T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

VALPROİK ASİT VE SPİRONOLAKTON KOMBİNASYONUNUN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA SİTOTOKSİK/APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MEHMET EMİN KÖSE

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. Ü. NAZLIHAN AZTOPAL

KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2021

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

VALPROİK ASİT VE SPİRONOLAKTON KOMBİNASYONUNUN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA SİTOTOKSİK/APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MEHMET EMİN KÖSE

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. Ü. NAZLIHAN AZTOPAL

KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2021

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum,“VALPROİK ASİT VE SPİRONOLAKTON KOMBİNASYONUNUN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA SİTOTOKSİK/APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Mehmet Emin Köse

(İmza)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen, eğitimimle ilgili özveri gösteren, tecrübesini, bilgisini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Nazlıhan AZTOPAL'a,

Tüm yüksek lisans eğitimim süresince imkanlarını seferber eden zaman zaman fikirlerimi dinleyen, destekleyen ve yol gösteren değerli Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Laboratuvar çalışmalarım süresince gerek teknik, gerek moral ve motivasyon destekleri ile yanımda olan Beste AYDIN, Merve ERKISA'ya, Melda SARIMAN'a Remzi Okan Akar'a ve Dr. Öğr. Üyesi Huri BULUT'a,

Şüphesiz eğitimimin her aşamasında bana maddi, manevi desteklerini hiç esirgemeyen ve bugünlere gelmemde büyük emekleri olan aile üyelerim, annem Refika KÖSE, babam Ramazan KÖSE ve ablam Merve Nur Özün'e saygı, sevgi ve minnetlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI ..... İ
TEŞEKKÜR ..... İİ
İÇİNDEKİLER ..... İİİ
TABLOLAR LİSTESİ V
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİ
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... Vİİİ
ÖZET X
ABSTRACT ..... Xİ
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 3
1.1. Akciğer Kanseri 7
1.1.1. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinom (KHOAK) 8
1.1.2. Küçük Hücreli Akciğer Karsinom (KHAK) 8
1.2. Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi 8
1.3. Akciğer Kanseri Tedavisi 13
1.4. Hücre Ölümü 14
1.5. Apoptosis 15
1.1.3. Dışsal Yol (Ekstrinsik Yol) 18
1.1.4. İçsel Yol (İntrinsik/Mitokondriyal yol) 19
1.6. Nekrozis 19
1.7. İlaçların Yeniden Kullanımı (Drug Repurposing) 19
2. MATERYAL & METOD 22
2.1. Materyal 22
2.1.1. Kimyasal Maddeler 22
2.1.2. Sarf Malzemeler 22
2.1.3. Cihazlar 23
2.2. Metot 24
2.2.1. İlaçların Hazırlanması ve Uygulanması 24
2.2.2. Hücre Kültürü 24

2.2.3. Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması 25
2.2.4. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması 25
2.2.5. Hücre Soylarının Pasajlanması 26
2.2.6. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı.....26
2.2.7. Hücre Soylarının Stoklanması 26
2.2.8. Sulforhodamine B (SRB) Testi ile Canlılık Tayini.....27
2.2.9. Akım Sitometri Analizleri.....28
2.2.9.1. Kazpaz 3/7 testi 28
2.2.9.2. Anneksin-V testi.....29
2.2.9.3. Mitokondri Membran Potansiyeli testi.....30
2.2.10. Yara İyileşmesi 31
3. BULGULAR.....32
3.1. Kombinasyon Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi 32
3.2. Akım Sitometri Bulguları 38
3.2.1. Annexin V-FITC Testi 38
3.2.2. Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Değerlendirilmesi 40
3.2.3. Mitokondri Membran Potansiyelinde Değişimin İncelenmesi 42
3.3. Kombinasyon Uygulamasının Migrasyon Yeteneği Üzerine Etkisinin Belirlenmesi 44
4. TARTIŞMA 46
5. SONUÇ 51
KAYNAKÇA.....52

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: A549 ve H1299 hücre soylarının VPA, SP ve Kombinasyon tedavi uygulaması sonrası elde edilen IC50 ve IC90 verileri. 36

Tablo 3.2: A549 ve H1299 hücrelerinde kombinasyon uygulaması sonrası (72 saat) elde edilen kombinasyon indeksi (CI) değerleri ve tanımlanan etkileri. 38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: Kanserin özellikleri (hallmarkları) (Hanahan ve ark., 2011)..... 7
Şekil 1.2: Kromozomun açık yapısı (Anonim, 2021)..... 13
Şekil 1.3: Hücresel ölüm yolakları (Burz ve ark., 2009) 15
Şekil 1.4: HL60 hücreleri. Bozulmamış bir çekirdeğe sahip normal hücre—siyah ok. Yoğunlaşmış parçalanmış çekirdeğe sahip apoptotik hücre-beyaz ok. (Doonan ve ark., 2008). 17
Şekil 1.5: Apoptosis mekanizması (Siddiqui ve ark., 2015)..... 18
Şekil 1.6: İlaçların yeniden kullanımı (Mourenza, Á. 2021.) 20
Şekil 3.1: A549 (A) ve H1299 (B) hücrelerinde 48 saat VPA, SP ve kombinasyon tedavi uygulamaları sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (*: p<0,05 **: p<0,01 ***: p<0,001); + Valproik asitin tek kullanımına göre (+: p<0,05; ++: p<0,01; +++: p<0,001); # Spironolaktonun tek kullanımına'ya göre (#:p<0,05 ##: p<0,01 ###: p<0,001) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir..... 33
Şekil 3.2: A549 (A) ve H1299 (B) hücrelerinde 72 saat VPA, SP ve kombinasyon tedavi uygulamaları sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (*: p<0,05 **: p<0,01 ***: p<0,001); + Valproik asitin tek kullanımına göre (+: p<0,05; ++: p<0,01; +++: p<0,001); # Spironolaktonun tek kullanımına göre (#:p<0,05 ##: p<0,01 ###: p<0,001) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir..... 34
Şekil 3.3: A549 (A) ve H1299 (B) hücrelerinin 48 saat ve 72 saat VPA, SP ve kombinasyon tedavi uygulamaları sonrası mikroskop görüntüleri (x4) 35
Şekil 3.4: A549 (A) ve H1299 (B) hücrelerinin VPA, SP ve kombinasyon tedavi (72 saat) uygulamaları sonrası doz-etki eğrileri..... 37
Şekil 3.5: A549 hücrelerinde VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) ile kombinasyon tedavisi sonrası apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramlarının AnnexinV-FITC metodu ile değerlendirmesi (X1=Canlı, X2=Erken Apoptozis, X3=Geç Apoptozis, X4= Nekroz)..... 39
Şekil 3.6: H1299 hücrelerinde VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) ile kombinasyon tedavisi sonrası apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramlarının AnnexinV-FITC metodu ile değerlendirmesi (X1=Canlı, X2=Erken Apoptoz, X3=Geç Apoptoz, X4=Nekroz) 40
Şekil 3.7: A549 hücrelerinde VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) ile kombinasyon tedavisi sonrası Kaspaz 3/7 aktivitesine bağlı elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (X1= Canlı, X2= Kaspaz 3/7 aktif olan erken apoptotik hücreler, X3= Kaspaz 3/7 aktif olan geç apoptotik hücreler, X4= Kaspaz 3/7 aktif olmayan nekrotik hücreler) 41

Şekil 3.8: H1299 hücrelerinde VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) ile kombinasyon tedavisi sonrası Kaspaz 3/7 aktivitesine bağlı elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (X1= Canlılık, X2= Kaspaz 3/7 aktif olan erken apoptotik hücreler, X3= Kaspaz 3/7 aktif olan geç apoptotik hücreler, X4= Kaspaz 3/7 aktif olmayan nekrotik hücreler) 42
Şekil 3.9: A549 hücrelerinde VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) ile kombinasyon tedavisi sonrası mitokondri membran potansiyelinde yüzde değişimin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (X1= Canlı, X2= Depolarize/Canlı, X3=Depolarize/Ölü, X4= Nekroz) 43
Şekil 3.10: H1299 hücrelerinde VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) ile kombinasyon tedavisi sonrası mitokondri membran potansiyelinde yüzde değişimin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (X1=Canlı, X2= Depolarize/Canlı, X3=Depolarize/Ölü, X4= Nekroz) 44
Şekil 3.11: A549 (A) ve H1299 (B) hücrelerinde VPA, SP ve kombinasyon tedavi uygulamaları sonrası yara iyileşmesi sürecinin takibi (0-48 saat). 45

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

7-AAD : 7-Aminoaktinomisin D
CTL : Sitotoksik T Hücreleri
DISC : Ölüm Bşlatma Sinyali Kompleksi
DR3 : Ölüm reseptörü 3
DR4 : Ölüm reseptörü 4
EGF : Epidermal büyüme faktörü
EGFR : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERBB2 : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
FasL : Fas Ligandı
FGFR1 : Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1
FITC : Floresein İzotiyosiyanat
HAT : Histon Asetil Transferaz
HDAC : Histon deasetilaz
HDACi : Histon deasetilaz inhibitörü
HER2 : İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IFN : İnterferon-γ
IGF : Insülin-benzeri Büyüme Faktörü
KHAK : Küçük Hücreli Akciğer Karsinom
KHOAK : Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinom
KKH : Kanser Kök Hücre
MAP2K1 : Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz 1
NF-κB : Nükleer Faktör Kappa B
PerCP : Peridinin Klorofil
PI3K : Fosfatidilinositol 3 Kinaz
PS : Fosfatidilserin
PTEN : Fosfataz ve Tensin Homolog Proteini
Rb : Retinoblastoma
SP : Spironolakton
SRB : Sulforhodamine B

STK11 **:** Serin-Treonin Kinaz 11

TBG **:** Tümör Baskılayıcı Gen

TCA **:** Trikoloroasetik asit

TNFR1 **:** Tümör nekroz faktör reseptörü 1

TNF-α **:** Tümör nekroz faktör- α

VEGF **:** Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

VPA **:** Valproik asit

ÖZET

Köse, Mehmet E. (2021). Valproik Asit ve Spironolakton Kombinasyonunun Akciğer Kanseri Hücre Soylarında Sitotoksik/Apoptotik Etkilerinin Araştırılması. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Kanser hastalarının dünya genelinde ölüm oranları incelendiğinde akciğer kanseri özellikle erkek bireylerde başı çekmektedir. Hayatta kalma süresi erken dönemde (5 yıl) %60-70 iken ileri evrelerde %5'in altına düşmektedir. Akciğer kanseri için kullanılan tedavi yöntemleri ise cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapidir. Bu alanlardaki ilerlemeler klinik sonuçlarda iyileşmeler göstersede; terapötik etkinlik tatmin edici değildir. Gelişen araştırma olanaklarını takiben kansere etkisinin zannedilenden çok daha fazla olduğu görülen epigenetik mekanizmalar, kanser tedavisinde yeni bir dönemin başlamasını sağladı. Epigenetik süreçlerin bozulması gen fonksiyonunun değişmesine ve malign hücresel transformasyona yol açabilir. Histon modifikasyonları kanser gelişiminde oldukça önemli bir yere sahiptir.Valproik asit (VPA) etkili bir HDACi (Histon Deasetilaz inhibitörü)'dür ve klinikte kullanılan FDA-onaylı bir anti-epileptik ajandır. VPA'nın, çeşitli *in vitro* ve *in vivo* sistemlerde güçlü antitümör etkiler sergilediği gösterilmiştir. Erken klinik çalışmalarda, tek başına veya kombinasyon halinde (demetile edici ajanlar ve/veya sitotoksik ajanlarla) kullanıldığında olumlu sonuçlar verdiği rapor edilmiştir. Spironolakton (SP) klinikte özellikle kardiovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan ve aldosteron-antagonisti olan bir ajandır. Kanser alanında ise Spironolakton, DNA hasar yanıtını bozarak kanser kök hücrelerinin büyümesini engellediği bildirildi. Bu tez kapsamında ise gerçekleştirilen literatür taramaları sonucunda Valproik asit ve Spironolakton kombinasyon tedavisi üzerine herhangi bir çalışma ile karşılaşılmamış olup, ilk olarak Valproik asit (0.3-5mM) ve Spironolakton (3-50µM) tek başlarına ve/veya birlikte kullanılarak doz-yanıt çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, A549 ve H1299 akciğer kanseri hücreleri ajanların ilgili dozları ile 48-72 saat muamele edildi ve hücre canlılığı Sulforhodamine B (SRB) metodu ile değerlendirildi. İlaç etkisini (sinerjistik, aditif veya antagonistik) değerlendirmek için kombinasyon indeksi CalcuSyn programı ile analiz edildi. Sitotoksik etki gözlenen doz(lar)da hücre ölüm modunun analizi için flow sitometri (akış sitometri) ile de Annexin-V-FITC pozitifliği, Mitokondri Membran Potansiyeli ve Kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirilmiştir. Daha sonra ise yara iyileşmesi (wound healing) metodu ile kombinasyon tedavinin hücrelerin migrasyon (göç) yeteneği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde VPA-SP kombinasyonunun her iki hücre soyunda da sinerjik etki gösterdiği ve apoptozisi tetiklediği gözlendi. Yara iyileşmesi sonuçlarına göre ilaçların ilgili dozlarının tek ve/veya kombinasyon tedavilerinin herhangi bir anti göç etkisi göstermediği saptanmıştır. Bu çalışma Valproik asit ve Spironolakton ikilisinin kombinasyon şeklinde kullanımının alternatif bir tedavi modeli olabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, Valproik asit, Spironolakton, Hücre ölümü

ABSTRACT

Köse, Mehmet E. (2021). Investigation Of Cytotoxic/Apoptotic Effects Of Valproic Acid and Spironolactone Combination On Lung Cancer Cell Lines. Istinye University, Institute of Health Science, Cancer Biology and Pharmacology. Master Thesis. Istanbul.

When the death rates of cancer patients around the world are examined, lung cancer takes the lead especially in male individuals. While the survival rate is 60-70% in the early period (5 years), it falls below 5% in the advanced stages. The most commonly used treatment methods for lung cancer are surgery, chemotherapy and immunotherapy. Although advances in these areas show improvements in clinical outcomes, the therapeutic efficacy is unsatisfactory. Following the advancing research possibilities, epigenetic mechanisms, which have been seen to have a much greater effect on cancer than expected, initiated a new era in cancer treatment. Disruption of epigenetic processes can lead to alteration of gene function and malignant cellular transformation. Histone modifications are epigenetic mechanism and have a very important place in cancer development. Valproic acid (VPA) is one of the most effective epigenetic agents as HDACi (Histone Deacetylase inhibitor) and a FDA-approved anti-epileptic used in the clinic. It exerts strong antitumor effects in various *in vitro* and *in vivo* systems. It has been reported in early clinical studies that VPA has promising results used either alone or in combination (demethylating and / or cytotoxic agents). Spironolactone is an aldosterone-antagonist agent used clinically, especially in the treatment of cardiovascular diseases. It has been reported that Spironolactone inhibits the growth of cancer stem cells by disrupting the DNA damage response. There is no study in the literature that encounter cytotoxicity of Valproic acid and Spironolactone combination therapy. Thus, in the present thesis, the differential doses of Valproic acid (0.3-5mM) and Spironolactone (3-50μM) are combined for dose-response analysis. For this purpose, A549 and H1299 lung cancer cells are treated with the relevant doses of the agents for 48-72 hours and cell viability is evaluated by Sulforhodamine B (SRB) method. The combination index analyzed by the CalcuSyn program to evaluate the drug efficacy (synergistic, additive or antagonistic). Annexin-V-FITC positivity, Mitochondrial Membrane Potential and Caspase 3/7 activity is then evaluated by flow cytometry (flow cytometry) for cell death analysis at the cytotoxic dose (s). The effect of combination therapy on migration ability of cells is investigated by wound healing method. Results exerted that the combination of VPA-SP exhibits synergistic effect and triggers apoptosis in both cell lines. According to the wound healing results, it was determined that the single and/or combination treatments of the relevant doses of the drugs did not show anti-migration effect. This study revealed that the use of Valproic acid and Spironolactone in combination may become an alternative treatment model in lung cancer.

Key Words: Lung cancer, Valproic acid, Spironolactone, Cell death

GİRİŞ

Akciğer kanseri morbiditesi, mortalitesi ve tedavi maliyeti açısından önemli bir toplum sağlığı sorunudur. Sadece 2020 yılında dünya genelinde 2.206.771 yeni akciğer kanseri vakası gözlenirken, 1.796.144 bireyin akciğer kanserine bağlı olarak yaşamları son bulmuştur (Torre ve ark., 2016). Özellikle dünya çapında erkekler arasında kanser ölümlerinin en önde gelen nedeni olan akciğer kanserinin oranları ve eğilimleri, sigara içme alışkanlıklarındaki farklılıklar nedeniyle cinsiyet, yaş, ırk / etnik köken, sosyoekonomik durum ve coğrafyaya göre önemli ölçüde değişiklik göstermektedir (Torre ve ark., 2016). Diğer tüm kanser vakalarında olduğu gibi akciğer kanserinde de en önemli aşama, erken tanı ve erken tedavidir. Hastanın durumu, yaşı, fiziksel özellikleri ve kanserin hangi fazda olduğu gibi özellikler tedavi türünün belirlenmesinde ana esası oluşturmaktadır. Mevcut tedaviler arasında cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi en başta gelmektedir. Ancak akciğer kanseri uzun süredir onkolojide geç evre tanısı ile karakterize edilen bir hastalık olduğu için mevcut birçok tedavi istenen sonucu vermemektedir (Hirsch ve ark., 2017). Bu nedenle, mevcut tedavilerin geliştirilmesine yönelik olarak izlenen en önemli stratejilerden biri kombinasyon tedavileridir. Kombinasyon tedavilerde amaç iki veya daha fazla ilacın additif veya sinerjik etkisinden faydalanarak birden fazla mekanizmanın hedeflenmesi suretiyle kanserli dokunun yok edilmesidir. Yeni bir ilaç sentezlemek veya yöntem geliştirmek oldukça pahalıdır ve kombinasyon çalışmalarının tercih edilmesinin en önemli nedeni düşük maliyettir. Kanser tedavilerinde kombinasyon çalışmaları genel olarak anti-kanser etkisi kanıtlanmış olan iki veya daha fazla ilacın, moleküler hedeflerinin birbirlerini tamamlayacak şekilde seçilerek, tedaviye karşı en iyi yanıtın alınması hedeflenmektedir (Mokhtari ve ark., 2017). Bir diğer önemli strateji ise klinikte hali hazırda farklı hastalıklarda kullanımları mevcut olan ilaçların yeniden başka bir hastalık için kullanımıdır. İlaçların yeniden kullanımı (drug repurposing) maliyet ve süre açısından birçok fayda sağlamaktadır (Sleigh ve ark., 2010). Yeni bir ilaç geliştirmek çok maliyetli ve oldukça vakit alan bir süreçtir. Ancak bir ilacın farklı bir hastalık için yeniden kullanılması birçok farklı güvenlik testinden feragat edilmesi ile vakit avantajı sağladığı gibi, yeni ilaç sentezlemek için gerekli olan maliyetten de kaçınılmasını sağlar. Bu strateji ile ilaçların bir dizi ön onkolojik test vasıtasıyla anti-

kanser etkileri saptanmakta ve umut vadeden ilaçların ileri testler ile klinikte kullanımlarının önü açılmaktadır (Bertolini ve ark., 2015). Örneğin Valproik asit (VPA) antiepileptik etkisinin kanıtlandığı 1963 yılından itibaren (Meuniier ve ark., 1963), uzun yıllar boyunca klinikte epilepsi ilacı olarak kullanılmıştır. 1999 yılında VPA'nın kanser alanında ilk klinik denemeleri başlatılmış, daha sonra ise çeşitli lösemiler ve solid tümör dokularında klinik olarak etkisi araştırılmış ve anti-kanser etkisi kanıtlanmıştır (Michaelis ve ark., 2007.). VPA bir epigenetik ajan olarak histon deasetilaz inhibitörü görevini üstlenmektedir. VPA'nın bu fonksiyonu anti-kanser etkisinin ana mekanizmasını oluşturmaktadır (Michaelis ve ark., 2007.; Duenas-Gonzalez, A ve ark., 2008). Ayrıca VPA'nın belirli doz aralığında (1-10 mM) küçük hücreli akciğer kanseri hücre soylarında proliferasyonu baskıladığı rapor edilmiştir (Platta ve ark., 2008). Diğer bir umut vadeden örnek ise Spironolaktondur (SP). Spironolakton potasyum tutucu diüretik bir ajan olmasının yanında klinikte kalp ve kardiovasküler hastalıklarda, adrenal hiperplasia, hipertansiyon ve nefrotik sendromlarda kullanılan bir ilaçtır (Anonim, 2020). Son yıllarda anti-kanser etkisi araştırılan Spironolakton'un serviks kanseri (HeLa) hücrelerinden elde edilmiş kanser kök hücrelerinin (KKH) DNA hasar yanıtını bozmak suretiyle büyümelerini engellediği rapor edilmiştir (Gold ve ark., 2019). Bu tezin kapsamında gerçekleştirilen literatür taramalarında Valproik asit ve Spironolakton'un birlikte kullanımının herhangi bir kanser türü üzerinde sitotoksik etkinliğinin *in vitro* olarak araştırılmadığı saptanmıştır. Literatürdeki bu eksiklikten faydalanarak, mevcut çalışmada Valproik asit ve Spirinolakton kombinasyonunun A549 ve H1299 akciğer kanseri hücre soylarında sitotoksik etkilerinin belirlenmesi ve hücre ölümü/apoptozis ile ilişkili moleküler mekanizmalarının araştırılması amaçlanmaktadır.

1. GENEL BİLGİLER

Kanser birçok ortak özelliği paylaşan ve yaklaşık 200 tipi bulunan hastalık grubunun genel adıdır (Gabriel, 2007). Tüm kanser türlerinde vücut hücrelerinin bir kısmı herhangi bir kısıtlama olmaksızın sürekli olarak bölünmeye başlamaktadırlar. Bu hücreler öncelikle bulundukları dokuyu daha sonrasında ise çevre dokuları istila edebilmektedirler (Anonim, 2021). Ayrıca tümör içerisinde bir alt popülasyon olarak bulunan kanser başlatıcı hücreler veya diğer adlarıyla kanser kök hücreler bulunmaktadır. Bu alt popülasyona dahil olan hücreler yüksek oranda kendini yenileme kabiliyetine sahip olup, ilaçlara karşı direnç oluşumundan ve tümör gelişiminden sorumludurlar (Wicha ve ark., 2006). Kanser sağlıksız beslenme, kötü yaşam koşulları, yüksek miktarda serbest radikallere, iyonlaştırıcı radyasyona, çevresel karsinojenlere ve çeşitli viral ajanlara maruz kalmak vasıtasıyla oluşabildiği gibi sayılan koşullardan bağımsız olarak sadece genetik yatkınlık ve anormallikler vasıtasıyla da ortaya çıkabilmektedir (Hussain ve ark., 2003). Kanser bir dizi karmaşık gelişim mekanizmasına sahiptir. Bu mekanizmalar bir hücrenin normal yaşamsal ve yönetimsel fonksiyonlarının bozulması ile başlayıp, daha komplike özellikler kazanarak ilerlemektedir (Gabriel, 2007). Kanserin kendine has kazanmış olduğu bu özelliklere örnek olarak; proliferatif (büyüme) sinyali sürdürme, büyüme baskılayıcılardan kaçma, immün sistemden kaçınma, invazyon ve metastaz, tümör destekleyici enflamasyon, genomik instabilite ve mutasyon yükü, anjiogenez, sınırsız replikatif aktivite, hücre ölümüne direnç ve enerji metabolizmasının tekrar düzenlemesi verilebilmektedir (Şekil 1.1) (Hanahan ve ark., 2011). Bu özellikler şu şekilde açıklanabilir.

Proliferatif sinyalin sürdürülmesi: Fizyolojik dokularda, hücre bölünmesi aşamasında büyümeyi teşvik eden sinyallerin salınımı çeşitli kontrol mekanizmaları vasıtasıyla düzenlenmektedir. Böylece hücre sayısının homeostazını dolayısıyla normal doku yapısının ve işlevinin korunması sağlanabilmektedir. Ancak kanser hücresi bu sinyalin salınımını kontrol eden mekanizmaları ve ilgili reseptörleri tekrardan düzenleyerek proliferatif sinyalin devamlılığını sağlayabilmektedir (Hanahan ve ark., 2011). Kanser hücreleri, bir dizi alternatif yolla proliferatif sinyallemeyi sürdürme kabiliyetini elde edebilirler: Büyüme faktörü ligandlarını kendileri üretebilirler ve buna aynı kökenli reseptörlerin ekspresyonu yoluyla yanıt verebilirler ve bu da otokrin proliferatif stimülasyonla sonuçlanır. Alternatif olarak, kanser hücreleri, kanser hücrelerine çeşitli büyüme faktörleri sağlayarak karşılık veren "destekleyici tümörle ilişkili" stroma içindeki normal hücreleri uyarmak için sinyaller gönderebilir (Cheng ve ark., 2008).

Büyüme baskılayıcılardan kaçma: Kanser hücrelerinin proliferatif sinyalleri sürdürebilmesinin bir yolu da anti-proliferatif baskılayıcılardan çeşitli yollarla kaçabilmeleridir. Bu amaçla kanser hücreleri proliferasyonun düzenlenmesinde kilit role sahip olan p53, PTEN, Rb, IGF, Notch gibi sinyal yolakları ve genleri hedef almak suretiyle büyüme baskılayıcı faktörlerden kaçarlar (Amin ve ark., 2015). Örneğin bir tür tümör baskılayıcı genin ürünü olan Rb proteini birçok anti-proliferatif sinyal fonksiyonunu kontrol eder. Rb geninde meydana gelen bir delesyon (kayıp) veya mutasyon nedeniyle kontrol mekanizması ortadan kalkar ve hücrelere devamlı proliferasyon sinyali iletilmesi sonucunda hücreler kontrolsüz bölünmeye başlar. Rb geninin kaybı erken çocukluk dönemi Retinoblastoması ile karakterize edilir (Gabriel, 2007).

İmmün sistemden kaçınma: Bağışıklık sistemi, tüm hastalık gelişimi ve metastaza ilerleme süreci boyunca kanser hücreleri ile yakından etkileşime girmektedir. Kanser hücreleri T hücre fonksiyonunu veya sekresyonlarını hedefleme, antijen sunumu, immün baskılayıcı aracıların üretimini değiştirme, tolerans ve immün sapma gibi çeşitli immünolojik süreçlerden yararlanmak suretiyle gelişimlerini olumlu yönde etkileyecek biçimde farklılaşırlar (Vinay ve ark., 2015). Örneğin CD8+ sitotoksik T hücreleri (CTL) ve CD4+ yardımcı T1 (Th) hücreleri interferon-γ (IFN) ve sitotoksin üretimini içeren mekanizmalar vasıtasıyla kanser gelişimini engellemektedirler

(Zamarron ve ark., 2011). Ancak kanser ilerlemesi için gerekli olan kronik inflamasyon süreci bu etkiyi geçersiz kılarak kanserli hücrelerin immün sistemden kaçmasına olanak sağlamaktadırlar (Balkwill ve ark., 2001; Rakoff-Nahoum, 2006). Kanser hücreleri çeşitli yetenekler geliştirerek immün sistemin gözetiminden kaçarlar. Bu özellikler T-hücre fonksiyonunun yeniden düzenlenmesi veya bunların salgılarının hedeflenmesi, antijen sunumu, bağışıklık baskılayıcı aracıların üretimini düzenleme, şeklinde örneklendirilebilir (Vinay ve ark., 2015).

İnvazyon ve metastaz: Fizyolojik şartlarda hücreler birbirleri arasında çeşitli moleküller yardımıyla bağlar oluşturmaktadırlar (Gabriel, 2007). Metastaz süreci ise hücre-hücre bağlanma molekülü olan E-kaderin'in miktarının yeniden düzenlemesi ve hücre morfolojisinin epitelyal formdan mezenkimal forma dönüşmesi ile başlamaktadır. Daha sonra ise bazal laminaya salınan matriks metalloproteinaz (MMPs) enzimi yardımıyla kanser hücreleri kan damarı veya lenfatik sistem yoluyla diğer doku ve organlara yayılıp, koloni oluşturmaktadırlar (Gabriel, 2007).

Tümör destekleyici enflamasyon: Sağlıklı dokularda enflamasyon meydana geldiğinde, adaptif immün sistem harekete geçerek enflamasyonlu hücreleri yutmak veya parçalamak vasıtasıyla dokudan uzaklaştırmaktadır. Aynı mekanizma kanserleşen dokularda da olmasına rağmen gelişen kompleks tümör mikroçevresi bu mekanizmanın işlevsiz hale gelmesine neden olmaktadır. Sonuç olarak, dönüştürülen hücreleri yok etmek yerine anti-tümör immün hücreler pro-survival (sağkalım), pro-migrasyon (göç) ve anti-belirleme faktörlerinin salınmasına öncülük eden immün hücrelerine dönüşmektedirler. Bu koşullar tümörün büyümesine ve metastazına zemin hazırlamaktadır (Hanahan ve ark., 2011). Kanser hücreleri enflamasyon sürecinin kontrolü için sitokinleri ve kemokinleri kodlayanlar dahil olmak üzere çeşitli pro-inflamatuar genlerin ekspresyonunu indükleyen, adaptif immün aktivasyon, stres cevabı oluşturma, metastazı destekleme gibi görevleri yerine getiren NF-κB sinyal yolağını yeniden düzenlemektedirler (Huber ve ark., 2004; Colotta ve ark., 2009; Liu ve ark., 2017).

Genomik instabilite ve mutasyon yükü: Genomik instabilite (kararsızlık), kırılmalar, anormal kromozom sayıları ve yaygın mutasyonlar gibi kromozomal anormalliklere yol açar; bu somatik değişiklikler genellikle proliferasyon ve karsinojenezde önemli olan genleri etkiler (Jorde ve ark., 2019). Birçok kolorektal ve

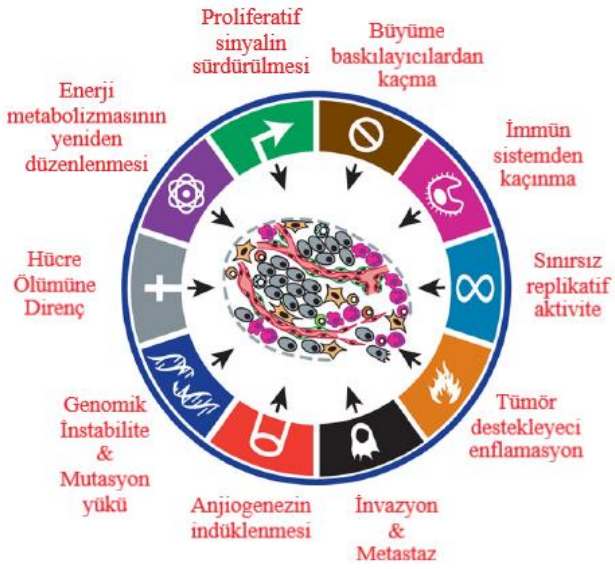
mide kanseri sendromunun, mikrosatellit instabilitesi olarak bilinen kısa tandem tekrar dizilerinin (mikro uydu dizileri) replikasyonunda kusurlara sahip olduğu bilinmektedir. Bu replikasyon hatası, MLH1 ve MSH2 hatalı eşleşme (mismatch) onarım genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır, bu da onkojenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde kansere yol açan bir dizi ikincil mutasyonlara yol açmaktadır (Loeb, 1986).

Anjiogenez: Anjiogenez yeni kan damarı oluşumunu tanımlayan biyolojik bir süreçtir.Tümör dokusu için esansiyel olan bu süreç dokunun gerekli nütrientlere ulaşmasını sağlamasının yanında atıklarını uzaklaştırmasını ve metastaz yapabileceği yeni dokulara ulaşımını sağlamaktadır. Tümör dokusu çeşitli genlerin ekspresyonlarını değiştirmek vasıtasıyla anjiogenez inhibitörlerinin ve indükleyicilerinin ifadelerini değiştirebilir. Örneğin en sık rastlanan değişim anjiogenez geçirecek olan kanserli dokuda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonun artması olarak gösterilebilmektedir (Hanahan ve ark., 1996).

Sınırsız replikatif aktivite: Araştırmalar esnasında kültüre edilen sağlıklı hücreler 60-70 replikasyon geçirir ve dururlar. Sonuçta hücreler bu şekilde büyür, gelişir ve daha sonra ölürler. Ancak kanser hücreleri telomeraz enzimi vasıtasıyla telomerin uzamasını sağlayarak replikatif aktivitenin sınırsız bir şekilde devam etmesine olanak tanımaktadırlar (Gabriel, 2007).

Hücre ölümüne direnç: Apoptozis dokuların yapımı, bakımı ve onarımı için gerekli olan, yüksek özgüllük ve verimlilikle, yanlış yerleştirilmiş veya hasar görmüş hücrelerin intiharına neden olabilen fizyolojik hücresel ölüm modudur (Meier ve ark., 2000). Kanser hücreleri belirli genomik değişiklikler nedeniyle pro-apoptotik bileşenler ile anti-apoptotik bileşenler arasındaki dengenin bozulması sonucu apoptozis gibi hücre ölüm modlarına karşı direnç geliştirirler. Örneğin genomun bekçisi olarak adlandırılan ve DNA hasarını algılayarak pro-apoptotik bir düzenleyici görevi gören p53 geninde meydana gelen mutasyon veya kayıp nedeniyle kanser hücreleri apoptozise karşı direnç geliştirebilmektedirler (Gabriel, 2007; Toufektchan ve ark., 2018).

Enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi: Tümör hücresel metabolizmasının en çarpıcı değişikliklerinden bazıları arasında glikoliz artışı, glutaminoliz akışında artış, amino asit ve lipid metabolizmasının yukarı regülasyonu, mitokondriyal biyogenezin geliştirilmesi, pentoz fosfat yolağının indüksiyonu ve makromolekül biyosentezi yer almaktadır (Phan ve ark., 2014).



Şekil 1.1: Kanserin özellikleri (hallmarkları) (Hanahan ve ark., 2011)

Kanserli hücreler bu on temel özellik ile sağlıklı hücrelerden ayrılabildikleri gibi, karakteristik davranışlarının temelleri de bu özellikler vasıtasıyla oluşmaktadır. Son olarak 2020 yılında yayımlanan verilere göre dünya genelinde her iki cinsiyet için meme kanseri görülme sıklığı birinci sırada yer alırken, akciğer kanseri ikinci sırada ve kolon kanseri ise üçüncü sırada yer aldı. Erkeklerde ise başı 1.5 milyon yeni vaka oranı ile akciğer kanseri çekerken, kadınlarda ise bu alanda 2.2 milyon yeni vaka ile meme kanseri göze çarpmaktadır (Ferlay ve ark., 2020).

1.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri onkolojide geç evre tanısı (Hirsch ve ark., 2017) ve spesifik genomik kararsızlık (instabilitasyon) ile karakterize edilen bir hastalık olmakla birlikte yüksek oranda çevresel karsinojenlere, sigara dumanına ve radyasyona maruziyetten kaynaklanmaktadır. Özellikle küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)'nin etiyolojisi güçlü bir şekilde sigara dumanı ile ilişkilidir (Weber, 2007). Akciğer kanserindeki genomik kararsızlığın altında yatan ana moleküler mekanizma ise siklinler, siklin bağımlı kinazlar, tümör baskılayıcılar ve onkogenleri de içeren kusurlu hücre döngüsü

kontrolüdür. Anormal çalışan DNA tamir mekanizmaları da bu durumu desteklemektedir (Soca-Chafre ve ark., 2019). Akciğer kanseri türleri histolojik açıdan Küçük hücreli karsinom ve Küçük hücreli olmayan karsinom olmak üzere ikiye ayrılır.

1.1.1. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinom (KHOAK)

Küçük hücreli olmayan akciğer karsinom (KHOAK) sıklıkla ileri evre metastatik hastalık olarak tespit edilebilmektedir. Erken evrelerde gözlenen vasküler invazyon da nükslere ve kötü sağkalım profiline neden olmaktadır. KHOAK'lar tüm akciğer kanser vakalarının yaklaşık %85'ini kapsamaktadırlar (Soca-Chafre ve ark., 2019). Üçe ayrılır;

• Adenokarsinoma: Akciğer adenokarsinomunun baskın histolojik paternleri arasında aciner, solid, papiller ve bronşioloalveolar yapılar bulunmaktadır. Akciğer adenokarsinom hücreleri, sitokeratin 7 ve 20'yi yüksek oranda eksprese etmektedirler. Tüm küçük hücreli olmayan KHOAK'ların %50'sini oluşturmaktadırlar. Adenokarsinoma cinsiyet, yaş, sigara alışkanlığından bağımsız olarak oluşabilmektedir (Soca-Chafre ve ark., 2019; Weber, 2007).

• Skuamöz hücreli karsinom: KHOAK vakalarında %30-40 oranlarında gözüken Skuamöz hücreli karsinom sigara kullanımı ile doğrudan ilişkilidir (Soca-Chafre ve ark., 2019).

• Büyük hücreli karsinom: KHOAK vakalarında %10-20 oranlarında gözüken Büyük hücreli karsinom sigara kullanımı ile doğrudan ilişkilidir (Soca-Chafre ve ark., 2019).

1.1.2. Küçük Hücreli Akciğer Karsinom (KHAK)

Küçük hücreli akciğer kanseri, minimal sitoplazmalı, nükleolleri olmayan ve değişken derecelerde nekrozlu küçük hiperkromatik hücreler ile karakterizedir. Tüm birincil akciğer kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur. Ayrıca KHOAK'lar ile karşılaştırıldığında KHAK'lar daha agresif bir hastalık profili izlerler (Weber, 2007).

1.2. Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Akciğer kanseri gelişimi boyunca özellikle büyümeyi teşvik edici yolakların aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonu için birçok genetik ve epigenetik değişiklik meydana gelmektedir (Cooper ve ark., 2013). Akciğer kanseri tüm kanser türleri içerisinde en fazla sayıda genetik anormallik barındıran kanser türüdür (Larsen

ve ark., 2011). Akciğer kanseri, yüksek sıklıkta meydana gelen nispeten az sayıda tekrarlayan mutasyon ve bol miktarda genetik çeşitlilik ile karakterize edilir. Bununla birlikte, genetik değişiklikler genellikle ortak bir onkojenik sinyal yolağı grubunu etkiler. Birçok akciğer kanseri vakasında karakteristik olarak gözüken KRAS, EGFR, BRAF, MEK, MET ve HER2 mutasyonları bulunurken, bu mutasyonlarla ilişkili olarak PI3K/AKT/mTOR, ALK, ROS1, RET ve FGFR1 sinyal yolakları da akciğer kanseri gelişimi (progresyonu) yönünde yeniden düzenlenmektedir. Ayrıca akciğer kanserinde karakteristik olarak TP53, RB1, LKB11 ve p16/CDKN2A gibi tümör baskılayıcı genlerinin mutasyonları sonucu onkojenik aktivite göstermesi de tümörijenezi destekler niteliktedir (Cooper ve ark., 2013).

KRAS, proto-onkogen olan RAS ailesinin bir üyesidir ve G-proteinini kodlamak suretiyle sinyal iletiminde kritik bir rol üstlenmektedir. Özellikle proliferasyon, farklılaşma ve sürvi (hayatta kalma) ile ilişkili sinyal yolakları üzerinde etkilidir (Downward, 2003). KRAS mutasyonları Skuamöz hücreli karsinom ve Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunda nadiren gözlenirken, Adenokarsinoma vakalarında yaygın şekilde saptanan mutasyon çeşididir (Rodenhuis ve ark., 1992; Ding ve ark., 2008; Sequist ve ark., 2011; Rekhtman ve ark., 2012; Yip ve ark., 2013).

EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) bir transmembran glikoproteinidir. EGFR birçok farklı ligandı aktive etmektedir. Örnek olarak epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme büyüme faktörü-alfa (TGF-α), heparin bağlayıcı EGF benzeri büyüme faktörü (HBEGF) verilebilmektedir (B. Singh ve ark., 2016). EGFR tarafından uyarılan sinyal iletimi, PI3K / AKT / mTOR, RAS / RAF // MAPK ve JAK / STAT sinyal yolakları aracılığıyla gerçekleşmektedir (Scagliotti ve ark., 2004; Sordella ve ark., 2004). EGFR mutasyonu proliferasyon, sağ kalım, farklılaşma, neovaskülarizasyon, invazyon ve metastaz gibi karsinogenezde etkili birçok onkojenik fonksiyonun düzenlenmesini sağlamaktadır (Yarden ve ark., 2001; Sordella ve ark., 2004).

BRAF, KRAS'ın aşağı yönde efektör proteini olan bir serin / treonin protein kinazı kodlar ve hücre proliferasyonunun ve hayatta kalmanın düzenlenmesinde yer alan MAPK sinyal iletim yolunu etkinleştirmektedir. BRAF mutasyonu klinikte özellikle yaygın şekilde melanoma vakalarında gözlenirken (Davies ve ark., 2002), Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu vakalarında %3 oranında gözlenmektedir

(Brose ve ark., 2002; Naoki ve ark., 2002; Schmid ve ark., 2009; Marchetti ve ark., 2011; Paik ve ark., 2011).

MEK1, ayrıca mitojenle aktive olan protein kinaz 1 (MAP2K1) olarak da bilinir, MAP2K / STE7 kinaz ailesinin çift özgüllüklü bir kinazıdır (Dérijard ve ark., 1995). Nispeten nadir gözlenen MEK1 mutasyonu hücre proliferasyonunu, farklılaşmayı ve dönüşümü teşvik ederek karsinogeneze katkıda bulunur (Cowley ve ark., 1994; Mansour ve ark., 1994).

Bir proto-onkogen olan MET, hepatosit büyüme faktörü reseptörü olarak da bilinen bir membran tirozin kinaz reseptörünü kodlar (Sadiq ve ark., 2013). MET mutasyonu tümör başlatılması, ilerlemesi ve terapötik direnç kazanımında rol oynayarak karsinogenezde önemli bir rol üstlenmektedir (Tovar ve ark., 2017).

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2 / ERBB2) geni, EGFR ile birlikte ERBB reseptör ailesinin bir üyesi olan zara bağlı reseptör tirozin kinazı kodlar (Tzahar ve ark., 1996). HER2, proliferasyon, survi ve farklılaşma mekanizmaları vasıtasıyla karsinogeneze katkıda bulunmaktadır (Sun ve ark., 2015).

PI3K/AKT/mTOR yolağı hücrede hareketlilik, adezyon, farklılaşma, sağ kalım ve proliferasyon ile ilişkili olan önemli bir sinyal iletim yolağıdır (Cully ve ark., 2006; Engelman ve ark., 2006). Bu sinyal yolundaki değişimler hem KHOAK hem de KHAK da gözlenmektedir (Brognard ve ark., 2001; Tsurutani ve ark., 2005). Gerçekleştirilen çalışmalar gösteriyor ki akciğer kanseri ve diğer birçok kanser türünde çeşitli somatik mutasyonlar vasıtasıyla bu sinyal yolağı farklılaşmaktadır (Yuan ve ark., 2008; Li ve ark., 2014). PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının malignant transformasyonu sonucu kanserli hücrelerde büyüme, metabolik aktivite, proliferasyon ve metastaz süreçleri desteklenmektedir (Gomez-Pinillos ve ark., 2012). Ayrıca bunlara ek olarak bu sinyal yolağının aktivasyonunun tedaviye direnci desteklediğini ve kötü prognostik belirteç özelliği gösterdiği rapor edilmiştir (Kandoth ve ark., 2013).

Tümör baskılayıcı genler, normal hücre büyümesinin oldukça önemli negatif düzenleyicileridir. Tümör baskılayıcı gen (TBG) işlevinin kaybı, kanser oluşumunun önemli bir mekanizmasıdır. Bu süreç Knudson'un iki başarılı hipotezinde de belirtildiği gibi, her iki gen allelinin de inaktivasyonunu gerektirmektedir. Akciğer kanserinde, sıklıkla inaktive edilen TBG'ler arasında TP53, retinoblastoma 1 (RB1), serin-treonin

kinaz 11 (STK11), CDKN2A, FHIT, RASSF1A ve PTEN bulunmaktadır (Knudson, 1993; Raso ve ark., 2007; Ding ve ark., 2008).

En önemli TBG'lerin başında gelen TP53, DNA'nın hasar alması durumunda hücre döngüsüne müdahale ederek döngünün durmasını sağlamaktadır. DNA'nın tamir edilmesi veya hücresel ölüm yolunun (apoptozis) tetiklenmesini sağlamak suretiyle hücrenin genetik materyalinin stabilitesini sağlamaktadır (Gabriel, 2007; Vousden ve ark., 2007). TP53 genindeki yanlış anlam (missense) mutasyonları, insan kanserlerinde son derece yaygındır ve tümör baskılayıcı aktivitelerini kaybeden mutant p53 proteinlerine yol açmaktadır. Kanser hücreleri p53 mutasyonlarına sahip olarak invazyon, metastaz ve kemo-direnç gibi çeşitli seçici avantajlara sahip olabilmektedirler (Mantovani ve ark., 2019). Küçük hücreli karsinomların %90'nında ve KHOAK vakalarının yaklaşık %65'inde TP53 mutasyonu gözlemlenmektedir (Wistuba ve ark., 2000).

PTEN birçok kanser türünde inaktive edilen önemli bir tümör baskılayıcı gendir (Milella ve ark., 2015). PTEN'in TSG fonksiyonunun inaktivasyonu, ligand bağlanmasından bağımsız olarak AKT / protein kinaz B'nin sınırsız aktivasyonuna yol açmaktadır (Cully ve ark., 2006). PTEN mutasyonu nadiren %5 oranında KHOAK vakalarda gözlemlenirken (Jin ve ark., 2010), sigara tüketimi ile doğrudan ilişkili olan Sukamöz hücreli karsinomada %10.2 ve adenokarsinomada %1.7 oranlarında gözlemlenmektedir (Marsit ve ark., 2005).

Retinoblastoma geni (RB1), hücre döngüsü ilerlemesinde önemli bir rol oynayan retinoblastoma (RB) cep proteinini kodlamaktadır (Bhateja ve ark., 2019). RB1 akciğer kanserinde tanımlanmış ilk TBG olma özelliğine de sahiptir (Harbour ve ark., 1988) ve küçük hücreli akciğer karsinomlarının yaklaşık %90'ında inaktive olur, ancak KHOAK'ın yalnızca yaklaşık %10-15'inde inaktive olduğu gözlemlenmiştir (Larsen ve ark., 2011).

Ek olarak, akciğer karsinogenezinde gözlenen epigenetik değişiklikler üç ana kısımda incelenebilir: anormal DNA metilasyon paterni (hiper ve hipometilasyon), histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA düzenlemesi.

Akciğer kanseri dokusunda hipometilasyon kendini şu şekilde gösterir: (i) onkogenlerin promotör bölgelerinin demetilasyonu; (ii) genomdaki küresel metilsitozin

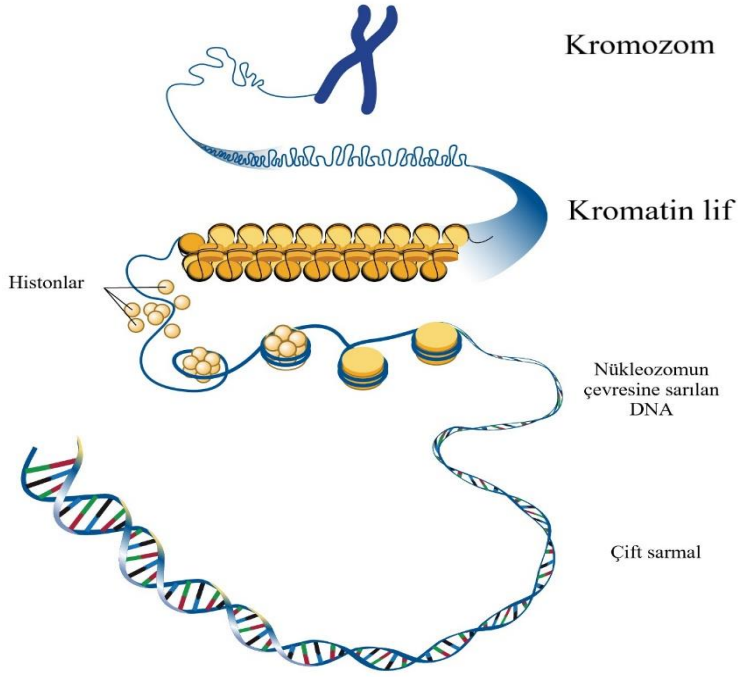
miktarının azalması; (iii) fizyolojik koşullar altında yoğun şekilde metillenmiş olan tekrarlayan DNA'nın demetilasyonu; (iv) genomun hareketli elemanlarının (transpozonlar)- örneğin LINE dizilerinin - artan transkripsiyonu ve silmelere ve translokasyonlara yol açan mitotik rekombinasyondaki ilişkili artış (Brzeziańska ve ark., 2013). Hipometilasyona örnek olarak BORIS geni verilebilir; tümör büyümesinde ve apoptosisin düzenlenmesinde rol oynayan BORIS geni akciğer kanserinde hipometillenmektedir (Renaud ve ark., 2007; Fiorentino ve ark., 2011).

Akciğer kanseri dokusunda gen promotörlerinin hipermetilasyonu, sıklıkla tümör baskılayıcıların transkripsiyonel susturulması ile ilişkilidir. Bu sürecin karsinogenezin başlamasına ve ilerlemesine yol açtığına inanılmaktadır (Chen ve ark., 2003). Çok sayıda çalışma, akciğer kanserinde erken tanı belirteci ve tedavi için bir öngörücü olarak promotör hipermetilasyonunun olası klinik yararlılığını öne sürmüştür. Akciğer kanseri tanımlaması ve farklılaşması için çeşitli belirteç panelleri öneren birkaç çalışma mevcuttur.

Dinamik histon modifikasyonları – gen promotör metilasyonu ile iş birliği içinde –kromatin konformasyonunun modülasyonunda ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik rol oynar. Akciğer kanseri de dahil olmak üzere kanser hücrelerinde, transkripsiyonel olarak bastırılmış tümör baskılayıcı genlerin promotör CpG adalarının hipermetilasyonu, histon işaretlerinin belirli bir kombinasyonu ile ilişkilidir, örneğin H3 ve H4 histonlarının deasetilasyonu, histon H3 lisin 4 (H3K4) trimetilasyonunun kaybı, ve H3K9 ve H3K27 trimetilasyon kazancı (Jones ve ark., 2007; Shikhar, 2010).

Nükleozomun ökaryotik hücrelerde kromatin yapısının temel birimi olarak ilk kez tanımlanmasından bu yana çeyrek yüzyıl geçti. İlerleyen süreçte gerçekleştirilen çalışmalar sonucu nükleozomun genomik fonksiyonun önemli bir belirleyicisi olduğu anlaşıldı. İzole edilmiş nükleozom çekirdek partikülü, etrafına 146 baz DNA çifti sarılmış H2A, H2B, H3 ve H4'ün her birinin iki kopyası olan bir oktamer yapısı içerir. Bu yapı hemen hemen tüm ökaryotlarda aynıdır. Nükleozomlar genetik materyalin sıkıca kromatin lifleri şeklinde paketlenmesini sağlayarak kromozom yapısını meydana getirmektedir (Şekil 1.2) (Turner, 2000). Heterokromatin ve ökromatin, kromatin üst yapısının iki ana alt segmentidir. Heterokromatin yoğun kromatin yapısına sahiptir ve

transkripsiyon için aktif değildir, ökromatin ise gevşek kromatin yapısına sahiptir ve transkripsiyon için aktiftir (Murakami, 2013).



Şekil 1.2: Kromozomun açık yapısı (Anonim, 2021)

Histon asetilasyonu, bir asetil grubunun lizine kovalent eklenmesini içerir. -NH2 grubu nedeniyle, lizin normalde pozitif yüklü bir amino asittir ve negatif yüklü DNA molekülüne güçlü bir şekilde bağlanır. Asetil grubunun eklenmesi bu pozitif yükü nötralize eder ve dolayısıyla histonlar ve DNA arasındaki bağlanmayı azaltır, bu da transkripsiyonel aktiviteyi arttırıcı bir etkiye neden olur. Histon asetilasyonu bu nedenle transkripsiyonel aktivasyona yol açar. Histon asetilasyonuna, üç alt aileye ayrılan histon asetil transferaz (HAT) enzimleri aracılık eder: GNAT, MYST ve p300/CBP (Elmore, 2007).

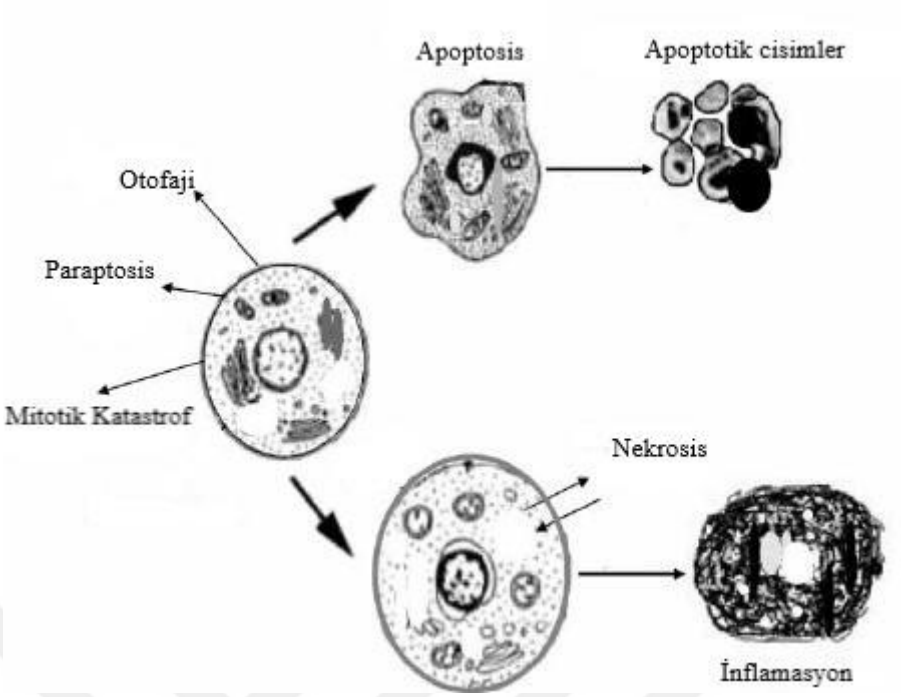
1.3. Akciğer Kanseri Tedavisi

Önemli bir halk sağlığı sorunu olan akciğer kanserinin tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immunoterapi ve hedefe yönelik tedaviler kullanılmaktadır (Lemjabbar-Alaoui ve ark, 2015). Akciğer kanseri tedavisinde sıklıkla birkaç tedavi çeşidinin kombinasyonu uygulanmaktadır. Radyoterapi ve kemoterapinin (radyokemoterapi) birlikte kullanılması buna bir örnektir. Radyokemoterapi tedavisi

cerrahi operasyonun öncesi (neoadjuvant terapi) veya onu takiben (adjuvant terapi) uygulanabilmektedir. Ayrıca akciğer kanseri tedavisinde son dönemde hedefe yönelik tedavi ve immunoterapi uygulamaları da sıkça kullanılan alternatif tedavi seçenekleri arasındadır (Lemjabbar-Alaoui ve ark., 2015). Akciğer kanserinin iki ana alt tipini oluşturan küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHOAK) arasındaki fizyolojik farklar tedavinin de farklılaşmasını sağlamaktadır. Ayrıca diğer birçok kanser türünde de olduğu gibi akciğer kanserinde de tedavinin çeşidi ve şekli, hastalığın evresi ile direkt olarak ilişkilidir. KHOAK daha az agresif bir profile sahip olmasının yanında geç evre tanısı ile karakterizedir. KHOAK vakalarının sadece %25 lik dilimi evre 1 ve 2 de saptanabilmektedir. Evre 1 ve 2 de saptanan akciğer kanseri vakaları için öncelikli tedavi yöntemi cerrahi operasyon ve adjuvant tedavi seçenekleridir. Daha geç evrelerde saptanan akciğer kanseri vakalarında ise tipik olarak kemoterapi ve radyoterapi tedavileri tercih edilmektedir (Duma ve ark., 2019; Anonim, 2020).

1.4. Hücre Ölümü

Hücre ölümü, biyolojik bir hücrenin işlevlerini yerine getirmeyi bırakması durumunu ifade eder. Bu, eski hücrelerin ölmesi ve yenilerinin yerini alması gibi doğal bir sürecin sonucu gerçekleşebilir veya hastalık, bölgesel yaralanma, hücrelerin parçası olduğu organizmanın ölümü gibi faktörlerden kaynaklanabilir (Kierszenbaum, 2015). Farklı hücre ölümü türleri genellikle morfolojik kriterlerle tanımlanır ve apoptotik, nekrotik, otofajik veya mitotik katastrof (felaket) ile ilişkili olarak sınıflandırılır (Şekil 1.3) (Duprez ve ark., 2009).



Şekil 1.3: Hücresel ölüm yolakları (Burz ve ark., 2009)

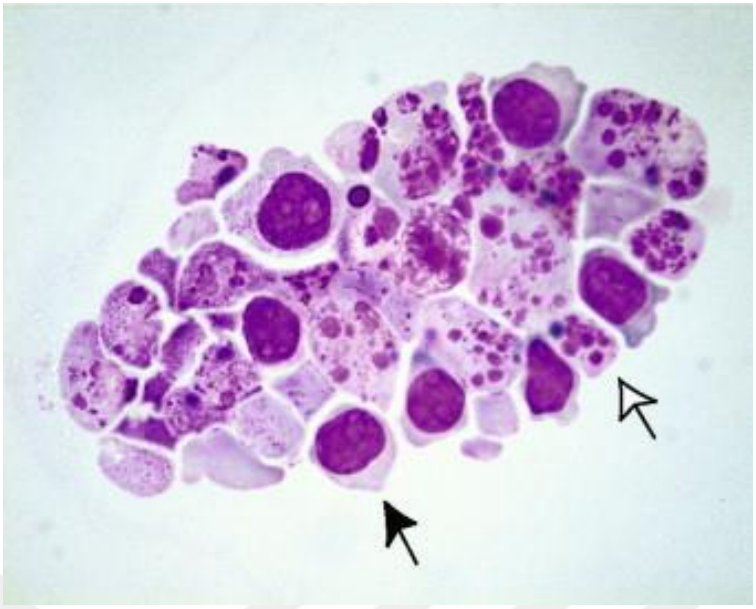
1.5. Apoptosis

Apoptozis, bir diğer ifade ile programlanmış hücre ölümü dokuların bakımı ve onarımı için gerekli olan, yaşlanmış, hasar görmüş hücrelerin yok edilmesini sağlayan fizyolojik bir süreçtir. Hücreler yaşlandıklarında, DNA'larında mutasyon meydana geldiğinde, zarar görüp işlevlerini yerine getiremeyecek bir forma girdiklerinde doku bütünlüğünün (homeostazisi) korunması amacıyla apoptozis sürecini başlatırlar (Meier ve ark., 2000). Apoptozis mekanizmasının bozulması ise birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin apoptozis sürecinin sekteye uğraması kanser ve restenosis gibi hücrelerin aşırı bölünmesinden kaynaklanan hastalıklara neden olurken, apoptozis'in kontrolsüz artması çeşitli fizyolojik hücrelerin anormal ölümlerine neden olmakta ve AIDS gibi otoimmün, Alzhiemer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların oluşmasına öncülük etmektedir (Favaloro ve ark., 2012).

Apoptozisi diğer hücre ölüm tiplerinden ayıran en önemli özelliği süreç sonunda oluşan apoptotik morfolojidir. Hücre küçülür (cell shrinkage), hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır (chromatin aggregation) ve kondanse olur (chromatin condensation), hücre membranı bütündür (intakt) ve üzerinde küçük cepcikler (membrane blebs) oluşur. Daha sonra hücre küçük cisimciklere (apoptotic

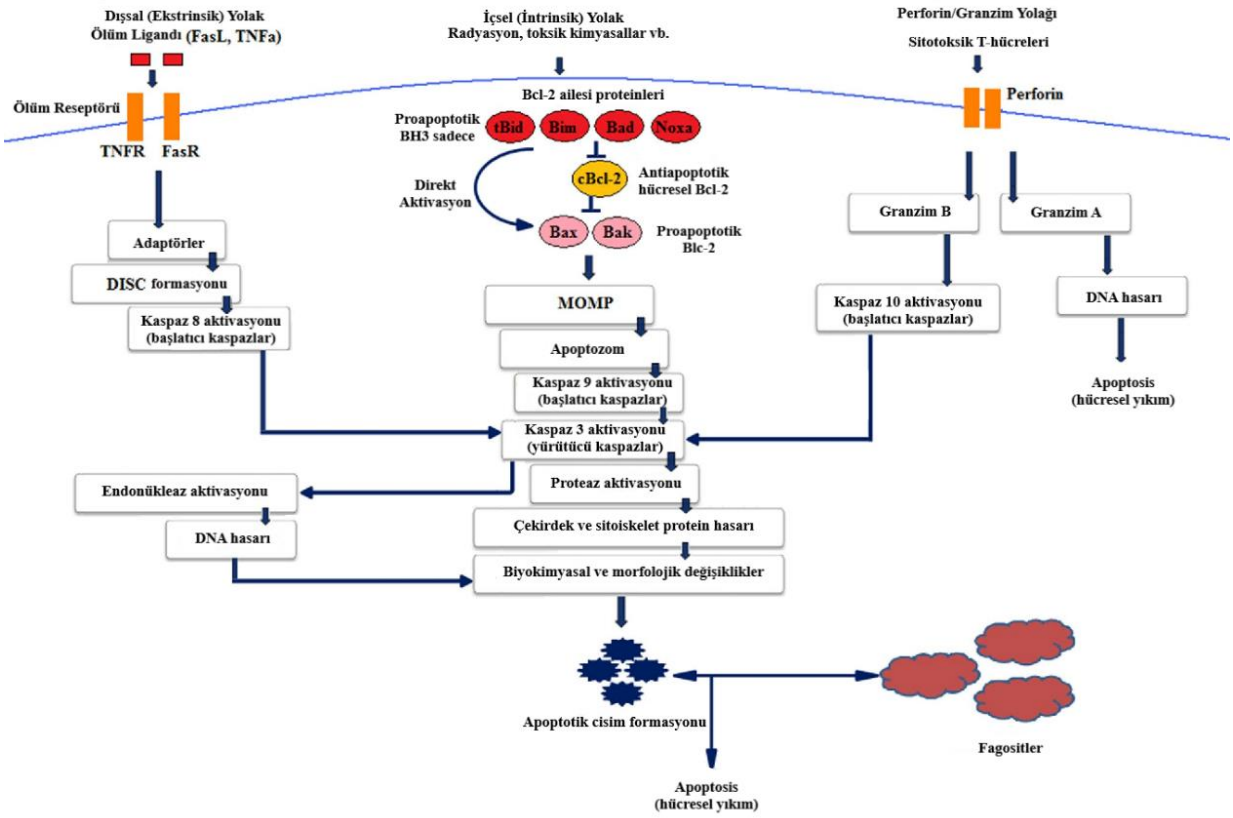
bodies) parçalanır. Apoptotik cisimcikler değişen miktarlarda hücresel komponent ve nukleus içermektedir (Hacker, 2000) (Şekil 1.3, Şekil 1.4).

Apoptozis sürecinin erken belirteçlerinden biri hücre membranının iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin (PS) moleküllerinin dış yüzüne transloke olmasıdır (Fadok ve ark., 1998). Gerçekleşen bu translokasyon bir tür "ye beni (eat me)" sinyali olarak işlev görmektedir. Anneksin-V proteini apoptozis esnasında hücre membranının dışına transloke olan PS ile yüksek özgüllükte etkileşime girme eğilimi göstermektedir. Anneksin-V ile floresan ışıma yapan FITC gibi bir madde bağlanarak bir kompleks oluşur, bu şekilde Anneksin-V ve PS etkileşimi ile apoptozisin yüzdesi nicel olarak belirlenebilmektedir. Apoptozis birçok proteinin uyum içerisinde çalışmasını gerektiren bir süreçtir. Bu proteinlerden kaspazlar en önemlileridir. Kaspazlar, apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesine ve yürütülmesine aracılık eden, yüksek oranda korunmuş sisteine bağımlı aspartata özgü asit proteazlar ailesidir (Salvesen ve ark., 1997; Lavrik ve ark., 2005). Kaspazlar birçok hücrede inaktif formda pro-kaspaz olarak bulunurlar ve bir kez aktive edildiklerinde bir kaspaz kaskadının başlamasına neden olurlar. Bu proteolitik kaskad apoptotik sinyali güçlendirir ve hızla hücre ölümüne gidilir (Elmore, 2007). Bugüne kadar birçok kaspaz tanımlanmıştır. Bu kaspazlar 3 ana gruba ayrılabilir; başlatıcı (initiators) kaspazlar 2-8-9-10, efektör (effector/executioners) kaspazlar 3-6-7 ve inflamatuar kaspazlar 1-4-5 (Martin, 2014). Kaspazların aktivitesi apoptosis proteinlerinin inhibitörleri (IAPs) tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Çeşitli hücresel protein aileleri de apoptosis sürecinin düzenlenmesi ile yakından ilişkili olup, farklı aşamalarda rol almaktadırlar. Bu proteinlere Bcl-2 ailesi, TNF ailesi ve p53 proteini örnek olarak verilebilmektedir (Chowdhury ve ark., 2006).



Şekil 1.4: HL60 hücreleri. Bozulmamış bir çekirdeğe sahip normal hücre—siyah ok. Yoğunlaşmış parçalanmış çekirdeğe sahip apoptotik hücre-beyaz ok. (Doonan ve ark., 2008)

Apoptozis mekanizması birçok biyokimyasal olayın gerçekleştiği ve çeşitli moleküllerin kaskad oluşturduğu bir sisteme sahiptir. Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalar iki ana apoptosis mekanizmasının varlığını ortaya koymaktadır. Bunlar dışsal (extrinsic) ve içsel (intrinsic) yolaklardır (Elmore, 2007). Bununla birlikte, iki yolun bağlantılı olduğuna ve bir yoldaki moleküllerin diğerini etkileyebileceğine dair kanıtlar rapor edilmiştir (Igney ve ark., 2002). Ek olarak perforin-granzim yolağıda bulunmaktadır. Bu yolak granzim B veya granzim A vasıtasıyla apoptosisi başlatabilmektedir. Ancak nihai olarak Dışsal, İçsel ve Perforin/Granzim yolakları ortak bir noktada birleşirler (Şekil 1.5).



Şekil 1.5: Apoptozis mekanizması (Siddiqui ve ark., 2015)

1.1.3. Dışsal Yol (Ekstrinsik Yol)

Apoptozisi başlatan dışsal sinyal yolakları, transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içermektedir. Bunlar, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör geni süper ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörlerini içermektedir (Locksley ve ark., 2001). TNF reseptör ailesinin üyeleri "ölüm alanı" olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik alana sahiptir. Bu ölüm alanı, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde kritik bir rol oynar (Elmore, 2007). Bugüne kadar, en iyi karakterize edilmiş ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri arasında FasL / FasR, TNF-α / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 ve Apo2L / DR5 bulunmaktadır (Peter ve ark., 1998; Ashkenazi ve ark., 2016). Ölüm aktivatörü olarak görev yapan FasL ile TNF-α (Tümör nekroz faktör α) nın etkileşimi sonucu pro-kaspaz 8, kaspaz 8'e dönüşür ve kaspaz kaskadı başlamış olur. Bu kaskad'da başlangıçta yer alan pro-kaspaz 8 ve 10 DISC (Death initiation signal complex) kompleksini oluşturmak için ilgili adaptör proteinlere etkileşime geçerler. Oluşan bu kompleks kaspaz 8 ve 10'u aktive eder.

Kaspaz 8 ve 10 lar, efektör kaspazları (3-6-7) aktive ederler ve kaspaz kaskadı başlamış olur (Elmore, 2007).

1.1.4. İçsel Yol (İntrinsik/Mitokondriyal yol)

İçsel apotozis yolu özellikle onkojenik hücre ölümü, ER stresi, genotoksik hasar, mitokondriyal hasar gibi ekstrem koşullarda veya büyüme faktörlerinin yokluğunda aktive olmaktadır (Singh ve ark., 2019). BCL-2 protein ailesi pro-apoptotik ve anti-apoptotik fonksiyonu bünyesindeki proteinlerde bulundurmaktadır. BCL-2'ler içsel yolda merkezi düzenleyici proteinler olup hücrenin apoptozis sürecine girip, girmeyeceğini belirleme noktasında etkindir (Toit, 2013). Mitokondri iç membranında bulunan elektron transport proteini olan sitokrom c'nin mitokondrinin dışına salınması bir apoptozis sinyalidir. Salınan sitokrom C, kaspaz-9 ve Apaf-1 ile etkileşime girerek bağlanır ve bu yapıya ATP'nin de katılması ile birlikte apoptozom yapısı meydana gelir ve kaspaz kaskadı bu şekilde başlamış olur (Elmore, 2007).

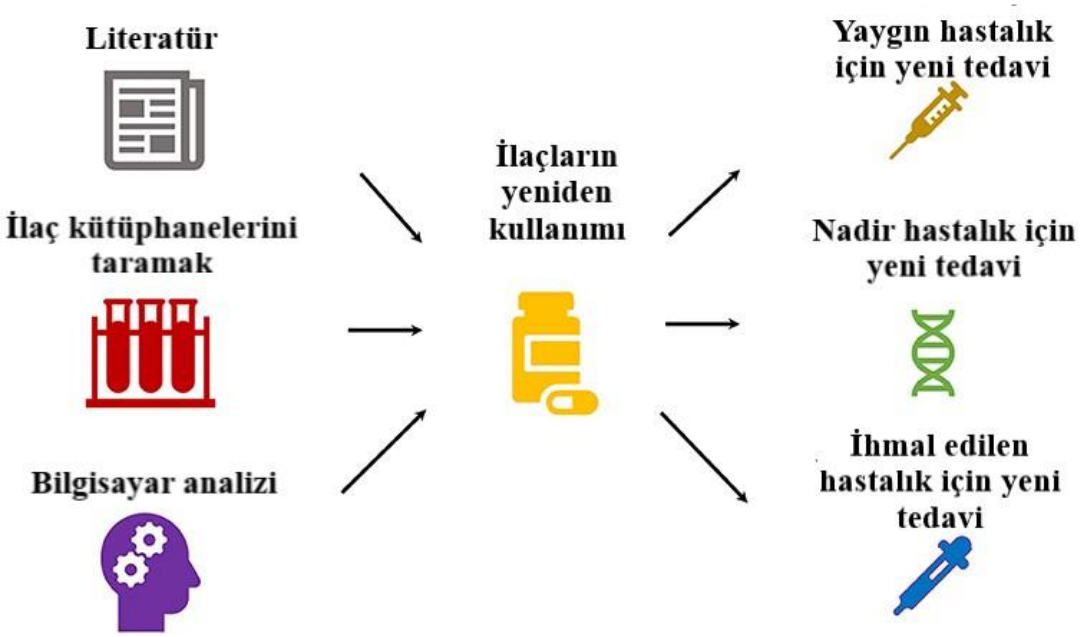
1.6. Nekrozis

Nekrozis, kitlesel, pasif ve programsız hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Nekrozis genel olarak hücre ATP'sinin katastrofik miktarda tükenmesi, toksik koşullara maruz kalması veya fiziksel bir hasar görmesi sonucu gözlenmektedir (Edinger ve ark., 2004). Nekrozis'i, apoptosis ile karşılaştırarak tanımlamak daha doğru bir yaklaşımdır. Apoptosis'in tersine nekrozisde spesifik bir morfoloji tanımlanmamaktadır. Nekrozis'de hücre içine sıvı girmesi ile hücre şişer (cell swelling), Kromatin paterni normal hücredeki görüntüye benzer, hücre membran bütünlüğünü kaybettiğinden dolayı ortama salınan hücresel komponentler inflamasyonun uyarılmasına neden olmaktadır (Elmore, 2007).

1.7. İlaçların Yeniden Kullanımı (Drug Repurposing)

Teknolojideki ilerlemelere ve insan hastalıklarına ilişkin gelişmiş bilgi birikimine rağmen, bu faydaların terapötik ilerlemelere çevrilmesi beklenenden çok daha yavaş olmuştur (Ashburn ve ark., 2004; Scannell ve ark., 2012). Bu durum birçok hastanın yaşamını olumsuz etkilemektedir. Bilim dünyasında ise yeni tedavilerin geliştirilmesi gibi hem yüksek maliyetli hem de vakit alan çalışmaların oluşturduğu olumsuz koşullar, bilim insanlarını alternatif çözümler aramaya teşvik etmektedir

(Pushpakom ve ark, 2018). Bu noktada mevcutta klinikte kullanılan ilaçların tekrar kullanımları (Drug Repurposing) ön plana çıkmaktadır. Bir ilacın yeniden kullanımı, halihazırda bir hastalığın tedavisi için kullanılan ve çeşitli güven kuruluşları tarafından onay almış ilaçların, farklı hastalıkların tedavisi amacıyla araştırılması ve süreç sonunda ilgili hastalıkta klinikte kullanılmasını tanımlayan bir ifadedir (Şekil 1.6). İlaçların yeniden kullanımının sağlamış olduğu çeşitli avantajlar bulunmaktadır. En önemli avantajlarından biri ilacın hasta üzerinde oluşturacağı risk oranıdır. Zaten klinik veya pre-klinik testleri, deneyleri gerçekleştirilip piyasada kullanıldıkları için risk oranları muhtemel geliştirilecek yeni bir ilaca kıyasla daha düşük olacaktır. İkinci bir avantaj olarak süre örnek verilebilir. Yeni bir ilaç geliştirileceği zaman ilacın laboratuvar ortamında (in vitro), deney hayvanı modellerinde (in vivo), pre-klinik (faz 1,2,3,4) çalışmalarda test edilmesi gerekmektedir. Ancak bir ilacın yeniden kullanımında bu gibi aşamalar zaten gerçekleştirildiği ve FDA (Food Drug Administration) gibi kuruluşlar vasıtasıyla güvenlikleri tescillendiği için büyük bir vakit kazancı sağlanmaktadır. Bir diğer avantaj ise maliyettir. Yeni bir ilaç geliştirmek için gerekli olan araştırma-geliştirme, ön testler ve deneylerin maliyeti oldukça yüksek bedellere denk gelmekteyken, bir ilacın yeniden kullanımı bazı proseslerin zaten gerçekleştirilmiş olmasından dolayı oldukça düşük maliyetli olabilmektedir (Breckenridge ve ark., 2018; Pushpakom ve ark., 2018).



Şekil 1.6: İlaçların yeniden kullanımı (Mourenza, 2021)

Valproik asit (VPA) antiepileptik etkisinin kanıtlandığı günden itibaren uzun yıllar boyunca klinikte epilepsi ilacı olarak kullanılmıştır (Genton ve ark., 2006). 1999 yılında VPA'nın kanser alanında ilk klinik denemeleri başlatılmış, daha sonra ise çeşitli lösemiler ve solid tümör dokularında klinik olarak etkisi araştırılmış ve anti-kanser etkisi kanıtlanmıştır (Anonim, 2021). VPA bir epigenetik ajan olarak histon deasetilaz inhibitörü görevini üstlenmektedir. VPA'nın bu fonksiyonu anti-kanser etkisinin ana mekanizmasını oluşturmaktadır (Hanahan ve ark., 2011; Anonim, 2021). Ayrıca VPA'nın belirli doz aralığında (1-10 mM) küçük hücreli akciğer kanseri hücre soylarında proliferasyonu baskıladığı rapor edilmiştir (Platta ve ark, 2008).

Diğer bir umut vadeden örnek ise Spironolaktondur (SP). Spironolakton potasyum tutucu diüretik bir ajan olmasının yanında klinikte kalp ve kardiovasküler hastalıklarda, adrenal hiperplasia, hipertansiyon ve nefrotik sendromlarda kullanılan bir ilaçtır (Anonim, 2021). Son yıllarda anti-kanser etkisi araştırılan Spironolakton'un serviks kanseri (HeLa) hücrelerinden elde edilmiş kanser kök hücrelerinin (KKH) DNA hasar yanıtını bozmak suretiyle büyümelerini engellediği rapor edilmiştir.

2. MATERYAL & METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler

%0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, İngiltere

Asetik asit, Isolab, Almanya

Bovine Serum Albumin, Sigma, ABD

Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma, ABD

Fetal sığır serumu (FBS), Wisent Bioproducts, Kanada

Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco, İngiltere

Glycine, Bioshop, Kanada

Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit, Merck Millipore, ABD

Muse® Caspase-3/7 Assay Kit, Merck Millipore, ABD

Muse® Mitopotential Assay Kit, Merck Millipore, ABD

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin), Gibco, ABD

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Wisent Bioproducts, Kanada

Sulforhodamine B sodium salt, Chemcruz, Hollanda

Trikoloroasetik asit, Sigma, ABD

Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries, ABD

Trizma Base, Sigma, ABD

2.1.2. Sarf Malzemeler

0,5 ml, 1,5 ml ve 2 ml‘lik santrifüj tüpleri, Isolab, Almanya

1000 µl’lik pipet uçları, Isolab, Almanya

10 µl’lik pipet uçları, Isolab, Almanya

2 ml‘lik cam pastör pipetler, Isolab, Almanya

25 cm^2, 75 cm^2 flask, Sunub, Şangay

6 kuyulu plate, Sunub, Şangay

24 kuyulu plate, Sunub, Şangay

96 kuyulu plate, Sunub, Şangay

Hemasitometri lamı, Neubauer improved, Isolab, Almanya

Kriyovial, ATS, Almanya

Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab, Almanya

Steril santrifüj tüpleri (15ml), Nest, Çin

Steril santrifüj tüpleri (50ml), Nest, Çin

Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Millex, Millipore, ABD

2.1.3. Cihazlar

10 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik pipet seti, Brand, Almanya

200 µl çok kanallı pipet, Brand, Almanya

-80°C buzdolabı, Panasonic, MDF-U5386S-PE. Japonya

Buzdolabı, Panasonic, MPR-721-PE, Japonya

CO2 inkübatörü, Panasonic, MCO-230AIC-PE, Japonya

Hassas terazi, KERN, ABJ-NM/ABS-N, Almanya

Inverted mikroskop, Nikon, Eclipse Ts2, Japonya

Inverted mikroskop, Zeiss Axio Observer Z1, Almanya

Kuru sterilizatör, Panasonic, MOV-212-PE, Japonya

Laminer hava kabini class II, Telstar, Biovanguard, İspanya

Muse Cell Analyzer Cihazı, Merck, Almanya

Otoklav, Nüve, OT90L, Türkiye

Pipetör, Isolab, ABD

Plate Reader-Spektrofotometre, BMG Labtech, Spectrostar, Almanya

Santrifüj, Hitachi, CF16RN, Japonya

Vorteks, Scilogex, MX-F, ABD

2.2. Metot

2.2.1. İlaçların Hazırlanması ve Uygulanması

Ticari olarak temin edilen Valproik asit (Sigma-Aldrich/MA:144.21) ana stok 200mM olacak şekilde moleküler dereceli su ile hazırlandı. Spironolakton (Sigma-Aldrich /MA: 416.57) ise ana stok 50 mM olacak şekilde DMSO ile hazırlandı. Valproik asit 300 µL ve Spironolakton 50 µL olacak şekilde alikotlanarak -20 ^{0}C'de saklandı. İlgili dozların dilüsyonları besiyerinde gerçekleştirildi.

A549 ve H1299 akciğer kanseri hücre soyları Valproik asit, Spironolakton ve kombinasyon (VPA+SP) grupları ile tedavi edildiler. Her grup için beş doz uygulandı. Bu dozlar sırası ile Valproik asit için (0.3-5mM), Spironolakton için (3-50µM) ve kombinasyon için 5 mM+50 µM, 2.5 mM+25 µM, 1.25 mM+12.5 µM, 0.6 mM+6.25 µM, 0.3 mM+3 µM şeklindedir.

2.2.2. Hücre Kültürü

İSÜMKAM bünyesinde hücre stoklarında bulunan ve kriyovial tüpler içerisinde -80°C dolapta saklanan A549 (ATCC® CCL-185) ve H1299 (ATCC® CRL-5803™) akciğer kanseri hücre soyları ile çalışıldı. Kullanılan hücre soylarının özellikleri aşağıda belirtilen şekildedir.

A549 (ATCC® CCL-185™):

- İnsan akciğer kanseri hücre soyu
- p53, doğal tip
- Rb, aberasyon yok
- p16, homozigot delesyon
- K-Ras, Mutasyon (Ser12)
- PTEN, aberasyon yok
- EGFR, doğal tip
- Epitelyal morfolojiye sahip

H1299 (ATCC® CRL-5803™):

- İnsan akciğer kanseri hücre soyu
- p53, yoksun (null)
- KRAS mutasyonu (-)
- Rb, doğal tip
- K-Ras, doğal tip
- PTEN, inaktif
- EGFR, doğal tip
- Akciğer kanserinin metastatik bölgesi olan lenf nodundan türetildiği için daha invazif karakterde ve fenotipik olarak mezenkimale daha yakın.

2.2.3. Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması

Hücre soyları uzun dönem saklanabilmesi için -80℃ dolapta kriyovial tüpler içerisinde muhafaza edilmektedir. Hücre soylarının büyüyebilmesi ve çoğaltılabilmesi için kriyovial tüplerden sıcak su banyosu yardımıyla hızlı bir şekilde çözülmeleri sağlandı. Süspant haldeki hücre, içerisinde %5 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin bulunan 5 mL RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) ile muamele edildi. Daha sonra bu karışım 15 mL hacimdeki falkon tüpte 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve sonra artık kısım (süpernatant) aspire edilerek uzaklaştırıldı. Geriye kalan hücre peleti üzerine 1 mL besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspant bir form içerisinde bulunmaları sağlandı. Bu işlemlerden kısa bir süre önce etiketlenen ve içerisine 4 mL kadar RPMI besiyeri konan 25 cm2'lik flaskların içerisine süspant haldeki hücreler (1ml) aktarıldı. Hücreler inkübasyon için 37 ℃, %5 CO_2 içeren ortama alındı.

2.2.4. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

RPMI 1640 (Gibco) besiyerine %10 Fetal Bovine Serum (Gibco), %1 L-Glutamin ve %1 Penisilin-Streptomisin solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin, Gibco) ilave edildi.

2.2.5. Hücre Soylarının Pasajlanması

Hücre soyları flask yüzeyini tamamen kapladıklarında (konfluent) flask içerisinde bulunan eski besiyeri aspire edildi. Daha sonra hücrelerin yüzeyden daha kolay kalkabilmesi ve serumdan arındırılabilmesi için 25cm^2'lik flask içerisine 2 mL 1X PBS (Gibco) uygulandı ve hücrelerin yüzeyleri nazikçe yıkandı. Daha sonra PBS aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı ve yüzeye yapışan hücrelerin, yüzey ile olan bağlantılarını kesip yüzer forma getirebilmek için 0.5 mL %0,25 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu ortama ilave edildi. Flask 37 ℃, %5 CO_2 ortamda 5 dakika inkübe edildi ve sürenin sonunda hücrelerin yüzey ile olan bağlantılarının kopup kopmadığı mikroskop altında incelendi. Yüzeyden hücreler ayrıldığında, tripsinin proteaz aktivitesini inhibe etmek için, ortama Tripsin miktarının on katı kadar besiyeri ilave edildi.

Hücre süspantı, 15 mL'lik falkon tüpe alındı. Falkon tüp 800 rpm, 5 dakika kadar santrifüj edildi ve süpernatant kısım aspire edildikten sonra geriye kalan hücre peleti 1:3 kuralına uygun şekilde besiyeri ile sulandırılarak ilgili hücre kültür kaplarında inkübasyon için 37 ℃, %5 CO_2 içeren ortama alındı.

2.2.6. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Süspanse hale getirilmiş olan hücrelerden 10 µL alınarak 96 kuyulu plate'in bir kuyusu içerisinde 10 µL %0.5 Tripan mavisi (Sigma) ile karıştırıldı. Bu karışım iyice al-ver yapıldıktan sonra 10 µL alınarak mikroskop altında hemasitometri üzerinde hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 mL besiyerindeki hücre sayısı hesaplandı.

2.2.7. Hücre Soylarının Stoklanması

Flasklarda kültüre edilen hücreler yüzeyin %80'ni kapladıklarında eski besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin yüzeyi 1X PBS solüsyonu ile yıkandı. Yapışmış olan hücrelerin (adherent) yüzey ile bağlantılarının kesilebilmesi için %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu ortama ilave edildi ve 5 dakika kadar inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı mikroskop yardımıyla incelendi. Ortamda bulunan tripsinin inhibisyonu için tripsinin 10 katı kadar besiyeri ortama ilave edilerek hücreler 15 mL hacimli falkon tüplere aktarıldı ve ardından 800 rpm'de 5 dakika kadar santrifüj edildi. Sürenin sonunda süpernatant kısım aspire edildi ve pelet halindeki

hücreler 1 mL dondurucu besiyeri (%10 DMSO + %10 FBS + %80 DMEM) ile muamele edildi ve her bir kriyovial saklama tüpüne 2-2.5x10^6 adet hücre düşecek şekilde aktarıldı. Daha sonra kriyovialler -80°C dolabına kaldırıldı.

2.2.8. Sulforhodamine B (SRB) Testi ile Canlılık Tayini

Temel prensibi hücre kültüründe türetilen kanser veya normal hücre hattının protein içeriğinin ölçülmesi esasına dayanır. Kanser hücrelerine uygulanan SRB testi klinikte kullanılan antikanser ajanlarının zamana bağlı sitotoksik etki derecesinin gözlenmesi hedeflenmektedir. Sulforhodamine B (SRB) metodunun temelini asidik ortamda proteinlere stokiyometrik olarak bağlanan ve bazik ortamda ise çözünen SRB boyası oluşturmaktadır. Proteinlere bağlanan SRB boyasının bazik ortamda çözünmesi ve çözünen boyanın spektrofotometre cihazı vasıtasıyla renk şiddetinin (spektrum) ölçülmesi ile canlılık üzerinde yorum yapılabilmektedir. Metodun uygulanabilmesi için gerekli olan maddeler ve saklama koşulları aşağıdaki gibidir;

- Trikoloroasetik asit (TCA) %50 (kütle/hacim) olacak şekilde distile su ile hazırlandı,
- SRB boyası ise %0,4 (kütle/hacim) olacak şekilde %1 asetik asit çözeltisi ile hazırlandı. Stok boya solüsyonu 4°C'de saklandı.
- Tris baz pH:10.0 ve 10 mM olacak şekilde 121 mg tris baz ve 100 ml dH2O ile hazırlandı. Oda koşullarında saklandı.
- Asetik asit %1 olacak şekilde dH2O ile hazırlandı.

Öncelikle A549 ve H1299 hücre soyları 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına ekildi. Hücre ekimini takiben, eş zamanlı olarak, VPA ve SP'nin değişen dozları ile yukarıda açıklanan şekilde tedavi uygulandı. Kontrol grubu için ise hücreler sadece besiyeri ortamına ekildiler. Daha sonra hücreler 48 ve 72 saat için 37°C, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süresinin sonunda mikroskop altında hücreler incelendikten sonra hücrelerin fikse (sabitlemek) edilmesi amacıyla her bir kuyuya 50 µL TCA eklenerek plate 4°C'de 1 saat inkübe edildi. Sürenin bitiminde TCA kuyulardan uzaklaştırıldı ve her kuyu en az 5 kez distile su ile yıkandı. Daha sonra her kuyuya 50 µL SRB boyası eklendi ve SRB boyası ışığa karşı hassas olduğu için karanlık ortamda 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitiminde boya kuyulardan uzaklaştırılıp, her bir kuyu %1 asetik

asit çözeltisi ile en az 5 kez yıkandı ve plate'in kurutulması sağlandı. Her bir kuyuya 150 µL (10 mM / pH:10) Tris baz çözeltisi eklendi ve çalkalayıcıda 100 rpm'de 10 dakika süre ile bırakıldı. Sürenin sonunda hücrelerde oluşan renk şiddeti spektrofotometrede (Plate Reader-Spektrofotometre, BMG Labtech, Spectrostar) 564 nm dalga boyunda ölçüldü ve cihaz tarafından sağlanan absorbans verileri ile hücre soylarının tedavi sonrası canlılık oranları aşağıda yer alan formül yardımıyla gerçekleştirildi.

% Canlılık = [100 × (Kimyasal uygulanan grubun absorbans ortalaması – Kör absorbans ortalaması) / (Kontrol grubunun absorbans ortalaması – Kör absorbans ortalaması)].

2.2.9. Akım Sitometri Analizleri

Akış sitometrisinin temel prensibi, hücrelerin bir lazerin önünden tek bir odak noktasından geçişidir. Bu lazer ışığı sayesinde hücreler tek tek algılanabilir, sayılabilir ve çeşitli özelliklerine göre detaylıca sınıflandırılabilirler (McKinnon, 2018). Akım sitometride analizler hücrelerin süspant halde bir sıvı içinde bulunmaları ile mümkün olmaktadır. Lazer odak noktasına flow cell denir ve bu noktadan geçen her hücre üzerine düşen lazer ışınını belli miktarda geri yansıtır ve bir miktarını da soğurur, bu floresan ışımaya neden olur. Hücreler içlerindeki veya yüzeylerindeki proteinlere özgü çeşitli antikolarla muamele edilerek antijenlere bağlanmaları sağlanır. Her özel antikor FITC, PE, PerCP (Peridinin klorofil), 7-AAD (7-Aminoaktinomisin D) gibi floresan boyalarla işaretlenmiştir. Bu şekilde ilgili antijeni bulunduran hücrelerin lazer ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyaller değerlendirilerek o hücrenin hangi spesifik antijeni taşıdığı belirlenebilir (McKinnon, 2018).

2.2.9.1. Kazpaz 3/7 testi

Kaspazlar, apoptozis sürecinde aktive olan ve spesifik çeşitli proteinleri parçalayan sistein proteazlardır (Widmann ve ark., 1998). Apoptozis süreci içerisinde yer alan ve effektör kaspazlar olarak isimlendirilen kaspaz 3/7'nin aktivasyonu, hücre ölümü ve membran bütünlüğü hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır.

Kaspaz 3/7 testi için A549 ve H1299 hücreleri kültüre edildi. Yeterli yoğunluk elde edildikten sonra hücreler sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına A549 ve H1299 hücreleri 1 mL içerisinde 3x 10^5 (48 saat) ve 2 x 10^5 (72 saat) hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekimi takiben eş zamanlı olacak şekilde 1 mL besiyeri içinde VPA (2.5 mM) ve

SP (25 μM) tek başlarına ve/veya birlikte olacak şekilde uygulandı. Daha sonra hücreler 37℃, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süresinin sonunda kuyuların içerisinde besiyerleri santrifüj tüplerine toplandı. Hücreler pasaj protokolünde yer alan işlemlerle süspanse hale getirilip ilgili santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip ve süpernatant kısımı uzaklaştırıldı. Geriye kalan hücre peleti %1 FBS ile sulandırıldı. Daha sonra tedavi grupları ilgili etiketlenmiş ependorflar içerisine 50 μL olacak şekilde aktarıldı. Sonra her bir ependorf tüpe 5 μL kaspaz 3/7 solüsyonundan eklendi ve al-ver işlemi yapıldı sonra tüplerin ağzı açık şekilde 30 dakika 37℃'de, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Sürenin bitiminde tüpler içerisindeki hücre süspansiyonlarına bir tür DNA'ya bağlanan toksik boya olan 7-AAD 150 μL kadar eklendi ve al-ver yapıldı. Son olarak oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 5 dakika süre ile inkübe edilen örneklerin, sürenin sonunda Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçümleri gerçekleştirildi.

2.2.9.2. Anneksin-V testi

Anneksin-V, apoptozis esnasında hücre membranının dışına transloke olan fosfotidilserin (PS) ile yüksek özgüllükte etkileşime girme eğilimi göstermektedir. Bu yöntemde ise Anneksin-V ile floresan ışıma yapan FITC gibi bir madde bağlanarak bir kompleks oluşturulur, bu şekilde Anneksin-V ve PS etkileşimi ile apoptozisin yüzdesi nicel olarak belirlenebilmektedir. Ayrıca yüksek özgüllükte çift zincirli DNA'ya bağlanabilen ve sağlam (intakt) hücre zarından kolayca geçemeyen floresan bir boya olan 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD) boyası da kullanılmaktadır. 7-AAD boyasının membran bütünlüğü ile olan ilişkisi, hücrelerin geç-apoptoz veya erken-apoptoz aşaması içerisinde olup olmadığı hakkında nicel bir sonuç elde edilmesini sağlamaktadır.

Anneksin-V testi için A549 ve H1299 hücreleri kültüre edildi. Yeterli yoğunluk elde edildikten sonra hücreler sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına A549 48 saat için 1 mL içerisinde 3 x 10^5, 72 saat için ise 1 mL içerisinde 2 x 10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Benzer biçimde 6 kuyulu hücre kültür kaplarına H1299 48 saat için 1 mL içerisinde 3 x 10^5, 72 saat için ise 1 mL içerisinde 2 x 10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekimi takiben eş zamanlı olacak şekilde 1 mL besiyeri içinde VPA'nın 2.5 mM dozu ve SP'nin 25 μM dozunu tek başlarına ve kombinasyon olacak şekilde uygulandı. Daha sonra hücreler 37℃, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

Hücreler pasaj protokolünde yer alan işlemlerle süspanse hale getirilip ilgili santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip ve süpernatant kısımı uzaklaştırıldı. Geriye kalan hücre peleti %1 FBS ile sulandırıldı. Daha sonra tedavi grupları ilgili etiketlenmiş ependorflar içerisine 50 µl olacak şekilde aktarıldı. İlgili ependorf tüplere 50 µl Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonu eklendi. Yaklaşık 5 saniye kadar vorteks yapıldıktan sonra karanlık bir ortamda 20 dakika süre ile oda ısısında inkübe edildi ve sonra Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

2.2.9.3. Mitokondri Membran Potansiyeli testi

Apoptozis'de merkezi ve önemli bir role sahip olan mitokondrinin analiz edilmesi, apoptozis'e gitmiş veya gitmekte olan hücreler hakkında birçok bilgi sağlamaktadır. Apoptozis esnasında hücrenin mitokondrisinden sitoplazmaya salınan sitokrom-c geri dönüşsüz bir yolun habercisidir (Garrido ve ark., 2006). Sitoplazmaya salınan sitokrom-c'yi takiben gelişen apoptotik süreç, hücrelerde mitokondriyal bütünlüğün kaybına neden olmaktadır.

Mitokondri membran potansiyeli testi için A549 ve H1299 hücreleri kültüre edildi. Yeterli yoğunluk elde edildikten sonra hücreler sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına A549 48 saat için 1 mL içerisinde 3 x 10^5, 72 saat için ise 1 mL içerisinde 2 x 10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Benzer biçimde 6 kuyulu hücre kültür kaplarına H1299 48 saat için 1 mL içerisinde 3 x 10^5, 72 saat için ise 1 mL içerisinde 2 x 10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekimi takiben eş zamanlı olacak şekilde 1 mL besiyeri içinde VPA'nın 2.5 mM dozu ve SP'nin 25 µM dozunu tek başlarına ve kombinasyon olacak şekilde uygulandı. Daha sonra hücreler 37°C, %5 CO2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süresinin sonunda kuyuların içerisinde bulunan besiyerleri 15 mL lik santrifüj tüplerine toplandı. Hücreler pasaj protokolünde yer alan işlemlerle süspanse hale getirilip ilgili santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip ve süpernatant kısımı uzaklaştırıldı. Geriye kalan hücre peleti %1 FBS ile sulandırıldı. Daha sonra tedavi grupları ilgili etiketlenmiş ependorflar içerisine 100 µl olacak şekilde aktarıldı. Daha sonra kit içerisinden çıkan solüsyondan 95 µl eklendi ve pipetaj ile al-ver yapıldıktan sonra 20 dakika 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda 7-AAD boyasından 5 µl pipetlenip 5 dakika inkübasyon için beklendi ve sürenin sonunda Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

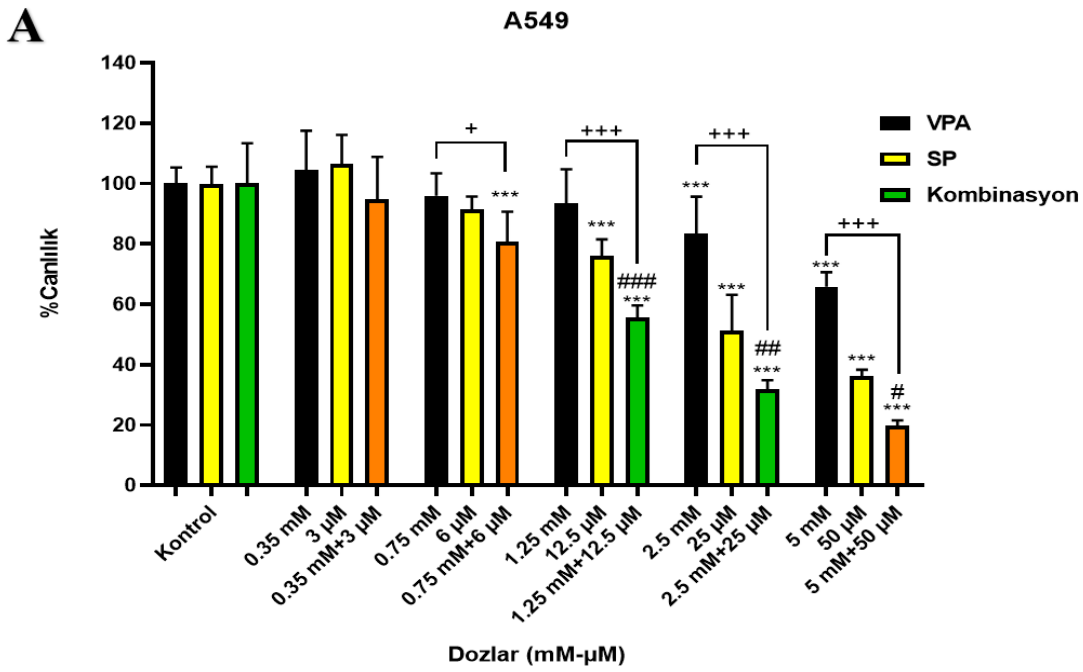
2.2.10. Yara İyileşmesi

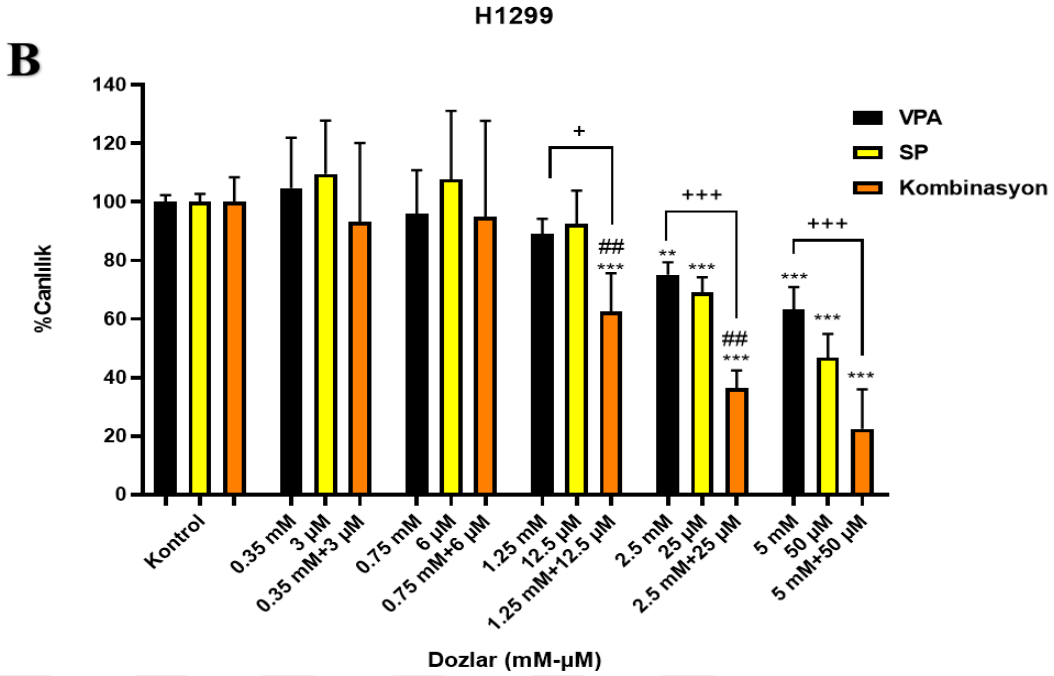
Yara iyileşmesi deneyi için 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına A549 ve H1299 hücreleri (her kuyucukta $6x10^4$ hücre) 2 tekrarlı olacak şekilde ekildi. Bir sonraki gün %95 doluluk oranına sahip kuyularda 200 µL pipet ucu ile dikey yaralar oluşturuldu. Yara oluşturma aşamasında yüzeyden kalkan hücreler 1X PBS vasıtasıyla ortamdan uzaklaştırıldı. Besiyeri tazelenen hücreler 0. saat fotoğraflaması için mikroskoba alındı. Ardından VPA için 1.25 mM, SP 12.5 µM ve kombinasyon için 1.25 mM+12.5 µM tedavi dozları ilgili kuyucuklara uygulanarak hücreler 37°C %5 CO_2'li inkübatöre alındı. Yara iyileşmesinin takibi 24 ve 48. saatlerde aynı bölgelerin mikroskop altında fotoğrafları çekilerek gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

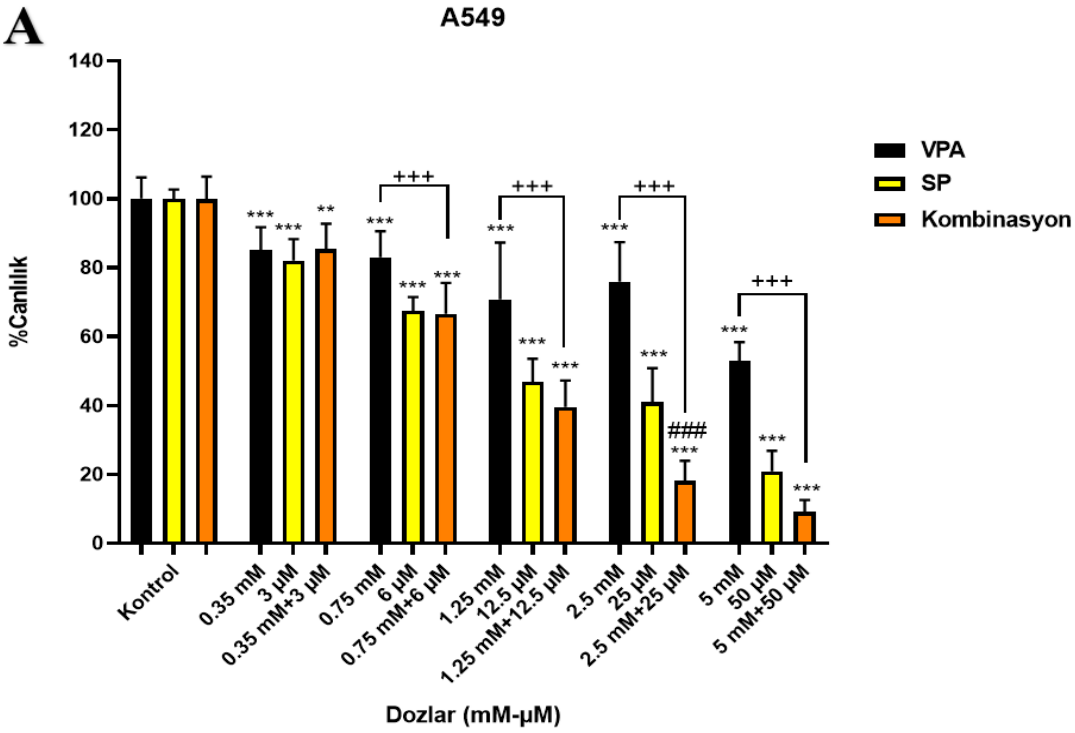
3.1. Kombinasyon Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

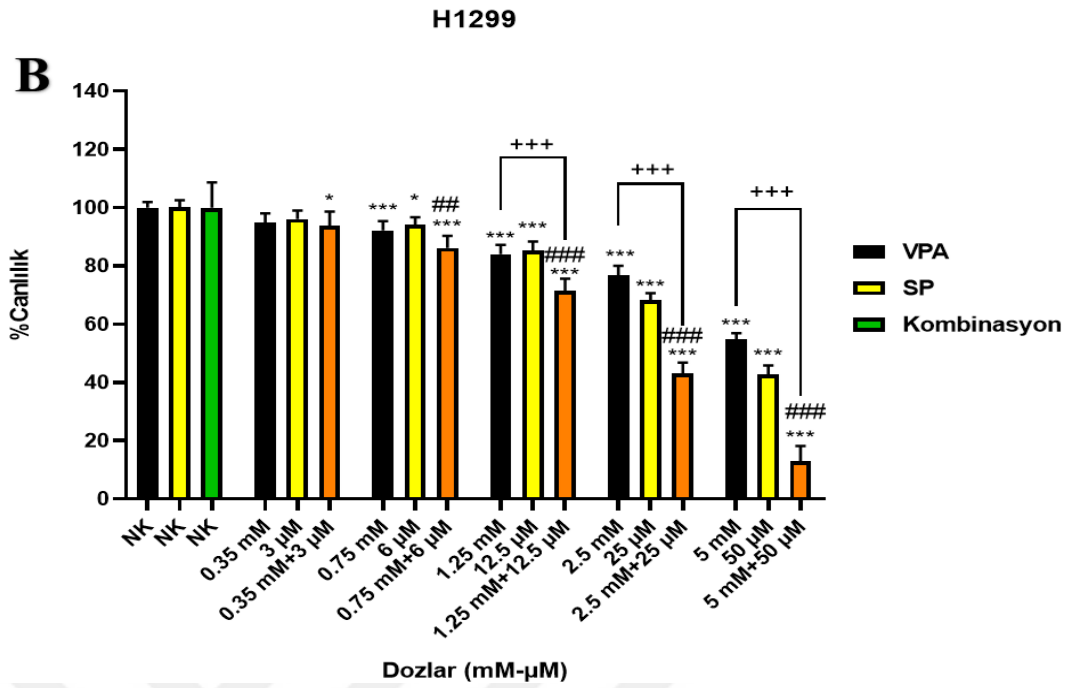
A549 ve H1299 hücrelerinde, VPA (0.35 mM - 5 mM), SP (3 µM - 50 µM) ve kombinasyon uygulamalarının hücre canlılığı üzerine olan etkisi SRB canlılık testi ile belirlendi. 48 ve 72 saat süren kombinasyon uygulaması sonrası, hücre canlılığının, ajanların tek başına etkisine kıyasla anlamlı biçimde azaldığı gözlendi (p<0,05; p<0,01; p<0,001) (Şekil 3.1, 3.2). İlgili hücreler, yöntem kısmında belirtilen şekilde, fenotipik ve genotipik olarak farklılık göstermektedir. Bu nedenle, tedavi yanıtları karşılaştırıldığında, kombinasyon uygulamasının göreceli olarak düşük dozlarda A549 hücrelerinde daha etkin olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.3). VPA, SP ve kombinasyon uygulamasının sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli parametreler olan IC_{50} (kontrol hücrelerine kıyasla tedavi sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) ve IC_{90} (kontrol hücrelerine kıyasla tedavi sonrası hücrelerin %90'ını öldüren konsantrasyon) dozları Tablo 3.1'de verilmiştir.



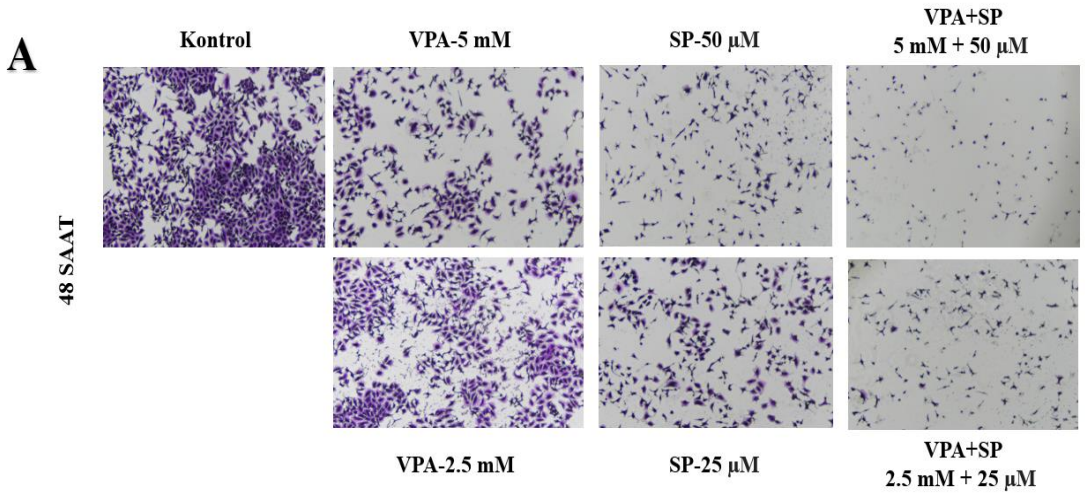


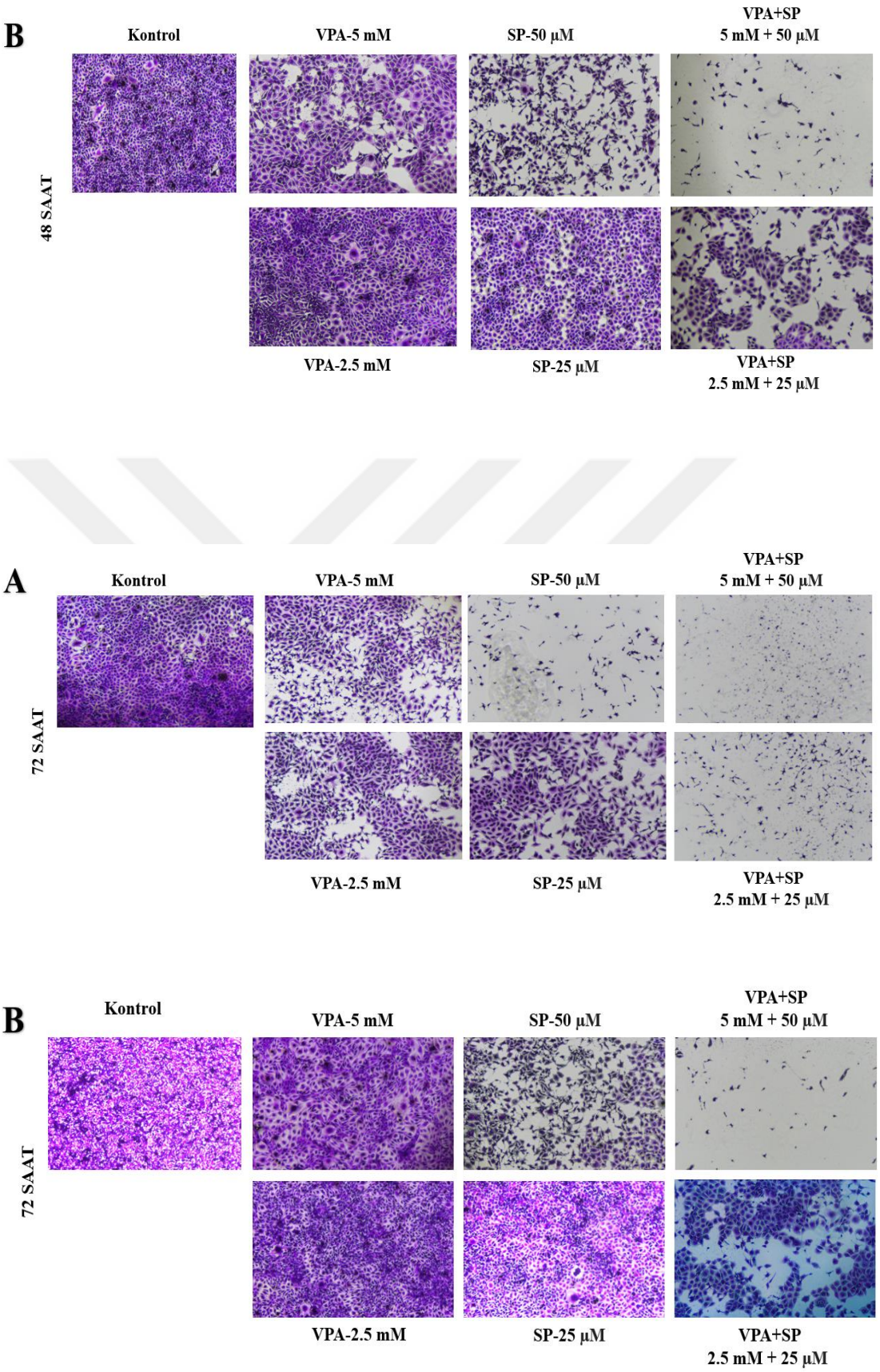
Şekil 3.1: A549 (A) ve H1299 (B) hücrelerinde 48 saat VPA, SP ve kombinasyon tedavi uygulamaları sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (*: p<0,05 **: p<0,01 ***: p<0,001); + Valproik asitin tek kullanımına göre (+: p<0,05; ++: p<0,01; +++: p<0,001); # Spironolaktonun tek kullanımına'ya göre (#:p<0,05 ##: p<0,01 ###: p<0,001) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.





Şekil 3.2: A549 (A) ve H1299 (B) hücrelerinde 72 saat VPA, SP ve kombinasyon tedavi uygulamaları sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (*: p<0,05 **: p<0,01 ***: p<0,001); + Valproik asitin tek kullanımına göre (+: p<0,05; ++: p<0,01; +++: p<0,001); # Spironolaktonun tek kullanımına göre (#:p<0,05 ##: p<0,01 ###: p<0,001) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.



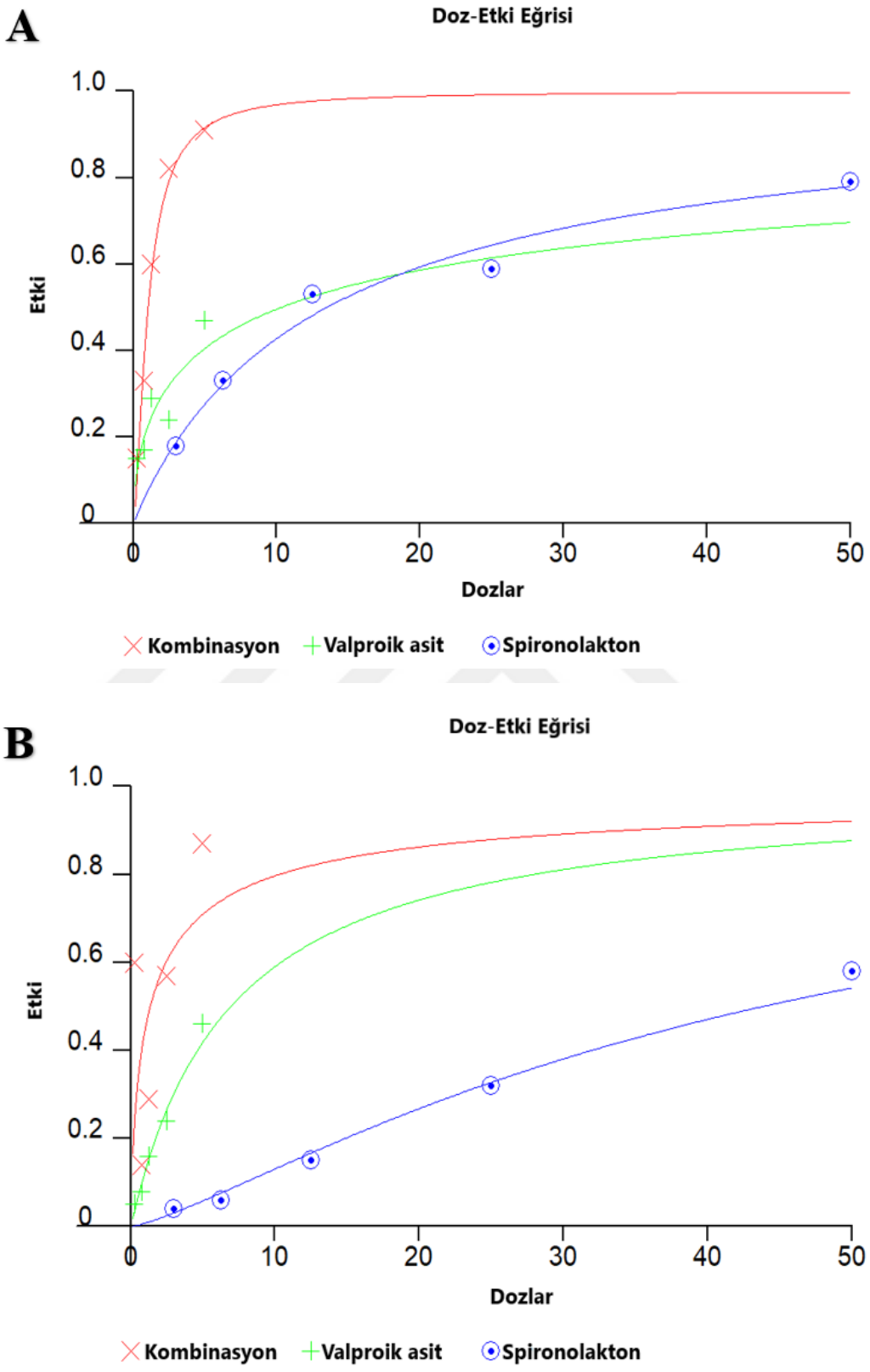


Şekil 3.3: A549 (A) ve H1299 (B) hücrelerinin 48 saat ve 72 saat VPA, SP ve kombinasyon tedavi uygulamaları sonrası mikroskop görüntüleri (x4)

Tablo 3.1: A549 ve H1299 hücre soylarının VPA, SP ve Kombinasyon tedavi uygulaması sonrası elde edilen IC50 ve IC90 verileri.

Dozlar		IC_{50}		IC_{90}	
Tedavi	Süre Hücreler	48 Saat	72 Saat	48 Saat	72 Saat
VPA (mM)	A549	>5	>5	>5	>5
	H1299	>5	>5	>5	>5
SP (µM)	A549	26,9	11,5	>50	>50
	H1299	46,4	42,9	>50	>50
Kombinasyon (mM-µM)	A549	1,55 mM + 15,5 µM	1,1 mM + 10 µM	>5mM+50µM	4,7 mM + 47,5 µM
	H1299	1,9 mM + 18,5 µM	2,2 mM + 22 µM	>5mM+50µM	>5mM+50µM

Kombinasyon tedavinin (72 saat) etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla CalcuSyn yazılımı yardımıyla doz-etki eğrileri oluşturuldu (Şekil 3.4) ve kombinasyon indeksi (CI) değerleri hesaplandı (Tablo 3.2). Hesaplamalar sonucunda CI değeri 1'den az ise (CI<1) sinerjistik, 1'den fazla ise (CI>1) antagonistik ve 1'e eşit ise (CI=1) additif etkiyi göstermektedir (Chou, 2006). VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) için hesaplanan kombinasyon tedavisinin (2.5 mM + 25 µM) her iki hücre soyunda da sinerjik etki (H1299: 0.57; A549: 0.82) gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 3.4: A549 (A) ve H1299 (B) hücrelerinin VPA, SP ve kombinasyon tedavi (72 saat) uygulamaları sonrası doz-etki eğrileri

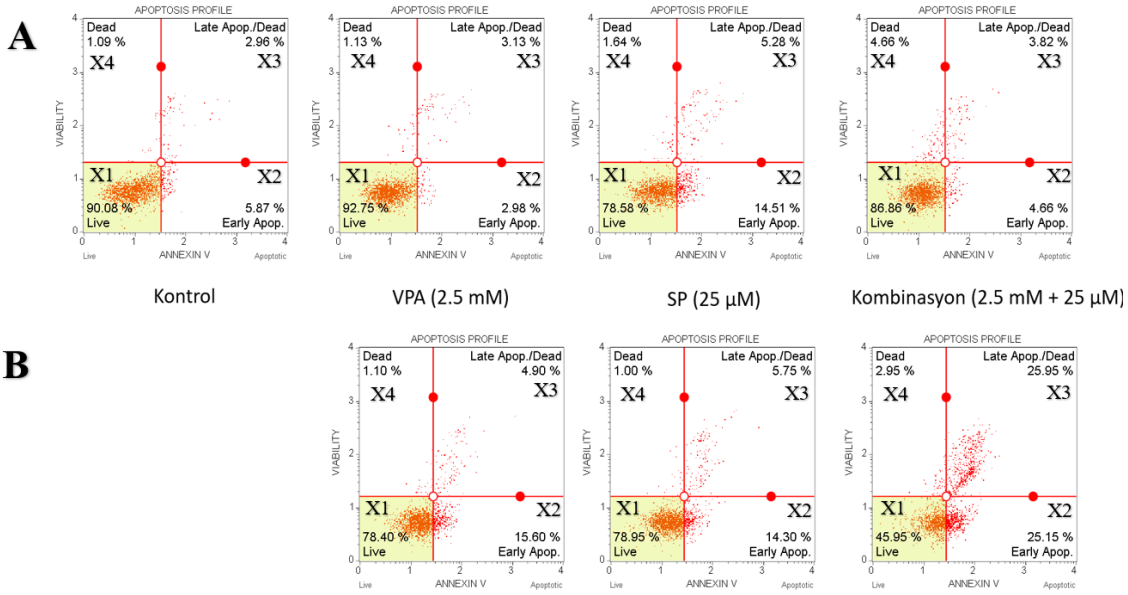
Tablo 3.2: A549 ve H1299 hücrelerinde kombinasyon uygulaması sonrası (72 saat) elde edilen kombinasyon indeksi (CI) değerleri ve tanımlanan etkileri.

Hücreler	Kombinasyon	CI değeri	Tanımlanan etki
A549	5 mM + 50 µM	0.91	Additif
	2.5 mM + 25 µM	0.82	Hafif sinerjizm
	1.25 mM+12.5 µM	0.60	Sinerjizm
H1299	5 mM + 50 µM	0.87	Hafif sinerjizm
	2.5 mM + 25 µM	0.57	Sinerjizm
	1.25 mM + 12.5 µM	0.29	Güçlü sinerjizm

3.2. Akım Sitometri Bulguları

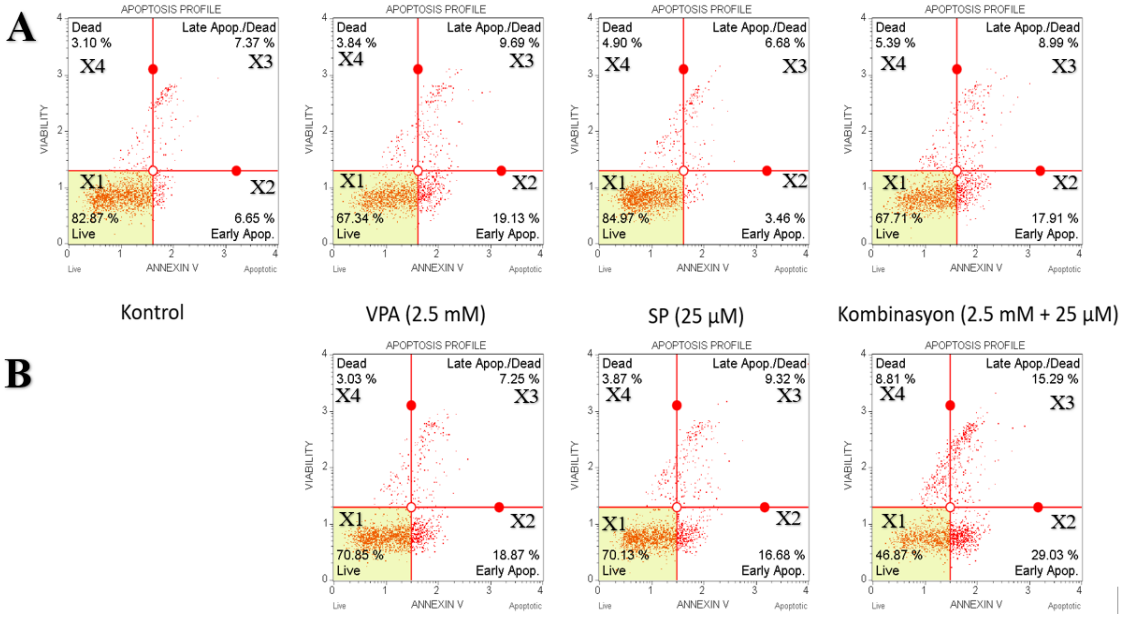
3.2.1. Annexin V-FITC Testi

Gerçekleştirilen sitotoksisite testleri ve kombinasyon etki değerlendirme yazılımı CalcuSyn ile belirlenen VPA 2.5 mM ve SP 25 µM konsantrasyonları için apoptotik hücre ölümü akım sitometrisinde Annexin V-FITC metoduyla değerlendirilmiştir. Kadranlarda yer alan ifadeler ise şu şekildedir; Annexin V-FITC ve 7-AAD negatif olan alan canlı hücreleri (X1), Annexin V-FITC pozitif ve 7-AAD negatif olan alan erken apoptotik hücreleri (X2), Annexin V-FITC ve 7-AAD pozitif olan alan geç apoptotik hücreleri (X3), Annexin V-FITC negatif ve 7-AAD pozitif olan alan ise nekrotik (X4) hücrelerin yüzde değerlerini belirtmektedir. A549 hücrelerinde 24 saatlik tedavi sonrasında VPA'nın tek başına kullanımında apoptotik oran %6,11 (X2+X3), SP'nin tek başına kullanımında apoptotik oran %19,79 (X2+X3), kombinasyonda ise apoptotik oran %8,5 (X2+X3) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5A). Devam eden çalışmada 48 saatlik tedavi sonrası özellikle kombinasyon tedavide apoptotik oran %51.1 (X2+X3) olarak belirlenirken, VPA'nın tek başına kullanımında apoptotik oran %20,5 (X2+X3), SP'nin tek başına kullanımında apoptotik oran %20,05 (X2+X3) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5B).



Şekil 3.5: A549 hücrelerinde VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) ile kombinasyon tedavisi sonrası apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramlarının AnnexinV-FITC metodu ile değerlendirmesi (X1=Canlı, X2=Erken Apoptozis, X3=Geç Apoptozis, X4= Nekroz)

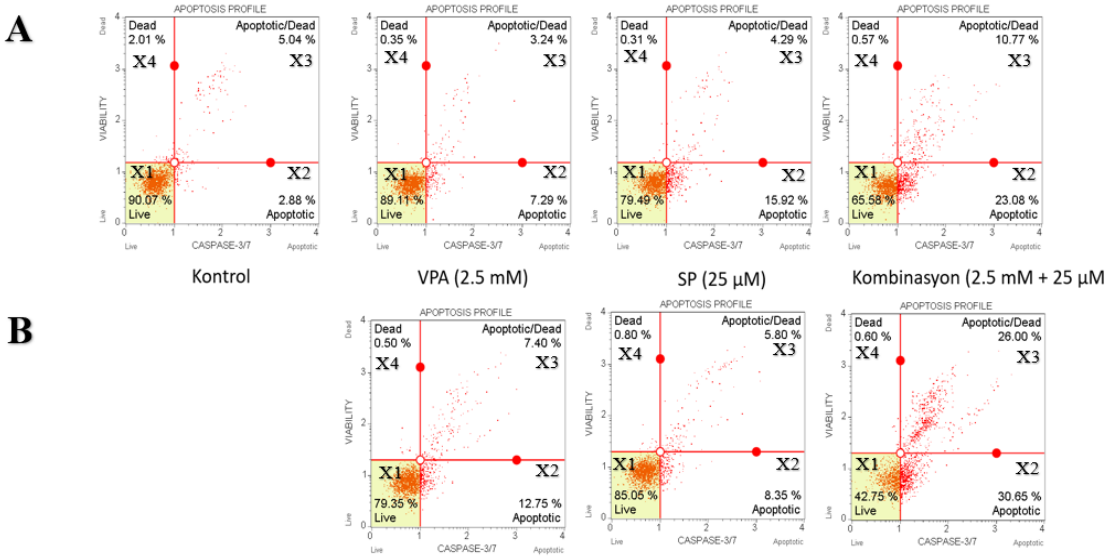
H1299 hücrelerinde 24 saatlik tedavi sonrasında VPA'nın tek başına kullanımında apoptotik oran %28,82 (X2+X3), SP'nin tek başına kullanımında apoptotik oran %10,14 (X2+X3) ve kombinasyonda ise apoptotik oran %26,9 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6A). Devam eden çalışmada 48 saatlik tedavi sonrası özellikle kombinasyon tedavide apoptotik oran %44,32 (X2+X3) iken, VPA'nın tek başına kullanımında apoptotik oran %26,12 (X2+X3) ve SP'nin tek başına kullanımında apoptotik oran %26 (X2+X3) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6B). Bu sonuçlar ışığında tedavi süresine bağlı olarak hem A549 hem de H1299 hücre soylarında kombinasyon tedavi, ilaçların tek kullanımına kıyasla belirgin fark ortaya koymuştur.



Şekil 3.6: H1299 hücrelerinde VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) ile kombinasyon tedavisi sonrası apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramlarının AnnexinV-FITC metodu ile değerlendirmesi (X1=Canlı, X2=Erken Apoptoz, X3=Geç Apoptoz, X4=Nekroz)

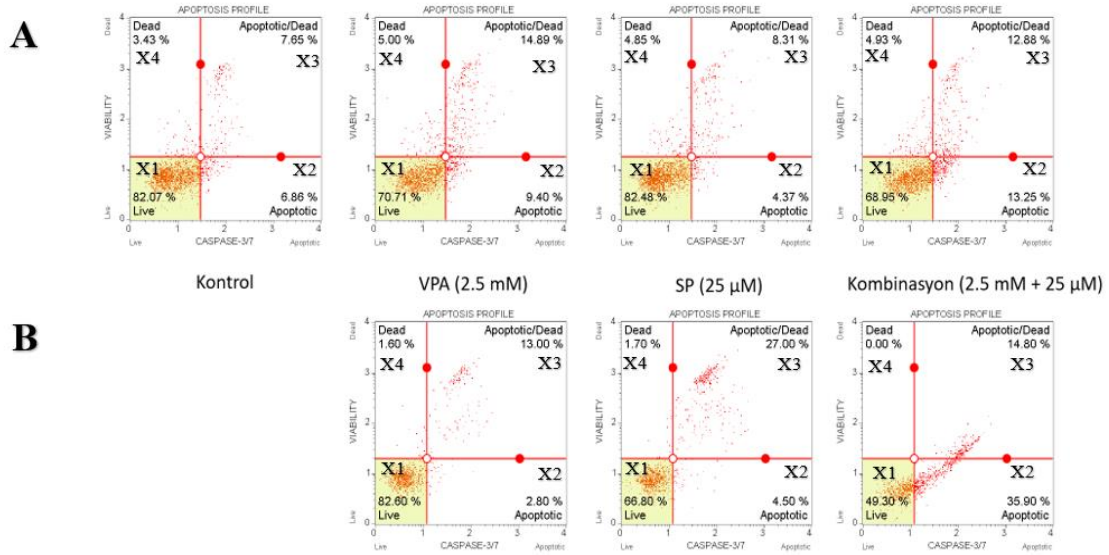
3.2.2. Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Apoptozis aşamasında önemli role sahip olan kaspaz 3 ve 7'nin aktivasyonu, apoptotik hücre ölümü ve membran bütünlüğü hakkında çeşitli bilgiler vermektedir. VPA 2.5 mM ve SP 25 µM konsantrasyonları için apoptotik hücre ölümü akım sitometrisinde Kaspaz 3/7 metoduyla değerlendirilmiştir. Kadranlarda yer alan ifadeler ise şu şekildedir; Kaspaz 3/7 ve 7-AAD negatif olan bölge sağlıklı hücreleri (X1), Kaspaz 3/7 aktivasyonu pozitif ve 7-AAD negatif olan bölge erken apoptotik hücreleri (X2), Kaspaz 3/7 aktivasyonu ve 7-AAD pozitif olan bölge geç apoptotik hücreleri (X3) ve Kaspaz 3/7 aktivasyonu negatif ve 7-AAD pozitif olan bölge nekrotik hücreleri (X4) göstermektedir. A549 hücrelerinde 24 saatlik tedavi sonrasında VPA'nın tek başına kullanımında apoptotik oran %10.53 (X2+X3), SP'nin tek başına kullanımında apoptotik oran %20.21 (X2+X3), kombinasyonda ise apoptotik oran %33.85 (X2+X3) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7A). Gerçekleştirilen 48 saatlik tedavi sonrası özellikle kombinasyon tedavide apoptotik oran %56.65 (X2+X3) olarak belirlenirken, VPA'nın tek başına kullanımında apoptotik oran %20.15 (X2+X3), SP'nin tek başına kullanımında apoptotik oran %14.15 (X2+X3) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7B).



Şekil 3.7: A549 hücrelerinde VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) ile kombinasyon tedavisi sonrası Kaspaz 3/7 aktivitesine bağlı elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (X1= Canlı, X2= Kaspaz 3/7 aktif olan erken apoptotik hücreler, X3= Kaspaz 3/7 aktif olan geç apoptotik hücreler, X4= Kaspaz 3/7 aktif olmayan nekrotik hücreler)

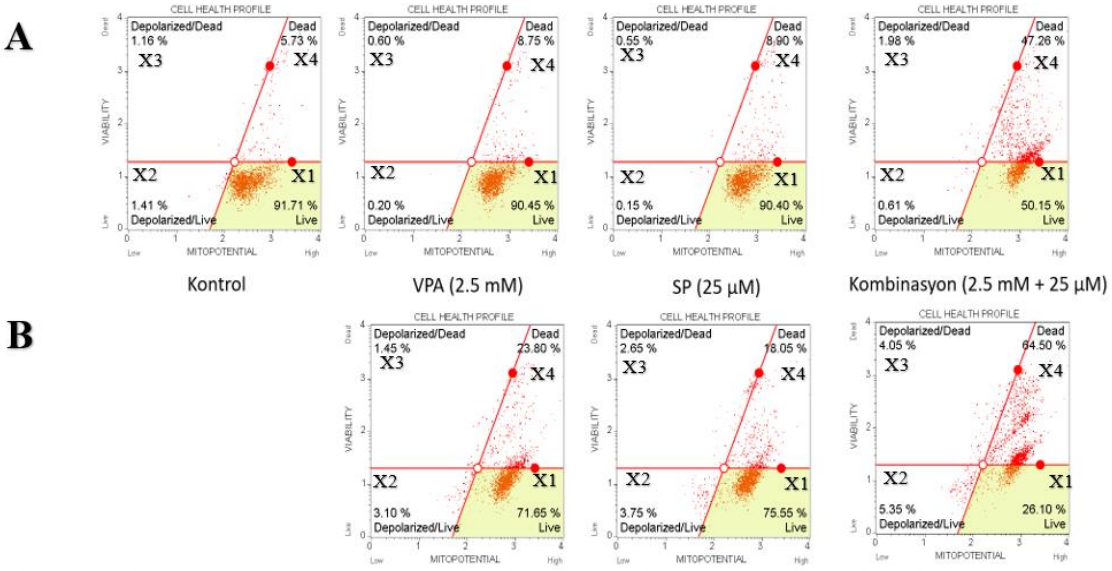
H1299 hücrelerinde 24 saatlik tedavi sonrasında VPA'nın tek başına kullanımında apoptotik oran %24.29 (X2+X3), SP'nin tek başına kullanımında apoptotik oran %12.68 (X2+X3) ve kombinasyonda ise apoptotik oran %26.13 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.8A). Gerçekleştirilen 48 saatlik tedavi sonrası özellikle kombinasyon tedavide apoptotik oran %50.7 (X2+X3) iken, VPA'nın tek başına kullanımında apoptotik oran %15.8 (X2+X3) ve SP'nin tek başına kullanımında apoptotik oran %31.5 (X2+X3) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.8B). Elde edilen verilen sonucunda kaspaz 3/7 aktivitesi açısından her iki hücre soyunda da kombinasyon tedavinin, tek başına tedavilere oranla daha belirgin bir artış ortaya koyduğu gözlemlendi.



Şekil 3.8: H1299 hücrelerinde VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) ile kombinasyon tedavisi sonrası Kaspaz 3/7 aktivitesine bağlı elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (X1= Canlılık, X2= Kaspaz 3/7 aktif olan erken apoptotik hücreler, X3= Kaspaz 3/7 aktif olan geç apoptotik hücreler, X4= Kaspaz 3/7 aktif olmayan nekrotik hücreler)

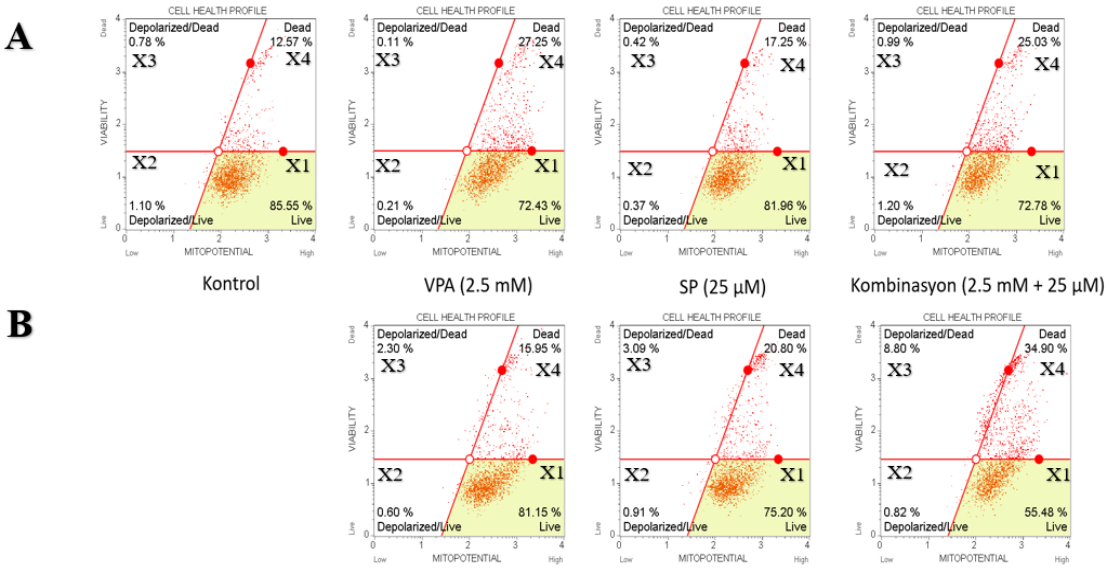
3.2.3. Mitokondri Membran Potansiyelinde Değişimin İncelenmesi

Bir sonraki adımda, A549 ve H1299 hücreleri için VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) ile 24 ve 48 saatlik kombinasyon tedavisinin, apoptozis sürecinde önemli değişikliklerden biri olan mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisi değerlendirildi. Buna göre; A549 akciğer kanseri hücrelerinde 24 saatlik tedavi sonrası VPA'nın tek başına uygulamasında mitokondrisi depolarize olan hücrelerin toplam yüzdesi %0.80 (X1+X3), SP'nin tek başına uygulamasında mitokondrisi depolarize olan hücrelerin toplam yüzdesi %0.70 (X1+X3) iken kombinasyon tedavideki oran %2.59 (X1+X3) olarak belirlendi (Şekil 3.9A). 48 saatlik tedavi sonrası ise kombinasyon uygulamasında mitokondrisi depolarize olan hücrelerin toplam yüzdesi %9.4 (X1+X3) şeklinde artış gösterdi. VPA'nın tek başına uygulamasındaki oran %4.55 (X1+X3) iken SP'nin tek başına uygulamasındaki oran %6.4 (X1+X3) olarak gözlendi (Şekil 3.9B).



Şekil 3.9: A549 hücrelerinde VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) ile kombinasyon tedavisi sonrası mitokondri membran potansiyelinde yüzde değişimin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (X1= Canlı, X2= Depolarize/Canlı, X3=Depolarize/Ölü, X4= Nekroz)

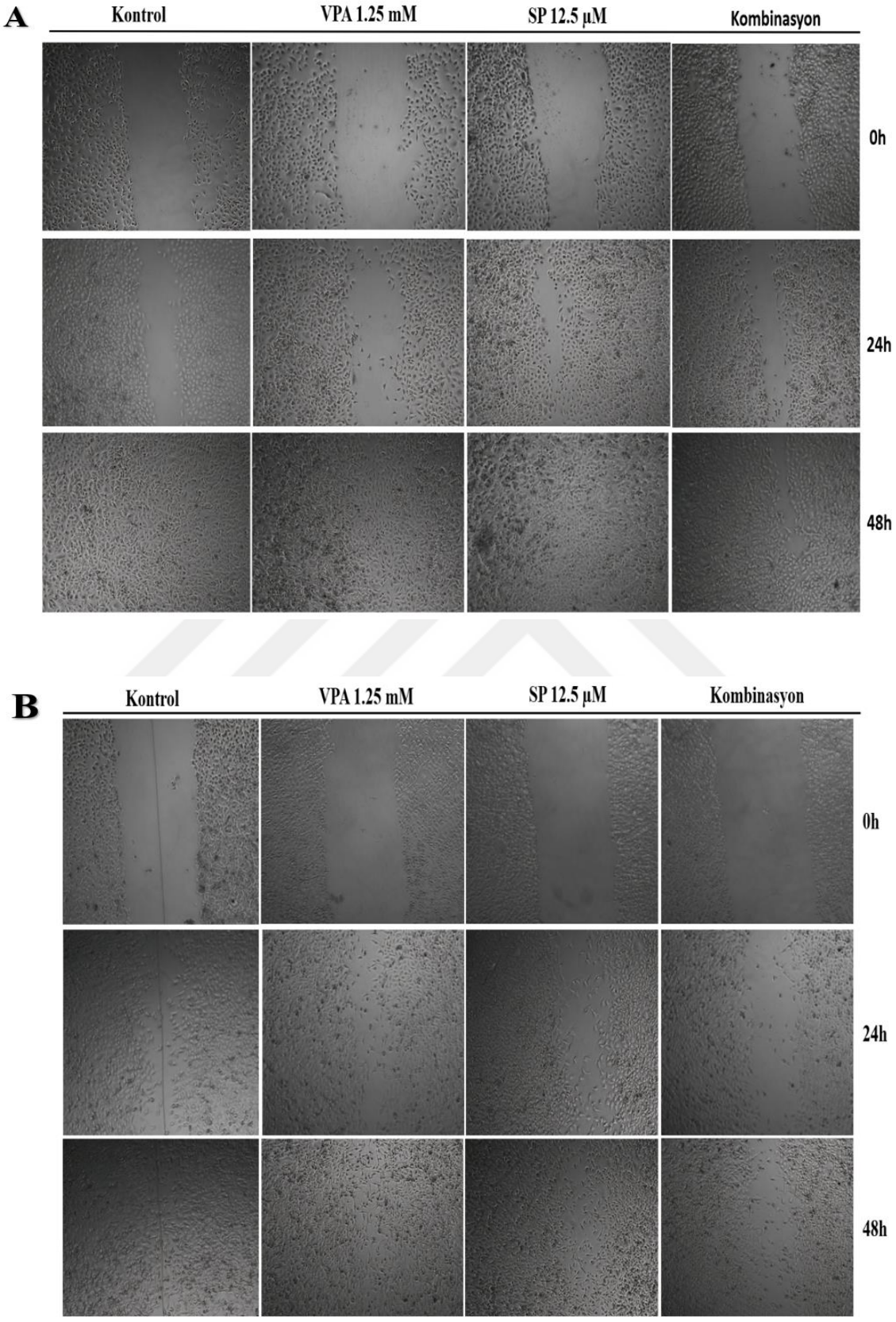
H1299 akciğer kanseri hücrelerinde 24 saatlik tedavi sonrası VPA ve SP'nin tek başına uygulamasında mitokondrisi depolarize olan hücrelerin toplam yüzdesi sırasıyla %0.32 (X1+X3), ve %0.79 (X1+X3) iken kombinasyon tedavideki oran %2.19 (X1+X3) şeklindedir (Şekil 3.10A). 48 saatlik tedavi sonrası ise kombinasyon uygulamasında mitokondrisi depolarize olan hücrelerin toplam yüzdesi %9.62 (X1+X3), VPA ve SP'nin tek başına uygulamasındaki oranlar sırasıyla %2.9 (X1+X3) ve %3.99 (X1+X3)'dur(Şekil 3.10B). Her iki hücre grubunda da zamana bağlı olarak mitokondri membranı intakt ölü hücre grubunda (X2) belirgin artış olmuştur.



Şekil 3.10: H1299 hücrelerinde VPA (2.5 mM) ve SP (25 µM) ile kombinasyon tedavisi sonrası mitokondri membran potansiyelinde yüzde değişimin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (X1=Canlı, X2= Depolarize/Canlı, X3=Depolarize/Ölü, X4= Nekroz)

3.3. Kombinasyon Uygulamasının Migrasyon Yeteneği Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

A549 ve H1299 hücrelerinde, anti-migratif etkiyi değerlendirmek için kombinasyon tedavi modelinde hücre büyümesini yaklaşık %50 oranında baskıladığı gözlenen doz (12.5+1.25) kullanılmıştır. Her iki hücre grubunda da, kontrole ve ajanların tek başına etkisine kıyasla, kombinasyon sonrası yara kapanma hızında belirgin ve anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: A549 (A) ve H1299 (B) hücrelerinde VPA, SP ve kombinasyon tedavi uygulamaları sonrası yara iyileşmesi sürecinin takibi (0-48 saat).

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında, A549 ve H1299 akciğer kanseri hücre soylarında Valproik asit ile Spironolakton ilaçlarının tek başlarına ve kombinasyon şeklinde kullanımlarının sitotoksik/apoptotik etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan Valproik asit ve Spironolakton halihazırda klinikte farklı hastalıkların tedavisi için kullanılmakta olan ilaçlardır (Gabriel, 2007; Anonim, 2021). Aynı zamanda gerçekleştirilen literatür taramaları sonucu bu ilaçların kombinasyon etkisinin herhangi bir kanser türünde araştırılmadığı saptanmıştır. Bu durum mevcut tez çalışmasının özgün tarafını oluşturmaktadır.

Her geçen gün daha da kötüye gitmekte olan kanser vaka oranları son yıllarda oldukça artmıştır. Tahminlere göre 2040 yılında dünya genelinde 28.4 milyon yeni kanser vakası gözlemlenecektir (Sung ve ark., 2021). Kemoterapi, radyoterapi gibi mevcut klinik uygulamalar hasta üzerinde oldukça olumsuz yan etkilere sahiplerdir. Yeni bir ilacın geliştirilmesi aşaması ise oldukça maliyetli ve süre alan bir işlemdir. Dolayısıyla bilim insanları ucuz, hızlı, yan etkisi az olan çözüm yöntemleri üzerinde çalışmaktadırlar. Bu noktada ilaçların yeniden kullanımı stratejisi (Drug repurposing) ön plana çıkmaktadır (Ashburn ve ark., 2004; Scannell ve ark., 2012; Pushpakom ve ark., 2018). Tez kapsamında da bu stratejiden yararlanılarak Valproik asit ve Spironolaktonun kombinasyon etkinliği akciğer kanseri hücre soylarında değerlendirilmiştir.

Bu amaçla, hücrelere, VPA, SP ve her ikisi ile eş zamanlı olacak şekilde kombinasyon tedavi modeli uygulanmış ve hücre canlılığı SRB yöntemiyle belirlenmiştir. VPA'nın 48 saatlik tedavi sonrası A549 hücre soyundaki IC_{50} değeri 6.8 mM (Kalantar ve ark., 2021) ve H1299 hücre soyundaki IC_{50} değeri ise 6 mM olarak (Shirsath ve ark., 2013) rapor edilmiştir. SP'nin ise mesane kanseri KU-19-19 hücre soyunda IC_{50} dozu 37.4 µM olarak raporlanmıştır (Xu., 2019). Tez kapsamında çalışılan hücrelerde, bu ajan için literatür verisi yoktur.

Bununla birlikte tez kapsamında ilgili tedavi süreleri sonunda (48-72), SRB yöntemi dikkate alınarak hesaplanan IC_{50} değerlerine göre; 48 saat VPA tedavisi için her iki hücre soyunda da >5 mM iken, SP için A549 hücre soyunda 26,9 µM, H1299 hücre soyunda ise 46,4 µM olarak hesaplanmıştır. 72 saat tedavi uygulamalarında ise

VPA tedavisi için her iki hücre soyunda da >5 mM iken, SP için A549 hücre soyunda 11,5 µM, H1299 hücre soyunda ise 42,9 µM olarak hesaplanmıştır. Her iki hücre soyu için hesaplanan VPA ve SP IC_{50} değerlerinin literatür ile korele olduğu saptanmıştır. Kombinasyon tedavi için hesaplanan IC_{50} değerleri ise; 48 saat tedavi uygulamasını takiben A549 hücre soyunda 1,55 mM + 15,5 µM, H1299 hücre soyunda 1,9 mM + 18,5 µM olarak hesaplanırken, 72 saat tedavi sonrası A549 hücre soyunda 1,1 mM + 10 µM, H1299 hücre soyunda ise 2,2 mM + 22 µM olarak hesaplanmıştır. Kombinasyon tedavi için literatürde herhangi bir çalışma olmadığından karşılaştırma yapılamamaktadır. Bunula birlikte, VPA için belirtilen IC_{50} dozu kombinasyon uygulamasıyla belirgin şekilde azalmıştır ve ilaçların tek kullanımları ile kıyaslandığında daha düşük dozlarda daha güçlü etki saptanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında kombinasyon tedavi uygulanan A549 akciğer kanseri hücre soyunun, H1299 akciğer kanseri hücre soyuna kıyasla daha hassas olduğu hem mikroskop görüntüleri hem de doza ve zamana bağlı yapılan canlılık analiziyle elde edilen diğer bir bulgudur. SRB çalışmasını takiben kombinasyon tedavinin (72 saat) istatiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla CalcuSyn yazılımı yardımıyla doz-etki eğrileri gösterildi ve kombinasyon indeksi (CI) değerleri hesaplandı. Her iki hücre soyunda da 2.5 mM + 25 µM dozları sinerjistik etki göstermektedir.

Valproik asit (VPA), umut verici yeni antineoplastik ajan sınıfına ait olan onaylanmış bir HDAC inhibitörüdür. Son dönemlerde çeşitli kanser türlerinde gerçekleştirilen çalışmalarda apoptozisi desteklediği saptanmıştır. Buna göre, A549 hücre soyunda 9 mM VPA tedavisinin (72 saat) Kaspaz-3 aktivasyonunu arttırdığı saptanmıştır (Niknamian, 2019). Bir diğer çalışmada ise 3 mM VPA tedavisinin (48 saat) tiroid kanser hücre soyu BHT-101 hücrelerinde kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunu arttırarak apoptozisin içsel yolağının tetiklendiği rapor edilmiştir (Catalano ve ark., 2005). Hücre ölüm modunun belirlenmesi için hücre canlılığını sinerjistik şekilde azaltan ve her iki hücre grubunda tedavi yanıtının farklı/kıyaslanabilir olduğu VPA 2.5 mM ve SP 25 µM konsantrasyonları için apoptotik hücre ölümü akım sitometrisinde 24 ve 48 saat süresince Annexin-V-FITC ve Kaspaz-3/7 aktivasyonu metotları ile değerlendirildi. Literatürle karşılaştırıldığında VPA'nın 2.5 mM dozunun A549 hücrelerinde hem Annexin-V-FITC hem de Kaspaz-3/7 aktivasyonu değerlendirmesi sonucu görece zamana bağlı olarak apoptozisi arttığı saptanmıştır. H1299 hücre

soyunun kıyaslanması için literatürde herhangi bir veri bulunmazken, çalışma sonucunda VPA tedavisi sonrası Annexin-V-FITC ve Kaspaz-3/7 aktivasyonu testlerinde belirgin bir fark gözlemlenmedi. Potasyum tutucu bir diüretik olan Spironolakton farklı DNA onarım mekanizmalarını inhibe ederek yumurtalık ve kolon kanseri hücrelerini diğer tedavilere karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Brino ve ark., 2014; Shahar ve ark., 2014; Gold ve ark., 2019). Gerçekleştirilen literatür taramalarında SP'nin genel itibari ile tek başına etkisi incelenmezken daha sık şekilde kombinasyon çalışmalarda yardımcı ajan olarak kullanıldığı gözlemlenmiştir. Mesane kanseri üzerinde gerçekleştirilen çalışmada SP ve Cisplatin kombinasyonunun apoptozisi arttırdığı saptanmıştır (Mohler ve ark., 2019). Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda ise A549 hücrelerinde SP'nin 25 µM dozunun tek başına kullanımında hem Annexin-V-FITC hem de Kaspaz-3/7 aktivasyonu sonuçları zamana bağlı olarak incelendiğinde belirgin bir fark gözlemlenmezken, H1299 hücre soyunda bunun tam tersi bir etki söz konusu olup zamana bağlı olarak hem Annexin-V-FITC hem de Kaspaz-3/7 aktivasyonunun arttığı saptanmıştır. Hücreler arasındaki ilaca yanıt farkının temel sebebinin hücrelerin sahip oldukları genetik mutasyonların farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle bu noktada A549 hücrelerinin p53 doğal tip olmaları ve H1299 hücrelerinin p53 yoksun olmaları dolayısıyla apoptozis aşamasında ilaca farklı yanıt gelişmiş olabilir. Ayrıca bir diğer saptanan durum ise zamana bağlı şekilde Annexin-V-FITC ve Kaspaz-3/7 aktivasyon sonuçları incelendiğinde, VPA'nın zamana bağlı etkinliği hücre bazında karşılaştırıldığında A549 hücrelerinin, H1299'lara kıyasla daha fazla etkilendiği saptanmıştır. Buna ek olarak SP'nin ise tam tersi şekilde H1299 hücreleri üzerinde nispeten, A549 hücrelerine kıyasla daha etkili olduğu saptanmıştır. Bu durumun ise ilaçların farklı etki mekanizmalarına sahip olmasının yanında yine özellikle hücrelerin genetik farklılıklarının da etkili olduğu düşünülmektedir.

Kombinasyon tedavi için 24 ve 48 saat süre ile 2.5 mM + 25 µM dozları hücrelere uygulandı. Gerçekleştirilen Annexin-V-FITC ve Kaspaz-3/7 aktivasyon testleri sonucu her iki hücre hattında da kombinasyon tedavinin ilaçların tek kullanıma kıyasla dramatik şekilde apoptozisi arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca her iki hücre soyu için 48 saat süre ile uygulanan kombinasyon tedavinin hücrelerin %50'sinde kaspaz-3/7 aktivasyonunu tetiklediği gözlemlenmiştir. Ek olarak A549 hücre soyu H1299 hücre

soyu ile kıyaslandığında zamana bağlı olarak kombinasyon tedaviden daha fazla etkilendiği saptanmıştır. Bu durum sitotoksisite testlerinde gözlemlenmiş olan A549 hücrelerinin, H1299'a kıyasla kombinasyon tedaviye karşı daha hassas olduğu çıkarımını desteklemektedir.

Düşük dozlarda VPA'nın p53'e bağlı olarak kolon kanserinde radyoterapi duyarlılığını arttırdığı vurgulanmaktadır. Yapılan bir çalışmada, $p53^{+}$ (doğal tip) HCT116 hücre soyunda 500 µM VPA ön tedavisinin mitokondri membran potansiyelinin (% MMP) kaybının artışına neden olduğu raporlanmıştır (Chen ve ark., 2009). Ayrıca gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise 3-15 mM arasında değişen dozlarda uygulanan VPA tedavisinin HeLa servikal kanser hücre soylarında membran potansiyelinin (% MMP) kaybının artışına neden olduğu bildirilmiştir (Han ve ark., 2013). Bu tez kapsamında her iki hücre soyunda da ilaçların tek ve kombinasyon kullanımlarının mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkisi 24 ve 48 saat süre ile incelenmiştir. Literatürü doğrular nitelikte VPA'nın 2.5 mM tedavisi A549 ($p53^{+}$, doğal tip) hücre soyunda nispeten, H1299'a ($P53^{-}$, yoksun) kıyasla depolarize mitokondri yüzdesini zamana bağlı olarak daha fazla arttırmıştır.

Literatür taramaları sonucu SP'nin tek başına kullanımında mitokondri membran potansiyelinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmazken, her iki hücre soyunda da süre bağımlı olarak tüm tedavi gruplarında toplam depolarize mitokondri yüzdesi artarken, nispeten kombinasyon tedavilerinde depolarize mitokondri yüzdesi ilaçların tek kullanımlarına kıyasla daha fazladır. Ancak mitokondri membranı bozulmamış (intakt) ölü hücre yüzdesinin, depolarize alanlara kıyasla daha fazla arttığı gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda her iki hücre soyunda da ilaçların tek/kombine kullanımlarda meydana gelen apoptozis mekanizmasının mitokondri bağımsız çalıştığı varsayılabilir.

Epitelyal-Mezenkimal dönüşüm geçiren hücrelerinin göç kapasitesinin arttığı ve bu yolla metastaz yapabildiği bilinmektedir (Heerboth ve ark., 2015). Gerçekleştirilen bir çalışmaya göre 2,2 mM, 4,5 mM ve 9 mM artan dozlarında VPA ile (72 saat) tedavi edilen A549 hücrelerinde, dozlarla doğru orantılı şekilde kanserde metastaz göstergeleri olarak kabul edilen CD44v6, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarının azaldığını rapor etmişlerdir (Kalantar ve ark., 2021). SP'nin 56 µM dozunun (26 saat) HCT116 ve HT29 kolon kanseri hücre soylarında hücre göçünü önemli ölçüde bastırdığı saptanmıştır

(Leung ve ark., 2013). Hücrelerin göç kapasitesinin test edilmesini amacıyla yara iyileşme deneyi VPA 1.25 mM ve SP 12.5 μM tedavi konsantrasyonları ile A549 ve H1299 akciğer kanseri hücre soylarında gerçekleştirildi. Test sonucu 0-24-48 saat çalışmalarından elde edilen bulgulara göre deney grupları arasında göç yeteneği açısından biyolojik olarak herhangi anlamlı bir sonuç gözlemlenmedi. Sonuçlar incelendiğinde literatürde her iki ilaç içinde anti-göç etkisi vurgulanan dozların bu tez kapsamında elde edilen IC_{50} değerlerine yakın olduğu saptanmış olup, göç yeteneğinin incelenmesi için kullanılan dozların (VPA 1.25 mM ve SP 12.5 μM) rapor edilen değerlerden daha düşük olmasının göç hareketini engellemediği gözlemlenmiştir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak, bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar klinikte halihazırda farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan Valproik asit ve Spironolakton ilaçlarının tek kullanımlarına kıyasla kombinasyon tedavilerinin insan akciğer kanseri hücre soylarında (A549 ve H1299) apoptozisi tetiklediğini göstermiştir. Bu çalışma Valproik asit ve Spironolakton ikilisinin kombinasyon şeklinde kullanımının alternatif bir tedavi modeli olabileceğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada bulunmayan farklı tip kanser hücre soylarında da testler gerçekleştirilerek olası kullanım ve etki alanının arttırılabileceği öngörülmüştür. Daha ileri çalışmalar gerçekleştirilerek bu kombinasyon modelini klinik uygulamalara dahil etmek için *ex vivo* ve *in vivo* deneyleri takiben farmokokinetik ve farmakodinamik etkilerinin araştırılabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKÇA

Amin, A. R. M. R., Karpowicz, P. A., Carey, T. E., Arbiser, J., Nahta, R., Chen, Z. G., Dong, ve ark. (2015). Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Seminars in Cancer Biology*, *35*, S55–S77.

Anonim. (2020). National Human Genome Research Institute/Chromatin. Erişim: 10/05/2021 https://www.genome.gov/genetics-glossary/Chromatin

Anonim. (2020). SCLC vs. NSCLC: What's the Difference? | *NFCR Lung Cancer Awareness.* Erişim: 16/07/2021 https://www.nfcr.org/blog/small-cell-lung-cancer-vs-non-small-cell-lung-cancer-whats-the-difference/

Anonim. (2020). Spironolactone: Uses, Dosage, Side Effects - *Drugs.com*. Erişim: 22/07/2021 https://www.drugs.com/spironolactone.html

Anonim. (2021). What Is Cancer? - *National Cancer Institute*. (n.d.). Erişildi: 26/07/2021 https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer

Ashburn, T. T., & Thor, K. B. (2004). Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, *3*(8), 673–683.

Ashkenazi, A., Dixit, V. M., Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (2016). *Linked references are available on JSTOR for this article : Death Receptors : Signaling and Modulation*. *281*(5381), 1305–1308.

Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*, *357*(9255), 539–545.

Bertolini, F., Sukhatme, V. P., & Bouche, G. (2015). Drug repurposing in oncology-patient and health systems opportunities. In Nature Reviews Clinical Oncology (Vol. 12, Issue 12, pp. 732–742). Nature Publishing Group.

Bhateja, P., Chiu, M., Wildey, G., Lipka, M. B., Fu, P., Yang, M. C. L., Ardeshir-Larijani, F., Sharma, N., & Dowlati, A. (2019). Retinoblastoma mutation predicts poor outcomes in advanced non small cell lung cancer. *Cancer Medicine*, *8*(4), 1459–1466.

Breckenridge, A., & Jacob, R. (2018). Overcoming the legal and regulatory

barriers to drug repurposing. *Nature Reviews Drug Discovery*, *18*(1), 1–2.

Brino, L., Egly, J., & Larsen, A. K. (2014). Article A Small Molecule Screen Identifies an Inhibitor of DNA Repair Inducing the Degradation of TFIIH and the Chemosensitization of Tumor Cells to Platinum. *Chemistry & biology* 398–407.

Brognard, J., Clark, A. S., Ni, Y., & Dennis, P. A. (2001). Akt/pbotein kinace B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Research*, *61*(10), 3986–3997.

Brose, M. S., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Gerrero, R., ve ark. (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Research*, *62*(23), 6997–7000.

Brzeziańska, E., Dutkowska, A., & Antczak, A. (2013). The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis. *Molecular Biology Reports*, *40*(1), 309–325.

Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O., & Irimie, A. (2009). Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncologica*, *48*(6), 811–821.

Catalano, M. G., Fortunati, N., Pugliese, M., Costantino, L., Poli, R., Bosco, O., & Boccuzzi, G. (2005). Valproic Acid Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Poorly Differentiated Thyroid Cancer Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 90*(3), 1383–1389.

Chen, W. Y., Zeng, X., Carter, M. G., Morrell, C. N., Chiu Yen, R. W., Esteller, M., ve ark. (2003). Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nature Genetics*, *33*(2), 197–202.

Chen, X., Wong, P., Radany, E., & Wong, J. Y. C. (2009). HDAC Inhibitor, Valproic Acid, Induces p53-Dependent Radiosensitization of Colon Cancer Cells,. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals. 24*(6).

Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming Growth Factor-β Signaling–Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. *Molecular Cancer Research*, *6*(10), 1521–1533.

Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, *58*(3), 621–681.

Chowdhury, I., Tharakan, B., & Bhat, G. K. (2006). Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. *Cellular and Molecular Biology Letters*, *11*(4), 506–525.

Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis*, *30*(7), 1073–1081.

Cooper, W. A., Lam, D. C. L., O'Toole, S. A., & Minna, J. D. (2013). Molecular biology of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, *5*(SUPPL.5).

Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., & Marshall, C. J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*, *77*(6), 841–852.

Cully, M., You, H., Levine, A. J., & Mak, T. W. (2006). Beyond PTEN mutations: The PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, *6*(3), 184–192.

Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., ve ark. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, *417*(6892), 949–954.

Dérijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I. H., Han, J., Ulevitch, R. J., & Davis, R. J. (1995). Independent human MAP kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*, *267*(5198), 682–685.

Ding, L., Getz, G., Wheeler, D. A., Mardis, E. R., McLellan, M. D., Cibulskis, K., ve ark. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, *455*(7216), 1069–1075.

Doonan, F., & Cotter, T. G. (2008). Morphological assessment of apoptosis. *Methods*, *44*(3), 200–204.

Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, *3*(1), 11–22.

Duenas-Gonzalez, A., Candelaria, M., Perez-Plascencia, C., Perez-Cardenas, E., de la Cruz-Hernandez, E., & Herrera, L. A. (2008).: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors - *Cancer Treatment Reviews*., 34(3), 206-222.

Duma, N., Santana-Davila, R., & Molina, J. R. (2019). Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, *94*(8), 1623–1640.

Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T. Vanden, & Vandenabeele, P. (2009). Major

cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, *11*(13), 1050–1062.

Edinger, A. L., & Thompson, C. B. (2004). Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, *16*(6), 663–669.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *In Toxicologic Pathology* (Vol. 35, Issue 4, pp. 495–516). NIH Public Access.

Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, *7*(8), 606–619.

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L., & Henson, P. M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation*, *5*(7), 551–562.

Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Ilio, C. Di, & Laurenzi, V. De. (2012), Role of apoptosis in disease. *Aging*. *4*(5), 330–349.

Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I, B. F. (2020). International Agency for Research on Cancer 2020. *Global Cancer Observatory: Cancer Today.*, *419*, 1–2. Erişildi:10/06/2021 https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf

Fiorentino, F. P., Macaluso, M., Miranda, F., Montanari, M., Russo, A., Bagella, L., & Giordano, A. (2011). CTCF and BORIS regulate Rb2/p130 gene transcription: A novel mechanism and a new paradigm for understanding the biology of lung cancer. *Molecular Cancer Research*, *9*(2), 225–233.

Gabriel, J. A. (Ed.). (2007). *The biology of cancer*. John Wiley & Sons.

Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, *13*(9), 1423–1433.

Genton, P., Semah, F., & Trinka, E. (2006). Valproic acid in epilepsy. Drug safety, 29(1), 1-21.

Gold, A., Eini, L., Nissim-Rafinia, M., Viner, R., Ezer, S., Erez, K., ve ark. (2019). Spironolactone inhibits the growth of cancer stem cells by impairing DNA damage response. *Oncogene*, *38*(17), 3103–3118.

Gomez-Pinillos, A., & Ferrari, A. C. (2012). MTOR Signaling Pathway and mTOR Inhibitors in Cancer Therapy. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *26*(3), 483–505.

Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. Cell Tissue Res. *Cell Tissue Res*, *301*, 5–17.

Han, B. O. R. A. M., You, B. O. R. A., & Park, W. O. O. H. (2013). Valproic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via caspase-dependent apoptosis. *Oncology Reports* 2999–3005.

Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, *86*(3), 353–364.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674.

Harbour, J. W., Lai, S. L., Whang-Peng, J., Gazdar, A. F., Minna, J. D., & Kaye, F. J. (1988). Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science*, *241*(4863), 353–357.

Heerboth, S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., Byler, S., Lapinska, K., Willbanks, A., & Sarkar, S. (2015). EMT and tumor metastasis. *Clinical and Translational Medicine*, *4*(1).

Hirsch, F. R., Scagliotti, G. V., Mulshine, J. L., Kwon, R., Curran, W. J., Wu, Y. L., & Paz-Ares, L. (2017). Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet*, *389*(10066), 299–311.

Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., ve ark. (2004). NF-κB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *Journal of Clinical Investigation*, *114*(4), 569–581.

Hussain, S. P., Hofseth, L. J., & Harris, C. C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer*, *3*(4), 276–285.

Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, *2*(4), 277–288.

Jin, G., Kim, M. J., Jeon, H. S., Choi, J. E., Kim, D. S., Lee, E. B., ve ark. (2010). PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*, *69*(3), 279–283.

Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The Epigenomics of Cancer. *Cell*, *128*(4), 683–692.

Jorde, L. B., Carey, J. C., & Bamshad, M. J. (2019). *Medical genetics*. Elsevier Health Sciences. Erişim: 21/04/2021 https://www.elsevier.com/books/medical-

genetics/jorde/978-0-323-59737-1

Kalantar, H., Rashidi, M., Kalantar, M., & Tavallaei, M. (2021). Anticancer Effects of Valproic Acid via Regulation of Epigenetic Mechanisms in Non-small-cell Lung Cancer A549 Cell Line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 20.1 (2021): 133-140,

Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., ve ark. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, *502*(7471), 333–339.

Kierszenbaum, Abraham L., and Laura Tres. Histology and cell biology: an introduction to pathology E-book. Elsevier Health Sciences, 2015.

Knudson, A. G. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(23), 10914–10921.

Larsen, J. E., & Minna, J. D. (2011). Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. *Clinics in Chest Medicine*, *32*(4), 703–740.

Lavrik, I. N., Golks, A., & Krammer, P. H. (2005). Caspase: Pharmacological manipulation of cell death. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(10), 2665–2672.

Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U. I., Yang, Y. W., & Buchanan, P. (2015). Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, *1856*(2), 189–210.

Leung, W., Vong, Q. P., Lin, W., Janke, L., Chen, T., & Leung, W. (2013). Modulation of NKG2D ligand expression and metastasis in tumors by spironolactone via RXR activation. *Journal of Experimental Medicine* 210.12 (2013): 2675-2692.

Li, T., & Wang, G. (2014). Computer-aided targeting of the PI3K/Akt/mTOR pathway: Toxicity reduction and therapeutic opportunities. *In International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 15, Issue 10).

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *2*(April).

Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*, *104*(4), 487–501.

Loeb, L. A. (1986). Microsatellite Instability: Marker of a Mutator Phenotype in Cancer. *Cancer Research*, *54*(19), 5059–5063.

Mansour, S. J., Candia, J. M., Gloor, K. K., & Ahn, N. G. (1996). Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAPKK1) and MAPKK2 mediate

similar transcriptional and morphological responses. *Cell Growth and Differentiation*, *7*(2), 243–250.

Mansour, S. J., Matten, W. T., Hermann, A. S., Candia, J. M., Rong, S., Fukasawa, K., ve ark. (1994). Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science*, *265*(5174), 966–970.

Mantovani, F., Collavin, L., & Del Sal, G. (2019). Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death and Differentiation*, *26*(2), 199–212.

Marchetti, A., Felicioni, L., Malatesta, S., Sciarrotta, M. G., Guetti, L., Chella, A., ve ark. (2011). Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *Journal of Clinical Oncology*, *29*(26), 3574–3579.

Marsit, C. J., Zheng, S., Aldape, K., Hinds, P. W., Nelson, H. H., Wiencke, J. K., & Kelsey, K. T. (2005). PTEN expression in non-small-cell lung cancer: Evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Human Pathology*, *36*(7), 768–776.

Martin, S. J. (2014). Caspases: Executioners of Apoptosis. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*, *16*, 145–152.

McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, *120*(1), 5.1.1-5.1.11.

Meier, P., Finch, A., & Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature Publishing Group* (Vol. 407, Issue 6805, pp. 796–801).

Meunier, H. (1963). Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid. *Therapie*, *18*, 435-438.MEUNIERMeunier, & H. (1963). Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid. *Therapie*, *18*, 435–438. Erişildi: 9/07/2021 https://ci.nii.ac.jp/naid/10019699871

Michaelis, M., Doerr, H. W., & Cinatl Jr., J. Valproic Acid As Anti-Cancer Drug. *Bentham Science Publishers*, Cilt 13, Sayı 33, 2007, s. 3378-3393(16)

Milella, M., Falcone, I., Conciatori, F., Incani, U. C., Del Curatolo, A., Inzerilli, N., ve ark. (2015). PTEN: Multiple functions in human malignant tumors. *Frontiers in Oncology*, *5*(FEB), 1–14.

Mohler, J., Goodrich, D., & Li, Q. (2019). MP51-16 Copyright © 2019 American Urological Association Education and Research , Inc . Unauthorized reproduction of this article is prohibited . *Copyright © 2019 American Urological Association Education and Research , Inc . Unauthorized reproduction of . 201*(4),

729–730.

Mokhtari, R. B., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., & Yeger, H. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, *8*(23), 38022.

Mourenza, Á. Bravo-Santano, N. Gil, A. J. Mateos, L. M. Letek, M. Drug Repurposing: A Quick and Easy Way of Finding New Medicines. 29/07/2021 https://kids.frontiersin.org/articles/10.3389/frym.2020.553424

Murakami, Y. (2013). Heterochromatin and Euchromatin. *Encyclopedia of Systems Biology*, 881–884.

Naoki, K., Chen, T. H., Richards, W. G., Sugarbaker, D. J., & Meyerson, M. (2002). Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Research*, *62*(23), 7001–7003.

Niknamian, S. (2019). Valproic Acid Inhibit Non-Small-Cell Lung Cancer (A549 Cell Line) Metastasis via Inhibition of CD44v6 and Nm23H1. *OSF Preprints.* (2019). *2*(2), 1–5.

Paik, P. K., Arcila, M. E., Fara, M., Sima, C. S., Miller, V. A., Kris, M. G., ve ark. (2011). Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *Journal of Clinical Oncology*, *29*(15), 2046–2051.

Peter, M. E., & Krammer, P. H. (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Current Opinion in Immunology*, *10*(5), 545–551.

Phan, L. M., Yeung, S. C. J., & Lee, M. H. (2014). Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biology and Medicine*, *11*(1), 1–19.

Platta, C. S., Greenblatt, D. Y., Kunnimalaiyaan, M., & Chen, H. (2008). Valproic Acid Induces Notch1 Signaling in Small Cell Lung Cancer Cells. *Journal of Surgical Research*, *148*(1), 31–37.

Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., ve ark. (2018). Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*, *18*(1), 41–58.

Rakoff-Nahoum, S. (2006). Why cancer and inflammation? *Yale Journal of Biology and Medicine*, *79*(3–4), 123–130.

Raso, M. G., & Wistuba, I. I. (2007). Molecular pathogenesis of early-stage non-small cell lung cancer and a proposal for tissue banking to facilitate identification of

new biomarkers. *Journal of Thoracic Oncology*, S128–S135.

Rekhtman, N., Paik, P. K., Arcila, M. E., Tafe, L. J., Oxnard, G. R., Moreira, A. L., (2012). Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: Lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clinical Cancer Research*, *18*(4), 1167–1176.

Renaud, S., Pugacheva, E. M., Delgado, M. D., Braunschweig, R., Abdullaev, Z., Loukinov, D., ve ark. (2007). Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors. *Nucleic Acids Research*, *35*(21), 7372–7388.

Rodenhuis, S., & Slebos, R. J. C. (1992). Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Research*, *52*(9 SUPPL.).

Sadiq, A. A., & Salgia, R. (2013). MET As a possible target for non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *31*(8), 1089–1096.

Salvesen, G. S., & Dixit, V. M. (1997). Caspases: Intracellular Minireview Signaling by Proteolysis of the protein, sometimes in inactivation, but never in degradation since their substrate specificity distin- guishes the caspases as among the most restricted of. *Cell*, *91*, 443–446.

Scagliotti, G. V., Selvaggi, G., Novello, S., & Hirsch, F. R. (2004). The Biology of Epidermal Growth Factor Receptor in Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, *10*(12), 4227s-4232s.

Scannell, J. W., Blanckley, A., Boldon, H., & Warrington, B. (2012). Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nature Reviews Drug Discovery*, *11*(3), 191–200.

Schmid, K., Oehl, N., Wrba, F., Pirker, R., Pirker, C., & Filipits, M. (2009). EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. *Clinical Cancer Research*, *15*(14), 4554–4560.

Sequist, L. V., Heist, R. S., Shaw, A. T., Fidias, P., Rosovsky, R., Temel, J. S., ve ark. (2011). Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Annals of Oncology*, *22*(12), 2616–2624.

Shahar, O. D., Kalousi, A., Eini, L., Fisher, B., Weiss, A., Darr, J., ve ark. (2014). A high-throughput chemical screen with FDA approved drugs reveals that the antihypertensive drug Spironolactone impairs cancer cell survival by inhibiting

homology directed repair. *Nucleic acids research 42*(9), 5689–5701.

Sharma, S., Kelly, T. K., Jones, P. A., Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1): 27–36.

Shirsath, N., Rathos, M., Chaudhari, U., Sivaramakrishnan, H., & Joshi, K. (2013). Lung Cancer Potentiation of anticancer effect of valproic acid , an antiepileptic agent with histone deacetylase inhibitory activity , by the cyclin-dependent kinase inhibitor P276-00 in human non-small-cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer*, *82*(2), 214–221.

Siddiqui, W. A., Ahad, A., & Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of Toxicology*, *89*(3), 289–317.

Singh, B., Carpenter, G., & Coffey, R. J. (2016). EGF receptor ligands: Recent advances [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research*, *5*(0), 1–11.

Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(3), 175–193.

Sleigh, S. H., & Barton, C. L. (2010). Repurposing strategies for therapeutics. In Pharmaceutical Medicine. *Springer International Publishing.* cilt. 24, sayı 3, pp. 151–159

Soca-Chafre, G., Montiel-Dávalos, A., De La Rosa-Velázquez, I. A., Caro-Sánchez, C. H. S., Peña-Nieves, A., & Arrieta, O. (2019). Multiple Molecular Targets Associated with Genomic Instability in Lung Cancer. *International Journal of Genomics*, *2019*.

Sordella, R., Bell, D. W., Haber, D. A., & Settleman, J. (2004). Gefitinib-Sensitizing EGFR Mutations in Lung Cancer Activate Anti-Apoptotic Pathways. *Science*, *305*(5687), 1163–1167. doi: 10.1126/SCIENCE.1101637

Sun, Z., Shi, Y., Shen, Y., Cao, L., Zhang, W., & Guan, X. (2015). Analysis of different HER-2 mutations in breast cancer progression and drug resistance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *19*(12), 2691–2701.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249.

Toit, A. Du. (2013). Cell death: Balance through a bivalent regulator. *Nature*

Reviews Molecular Cell Biology, *14*(9), 546–547.

Torre, L. A., Siegel, R. L., & Jemal, A. (2016). Lung Cancer Statistics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *893*, 1–19.

Toufektchan, E., & Toledo, F. (2018). The guardian of the genome revisited: P53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. *Cancers*, *10*(5).

Tovar, E. A., & Graveel, C. R. (2017). MET in human cancer: Germline and somatic mutations. *Annals of Translational Medicine*, *5*(10), 6–11.

Tsurutani, J., West, K. A., Sayyah, J., Gills, J. J., & Dennis, P. A. (2005). Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway but not the MEK/ERK pathway attenuates laminin-mediated small cell lung cancer cellular survival and resistance to imatinib mesylate or chemotherapy. *Cancer Research*, *65*(18), 8423–8432.

Turner, B. M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays*, *22*(9), 836–845.

Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunagaran, D., Lavi, S., ve ark. (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(10), 5276–5287.

Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., ve ark. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, *35*, S185–S198.

Vousden, K. H., & Lane, D. P. (2007). P53 in Health and Disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(4), 275–283.

Weber, G. F. (2007). *Molecular mechanisms of cancer*. 645.

Wicha, M. S., Liu, S., & Dontu, G. (2006). Cancer stem cells: An old idea - A paradigm shift. *Cancer Research*, *66*(4), 1883–1890.

Widmann, C., Gibson, S., & Johnson, G. L. (1998). Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(12), 7141–7147.

Wistuba, I. I., Berry, J., Behrens, C., Maitra, A., Shivapurkar, N., Milchgrub, S., Mackay, B., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (2000). Molecular changes in the bronchial

epithelium of patients with small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, *6*(7), 2604–2610.

Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *2*(2), 127–137.

Yip, P. Y., Yu, B., Cooper, W. A., Selinger, C. I., Ng, C. C., Kennedy, C. W., Kohonen-Corish, M. R. J., ve ark. (2013). Patterns of DNA mutations and ALK rearrangement in resected node negative lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, *8*(4), 408–414.

Yuan, T. L., & Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: Variations on a theme. *Oncogene*, *27*(41), 5497–5510.

Zamarron, B. F., & Chen, W. (2011). Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *International Journal of Biological Sciences*, *7*(5), 651.

Xu*, D., Wang, L., Wu, Y., Smith, G., Kauffman, E., Mohler, J., ... & Li, Q. (2019). MP51-16 Spıronolactone, A Nucleotıde Excısıon Repaır Inhıbıtor, Potentıates Cytotoxıc Effect Of Cısplatın In Bladder Cancer Cells. *The Journal of Urology*, *201*(Supplement 4), e729-e730

İNTİHAL RAPORU

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme kondu: 10-Eyl-2021 03:17 +03
NUMARA: 1640003623
Kelime Sayısı: 16315
Gönderildi: 1

Mehmet Emin KÖSE Mehmet Emin KÖSE tarafından

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik
%16	Internet Sources: %10 Yayınlar: %2 Öğrenci Ödevleri: %12

4% match (18-Ara-2019 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) on 2019-12-18

4% match (02-Eyl-2021 tarihli öğrenci ödevleri)
Sınıf: Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi
Ödev: Master Tez
Ödev Numarası: 1640010626

1% match (27-Oca-2021 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) on 2021-01-27

1% match (28-Haz-2021 tarihli internet)
https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/1244/10330812.pdf?isAllowed=y&sequence=1

1% match (18-May-2021 tarihli internet)
http://acikerisim.uludag.edu.tr/jspui/bitstream/11452/18203/1/G%c3%bclseven_D%c3%96NE.pdf

1% match (15-Tem-2019 tarihli internet)
http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/5249/abdulsamet_sandal_tez_teslim.pdf?isAllowed=y&sequence=3

< 1% match (04-Ağu-2021 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) on 2021-08-04

< 1% match (23-May-2021 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) on 2021-05-23