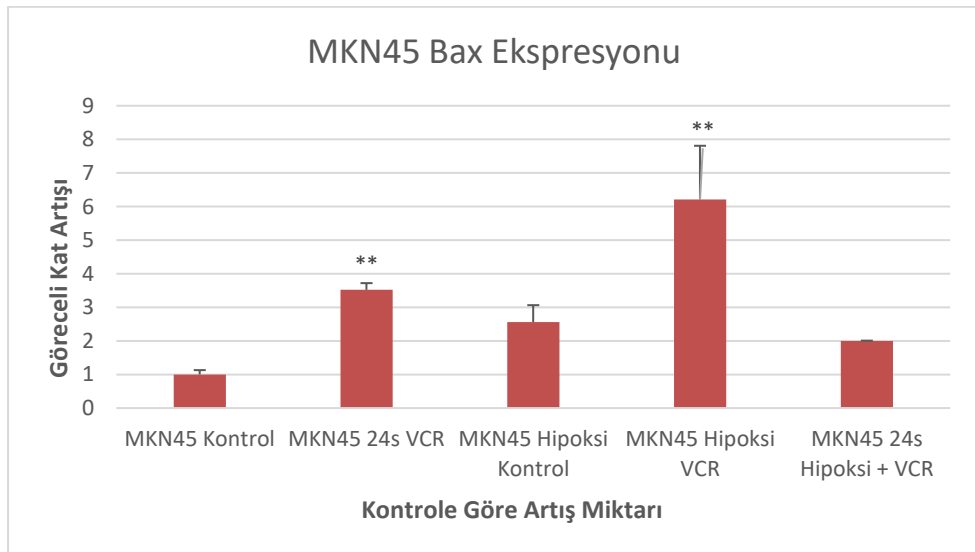
#### 4.2.3. Bax Gen Ekspresyon Düzeyi

AGS hücrelerine uygulanan 300 nM VCR ve 24 ve 48 saat hipoksi uygulaması sonucunda,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak ekspresyon seviyesi ölçülen Bax'ın ekspresyon seviyesi Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 11. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde Bax ekspresyonu seviye değişimi (\*\*p<0.0001).

MKN45 hücrelerine uygulanan 300 nM VCR ve 24 ve 48 saat hipoksi uygulaması sonucunda,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak ekspresyon seviyesi ölçülen Bax'ın ekspresyon seviyesi Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

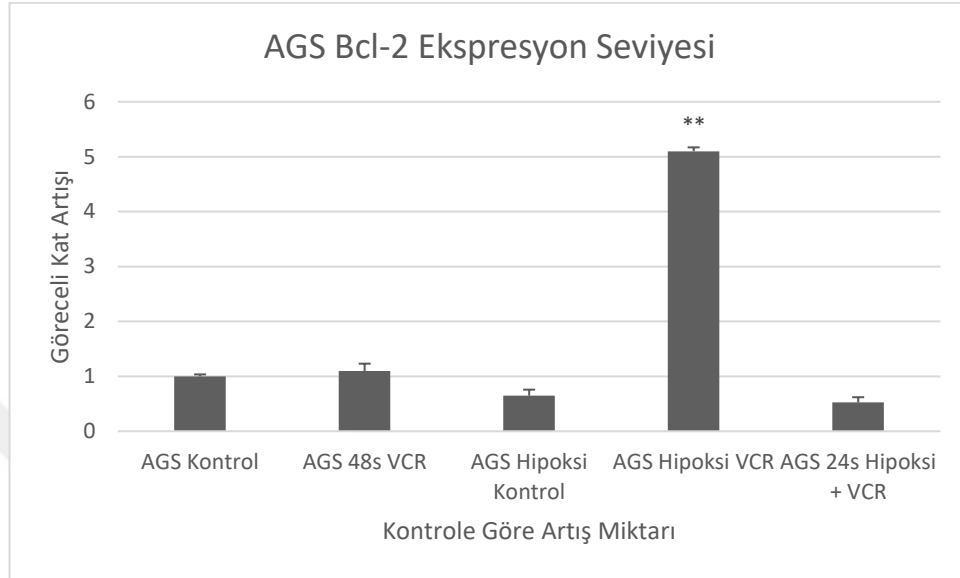


Şekil 4. 12. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde Bax ekspresyonu seviye değişimi (\*\*p<0.05).



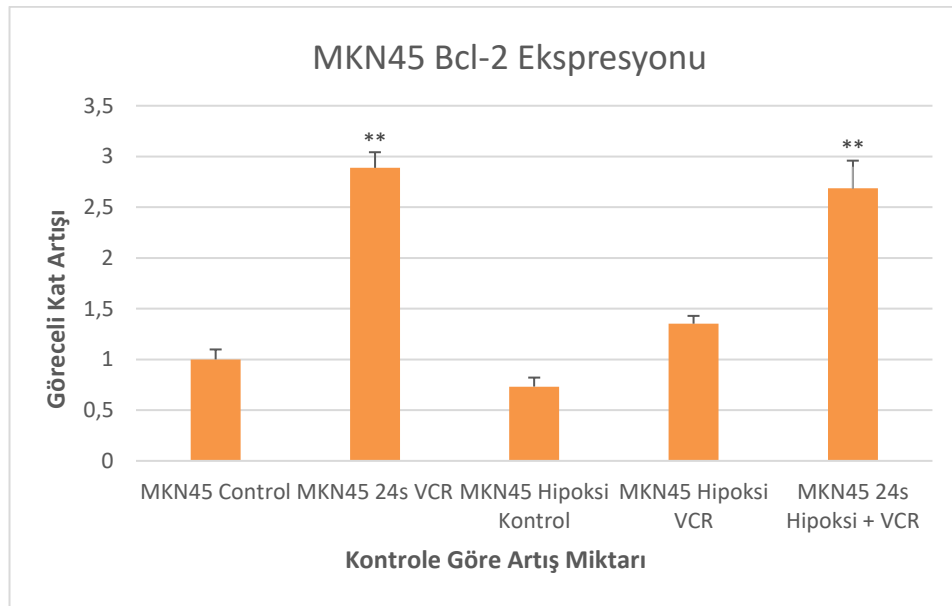
#### 4.2.4. Bcl-2 Gen Ekspresyon Düzeyi

AGS hücrelerine uygulanan 300 nM VCR ve 24 ve 48 saat hipoksi uygulaması sonucunda,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak ekspresyon seviyesi ölçülen Bcl2'nin ekspresyon seviyesi Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4. 13. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde Bcl-2 ekspresyonu seviye değişimi (\*\*p<0.05).

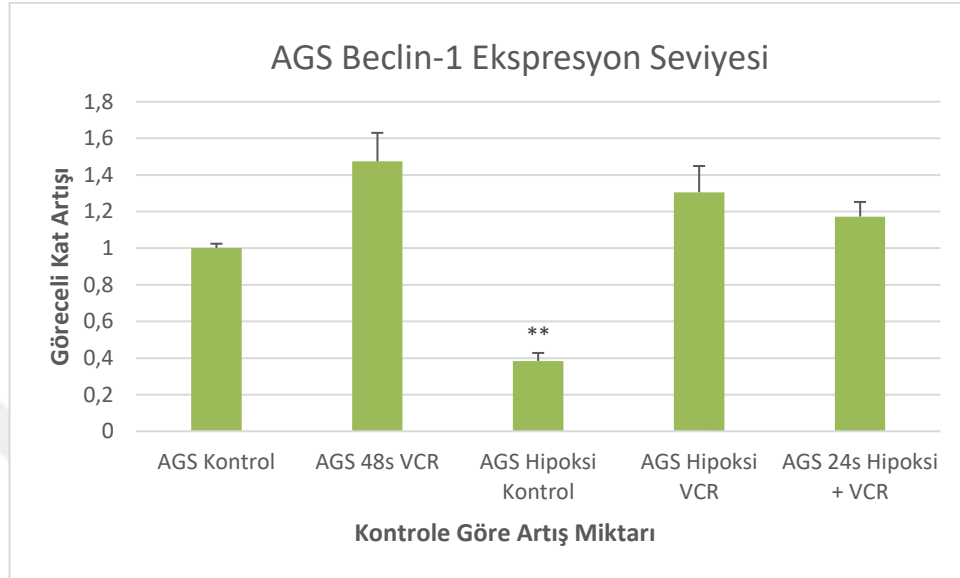
MKN45 hücrelerine uygulanan 300 nM VCR ve 24 ve 48 saat hipoksi uygulaması sonucunda,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak ekspresyon seviyesi ölçülen Bcl-2'nin ekspresyon seviyesi Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4. 14. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde Bcl-2 ekspresyonu seviye değişimi (\*\*p<0.0001).

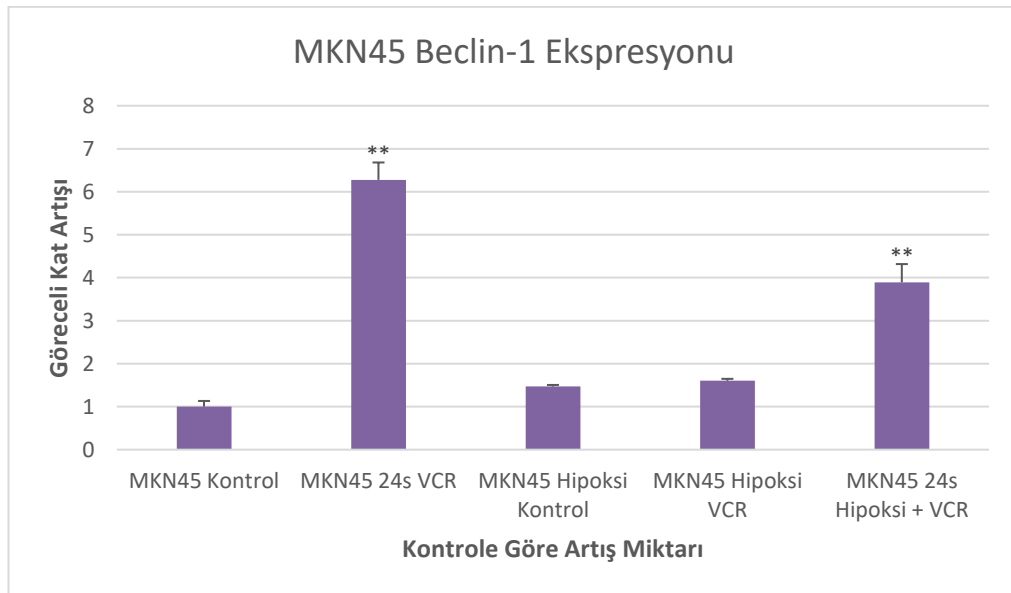
#### 4.2.5. Beclin-1 Gen Ekspresyon Düzeyi

AGS hücrelerine uygulanan 300 nM VCR ve 24 ve 48 saat hipoksi uygulaması sonucunda,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak ekspresyon seviyesi ölçülen Beclin1'in ekspresyon seviyesi Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4. 15. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde Beclin-1 ekspresyonu seviye değişimi (\*\*p<0.05).

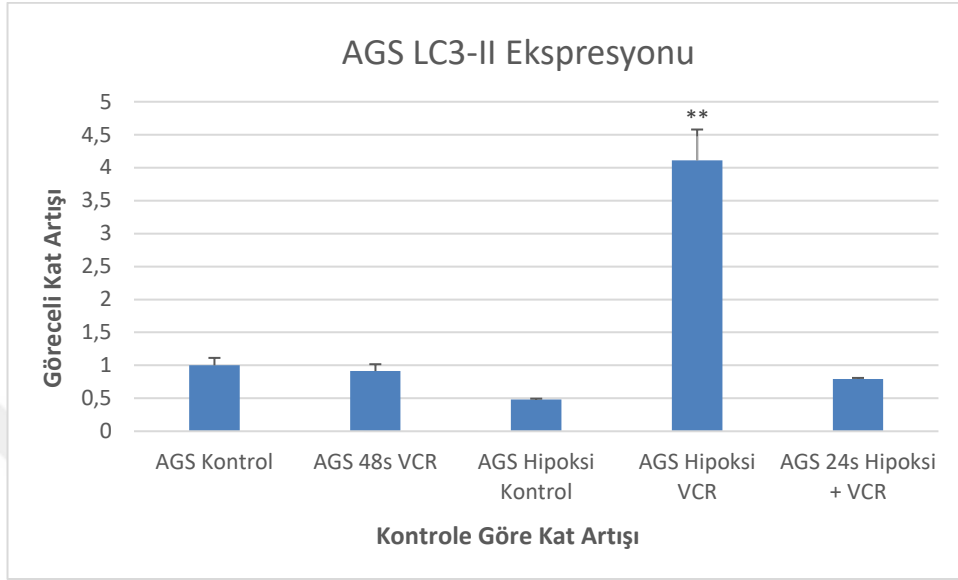
MKN45 hücrelerine uygulanan 300 nM VCR ve 24 ve 48 saat hipoksi uygulaması sonucunda,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak ekspresyon seviyesi ölçülen Beclin-1'in ekspresyon seviyesi Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 16. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde Bcl-2 ekspresyonu seviye değişimi (\*\*p<0.0001).

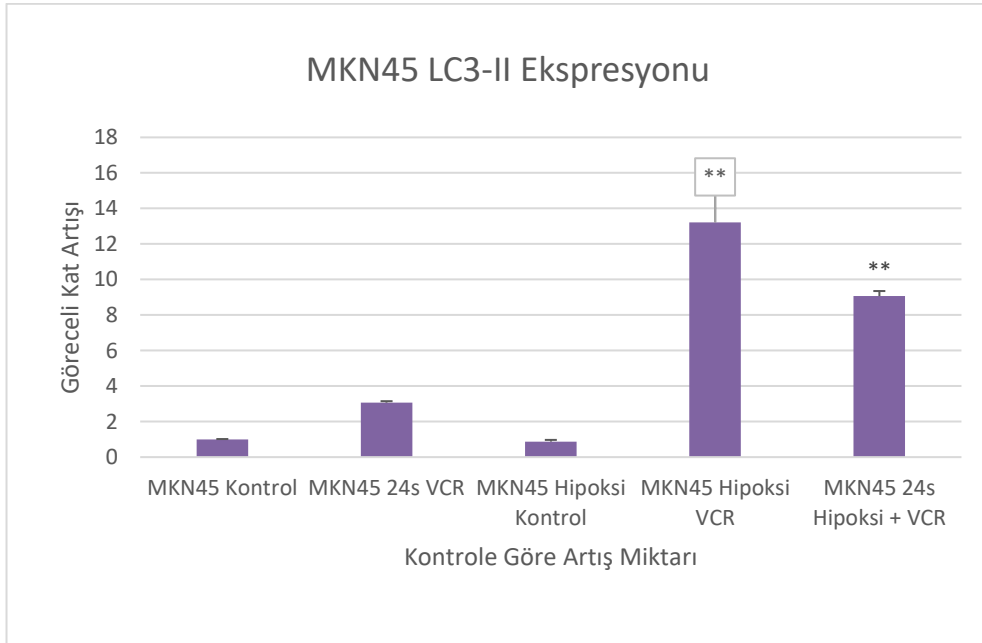
#### 4.2.6. LC3-II Gen Ekspresyon Düzeyi

AGS hücrelerine uygulanan 300 nM VCR ve 24 ve 48 saat hipoksi uygulaması sonucunda,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak ekspresyon seviyesi ölçülen LC3-II'nin ekspresyon seviyesi Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 17. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde LC3-II ekspresyonu seviye değişimi (\*\*p<0.05).

MKN45 hücrelerine uygulanan 300 nM VCR ve 24 ve 48 saat hipoksi uygulaması sonucunda,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak ekspresyon seviyesi ölçülen LC3-II'nin ekspresyon seviyesi Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 18. Kantitatif Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 24 ve 48 saat boyunca VCR ve hipoksi uygulaması neticesinde LC3-II ekspresyonu seviye değişimi (\*\*p<0.0001).

**Çizelge 4. 1.** Elde Edilen Bulgular

VCR	KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PZR İLE KONTROLE GÖRE EKSPRESYON DEĞİŞİMİ		AGS	MKN45
		VEGF	0,62 kat artma	0,97 kat artma
		HIF-1 $\alpha$	0,1 kat artma	0,13 kat azalma
		Bax	0,14 kat azalma	2,51 kat artma
		Bcl-2	0,9 kat artma	1,88 kat artma
		Beclin-1	0,47 kat artma	5,27 kat artma
		LC3-II	0,19 kat azalma	2,07 kat artma

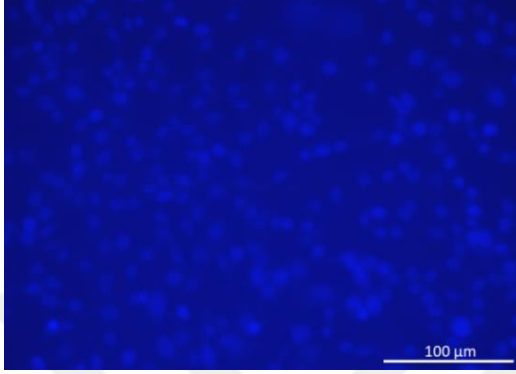
Hipoksi Kontrol	KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PZR İLE KONTROLE GÖRE EKSPRESYON DEĞİŞİMİ		AGS	MKN45
		VEGF	0,71 kat azalma	0,5 kat artma
		HIF-1 $\alpha$	2,91 kat artma	0,1 kat azalma
		Bax	0,9 kat azalma	1,55 kat artma
		Bcl-2	0,36 kat azalma	0,27 kat azalma
		Beclin-1	0,62 kat azalma	0,46 kat artma
		LC3-II	0,52 kat azalma	0,13 kat azalma

Hipoksi + 300 nM VCR	KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PZR İLE KONTROLE GÖRE EKSPRESYON DEĞİŞİMİ		AGS	MKN45
		VEGF	7,63 kat artma	0,55 kat azalma
		HIF-1 $\alpha$	3,34 kat artma	0,10 kat artma
		Bax	2,07 kat artma	5,21 kat artma
		Bcl-2	4,09 kat artma	0,35 kat artma
		Beclin-1	0,30 kat artma	0,60 kat artma
		LC3-II	3,1 kat artma	12,2 kat artma

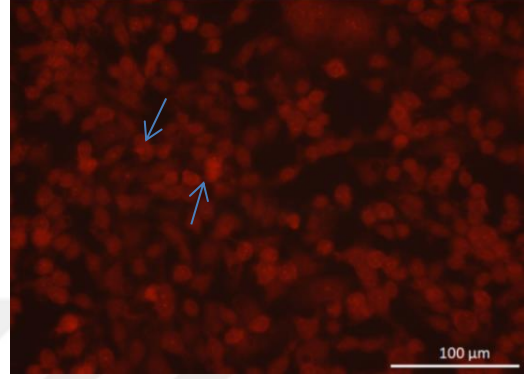
24h Hipoksi + VCR + 24h Hipoksi	KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PZR İLE KONTROLE GÖRE EKSPRESYON DEĞİŞİMİ		AGS	MKN45
		VEGF	0,51 kat azalma	10,08 kat artma
		HIF-1 $\alpha$	0,79 kat azalma	1,89 kat artma
		Bax	0,89 kat azalma	0,99 kat artma
		Bcl-2	0,48 kat azalma	1,68 kat artma
		Beclin-1	0,17 kat artma	2,89 kat artma
		LC3-II	0,21 kat azalma	8,06 kat artma

### 4.3. AGS ve MKN45 Hoechst ve Akridine Orange Boyaması Mikroskop Görüntüleri

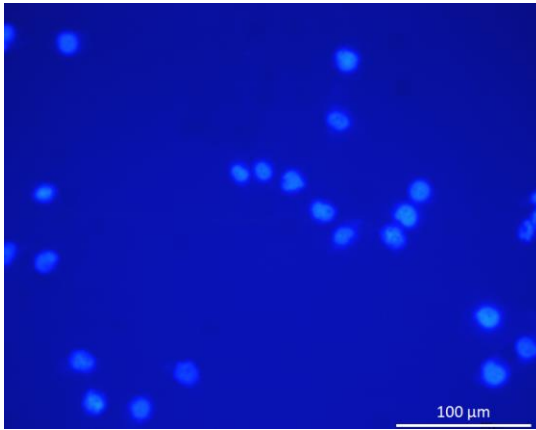
AGS ve MKN45 hücreleri için uygulanan boyama sonrasında Inverted Mikroskop ile 40X objektifte görüntü alındı. Görüntüler Şekil 4.19-4.38 aralığında gösterilmiştir.



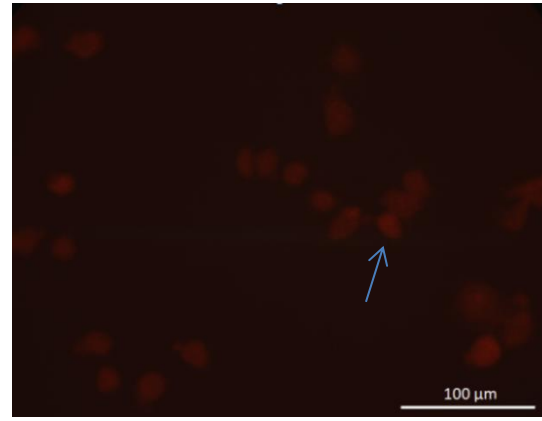
**Şekil 4. 19.** AGS hücrelerinin 48 saat kontrolünün floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.



**Şekil 4. 20.** AGS hücrelerinin 48 saat kontrolünün floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.

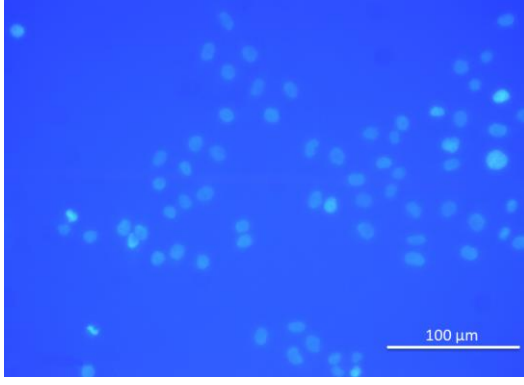


**Şekil 4. 21.** AGS hücrelerinin 48 saat 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme bakıldı.

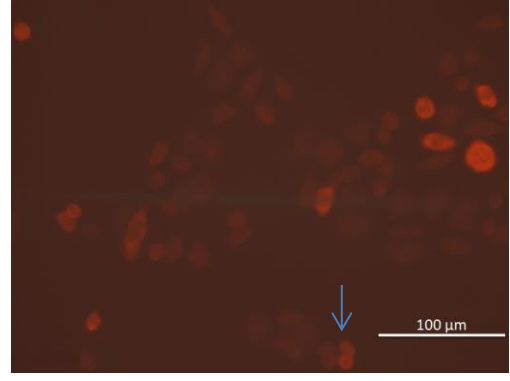


**Şekil 4. 22.** AGS hücrelerinin 48 Saat 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.

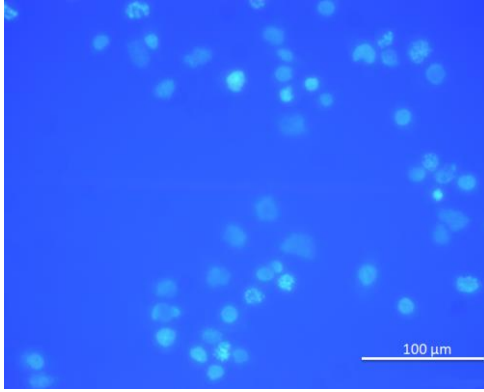
AGS hücrelerinin 48 saat kontrolde 32 adet AVO boyaması gözlenmişken, 48 saat 300 nM VCR uygulaması sonrasında 4 adet AVO boyanmıştır.



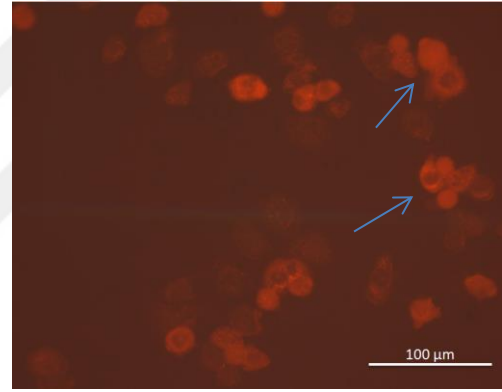
**Şekil 4. 24.** AGS hücrelerinin 24 saat hipoksik kontrolünün floresans mikroskopta görüntüsü. Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.



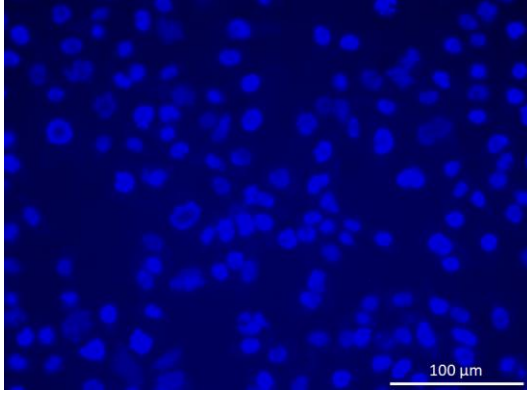
**Şekil 4. 23.** AGS hücrelerinin 24 saat hipoksik kontrolünün floresans mikroskopta görüntüsü. Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.



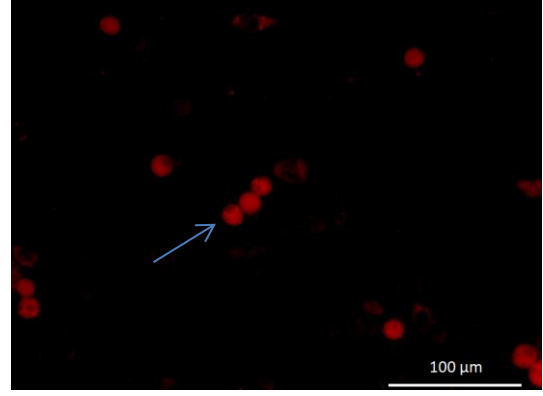
**Şekil 4. 25.** AGS hücrelerinin 24 Saat hipoksik koşulda 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.



**Şekil 4. 26.** AGS hücrelerinin 24 Saat hipoksik koşulda 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.

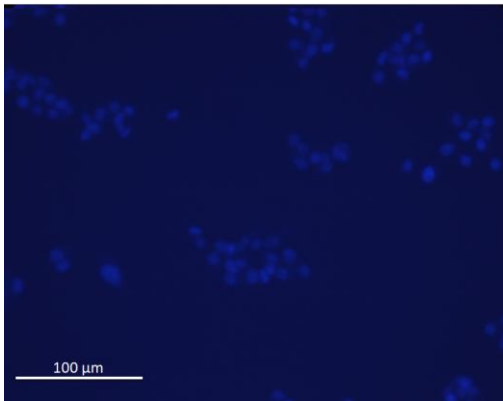


**Şekil 4. 27.** AGS hücrelerinin 24s hip+VCR+24s hip. uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.

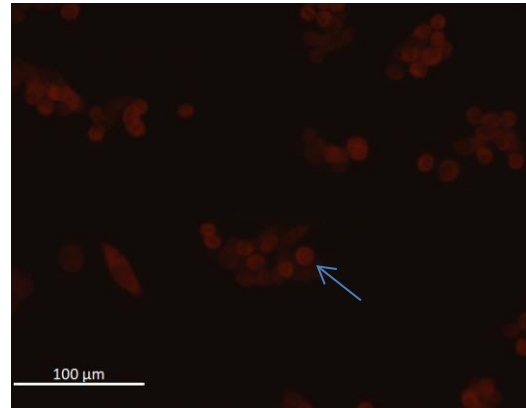


**Şekil 4. 28.** AGS hücrelerinin 24s hip+VCR+24s hip. uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.

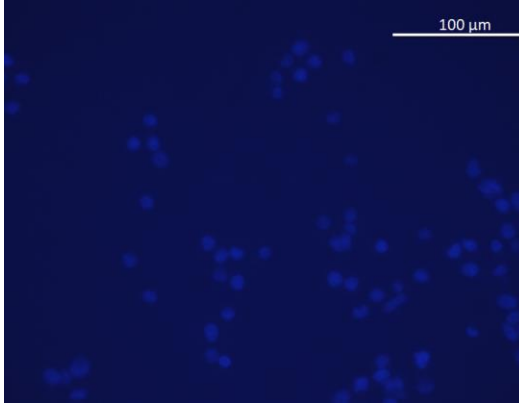
AGS hücrelerinin 24 saat hipoksi kontrolde 5 adet AVO boyaması gözlenmişken, 24 saat hipoksik koşulda 300 nM VCR uygulaması sonrasında 10 adet AVO boyanmıştır. 24 saat hipoksik koşulda bekletilmesinin ardından 300 nM VCR uygulaması ve 24 saat daha hipoksizde tutulduğunda 11 adet AVO boyanması gözlenmiştir.



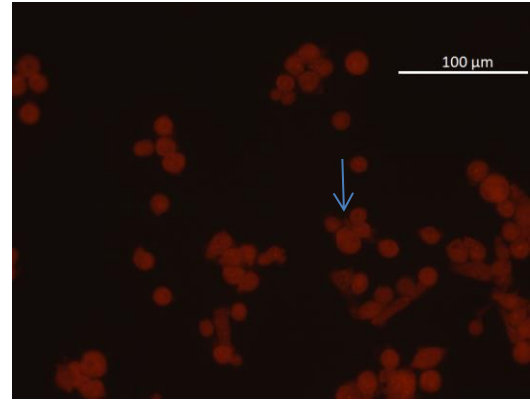
**Şekil 4. 29.** MKN45 hücrelerinin 24 Saat kontrolünün floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.



**Şekil 4. 30.** MKN45 hücrelerinin 24 Saat kontrolünün floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.



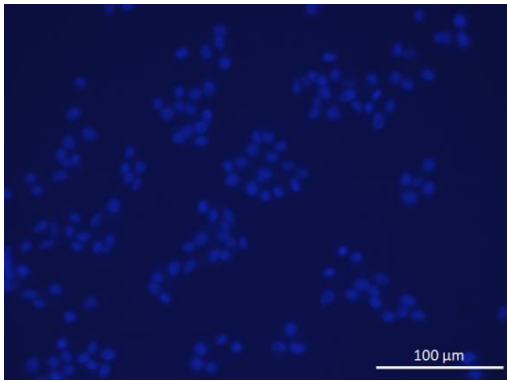
**Şekil 4. 31.** MKN45 hücrelerinin 24 Saat 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.



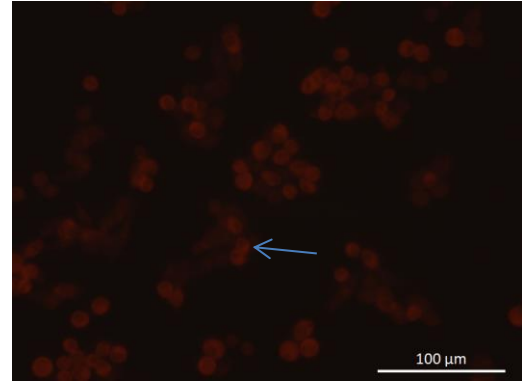
**Şekil 4. 32.** MKN45 hücrelerinin 24 Saat 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.

MKN45 hücrelerinin 24 saat kontrolde 24 adet asidik veziküler organel (AVO) boyanmışken gözlenmişken, 24 saat 300 nM VCR uygulaması sonrasında 46 adet AVO boyanmıştır.

MKN45 hücrelerinin 24 saat hipoksi kontrolünün floresans mikroskopta görüntüsü. Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.

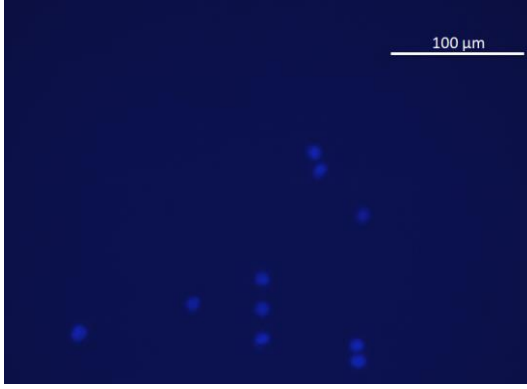


**Şekil 4. 33.** MKN45 hücrelerinin 24 Saat hipoksi kontrolünün floresans mikroskopta görüntüsü. Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.

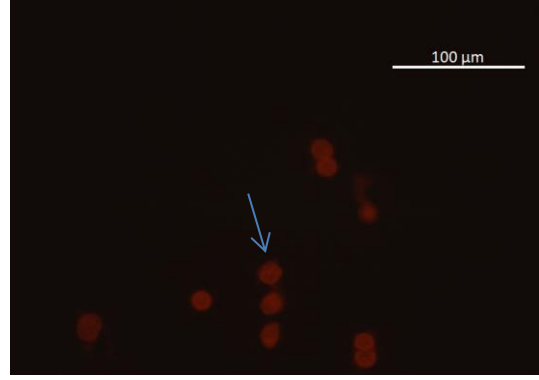


**Şekil 4. 34.** MKN45 hücrelerinin 24 Saat hipoksi kontrolünün floresans mikroskopta görüntüsü. Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.

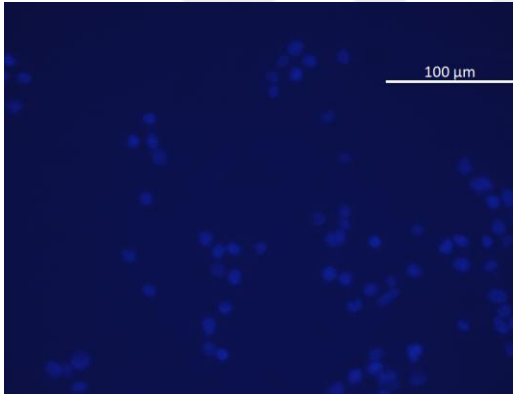




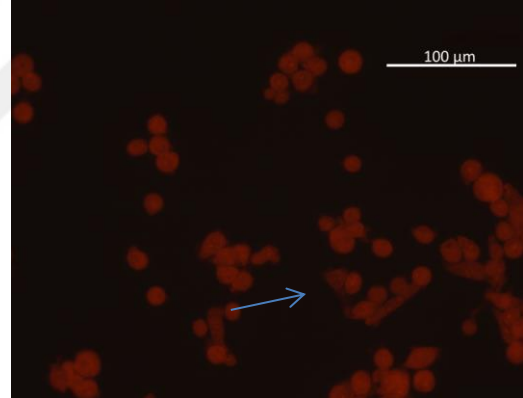
**Şekil 4. 35.** MKN45 hücrelerinin 24 Saat hipoksi koşulda 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.



**Şekil 4. 36.** MKN45 hücrelerinin 24 Saat hipoksi koşulda 300 nM VCR uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.



**Şekil 4. 38.** MKN45 hücrelerinin 24s hip+VCR+24s hip. uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Hoechst boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.



**Şekil 4. 37.** MKN45 hücrelerinin 24s hip+VCR+24s hip. uygulamasının floresan mikroskopta görüntüsü, Acridine Orange boyaması, 400X büyütme ile bakıldı.

MKN45 hücrelerinin 24 saat hipoksi kontrolde 57 adet AVO boyaması gözlenmişken, 24 saat hipoksik koşulda 300 nM VCR uygulaması sonrasında 8 adet AVO boyanmıştır. 24 saat hipoksik koşulda bekletilmesinin ardından 300 nM VCR uygulaması ve 24 saat daha hipoksizde tutulduğunda 31 adet AVO boyanması gözlenmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Kanser, ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde önde gelen ölüm nedeni ve gelişmekte olan ülkelerde ikinci önde gelen ölüm nedenidir (Jemal et al., 2011).

Mide kanseri dünyada yaygın bir şekilde görülen, agresif bir hastalıktır (Göçmen ve Kocaoğlu, 2000). Her ne kadar sürekli olarak azalsa da, mide kanseri, dünyadaki en yaygın ve ölümcül neoplazilerden biri olmaya devam etmektedir (Rawla and Barsouk, 2018). Belirgin coğrafi varyasyon, zaman eğilimleri ve mide kanseri insidansı üzerindeki göçmen etkisi, çevresel veya yaşam tarzı faktörlerinin bu hastalığın etiyojisine önemli ölçüde etki ettiği bilinmektedir (Crew and Neugut, 2006).

Otofaji; hücre içi organellerin ve proteinlerin lizozomda parçalanmasını sağlayan hücresel bir süreçtir. Fakat otofajinin düzenlenmesindeki temel mekanizmalar ve kanser üzerindeki etkisi tam olarak açıklanamamaktadır. Otofaji uyarıldığında apoptozda görevli olan hasarlı hücreler işlevini yapamadığından kanserli hücreler için alternatif bir ölüm mekanizması aktive olur (Kartlaşmış ve ark., 2018). Fakat bununla birlikte Zhan et al, VCR'nin, Mc11'in transkripsiyonel düzenlenmesi yoluyla HMGB1'i ekstraselüler alana bırakarak, mide kanseri hücrelerini apoptoza karşı korumak için otofajiyi indükleyebileceğini göstermiştir. (Zhan et al., 2012).

Artan kanıtlar otofajinin kanser gelişiminde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, otofajinin tümör gelişimini baskıladığı veya kanser hücrelerine açlık gibi stres koşullarında, tümör gelişimini teşvik eden bir kurtarma mekanizması sağlayıp sağlamadığı açık değildir. Ayrıca, otofajinin kanser gelişimindeki rolü, karsinogenezin erken evrelerinde, ilerlemiş kanserlerden daha önemli olabilir (Yoshioka et al., 2008).

Hipoksi, tümör gelişimi ve agresifliğinin ana düzenleyicisidir. Glikoz, tümör hücrelerinin çoğalmasını ve hayatta kalmasını koruyan bir metabolik enerji kaynağıdır. Glikoz taşıyıcıları (GLUT) Warburg etkisi olarak da bilinen aerobik glikolizi desteklemek için glikozu sitoplazmaya taşır (Han et al., 2019). Aktive edilmiş HIF-1, tümör hücrelerinin, yaşamda kalma ve ilerleme için gerekli hayati biyolojik süreçleri düzenleyen yüzden fazla aşağı akış genin transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla oksijendeki değişimlere karşı uyarlanan tepkilerinde çok önemli bir rol oynar. Bunlara glukoz metabolizması, hücre çoğalması, göç ve anjiyogenez örnek olarak verilebilir. Örneğin, hızla büyüyen bir tümör dokusunda HIF-1, hipoksik tümör hücrelerinin, Warburg etkisini korumak için glukoz metabolizmasını, daha verimli oksidatif fosforilasyondan daha az verimli glikolitik yola kaydırmasına yardımcı olur. Bu nedenle, hipoksik hücreler enerji ihtiyaçlarını karşılamak için daha fazla glikoz tüketme eğilimindedir (Masoud and Li W, 2015). HIF-1, düşük verimliliği telafi etmek için glikoz alımını artıran, GLUT-1 aşırı ekspresyonunu stimüle eder (Chen and Sang, 2016). HIF-1, tümör hücrelerini büyümeleri için oksijenle zenginleştirmek için yeni kan damarlarının gelişimini stimüle etmek için VEGF gibi birçok pro-anjiyojenik faktörü indükler (Masoud and Li, 2015). HIF-1 $\alpha$ , GLUT-1 ve VEGF'in birlikte aktive olmasını sağlayarak anjiyogeneze neden olur (Yang et al., 2016).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, öncelikle iki farklı mide kanseri hücre hattı seçilmiştir. Bunun nedeni, agresifliği birbirinden farklı iki farklı mide kanserine, hipoksinin ve VCR'nin etkisinin incelenmesidir. AGS ve MKN45 hücre hatlarına uygulanan Vincristine'nin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için MTT testi uygulanmıştır. AGS hücre hattında 24. ve 48. saatlerde, MKN45 hücre hattında ise 24. saatte 300 nM VCR uygulaması sonucu, daha düşük konsantrasyona oranla hücreler kurtarılmıştır ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu nedenle hücrelerin kendilerini kurtarmaya gittiği saat ve doz, çalışma dozu olarak belirlenmiştir.

Yüksek dozlarda VCR'nin, fare pankreas hücrelerinde belirgin otofaji oluşturduğu sonucuna varılabilir. Otofajik vakuollerin oluşumu, 5 ve 24 saatlik tedaviden sonra oldukça fazla bulunmuştur (Nevalainen, 1975). Bununla tutarlı olarak AGS hücre hattında, kontrole göre kıyaslandığında VCR uygulaması sonucunda AVO oluşumu 8 kat azalmış, MKN45 hücre hattında VCR uygulaması

sonucu AVO oluşumu 2 kat artmıştır. Hipoksi uygulandığı durumda yine AGS hücrelerinde kontrole göre 6,4 kat azalmıştır, fakat hipoksi ve VCR'nin birlikte uygulandığı durumda hipoksi kontrole göre 2 kat artış gözlenmiştir. 24s hip+VCR+24s hip. uygulaması sonrası hipoksi kontrole göre 2,2 kat artış olmuştur. Aynı işlemler MKN45 hücrelerine uygulandığında kontrole göre hipoksi kontrolde AVO artışı 2,3 kat olmuştur. 24s hip+VCR+24s hip. uygulaması sonrası ise 1,2 kat AVO artışı gözlenmiştir. Zhan et al. (2015) VCR'nin, AVO'nun önemli ölçüde oluşumunu tetiklemediğini buldu. Fakat üzerinde çalışılan AGS ve MKN45 hücre hatlarında hipoksi ile birlikte VCR kullanımı sonucu AVO oluşumunda gözle görülür bir etkiden söz edilmektedir.

Jin et al. (2016), VCR'nin, gastrointestinal hücre büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini bulmuştur. Fakat diğer bir yandan VCR, göç ve istila gibi hücre hareket kabiliyetini konsantrasyona bağlı bir şekilde arttırdığını gözlemlemiştir.

Hsich et al. (2015), oral kanserde VCR'nin otofajiyi indüklediğini; Zhan et al. (2015), VCR'nin, mide kanseri hücreleri olan BGC-823 ve SGC-7901 hücrelerini apoptozdan koruyarak otofajiyi indüklediğini, LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünü tetiklediğini ve aynı zamanda Beclin-1'in ekspresyonunu artırdığını bulmuştur. Bu sonuçlar, VCR'nin otofajiyi tetiklediğini gösterirken, apoptotik hücre ölümünün ilaçla tedaviden sonra göreceli olarak geç evrelerde gerçekleştiğini göstermektedir.

Bu bilgiler ışığında, pro-apoptotik Bax geni ve anti-apoptotik Bcl-2 geninin hipoksi ve VCR ile muamelesi sonucu ekspresyon değişimlerine bakılmıştır. Çalışmanın sonunda, AGS hücre hattında kontrole kıyasla, VCR uygulanmış hücrelerde Bax geninin ifadesi azalmıştır. Hipoksik koşullar altında Bax geninin ifadesi kolon kanserlerinde azalmış olarak gösterilmiştir (Erler et al., 2004). Sadece hipoksinin uygulandığı durumda yine Bax geninde düşük bir azalmadan söz edilmektedir. Fakat hipoksi ve VCR beraber uygulandığında Bax'ın ifadesinde artış gözlenmektedir. Bu sonuç, oksijensiz ortamda kanserli hücelere VCR uygulandığında hücrelerin apoptoza gittiğini göstermektedir. 24s hip+VCR+24s hip. uygulaması sonrası ise AGS hücrelerinde Bax geninin ifadesinde azalma gözlenmiştir. Bu da, daha agresif ve oksijensiz ortamda bulunan hücrelerin, kontrole göre kıyaslandığında VCR uygulanması sonucu hücreleri apoptoza daha az götürdüğünü belirtmektedir. Yumurtalık kanserinde yapılan bir çalışmaya göre dirençli kanser hücrelerine VCR uygulandığında hücrelerin apoptoza gittiği

belirlenmiştir (Liang, 2016) ancak bu çalışmada mide kanseri olan AGS hücre hattında stres altındaki koşullarda apoptoza götürmediği, Bax geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir.

MKN45 hücre hattında, VCR ve hipoksi uygulaması sonucu apoptoza götürecek olan Bax geninin ifadesi artmıştır. Hipoksi ve VCR aynı anda uygulandığında, ifade kontrole göre 5 kat artış göstermiştir. Hücrelere 24s hip+VCR+24s hip. uygulandığında yine gen ifadesi artmıştır. Bu sonuçlara bakarak, hipoksi ve VCR'nin daha az agresif olan MKN45 hücrelerinde apoptozu büyük ölçüde tetiklediği gözlenmektedir. Uzun süre stres ortamında kalındığında ise kontrole göre çok az bir miktarda Bax geninde ifade artışı söz konusudur.

AGS hücrelerinde anti-apoptotik Bcl-2 geninin ifadesine de bakılmıştır. VCR, Bcl-2 geninin fosforillenmesini sağlayarak ifadesinin artmasına neden olur (Kroemer, 1997). AGS hücrelerine VCR uygulandığında, Bcl-2 geninin ifadesinde artış gözlemiştir. Bcl-2'nin hipoksik koşullar altında böbreküstü bezi hücresi olan PC12 hücre hattında, apoptozu önlemek için ağırlıklı olarak etki ettiği bulunmuştur (Shimizu, 1996). Fakat yapılan çalışmada sonuç, mide kanserinde hipoksik koşulların Bcl-2 geninin ifadesini azalttığı yönündedir.

Hipoksi ve VCR birlikte uygulandığında AGS hücre hattında Bcl-2 geninin ifadesinde yaklaşık 4 kat artma, 24s hip+VCR+24s hip. uygulandığında azalma görülmektedir. Bunun sonucu olarak AGS hücrelerinde hipoksi ve VCR'nin beraber kullanılması sonucu apoptozu engelleyecek olan Bcl-2 geninin ifadesinde anlamlı bir artıştan bahsedilebilmektedir. Fakat stres koşulları ve VCR ile birlikte apoptoza engel olacak gende olumlu yönde bir azalma fark edilmektedir. Wall et al, VCR'nin Reh hücrelerinde Bax ve Bcl-2 genlerinde ifade artışına neden olduğunu bulmuştur (Wall et al., 1999). Yapılan çalışma, mide kanseri hücreleri olan AGS hücre hattında da bunun doğruluğu bir kez daha gösterilmektedir.

Daha az agresif olan MKN45 hücre hattında Bcl-2 geninin ifadesi ise VCR uygulandığında artmış; hipoksi uygulandığında ise azalmıştır. Hipoksi ve VCR birlikte uygulandığında ve 24s hip+VCR+24s hip. uygulandığında gen ifadesinde artma görülmektedir. Daha önceki çalışmalarda hipoksinin Bcl-2 geninin ifadesini arttırdığı bulunsada MKN45 hücre hattında tam tersi bir durum söz konusudur. VCR tek başına uygulandığında ise hücrelerin apoptozdan daha fazla korunduğu fark

edilmektedir. AGS hücrelerine kıyasla MKN45 hücre hattında hipoksi ve VCR birlikte kullanıldığı zaman daha az bir artış gözlenmektedir.

HepG2 hücrelerinde VCR'nin otofajiyi indüklediği bilinmektedir (Xinzhao et al., 2004). Hipoksi ve VCR'nin etkilerinin tam olarak anlaşılabilmesi için otofajik yollarda görev yapan Beclin-1 ve LC3-II genlerinin ifadelerine bakılmıştır. AGS hücrelerinde VCR uygulandığında Beclin-1 geninin ifadesi artma; hipoksi uygulandığında ise azalma fark edilmiştir. Hipoksi ve VCR birlikte kullanıldığında ve 24s hip+VCR+24s hip. uygulandığında yine artış gözlenmiştir. AGS hücreleri yalnızca VCR kullanıldığında hücreleri otofajiye götürmüştür. Bcl-2'nin aşırı ifadesinin, özellikle hipoksik koşullar altında mitokondriyal DNA seviyelerini arttırdığı ve otofajiyi inhibe ettiği; hipoksinin seçici bir şekilde mitokondri otofajisini indüklediği bulunmuştur (Zhang et al., 2008). Fakat bu çalışmada hipoksi ile herhangi bir muamelede bulunulduğunda Beclin-1 ifadesinde azalma gösterilmektedir.

MKN45 hücrelerinde VCR uygulaması sonucu Beclin-1 geninde yaklaşık 5 kat artış; hipoksi uygulanması sonucu yine artış gözlenmiştir. Hipoksi ve VCR birlikte uygulandığında ve 24s hip+VCR+24s hip. uygulandığında ise artma tespit edilmiştir. Bu; daha az agresif olan MKN45 hücresinde VCR'nin hücreleri daha fazla otofajiye götürdüğünü belirtir. Her durumda normale göre artış tespit edilmiştir, bu da hipoksi ve VCR'nin daha az agresif olan mide kanseri hücrelerinde otofajiyi tetiklediğini göstermektedir.

AGS hücrelerinde sadece VCR, sadece hipoksi ve 24s hip+VCR+24s hip. uygulandığında LC3-II geninin ifadesinde azalma, hipoksi ve VCR birlikte uygulandığında ise artma gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda bahsedildiği üzere hipoksi ve VCR otofajiyi tetiklemesine rağmen ikisi hücreye birlikte verildiğinde otofajiyi tetikleyen genlerin birinde azalma gözlenmiştir.

MKN45 hücrelerine sadece VCR uygulanması durumunda LC3-II geninin ifadesinde artma, hipoksi ve VCR uygulandığında LC3-II geninin ifadesinde yaklaşık 12 kat artma; 24s hip+VCR+24s hip. uygulandığında LC3-II geninin ifadesinde yaklaşık 8 kat artma; yalnızca hipoksi uygulanması durumunda ise azalma gözlemlenmiştir. Daha az agresif olan bu hücre hattına bakıldığında stres ortamı otofajik genlerden Beclin-1'in ifadesini arttırırken LC3-II'nin ifadesinin azalmasına neden olmuştur.

Birbirleriyle etkileşimde olan hipoksi geni HIF1- $\alpha$  ve anjiyogeneze neden olan VEGF genleri üzerinde ekspresyon incelemesi yapılmıştır. VCR'nin hem HIF-1 $\alpha$  hem de VEGF geninin ekspresyonunu düşürdüğü bilinmektedir (Park et al., 2016). AGS hücre hattında sadece VCR ve hipoksi ve VCR uygulanması durumunda VEGF geninde artma, diğer iki durumda ise bu gende azalma söz konusudur.

MKN45 hücre hattında ise sadece VCR ve sadece hipoksi durumunda VEGF geninin ifadesinde artma, 24s hip+VCR+24s hip. uygulandığında VEGF geninde yaklaşık 10 kat artma, hipoksi ve VCR birlikte uygulandığında ise azalma söz konusudur.

Transkripsiyon faktörü HIF-1, normoksiden hipoksiye kadar hücrelerin ve tüm organizmanın hayatta kalmasını kolaylaştıran genlerin indüklenmesinden sorumlu anahtar bir düzenleyicidir (Ke and Costa, 2006). AGS hücre hattında sadece VCR, sadece hipoksi ve hipoksi ve VCR'nin birlikte uygulandığı durumda HIF1- $\alpha$  geninin ekspresyonunda artma, 24s hip+VCR+24s hip. uygulandığında azalma gözlenmiştir.

MKN45 hücre hattında sadece VCR ve sadece hipoksi uygulandığı durumda HIF1- $\alpha$  geninin ekspresyonunda artma ve hipoksi ve VCR'nin birlikte, 24s hip+VCR+24s hip. uygulandığında azalma gözlenmiştir.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Otofajinin tümör gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Erken evrelerde otofaji kanser oluşumunu engelliyorken daha ileri evrelerde stres ve genomik kararsızlığın daha fazla olması kanseri tetikleyebilir (Hanahan and Weinberg, 2011).

Özet olarak, MKN45 hücreleri daha az agresif olduğundan ve kendini çoğaltma süreleri yaklaşık 30 saat olduğundan; VCR uygulaması sonucu, hücreleri büyük ölçüde otofajiye götürdüğü söylenebilmektedir. Stres altında VCR kemoterapötik ilacının, pro-apoptotik genlerin ve otofajik genlerin ekspresyonlarını arttırdığı için bu hücre hattında daha efektif olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak p53'ü mutasyonlu olan ve kendini 20 saatte eşleyebilme özelliğine sahip AGS hücreleri için VCR kemoterapötik ilacı, uygun bir ilaç olmamakla birlikte, daha agresif ortam koşullarında etkisini büyük ölçüde kaybedebilmektedir. Hipoksik durumda, agresif olan bu hücre hattına VCR uygulanması halinde anjiyogeneze neden olan VEGF geninin, glukoz mekanizmasını çalıştıracak olan HIF-1 $\alpha$  geninin ekspresyonlarında fark edilir ölçüde artış tespit edilmiştir. VCR ile her ne kadar Bax geninin ifadesinde artış da gözlenirse, anti-apoptotik Bcl-2 genindeki artış Bax'ın Bcl-2'den ayrılarak apoptozu tetiklemesine yardım edemeyecektir. Bu da hücreyi apoptozdan koruduğunu göstermektedir. Bu agresif hücre hattında Beclin-1 ve LC3-II'nin artmasının ve hücrenin otofajiye gitmesinin sonucu olarak tümör ilerlemesi daha da artabilmektedir.



Agresif tümörlerde daha uygun bir sonuç için HIF-1 $\alpha$  baskılayıcı bir ajan ile VCR kombine tedavi yapılabilir, bunun sonucunda gen ekspresyonlarına bakılarak kanser hücrelerinin ne ölçüde apoptoza gittiği belirlenebilir. Bunun yanısıra agresif olmayan tümörlerde de yüksek dozlar denenerek kanser hücrelerini tamamen yok edip etmediği ekspresyon düzeylerinin incelenmesiyle tespit edilebilir.



## 7. KAYNAKÇA

Ahn C.H., Jeong E.G., Lee J.W., Kim M.S., Kim S.H., Kim S.S., Yoo N.J., Lee S.H. (2007) Expression of Beclin-1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers. 115:1344–9.

Anding A.L, Baehrecke E.H. (2015) Autophagy in cell life and cell death. *Current Topics in Developmental Biology*, Volume 114:67-91.

Arcaro A, Guerreiro A.S. (2007) The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications. *Curr Genomics*, 8(5):271-306.

Azad M.B., Chen Y, Henson E.S., Cizeau J, Ward E.M., Israels S.J., Gibson S.B. (2007) Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy*, 4(2):195–204.

Bunn H, Poyton R. (1996) Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiological Reviews*, 76(3):839-85.

Carcas L.P. (2014) Gastric cancer review. *Journal of Carcinogenesis*, 13:14 doi: 10.4103/1477-3163.146506

Chao Y, Luo Y, Zou J, Ouyang J, Cai Z, Zeng X, Ling H, Zeng T. (2019) Autophagy and its role in gastric cancer. *Clinica Chimica Acta*, 489;10-20.

Chen B, Jin F, Lu P, Lu X.L., Wang P.P., Liu Y.P., Yao F, Wang S.B. (2004) Effect of mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway on multidrug resistance induced by vincristine in gastric cancer cell line MGC803. *World J Gastroenterol*, 10(6):795-799.

Chen S, Sang N (2016). Hypoxia-Inducible Factor-1: A Critical Player in the Survival Strategy of Stressed Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117:267–278.

Cotter T. (2009) Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, 9(7):501-7.

Crew K.D., Neugut A.I. (2006) Epidemiology of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 21; 12(3):354-362.

Dellabona P, Moro M, Crosti M.C., Casorati G, Corti A. (1999) Vascular attack and immunotherapy: a 'two hits' approach to improve biological treatment of cancer. *Gene Therapy*, 6:153-154.

Demetriou C, Esposti D, Fedinick K, Russo F, Robinson O, Vineis P. (2017) Filling the gap between chemical carcinogenesis and the hallmarks of cancer: a temporal perspective. *Eur J Clin Invest*, 48(6):e12933 doi: 10.1111/eci.12933

Elmore S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4):495-516.

Erler J.T., Cawthorne C.J., Williams K.J., Koritzinsky M, Wouters B.G., Wilson C, Miller C, Demonacos C, Stratford I.J., Dive C. (2004) Hypoxia-mediated down-regulation of *id* and *bax* in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Molecular And Cellular Biology*, Apr. 2004, 24(7):2875–2889.

Fan X, Wong B, Wang W, Zhou X, Cho C, Yuen S, Leung S, Lin M, Kung H, Lam S. (2001) Inhibition of proteasome function induced apoptosis in gastric cancer. *Int. J. Cancer*: 93, 481–488.

Folkerts H, Hilgendorf S, Vellenga E, Bremer E, Wiersma V.R. (2018) The multifaceted role of autophagy in cancer and the microenvironment. *Med Res Rev*, 39(2):517-560.

Fonkoua L, Nelson S. (2018) Molecular characterization of gastric carcinoma: therapeutic implications for biomarkers and targets. *Biomedicines*, 9;6(1).

Fu J.D., Yao J.J., Wang H, Cui W.G., Leng J, Ding L.Y., Fan K.Y. (2019) Effects of EGCG on proliferation and apoptosis of gastric cancer SGC7901 cells via down-regulation of HIF-1 $\alpha$  and VEGF under a hypoxic state. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23:155-161.

Geng Q.R., Xu D.Z., He L.J., Lu J.B., Zhou Z.W., Zhan Y.Q., Lu Y. (2012) Beclin-1 expression is a significant predictor of survival in patients with lymph node-positive gastric cancer. *PLoS ONE* 7(9).

Giansanti V, Torriglia A, Scovassi A. (2011) Conversation between apoptosis and autophagy: “Is it your turn or mine?” *Apoptosis*, 16:321–333.

Göçmen E, Kocaoğlu H. (2000) Mide Kanseri Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri J Surgery*, 5(4):161-2.

Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. (2008) Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri, *Türk Kardiyol Dern Arş*, 36(2):120-130.

Han X, Wang W, He J, Jiang L, Li X. (2019) Osteopontin as a biomarker for osteosarcoma therapy and prognosis. *Oncology Letters*, 17(3):2592-2598.

Hanahan D, Weinberg R. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-669.

Hansen M.H., Jäättelä M. (2008) Autophagy an emerging target for cancer therapy. *Landes Bioscience, Autophagy* 4:5, 574-580.

Hsich M.J., Hsieh Y.H., Lin C.W., Chen M.K., Yang S.F., Chiou H.L. (2015) Transcriptional regulation of Mcl-1 plays an important role of cellular protective effector of vincristine-triggered autophagy in oral cancer cells. *Expert Opinion*, 19(4):455-70.

Huang S.P., Wu M.S., Shun C.T., Wang H.P., Hsieh C.Y., Kuo M.L., Lin J.T. (2005) Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma. *Journal of Biomedical Science*, 12:229–241.

Jemal A, Bray F, Center M.M., Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA CANCER J CLIN*, 61:69–90.

Jiang Z.F., Shao L.J., Wang W.M., Yan X.B., Liu R.Y. (2012) Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer. *Mol Biol Rep*, 39:259–267.

Jin X, Liu K, Jiao B, Wang X, Huang S, Ren W, Zhao K. (2016) Vincristine promotes migration and invasion of colorectal cancer HCT116

cells through RhoA/ROCK/ Myosin light chain pathway. Jin et al. *Cell. Mol. Biol*, 62 (12):91-96.

Johnson I.S., Armstrong J.G., Gorman M, Burnett J.P. Jr. (1963) The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res*, 23:1390-427. 1963.

Kartlaşmış K, Kökbaş U. Kayrın L. (2018) Kanser Metabolizması ve Otofaji. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 27(4): 388-396.

Ke Q, Costa M. (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular Pharmacology*, 70:1469–1480.

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26:239-245.

Koukourakis M.I., Giatromanolaki A, Sivridis E, Pitiakoudis M, Gatter K.C., Harris A.L. (2010) Beclin 1 over- and underexpression in colorectal cancer: distinct patterns relate to prognosis and tumour hypoxia. *British Journal of Cancer*, 103(8):1209–1214.

Krajewska M, Fenoglio-Preiser C.M., Krajewski S, Song K, Macdonald J.S., Stemmerman G, Reed J.C. (1996) Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach. *American journal of Patbology*, 149(5):1449-1457.

Kroemer G. (1977) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature*, 3(6):614-20.

Kroemer G, Marino G, Levine B. (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell*, 40(2):280-293.

Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Onogawa S, Matsutani N, Kaio E, Ito M, Chayama K. (2003). Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Cancer Cell Biology*, 105(2):176-81.

Lai M.C., Chang C.M., Sun H.S. (2016) Hypoxia induces autophagy through translational up-regulation of lysosomal proteins in human colon cancer cells. *PLoS One*, 11(4):e0153627.

Lauwers G. (1995) Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas. *Cancer*, 75(9):2209-13.

Li Z, Sheng M. (2012) Caspases in synaptic plasticity. *Molecular Brain*, 5:15 doi: 10.1186/1756-6606-5-15.

Liang B. (2016) Inhibition of autophagy sensitizes MDR-phenotype ovarian cancer SKVCR cells to chemotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82. 98–105.

Liu Y, Zhang Z, Wang J, Chen C, Tang X, Zhu J, Liu J. (2019) Metabolic reprogramming results in abnormal glycolysis in gastric cancer: a review. *OncoTargets and Therapy*, 12:1195–1204.

Llambi F, Green D. (2011) Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21:12–20.

Masoud G.N., Li W. (2015) HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5): 378–389.

Mehrpour M, Escalatine A, Beau I, Codogno P (2010). Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research*. 20:748-762.

Meier, P., Finch, A., Evan, G. (2000) Apoptosis in development. *Nature*, 407(6805):796-801.

Mizushima N, Levine B, Cuervo A, Klionsky D. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182):1069-75.

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:107-32

Molaei F, Forghanifard M, Fahim Y, Abbaszadegan M. (2018) Molecular signaling in tumorigenesis of gastric cancer. *Iranian Biomedical Journal*, 22(4):217-230.

Nevalainen T.J. (1975) Cytotoxicity of vinblastine and vincristine to pancreatic acinar cells. *Virchows Arch. B Cell Path*, 18(1):119-127.

Oh S, Kwon H, Kim S, Jang J, Kim M, Kim K, Han J, Kim C, Kim S, Jeong J, Kim H. (2008) Clinicopathologic significance of HIF-1 $\alpha$ , p53, and VEGF expression and preoperative serum VEGF level in gastric cancer. *BMC Cancer*, 8:123.

Ohsumi Y. (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Molecular Cell Biology*, 2(3):211-6.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang F.T., Zhou T.T., Liu B, Bao J.K. (2012) Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45, 487–498.

Park K.J., Yu M.O., Park D.H., Park J.Y., Chung Y.G., Kang S.H. (2016) Role of vincristine in the inhibition of angiogenesis in glioblastoma. *Neurological Research*, 38(10):871-9.

Qian H.R., Yang Y. (2016) Functional role of autophagy in gastric cancer. *Oncotarget*, 7(14):1764-17651.

Rawla P, Barsouk A. (2019) Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Gastroenterology Rev*, 14(1):26-38.

Riquelme I, Saavedra K, Espinoza J. (2015) Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathway-driven targeted therapy. *Oncotarget*, 6(28):24750-24779.

Schwartz S, Yamamoto, Navarro M. (1997) Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Research*, 57(19):4420-4426.

Shimizu S. (1996) Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by bcl-2 and bcl-x<sub>l</sub>. *Cancer Research*, 56. 2161-2166.

Siegel R, Miller K, Jemal A. (2019) Cancer Statistics. *CA Cancer*. 69(1):7-34.

Smith M.G., Hold G.L., Tahara E, El-Omar E.M. (2006) Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 12(19):2979-2990.

Taghizadehghalehjoughi A, Sezen S, Hacımüftüoğlu A, Güllüce M. (2019) Vincristine combination with Ca<sup>2+</sup> channel blocker increase antitumor effects. *Molecular Biology Reports*, 46(2):2523-2528.

Tan M, Balakrishnan M, Graham D. (2019) Gastric cancer worldwide except japan. *Nature Singapore*, 2:17-28.

Tan Q, Wang M, Yu M, Zhang J, Bristow R.G., Hill R.P., Tannock I.F. (2016) Role of autophagy as a survival mechanism for hypoxic cells in tumors. *Neoplasia*, 18(6):347-355.

Tanida I. (2011) Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling* 14(11):2201-14.

The Cancer Genome Atlas Research Network. (2014) Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517):202-209.

Tonder A, Jobert A, Cromarty D. (2015) Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BioMed Central, BMC Research Notes*, 8:47.

Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, Tsujie M, Yamamoto H, Miyata H, Takiguchi S, Yasuda T, Yano M, Monden M. (2006) Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer*, 9: 44–49.

Wall N.R., Mohammad R.M., Al-Katib A.M. (1999) Bax:Bcl-2 ratio modulation by bryostatin 1 and novel antitubulin agents is important for susceptibility to drug induced apoptosis in the human early pre-B acute lymphoblastic leukemia cell line. *Leukemia Research*, 23(10):881–888.

Wang C, Klionsky D. (2003) The molecular mechanism of autophagy. *Molecular Medicine*, 9(3-4):65-76.

Winship A.L., Carpenter M, Griffiths M., Hutt K.J. (2019) Vincristine chemotherapy induces atresia of growing ovarian follicles in mice. *Toxicol Sci*, 169(1):43-53.

Xie Z, Klionsky D. (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9(10):1102-9.

Xinzhao P, Ying C, Yingjie P. (2004) Inhibition of autophagy influences the autophagic apoptosis induced by vincristine. *Oncol Lett*, 9(5):2278-2282.

Yang B, Huang J, Liu H. (2015) miR-335 directly, while miR-34a indirectly modulate survivin expression and regulate growth, apoptosis, and invasion of gastric cancer cells. *Tumour Biol*. 37(2):1771-9.

Yang T, Yao Q, Cao F, Liu Q, Liu B, Wang X.H. (2016) Silver nanoparticles inhibit the function of hypoxia-inducible factor-1 and target



genes: insight into the cytotoxicity and antiangiogenesis. *International Journal of Nanomedicine*, 11:6679–6692.

Yeo E, Chun Y, Park J. (2004) New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biomedical Pharmacology*, 68(6):1061-1069.

Yokozaki H. (2000) Molecular characteristics of eight gastric cancer cell lines established in Japan. *Pathology International*, 50(10):767-777.

Yoshioka A, Miyata H, Doki Y, Yamasaki M, Sohma I, Gotoh K, Takiguchi S, Fujiwara Y, Uchiyama Y, Monden M. (2008) LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancers. *International Journal Of Oncology*, 33:461-468.

Zhan Z, Li Q, Wu P, Ye Y, Tseng H.Y., Zhang L, Zhang X.D. (2012) Autophagy-mediated HMGB1 release antagonizes apoptosis of gastric cancer cells induced by vincristine via transcriptional regulation of Mcl-1. *Autophagy*, 8(1):109–121.

Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda L.A., Tan Y.S., Baek J.H., Wesley J.B., Gonzalez F.J., Semenza G.L. (2008) Mitochondrial autophagy is an hif-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *The Journal Of Biological Chemistry*, 283(16):10892–10903.

Zhao L. (2004) Gambogic acid induces apoptosis and regulates expressions of bax and bcl-2 protein in human gastric carcinoma mgc-803 cells. *Biol. Pharm. Bull*, 27(7):998-1003.

Zheng X.Y., Li L.J., Li W, Jiang P.F., Shen H.Q., Chen Y.H., Chen X. (2015) Low concentrations of chloroquine and 3-methyladenine suppress the viability of retinoblastoma cells synergistically with vincristine independent of autophagy inhibition. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 253(12):2309-15.

Zhou X. (2001) Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in gastric cancer cells through up-regulation of bak and bax. *Carcinogenesis*, 22(9):1393-1397.

Zhu C, Huang Q, Liu C, Lin X, Xie F. (2013). Prognostic value of HIF-1a expression in patients with gastric cancer. *Mol Biol Rep*, 40:6055-6062.

<https://www.invivogen.com/review-autophagy/> (05.03.2019)

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1995 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. Lisans ve yüksek lisans eğitimini Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde tamamladı. Temmuz 20016-Eylül 2016 tarihi arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi GETAM'da staj yaptı. Burada sitogenetik, moleküler genetik ve teratoloji alanlarında staj gördü.

### YAYINLAR

Irmak Yazıcıoğlu M.B., Ceylaner B, Turna S, Kaşıkçı H. (2018) Kanserde hedefe yönelik monoklonal antikör tedavisi, Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi,1: 95-102.