



**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI  
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**A549 İNSAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA  
TRASTUZUMAB VE 5-FLUOROURASİL KOMBİNE İLAÇ  
TEDAVİSİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Elif KORKUT**

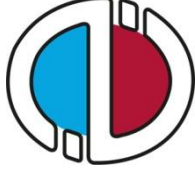
**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı**

**Dr. Öğretim Üyesi Onur EROĞLU**

**BİLECİK, 2018**

**Ref. No: 10206166**



**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI  
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**A549 İNSAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA  
TRASTUZUMAB VE 5-FLUOROURASİL KOMBİNE İLAÇ  
TEDAVİSİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Elif KORKUT**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı**

**Dr. Öğretim Üyesi Onur EROĞLU**

**BİLECİK, 2018**



**ANADOLU UNIVERSITY**



**BILECIK SEYH EDEBALI  
UNIVERSITY**

**Graduate School of Sciences**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF COMBINATION  
DRUG TREATMENT WITH TRASTUZUMAB AND 5-  
FLUOROURACIL ON A549 HUMAN LUNG CANCER  
CELL LINE**

**Elif KORKUT**

**Master's Thesis**

**Thesis Advisor**

**Asst. Prof. Onur EROĞLU**

**BILECIK, 2018**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS**

**JÜRİ ONAY FORMU**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 19/07/2018 tarihli ve 40/sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 01/08/2018 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Elif KORKUT'un "A549 İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattında Trastuzumab ve 5-Fluorourasil Kombine İlaç Tedavisinin Etkisinin İncelenmesi" başlıklı tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği/ oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

ÜYE (TEZ DANIŞMANI) : Dr. Öğr. Üyesi Onur EROĞLU

ÜYE : Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

ÜYE : Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS

ÜYE:Doç. Dr. Gökhan KUŞ

ÜYE:Dr. Öğr. Üyesi Oğuz ÇİLİNGİR

**ONAY**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun  
.../.../... tarih ve .../... sayılı kararı.

İMZA / MÜHÜR

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin ve çalışmamın her aşamasında bilgisinden ve ilgisinden faydalandığım tez danışmanım, değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Onur EROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca akademik olarak yetişmemi sağlayan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösterici olan başta Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü hocalarım olmak üzere, bütün hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığım hücre hattını bizimle paylaşan Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde görev yapan Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU hocama teşekkür ederim.

Tüm bu süreci birlikte paylaştığımız ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olduklarını hissettiren annem Nejla KORKUT'a, babam Sadi KORKUT'a ve kardeşim Ahmet Berat KORKUT'a sonsuz saygı, sevgi, minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Elif KORKUT

## ÖZET

Akciğer kanseri, dünyadaki en yaygın malignitelerden biridir ve kansere bağlı ölümün önde gelen nedenidir. Bu çalışmada, trastuzumab ve 5-fluorourasil kombinasyonunun HER2-pozitif insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı A549'da etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. A549, %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde 37 ° C'de %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI ortamında kültüre edilmiştir. MTT analizi, çeşitli konsantrasyonlarda trastuzumab, 5-fluorourasil ve kombinasyonun etkilerini değerlendirmek için yapılmıştır. Kombinasyon tedavisinin sitotoksik etkisini belirlemek için (24-144 saat) sağkalım deneyi yapılmıştır. Kombine kullanımlarının etkisi, yara iyileşmesi deneyi, koloni oluşumu deneyi ve soft-agar deneyi ile araştırılmıştır. Ayrıca kaspaz-3 kaspaz-7 ve kaspaz-9 apoptotik proteinleri incelenmiştir. MTT analizi ile IC<sub>50</sub> değerlerinin trastuzumab için 70µM, 5- fluorourail için 75µM ve kombine kullanımları için 30µM-30µM olduğu belirlenmiştir. Sağkalım analizi, trastuzumab 5-fluorourasil ile kombinasyon tedavisinin hücre canlılığını azalttığını göstermiştir. Kombinasyon uygulaması, yara iyileşmesi deneyinde kontrole kıyasla çizilen alana göçü inhibe etmiştir. Ayrıca soft agar ve koloni oluşum deneylerinde, kombinasyon uygulamalarının koloni oluşumunu inhibe ettiği görülmektedir. Kaspaz-3 seviyesi trastuzumab ve 5-fluorourasil uygulanan gruplarda artmışken, trastuzumab ve 5-fluorourasil kombinasyonu uygulanan grupta azalmıştır. Kaspaz-7 seviyesi ise trastuzumab uygulanan hücrelerde azalmıştır. Kaspaz-9 seviyesinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Literatürde ilk kez trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonunun A549 hücreleri üzerinde anti-proliferatif etki yarattığı belirlenmiştir. Kombine tedavi uygulamalarının mekanizmalarının net bir şekilde aydınlatılabilmesi için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Akciğer kanseri; trastuzumab; 5-fluorourasil

## ABSTRACT

Lung cancer is one of the most common malignancies in the world and the leading cause of cancer-related death. In this study, we aim to investigate the effects of combining trastuzumab and 5-FU on the HER2-positive human non-small cell lung cancer cell line A549. A549 was cultured in RPMI medium with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> incubator. MTT assay was performed to evaluate the effects of various concentrations of trastuzumab, 5-fluorouracil and combination. To determine the cytotoxic effect of drugs combination were used in survival assay (24-144h). The effect of Trastuzumab, 5-fluorouracil and combination were investigated by wound healing experiment, colony formation experiment and soft-agar experiment. Furthermore, caspase-3 caspase-7 and caspase-9 apoptotic proteins have been investigated. We observed that IC<sub>50</sub> values for trastuzumab, 5-fluorouracil and combination by MTT assay 70µM, 75µM and 30µM-30µM respectively. Survival analysis showed that combination therapy significantly reduced cell viability. Combination therapy were inhibited migration into the scratched area as compared to untreated cells. Furthermore, in soft agar and colony formation experiments, observed that combination treatments inhibit colony formation. While the levels of caspase-3 trastuzumab and 5-fluorouracil were increased, the combination of trastuzumab and 5-fluorouracil was reduced in the treated group. Caspase-7 level decreased in cells treated with trastuzumab. There was no significant change in the level of caspase-9. For the first time in the literature, it has been determined that the combination of trastuzumab-5-fluorouracil has an anti-proliferative effect on A549 cells. Further research is needed to clarify the mechanisms of combined treatment applications clearly.

**Keyword:** Lung cancer; trastuzumab; 5-fluorouracil

## İÇİNDEKİLER

**JÜRİ ONAY FORMU**

**TEŞEKKÜR**

**ÖZET..... III**

**ABSTRACT ..... IV**

**İÇİNDEKİLER ..... V**

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... IX**

**ŞEKİLLER DİZİNİ ..... XII**

**ÇİZELGELER DİZİNİ .....XIV**

**1 GİRİŞ ..... 1**

**2 GENEL BİLGİLER..... 3**

**2.1 Kanser..... 3**

**2.2 Akciğer Kanseri..... 4**

2.2.1 Akciğer kanseri epidemiyolojisi..... 4

2.2.2 Akciğer kanseri etiyolojisi..... 5

2.2.2.1 Akciğer kanserinde genetik risk faktörleri..... 7

**2.3 Akciğer Kanserinin Histopatolojisi..... 8**

2.3.1 Küçük hücreli akciğer kanseri ..... 8

2.3.2 Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ..... 9

2.3.2.1 Adenokarsinom..... 9

2.3.2.2 Skuamöz hücreli karsinoma..... 9

2.3.2.3 Büyük hücreli karsinom..... 10

<b>2.4 A549 Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Hattı</b>	<b>10</b>
<b>2.5 Akciğer Kanserinde Moleküler Prognostik Faktörler</b>	<b>10</b>
2.5.1 Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR)	11
2.5.2 Kirsten rat sarkoma viral onkogen homoloğu(KRAS)	11
2.5.3 Hepatosit büyüme faktörü reseptörü (MET)	12
2.5.4 V-raf mürin sarkoma viral onkogen homoloğu (BRAF)	12
2.5.5 Fosfatidilinisitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik alt ünite alfa (PIK3CA)	13
2.5.6 Anaplastik Lenfoma Reseptör Tirozin Kinaz (ALK)	13
2.5.7 RET proto-onkogeni	13
2.5.8 İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2	14
2.5.9 ROS proto-onkogeni	16
<b>2.6 Hücre Döngüsü</b>	<b>16</b>
<b>2.7 Apoptoz</b>	<b>18</b>
2.7.1 Akciğer kanserinde apoptotik sinyal iletiminde değişiklikler	23
<b>2.8 Akciğer Kanseri Tedavisi</b>	<b>26</b>
2.8.1 Trastuzumab	26
2.8.2 5-Fluorourasil	28
<b>3 MATERYAL VE METODLAR</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Kullanılan Malzemeler</b>	<b>30</b>
3.1.1 Kullanılan cihazlar	30
3.1.2 Sarf malzemeler	30
3.1.3 Kullanılan kimyasallar	31
3.1.4 Kullanılan çözeltiler	32
3.1.4.1 1X PBS tamponu	32
3.1.4.2 Hücre dondurma ortamı	32
3.1.4.3 1X RIPA tamponu	33

3.1.4.4 % 10APS.....	33
3.1.4.5 %10 SDS.....	33
3.1.4.6 1,5M Tris-HCl .....	33
3.1.4.7 0,5M Tris-HCl .....	33
3.1.4.8 1X Tris-Glisin-SDS yürütme tamponu.....	33
3.1.4.9 10X TBS tamponu .....	33
3.1.4.10 1X TBS tamponu .....	33
3.1.4.11 1X TBS-Tween 20 tamponu.....	33
3.1.4.12 %5 Süt.....	33
3.1.4.13 SDS poliakrilamid jel.....	34
3.1.4.14 Transfer tamponu .....	34
<b>3.2 Yöntemler.....</b>	<b>34</b>
3.2.1 Hücre kültürü .....	34
3.2.2 Kullanılan kemotrapötik ajanların hazırlanması.....	35
3.2.3 Hücre canlılığının belirlenmesi .....	35
3.2.4 Hücre sağkalım tayini .....	36
3.2.5 Yara iyileşmesi deneyi.....	36
3.2.6 Soft-agar koloni oluşum deneyi.....	37
3.2.7 Koloni oluşum deneyi.....	37
3.2.8 Protein izolasyonu ve tayini .....	38
3.2.9 SDS-PAGE elektroforezi.....	38
3.2.10 Western blotlama analizi .....	39
3.2.11 İstatistiksel analiz .....	39
<b>4 BULGULAR.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 A549 Hücre Hattında Trastuzumab 5-Fluorourasil ve Trastuzumab - 5-Fluorourasil Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Trastuzumab, 5-Fluorourasil ve Trastuzumab – 5-Fluorourasil Kombinasyonunun A549 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Gösterilmesi .....</b>	<b>47</b>

<b>5</b>	<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>49</b>
	<b>5.1 A549 Hücre Hattında Trastuzumab ile İlgili Literatür Bilgisi .....</b>	<b>49</b>
	<b>5.2 A549 Hücre Hattında 5-Fluorourasil ile İlgili Literatür Bilgisi.....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>56</b>
	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>57</b>
	<b>EK-1: Akciğer Kanserinde Tnm Evrelemesi.....</b>	<b>66</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl:	Mikrolitre
µM:	Mikromolar
µm:	Mikronmetre
ADCC:	Antikor bağımlı hücrel sitotoksosite
Apaf-1:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
APS:	Amonyum persülfat
ATM:	Serin/treonin kinaz
ATP:	Adenozin trifosfat
Bax:	Bcl-2-ilişkili protein X
Bcl-2:	B-hücreli lenfoma 2
BSA:	Sığır serum albümin
CAD:	Kaspaz aktive edici DNaz
DD:	Ölüm domaini
DED:	Ölüm efektör alanı
Diablo:	IAP-bağlanan mitokondriyal protein
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
dNTP:	Deoksinükleotid
DPD:	Dihidropirimidin dehidrojenaz
DR:	Ölüm reseptörü
dTMP:	Deoksitimidin monofosfat
dUMP:	Deoksiüridin monofosfat
dUTP:	Deoksiüridin trifosfat
ECL:	Güçlendirilmiş kemilüminesans
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
EGFR:	Epidermal büyüme faktör reseptörü
FasL:	Fas hücre yüzey ölüm reseptör ligandı
FBS:	Fetal sığır serumu
FdUMP:	Fluorodeoksiüridin monofosfat
FdUTP:	Fluorodeoksiüridin trifosfat
FLIP:	FLICE inhibitör proteini

FUTP:	Fluoroüridin trifosfat
GAPDH:	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GWAS:	Genom ilişkilendirme çalışmaları
HER2:	Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 2
HSP:	Isı şok proteini
IAP:	Apoptoz proteinlerin inhibitörü
IARC:	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IC <sub>50</sub> :	Yarı-maksimal inhibitör konsantrasyon
ICAD:	İnaktif kaspaz aktive edici DNaz
JNK:	c-Jun N-terminal kinaz
KCl:	Potasyum klorür
kDa:	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	Potasyum dihidrojen fosfat
KHAK:	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK:	Küçük hücre dışı akciğer kanseri
MET:	c-Met proto-onkogen, HGF reseptörü
ml:	Mililitre
MOMP:	Mitokondriyal dış zar geçirgenliği
MTT:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5)-Diphenyltetrazolium bromide
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	Disodyum hidrojen fosfat
NaCl:	Sodyum klorür
nm:	Nanometre
nM:	Nanomolar
PAH:	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PBS:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PI3K:	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PMSF:	Fenilmetilsülfonil florid
PTEN:	Fosfataz ve tensin homoloğu
RNA:	Ribonükleik asit
ROS:	Reaktif oksijen türevleri
Rpm:	Dakikadaki devir sayısı
RTK:	Reseptör tirozin kinaz

SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SNP:	Tek nükleotid polimorfizmi
STK:	Serin/treonin kinaz
TBS :	Tris- tamponlu tuz çözeltisi
TBST:	Tween 20 içeren tris- tamponlu tuz çözeltisi
TS:	Timidilat sentaz
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
XIAP:	X'e bağımlı apoptozis protein inhibitörü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Akciğer kanseri ölümlerin yaş gruplarına göre bölgelere göre dağılımı .....	5
<b>Şekil 2.2.</b> HER2 sinyalizasyonu.....	15
<b>Şekil 2.3.</b> Hücre döngüsünün şematik gösterimi. ....	17
<b>Şekil 2.4.</b> İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik sinyal iletim yolağı .....	18
<b>Şekil 2.5.</b> Kaspazların yapısı.....	19
<b>Şekil 2.6.</b> Apoptotik sinyal iletim yolları.....	21
<b>Şekil 2.7.</b> Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde IAP proteinleri ve kaspazların ekspresyon değişimleri. ....	25
<b>Şekil 2.8.</b> Trastuzumabın etki mekanizmasının şematik gösterimi. ....	27
<b>Şekil 2.9.</b> 5-fluorourasilin etki mekanizmasının şematik gösterimi. ....	28
<b>Şekil 4.1.</b> Trastuzumabın farklı dozlarının (0-110 $\mu$ M) A549 hücre hattında 48 saatte hücre canlılığı üzerine etkisi .....	40
<b>Şekil 4.2.</b> 5-Fluorourasilin farklı dozlarının (0-165 $\mu$ M) A549 hücre hattında 48 saatte hücre canlılığı üzerine etkisi .....	41
<b>Şekil 4.3.</b> Trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonunun farklı dozlarının (0-35 $\mu$ M) A549 hücre hattında 48 saatte hücre canlılığı üzerine etkisi .....	41
<b>Şekil 4.4.</b> Yara A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab 5-fluorourasil kombinasyonunun hücre proliferasyonu üzerine etkileri.....	42
<b>Şekil 4.5.</b> Trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab 5-fluorourasil kombinasyonun hücre göçü ve proliferasyonu üzerine etkileri).....	43
<b>Şekil 4.6.</b> Yara iyileşmesi deneyi yara genişliği ölçümleri.....	44
<b>Şekil 4.7.</b> Hücrelerin yüzeye yapışmasının engellendiği soft-agar ortamında trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonun hücre büyümesi üzerine etkileri. ....	44
<b>Şekil 4.8.</b> Soft-agar ortamında trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulanan grupların koloni sayıları. ....	45
<b>Şekil 4.9.</b> Soft-agar ortamında trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulanan grupların koloni sayılarının bağıl değerlendirmesi. ....	45
<b>Şekil 4.10.</b> Koloni oluşum deneyi görüntüsü.....	46
<b>Şekil 4.11.</b> Koloniler tarafından absorbe edilen kristal viyole miktarlarının spektrofotometrik ölçümü. ....	47

- Şekil 4.12.** Kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-9 ve GAPDH proteinlerine ait membran görüntüsü.....48
- Şekil 4.13.** Western blot yöntemi ile elde edilen bantların kalınlık ölçümleri. ....48

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b>Çizelge 2.1.</b> Apoptoz ve nekrozun çeşitli özelliklerinin karşılaştırılması.....	24
<b>Çizelge 3.1.</b> 1X PBS tampon içeriği.....	33
<b>Çizelge 3.2.</b> %12'lik SDS poliakrilamid jel içeriği.....	35

## 1 GİRİŞ

Hücrelerin çoğalması, sağkalımı ve diferansiyasyonu, organizmanın genel gereksinimlerine göre düzenlenmektedir. Hücrelerde bu olayların düzenlenmesinde etkili olan mekanizmaların aksaması veya ortadan kalkması ile hücreler kontrolsüz bir şekilde bölünerek çoğalmaya başlar. Kansere, neoplastik dönüşümlere veya anormal hücre büyümesine yol açan spesifik genlerin uygunsuz aktivasyonunu veya inaktivasyonunu tetikleyen çevresel faktörlerin neden olduğu genetik ve genetik olmayan değişimler neden olur. Hücrelerin anormal çoğalması ile ortaya çıkan tümör benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olabilir. Kanser 21. yüzyılın en önemli sağlık sorunlarının başında yer almaktadır.

Akciğer kanseri akciğer dokularını oluşturan hücrelerin kontrolsüz ve anormal çoğalması ile oluşan bir hastalıktır. Akciğer kanseri her iki cinsiyette de kanser ölümlerinin birinci nedenidir. Akciğer kanseri gelişiminde; genetik, epigenetik ve çevresel faktörleri içeren ve anahtar role sahip onkogenlerle tümör supresör genlerin düzensiz etkileşimlerine bağlı kanserle ilişkili sinyal yollarının aktivasyonuna yol açan çoklu karsinojenik aşamalar gözlenir.

Günümüzde dünyada en sık kanser türü olan akciğer kanseri tüm yeni kanser olgularının %12,8'ini oluşturur ve her yıl sıklığı %3 artmaktadır. Tüm kanser ölümleri içinde, akciğer kanserinin, her iki cinsiyette en sık ölüm nedeni olduğu ve kanser ölümlerinin de %17,8'inden sorumlu olduğu bilinmektedir. Akciğer kanserleri; küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olmak üzere 2 ana grupta sınıflandırılır. Akciğer kanserli olgunların yaklaşık %85'i küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tanısı almıştır.

Kanser tedavisinde başarıya ulaşmak için genellikle birden fazla kemoterapötik ajan uygulanmaktadır. Ancak, sonradan kazanılan ya da tedavi öncesi kişide mevcut olan ilaç dirençliliği, kanser kemoterapisinde başarıya ulaşmanın en büyük engelidir. Kemoterapiye karşı geliştirilen çoklu ilaç dirençliliği pek çok kemoterapötik ajanın hastalar üzerinde beklenen etkisini gösterememesine ve hastalığın daha agresif seyrine neden olmaktadır. İlaç dozunun artırılması ise hastalarda görülen yan etkilerin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca, dirençlilik nedeniyle zaman ve ilaç kaybı olmakta, hastaların tedavisi zorlaşmaktadır.

Apoptoz hücrelerin programlanmış ölümü olarak bilinen ve farklı morfolojik değişikliklerle karakterize olan hücresel bir süreçtir. Apoptoz, embriyonun gelişiminde anahtar rol oynarken erişkinlerde ise hücre proliferasyonunun dengede olması ve dokudaki hücre sayısının sabit tutulması gibi görevleri üstlenmesine ek olarak, DNA hasarı oluşan hücrelerin ve kanser oluşumunu indükleyebilecek gen mutasyonlarını taşıyan hücrelerin de organizmadan eliminasyonunu sağlar. Apoptoz mekanizması, kanser tedavisi için kemoterapötik ajan geliştirilmesi konusunda temel araştırma konuları arasında yer alan bir mekanizmadır.

Bu çalışmada; trastuzumab ve 5-fluorourasilin A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında; hücre canlılığı, hücre göçü üzerine etkileri ile birlikte hücrede apoptoz mekanizmasında görevli olan kaspaz-3 kaspaz-8 ve kaspaz-9 proteinleri üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

İleriye yönelik klinik denemeler için bu tür bir kombinasyon tedavisinin değerlendirilmesi, özellikle ilaç direnci geliştirme olasılığı olan hastalar için etkili tedavi seçeneklerinin sınırlı olması açısından acilen gereklidir. Başarılı olunduğu takdirde, her yıl akciğer kanserinden etkilenen 1 milyonu aşkın olgunun tedavi edilmesi, zaman ve maliyet açısından da avantajlı olarak mümkün olabilecektir.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kanser

Kanser teriminin ilk olarak Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-377) organizmada tedavi edilemeyen yeni oluşumları anlatmak için kullanıldığı bildirilmektedir. Hipokrat vücut yüzeyinde gelişen, diğerlerinden farklı karakterde olan, kırmızı renkli ve daha yavaş büyüyen şişliklere “Carcinos” ya da “Carcinoma” demiştir. (Ünal, 2006).

Hücrelerin çoğalması, sağkalımı ve farklılaşması organizmanın genel gereksinimlerine göre düzenlenmektedir. Kanser hücrelerinde bu olayların düzenlenmesinde etkili olan mekanizmalarda aksama veya ortadan kalkma söz konusudur. Böylelikle hücreler kontrolsüz bir şekilde bölünerek çoğalmaya başlar. Hücrelerin anormal çoğalması ile ortaya çıkan tümör benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olabilir. Benign tümörler çevredeki dokuya yayılmadan olduğu bölgede kalabilir. Ancak malign tümörler ilerleyen aşamalarda kan veya lenfatik sistem aracılığıyla vücuda metastaz yaparak organizmadaki normal doku ve organların işlevini etkiler (Cooper ve Hausmann, 2006). Kanserin günümüzde gittikçe artan sıklıkta görülmesi, yüksek oranda morbidite ve mortaliteye sebep olması bir sağlık sorunu olarak daha çok dikkat çekmesini sağlamıştır (Kutluk, vd., 2013). Normal bir hücrenin kanserleşme yolunda birçok mekanizma tarafından etkilendiği bilinmektedir fakat bu mekanizmaların tamamı günümüzde hala belirlenememiştir.

Kanser, hem Dünya’da hem de ülkemizde kardiyovasküler hastalıkların %33’lük oranının ardından %22 oranı ile en sık görülen ikinci ölüm nedenidir. GLOBOCAN 2012 verilerine göre Dünya’da toplam 14,1 milyon kanser vakası görülmüş ve Amerikan Kanseri Derneği 2015 verilerine göre 8,2 milyon ölüm kanser sebebi ile gerçekleşmiştir. Gelecek 20 yılda yeni vaka beklentilerinin %70 civarında artmasını beklemektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı’nın (IARC) tahmini verilerine göre 2030 yılında 24 milyon insanın kanser hastası olacağı, 17 milyon insanın kanser nedeniyle yaşamını yitireceği öngörülmektedir.

Günümüzde dünyada en sık kanser türü olan akciğer kanseri tüm yeni kanser olgularının %12,8’ini oluşturur ve her yıl sıklığı %3 artmaktadır. Tüm kanser ölümleri içinde, akciğer kanserinin, her iki cinsten en sık ölüm nedeni olduğu ve kanser ölümlerinin de %17,8’inden sorumlu olduğu bilinmektedir (Bakar, 2017).

## 2.2 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri akciğer dokularını oluşturan hücrelerin kontrolsüz ve anormal çoğalması ile oluşan bir hastalıktır. Akciğer kanseri her iki cinsiyette de kanser ölümlerinin birinci nedenidir (Cruz, 2011).

Akciğer kanserleri; küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olmak üzere 2 ana grupta sınıflandırılır. Akciğer kanserli olgunların yaklaşık %85'i küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tanısı almıştır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ayrıca skuamöz hücreli karsinoma, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinoma olarak sınıflandırılır (Wood, vd., 2015).

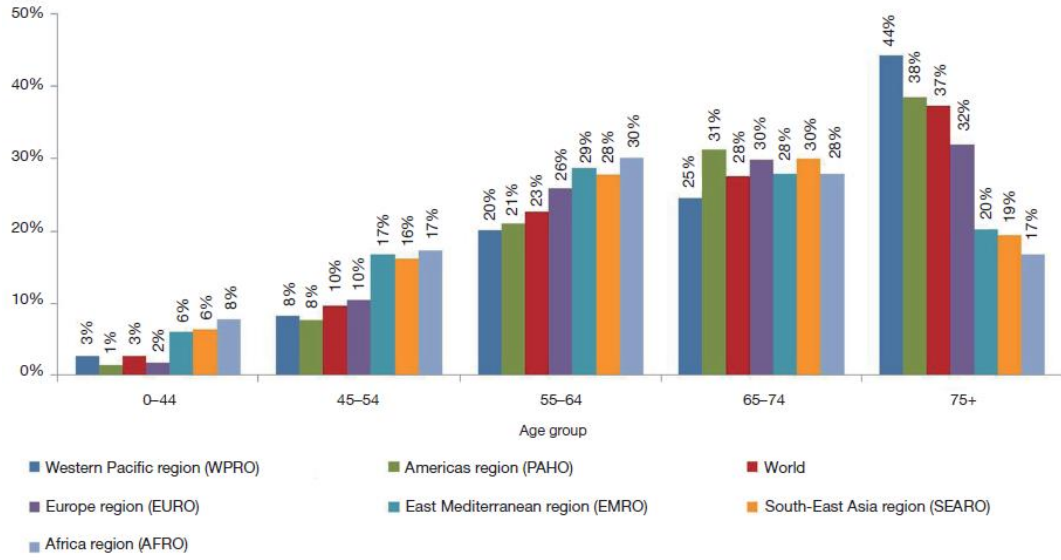
Sigara, akciğer kanseri için en önemli tek risk faktörüdür; bu, tüm akciğer kanseri türlerine neden olabilir, ancak küçük hücreli akciğer kanseri ve skuamöz hücreli karsinom ile daha güçlü bir şekilde bağlantılıdır (Dela Cruz, vd., 2011; Diniz, vd., 2017).

Akciğer kanseri gelişiminde; genetik, epigenetik ve çevresel faktörleri içeren ve anahtar role sahip onkogenlerle tümör supresör genlerin düzensiz etkileşimlerine bağlı kanserle ilişkili sinyal yollarının aktivasyonuna yol açan çoklu kanserojenik aşamalar gözlenir. Akciğer kanserinin küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri olarak sınıflandırılması tedavi için yeterli olmuşsa da, özellikle son yılda, akciğer kanser gelişiminde etkili birçok moleküler değişiklikler keşfedilmiş olup, bunlar daha çok adenokarsinomlarda saptanmaktadır (Diniz, vd., 2017).

### 2.2.1 Akciğer kanseri epidemiyolojisi

Günümüzde en sık görülen kanser türü olan akciğer kanseri, dünyadaki tüm yeni kanser olgularının %12,8'ini oluşturmaktadır. Her yıl sıklığının %3 oranında arttığı belirlenmiştir (Bingöl, 2014). 2012 yılında 1,6 milyondan fazla insan akciğer kanseri nedeniyle ölmüştür. Tütün içimi ile akciğer kanseri oluşumu arasındaki neden sonuç ilişkisi, hem ekolojik hem de klinik olarak kanıtlanmıştır. Küresel açıdan bakıldığında, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, artan tütün tüketimi eğiliminin ardından, akabinde akciğer kanseri mortalitesindeki yükselme eğilimlerinin görüldüğü görülmektedir. Tüm kanser ölümleri içinde, akciğer kanserinin, her iki cinsiyette en sık ölüm nedeni olduğu ve kanser ölümlerinin de %17,8'inden sorumlu olduğu bilinmektedir. Genel akciğer kanseri insidansı: erkeklerde kadınlardan daha yüksekken 1980'lerden beri erkekler için düşüş göstermektedir. Ayrıca akciğer kanseri insidansı 2000'li yılların ortalarından beri kadınlar için düşüş göstermektedir (1980'lerden bu yana artan eğilimin azaldığı

görülmektedir). Akciğer kanseri kötü prognoza sahiptir, bu da insidansın mortalite ile çok yakın olduğu anlamına gelir. Ortalama olarak akciğer kanseri beş yıllık göreceli hayatta kalma oranı %16'dır. Akciğer kanseri ölümlerin yaş gruplarına göre bölgelere göre dağılımı Şekil 2.1'de gösterilmiştir (Didkowska, vd., 2016; Groot ve Munden 2012; Dela Cruz, vd., 2011).



**Şekil 2.1.** Akciğer kanseri ölümlerin yaş gruplarına göre bölgelere göre dağılımı (her iki cinsiyeti de içermektedir) (Didkowska vd., 2016).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda en sık saptanan histolojik tip epidermoid kanserdir (Uysal ve Özgül, 2005). Akciğer kanseri haritası projesinde en sık saptanan histolojik tip %29,4 ile epidermoid karsinom iken, olguların %71,9'u küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olarak sınıflandırılmıştır. Sigara içmeyenlerde ve pasif içicilerde ise adenokarsinom en sık görülen histolojik alt tiptir (Özsu ve Özlü, 2013). Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı'nın 2014 yılı verilerine göre Türkiye'de akciğer kanserinin yaşa standardize insidans hızı erkeklerde 100.000'de 52,5 kadınlarda ise 100.000'de 8,7 olarak bildirilmektedir.

### 2.2.2 Akciğer kanseri etiyolojisi

Tütün ve tütün ürünlerinin kullanımı akciğer kanserinin en önemli nedenlerinden biridir. Diğer çevresel etkenlerin başında pasif içicilik gelmektedir. Bunların yanı sıra mesleksel veya çevresel radon, asbest, silika, polisiklikaromatik hidrokarbonlar ve klorometil eterler, ağır metal (kadmiyum, krom, nikel) maruziyeti, hava kirliliğidir.

Bireysel faktörlerin de akciğer kanseri gelişiminde rolü vardır. Karsinojen metabolizmasında rol oynayan sitokrom enzimleri ve DNA tamir mekanizmalarındaki bozukluk ya da polimorfizmler de önemlidir (Esin ve Çelik, 2013).

**Tütün ve tütün ürünleri:** Tütün ve tütün ürünleri kullanımı akciğer kanserini tetikleyen en önemli faktördür. Kronik sigara içimine tüketiminin, akciğer kanseri olgularının %90'ından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Sigara tüketiminin süresi ve yoğunluğu artmış akciğer kanseri riski ile doğrudan ilişkilidir. Sigara içen kişilerdeki akciğer kanseri riskinin sigara içmeyen kişilere oranla 20 ila 50 kat daha fazla olduğu düşünülmektedir (Hoffman, vd., 2001; Malthora, vd., 2016). Sigarada yaklaşık 40.000 tane kimyasal madde tanımlanmış ve bunların 60'tan fazlası karsinojen madde olarak tespit edilmiştir. Sigarada bulunan en güçlü karsinojenler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), N-nitrozaminler, aromatik aminler, piridin alkaloidleri ve heterosiklikaminlerdir (Yüksek, 2015). Bunların içinde, nikotinin nitrozasyonundan oluşan nitrozamin 4-(metil nitrozamin)-1-(3 piridil)-1-bütanon (NNK) en güçlü ve en mutajen karsinojendir. Sigara dumanı 6000 kadar kimyasal maddeden oluşmaktadır ve bunlardan 55 kadarının karsinojen olduğu bilinmektedir. Sigaralardaki nikotin ve katran oranlarının düşürülmesine karşın kanser riski çok az düşmektedir (Özbaşıoğlu, 2013).

**Pasif içicilik:** Sigara dumanından pasif etkilenim ile akciğer kanseri riski erkeklerde %37, kadınlarda %22 artış göstermektedir. Çevresel sigara dumanına maruziyette (pasif içicilik) aktif sigara içenlere göre karsinojenlere maruziyetin yoğunluğu daha az olmasına rağmen maruziyet yaşı genelde daha erken başlayıp daha uzun sürmektedir (Taban, 2017).

**Çevresel etki ve mesleki maruziyet:** Mesleki maruziyetler, akciğer kanseri etiolojisinde önemli bir rol oynamaktadır ve bir dizi endüstride ve meslekte çalışan işçilerde akciğer kanseri riski artmaktadır. En önemli mesleki akciğer karsinojenlerinin asbest, silika, radon, ağır metaller ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar olduğu bildirilmiştir. Tüm farklı asbest türleri (krikoidolit, amosit ve tremolit dahil olmak üzere krizotil ve amfiboller), insan akciğerinde karsinojenik etkiye sahiptir. İç hava kirliliği, kötü havalandırılan evlerde kömür yakılması, odun ve diğer katı yakıtların yanmasından kaynaklanan dumanları içerir. Ev içi hava kirliliğinin akciğer kanseri riskinde artışa neden olduğu saptanmıştır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, hava kirliliğini risk faktörleri arasına dahil etmektedir (Taban, 2017).

### **2.2.2.1 Akciğer kanserinde genetik risk faktörleri**

Ailesinde akciğer kanseri veya genç yaşta akciğer kanseri gelişme öyküsü olan kişilerde akciğer kanser gelişme riskinde 2 kat artış vardır. Birinci derece yakınlarında akciğer kanseri bulunan hiç sigara içmemiş kişilerde, akciğer kanseri gelişme riski 2,7 kat fazladır (Zhu, vd., 2014; Matakidou, 2004).

**Aile öyküsü:** Yüksek riskli pedigrilerin bir bağlantı analizi, kromozom 6q23–25'e karşı önemli bir duyarlılık lokusu tanımlamıştır. Akciğer kanseri riski de, tümör baskılayıcı gen P53'te germ hattı mutasyonu ile karakterize Li-Fraumeni sendromu çerçevesinde artmaktadır (Malhotra, vd., 2016).

**Genetik polimorfizmler:** Son zamanlardaki genom boyu ilişki (GWA) çalışmaları, ortak genetik varyasyonları tanımlamak için bir milyon etiketleme tek nükleotid polimorfizmini (SNP) kullanarak akciğer kanseri riskinin altında yatan çoklu genetik polimorfizmleri tanımlayabilmiştir. Belirlenen üç ana duyarlılık lokusu, 15q25, 5p15 ve 6p21 bölgelerinde bulunmaktadır, bunların dışında birçok ortak varyant da bildirilmiştir. 15q25 duyarlılık bölgesi, nöronal ve diğer dokularda nikotinic asetilkolin reseptörlerini kodlayan üç kolinerjik nikotin reseptör genini (CHRNA3, CHRNA5 ve CHRNB4) içeren altı tanımlanmış kodlama bölgesi içerir. 15q25 lokusundaki varyantlar ayrıca tütün bağımlılığı ve sigara içimi davranışının artması ile birlikte gün başına içilen sigara sayısını arttırmak da dahil olmak üzere artmaktadır (Amos, vd.,2008; Thorgeirsson, vd., 2008; Malhotra, vd., 2016). Akciğer adenokarsinomlarının önemli bir fraksiyonunda yer alan yeni bir proto-onkogen, 14q13.3 amplifikasyon aralığında bulunan ve bir soya spesifik transkripsiyon faktörünü kodlayan NKX2-1 (NK2 homeobox 1, ayrıca TITF1 olarak da adlandırılır) olarak tanımlanmıştır (El-Telbany ve Ma, 2012).

**Diğer faktörler:** Daha önceden geçirilmiş hastalıkların (astım, tüberküloz, kronik bronşit, amfizem ve obstrüktif akciğer hastalıkları gibi) akciğer kanseri riskini arttırdığını gösteren çalışmalar vardır (Yüksek, 2015). Yüksek doz radyasyona maruz kalmış populasyonlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, akciğer kanserinin iyonize radyasyonla ortaya çıkan kanserlerden biri olduğunu göstermiştir (Özbaşoğlu, 2003). Geçirilmiş malignitelerin tedavisi için toraksa radyoterapi alan hastalarda akciğer kanseri riskinin arttığı saptanmıştır (Taban, 2017).

### 2.3 Akciğer Kanserinin Histopatolojisi

Akciğer kanseri genellikle mikroskop altında bakıldığında etkilenen hücrelerin büyüklüğüne bağlı olarak küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olmak üzere iki tipe ayrılır Küçük hücreli akciğer kanseri sıklıkla karaciğer, beyin, kemik ve adrenal bezlere (her böbreğin üstünde bulunan küçük hormon üreten bezler) sıklıkla metastaz yapar. Tanıdan sonra, küçük hücreli akciğer kanseri olan çoğu insan yaklaşık bir yıl hayatta kalır; yüzde yediden azı beş yıl hayatta kalır (Bakar, 2017).

Kanserin başlıca hücre tipleri küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) olup, ikinci kategori birkaç histolojik alt tip içerir, bunların başlıcaları skuamöz hücre kanseri, adenokarsinom ve büyük hücre kanseridir.

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, üç ana alt tipe ayrılır: adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli akciğer karsinomu. Adenokarsinom, akciğerler boyunca yer alan küçük hava keselerini (alveol) tutan terminal bronşiyol epitel hücrelerinden köken alır. Skuamöz hücreli karsinom, nefes borusundan (trakea) akciğerlere (bronşlar) giden pasajları hizalayan skuamöz hücrelerden kaynaklanır. Büyük hücreli karsinom, akciğerleri hizalayan epitelyal hücrelerden kaynaklanır. Büyük hücreli karsinom, adenokarsinom veya skuamöz hücreli karsinom gibi görünmeyen küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerini kapsar. (Özercan ve Şimşek, 2017)

Sigara içimi ile en güçlü ilişkisi olan hücre tipleri KHAK ve skuamöz hücreli akciğer kanseridir. Son yıllarda immünohistokimyada yeni teknikler hücre tipinin daha doğru tanımlanmasını sağlamıştır ve sigara içmeyenlerin adenokarsinomlarında epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyonları gibi prognostik ve tedavi etkileri olan spesifik genetik mutasyonların saptanması için testler mevcuttur (Groot, 2012).

#### 2.3.1 Küçük hücreli akciğer kanseri

Küçük hücreli akciğer tüm akciğer kanseri olgularının %14 kadarını oluşturmaktadır. Hemen tüm olgularda sigara ile ilişkilidir. Tanı anında çoğu olgunun ileri evre olduğu akciğer kanseri türüdür.

Akciğer kanserlerinde KHAK ve KHDAK olmak üzere ayırım yapılmasının nedeni KHAK'lerin daha agresif seyretmeleri, tanı anında metastaz yapmaları ve genellikle cerrahi şansın olmamasıdır. Küçük hücreli akciğer karsinomları, küçük hücreli

dışı akciğer karsinomlarından ayıran belli morfolojik özellikler vardır fakat asıl özellik; hücrelerin boyutu değil, kromatin yapısıdır. Tümör hücreleri tipik olarak, hücrelerin kolay zedelenebilmesi nedeni ile oluşan ezilme, çekilme, yığılma artefaktı oluşturan, yüksek mitotik aktivite gösteren ince granüler kromatine sahip, nükleolü belirsiz, yuvarlak ya da fuziform küçük nükleuslu, dar sitoplazmalıdır. Çoğu olguda nekroz görülmektedir. Damar duvarlarında tümör hücrelerinden çıkan artmış miktardaki DNA'nın oluşturduğu bazofilik görünüm Azzopardi etkisi olarak adlandırılan tipik bir bulgudur (Taban, 2017; Yener ve Apa, 2017; Yüksek, 2015)

### **2.3.2 Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri**

Akciğer kanserli olgunların yaklaşık %85'i küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tanısı almıştır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri skuamöz hücreli karsinoma, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinoma olarak sınıflandırılır (Yener ve Apa, 2017).

#### **2.3.2.1 Adenokarsinom**

Olgularda en sık görülen akciğer kanseri tipi olarak değerlendirilmektedir. Sigara içme alışkanlıklarındaki değişiklikler nedeniyle, adenokarsinom son yıllarda skuamöz hücreli karsinomu geçerek tüm akciğer kanseri olgularının yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Genelde sigara öyküsü olmayan kişilerde, kimi zaman skar dokusu zemininde gelişen bu tümör, terminal bronşiyol epitelinden köken alır. Tümör, histopatolojik açıdan incelendiğinde çoğu kez kompleks heterojen bir yapıya sahiptir. Bu yapı, lepidik, papiller, asiner, mikropapiller ve solid paternlerin bir ya da birkaçından oluşmaktadır (Yener ve Apa, 2017; Taban, 2017)

#### **2.3.2.2 Skuamöz hücreli karsinoma**

Bronş epitelinde skuamöz metaplazi veya displazinin odaklarının ilerlemesiyle gelişen, genelde ana bronşlarda santral yerleşimli tümörlerdir. Sigara ile ilişkilidir. Günümüzde adenokarsinomlardan sonra en sık rastlanan akciğer kanseri çeşididir. Gross olarak perihiler yumuşak dokular, akciğer parankimi ve hiler lenf nodlarını infiltre edebilir. Periferik yerleşimlilerde nodüler büyüme, santral nekroz ve kavitasyon gözlenir. Morfolojik olarak şeffaf hücreli, küçük hücreli, papiller, bazaloid varyantlar olmak üzere 4 varyantı vardır (Yener ve Apa, 2017).

### **2.3.2.3 Büyük hücreli karsinom**

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olgularının %3-5'ini oluşturur. Küçük hücreli karsinomun sitolojik özelliklerini taşımamaktadır ve sitolojik diferansiyasyon göstermez. Çoğunlukla periferik yerleşimli olup büyük hacimlidirler. Morfolojik olarak skuamöz ya da glandüler ayrımlaşma göstermez. İri ve poligonik nükleusları vardır, nükleolusu belirgin hücrelerden oluşan tümördür. Sigara ile ilişkilidir. Alt tipleri; büyük hücreli nöroendokrin karsinoma (kombine ya da saf), lenfoepitelyoma-benzeri karsinoma, bazaloid karsinoma, şeffaf hücreli karsinoma, rabdoid fenotipli büyük hücreli karsinom, hiç ayrımlaşmamış büyük hücreli karsinomadır.

### **2.4 A549 Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Hattı**

A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri, adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücreleridir. A549 hücreleri ilk kez 1972 yılında D.J. Giard vd., tarafından elde edilmiştir. Kanserli akciğer doku kültürü pulmoner adenokarsinoması bulunan 58 yaşındaki bir Kafkasyalı erkekten alınmıştır. Bu hücreler tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir. A549 hücreleri tümör süpresör P53 geninin yabancıl-tipine (wild-type) sahiptir. A549 hücreleri %24 oranında 66 kromozoma sahip (%22 oranında 64 kromozom) hipotriploid bir insan hücre hattıdır. Çoğu hücrede iki X ve iki Y kromozomu vardır. Bununla birlikte, analiz edilen 50 hücrenin %40'ında bir veya her iki kromozom kaybolmuştur. Kromozom N2 ve N6, hücre başına tek kopyaya sahiptir ve N12 ve N17 genellikle 4 kopyaya sahiptir. Sitogenetik bilgi hücre hattının başlangıç stoğuna dayanmaktadır (Lieber, vd., 1976).

Bunn, vd., (2001) A549 hücre hattının HER2 ekspresyon seviyesinin %72 olduğunu (SKBR3 hücre hattı HER2 ekspresyon seviyesi için referans hücre hattı kabul edilip %100 olarak kabul edildiğinde); A549 hücrelerinde rastlanan ortalama HER2 gen sayısının 3,7 olduğu, maksimum HER2 gen sayısının ise 8 olduğunu bildirmişlerdir.

### **2.5 Akciğer Kanseri Moleküler Prognostik Faktörler**

Son yıllarda akciğer kanseri genom analizinde görülmemiş gelişmeler, hastalığın daha derin bir moleküler ölçekte anlaşılmasını sağlamıştır. İlk olarak, tüm gen familyalarının (örn., protein kinome, lipid kinome ve tirozin fosfatome), akciğer kanserinde kanser genlerinin DNA mutasyonel profillemesinin bir parçası olarak analizi, hastalığın moleküler yapısı hakkında hayati bilgiler açıklamıştır. RAS / RAF / MEK /

MAP kinaz sinyal yolunun protein mutasyonları türünün büyük ölçekli sisteminde ilk olarak incelenmiştir.

Kansere bağlı mutasyonların keşfi, kanser genomunun sistematik olarak yeniden düzenlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. 188 insan akciğer adenokarsinomu vakasında yeni somatik mutasyonları keşfetmeyi amaçlayan bir çalışma, bilinen veya şüphelenilen kanserli aktiviteye sahip 623 genin DNA dizilemesinden sonra 1.000 somatik mutasyon ortaya çıkarmıştır. Muhtemel olarak yüksek bir mutagenез hızına sahip 26 geni tanımlanmıştır, bunları da muhtemelen tümör oluşumuna neden olduğu ifade edilmiştir. Sıklıkla mutasyona uğramış diğer genler arasında EGFR homoloğu ERBB4 gibi tirozin kinazlar ve EPHA3, VEGFR2 (KDR) ve NTKR gibi çoklu Ephrin reseptör genleri bulunur (Ding vd., 2008).

### **2.5.1 Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR)**

EGFR, günümüzde dünya çapında klinik ortamda yaygın olarak kullanılan, akciğer kanserinde moleküler hedefli tedavinin anahtar paradigmasıdır. Mevcut EGFR'yi hedefleyen mevcut ilaçlar 2 kategoriye ayrılabilir: küçük molekülü EGFR tirozin kinaz inhibitörü (TKI) olan gefitinib ve erlotinib ve monoklonal anti-EGFR antikoru olan setuksimab. EGFR'deki genomik keşifler ve sonuçta ortaya çıkan hedefe yönelik tedavi, akciğer kanseri biyolojisi ve tedavisindeki yenilenmiş anlayış için yeni bir fırsat penceresi açmıştır. Bu anlayışa esas olarak, akciğer adenokarsinomunda spesifik bir EGFR gen mutasyonu kümesinin, EGFR kinaz inhibitörleri gefitinib ve erlotinibe karşı gelişmiş duyarlılık ve klinik tepkiye neden olduğunu bildiren çalışmaların bulguları neden olmuştur (Lynch, vd., 2004; Paez, vd., 2004; Pao, vd., 2004). Tirozin kinaz domaininde 18 ila 21 arasındaki eksonların, mutasyonel sıcak noktaları barındırdığı düşünüldüğünden, en yoğun dizilenen bölgedir (El-Telbany ve Ma, 2012).

### **2.5.2 Kirsten rat sarkoma viral onkogen homoloğu (KRAS)**

KRAS, aşağı yönde büyüme faktörü reseptör sinyallemesinin merkezi bir aracısının rolünü oynayan bir guanozin trifosfatı şifreler ve bu nedenle hücre çoğalması, hayatta kalma ve farklılaşma için kritik öneme sahiptir. Yapısal olarak aktif hale gelen KRAS gen ürünü; GDP/GTP'ye son derece yüksek afinite göstermesi, bilinen allosterik bağlanma bölgelerinin yokluğu, proteinin geniş transkripsiyon sonrası değişikliklere maruz kalması gibi çeşitli nedenlerden dolayı onkolojide zor bir hedef

olarak kalmıştır. KRAS gen mutasyonları skuamöz hücreli karsinomda nadirdir, ancak akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %15 ila %25'inde mevcut olabilir (Aviel-Ronen, vd., 2006). Mutasyonlar öncelikle ekzon 1'in 12. ve 13. kodonlarında yanlış anlam mutasyonlarıdır. Vakaların büyük çoğunluğunda, KRAS mutasyonları EGFR wild-type (yabani-tip) tümörler bulunmuştur; bu nedenle, EGFR ve KRAS mutasyonları karşılıklı olarak sınırlıdır (Marchetti, vd., 2005; Toyooka, vd., 2006 a). EGFR'de olduğu gibi KRAS mutasyon durumu, primer tümör ve ilgili metastazlar arasında da değişmektedir (Toyooka, vd., 2006 b). Şu anda, in vitro çalışmalarda ve klinik kullanımın erken safhalarında başarılı olan ajanların bulunmasına rağmen, klinik kullanımda mutasyona uğramış KRAS'ı hedefleyen etkili bir hedefe yönelik terapötik bulunmamaktadır (El-Telbany ve Ma, 2012; Matikas, vd., 2017).

### **2.5.3 Hepatosit büyüme faktörü reseptörü (MET)**

MET (c-Met proto-onkogen, HGF reseptörü) onkogenik mutasyonlar, amplifikasyon / aşırı ekspresyon ve alternatif splicingde görevli bir proteindir. MET proto-onkogeni, EGFR ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) genlerinin de bulunduğu insan kromozomu 7 üzerinde bulunur. MET, doğal ligandına (HGF) bağlanan ve ayrıca scatter faktörü (SF) olarak adlandırılan bir reseptör tirozin kinazı (RTK) kodlar (Ma, vd., 2003). Ligand-reseptör bağlanması, reseptör fosforilasyonunu ve aktivasyonunu kolaylaştıran MET reseptöründe bir konformasyon değişikliği başlatır. Malignite bağlamında, MET-HGF / SF yolu, tümör büyümesi, hayatta kalma, dallanan morfogenez, motilite ve migrasyon, invazyon, tümör anjiyogenez ve metastaz gibi pleiotropik etkilerin bir aracı olarak güçlü bir şekilde rol oynamaktadır (Ma, vd., 2003; Wojta, vd., 1994; Besser, vd., 1997). Rikova ve arkadaşlarının (2007) bir araştırmasına göre, MET reseptörü, RTK familyasının üyeleri arasında KHDAK doku örneklerinde tirozinlenmiş fosfopeptidlerin sayısında birinci sırada yer almıştır ve böylece MET'nin akciğer kanseri onkogenik sürecinde önemli bir sürücü RTK olduğu fikrini desteklemektedir. Ayrıca, akciğer kanserinde MET ve EGFR sinyal yolları arasında çapraz-konuşma (cross-talk) bulunmuştur (El-Telbany ve Ma, 2012).

### **2.5.4 V-raf mürin sarkoma viral onkogen homologu (BRAF)**

BRAF kinaz, ARAF, BRAF ve CRAF (RAF1) içeren bir serin-treonin protein kinaz ailesine aittir. Mutant BRAF melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri,

yumurtalık kanseri, papiller tiroid kanseri ve kolorektal kanser dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin patogeneğinde rol oynamıştır. Yaygın olarak tanımlanan BRAF mutasyonu, melanomda BRAF mutasyonlarının %90'ını oluşturan V600E'dir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, BRAF gen mutasyonları tüm örneklerin %1-3'ünde tanımlanmıştır (El-Telbany ve Ma, 2012; Davies, vd., 2002; Brose, vd., 2002; Pratilas, vd., 2008).

### **2.5.5 Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik alt ünite alfa (PIK3CA)**

PIK3CA geni, hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi ve hayatta kalması dahil olmak üzere birçok hücresel süreçte yer alan bir lipid kinaz ailesine ait olan fosfatidilinositol 3-kinazların (PI3K) katalitik alt birimlerinden biri olan p110a'yı kodlar. PI3K, 2 altbirimden oluşan bir heterodimerdir: bir 85-kDa regülatör alt birim (p85) ve bir 110-kDa katalitik alt birim. PI3K, hücre zarının iç bölümünde PI (4,5) P2'yi PI (3,4,5) P3'e dönüştürür. PI (3,4,5) P3, hücre zarına AKT gibi önemli downstream sinyal proteinlerini toplar; bu, proteinlerin artan aktivitesi ile sonuçlanır. PIK3CA'nın kolorektal kanserlerin %30'undan fazlasında mutasyona uğradığı bulunmuştur. PIK3CA'daki somatik mutasyonlar da tüm küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin %1 - 3'ünde bulunmuştur (Samuels, vd., 2004; Kawano, vd., 2006). Ayrıca skuamöz hücreli karsinomda daha sık görülürler. PIK3CA, kanser hedefli ilaç terapisinde bir aday olarak önemli bir potansiyel göstermektedir (El-Telbany ve Ma, 2012).

### **2.5.6 Anaplastik Lenfoma Reseptör Tirozin Kinaz (ALK)**

ALK, çeşitli malignitelerde anormal olan bir tirozin kinaz reseptörüdür. İnsan kanserlerinde ALK'nin rolü uzun süredir non-Hodgkin lenfomada NPM-ALK füzyonunda tanınırken, EML4-ALK füzyonu literatürde Soda vd., (2007) tarafından yeni bir potansiyel onkojenik olarak küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde belgelenmiştir. Akciğer tümörlerinin yaklaşık % 3-7'si ALK füzyonlarını barındırır (El-Telbany ve Ma, 2012).

### **2.5.7 RET proto-onkogeni**

RET proto-onkogeni, glial hücre dizisi türetilmiş nörotropik faktör ailesi ligandları için bir reseptör tirozin kinaz kodlar; nöral gelişim ve bakım için RET sinyali gereklidir. RET mutasyonlarının tiroid kanserlerinde mevcut olduğu bilinmektedir. Aslında tüm sporadik papiller tiroid karsinomlarının % 10 ila % 20'sinde RET füzyonları

bulunur ve bunların %60 - 70'i RE1 füzyonuna bağlanır. Akciğer kanserinde KIF5B-RET füzyonu küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarının küçük bir kohortunda tespit edilmiştir. RET pozitif hastalarda bilinen herhangi bir onkojenik mutasyon saptanmamıştır, bu da RET füzyonunun onkogenik sürecin ardındaki itici güç olabileceğini düşündürmektedir. Kohno vd., akciğer adenokarsinomu olan vakaların %1-2'sinde KIF5B-RET füzyonu olduğunu bildirmişlerdir (El-Telbany ve Ma, 2012).

### 2.5.8 İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

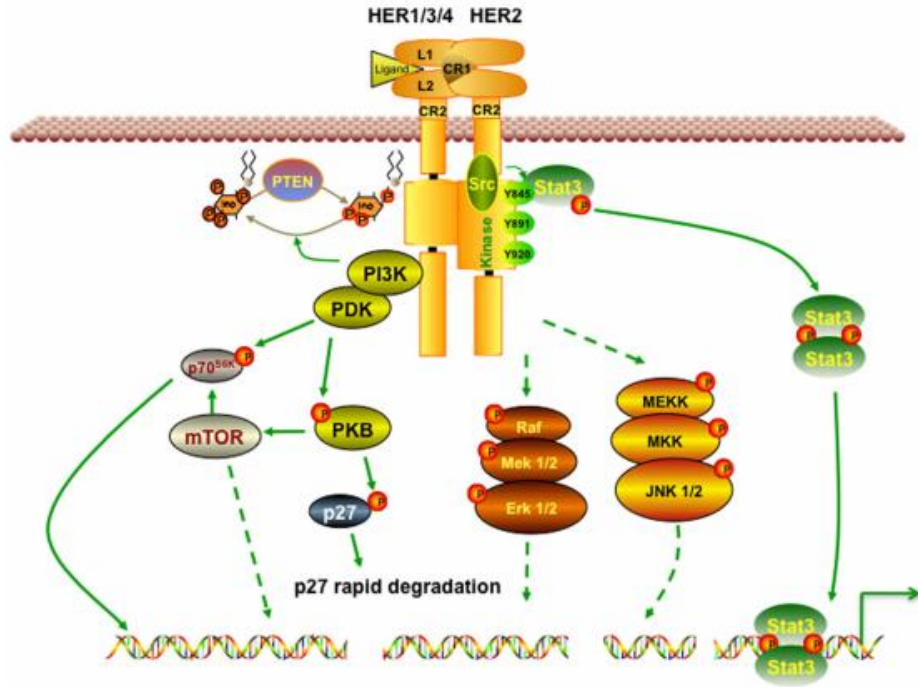
On yedinci kromozomun (KR17) uzun kolunda yerleşen insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2 / ErbB2) geni, intrinsik tirozin kinaz aktivitesiyle hücre büyüme ve çoğalması, hücre farklılaşması, apoptoz, adhezyon, migrasyon benzeri fonksiyonlarda rol oynayan transmembran reseptör proteinini kodlar. ErbB2 geninin insan malignitelerinde de önemli bir rolü vardır. HER2'nin aşırı ekspresyonunun, hastalığın kötü prognozu (agresif seyri), artmış mortalite ve daha yüksek relaps oranı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. ErBB tirozin reseptörü kinazları, PI3K-AKT ve RAS-MAPK yolları dahil olmak üzere çoğalma, göç, hayatta kalma ve hücre büyümesi gibi birçok hücre fonksiyonunu düzenleyen çeşitli yolları aktive eder (Arman, vd., 2013).

HER2 protein aşırı ekspresyonu ve gen amplifikasyonu, sırasıyla %6–35 ve %10-20 oranında küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (Rouquette, vd., 2012; Pellegrini, vd., 2003) bulunurken HER2 mutasyonları, yaklaşık %2-4 oranında küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde tanımlanmıştır (Arcila, vd., 2012; Tomizawa, vd., 2011). HER2 mutasyonları HER2 protein aşırı ekspresyonu ve gen amplifikasyonundan daha önemli olmasına rağmen, HER2 mutasyona uğramış küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarının klinik seyri hakkında çok az veri bulunmaktadır (Arteaga, vd., 2012).

HER2 ekson 20 insersiyonları, kinaz domeninin bir kısmını kodlayan ekson 20 içinde meydana gelir. Bu mutasyon, tüm küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin yaklaşık %2-4'lük bir sıklığında gerçekleşir. EGFR / KRAS / ALK - negatif küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin örneklerinin kohortlarında, HER2 mutasyonlarının sıklığı %6'dır (Arcila ve ark. 2012).

HER2 aktivasyonunda, reseptör homodimerizasyonu veya heterodimerizasyon, HER2 aktivasyonu için ön koşul aşamasıdır. Daha sonra aktivasyonu, hücre büyümesi, proliferasyonu ve hayatta kalması dahil olmak üzere birçok etkiyi teşvik etmek için geniş bir alt akış kaskadları spektrumunu tetikler. PI3K / Akt, HER2 tarafından aktive edilen

en iyi çalışılmış yollardan biridir. Aktive PI3K / Akt ayrıca hücre metabolizmasının ana pozitif düzenleyicisi olan mTOR'u tetikler. Ek olarak, HER2 aktivasyonu, kanser hücrelerinin büyümesini ve göçünü destekleyen Ras / Raf ve MEK yollarını aktive edebilir (Diniz, vd, 2015). HER2 aktivasyonu Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. HER2 sinyalizasyonu (Vu ve Claret, 2012).

HER2'nin insan tümörlerinde oynadığı rol gerçekten kayda değerdir. HER2, spesifik olarak, meme kanserlerinin %20-30'unda aşırı ekspresyonu gösterir ve kötü hasta sonuçları ile ilişkili olması muhtemeldir. Diğer birçok insan malignitelerinde de aşırı ifade edilir. HER2'nin aşırı ekspresyonu ayrıca kanser hücrelerinin metastatik karakteristiğini artırır. Kanser özelliklerinden biri de apoptoza dirençtir. HER2 aşırı ekspresyonu meme kanseri hücrelerinde apoptozun baskılanmasına yol açar. Apoptozu baskılamak için, HER2'nin aşırı ekspresyonunun, farklı mekanizmalar yoluyla hem intrinsik hem de dış kaynaklı apoptotik yolları bozduğu gösterilmiştir (Carpenter ve Lo, 2013). Aynı zamanda, apoptozun HER2 aracılı baskılanması için HER2 ekspresyonunu korumak gerekir (Carpenter ve Lo, 2014). HER2, HER2 tarafından apoptozun bastırılmasında önemli bir rol oynayan PI3K-AKT sinyalleme sisteminin aktivasyonuna aracılık eder. HER2 ayrıca P53 fonksiyonunu da negatif olarak düzenler. HER2, her ikisi de AKT'nin aracı olduğu farklı dolaylı mekanizmalarla P53'ü bastırır. P53

ekspresyonunun inhibisyonu, P53'ün intrinsik apoptotik yolda yer alan çeşitli pro-apoptotik genleri yukarı regüle ettiği gösterildiğinden apoptozu inhibe eder. Survivin, HER2-aracılı apoptoz baskılamada, hasta tümörlerinde HER2 ekspresyonu ile güçlü bir ilişki içerdiğinden önemli bir rol oynar gibi görünmektedir (Carpenter ve Lo, 2013). HER2'nin demonte edilmesinin survivini şiddetli bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. Bunun tersi de doğrudur, çünkü HER2'nin zorla ifadesi survivin'i artırır. Sonuç olarak, bu sonuçlar açıkça HER2 ifadesinin, dolaylı olarak azalmış apoptoza yol açan survivin ekspresyonunu desteklediğini göstermektedir. HER2 ayrıca hücre sağkalımını desteklemede Bcl-2'yi hedefler. HER2'nin aşırı ekspresyonu nedeniyle Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ve survivin upregülasyonu vardır (Arman, vd., 2014).

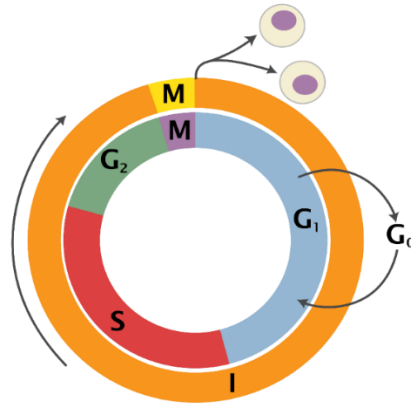
### 2.5.9 ROS proto-onkogeni

ROS1, insülin reseptör ailesinin bir reseptör tirozin kinazıdır. Genin başlangıçta glioblastomalarda bitişik FIG genine kaynaştırıldığı bulunmuştur. Daha sonra, ROS1 füzyonları, yaklaşık %2 oranında küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde tanımlanmış ve potansiyel bir sürücü mutasyonu olarak kabul edilmiştir. Bu füzyonlar, ROS1 füzyonu tarafından iletilen aşağı akım sinyalleme sisteminin ayrıntıları henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da, reseptör tirozin kinaz aktivasyonu ile sonuçlanmıştır (El-Telbany ve Ma, 2012).

## 2.6 Hücre Döngüsü

Hücreler için en temel özelliklerden birisi kontrollü çoğalması yani bölünmesidir. Bütün hücreler, mitoz bölünme döngüsünün tamamlanması ile identik iki yavru hücre oluşturmaktadır. Hücre bölünmesi, yavru hücrelerin doğru ve eksiksiz genomu içermelerini sağlamak için DNA replikasyonu ve hücre döngüsü kontrol altındadır. Hücrenin bölünme döngüsünde gerçekleşen hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, genetik materyalin yavru hücrelere eşit aktarılması ve hücrenin ikiye bölünmesi süreçleri birbiri ile eşzamanlı olarak gerçekleşmektedir (Lüleyap, 2008).

Hücre döngüsü interfaz ve mitoz yani dinlenme ve bölünme evreleri olarak iki kısımda incelenmektedir. Dinlenme evresi, hücrenin sorumlu olduğu işlevleri yerine getirdiği ve yaşamsal faaliyetlerinin devam ettiği evredir. Bu evreye G<sub>0</sub> fazı da denilmektedir. Bölünme evresi ile mitoz için hücrenin hazırlıklarını tamamladığı G<sub>1</sub>, S ve G<sub>2</sub> fazları ile mitoz bölünmenin gerçekleştiği M fazından oluşmaktadır (Lüleyap, 2008). Hücre döngüsünün fazları Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



**Şekil 2.3.** Hücre döngüsünün şematik gösterimi.

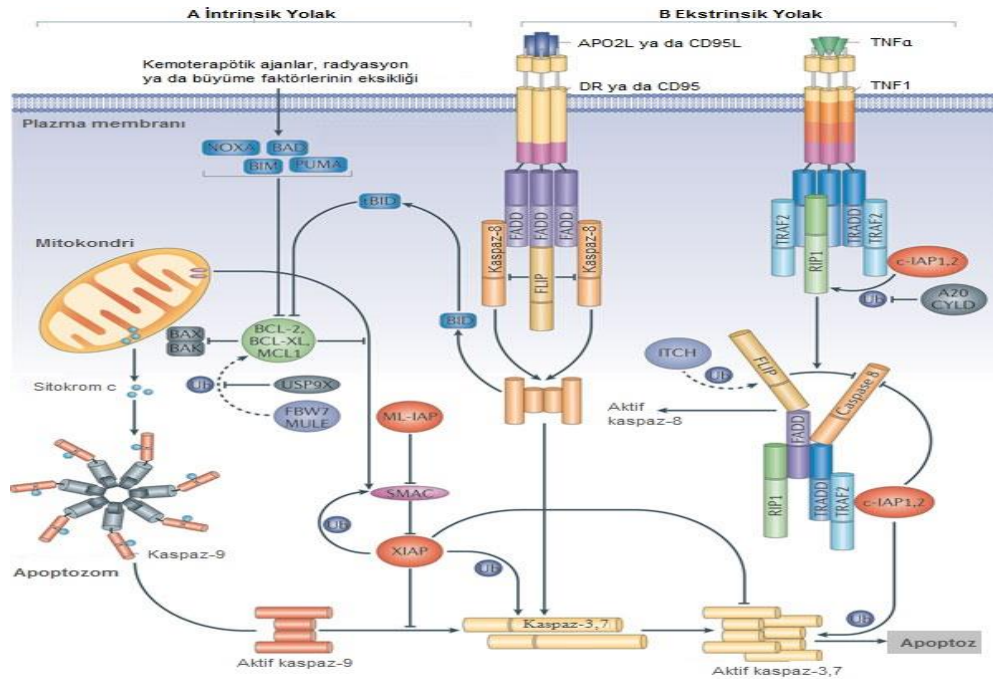
- G1 fazı boyunca hücre metabolik olarak aktiftir ve DNA replikasyonu için gerekli olan RNA ve proteinlerin sentezi gerçekleştirilir.
- S fazında DNA replikasyonu tamamlanır.
- G2 evresinde hücre büyümesi devam eder, mitoz hazırlık için protein ve organel sentezi gerçekleşmektedir.
- M fazında ise bir hücreden iki yavru hücre oluşur, nükleus bölünmesi ve onu takip eden sitokinez ile mitoz bölünme tamamlanmaktadır (Lüleyap, 2008).

Ökaryotik hücrelerde, hücre döngüsü süreci korunmuş bir seri protein kinaz tarafından regüle edilir. Bu protein kinazlara siklinler denir ve siklin bağımlı kinazlarla (CDKs) birlikte işlev görmektedirler (Lüleyap, 2008).

- Siklin D erken G<sub>1</sub> evresinde sentezlenir, CDK4 ve CDK6'ya bağlanır.
- Siklin E geç G<sub>1</sub> evresinde sentezlenir ve CDK2'ye bağlanır. Bu üç kompleks, diğer araçlarla birlikte hücrenin S evresine girmesini ve hücrenin S evresinde ilerlemesini sağlar.
- Siklin A, CDK2 ve CDK1'e bağlanır. Bu kompleksler, hücrenin S fazını terk edip G<sub>2</sub> evresine girmesini sağlarken Siklin B'nin oluşumunu indükler.
- Siklin B, CDK1'e bağlanır ve bu kompleks hücrenin G<sub>2</sub> fazını terk edip M evresine girmesine izin verir.
- Siklinler, işlevlerini gerçekleştirdikten sonra, ubiquitin-proteazom yolu ile proteolitik olarak yıkılmaktadır (Kastan ve Bartek, 2004).

## 2.7 Apoptoz

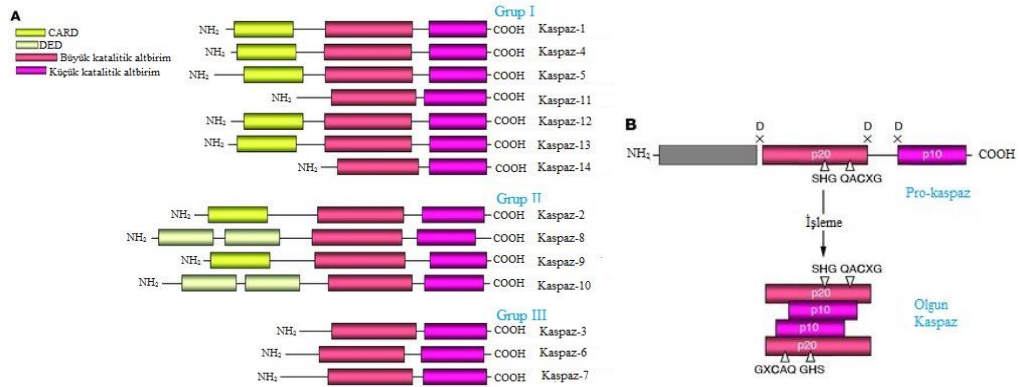
Apoptoz hücrelerin programlanmış ölümü olarak bilinen ve farklı morfolojik değişikliklerle karakterize olan (plazma membranı kabarması, hücre büzülmesi, kromatinin yoğunlaşması / parçalanması ve hücrenin apoptotik cisimlere parçalanması) hücresel bir süreçtir (Nicholson, 1999). Apoptoz, embriyonun gelişiminde anahtar rol oynarken erişkinlerde ise hücre proliferasyonunun dengede olması ve dokudaki hücre sayısının sabit tutulması gibi görevleri üstlenmektedir. Bunlara ek olarak apoptoz, DNA hasarının olduğu hücreler ve kanser oluşumunu indükleyebilecek gen mutasyonlarını taşıyan hücrelerin de organizmadan eliminasyonunu sağlar. Tüm bu özellikler, hücre sinyal iletiminde, DNA onarımında veya DNA bütünlüğünün yapısal bakımında, proteinlerin seçici proteolizinin, bir grup sistein-aspartat enzimi olan kaspazlar tarafından gerçekleştirilmesidir (Viktorsson ve Lewensohn, 2007; Johnstone 2002). Apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, P53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriyonlar rol oynar. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli girişi olan kalsiyum iyonları; endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol almaktadır (Coşkun ve Özgür, 2011).



Şekil 2.4. İntresik ve ekstrinsik apoptotik sinyal iletim yolağı (Domagoj, vd., 2011).

Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi  $Ca^{++}$  düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik bozukluklar, hücre döngüsü bozuklukları ve hipoksidir. Hücre dışı sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS – FAS ligand aracılı apoptoz, TNF aracılı apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenlerdir (toksinler, ultraviyole ışınlar, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon). Hücre içi sinyaller instrinsik apoptoz yolunu devreye sokarken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yol ile apoptozu indükler (Coşkun ve Özgür, 2011; Danial ve Korsmeyer, 2004; Kroemer, vd., 2007; Viktorsson ve Lewensohn, 2007). İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik sinyal yolağı Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

İntrinsik yolun başlatılması, hücre stresine yanıt olarak mitokondriyal intermembran boşluğundan mitokondriyal elektron taşıma zincirinin bir bileşeni olan sitokrom c salınması ile gerçekleşir. Daha sonra kaspaz-9 aktivasyonuna neden olan pro-kaspaz-9, sitokrom-c ve Apaf-1'den oluşan apoptozom yapı inşasına, daha sonra kaspaz-3'ü ve dolayısıyla DNA fragmentasyonunu tetikler. Dış mitokondriyal membran, dış mitokondriyal membran permeabilizasyonu (MOMP) olarak adlandırılan bir süreçte bütünlüğünü kaybeder ve apoptotik proteinlerin sitozole (sitokrom c ve Smac / DIABLO) salınmasına neden olur. Ayrıca bu proteinler, apoptoz proteinlerinin inhibitörü (IAP'ler) tarafından kaspaz inhibisyonunu önleyerek kaspaz aktivitesini önemli ölçüde artırır.



**Şekil 2.5.** Kaspazların yapısı. (A.Kaspazlar üç büyük gruba ayrılırlar. Grup I: İnflamatuvar kaspazlar; Grup II: Başlatıcı kaspazlar; Grup III: Efektör kaspazlar. B. Pro-kaspaz aktivasyon şeması. (Lavrik, vd., 2005)).

Kaspazlar; inflamatuvar kaspazlar, (kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13), başlatıcı kaspazlar (insan hücreleri içinde kaspaz-2, -8, -9 ve -10), ve efektör kaspazlar (esas olarak insan hücrelerinde kaspaz-3, -6 ve -7) olarak 3 ana grupta sınıflandırılırlar (Şekil 2.5).

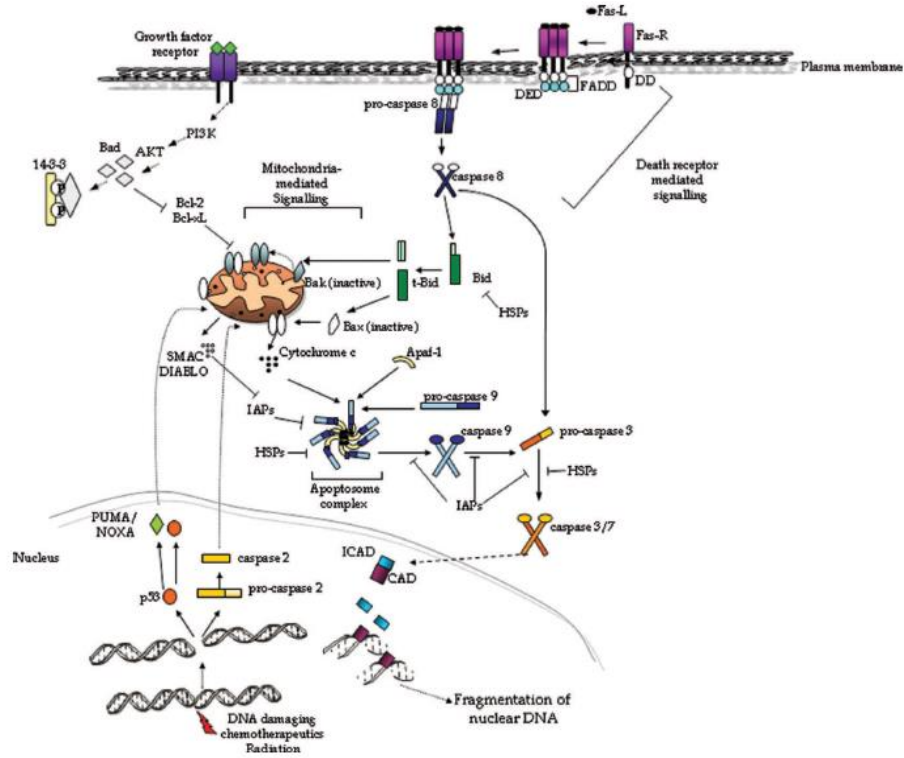
Başlatıcı kaspazlar ikinci grubun kesiminden ve etkinleştirilmesinden sorumlu iken efektör kaspazlar seçici proteolizden sorumludur.

Kaspazlar ya ölüm reseptörü (DR) aktivasyonu (ekstrinsik) ya da apoptotik proteinlerin (örneğin sitokrom c, smac/DIABLO ve HtrA2/Omi) (intrinsik) mitokondriyal salınımı yoluyla aktive edilir. İntrinsik yol tarafından yayılan sinyaller, hücre çekirdeğinde veya lizozomlarda veya endoplazmatik retikulum içinde de üretilebilir (Kroemer, vd., 2005; Norbury, vd., 2004; Orrenius, vd., 2003) .

Ekstrinsik kaspaz aktivasyon yolunda, TNF süper ailesi ligandları DR'lere bağlanır, bu da DR'lerin oligomerizasyonuna ve adaptör proteinlerinin bir ölüm domaini yoluyla toplanmasına neden olur. Buna karşılık, adaptör proteinleri pro-kaspaz-8'i, pro-kaspaz-8'in aktive edilmesine izin veren bir ölüm efektör alanı (DED) yoluyla bağlar, bu da pro-kaspaz-8'deki adaptör alım alanına kritik bir şekilde bağlıdır (Pop, vd., 2006). Aktif kaspaz-8 daha sonra ya pro-kaspaz-3'ü doğrudan aktive eder ya da Bid-kesimi yoluyla sinyali çoğaltır. İntrinsik yolda apoptotik sinyaller mitokondriyal dış zar geçirgenliğini (MOMP) artırır, ardından mitokondriyal inter-membran boşluğundan sitozole (örn., Sitokrom c, Smac / DIABLO ve HtrA2 / omi) kaspaz aktivasyonunu teşvik eden apoptotik proteinlerin selektif salınımı izler (Garrido, vd., 2006). Sitozolik sitokrom c, apoptoz proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) ve dATP (yani apoptozom) ile bir kompleks oluşturur, burada pro-kaspaz-9'un dimerizasyonu gerçekleşir ve kaspaz-9 aktivasyonu sağlanır. Bunu pro-kaspaz-3 aktivasyonu takip eder (Pop, vd., 2006). Bunun apoptotik ilerleme ile verimli bir şekilde sonuçlanması için, apoptoz proteinlerin inhibitörünün (IAPs) kaspaz-bloke edici etkisinin eş zamanlı olarak ortadan kaldırılması gereklidir. Bu nedenle, her ikisi de IAP'leri bloke eden ve her ikisi de artmış MOMP'nin bir sonucu olan Smac / DIABLO ve HtrA2 / omi'nin salınması, artmış kaspaz-3 aktivitesine yol açar (Garrido, vd., 2006). Kısmen, MOMP, Bcl-2 aile proteinleri tarafından kontrol edilir ve anti-apoptotik üyeler olan Bcl-xL ve Bcl-2'nin her ikisi de MOMP'yi inhibe eder. Buna göre, her ikisi de “BH3-only” proteinler (Bid, Bim, Bad, PUMA ve NOXA) tarafından aktive edilen, Bak veya Bax gibi pro-apoptotik üyeler, MOMP'yi destekleyebilir (Puthalakath ve Strasser, 2002; Viktorsson ve Lewensohn, 2007; Fennel, 2005).

Mitokondri aracılı sinyal iletiminin önemli bir regülatörü, P53 tümör süpresör proteindir. Böylece P53, pro-apoptotik proteinlerin (örneğin Bax, PUMA, Apaf-1)

ekspresyonunu indükleyebilir ve/veya DNA hasarı karşısında Bcl-2 dahil anti-apoptotik proteinleri inhibe edebilir (Vousden ve Lu, 2002). Ayrıca, P53 sitozölü tekrar lokalize edebilir ve “BH3-only” proteinler Bak ve/veya Bax aktivasyonunu tetikleyebilir (Chipuk, vd., 2004; Leu, vd., 2004). Apoptotik sinyal iletim yolağı Şekil 2.6’de gösterilmiştir.



**Şekil 2.6.** Apoptotik sinyal iletim yolları. Kaspazlar ekstrinsik veya intrinsik yol sinyal yolağı ile aktive edilir. Ölüm ligandları reseptörlerine (Fas-L ve Fas-R) bağlanır ve ölüm domaini adaptör proteinleri (FADD) ile bağlanır. Bir ölüm efektör alanı (DED) yoluyla, adaptör protein aktif hale gelen pro-kaspaz-8'i alır. Kaspaz-8, bundan sonra, yapısal proteinleri ve kaspaz ile aktive edilmiş DNaz inhibitörünü (ICAD) ayıran pro-kaspaz-3'ü doğrudan aktive eder ve nükleer DNA'nın parçalanmasına neden olan serbest kaspaz ile aktive edilmiş DNaz (CAD) ile sonuçlanır. Sinyali amplifiye etmek için, kaspaz-8, mitokondri aracılı sinyalleme başlatılabilir. Bid'i t-Bid'e bölebilir. Mitokondri aracılı yolak artmış mitokondriyal dış zar geçirgenliğine ve apoptotik proteinlerin sitozole (sitokrom c ve Smac/DIABLO) salınmasına neden olur. Bcl-2, Bcl-XL, Bak, Bax, Bad ve Bid proteinleri MOMP'ta kısmi kontrol görevindedir. Sitozol içinde sitokrom c, pro-kaspaz-9'un aktive edildiği apoptozom ile Apaf-1 ile birlikte bir kompleks oluşturur. Aktif kaspaz-9, pro-kaspaz-3 aktivasyonunu tetikler. Çeşitli seviyelerde kaspaz işlenmesi ve aktivitesi, apoptoz proteinlerinin inhibitörü veya HSP tarafından inhibe edilebilir. IAP'ler Smac/DIABLO tarafından antagonize edilir. Apoptotik sinyalleme, 14-3-3 proteinlerine bağlanmayı indükleyerek Bad işlevi engelleyen büyüme faktörü reseptör sinyallemesinden de etkilenir. Apoptotik sinyaller, hücre içindeki başka yerlerde de başlatılabilir, burada P53, PUMA, NOXA ve kaspaz-2, DNA hasarı üzerinde aktif hale gelir ve pro-apoptotik sinyalleri mitokondriye iletir (Viktorsson ve Lewensohn, 2007).

Kaspaz aktivitesi, apoptoz proteinlerinin (IAPs) inhibitörü, ısı şoku proteinleri (HSP'ler) veya protein kinaz sinyal iletimindeki değişiklikler ile kısıtlanabilir. Kısaca, IAP'lar (cIAP-1, -2, XIAP ve survivin), kaspazların substrat bağlayan cebi içinde yapısal bir engele neden olur; bu durum substrat bağlanmasını engeller ve proteozomal degradasyon için bağlı kaspazları hedefler (Schimmer, 2004). HSP'ler (HSP90, HSP70, HSP60 ve HSP27), sitokrom c'nin sekestrasyonu, Bid yeniden dağılımının inhibisyonu, Akt defosforilasyonu veya Apaf-1 aracılı pro-kaspaz-9 veya pro-kaspaz-3 aktivasyonunun bloke edilmesi yoluyla kaspaz aktivitesini bloke edebilir (Parcellier, vd., 2003).

Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3-K) / Akt'e bağlı yolak ve Ras-aktive mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) yollarının her ikisi de apoptotik eğilimi etkiler. Akt ve MAPK / ERK esas olarak büyüme faktörleri tarafından aktive edilmesine ve pro-apoptotik sinyal iletimini inhibe etmesine rağmen, MAPKlar, P38 ve JNK hücrel strese (örn., DNA hasarlı tedaviler) yanıt olarak aktive edilebilir ve uyarılara, süreye ve hücre tipine bağlı olarak hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik olabilir (Davis, 2000). Hem Akt hem de ERK, Bad veya kaspaz-9'u inhibe edebilir veya Bim'i antagonize edebilir (Puthalakath ve Strasser, 2002; Pike, 2006; Greer ve Tournier, 2005). JNK'nın, kısmen Bax/Bak aktivasyonunu veya kompleks oluşumunu teşvik ederek veya Bcl-2/Bcl-xL'yi inhibe ederek sitokrom c salınımını düzenlediği bilinmektedir. (Lei ve Davis, 2003; Ihrlund, vd., 2006; Donovan, vs., 2002). JNK ayrıca Bak, Bax ve Bim'in ekspresyonlarına da desteklemektedir. Benzer şekilde, P38 Bcl-2 aile proteinlerini antagonize ederek veya teşvik ederek apoptotik sinyallemeyi kontrol eder (Cai, vd., 2006; Choi, vd., 2006; Viktorsson ve Lewensohn, 2007).

Programlanmış hücre ölümü haricinde, patolojik durumlarda gerçekleşen nekroz da hücre ölümüne neden olmaktadır. Apoptozun aksine nekrozda süreç genler tarafından regüle edilmez ve düzenli bir süreç değildir. Hücrenin nekroza gitmesi birçok sebebe bağlıdır. Bunlar; hipoksik ortam, ağır metaller, inflamasyon, yanık, oksidatif stres ve toksik maddelerdir. Nekrozun karakteristik özelliği hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması ile inflamasyon oluşumu ve makrofaj ile nötrofillerin nekrotik dokuya migrasyonudur (Coşkun ve Özgür, 2011; Goldstein ve Kroemer, 2007; Viktorsson ve Lewensohn, 2007). Apoptoz ve nekrozun karşılaştırması Çizelge 2.1'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.:** Apoptoz ve nekrozun çeşitli özelliklerinin karşılaştırılması (Coşkun ve Özgür, 2011'den değiştirilerek alınmıştır.).

<b>Özellik</b>	<b>Apoptoz</b>	<b>Nekroz</b>
<b>Nedenler</b>	Büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, apoptotik yolak aktivasyonu, sitotoksik etki, radyasyon.	Hipoksik ortam, oksidatif stres, ağır metaller, toksik maddeler, inflamasyon.
<b>Morfolojik özellikler</b>	Hücre membranı sağlamdır. Organeller sağlamdır. Hücre küçülür ve apoptotik cisimler oluşur.	Hücre membran bütünlüğü bozulmuştur. Organeller parçalanmıştır. Hücre şişer ve hücre lizisi gerçekleşir
<b>Biyokimyasal özellikler</b>	ATP gerektirir. DNA fragmentleri jel elektroforezinde merdiven şeklini alır.	ATP gerektirmez. DNA fragmentleri jel elektroforezinde rastgele (smear şeklinde) yürür.
<b>Diğer</b>	Hücreler tek başına veya grup halinde ölür. Fizyolojik şartlar dolayısıyla gerçekleşebilir. Makrofajlar tarafından fagosite edilir.	Hücreler grup halinde ölür Patolojik nedenlerden kaynaklanan bir ölümdür. Lizozomal enzimlerin sekresyonu gerçekleşir. İnflamasyona neden olur.

### 2.7.1 Akciğer kanserinde apoptotik sinyal iletiminde değişiklikler

Pro-kaspaz-8, FasL veya DRs ekspresyonlarının kaybı (örn., FAS veya TRAIL-reseptörü 1) küçük hücreli akciğer kanserinde rapor edilmiştir (Hopkins-Donaldson, vd., 2003). Ayrıca, küçük hücreli akciğer kanserinde kaspaz-8'in bölünemeyen bir homoloğu olan c-FLIP'nin artan ekspresyon seviyesi gözlenmiştir (Shivapurkar, vd., 2002). Normal akciğer ile karşılaştırıldığında küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tümörlerinde Apc-1'in azalmış ekspresyonu bildirilmişken, pro-kaspaz-9 ve pro-kaspaz-3 yukarı regüle edilmiştir (Krepela, vd., 2006). Pro-kaspaz-3'ün artmış ekspresyonu, rezekte edilmiş küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde kötü prognoz ile ilişkiliyken, artmış kaspaz-3 ekspresyonu ve/veya aktivitesi, başka bir çalışmada artmış sağkalım ile ilişkili

bulunmuştur. Apaf-1'in nükleusa lokalizasyonunun da erken evre küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda sağkalımı öngördüğü bildirilmiştir (Takata, vd., 2001; Besse, vd., 2004; Viktorsson ve Lewensohn, 2007).

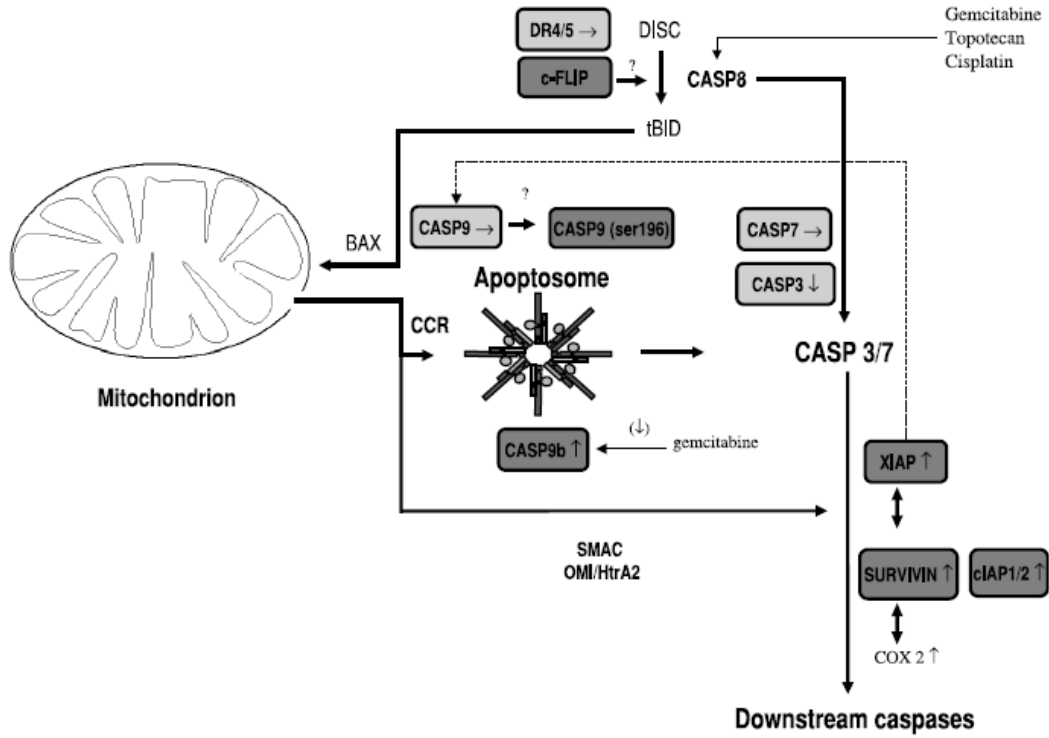
Bcl-2 aile proteinleri ile ilgili olarak, radyo-dirençli küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücrelerinin radiosensitif küçük hücreli olmayan akciğer kanser veya küçük hücreli akciğer kanserine kıyasla hiç aktivasyon göstermedikleri veya çok az Bak veya Bax aktivasyonu gösterdiklerini bildirilmiştir (Viktorsson, vd., 2003). Akciğer kanseri olan hastalarda sağkalım ve / veya kemo veya radyoterapi yanıtları için Bcl-2'nin prognostik değeri yakın zamanda gözden geçirilmiştir. Artan Bcl-2 ekspresyonu, bazı küçük hücreli olmayan akciğer kanseri alt tiplerinde bulunmuştur ve hafif prognostik değere sahip olduğu önerilmiştir (Zhu, vd., 2006).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserindeki IAP'lerin ve HSP'lerin ekspresyonu ve prognostik değeri de gözden geçirilmiştir. Kısaca, c-IAP-1, XIAP ve survivin'in, tümör olmayan tipte bağımlı bir şekilde bir küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı ve küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre hattı panelinde farklı olarak ifade edildiği bildirilmiştir. Aksine, c-IAP-2, küçük hücreli akciğer kanseri hücre hatları ile karşılaştırıldığında küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatlarında önemli ölçüde daha yüksek bir seviyede ifade edilmiştir. Bununla birlikte, klinik akciğer kanseri materyalinde, c-IAP-1, -2 ve XIAP'ın, klinik olarak ilişkili prognostik faktörler (ör., tümör boyutu, evre, histoloji ve derece) veya tümör kemoterapötik yanıtı ile ilişkili olmadığı rapor edilmiştir (Ferreira, vd., 2001). Buna karşılık, yüksek bir survivin ekspresyonunun, radyoterapi sonrası kötü prognoz ve lokal kontrol ile korele olduğu bildirilmiştir (Choi, vd., 2001). Şekil 2.8'de küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde IAP proteinleri ve kaspazların ekspresyon değişimleri gösterilmiştir.

Kaspazlar; inflamatuvar kaspazlar, (kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13), başlatıcı kaspazlar (insan hücreleri içinde kaspaz-2, -8, -9 ve -10), ve efektör kaspazlar (esas olarak insan hücrelerinde kaspaz-3, -6 ve -7) olarak 3 ana grupta sınıflandırılır (Şekil 2.5). Başlatıcı kaspazlar ikinci grubun kesiminden ve etkinleştirilmesinden sorumlu iken efektör kaspazlar seçici proteolizden sorumludur.

İnsan küçük hücreli olmayan akciğer kanser ve küçük hücreli akciğer kanseri hücre hatlarında HSP72 ve HSP27'nin analizi, hücre hattı panelindeki radiosensitivite ile herhangi bir korelasyon göstermemiştir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri klinik

örneklerinde HSP27 ve HSP70 incelendiğinde, vakaların %60'ında ekspresyon saptanmış ve HSP70 ekspresyonu histopatolojik farklılaşma, klinik evreler, sigara içme öyküsü veya lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur (Ekedahl, vd., 2003; Huang, vd., 2005).



**Şekil 2.7.** Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde IAP proteinleri ve kaspazların ekspresyon değişimleri. (IAP'lerin up-regülasyonu survivin, XIAP ve cIAP1/2 apoptozom aktivasyonuna direnç kazandırabilir. Survivin XIAP'ı bağlar ve dengeler. COX2, KHDAK'de up-regüle edilmiştir ve survivini stabilize etmektedir. Apoptozun baskılanması, apikal izoform kaspaz 9b'nin ekspresyonu (gemcitabin ile RNA işleme seviyesinde bastırılmış olan) ile sağlanabilir. Cas9 ve Cas7 aşırı eksprese edilmez (Fennel, 2005))

Akciğer kanserinin, özellikle de küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin, artmış büyüme faktörü sinyalleme ile yönlendirildiği iyi bilinmektedir. Dolayısıyla, IGF-1R, EGF-R (erbB1) veya KRAS'ın tümü, çoğu zaman, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve küçük hücreli akciğer kanserinde fazla sentezlenmiş veya yapısal olarak aktiftir ve artmış anti-apoptotik sinyalleme neden olabilir. Ayrıca, JNK ve/veya P38 gibi MAPK'ların aktivasyonundaki eksikliğin de, radyasyona bağlı apoptotik tepkilerin bozulmasına katkıda bulunabileceğini gösterilmiştir. Engellenen JNK aktivitesi, küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücreleri içinde fosfataz MKP1/CL100 ekspresyonunun artmasından kaynaklanabilir (Arteaga, vd., 2006; Viktorsson ve Lewensohn, 2007).

## 2.8 Akciğer Kanseri Tedavisi

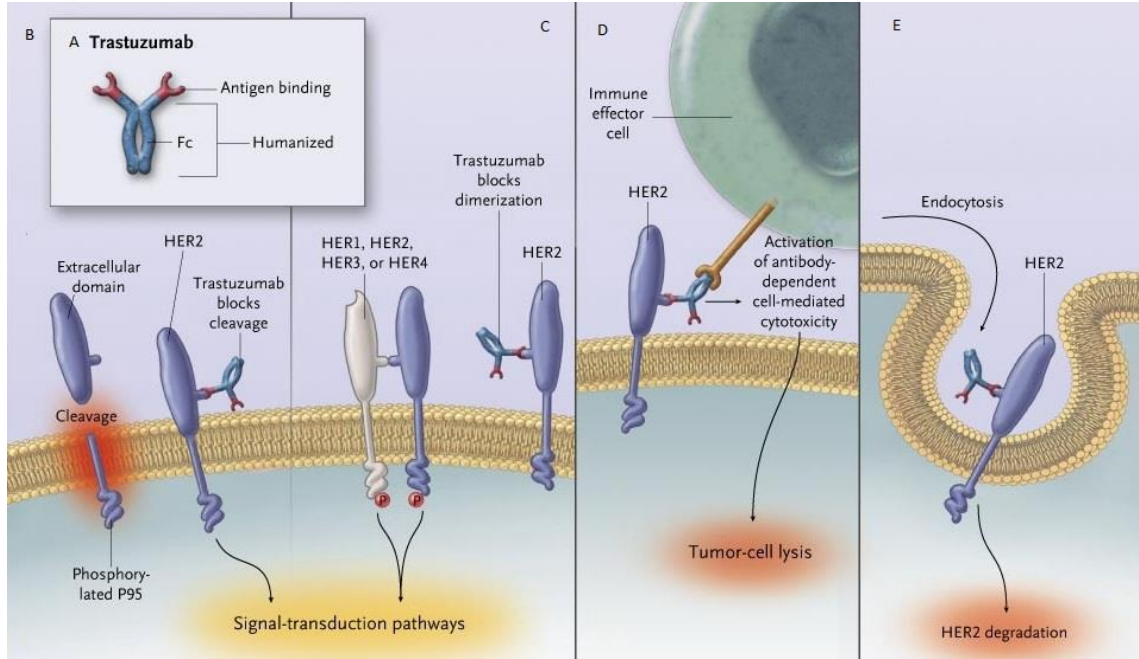
Mevcut standart tedavilere rağmen akciğer kanseri hastalarının genel hayatta kalma oranı zayıf kalmaktadır. Mutasyon analizi ve moleküler hedefli tedavi alanlarındaki son gelişmeler, erlotinib ve gefitinib gibi (epidermal büyüme faktörü reseptörüne [EGFR] karşı) yeni reseptör kinaz inhibitörlerinin ve crizotinib (yeniden düzenlenmiş anaplastik lenfoma kinaz [ALK]) ve cetuximab (EGFR'ye karşı) ve bevacizumab (vasküler endotelial büyüme faktörüne [VEGF] karşı) gibi antikörlerin geliştirilmesini mümkün kılmıştır. Bu keşifler tedaviye daha iyi yanıt oranları vermiştir ve hedefe yönelik akciğer kanserinde kişiselleştirilmiş tedavide yeni bir çağa işaret etmektedir. Üstelik son yıllarda, akciğer kanserinin moleküler profillemesi, yüksek çıktılı genomik analiz platformları ile yapılan kanser genom araştırmalarında son derece hızlı bilimsel ve teknolojik ilerlemeyle büyük ölçüde körüklenmiştir. (Telbany ve Ma, 2012)

### 2.8.1 Trastuzumab

Trastuzumab HER2'nin ekstraselüler domain IV'e karşı yönlendirilen rekombinant insanlaştırılmış bir monoklonal antikör olarak geliştirilmiştir (Carter vd., 1992). Meme kanserinde hedefe yönelik tedavide başarılı bir şekilde dikkat çekici bir örnek teşkil etmiştir. Klinik çalışmalar, trastuzumabın standart kemoterapi ile kombinasyonunun tek başına kemoterapiden çok daha iyi yanıt oranları sağladığını göstermiştir (Slamon vd., 2001; Vogel vd., 2002; Vu ve Claret, 2012).

Genel olarak, trastuzumab, HER2'nin hücre dışı alanına bağlanarak, hem doğrudan hem de dolaylı olarak kanser hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını ve hayatta kalmasını güçlü bir şekilde baskılayabilir (Junttila vd., 2009; Vu ve Claret, 2012). Trastuzumabın etki mekanizması Şekil 2.9'da gösterilmiştir.

**HER2 Degredasyonu:** Trastuzumabın E3 ubiquitin protein kinaz c-Cbl aktivitesini teşvik ederek HER2 internalizasyonunu ve degredasyonunu tetiklemesi önerilmiştir (Klapper vd., 2000). Trastuzumabın HER2'ye bağlanmasının c-Cbl'yi kenetlenme yerine soktuğu, Tyr1112'nin c-Cbl'in HER2'yi ubiquitine ederek degredasyona yol açtığı gözlenmiştir. c-Cbl'nin, trastuzumab'ın HER2'ye bağlanmasını nasıl indüklediği ve c-Cbl'nin HER2 degredasyonuna nasıl aracılık ettiği belirsiz kalmaktadır.



**Şekil 2.8.** Trastuzumabın etki mekanizmasının şematik gösterimi. (A)Trastuzumab antikorunun genel yapısı. (B)HER2'nin ekstraselüler domaininin kesimi sinyal transdüksiyon yollarını aktive edebilen membrana bağlı fosforile P95 oluşturur. (C) Trastuzumab, gösterildiği gibi homodimerizasyonu veya heterodimerizasyonu fiziksel olarak inhibe ederek HER2 sinyalini azaltabilir. (D)Trastuzumab, Fc-yetkili bağışıklık efektör hücrelerini ve antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksitenin diğer bileşenlerini, tümör hücresi ölümüne yol açabilir. (E) Endositoz yoluyla reseptör aşağı regülasyonu gibi ek mekanizmalar da öne sürülmüştür (Hudis, 2007).

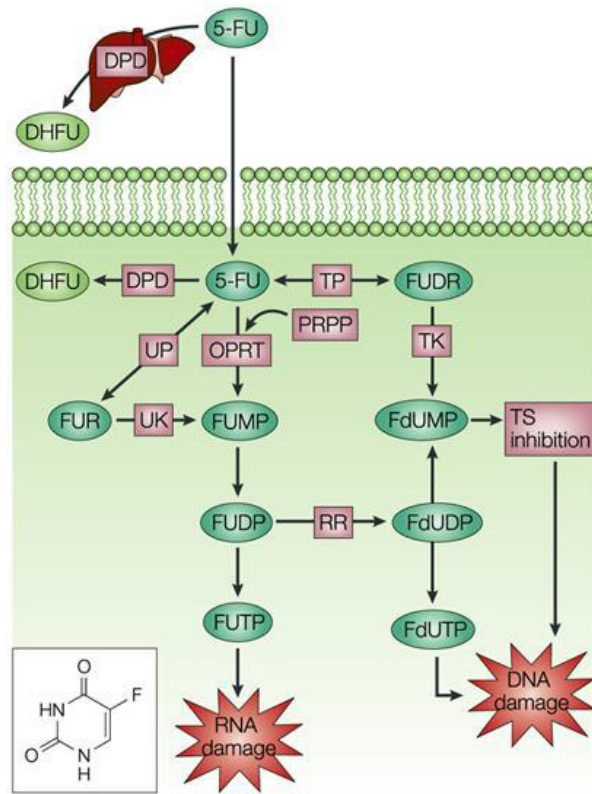
**Antikor bağımlı hücresel sitotoksiste:** Bir antikor olarak, trastuzumabın ana mekanizmalarından biri, antikorları, antikor bağımlı hücresel sitotoksiste (ADCC) olarak adlandırılan bir mekanizma ile HER2'yi aşırı eksprese eden tümör sitelerine çekmektir. Arnould vd., (2006) tümör örneklerini trastuzumab ve dosetaksel ile tedavi edildikten sonra, tümör infiltratlarında doğal öldürücü hücrelerin ve sitotoksik proteinlerin sayısında bir artış gözlemlemiştir. Bu bulgular, trastuzumabın bir etki mekanizması olarak antikor bağımlı hücresel sitotoksiste mekanizması için güçlü bir destek sağlar ve yüksek HER2 ekspresyonuna sahip kanser hücrelerinin niçin ilaca daha duyarlı olduğunu açıklamaya yardımcı olur.

**MAPK ve PI3K / Akt interferansı:** Trastuzumabın en bilinen etkisi MAPK ve PI3K / Akt yollarının inhibisyonudur. Bu hücre döngüsü arrestine ve hücre büyümesi ve çoğalmasının baskılanmasına yol açar. HER2'nin dimerizasyonuna müdahale ederek, trastuzumab'ın HER2 aktivasyonunu inhibe ettiği ve Akt fosforilasyonunu baskıladığı yaygın bir şekilde kabul edilmektedir (Junttila vd., 2009).

### 2.8.2 5-Fluorourasil

Fluorourasil (5-fluorourasil) yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçlarından birisidir. Meme kanseri, kolon kanseri, rektum kanseri, pankreas kanseri ve mide kanseri gibi solid doku tümörlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılır (Jee Hyun Haa, vd., 2011).

5-fluorourasil, C-5 pozisyonunda hidrojen yerine flor içeren bir urasil analogudur. 5-fluorourasil intraselüler olarak birçok aktif metabolite dönüştürülür: fluorodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), fluorodeoksiüridin trifosfat (FdUTP), fluorüridin trifosfat (FUTP). Bu aktif metabolitler ise RNA sentezini ve timidilat sentaz enzim aktivitesinin bozulmasına yol açmaktadır.



Şekil 2.9. 5-fluorourasilin etki mekanizmasının şematik gösterimi.

Timidilat sentaz (TS) enzimi, deoksitimidin monofosfattan (dTMP) deoksiüridin monofosfat (dUMP) dönüşümünü katalize etmektedir. 5-fluorourasilin aktif metaboliti olan fluorodeoksiüridin monofosfat (FdUMP) timidilat sentazın nükleotid bağlanma bölgesine bağlanır ve kararlı bir kompleks oluşur, nükleotid bağlanma bölgesinin dUMP erişimi bloke olur ve dTMP sentezi inhibe edilir. Bu olay deoksinükleotid (dNTP) havuzunun dengesizliği ve deoksiüridin trifosfat seviyesinin yükselmesi ile sonuçlanır. Her iki olay da DNA hasarına yol açar. dUTP'nin neden olduğu DNA hasarının ölçüsü

pirofosfataz, dUTPaz ve urasil-DNA-glikozilaz (UDG) seviyelerine bağlıdır (Longley vd., 2003). dTMP, timidin kinaz (TK) etkisi aracılığıyla timidinden temin edilebilir. Bu temin etme yolağı 5-fluorourasilin potansiyel direnç mekanizmasını temsil etmektedir. 5-fluorourasilin etki mekanizması Şekil 2.10'da gösterilmiştir.

İlacın metabolizması ve 5-fluorourasil deaktivasyonu için çok önemli olan dihidropirimidin dehidrogenaz (DPD) enzimi aktivitesi hastaların yaklaşık %3-8'inde genetik bir varyasyon nedeniyle azalır. Bu varyasyona sahip hastalarda gözlenen Şiddetli toksik reaksiyonlar, dŐuk dozda dahi ilk 5-fluorourasil uygulaması sonrasında ölümcül olabilir. (Amstutz, vd., 2011).

### 3 MATERYAL VE METODLAR

#### 3.1 Kullanılan Malzemeler

##### 3.1.1 Kullanılan cihazlar

Buz Makinası (Hoshizaki)

Buzdolabı (+4 °C) (Regal)

Buzdolabı (-80 °C) (Panasonic)

CO<sub>2</sub>'li İnkübatör (New Brunswick - Galaxy 170 R, Memmert)

Derin Dondurucu (Bosch)

Dikey Elektroforez Sistemi (Cleaver)

Hassas Terazî (Ohaus)

İnvert Mikroskop (Nikon eclipse TS100)

Jel Görüntüleme Sistemi (Syngene – G-box)

Laminar Flow (Scanlaf - Mars Safety Classe 2)

Mikrodalga Fırın (Kenwood)

Mikroplaka Okuyucu (Thermo Scientific - Multiscan Go)

Otoklav Cihazı (Nüve Steamart-OT 90L)

Pasteur Fırını (Jeio Tech-ON-12)

pH Metre (İnolab-PH 7110)

Pipet Seti (Thermo Scientific, Eppendorf)

Rotatör (Biosan – Multi Bio RS24)

Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Thermo Scientific - Micro CL 21R)

Su Banyosu (Nüve-NF 800)

Transfer Sistemi (iBlot 2)

Yatay çalkalayıcı (Lab Companion – SK300)

##### 3.1.2 Sarf malzemeler

1,5 ml toplama tüpü (Isolab)

2 ml toplama tüpü (Isolab)

25 ve 75 cm<sup>2</sup> hücre kültür kapları (SPL Life Sciences)

6 kuyucuklu plaka (Sarstedt)

96 kuyucuklu plaka (Sarstedt)

Beher (S&H Labware)

Cam Şişe (Isolab)  
Cryo Tüp (2 ml) (Isolab)  
Enjektör (20 ml) (Aysset)  
Erlen (S&H Labware)  
Falkon tüp (Isolab)  
Filtre (0,22 µM) (TPP)  
iBlot Stack (Invitrogen)  
Mezür (S&H Labware)  
Pipet Ucu (Isolab)

### **3.1.3 Kullanılan kimyasallar**

2X Laemmli örnek tamponu (Sigma)  
5-Fluorourasil (Deva)  
Agaroz (Applichem)  
Akrilamid / Bisakrilamid (Sigma)  
Amonyum persülfat (Sigma)  
Asetik Asit (Merck Millipore)  
Bradford Reaktifi (Sigma)  
Kaspaz-3 primer antikör (Cell Signaling Technology)  
Kaspaz-7 primer antikör (Cell Signaling Technology)  
Kaspaz-9 primer antikör (Cell Signaling Technology)  
DMSO (Merck Millipore)  
ECL (Thermo Scientific)  
Fetal Bovine Serum (Capricorn Scientific)  
GAPDH primer antikör (Cell Signaling Technology)  
Hidroklorik asit (Merck Millipore)  
İzopropil alkol (Merck Millipore)  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck Millipore)  
Kristal Viyole (Merck Millipore)  
Metanol (Sigma)  
MTT Reaktifi (Glentham Life Sciences)  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck Millipore)  
Penisilin/Streptomisin (Gibco)

PMSF (Cell SignalingTechnology)  
 Potasyum Klorür (Merck Millipore)  
 Protein Marker 11-250 kDA (Cell SignalingTechnology)  
 RIPA Tamponu (Cell SignalingTechnology)  
 RPMI 1640 (Gibco)  
 Sığır Serum Albumini (BSA)  
 Sekonder antikor – Fare (Cell SignalingTechnology)  
 Sekondder antikor – Tavşan (Cell SignalingTechnology)  
 Sodyum Dodesil Sülfat (Sigma)  
 Sodyum Klorür (CalbioChem)  
 TEMED (Tokya Chemical Industry)  
 Trastuzumab (Roche)  
 Tripsin-EDTA (Sigma)  
 Tris-baz (Sigma)  
 Trypan Blue Solüsyonu (%0,4) (Amresco)

### 3.1.4 Kullanılan çözeltiler

#### 3.1.4.1 1X PBS tamponu

Çizelge 3.1’de verilen kimyasallar 800 ml dH<sub>2</sub>O’da çözdürülmüştür. Daha sonra pH 7,4’e ayarlanıp toplam hacim 1000 ml’ye tamamlanmıştır. Otoklav ile steril edilen tampon +4 °C’de saklanmıştır.

**Çizelge 3.1.** 1X PBS tampon içeriği.

İçerik	Miktar
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g

#### 3.1.4.2 Hücre dondurma ortamı

9 ml 0,22µm boyutundaki filtreden geçirilmiş fetal sığır serumu (FBS) ve 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) karıştırılarak hazırlanmıştır.

#### **3.1.4.3 1X RIPA tamponu**

Cell Signaling Technology marka 10X RIPA tampondan 100 µl alınıp, 900 µl distile su ile 1000 µl'ye tamamlanır. 1ml RIPA içerisine 5 µl PMSF eklenir.

#### **3.1.4.4 %10 APS**

100 mg amonyum persülfat 1000 ml distile su ile çözülerek hazırlanır.

#### **3.1.4.5 %10 SDS**

10 g SDS 800 ml distile su ile çözülür, hacmi 1000 ml'ye tamamlanır.

#### **3.1.4.6 1,5M Tris-HCl**

27,23 g Tris 80 ml distile su ile çözülür, pH 8,8 e ayarlandıktan sonra hacmi 150 ml'ye tamamlanır.

#### **3.1.4.7 0,5M Tris-HCl**

6 g Tris 80 ml distile su ile çözülür, pH 6,8 e ayarlandıktan sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanır.

#### **3.1.4.8 1X Tris-Glisin-SDS yürütme tampon**

Cell Signaling Technology marka 10X Tris-Glisin-SDS yürütme tamponundan 200 ml alınıp, 1800 ml distile su ile 2000 ml'ye tamamlanır.

#### **3.1.4.9 10X TBS tamponu**

86,6 g NaCl ve 12,11 g Tris-Baz tartılır. Tartımı yapılan kimyasallar 800 ml distile su ile çözüldükten sonra pH 8,8 e ayarlandıktan sonra hacmi 1000 ml'ye tamamlanır.

#### **3.1.4.10 1X TBS tamponu**

10X TBS tamponundan 100 ml alınıp, 900 ml distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

#### **3.1.4.11 1X TBS-Tween 20 tamponu**

Cell Signaling Technology marka 10X TBS-Tween 20 tampondan 100 ml alınıp, 900 ml distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

#### **3.1.4.12 %5 Süt**

Cell Signaling Technology marka non-fat dry milk kullanılarak hazırlanmıştır. 5 g yağsız süt tozu 100 ml TBS-Tween 20 tamponu ile çözülmüştür

### 3.1.4.13 SDS poliakrilamid jel

Çizelge 3.2’de verilen bileşenlerden belirtilen miktarlarda tartılmıştır. Toplam hacim 100 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.2.** %12’lik SDS poliakrilamid jel içeriği.

İçerik	Miktar	Miktar
	Yükleme jeli	Ayırma Jeli
dH <sub>2</sub> O	3,075 ml	3,4 ml
Tris-HCl	1,25 ml (0,5 M pH: 6,8)	2,5 ml (1,5M pH:8,8)
Akrilamid/bisakrilamid (%30, %0,8 w/v)	0,67 ml	4 ml
%10 SDS	0,05 ml	0,1 ml
APS	40 µl	100 µl
TEMED	4 µl	10 µl

### 3.1.4.14 Transfer tamponu

Cell Signaling Technology marka 10X Tris-Glisin-SDS yürütme tamponundan 10 ml alınıp üzerine 30 ml metanol eklenir ve 100 ml’ye tamamlanır.

## 3.2 Yöntemler

### 3.2.1 Hücre kültürü

A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU’dan temin edilmiştir. A549 hücreleri tek tabakalı, yapışkan özelliktedir ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir. A549 hücreleri tümör süpresör P53 geninin yabancıl-tipine (wild-type) sahiptir. A549 hücreleri %24 oranında 66 kromozoma sahip (%22 oranında 64 kromozom) hipotriploid bir insan hücre hattıdır.

A549 hücrelerinin kültüründe kullanılan besiyerinin temel içeriği RPMI 1640 olmakla birlikte %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içermektedir. Hücre kültürü steril olarak hazırlanmış medya içeren T25 ve T75 flasklar içerisinde %5

CO<sub>2</sub> ve 37°C sıcaklık şartlarını sağlayan karbondioksitli inkübatörde steril şartlarda inkübe edilerek yapılmıştır.

Çoğaltılmakta olan hücreler, kültür flaskının yaklaşık %80'ini kaplayan yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Pasajlama sırasında hücre kültür flaskının içerisindeki tüm besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) eklenmiş, yıkama işlemi gerçekleştirilip PBS ortamdan uzaklaştırılmıştır. Flaska 2 ml 1Tripsin-EDTA çözeltisi eklenip 5 dk süreyle inkübatörde bekletilmiştir. İnkübatörden çıkarılan hücreler üzerine tripsini inaktive etmesi amacıyla 2 ml besiyeri eklenmiştir. Hücreler falkon tüpe toplanmıştır. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmıştır ve pelet 1 ml taze besiyeri eklenip süspanse hale getirilmiştir. Süspanse hale gelen hücrelerin hemositometre lamında sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayımı yapılan hücrelerin yapılması planlanan deneye özgü petri kaplarına ya da hücre kültürü flasklarına yeniden ekimi yapılarak pasaj işlemi gerçekleştirilmiştir. Süspanse haldeki hücreler, 1500 rpm'de 5 dk santrifüj işleminden sonra 1 ml hücre dondurma ortamı eklenerek -80°C 'de saklanmaktadır.

### **3.2.2 Kullanılan kemotrapötik ajanların hazırlanması**

Trastuzumab (Roche) ve 5-fluorourasil (Deva) etken maddeleri üretici firmaların talimatları doğrultusunda steril bidistile su ile çözülmüştür. Deneyler sırasındaki kullanımları için dilüsyon işlemleri RPMI 1640 ile yapılmıştır.

### **3.2.3 Hücre canlılığının belirlenmesi**

Hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir. MTT'nin canlı hücreler içerisine girmesiyle boyanın indirgenmesi sonucu mor renkli formazan tuzları meydana gelir ve bu sayede kolorimetrik ölçümlerle bağıl hücre canlılığı belirlenmektedir.

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan süksinat dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır.

Bu amaçla, 96 kuyucuklu plakaya sayımı yapıldıktan sonra kuyu başına 10,000 hücre ve 100 µl medya olacak şekilde ekim yapılmıştır ve hücrelerin yapışması beklenmiştir. Ekimi yapılan hücreler %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C sıcaklık şartlarında inkübe edilmiştir. Her kuyucuk için uygun konsantrasyonlar halinde hazırlanan ilaç ve medya karışımları toplam hacimleri 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır hücreler 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. Kuyucuklarda bulunan ilaç ve medya karışımının üzerine 10 µl MTT reagent uygulaması yapılmıştır ve 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından kuyucukların içindeki tüm medya pipet ile uzaklaştırılıp, her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenerek 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir. 96 kuyucuklu plaka ELISA okuyucu ile 570 ve 655 nm dalga boyunda okutulmuştur. Deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

### 3.2.4 Hücre sağkalım tayini

Uygulanan ilaçların hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin zamana bağlı olarak belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla tripan mavisi ile hücreler boyanarak hücre sağkalım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Her kuyucukta 500µl besiyeri içerisinde  $2 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara A549 hücrelerinin ekimi yapılmıştır ve hücrelerin yapışması beklenmiştir. MTT testi ile belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinde trastuzumab (70 µM) , 5-fluorourasil (75 µM) ve kombinasyon (20-40 µM) uygulanmıştır. Hücreler 24., 48., 72., 96., 120. ve 144. saatlerde sayımları yapılacak şekilde inkübe edilmiştir. Belirlenen saatlerde hücreler tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılarak tüplere toplanmıştır. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapılmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 50 µl besiyeri ve 50 µl tripan boyası eklenmiştir. Hücreler homojen hale getirilmiş ve bu karışımdan 10 µl örnek alınarak hemositometrede sayımları gerçekleştirilmiştir. Deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

### 3.2.5 Yara iyileşmesi deneyi

Uygulanan ilaçların lateral hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimlerinin üzerine etkileri yara iyileşmesi (wound-healing) deneyi ile incelenmiştir. A549 hücrelerinin her kuyucukta  $25 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekimleri yapılmıştır ve hücrelerin yapışması beklenmiştir. Yapışan hücreler düz bir hatta olacak şekilde her kuyucuk birbirine paralel 3 çizgi ve bu çizgilere dik olarak birbirine paralel 3 çizgi oluşturacak şekilde 200 µl'lik pipet ucu yardımıyla kazınmıştır. Hücre artıklarını

temizlemek amacıyla 1x PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama sonrası belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinde trastuzumab (70 µM), 5-fluorourasil (75 µM) ve trastuzumab 5-fluorourasil kombinasyonu (20 - 40 µM) uygulanmıştır. 24, 48, 72 ve 96. saatlerde hücreler invert mikroskop ile izlenmiştir ve görüntüleri kayıt edilmiştir.

### 3.2.6 Soft-agar koloni oluşum deneyi

Soft-agar koloni oluşum deneyi, hücrelerin yüzeye yapışmasının engellendiği (ankraj bağımsız) ortamda hücrelerin malign transformasyon yeteneğini tespit etmek için kullanılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda öncelikle 6 kuyucuklu petriler 1:1 oranında %20 FBS içeren RPMI ve %0,6 agaroz ile kaplanmıştır ve donması beklenmiştir. Her kuyucukta 5x10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde yine 1:1 oranında karıştırılmış %20 FBS içeren RPMI ve %0,3'lük agaroz karışımı, hazırlanan petrilerin üzerine ekilmiştir ve donması beklenmiştir. 20 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Her iki günde bir üst besiyeri taze besiyeri ile değiştirilmiştir. 20 gün sonunda kuyucuklar %0,005'lik kristal viyole ile muamele edilmiştir ve 20 dk bekletilmiştir. Boyama sonrasında oluşan koloniler mikroskop yardımıyla incelenmiştir.

### 3.2.7 Koloni oluşum deneyi

Uygulanan ilaçların, hücreler üzerindeki metastatik etkisinin ve hücreler tek başına bırakıldığında davranışlarını belirlemek için koloni oluşum deneyi yapılmıştır. Her kuyucukta 1000 µl besiyeri içerisinde 5x10<sup>2</sup> hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara A549 hücrelerinin ekimi yapılmıştır ve hücrelerin yapışması beklenmiştir. MTT testi ile belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinde trastuzumab (70 µM), 5-fluorourasil (75 µM) ve kombinasyon (20 - 40 µM) uygulanmıştır. Hücreler ilaçlı besiyeri ile 48, 72 ve 96 saat inkübe edildikten sonra ilaçsız besiyeri ile değiştirilerek hücrelerin büyümesi takip edilmiştir. 14 gün sonunda hücreler metanol astetik asit fiksatif (3:1) ile 5 dakika süreyle fikse edilmiştir. Hücreler %0,5'lik kristal viyole ile 20 dakika muamele edildikten sonra yıkanmıştır ve morfolojik görüntüleri elde edilmiştir.

Koloniler tarafından absorbe edilen kristal viyole miktarının spektrofotometrik ölçümünün yapılabilmesi için oda sıcaklığında 3 saat boyunca 2 ml metanol ile muamele edilmiştir. Elde edilen metanol-kristal viyole karışımlarının spektrofotometre ile 570 nm'de ölçümleri yapılmıştır.

### 3.2.8 Protein izolasyonu ve tayini

Hücre hattından proteinleri izole ederken; T75 flasklara ekilmiş hücrelerin tüm gruplarının üst fazları toplanıp 2 ml'lik toplama tüplerine alınarak 2 dakika 13 200 g'de santrifüjü yapılmıştır. Flask yüzeyine yap için hücre miktarına uygun olarak 3 ml PBS ile yıkaması gerçekleştirilerek scraper yardımı ile flask yüzeyleri kazınarak hücreler toplanmıştır. 2 ml hacimli toplama tüplerine alınan hücrelere 13 200 g'de 2 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra hücrelerin süpernatantları atılırken PBS ile yıkanmış hücreler tekrar 2 dakika 13 200 g'de santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra süpernatant atılmıştır ve PMSF eklenmiş RIPA tamponundada proteinler çözdürülmüştür. Örnekler önce 5 dakika buzda sonra 15 dakika shakerda oda sıcaklığında bekletilir. 13 200 g'de 2 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra süpernatant kullanılmak üzere ayrı bir ependorfa alınmıştır. İzole edilen proteinler -80°C'de muhafaza edilir.

Bradford analizi, elde edilen proteinlerin miktarını belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Protein konsantrasyonu ve absorbansını bilinen BSA (Bovine Serum Albumine) değerleri referans alınarak, izole edilen proteinin miktarı belirlenebilmektedir. 96-kuyucuklu plakada, 3 tekrar olacak şekilde 1, 2, 3, 4, 5'er µl BSA ve üzerlerine 200µl Bradford reaktifi eklenir. İzole edilen örneklerden, 3 tekrar olacak şekilde 1 µl örnekten eklenerek üzerlerine 200 µl Bradford reaktifi eklenir. 5 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildikten sonra ELISA okuyucuda 595nm'de ölçümü yapılır. BSA ile oluşturulan standart grafiğe göre protein miktarları belirlenir. Elektroforez için gerekli miktarda protein örneği ile 2X Laemli örnek tamponu 1:1 oranda karıştırılarak su banyosunda 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek örnekler hazırlanır.

### 3.2.9 SDS-PAGE elektroforezi

Çizelge 3.2'de belirtilen miktarlara göre %12'lik SDS jel hazırlanır. %12'lik ayırma jeli dikey elektroforez sistemine dökülür, yüzeyinin düzgün olması için üzerine 1 ml izopropil alkol eklenir. Ayırma jeli donduktan sonra izopropil alkol kokusu çıkana dek dH<sub>2</sub>O ile yıkama işlemi yapılır. Yükleme jeli dökülür. Yürütme tamponu içinde taraklar çıkarıldıktan sonra eşit miktarda protein örneği (50µg) yüklenerek Tris – Glisin – SDS yürütme tamponu ile SDS jel elektroforezi yapılır. Güç kaynağı ile bağlantıları yapılan elektroforez sisteminde örnekler SDS jelde istenilen konuma gelene dek 90 V'da yürütülür.

### 3.2.10 Western blotlama analizi

SDS-PAGE jel elektroforezinde yürütülen jel dikkatlice nitro sellüloz membran üzerine alınmıştır. Top-bottom stack paketi açılıp üzerine SDS-PAGE'ten alınan membran yerleştirilmiştir. Üzerine dH<sub>2</sub>O ve transfer buffer ile yıkanmış filtre kağıdı üzerinden arada hava boşluğu kalmayacak şekilde rulo üzerinden geçilmiştir. Hemen üzerine top stack ve onunda üzerine absorbans pad eklenerek cihaz kapatılmıştır. Transfer işlemi 20V'da 7 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Transfer işleminden sonra membranlar %5'lik yağsız süt içerisinde 1 saat süreyle shaker ile çalkalanarak inkübe edilmiştir. Bir saatlik inkübasyonun sonunda primer antikolarlar 1:1000 oranında %5'lik yağsız süt ile hazırlanarak rotatörde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra membranlar 1X TBST ile 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Sekonder antikolarlar 1:5000 oranında %5'lik yağsız süt ile hazırlanmıştır. 24 saatin sonunda membranlar 3 kez 10 dakika süreyle 1X TBS-T ile yıkanmıştır. 4.yıkama 1X TBS ile yapılmıştır. Membran güçlendirilmiş kemilüminesans (ECL) içerisine alınmış, birkaç dakika bekletildikten sonra ve görüntüleme cihazına alınmıştır. Elde edilen görüntülerdeki bant kalınlıkları ImageJ programı ile sayısal verilere çevrilmiştir.

### 3.2.11 İstatistiksel analiz

Yapılan bütün deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Wesrern blot yöntemi ile elde edilen görüntülerdeki bant kalınlıkları ImageJ programı ile sayısal verilere çevrilmiştir. Yapılan deneylerin ortalamaları alınarak Graph Pad 4.04 istatistik programı ile istatistiksel analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerde *bağımsız t-testi* kullanılmıştır.

Olasılık değerleri;

$p > 0,05$  anlamlı düzeyde farklılık yoktur,

$p < 0,05$  önemli düzeyde farklılık,

$p < 0,01$  çok önemli düzeyde farklılık,

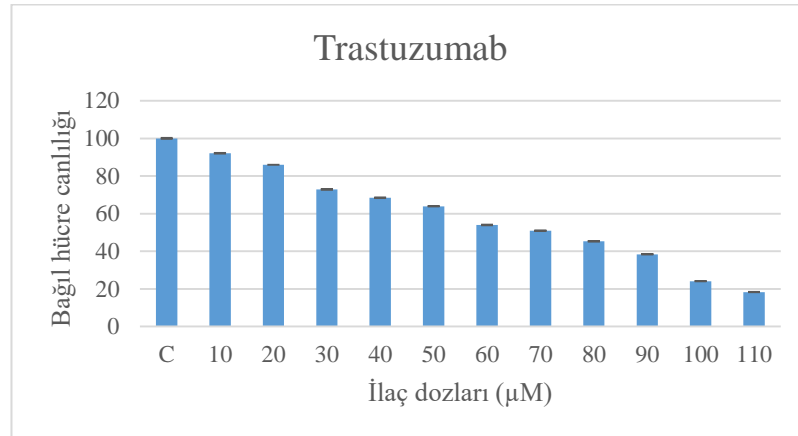
$P < 0,001$  ileri düzeyde farklılık, olarak değerlendirilmiştir.

## 4 BULGULAR

### 4.1 A549 Hücre Hattında Trastuzumab, 5-Fluorourasil ve Trastuzumab - 5-Fluorourasil Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

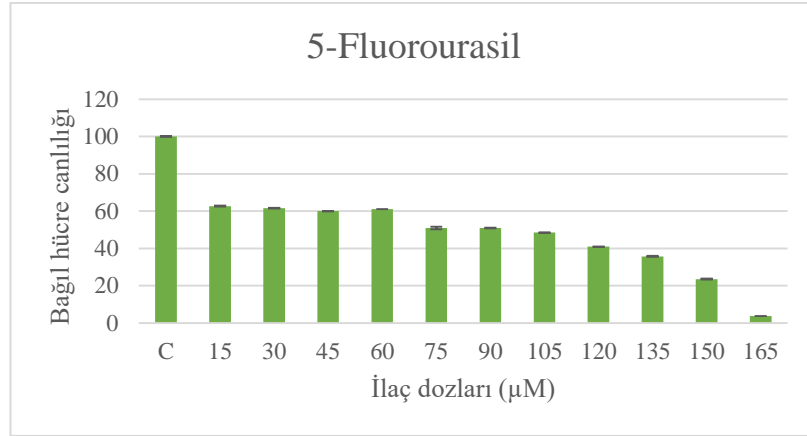
A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonunun hücre canlılığı üzerinde doza bağlı etkilerinin incelenmesi amacıyla MTT deneyi yapılmıştır. Bu amaçla A549 hücrelerine artan konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat boyunca trastuzumab (0-140  $\mu\text{M}$ ) ve 5-fluorourasil uygulaması yapılmıştır. Elde edilen sonuçları takiben A549 hücrelerine artan dozlarda trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulaması 24 ve 48 saat parametreleri ile yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar neticesinde kullanılan ilaçların artan dozları ile birlikte A549 hücrelerinde bağıl hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Hücrelerin %50'sinin öldüğü değer olan  $\text{IC}_{50}$  değeri 48. saatte trastuzumab için 70  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).

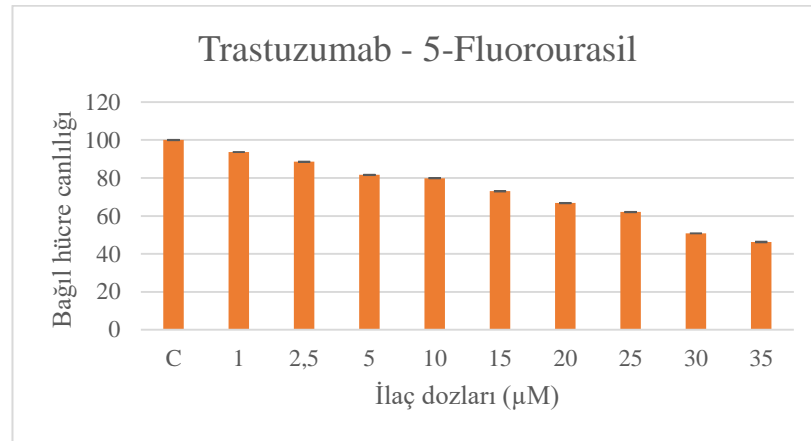


**Şekil 4.1.** Trastuzumabın farklı dozlarının (0-110  $\mu\text{M}$ ) A549 hücre hattında 48 saatte hücre canlılığı üzerine etkisi (ilaç uygulaması yapılmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $\text{IC}_{50}$  değeri 70  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir).

5-fluorourasil için 48. saatte  $\text{IC}_{50}$  değeri 75  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2). Trastuzumab ve 5-fluorourasil kombinasyonu için 48. saatte  $\text{IC}_{50}$  değeri 30-30  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).



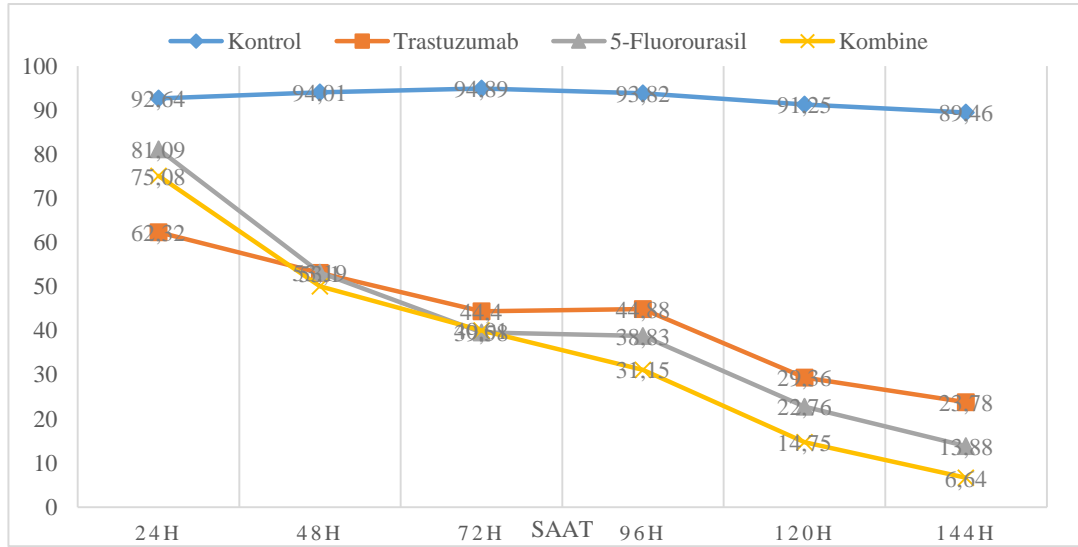
**Şekil 4.2.** 5-Fluorourasilin farklı dozlarının (0-165 µM) A549 hücre hattında 48 saatte hücre canlılığı üzerine etkisi (İlaç uygulaması yapılmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $IC_{50}$  değeri 75 µM olarak belirlenmiştir).



**Şekil 4.3.** Trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonunun farklı dozlarının (0-35 µM) A549 hücre hattında 48 saatte hücre canlılığı üzerine etkisi (İlaç uygulaması yapılmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $IC_{50}$  değeri 30-35 µM olarak belirlenmiştir).

A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında MTT deneyi sonucunda belirlenen  $IC_{50}$  değerinde uygulanan trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab 5-fluorourasil kombinasyonunun zamana bağlı etkilerinin incelenmesi için sağkalım deneyi yapılmıştır. İlaç uygulanan hücelere 24, 48, 72, 96, 120 ve 144. saatlerde tripan mavisi ile boyama yapılmıştır ve hemositometre ile canlı ve ölü hücre sayımları gerçekleştirilmiştir. Yapılan sayımlar sonucunda ölü ve canlı hücre oranları hesaplanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24. saatte trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonunun hücre büyümesi üzerinde benzer etkiye sahipken, 48 saat ve sonrasında trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu

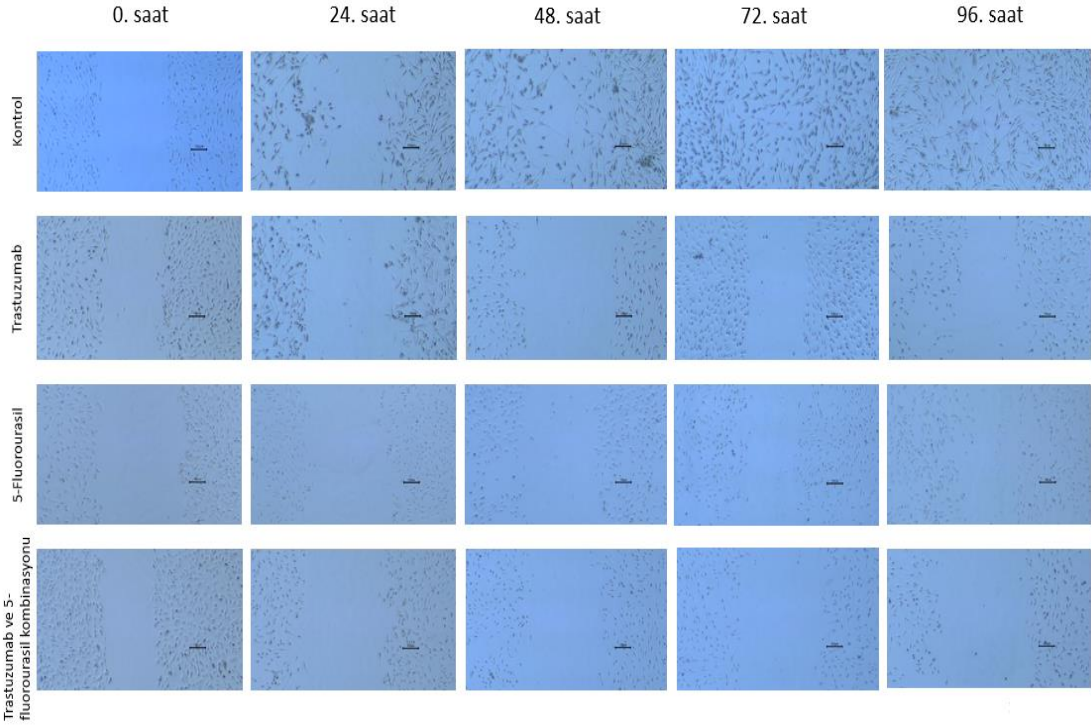
uygulamasının hücre canlılığında anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** Yara A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab 5-fluorourasil kombinasyonunun hücre proliferasyonu üzerine etkileri (A549 hücrelerine trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulaması yapılmıştır ve zamana bağlı (24-144 Saat) etkileri incelenmiştir. Her 24 saatte bir kaldırılan hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayımları gerçekleştirilmiştir).

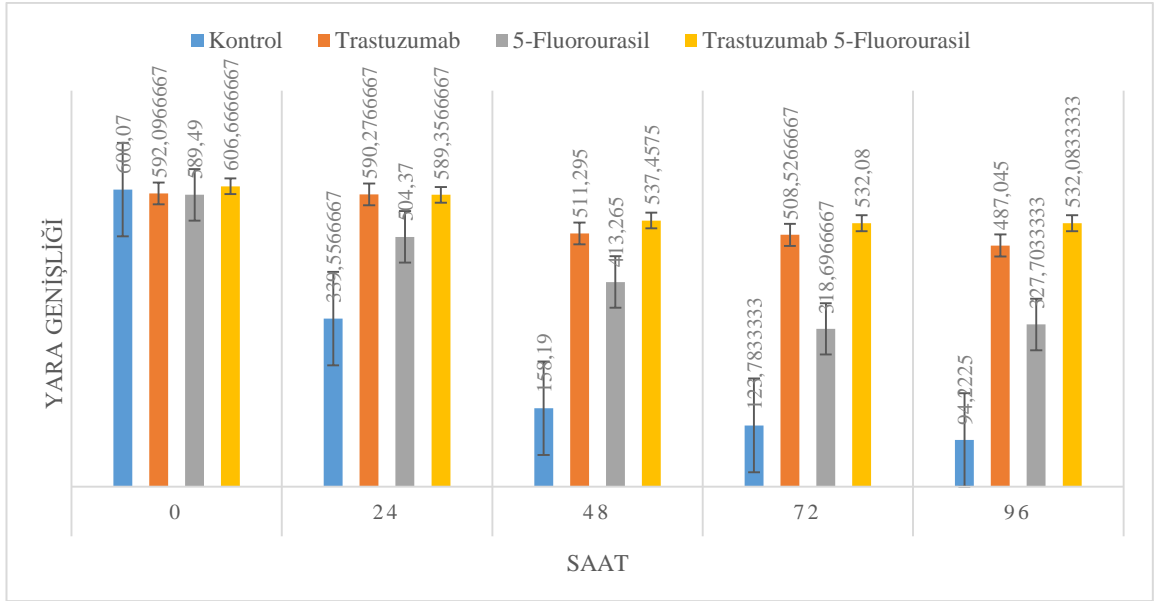
Trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonunun lateral hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır. Yüzeğe yapışık halde olan A549 hücrelerine pipet ucu ile yara açılarak trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulaması sonrasında yara genişliğinde meydana gelen değişiklikler her 24 saatte bir ölçüm yapılarak kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda kontrol grubunda günden güne yaranın kapandığı gözlenirken; trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulamasının hücre göçünü ve proliferasyonu engellediği gözlenmiştir (Şekil 4.5).



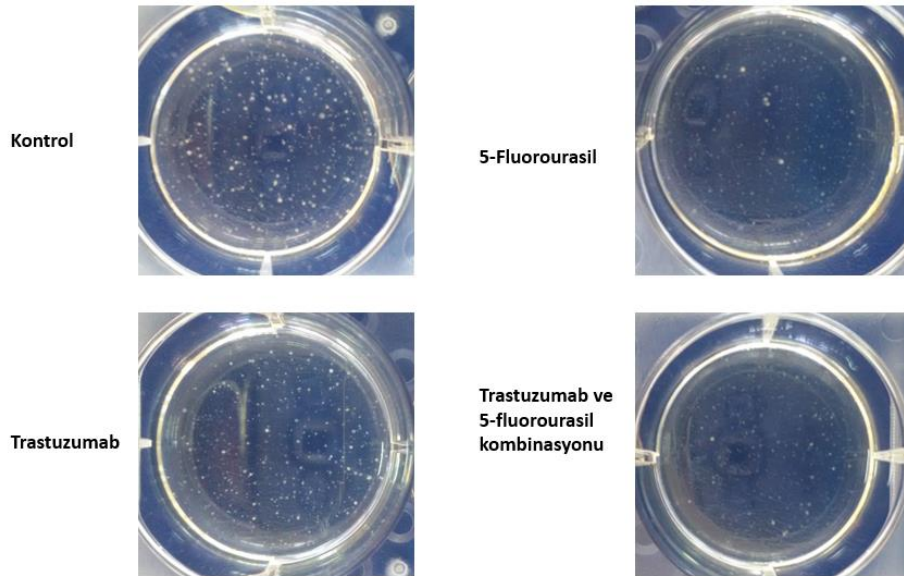
**Şekil 4.5.** Trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab 5-fluorourasil kombinasyonun hücre göçü ve proliferasyonu üzerine etkileri (*Yara alanı ışık mikroskobu altında incelenmiştir (4X)*).

Yara iyileşmesi deneyinde yara kapanması 24 saatlik aralıklarla incelenmiştir. Yara genişlikleri ölçüldüğünde kontrol grubunda 0. saatte 600  $\mu\text{m}$  olan yara boyutunun 96 saat sonunda 94  $\mu\text{m}$ 'ye düştüğü gözlenmiştir. Trastuzumab uygulanan hücrelerde 0. saatte 592  $\mu\text{m}$  olan yara boyutunun 96 saat sonunda 484  $\mu\text{m}$ 'ye düştüğü gözlenmiştir. 5-Fluorourasil uygulanan hücrelerde 0. saatte 589  $\mu\text{m}$  olan yara boyutunun 96 saat sonunda 327  $\mu\text{m}$ 'ye düştüğü gözlenmiştir. Trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulanan hücrelerde 0. saatte 606  $\mu\text{m}$  olan yara boyutunun 96 saat sonunda 532  $\mu\text{m}$ 'ye düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulamasının yara iyileşmesini engellediği gözlenmektedir (Şekil 4.6).



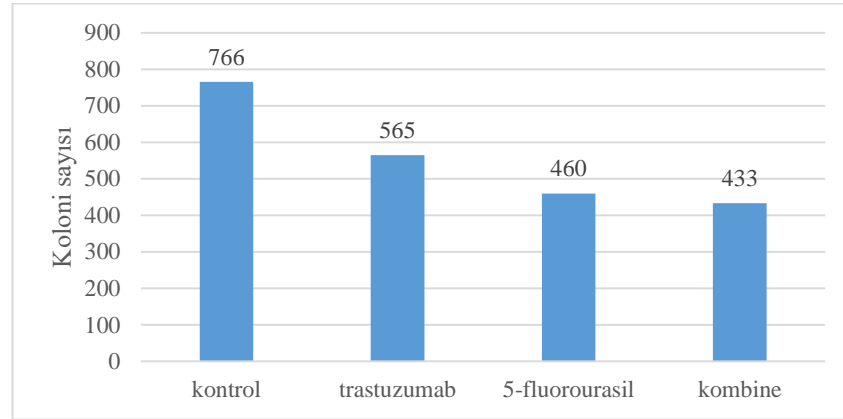
**Şekil 4.6.** Yara iyileşmesi deneyi yara genişliği ölçümleri. (Gruplar karşılaştırıldığında kombinasyon uygulamasının hücre proliferasyonunun azalttığı ve hücre göçünü engellediği gözlenmiştir).

Hücreler katı bir yüzeyden bağımsız bir şekilde ve birbirini üzerinde büyümezler. Yüzeyden bağımsız bir şekilde büyüebilme yeteneği kazanabilmek için transformasyon geçirirler. Bu amaçla soft-agar koloni oluşum deneyi yapılmıştır. Soft-agar deneyi ile elde edilen görüntüler Şekil 4.7’de sunulmuştur.



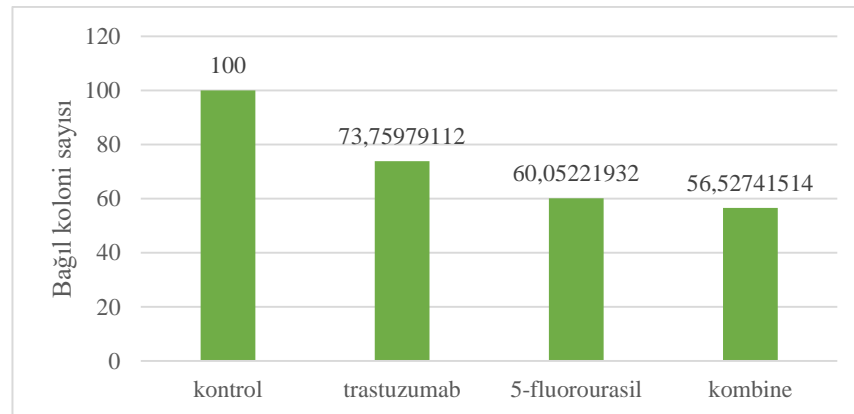
**Şekil 4.7.** Hücrelerin yüzeye yapışmasının engellendiği soft-agar ortamında trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonunun hücre büyümesi üzerine etkileri.

Yapılan soft agar deneyinde ilaç uygulanmayan kontrol grubunda ilaç uygulaması yapılan diğer tüm gruplara kıyasla daha fazla sayıda (766) koloni sayılmıştır. Trastuzumab uygulanan grupta 565, 5-fluorourasil uygulanan grupta 460 ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulanan grupta 433 koloni sayılmıştır (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** Soft-agar ortamında trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulanan grupların koloni sayıları.

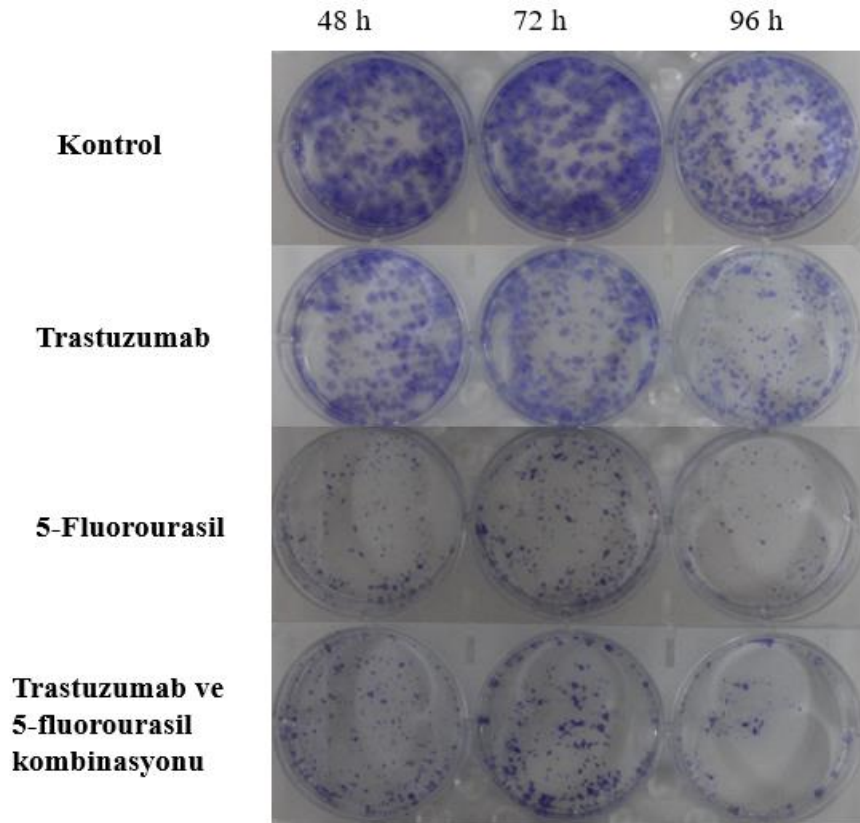
Soft agar deneyi sonucunda elde edilen koloni sayıları bağıl olarak değerlendirildiğinde kontrol grubuna kıyasla; trastuzumab uygulamasının hücre büyümesi ve koloni oluşumunu %26 oranında inhibe ettiği, 5-fluorourasil uygulamasının, kontrol grubuna kıyasla hücre büyümesi ve koloni oluşumunu %39 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulamasının, kontrol grubuna kıyasla hücre büyümesi ve koloni oluşumunu %43,47 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** Soft-agar ortamında trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulanan grupların koloni sayılarının bağıl değerlendirmesi.

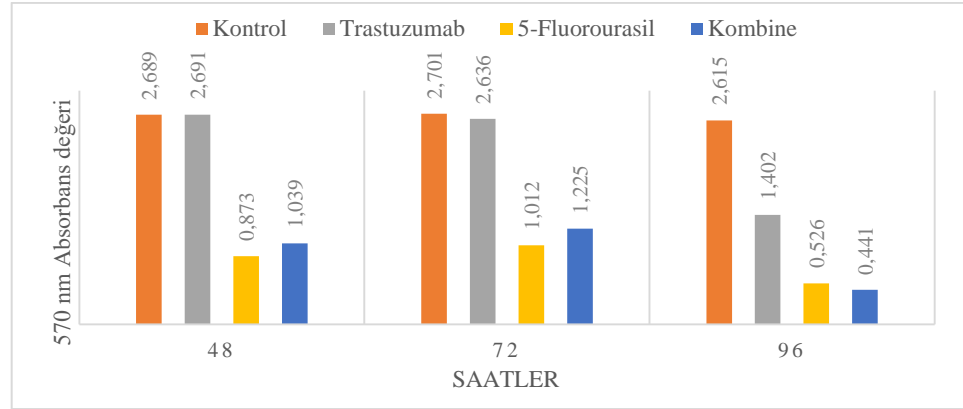
Sonuç olarak trastuzumab - 5-fluorourasil kombine uygulamasının hücrelerin yüzeyden bağımsız bir şekilde büyümelerini trastuzumabın ve 5-fluorourasilin tekli uygulamalarına kıyasla daha fazla inhibe ettiği gözlenmiştir.

Koloni oluşum deneyi, hücrelerin tek başına bırakıldıklarında nasıl davrandıklarını belirlemeye yönelik metastatik etkiyi değerlendirmeye yardımcı olan bir tekniktir. Bu amaçla trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulamasının etkilerini belirlemek amacıyla koloni oluşum deneyi yapılmıştır. Koloni oluşum deneyi sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.10'da görülmektedir. Elde edilen görüntüler doğrultusunda kontrol grubuna kıyasla trastuzumab, 5- fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulamalarının koloni oluşumunu inhibe ettiği görülmektedir.



**Şekil 4.10.** Koloni oluşum deneyi görüntüsü

Koloniler tarafından absorbe edilen kristal viyole miktarlarının spektrofotometrik ölçümü sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.11'de gösterilmektedir. Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulamasının koloni oluşumunu 48. saatten itibaren inhibe ettiği görülmektedir.

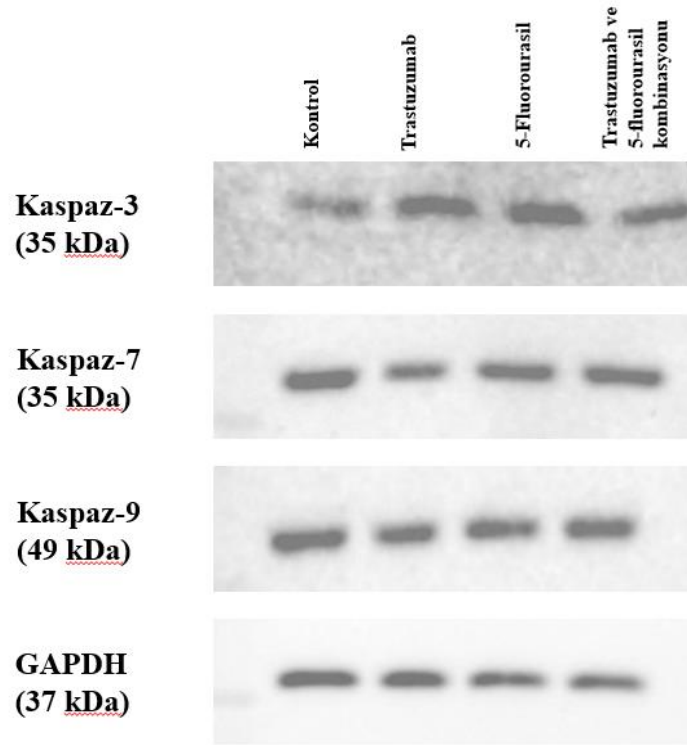


**Şekil 4.11.** Koloniler tarafından absorbe edilen kristal viyole miktarlarının spektrofotometrik ölçümü.

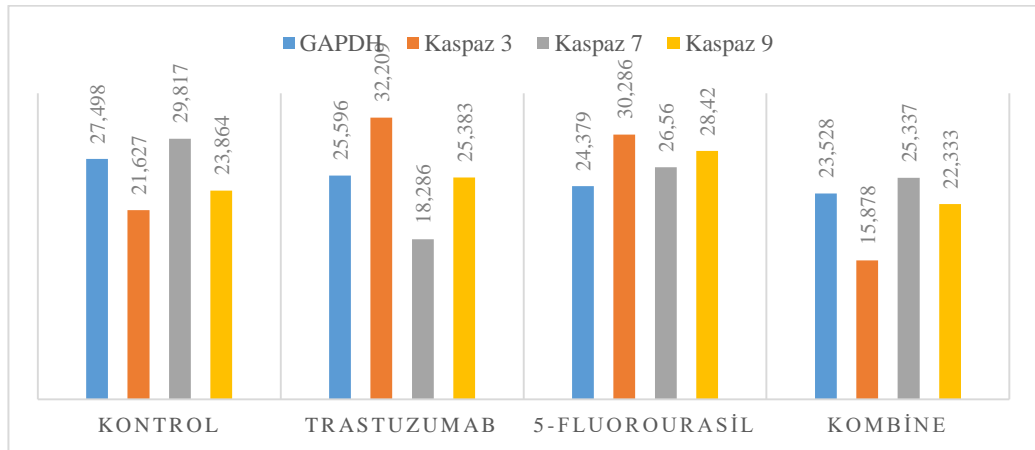
#### **4.2 Trastuzumab, 5-Fluorourasil ve Trastuzumab – 5-Fluorourasil Kombinasyonunun A549 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Gösterilmesi**

Trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulamasının A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında apoptotik mekanizmada görevli proteinler olan kaspazlar üzerindeki etkilerinin araştırılması için western blot analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla trastuzumab, 5-fluorourasil ve trastuzumab 5-fluorourasil kombinasyonu uygulaması yapılan A549 hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9 proteinlerinin western blot analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda G-box görüntüleme cihazı kullanılarak elde edilen kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-9 ve GAPDH proteinine ait membran görüntüsü Şekil 4.12’de gösterilmektedir.

Western blot sonucunda elde edilen membranların görüntüleri, ImageJ programı yardımıyla sayısal verilere dönüştürülmüştür (Şekil 4.16). Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında kaspaz-3, trastuzumab ve 5-fluorourasil uygulanan gruplarda artış gösterirken, trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulanan grupta azalma göstermiştir. Kaspaz-7 proteini kontrol, 5-fluorourasil ve trastuzumab - 5-fluorourasil kombinasyonu uygulanan gruplarda yakın seviyede ekspresyon gösterirken, trastuzumab uygulanan hücrelerde seviyesi azalmıştır. Kaspaz-9 proteininin seviyelerinde ciddi bir farklılık gözlenmemiştir.



**Şekil 4.12.** Kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-9 ve GAPDH proteinlerine ait membran görüntüsü.



**Şekil 4.13.** Western blot yöntemi ile elde edilen bantların kalınlık ölçümleri.

## 5 TARTIŞMA

Akciğer kanseri akciğer dokularını oluşturan hücrelerin kontrolsüz ve anormal çoğalması ile oluşan bir hastalıktır. Tüm kanser ölümleri içinde, akciğer kanserinin, her iki cinste en sık ölüm nedeni olduğu ve kanser ölümlerinin de %17,8'inden sorumlu olduğu bilinmektedir (Cruz, 2001).

Bu çalışmada; trastuzumab ve 5-fluorourasilin A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında; hücre canlılığı üzerine etkileri ile birlikte hücrede apoptoz mekanizmasında görevli olan olan kaspaz-3 kaspaz-7 ve kaspaz-9 proteinleri üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Temmuz 2018 Pubmed verilerine göre trastuzumabın A549 hücre hattında kullanımı ile ilgili literatürde sınırlı sayıda (9 makale) makale bulunmaktadır. Pubmed Temmuz 2018 verilerine göre A549 hücre hattında 5-fluorourasilin kullanımı ile ilgili son 5 yılda 110 yayın bulunmaktadır. Yine Temmuz 2018 verilerine göre, A549 hücre hattında trastuzumab ile 5-fluorourasilin kombine kullanımı veri tabanlarında yer almamaktadır. Literatürdeki bu açıklığın giderilmesi amacıyla bu araştırma planlanmıştır.

İleriye yönelik klinik denemeler için bu tür bir kombinasyon tedavisinin değerlendirilmesi, özellikle ilaç direnci geliştirme olasılığı olan hastalar için etkili tedavi seçeneklerinin sınırlı olması açısından gerekli olduğu düşünülmektedir.

### 5.1 A549 Hücre Hattında Trastuzumab ile İlgili Literatür Bilgisi

Son zamanlarda, akciğer kanserinin moleküler biyolojisinin en iyi şekilde anlaşılması, tümörün genotipine bağlı olarak akciğer kanserinin teşhisinde ve tedavisinde iyileşmeye yol açmıştır. Özellikle EGF aile reseptörlerinin (EGFR, HER2, HER3 ve HER4), akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu, göçü, sağ kalımı, adhezyonu ve farklılaşmasında rol oynadığı bilinmektedir (Arman, vd., 2013). Birçok araştırmacı tarafından EGFR ve HER2 gen-protein ekspresyonu ve gen amplifikasyonu üzerindeki değişiklikleri incelenmiştir. Akciğer kanseri biyobelirteçleri arasında düşük oranda gözlenmesi sebebiyle HER2 zayıf tarif edilen bir hedefdir. HER2 proteininin aşırı ekspresyonunun veya gen amplifikasyonunun meme kanserinde HER2-hedefleyici ilaçlara duyarlılıkla ilişkili olduğu yaygın bir şekilde bilinmektedir, fakat HER2'nin akciğer kanserinde tutulumu fazla araştırılmamıştır (Arteaga, vd., 2012).

Günümüzde, EGFR aile üyelerinin eşzamanlı inaktivasyonu, epitelyal kanserlere karşı seçici tedavilerin geliştirilmesi için bir stratejiyi temsil etmektedir. EGFR ve HER2'yi birlikte sentezleyen tümörler, tek başına reseptörü eksprese eden tümörlere göre daha az avantajlı bir prognoz sergilerler ve bu da iki reseptörün tümör progresyonunda işbirliğini gösterir. ( Li, vd., 2005; Privitera, vd, 2016). Mevcut EGFR ve HER2 tabanlı hedefe yönelik tedaviler, monoklonal antikoların ve küçük moleküllü inhibitörlerin kullanımını içermektedir. Trastuzumab, meme kanseri hastalarının tedavisi için onaylanmış olan ve HER2'yi eksprese eden tümörleri olan metastatik meme kanseri hastalarının hayatta kalma süresinin uzadığı bir monoklonal antikordur (Altundağ, vd., 2005).

Anti-HER2 tedavisinin şu anda HER2 proteinini aşırı eksprese eden veya HER2 geni için amplifiye edilmiş meme, gastrik ve gastroözofagal kanserler için onaylanmış olmasına rağmen, HER2 aberasyonları (gen amplifikasyonu, gen mutasyonları ve protein aşırı ekspresyonu) rapor edilmektedir. Mesane, serviks, kolon, endometriyum, germ hücre, glioblastoma, baş ve boyun, karaciğer, akciğer, yumurtalık, pankreas ve tükürük kanalı tümörlerinin yaklaşık %1 - 37' si HER2 aberasyonlarını barındırmaktadır (Yan, vd., 2014). Gastroözofagal, mide kanseri gibi farklı kanser türleri için farklı kemoterapötik ajanlar ile birlikte kullanımları mevcuttur.

Bunn, vd., (2001) çalışmasının sonuçları, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatlarının (NCI-H322, NCI-H226, NCI-H441, NCI-H1703, NCI-H324, NCI-H2122, NCI-H125, NCI-H1334, NCI-H1435, NCI-H157, NCI-H1264, NCI-H661, NCI-H520, NCI-H460, NE-18, SW1573, A549, Calu-3, SKLU-1) sık sık hücre yüzeyinde HER2 ifade ettiğini, buna karşın küçük hücreli akciğer kanseri hücre hatlarında (NCI-H345, NCI-H209, NCI-H187, NCI-H69, NCI-H510, NCI-H146, NCI-H128, NCI-H82, NCI-H196, NCI-N417, SHP-77) ifadesinin olmadığını göstermektedir. Çalışmada, farklı akciğer kanseri hücre hatlarının HER2 düzeyleri FACS ve immünohistokimya yöntemleri ile belirlenmiştir. A549 hücre hattının HER2 ekspresyon seviyesinin %72 olduğunu (SKBR3 hücre hattı HER2 ekspresyon seviyesi için referans hücre hattı kabul edilip %100 olarak kabul edildiğinde); A549 hücrelerinde rastlanan ortalama HER2 gen sayısının 3,7 olduğu, maksimum HER2 gen sayısının ise 8 olduğunu bildirmişlerdir. SKBR3 hücre hattında 0,1µM gibi düşük dozlarda büyüme inhibisyonu gözlenmiştir. Yüksek HER2 ifadesine sahip küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı Calu-

3'de büyüme, SKBR3 meme kanseri hücre hattı ile benzer bir dereceye kadar inhibe edilmiştir. Aksine, orta düzeyde HER2 ifade eden küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatları NCI-H322 ve A549'u inhibe etmek için daha yüksek konsantrasyonlarda trastuzumab gerekmiştir. Her iki hücre hattında da sadece yüksek konsantrasyonlarda (40  $\mu$ M) kısmi inhibisyon gözlenmiştir, hücre hatları için IC<sub>50</sub> değerleri belirtilmemiş olup, trastuzumabın hücreler üzerindeki anti-proliferatif etkisinin HER2 ekspresyonu ile korelasyon gösterdiği ifade edilmiştir.

Çalışmamız Bunn vd.'nin (2001) yaptığı çalışma ile kıyaslandığında çalışmada IC<sub>50</sub> değerleri belirtilmemiş olsa da trastuzumabın yüksek dozları ile hücre proliferasyonunun inhibe edildiği her iki çalışmada da belirtilmektedir.

Nakamura, vd., (2005) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin sıklıkla EGFR ve HER2'yi ifade etmesi nedeniyle, ZD1839 ve trastuzumab kombinasyonunun bir additif veya sinerjik bir anti-tümör etkiye sahip olup olmadığını araştırmışlardır. ZD1839, çeşitli seviyelerde EGFR, HER2, HER3 ve HER4 ifade eden dört küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattının (A549, NCI-H23, NCI-H727 ve NCI-H661) büyümesini inhibe etmiştir. ZD1839, A549 hücrelerinde trastuzumab ile birleştirildiğinde anlamlı bir sitotoksik etki gözlenmiştir. Bazal büyüme koşulları altında hem ZD1839 hem de trastuzumab ile tedavi edilen A549 hücreleri, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazında artan hücre sayısı, artmış P27 ekspresyonu, siklin E'nin ve siklin D1'in ekspresyonunu azaltmıştır ve her iki ilacı ile tedavi edilen hücrelerle karşılaştırıldığında Rb fosforilasyonunu azaltmıştır. Kombinasyon tedavisi EGFR, HER2, ERK-1/2 ve Akt'ın fosforilasyonunu tek başına ajan ile tedavi ile karşılaştırıldığında azaltmıştır.

Çalışmamız ile uyumlu bir şekilde A549 hücre hattında HER2'nin hedeflenerek hücre hattı üzerinde anti-proliferatif etki gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Privitera, vd., (2016) çalışmalarında anti-HER2 antikoru trastuzumab ve insanlaştırılmış anti-EGFR antikor setuksimabın bir kombinasyonu ile tedavi edilen A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde sinerjik bir büyüme inhibisyonunu göstermektedir.

Çalışmamız Privitera vd.'nin yaptığı çalışma ile kıyaslandığında trastuzumabın hücre proliferasyonundaki inhibisyon etkisi her iki çalışmada da belirtilmektedir.

Ergün, vd., (2014) HER2 pozitif SKBR3 meme kanseri hücre hattında trastuzumab ile kombinasyon halinde miR-122-5p'nin apoptozu tetiklemesini incelemişlerdir. Trastuzumab uygulanan SKBR3 hücrelerinde miR-122-5p

transfeksiyonu sonucu kaspaz-3 ve kaspaz-8 ifade düzeylerinin transfeksiyon yapılmayan hücrelere göre arttığını fakat kaspaz-9 ifade düzeyinin anlamlı ölçüde değişmediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, kaspaz-3 ile beraber kaspaz-8'in ifade düzeyinin artması, apoptozun ekstrinsik yolak aracılığı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Sonuç olarak, trastuzumab uygulaması ile miR-122-5p kombinasyonunun apoptoz üzerindeki artırıcı etkisinin, HER2 pozitif meme kanseri vakaları için yeni bir tedavi seçeneği olarak sunabileceğini ifade etmişlerdir.

Buradan yola çıkarak HER2 pozitif hücre hatlarında trastuzumabın farklı kombinasyonlarının hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerindeki etkilerinin belirlenmesinin güncel bir araştırma konusu olduğu yorumu yapılabilmektedir.

Karaca, vd., (2014) HER2-pozitif insan meme kanseri hücre hatları, MDA-MB-453 ve SKBR3'teki trastuzumab ile kombinasyon halinde AT-101'in olası sinerjik sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırmıştır. Trastuzumab'ın AT-101 ile kombinasyonu, tek başına herhangi bir ajan ile karşılaştırıldığında, 72 saatte meme kanseri hücrelerinde güçlü bir sinerjik sitotoksikite göstermiştir. Kombine tedavi ayrıca meme kanseri hücrelerinde DNA fragmentasyonu ve kaspaz 3/7 aktivasyonunu indüklemiştir. PI3K inhibitörü LY294002, meme kanseri hücre hatlarında kombinasyon tedavisinin apoptotik etkisini inhibe etmiştir, bu durumun; kombinasyon tedavisinin apoptotik hücre ölümüne yol açan PI3K sinyal yolunu engellediğini gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda 48 saat trastuzumab uygulaması ile gözlenen kaspaz-3 seviyesindeki artış Karaca vd.'nin çalışması ile uyumlu görülmektedir. Ancak kaspaz-7'de gözlenen azalmayı açıklamaya yardımcı değildir. Karaca vd.,'nin çalışmasında kaspaz3/7 aktivitesi yalnızca enzimatik aktivite açısından spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu nedenle artış gösteren kaspaz 3/7 aktivitesinin kaspaz 3 veya kaspaz 7 proteinlerinden hangisinin aktivasyonu ile gerçekleştiği konusunda bilgi verici değildir.

## **5.2 A549 Hücre Hattında 5-Fluorourasil ile İlgili Literatür Bilgisi**

5-fluorourasil, akciğer kanseri dahil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinin tedavisinde bir ilaç olarak etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Antitümör aktivitesinin altında yatan başlıca mekanizma, 5-fluorourasilin DNA ve RNA sentezine müdahalesine atfedilmiştir. Geçtiğimiz on yıllarda, 5-FU ile apoptoz indüksiyonu kanser tedavisinde en önemli faktör olmuştur (Pan, vd., 2013).

Pan, vd., (2013) A549 hücre hattında 5-fluorourasil uygulamasının otofajiye neden olabileceğini bildirmiştir. Kaspazların aktivasyonunun intrinsik mitokondriyal apoptotik yolla sitokrom-c tarafından yönlendirilmesi nedeniyle, inhibe edilen otofajinin, 5-fluorourasil aracılı sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması üzerindeki etkisi, hücre fraksiyonasyonu kullanılarak araştırılmıştır. 5-fluorourasil ile tedavi edilen hücrelerde otofajinin inhibisyonunun, sitoplazmada sitokrom-c birikiminde önemli bir artışa yol açtığını ortaya çıkarmıştır. 5-fluorourasil ile muamele edilmiş hücrelerde otofajinin inhibisyonu, mitokondriyal membran potansiyelinde bariz bir düşüğe neden olmuştur. Bu veriler, daha sonra kaspazların aktivasyonunu ve bölünmesini tetikleyen ve hücre apoptozu ile sonuçlanan 5-FU kombine 3-metiladeninin indüklü sitokrom-c salıverilmesi için mitokondriyal membran potansiyelinin gerekli olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar, 5-FU ile tetiklenen otofajik yanıtın, hücre apoptozuna karşı koruyucu bir rol oynadığını ve otofajinin inhibisyonunun, ROS oluşumunun uyarılması yoluyla 5-FU ile indüklenen kaspaz bağımlı apoptozu duyarlı hale getirebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda 5-FU'nun hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Ancak hücre ölümünün apoptoz, nekroz veya otofaji mekanizmalarından hangisinin aracılığı ile gerçekleştiğine dair bir veri mevcut değildir.

Tong, vd., 5-FU'nun apoptoz yoluyla oral kanser hücresi ölümünü indüklediğini göstermektedir (2000). Nita, vd., 1998 yılında yaptığı çalışmada insan kolon kanseri hücre hatlarında Bcl-2 protein ailesinin bazı üyelerinin 5-fluorourasil ile modüle edildiğini ve Bcl-XL'in Bax'a oranının 5-FU'ya karşı kemosenitivite ile ilişkili olabileceğini, P53 ve Bcl2 protein ailesi, kemoterapiyle indüklenen apoptozda, ancak hücre tipine bağlı bir şekilde yer aldığını ifade etmiştir.

Mhaidat, vd., 2014 yılında yaptığı çalışmada, 5-fluorourasilin kaspaz-9 bağımlı şekilde apoptozu başlattığını ifade etmiştir. Kesilmiş kaspaz-9 HCT116 hücrelerinde 16.saatte belirgin olarak gözlendiğini bildirmişlerdir. Bu bulgular, kaspaz-9'un 5-FU kaynaklı apoptozda başlatıcı kaspaz olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda 48 saatlik 5-FU uygulamasının ardından yapılan kaspaz-9 proteinin western blot analizinde kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durumda hücrelerin 5-FU'ya maruz bırakıldığı süre ile kaspaz-9 seviyesinin ilişkili olduğu yorumu yapılabilir.

Pegram vd.. (1999) SK-BR-3 insan meme kanseri modelinde 5-fluorourasil ve trastuzumab kombinasyonunun etkisinin antagonistik olduğunu göstermişlerdir. Trastuzumab ve 5-fluorourasil arasındaki in vitro antagonistik etkileşimin mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşmamış olsa da, trastuzumab S fazında SKBR-3 hücrelerinin fraksiyonunu azaltabilmektedir ve bu trastuzumab ile tedavi edilen hücrelerin 5-fluorourasile karşı duyarlılığın azalmasından sorumlu olabilir. Bir in vitro antiproliferasyon analizinde, trastuzumab ve 5-fluorourasil, KPL-4 ve BT-474 insan meme kanseri hücre hatlarında, SKBR-3 insan meme kanseri hücreleri ile yapılan çalışmanın bildirilen antagonistik sonuçları aksine additif etkileşim göstermiştir. Bir in vitro antiproliferasyon analizinde, trastuzumab ve 5-fluorourasil, KPL-4 ve BT-474 insan meme kanseri hücrelerinde, SKBR-3 insan meme kanseri hücreleri ile çalışmanın bildirilen sonuçları ile tutarlı bir antagonistik etkileşim göstermiştir. Trastuzumab ve 5'-dFurd kombinasyonu, KPL-4 hücrelerinde in vitro olarak antagonistik bir etkileşim gösterdiği halde, BT-474 hücrelerinde additif etkileşim göstermiştir. 5'-deoksi-5-fluorouridin aktif metabolit 5-fluorourasile dönüştürüldükten sonra antiproliferatif aktivite sergilediğinden, 5'-deoksi-5-fluorouridin ve 5-fluorourasilin trastuzumab ile aynı mekanizma ile antagonist olarak etkileşmesi olasıdır. BT-474 meme kanseri modelinde kombinasyon halinde bulunan 5'-deoksi-5-fluorouridin ve 5-fluorourasil arasındaki tutarsızlıkların nedeni açıklanamamıştır. Diğer taraftan, in vivo deneylerde, trastuzumab ile kapesitabin veya 5'-deoksi-5-fluorouridin kombinasyonu KPL-4 ve BT-474 hücre hatlarında additif antitümör aktivite göstermiştir. Kombinasyon tedavisi, tümör büyümesi inhibisyonu ve tümör büyümesi gecikmesi açısından tek başına tek ajanla tedaviden daha üstündür. Bu nedenle, bazı hücre hatları için in vitro olarak rapor edilen antagonistik etkileşim, in vivo olarak gözlenmemiştir. Trastuzumabın in vivo antitümör aktivitesinin mekanizmasının, incelenen tümör modellerinde in vitro olandan farklı olması muhtemeldir. İn vivo ve in vitro sonuçlar arasındaki uyumsuzluğun nedeni açıklığa kavuşturulmamıştır (Fujimoto-Ouchi, vd., 2002).

Trastuzumab ve 5-fluorourasil kombinasyonunun antagonistik veya additif etkisinin hücre hatlarının özelliklerine bağlı olarak değiştiği ifade edilebilir. Ancak bu etkileşimin mekanizması detaylı araştırmalara ihtiyaç duymaktadır.

Othani, vd., (2000) çalışmasında skuamöz hücreli karsinom hücre hattı olan NA hücreleri, kaspaz 1, 3 ve 8 inhibitörleri ile birlikte cisplatin veya 5-fluorourasile maruz

bırakılmıştır. DNA fragmentasyonunun analizi, kaspaz inhibitörlerinin, 5-FU tarafından indüklenen DNA fragmentasyonunu tutarlı bir şekilde inhibe ettiğini ortaya çıkarmıştır. 5-FU indüklü apoptoza, kaspaz 1, 3 ve 8'i içeren bir kaspaz kaskadı aktivasyonu ile aracılık ettiğini ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda ifade edilen, 48 saat 5-fluorourasil uygulaması ile gözlenen kaspaz-3 seviyesindeki artış Othani vd.'nin çalışması ile tutarlı sonuç göstermektedir.

Al-Batran, vd.,'nin 2012'de yaptığı çalışmada HER2 pozitif mide kanseri hastalarında trastuzumab ve üçlü FLOT kemoterapi (5-Fluorourasil / Leucovorin, Oxaliplatin ve Docetaxel) kombinasyonu tedavisi ile ilgili ilk raporu sunmuştur. Trastuzumab artı FLOT kemoterapinin bu klinik ortamda oldukça etkili ve güvenli bir yaklaşım olabileceğini bildirmişlerdir. Trastuzumab ve taksanların meme kanserinde iyi bilinen sinerjik etkilerinin, trastuzumabın FLOT ile birleştirilmesi için daha ileri bir mantık sağlayabileceğini fakat FLOT artı trastuzumab'ın etkinliğini ve fizibilitesini doğrulamak için, HER2-pozitif, metastatik gastroözofageal kanserde ileri klinik çalışmalar gerekliliğini bildirmişlerdir.

Yan, vd., (2014) çalışmalarında trastuzumab, HER2-pozitif gelişmiş mide veya gastroözofageal kanserin birinci basamak tedavisi için kemoterapi ile kombinasyon halinde araştırmıştır. Araştırmaya randomize olarak 594 hastadan (trastuzumab ve kemoterapi, n = 298; tek başına kemoterapi (5-fluorourasil + cisplatin), n = 296), 584'ü birincil analize dahil edilmiştir. Medyan takip süresi trastuzumab + kemoterapi grubunda 18.6 ay ve tek başına kemoterapi grubunda 17.1 ay (9-25) idi. Medyan genel sağ kalım trastuzumab + kemoterapiye atananlarda 13.8 ay (% 95 CI 12-16) iken, sadece kemoterapiye atananlarda 11.1 ay (10-13) idi.

Trastuzumabın 5-fluorourasil ile birlikte uygulandığı klinik denemelerde elde edilen sağ kalım süresinin uzaması bulguları bu kombinasyon tedavisinin farklı HER2 pozitif kanserlerde denenmesinin önünü açmaktadır.

## 6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan araştırmalar neticesinde, literatürde ilk kez trastuzumab ve 5-fluorourasilin kombine kullanımının trastuzumab ve 5-fluorourasilin tekli kullanımlarına kıyasla A549 insan akciğer kanseri hücre hattında; hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. İlaçların tekli kullanımları ile elde edilen verilerden gözlenen anti-proliferatif etkinin literatür ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Kombine ilaç uygulamasının ilaçların tekli uygulamalarına kıyasla hücreler üzerinde daha kuvvetli bir anti-proliferatif etki yarattığı belirlenmiştir. Gözlenen anti-proliferatif etkinin apoptoz, nekroz veya otofaji mekanizmalarından hangisinin aracılığı ile gerçekteştiğine dair ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Kombine tedavi uygulamalarının mekanizmalarının net bir şekilde aydınlatılabilmesi için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma sonrasında anti-proliferatif etkisi belirlenmiş olan trastuzumab ve 5-fluorourasil kombinasyonunun etkili olduğu hücre ölüm mekanizmasının belirlenmesi, hücreölüm sürecinde etkili olan proteinlerin, transkripsiyon faktörlerinin üzerindeki etkisinin incelenmesi, kombine ilaç kullanımının hücre döngüsü üzerindeki etkisinin incelenmesi bir sonraki basamak olarak düşünülebilir.

Ayrıca yapılan bu çalışmanın, bundan sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

- Altundag K, Esteva FJ, Arun B. Monoclonal antibody-based targeted therapy in breast cancer. *Curr Med Chem Anti Cancer Agents.*,5:99–106 (2005).
- Amos, C.I., Wu, X., Broderick, P., v.d., “Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1.”, *Nat Genet* 40:616–622 (2008).
- Amstutz, U., Froehlich, T.K. Largiadèr, C.R., "Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity.", *Pharmacogenomics.*, 12(9):1321-36. (2011)
- Arcila, M. E., Chaft, J. E., Nafa, K., Roy-Chowdhuri, S., Lau, C., Zaidinski, M., Ladanyi, M., vd., “Prevalence, clinicopathologic associations and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. “, *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(18),10.1158/1078–0432.CCR–12–0912 (2012).
- Arman, K., Ergün. S., Temiz, E., Öztuzcu, S., “Deciphering the role of ErbB2/HER2 in cancer cell lines: a proto-oncogene with antiapoptotic activity.”, *Can. Cell. Microenviron*, 1:e448 (2014).
- Arnould, L., Gelly, M., Penault-Llorca, F., Benoit, L., Bonnetain, F., Migeon, C., Cabaret, V., Fermeaux, V., Bertheau, P., Garnier, J., Jeannin, J. F., Coudert, B. “Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism?” *Br. J. Cancer* 94:259–267 (2006).
- Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, et al. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol.*, 9:16–32.
- Arteaga, C.L., “EGF receptor mutations in lung cancer: from humans to mice and maybe back to humans.”, *Cancer Cell*, 9:421–423 (2006).
- Aviel-Ronen, S., Blackhall, F.H., Shepherd, F.A., Tsao, M.S., “K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review.”, *Clin Lung Cancer*. 8:30-8 (2008).
- Bakar, C., “Dünyada ve Türkiye'de Kanser Epidemiyolojisi.”, *Türkiye Klinikleri J Med Genet-Special Topics* 2(2):49-59 (2017).
- Besse, B., Cande, C., Spano, J.P., vd., “Nuclear localization of apoptosis protease activating factor-1 predicts survival after tumor resection in early-stage non-small cell lung cancer.”, *Clin Cancer Res*, 10:5665–5669 (2004).
- Besser, D., Bardelli, A., Didichenko, S., vd., “Regulation of the urokinasetype plasminogen activator gene by the oncogene Tpr-Met involves GRB2.”, *Oncogene*. 14:705-11 (1997).
- Bingöl, “Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.”, *Türkiye Klinikleri J Pulm Med-Special Topics*, 7(1):1-5 (2014).

### KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Brose, M.S., Volpe, P., Feldman, M., vd., “BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma.”, *Cancer Res.*, 62:6997-7000 (2002).
- Bunn, P.A., Helfrich, B., Soriano, A.F., Franklin, W.A., vd., “Expression of Her-2/neu in Human Lung Cancer Cell Lines by Immunohistochemistry and Fluorescence in Situ Hybridization and its Relationship to in Vitro Cytotoxicity by Trastuzumab and Chemotherapeutic Agents.”, *Clinical Cancer Research*, 3239,7:3239–3250 (2001).
- Cai, B., Chang, S., Becker, E.B., Bonni A., Xia Z., “p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of Bimel at Ser65.”, *J Biol Chem*, 281:28215–25222 (2006).
- Carpenter R.L., Lo H.W., “Regulation of apoptosis by HER2 in breast cancer.”, *J Carcinog Mutagen*, 7:003 (2013).
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B. Henner, D., Wong, W.L., Rowland, AM, Kotts, C, Carver, ME, Shepard, HM, “Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:4285–4289 (1992).
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., vd., “Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis.”, *Science*, 303:1010–1014 (2004).
- Choi, N., Baumann, M., Flentjie, M., vd., “Predictive factors in radiotherapy for non-small cell lung cancer: present status.”, *Lung Cancer*, 31:43–56 (2001).
- Choi, S.Y., Kim, M.J., Kang, C.M., vd., “Activation of Bak and Bax through c-abl-protein kinase Cdelta-p38 MAPK signaling in response to ionizing radiation in human non-small cell lung cancer cells.”, *J Biol Chem*, 281:7049–7059 (2006).
- Cooper G.M., Hausmann R.E., “Hücre: Moleküler Yaklaşım”, Üçüncü Baskı, Sakızlı M., Atabey N., ISBN 9944-5148-0-2, *İzmir Tıp Kitabevi*, (2006).
- Cretella, T., Sacconi, F., Quaini F., Frati, C., Lagrasta, C., Bonelli, M., Caffarra, C., Cavazzoni, A., vd., “Trastuzumab emtansine is active on HER-2 overexpressing NSCLC cell lines and overcomes gefitinib resistance.”, *Molecular Cancer*, 13:143 (2014).
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox C., vd., “Mutations of the BRAF gene in human cancer.” *Nature*, 417:949-54 (2002).
- Davis, R.J., “Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.”, *Cell*, 103:239–252 (2000).
- De Groot, P., Munden, R.F., “Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention.”, *Radiol Clin N Am* 50:863–876 (2012).

### KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Dela Cruz, C.S., Tanoue, L.T., Matthay, R.A., “. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention.”, *Clin Chest Med.*, 32(4):605-44 (2011).
- Didkowska, J., Wojciechowska, U., Mańczuk, M., Łobaszewski, J., “Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide.”, *Ann Transl Med*, 4(8):150 (2016).
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D. A., Mardis, E. R., McLellan, M. D., Cibulskis, K., Wilson, R. K., vd., “Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma.”, *Nature*, 455(7216): 1069–1075 (2008).
- Diniz, G., Ünlü, İ., Kömürçüoğlu, B., Akciğer kanserinin histopatolojik ve moleküler özellikleri, *Tepecik Eğit ve Araşt. Hast Derg.*,27(2): 77-87 (2017).
- Diniz, G., Irkkan, Ç., Kelten, C., Özekinci, S., “Clues and Pitfalls in the evaluation of HER2.”, *Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi*, 25(1):7-12 (2015).
- Ekedahl, J., Joseph, B., Marchetti, P., vd., “Heat shock protein 72 does not modulate ionizing radiation-induced apoptosis in U1810 non-small cell lung carcinoma cells.”, *Cancer Biol Ther*, 2:663–669 (2003).
- El-Telbany A., Ma, P.C., “Cancer Genes in Lung Cancer: Racial Disparities: Are There Any?”, *Genes & Cancer*, 3:(7-8) 467–480 (2012).
- Ergün, S., Camcı, C., Temiz, E., Kırkbeş, S., Ulaşlı, M., Oztuzcu, S., “SKBR3 Hücre Hattında Trastuzumab ile Kombineli Olarak miR-122-5p’nin Caspase 3/8/9 İfade Düzeyleri Üzerine Etkileri.”, *11. Ulusal Tıbbi Onkoloji Kongresi*, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, (2014).
- Ergüney S., “AJCC Kanser Evreleme Atlası.”, *Nobel Tıp Kitabevleri*,23:857-65. , İstanbul (2013).
- Esin, E., Çelik, İ., “Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi, Risk Faktörleri ve Akciğer Kanserinde Erken Tanı-Tarama.”, *Türkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics*, 6(4):1-5(2013).
- Fennell, D.A., “Caspase regulation in non-small cell lung cancer and its potential for therapeutic exploitation.”, *Clin Cancer Res.*, 11:2097– 2105 (2005).
- Ferreira, C.G., van der Valk, P., Span, S.W., vd., “Assessment of IAP (inhibitor of apoptosis) proteins as predictors of response to chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients.”, *Ann Oncol.*, 12:799–805 (2001).
- Fujimoto-Ouchi, K., Sekiguchi, F.,Tanaka, Y.,” Antitumor activity of combinations of anti-HER-2 antibody trastuzumab and oral fluoropyrimidines capecitabine/5’-dFurd in human breast cancer models.”, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 49: 211–216 (2002).

### KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., Kroemer, G., “Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria.”, *Cell Death Different.*, 13:1423–1433 (2006).
- Golstein, P., Kroemer, G., “Cell death by necrosis: towards a molecular definition.”, *Trends Biochem Sci*, 32:37-43 (2007).
- Göksel, T., Akkoçlu A., “Lung and Pleural Malignancies Study Group. Pattern of lung in Turkey 1994-1998.”, *Turkish Thoracic Society. Respiration*, 69:207-10 (2002).
- Greer, E.L., Brunet, A., “FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression.”, *Oncogene*, 24:7410–7425 (2005).
- Hoffmann, D., Hoffmann, I., El Bayoumy, K., "The less harmful cigarette:a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chem ResToxicol.*, 14:767-90 (2001).
- Hopkins-Donaldson, S., Ziegler, A., Kurtz, S., vd., “Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation.”, *Cell Death Different.*,10:356–364 (2003).
- Huang, Q., Zu, Y., Fu, X., Wu, T., “Expression of heat shock protein 70 and 27 in non-small cell lung cancer and its clinical significance.”, *J Huazhong*, 25:693–695 (2005).
- Hudis, C.A., “Trastuzumab- Mechanism of Action and Use in Clinical Practice.”, *The New England Journal of Medicine*, 357:39-51 (2007).
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Lowe, S.W., “Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy.” *Cell*,108:153–164 (2002).
- Junttila, T.T., Akita, R.W., Parsons, K., Fields, C., Lewis-Phillips, G.D., Friedman, L.S., Sampath, D., Sliwkowski, M.X., “Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941”., *Cancer Cell*, 15:429–440 (2009).
- Karaca, B., Bozkurt, E., Atmaca, H., Surmeli, Z., Pinar, A., Sanli, U.A., Uslu, R., “Effect of trastuzumab/AT-101 combination on apoptosis and cytotoxicity in HER2-positive breast cancer cells: A novel combination to effect resistance to anti-HER2 therapy through inhibition of PI3K signaling.”, *Journal of Clinical Oncology*, 32:15 (2014).
- Kawano, O., Sasaki, H., Endo, K., vd., “PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients.”, *Lung Cancer*, 54:209-15(2006).
- Klapper, L.N., Waterman, H., Sela, M., Yarden, Y., “Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2.” *Cancer Res.*, 60:3384–3388 (2000).

### KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Krepela, E., Prochazka, J., Fiala, P., Zatloukal, P., Selinger, P., "Expression of apoptosome pathway-related transcripts in non-small cell lung cancer.", *J Cancer Res Clin Oncol.*, 132:57–68 (2006).
- Kroemer, G., Jaattela, M. "Lysosomes and autophagy in cell death control.", *Nat Rev.*, 5:886–897 (2005)
- Kutluk, T., Kars, A., "Kanser konusunda genel bilgiler.", <http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/kanser.pdf> (2001). (Erişim Tarihi: 20/07/2018)
- Lavrik, I.N., Golks, A., Krammer, P.H., "Caspases: pharmacological manipulation of cell death.", *The Journal of Clinical Investigation*, 115 (10):2665-2672 (2005).
- Lei, K., Davis, R.J., "JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis.", *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:2432–2437 (2003.)
- Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., George, D.L., "Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex.", *Nat Cell Biol.*, 6:443–450 (2004).
- Li S., Schmitz K.R., Jeffrey P.D., Wiltzius J.J., Kussie P., Ferguson K.M., "Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab.", *Cancer Cell*, 7:301–11(2005).
- Lieber, M., Todaro, G., Smith, b., Szakal, A., Nelson-Rees, W., "A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells", *Int J Cancer.*,17(1):62-70 (1976).
- Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G., "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies". *Nat. Rev. Cancer*, 3 (5):330–8 (2003).
- Lüleyap, Ü., "Moleküler Genetiğin Esasları", *Nobel Kitabevi*, Adana (2008).
- Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., vd, "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib.", *N Engl J Med.*, 350:2129-39 (2004).
- Ma, P.C., Maulik, G., Christensen, J., Salgia, R., "c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition.", *Cancer Metastasis Rev.*, 22:309-25 (2003).
- Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia., C., Boffetta, P., "Risk factors for lung cancer worldwide.", *Eur Respir J.*, 48:889–902 (2016).
- Marchetti, A., Martella, C., Felicioni, L., vd., "EGFR mutations in nonsmall-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment.", *J Clin Oncol.*, 23(4):857-65 (2005).

### KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Matakidou, A., Eisen, T., Houlston, R.S., “Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk.”, *Br J Cancer.*, 93(7):825-33 (2005).
- Matikas, A., Mistriotis, D., Georgoulas, V., Kotsakis, A., “Targeting KRAS mutated non-small cell lung cancer: A history of failures and a future of hope for a diverse entity.”, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 110:1–12 (2017).
- Mhadiat, N.M., Bouklihacene, M., Thorne, R., “5-Fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase-9-dependent and mediated by activation of protein kinase C- $\delta$ .”, *Oncol Lett.*, 8(2):699–704 (2014).
- Nakamura H., Takamori, S., Fujii, T., Ono, M., Yamana, H., Kuwano, M., Shirouzu, K., “Cooperative cell-growth inhibition by combination treatment with ZD1839 (Iressa) and trastuzumab (Herceptin) in non-small-cell lung cancer.”, *Cancer Letters*, 230:33–46 (2005).
- Naoki, K., Chen, T.H., Richards, W.G., Sugarbaker, D.J., Meyerson, M., “Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma.”, *Cancer Res.*, 62:7001-3 (2002).
- Nicholson, D.W., “Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death.”, *Cell Death Different*, 6:1028–1042 (1999).
- Nita M. E., Nagawal H., Tominagal O., Tsunol N., Fujii, S., vd., 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins.”, *British Journal of Cancer* 78(8):98-992 (1998).
- Norbury, C.J., Zivotovsky, B., “DNA damage-induced apoptosis.”, *Oncogene*, 23:2797–2808 (2004).
- Orrenius, S., Zivotovsky, B., Nicotera, P., “Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link.”, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 4:552–565 (2003).
- Othani, T., Hatori, M., Ito, H., Takizawa, K., Kamijo, R., Nagumo, M., “Involvement of caspases in 5-FU induced apoptosis in an oral cancer cell line.”, *Anticancer Res.*, 20(5A):3117-21 (2000).
- Özbaşıoğlu, K., Akciğer Kanseri Ve Akciğer Kanserinde Kullanılan Tümör Markırları, Bitirme Tezi, *Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı*, Kayseri, (2013).
- Özercan, İ.H., Şimşek, S., “Akciğer Kanserinin Histopatolojik Özellikleri.”, *Türkiye Klinikleri J Thor Surg-Special Topics*, 8(1):14-8 (2017).
- Özsu, S., Özlü T., “Türkiye’de Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.”, *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*, 1 (3):7-11 (2013).
- Paez, J.G., Janne, P.A., Lee, J.C., vd., “EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy.” *Science*, 304:1497-500 (2004).

### KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Pan, X., Xiuli Zhang, X., Sun, H., Zhang J., Yan, M., Zhang, H., “Autophagy Inhibition Promotes 5-Fluorouracil-Induced Apoptosis by Stimulating ROS Formation in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells.”, *PLOS One*, 8:e56679 (2013).
- Pao, W., Miller, V, Zakowski., M, vd., “EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib.”, *Proc Natl Acad Sci U S A.*,101:13306-11 (2004).
- Parcellier, A., Gurbuxani, S., Schmitt, E., Solary, E., Garrido, C., “Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways.”, *Biochem Biophys Res Comm*, 304:505–512 (2005).
- Pegram M, HsuS, Lewis G. Pietras R, Beryt M, Sliwkowski M, Coombs D, Baly D, Kabbinavar F, Slamon D., “Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers.”, *Oncogene*, 18:2241 (1999).
- Pellegrini C, Falleni M, Marchetti A, vd., HER-2/Neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.*, 9:3645–52.
- Pike, Y., “GTPase-mediated nuclear signalings promote cell survival.”, *Biochim Biophys Acta*, 1761:570–576 (2006).
- Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S., Salvesen, G.S., “The apoptosome activates caspase-9 by dimerization.”, *Mol Cell.*, 22:269–275 (2006).
- Pratilas, C.A., Hanrahan, A.J., Halilovic, E., vd., “Genetic predictors of MEK dependence in non-small cell lung cancer.”, *Cancer Res.*, 68:9375-83 (2008).
- Privitera, G., Luca T., Musso N., Vancheri, C., Crimi, N., Barresi, V., Condorelli, D., Castorina, S., “In vitro antiproliferative effect of trastuzumab (Herceptin) combined with cetuximab (Erbix) in a model of human non-small cell lung cancer expressing EGFR and HER2.”, *Clin Exp Med.*, 16:161–168 (2016).
- Puthalakath, H., Strasser, A., “Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins.”, *Cell Death Different*, 9:505–512 (2002).
- Rikova K., Guo A., Zeng Q., Possemato A., Yu J., Haack, H., Nardone, J., Lee, K., Reeves C, vd., “Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer.”, *Cell*, 131:6,1190-203 (2007).
- Roh H, Pippin J, Drebin JA. “Down-regulation of HER2/neu expression induces apoptosis in human cancer cells that overexpress Her2/neu.” *Cancer Res.*, 60(3):560–5.
- Rouquette I, Lauwers-Cances V, Allera C, et al. Characteristics of lung cancer in women: importance of hormonal and growth factors. *Lung Cancer*, 76:280–5 (2012).

### KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., vd., “High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers.”, *Science.*, 304:554 (2004).
- Schimmer, A.D., “Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice.”, *Cancer Res.*, 64:7183–7190 (2004).
- Shivapurkar, N., Reddy, J., Matta, H., vd., “Loss of expression of deathinducing signaling complex (DISC) components in lung cancer cell lines and the influence of MYC amplification.”, *Oncogene*, 21:8510–8514 (2002).
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L., “Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.”, *Science* 235:177–182 (1987).
- Taban H., Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinin Tanı, Tedavi Yanıtı Ve Prognoz Tayininde Sulf2 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı*, Ankara, (2017).
- Takata, T., Tanaka, F., Yamada, T., vd., “Clinical significance of caspase-3 expression in pathologic-stage I, nonsmall-cell lung cancer.”, *Int J Cancer*, 96:54–60 (2001).
- Thorgeirsson, T.E., Geller, F., Sulem, P., vd., “A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease.”, *Nature*, 452:638–642 (2008).
- Tomizawa K, Suda K, Onozato R, vd., Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer*, 74:139–44 (2011).
- Tong D., Poot M., Hu D, Oda D., “5-Fluorouracil-induced apoptosis in cultured oral cancer cells.”, *Oral Oncol.*, 36(2):236-41 (2000).
- Toyooka, S., Tokumo, M., Shigematsu, H., vd., “Mutational and epigenetic evidence for independent pathways for lung adenocarcinomas arising in smokers and never smokers.”, *Cancer Res.*, 66:1371-5 (2006).
- Toyooka, S., Yatabe, Y., Tokumo, M., vd., “Mutations of epidermal growth factor receptor and K-ras genes in adenosquamous carcinoma of the lung.”, *Int J Cancer.*, 118:588-90 (2006).
- Uysal, M.A., Özgül, M.A., Yıldız, P, vd., “Akciğer Kanserli Olgularımızın Histopatolojik Tiplerine Göre Bronkoskopik Özellikleri.”, *Archives of Lung*, 6:54-7 (2005).
- Ünal, H., 2006, “Meme Kanserinin Tanı ve Tedavisinin Tarihsel Gelişimi”, İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, *Meme Kanseri Sempozyumu Dizisi* No:54; 9-13 (2006).
- Viktorsson, K., Ekedahl, J., Lindebro, M.C., vd., “Defective stress kinase and Bak activation in response to ionizing radiation but not cisplatin in a non-small cell lung carcinoma cell line.”, *Exp Cell Res.*, 289:256–264 (2003).

### KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Viktorsson, K., Lewensohn, R., “Apoptotic Signaling Pathways in Lung Cancer.”, *Journal of Thoracic Oncology*, 2:175–179 (2007).
- Vousden, K.H., Lu, X., “Live or let die: the cell’s response to p53.”, *Nat Rev.*, 2:594–604 (2002).
- Vu, T., Claret, F.X., “Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer.”, *Front Oncol.*, 2:62 (2012).
- Wojta, J., Nakamura, T., Fabry A., vd., “Hepatocyte growth factor stimulates expression of plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue factor in HepG2 cells.”, *Blood.*, 84:151-7 (1994).
- Wood, S.L., Pernemalm, M., Crosbie, P.A., Whetton, A.D., “Molecular histology of lung cancer: From targets to treatments.”, *Cancer Treatment Reviews*, 41:361–375 (2015).
- Yan, M., Parker B.A., Schwab R., Kurzrock R., “HER2 aberrations in cancer: Implications for therapy.”, *Cancer Treatment Reviews*, 40:770–780 (2014).
- Yener, N.A., Düşmez Apa, D., “Histopathological and molecular features of lung cancer.”, Trd Sem 2014; 2: 281-289, *Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi*, 27(2):77-87 (2017).
- Yüksek, G.E., “Akciğer Adenokarsinomlarının, 2011 Uluslararası Akciğer Karsinomları Çalışma Grubu (Iaslc/Ats/Ers)’Nun Sınıflandırmasına Göre Yeniden Sınıflandırılması Ve Olguların Gözden Geçirilmesi.”, Uzmanlık Tezi, *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Mersin, (2015).
- Zhu, C.Q., Shih, W., Ling, C.H., Tsao, M.S., “Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation.”, *J Clin Pathol.*, 59:790– 800 (2006).
- Zhu, J., Hua, R.X., Jiang, J., Zhao, L.Q., Sun, X., Luan, J., Lang, Y., Sun, Y., Shang, K., Peng, S., Ma, J.. “Association studies of ERCC1 polymorphisms with lung cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis.”, *PLoS One.*, 9(5):e97616 (2014).

## **Ek-1: Akciğer Kanserinde TNM Evrelemesi**

### **Primer Tümör (T)**

TX: Primer tümör değerlendirilemiyor.

T0: Primer tümör bulgusu mevcut değildir.

Tis: Karsinoma in situ.

T1: En büyük çapı 3 cm veya 7 cm'den daha küçük tümör (Akciğer veya viseral plevra ile çevrili, lobar bronş proksimaline invazyonun bronkoskopik bulgusu olmayan tümör).

T1a: En büyük çapı 2 cm veya daha küçük olan tümör mevcuttur.

T1b: En büyük çapı 2 cm'den büyük ancak 3 cm veya daha küçük olan tümör.

T2: En büyük çapı 3 cm'den büyük ancak 7 cm veya daha küçük olan veya ana bronşu tutan, distal karinaya 2 cm'den fazla uzaklıkta bulunan, viseral plevraya invaze, hiler bölgeye uzanan ancak tüm akciğeri içermeyen atelektazi veya obstrüktif pnömoni özelliklerinden birine sahip tümör mevcuttur.

T2a: En büyük çapı 3 cm'den büyük ancak 5 cm veya daha küçük olan tümör mevcuttur.

T2b: En büyük çapı 5 cm'den büyük ancak 7 cm veya daha küçük olan tümör mevcuttur.

T3: En büyük çapı 7cm'den büyük olan ve pariyetal plevra, göğüs duvarı, diyafram, frenik sinir, mediastinal plevra ve pariyetal perikarddan herhangi birine invaze veya ana bronş tümörü (distal karinaya 2 cm'den daha yakın ancak invaze olmayan) veya tüm akciğeri etkileyen atelektazi ya da obstrüktif pnömoni veya aynı lobta nodül(ler) mevcuttur.

T4: Herhangi bir büyüklükteki ve mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özefagus, vertebra korpusu, karinadan herhangi birine invaze tümör veya ipsilateral farklı lobta tümör nodülü mevcuttur.

### **Bölgesel Lenf Nodları (N)**

NX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor.

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok.

N1: İpsilateral peribronşial ve/veya subkarinal lenf nodlarına metastaz veya intrapulmoner nodlar, direkt ekstansiyon ile yayılım gösterir.

N2: İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodu metastazı bulunur.

N3: Kontralateral mediastinal, hiler, ipsilateral veya kontralateral skalen veya supraklavikular lenf nodu metastazı bulunur.

**Metastaz (M)**

M0: Uzak metastaz yok.

M1: Uzak metastaz var.

M1a: Kontralateral lobta ayrı tümör nodül(leri), tümör ile birlikte plevral tümoral nodüller, malign plevral veya perikardiyal efüzyon

M1b: Uzak metastaz var.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler:

Adı Soyadı : Elif KORKUT  
Doğum Yeri ve Tarihi : Burhaniye 21.05.1992



### Eğitim Durumu:

Lisans Öğrenimi : Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi (2016)

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce, Almanca

Bilimsel Faaliyetleri :

ODTÜ 1. Sinirbilim Günleri (16-17 Şubat 2013)

İÜGEN 11. Uluslararası Katılımlı Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu (7-9 Mart 2014)

1. Uluslararası Adli Biyoloji ve Genetik Kongresi (27-28 Kasım 2014)

Gazi Üniversitesi 1.Kök Hücre Sempozyumu (13 Aralık 2014)

AGU 1.Yaşam Bilimleri Sempozyumu (23-23 Şubat 2016)

4th International Congress On Applied Biological Sciences (3-5 Mayıs 2018)

### İş Deneyimi:

Stajlar :

Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi (TÜRKKÖK Stajyeri)

Başkent Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi

Çalıştığı Kurumlar : -

## **İletişim:**

Adres : Meydan Mah, 962 (Işıktan) Sokak, Kocagöl Apt No:1/1  
Merkez/AKSARAY

E- posta Adresi : [elif.k92@gmail.com](mailto:elif.k92@gmail.com) / [elifkorkut@outlook.com](mailto:elifkorkut@outlook.com)

## **Yabancı Dil Bilgisi:**

- 2016 YDS Sonbahar Dönemi : 58,750
- 2018 YÖKDİL Bahar Dönemi : 82,500

## **Akademik Çalışmaları:**

**“Investigation of Cytotoxic Effect of Doxorubicin 5 Fluorouracil Propranolol and Triple Combined Treatment in MCF7 Breast Cancer Cell Line”** (Poster Presentation), 4th International Bau Drug Design Congress 13-15 Ekim 2016, EROĞLU ONUR, GÜVENİR ÇELİK Esin, ÇELEN Merve, KAYA Hacer, NALBANT Ali, KORKUT Elif, NİZAM Nagihan.

**“Investigation of the Effects of Combination Drug Treatment with Trastuzumab and 5-Fluorouracil on A549 Human Lung Cancer Cell Line”** (Oral Presentation) 4th International Congress On Applied Biological Sciences, 3-5 Mayıs, 2018, Elif KORKUT, Onur EROĞLU.

**“Investigation of Effects Combined Treatment with Caffeic Acid Phenethyl Ester and Propranolol on MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line”** (Poster Presentation) 4th International Congress On Applied Biological Sciences, 3-5 Mayıs 2018, Melike Bügöl, Esin Güvenir Çelik, Hacer Kaya, Elif Korkut, Onur Eroğlu.

Tarih : 17.07.2018