

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL AKCİĞER KANSERİ MODELİNDE STANDART
TEDAVİYE DEĞÜELİN'İN KATKILARI

HAKAN CENGİZ
0000-0002-0868-0499

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

İZMİR
MAYIS 2021

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970179

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENEYSEL AKCİĞER KANSERİ MODELİNDE STANDART
TEDAVİYE DEĞÜELİN'İN KATKILARI**

HAKAN CENGİZ

0000-0002-0868-0499

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gül Hüray İŞLEKEL

0000-0002-0416-1325

İZMİR

MAYIS 2021

(Bu araştırma, DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2018. KB. SAG. 057 sayı ile desteklenmiştir.)

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR	ix
TEZ KABUL ONAYI	x
ETİK BEYANI	xi
TEŞEKKÜR	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı	3
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kanser	5
2.1.1. Kanserin tedavisi.....	6
2.2. Akciğer Anatomisi.....	7
2.2.1. Pulmoner Alveoller	9
2.3. Akciğer Kanseri.....	10
2.4. Akciğer Kanserin Evrelendirilmesi.....	11
2.5. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi ve Mekanizmaları	12
2.6. Akciğer Kanseri <i>in vitro</i> Deney Materyalleri	13
2.7. Akciğer Kanseri <i>in vivo</i> Deney Modelleri	15
2.8. Kemoterapi	18
2.8.1. Dose taksel ve Standart Tedavide Kullanımı	19
2.8.2. Deguelin	22
2.8.2.1. Sentetik Deguelinler	26
2.9. Apoptozis.....	28
2.10. Anjiyogenezis	29

2.10.1.	Kanser Durumunda Damar Oluşum Mekanizması	30
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1.	Araştırmanın Tipi	32
3.2.	Araştırmanın Yeri ve Zamanı	32
3.3.	Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	32
3.4.	Araştırmanın Materyali	32
3.5.	Araştırmanın Değişkenleri	32
3.5.1.	Hücre Kültürü Çalışması	33
3.5.2.	Deney Hayvanı Çalışması.....	33
3.6.	Veri Toplama Araçları	33
3.6.1.	Tez Çalışması Sırasında Kullanılan Araç ve Gereçler.....	33
3.6.2.	Kullanılan Sarf Malzemeler.....	35
3.6.3.	Uygulanan Yöntemler.....	37
3.6.3.1.	Hücre Kültürü	38
3.6.3.1.1.	Hücre Hattı Özellikleri	38
3.6.3.2.	Hücre Kültürünün İdame Ettirilmesi, Pasajlanması, Dondurulması- Çözülmesi ve Hücre Sayımı İşlemleri	38
3.6.3.3.	Hücre Canlılık Testi ve IK_{50} Tayini	40
3.6.3.4.	Hücre Göçü Analizi	42
3.6.3.5.	Anjiyogenezis Metodu	42
3.6.3.6.	Görüntü Analizi.....	42
3.6.3.7.	Akım Sitometri ile Apoptosis Tayini	43
3.6.3.8.	Akım Sitometri ile Hücre Döngüsü Analizleri.....	44
3.6.3.9.	Deney Hayvanı Modeli ve Deneklerin Bakımı.....	45
3.6.3.10.	Tedavi Protokolü ve <i>in vivo</i> Deney Modeli için Dozların Belirlenmesi 46	
3.6.3.10.1.	Dosetaksel Dozu Belirleme	46
3.6.3.10.2.	Deguelin Dozu Belirleme.....	47
3.6.3.15.	Doku Homojenizasyonu	49
3.6.3.16.	TRIZOL ile RNA İzolasyon Protokolü	50

3.6.3.17.	RT-Polimeraz Zincir Reaksiyonu	51
3.6.3.18.	Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü.....	52
3.6.3.18.1.	Hematoksilen-Eozin boyaması	54
3.6.3.19.	Avidin-Biyotin-Peroksidaz Tekniği ile İndirek İmmünohistokimyasal Yöntem	56
4.	BULGULAR.....	60
4.1.	Hücre Canlılık Testi ve IK_{50} Tayini.....	60
4.2.	Hücre Göçü Analizi.....	61
4.2.1.	LAK Hücre Hattı Çalışması.....	61
4.3.	Anjiyogenezis (Tüp Formasyon) Analizi	63
4.3.1.	LAK Hücre Hattı.....	63
4.5.	Sakrifikasyon Aşaması ve Yapılan İşlemler	67
4.6.	Deneklerin Sağkalım Analizleri.....	69
4.7.	Deneklerin Tümör Boyutları.....	71
4.8.	Denek Ağırlıkları (Önce ve Sonra)	71
4.9.	Hematoksilen & Eozin Boyama Değerlendirmesi.....	73
4.9.1.	Tümör Dokusunun İncelenmesi	73
4.9.2.	Akciğer Dokusunun İncelenmesi.....	76
4.10.	Aktif Kaspaz-3 İmmünohistokimya Değerlendirmesi	78
4.11.	Gen Ekspresyon Analizinin Bulguları.....	82
4.11.1.	Tümör Dokusu Gen Ekspresyon Analizi	82
4.11.2.	Akciğer Dokusunda Gen Ekspresyon Analizi	88
5.	TARTIŞMA.....	93
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	101
7.	KAYNAKLAR	102
8.	EKLER	117
9.	ÖZGEÇMİŞ	118

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.4-1 TNM sınıflandırmasına göre evrelendirme (38, 39).....	12
Tablo 3.6-1 Tez çalışmasında kullanılan tüm araç ve gereçler	33
Tablo 3.6-2 Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler	35
Tablo 3.6-3 Sakrifikasyon Aşaması ve Yapılan İşlemler.....	48
Tablo 3.6-4 Rutin Doku Takibi	53
Tablo 3.6-5 Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	54
Tablo 4.6-1 Gruplarda sağkalım süreleri ve karşılaştırmaları.....	70
Tablo 4.10-1 Tümör dokusunda gruplar arasında aktif kaspaz-3 skor karşılaştırmaları..	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1-1 Kanserin ayırt edici özellikleri	6
Şekil 2.2-1 Akciğer anatomisi.....	8
Şekil 2.2-2 Bronkopulmoner Segmentler.....	9
Şekil 2.3-1 Akciğer kanseri çeşitleri	11
Şekil 2.7-1 Sinjenik modelin oluşturulması	17
Şekil 2.8-1 Hücre döngüsünde dosetaksel ve deguelinin kontrol noktalarında etkisi.....	18
Şekil 2.8-2 Dosetakselin molekül şekli	19
Şekil 2.8-3 Hücre içinde mikrotübül yerleşimi	20
Şekil 2.8-4 Mikrotübül ve dosetaksel etkileşimi.....	21
Şekil 2.8-5 Deguelin kimyasal yapısı (94).....	23
Şekil 2.8-6 Deguelinin bilinen etki ettiği mekanizmaları	25
Şekil 2.8-7 Deguelin'in türevleri (A ve B).....	27
Şekil 3.6-1 Hücre canlılık analizi ve IK_{50} Tayini.....	41
Şekil 3.6-2 Araştırma planı	57
Şekil 3.6-3 Deney Hayvanı Model Planı ve Dizaynı	58
Şekil 3.6-4 Araştırmanın takvimi.....	58
Şekil 4.1-1 LAK (LLC) Hücre hattında Dosetaksel ve Deguelinin IK_{50} Değerleri	60
Şekil 4.1-2 Kemoterapötik ajanlara ait in vitro/in vivo dozlarına bağlı etkinliklerini gösteren ısı haritası.....	61
Şekil 4.2-1 Gruplar arasında hücre göçü analiz sonuçlarının karşılaştırılması	62
Şekil 4.2-2 Gruplar arasında zaman bağlı hücre göçü görüntü karşılaştırılması	63
Şekil 4.3.1-1 Gruplar arasında 3B Anjiyogenezis (tubular formasyon) karşılaştırılması	64
Şekil 4.3.1-2 Gruplar arasında 3B Anjiyogenezis (tubular formasyon) ağ sayısı ve toplam ağ alanı karşılaştırılması (çizgiler anlamlı karşılaştırmayı belirtir)	64
Şekil 4.3.1-3 Anjiyogenezis - Tüp Formasyon metodunda (3B).	65
Şekil 4.3.1-4 Apoptozis ve hücre döngüsü analizi.....	66
Şekil 4.5-1 Grupların makroskopik incelenmesi ve tümör görünüşleri.....	69
Şekil 4.6-1 Denekler arasında sağkalım analizi ve grafiği.....	70
Şekil 4.7-1 Gruplar arası tümör volümü karşılaştırması	71

Şekil 4.8-1 Başlangıç esnasında denek ağırlıkları	72
Şekil 4.8-2 Denek ağırlıklarının sakrifikasyon öncesi son ölçümlere göre karşılaştırılması	72
Şekil 4.9-1 Gruplar arasında nekrotik tümör varlığı karşılaştırması	73
Şekil 4.9-2 Gruplar arasında apoptotik tümör varlığı karşılaştırması	74
Şekil 4.9-3 Tümör dokusunun hematoksilin & eozin boyamaları.....	75
Şekil 4.9-4 Akciğer Dokusunun Hematoksilin&Eosin Boyama ile İncelenmesi.....	77
Şekil 4.10-1 Tümörlü dokularda aktif kaspaz-3 boyaması ve değerlendirilmesi.....	79
Şekil 4.10-2 Tümör dokusunda aktif kaspaz-3'ün gruplar arasında boyama yüzdesi karşılaştırması	80
Şekil 4.10-3 Akciğer dokusunda aktif kaspaz-3'ün gruplar arasında boyama yüzdesi karşılaştırması	81
Şekil 4.11-1 Tümör dokusunda aktif <i>kaspaz-3</i> gen ekspresyon karşılaştırması	83
Şekil 4.11-2 Tümör dokusunda <i>kaspaz-9</i> gen ekspresyon karşılaştırması.....	84
Şekil 4.11-3 Tümör dokusunda <i>TP53</i> gen ekspresyon karşılaştırması	85
Şekil 4.11-4 Tümör dokusunda <i>HIF-1a</i> gen ekspresyon karşılaştırması.....	86
Şekil 4.11-5 Tümör dokusunda <i>VEGF-A</i> gen ekspresyon karşılaştırması.....	87
Şekil 4.11-6 Akciğer dokusunda Aktif <i>Kaspaz-3</i> gen ekspresyonu karşılaştırması	88
Şekil 4.11-7 Akciğer dokusunda <i>Kaspaz-9</i> gen ekspresyonu karşılaştırması.....	89
Şekil 4.11-8 Akciğer dokusunda <i>TP53</i> gen ekspresyonu karşılaştırması	90
Şekil 4.11-9 Akciğer dokusunda <i>HIF-1a</i> gen ekspresyonu karşılaştırması.....	91
Şekil 4.11-10 Akciğer dokusunda <i>VEGF-A</i> gen ekspresyonu karşılaştırması.....	92

KISALTMALAR

AK: Akciğer Kanseri

CCK: Cell Counting Kit

DEG: Deguelin

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DTX: Dosetaksel

IK50: İnhibitör Konsantrasyon %50

İHK: İmmünohistokimya

HUVEC: İnsan Umbilikal Kord Veni Endotelyal Hücresi

KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

LAK: Lewis Akciğer Karsinomu

NADPH: Nikotinamid-Adenin-Dinükleotid-Fosfat İndirgenmiş formu

NADH: Nikotinamid-Adenin-Dinükleotid İndirgenmiş formu

PBS: Fosfat Buffer (Tampon) Solüsyonu

PI: Propidyum İyodür

PS: Fosfatidilserin

TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Doktora Programı öğrencisi **Hakan CENGİZ** tarafından hazırlanan ve sunulan **“DENEYSEL AKCİĞER KANSERİ MODELİNDE STANDART TEDAVİYE DEĞÜELİN’İN KATKILARI”** başlıklı tez çalışması **17/05/2021** günü **09:30 – 11:30** saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından **OY BİRLİĞİ** ile **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum **“Deneysel Akciğer Kanseri Modelinde Standart Tedaviye Deguelin’in Katkıları”** başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Hakan Cengiz

05.05.2021

TEŞEKKÜR

2008 yılından bu yana öğrencisi olduğum Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nın hayatıma dokunan ve derslerini aldığım tüm öğretim üyelerine,

Her şeye rağmen beni anlayan ve arkamda duran, emeğime değer veren, desteğini ve ilgisini esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Hüray İşlekel'e,

Son yokuşta aktivasyon enerjisi sağlayan ve moral veren Doç. Dr. Zahide Çavdar'a,

Tezimin çalışmalarında yol gösteren ve katkı sağlayan Prof. Dr. Hilal Koçdor, Prof. Dr. M. Ali Koçdor, Dr. Halil Ateş, Doç. Dr. Seda Özbal, Prof. Dr. Meral Karaman, Doç. Dr. Asuman Argon, Prof. Dr. Emine Çağnur Ulukuş, Doç. Dr. Nilgün Yener, Doç. Dr. Tarık Salman ve Dr. Öğr. Üyesi Mehtap Yüksel Eğrilmez'e,

Enstitüde öğrenimime başlayıp bitirene dek sıkılmadan bıkmadan öğrencilik işlerimi takip eden öğrenci işleri mensuplarından Beyhan Gürkan'a, Fulya Küçük'e, Neslihan Artunç'a ve Ebru Müftüoğlu'na,

Laboratuvar çalışmalarımda birlikte yol aldığımız yardımsever ve fedakar Gamze Beyoğlu ve Selma Aydemir arkadaşlarıma,

Aziz Gazi ve Şehitlerimize,

Ve iyiki varsınız dediğim Anneciğim ve Babacığım, kardeşime, eşimin ailesine, eşim Neslihan ve oğlum Selim Kağan'a sonsuz teşekkürlerimle...

Hakan CENGİZ

DENEYSEL AKCİĞER KANSERİ MODELİNDE STANDART TEDAVİYE DEGUELİN'İN KATKILARI

Doktora Tezi

Hakan CENGİZ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

ÖZET

Kanserin tedavisi yoğun çabalara rağmen zor olmakla birlikte önlenmesi de bir o kadar zor ve önemlidir. Mücadelenin bu kadar yoğun ve fazla olmasına rağmen olarak dünya genelinde kanser, ölüm nedenlerinde ne yazık ki önde gelmektedir. Akciğer kanseri ise dünyada kansere bağlı ölümler arasında cinsiyet fark etmeksizin ilk sırada yer almaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan en etkili kemoterapötik ajanlar, normal dokular için toksik etki göstermektedir ve yan etki görülme sıklığı bu nedenle yüksektir. Bundan dolayı, toksisitesi olmayan ya da en az olan tedavi edici veya prewantif etkisi olan yeni ilaçlara ve rejim metodlarına ihtiyaç vardır.

Bu çalışma, Deguelin'in *in vitro* ve *in vivo* akciğer kanseri modelinde etkin konsantrasyonda kanser hücrelerinin proliferasyonuna inhibe edici etkiye sahip olması ve [Deguelin (DEG)+Dosetaksel (DTX)]/2 kombinasyonunun akciğer kanseri hücrelerini ve tümör volümünü azaltıcı etkisinin ilaçların ayrı ayrı kullanılmasına göre de başarılı olabileceği hipotezini test etmek amacıyla gerçekleştirildi. Lewis Akciğer Karsinomu (LAK) hücre hatlarında DTX ve DEG'in tek başlarına sitotoksik etkileri araştırılarak IK50 dozları belirlendi. Belirlenen etkin konsantrasyonlar, Deguelin, Dosetaksel ve kombinasyonları LAK hücrelerine uygulandı. Hücre kültürüne bağlı akım sitometrik analizler (apoptozis, hücre döngüsü), migrasyon analizi ve 3B anjiyogenezis (tubular formasyon) metodları gerçekleştirildi. Bu çalışmanın önemli basamağı olan LAK hücre hattı ile C57BL/6 fareler üzerinde oluşturulan sinjeneik akciğer kanseri *in*

vivo modelinde, DEG, DTX ve kombinasyonlarının anti-kanser, apoptotik ve anti-anjiyojenik etkileri incelendi.

Araştırmamızda, DEG+DTX kombinasyonunun *in vitro* deney modelinde, ilaçların tekli kullanımlarına göre hücre proliferasyonunu baskılamada daha başarılı olduğu halde, *in vivo* deney modelinde ise tümör volümü, apoptozis belirteçleri ve anjiyogenezis gen ekspresyon düzeylerinde bu başarı tekli tedavi lehine dönmüştür. Bu durumda kombinasyon dozunun tekrar değerlendirilmesi ya da tedavi rejiminde zaman diliminin kombinasyon dozu için farklı ayarlanması gerektiği sonucu çıkmaktadır. Deguelin'in antikanser etkisi, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve tümör yayılımını azaltıcı yönde olabileceğidir.

Anahtar Sözcükler: Akciğer kanseri *in vitro* ve *in vivo* deney modeli, Deguelin, Dosetaksel, Lewis Akciğer Karsinomu hücre hattı, C57BL/6, apoptozis, hücre döngüsü, hücre migrasyonu, anjiyogenezis

Tezin Sayfa Adedi: 140

Danışman: Prof. Dr. Gül Hüray İŞLEKEL

DEGUELIN'S CONTRIBUTION TO STANDARD THERAPY IN AN EXPERIMENTAL LUNG CANCER MODEL

Doctoral Thesis

Hakan CENGİZ

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Department of Molecular Medicine

ABSTRACT

Although the treatment of cancer is difficult despite intense efforts, its prevention is also difficult and important. Due to the fact that the struggle is so intense and high, unfortunately, cancer is the leading cause of death worldwide. Lung cancer, on the other hand, ranks first among cancer-related deaths in the world, regardless of gender. The most effective chemotherapeutic agents used in the treatment of cancer are toxic to normal tissues and the incidence of side effects is therefore high. Therefore, there is a need for new drugs and regimen methods with no or minimal therapeutic or preventative effects.

This study hypothesized that Deguelin has an effective concentration inhibitory effect on the proliferation of cancer cells in an *in vitro* and *in vivo* lung cancer model, and that the effect of the [Deguelin (DEG)+Docetaxel (DTX)]/2 combination to reduce lung cancer cells and tumor volume can also be successful compared to the use of drugs separately. IC₅₀ doses were determined by investigating the cytotoxic effects of DTX and DEG alone in Lewis Lung Carcinoma (LLC) cell lines. The determined effective concentrations of Deguelin, Docetaxel, and their combinations were applied to the LLC cells. Flow cytometric analysis (for apoptosis, cell cycle), migration analysis, and 3D angiogenesis (tubular formation) methods were performed using cell cultures. The anti-cancer, apoptotic and anti-angiogenic effects of DEG, DTX and their combinations were

investigated in an *in vivo* model of syngeneic lung cancer on C57BL / 6 mice with the LLC cell line, which was an important step of this study.

In our study, although the DEG + DTX combination was more successful in suppressing cell proliferation than single use of drugs in the *in vitro* experimental model, this success in tumor volume, apoptosis markers and angiogenesis gene expression levels in the *in vivo* experimental model turned in favor of single therapy. As a result, it is concluded that the combination dose should be re-evaluated or the time frame in the treatment regimen should be adjusted differently for the combination dose. Deguelin's anticancer effect may be through reducing the proliferation of cancer cells and tumor spread.

Keywords: Lung cancer *in vitro* and *in vivo* experimental model, Deguelin, Docetaxel, Lewis Lung Carcinoma cell line, C57BL / 6, apoptosis, cell cycle, cell migration, angiogenesis

Page Number: 140

Advisor: Prof. Dr. Gül Hüray İŞLEKEL

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile meydana gelen ve genetik ve çevresel koşulların da etkisinin olduğu çok bileşenli bir hastalıktır. Mücadele edilmesine rağmen, kanser dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Bilinen çok fazla kanser türü olmasına ve belli tipteki kanserler için olabildiğince standart yaklaşımlar geliştirilmesine rağmen bazen sağaltım hedefine ulaşılamamaktadır. Akciğer kanseri, dünya genelinde (hem küçük hücreli hem de küçük hücreli dışı) hem erkeklerde hem de kadınlarda en yaygın ikinci kanserdir (1). Akciğer kanseri, hem erkekler hem de kadınlar arasında kanserden ölümlerin açık ara önde gelen nedenidir ve tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %25'ini oluşturur (1). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) kötü prognoza sahiptir; (2) ve akciğer kanserinin en sık tipini (%80) temsil etmektedir (3). Akciğerlerdeki metastatik tümörler, diğer bölgelerde gelişen ve kan akışı yoluyla akciğerlere yayılan malignitelerdir. Akciğerlere metastaz yapan yaygın tümörler arasında meme kanseri, kolon kanseri, prostat kanseri, sarkom, mesane kanseri, nöroblastoma bulunur (4). Bununla birlikte, hemen hemen her kanserin akciğerlere yayılma kapasitesi vardır. Son yıllarda tedavi yöntemlerinin gelişmesine rağmen KHDAK tanısı konmuş hastalarda tedaviye yanıt kısmen olmakla birlikte remisyon oranları düşük kalmaktadır (5).

Taksan sınıfına ait olan Dosetaksel (DTX), *Taxus baccata L.* 'dan (porsuk ağacı) türetilmiş paklitakselin yarı sentetik bir türevi olmakla birlikte bu sınıfın ikinci nesil kemoterapötik ajanıdır (6). Dosetaksel, solid nöroendokrin tümörlere karşı geniş bir anti-tümör etkiye sahiptir. KHDAK, prostat, meme, baş-boyun, over karsinomları da dahil olmak üzere çeşitli tümörlere karşı tedavi ajanı olarak kullanılmaktadır (7–10). DTX, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen ilaç direnç gelişimi gözlemlenmekte ve akciğer adenokarsinomu olan hastaların tedavisinde bu durum sık rastlanmaktadır (11–13). Dosetaksel, hücrenin mitoz bölünmesinde görev alan mikrotübüllerin yapısında yer alan beta tübülüne bağlanarak onların stabil halde

kalmasını sağlar (14). Buna bağılı olarak hücre döngüsünün G2/M fazında alıkonmasına neden olur ve kanser hücrelerinin apoptoziye yönelmesini sağlar (14, 15).

Tarihçesine baktığımızda tıbbi botanik ve tıbbi bitkiler uzun yıllardır dünya genelinde tedavi amaçlı kullanımları devam etmektedir (16–18). Roteneoid alt sınıfına ait bir flavonoid olan Deguelin, doğal olarak baklagil türleri arasında bulunan *Mundulea sericea*, *Derris trifoliata* Lour ve *Tephrosia vogelii* Hook.f tıbbi bitkilerden izole edilmektedir (19, 20). Teksas Üniversitesi'nden Ho-Young Lee isimli araştırmacı 2003 yılında bu molekül için patent başvurusunu yapmıştır (21). Sentetik olarak laboratuvar ortamında sentezlenebilmesi ile biyolojik aktiviteleri üzerine daha detaylı çalışma yapılabilmesinin yolu açılmıştır (22). Deguelin ile yapılan çalışma sonuçlarına göre birçok kanser türüne karşı etkisinin olduğu görülmüş ve umut verici kemoterapötik bir aday ajan moleküldür. Kemopreventif, karsinogenez inhibitörü ya da enerji metabolizmasına etkisi olabilen Deguelin'in, çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kanser hücrelerinin büyümesini engellediği belirtilmiştir (22–27).

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötikler oldukça toksik ve yan etkileri olan ilaçlardır. Son zamanlarda, bitkisel türevli ilaçların daha az yan etkilere sahip olduğu görülmüş ve kanser tedavisi için ilgileri artmıştır. Etki mekanizması belli ve tedavi rejimi netleşmiş standart tedavide kullanılan kemoterapötiklerin, yeni aday moleküller ile kombinasyonları uygulanarak tedavide etkinin artırılması hedeflenmektedir. Kombinasyon tedavisinin uygulanması ile yan etkisi çok olan kemoterapötik ajanın dozu azaltılıp etkinliği artırılabilir ya da etkinliği aynı kalsa da yan etkilerin azaltılması kanser tedavisinin stratejileri arasındadır.

Bu çalışmada, *in vitro* ve *in vivo* akciğer kanseri modelleri üzerinde etkili olacağı öngörüsü ile kemoterapötik aday ajan olan Deguelin ve standart tedavide kullanılan Dosetaksel'in hem tekli dozları hem de ikili yarı doz kombinasyonu şeklinde tedavide kullanılması araştırılmıştır ve elde edilen verilerin ileride diğer *in vivo* ve faz çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada, akciğer kanseri tedavisinde birinci basamakta kullanılan Dosetaksel ile etkili olabilecek kemoterapötik aday ajan olan Deguelin'in hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde karşılaştırılması ve hücre döngüsü, apoptozis, hücre göçü, anjiyogenezis ve metastaza karşı etkili olabilme durumunun değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Lewis akciğer karsinomu (LAK) hücre hattı (*in vitro*) ve *Mus musculus* cinsi C57BL/6 türü fareler üzerinde geliştirilen KHDAK *in vivo* modelinde araştırma yapılmıştır.

H1: Deguelin (DEG), LAK hücre hattında (*in vitro*) bulunan inhibitör konsantrasyonunda (İK50) kanser hücrelerinin proliferasyonunu engeller.

H2: DEG, hücre döngüsünde G₁/S geçiş fazında etkilidir.

H3: DEG, hücre göçünde (migrasyon) LAK hücre hattı üzerinde etkilidir.

H4: DEG, LAK ve HUVEC hücre hatları ile oluşturulan 3B anjiyogenezisin (tubular formasyon) inhibisyonunda etkilidir.

H5: DTX hücre döngüsünde G₂+M fazında etkilidir.

H6: DTX, hücre göçünde (migrasyon) LAK hücre hattı üzerinde etkilidir.

H7: DTX, LAK ve HUVEC hücre hatları ile oluşturulan 3B anjiyogenezisin (tubular formasyon) inhibisyonunda etkilidir.

H8: [DEG+DTX]/2 kombinasyon dozu, hücre göçünde (migrasyon) LAK hücre hattı üzerinde etkilidir.

H9: [DEG+DTX]/2 kombinasyon dozu, LAK ve HUVEC hücre hatları ile oluşturulan 3B anjiyogenezisin (tubular formasyon) inhibisyonunda etkilidir.

H10: Tedavi gruplarında sağkalım oranı yüksektir.

H11: DEG, *in vivo* deney modelinde tümör volümünü azaltır.

H12: DTX, *in vivo* deney modelinde tümör volümünü azaltır.

H13: [DEG+DTX]/2 kombinasyon dozu, *in vivo* deney modelinde tümör volümünü azaltır.

H14: DEG, *in vivo* deney modelinde apoptozis yolaklarını aktive eder.

H15: DTX, *in vivo* deney modelinde apoptozis yolaklarını aktive eder.

H16: [DEG+DTX]/2 kombinasyon dozu, *in vivo* deney modelinde apoptozis yolaklarını aktive eder.

H17: DEG, *in vivo* deney modelinde anjiyogenezis yolağında VEGF ve HIF-1a üzerinde inhibitör etkisi vardır.

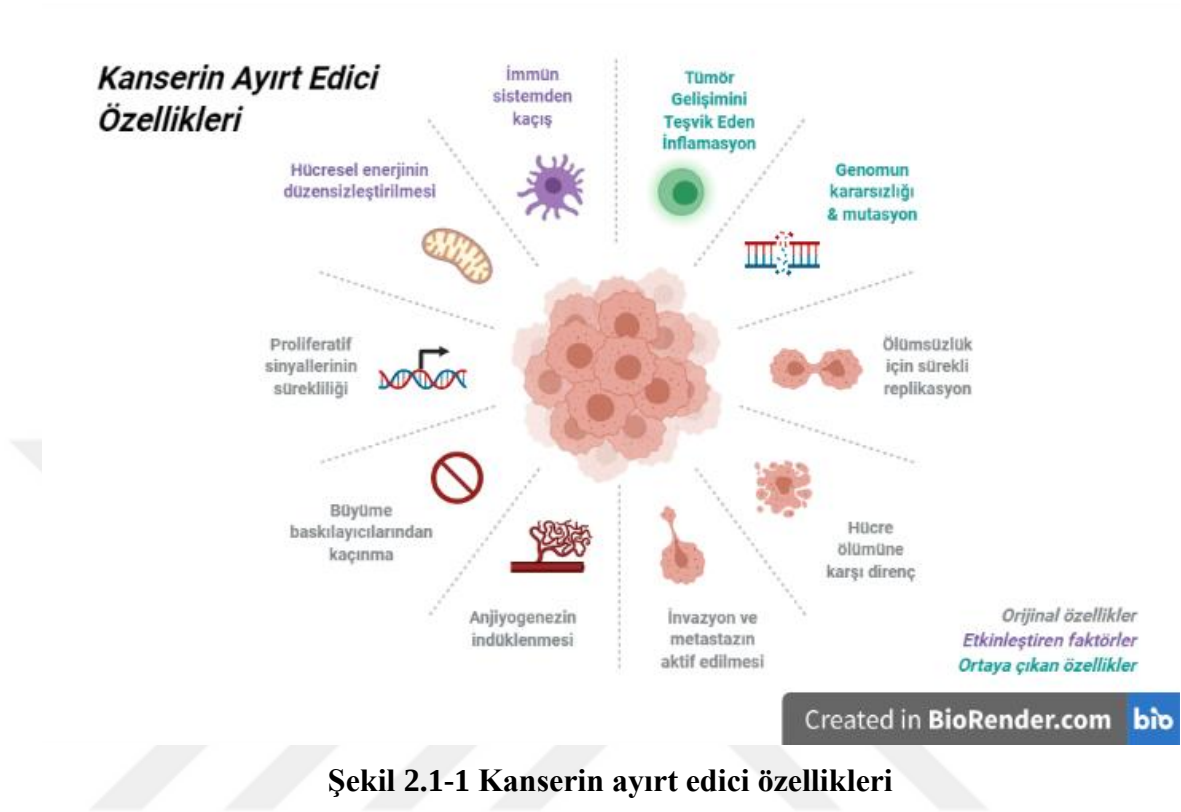
H18: DTX, *in vivo* deney modelinde anjiyogenezis yolağında VEGF ve HIF-1a üzerinde inhibitör etkisi vardır.

H19: [DEG+DTX]/2 kombinasyon dozu, *in vivo* deney modelinde anjiyogenezis yolağında VEGF ve HIF-1a üzerinde inhibitör etkisi vardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, fiziko-kimyasal, biyolojik, genetik kaynaklı herhangi bir hasar unsuru ya da bu mutasyon yapıcı faktörlerin kombinasyonundan kaynaklanabilen çok aşamalı ve hücrede karşı koyucu-koruyucu mekanizmalar ile mücadelesi olan bir süreçtir (28) ve bu olaya “karsinogenez” tanımlaması yapılmıştır. Karsinogenez, dört temel aşamada; tümörün tek hücrede başlaması (inisiyasyon), tümörün artışı-gelişimi (promosyon), malign dönüşüm ve tümörün ilerlemesi (progresyon) olarak ele alınır (28–31). Kanserin önlenmesi ya da tamamen tedavi edilmesi karsinogenezin bütün aşamaları için geçerlidir. Bu amaçla, tümör oluşumunu durdurmak, tersine çevirmek veya geciktirmek için etkinliği ispat edilmiş prevansiyon materyalleri kullanmak gereklidir. Prevansiyon tanımı gereği kanseri kontrol altına almak için en uygun ajan ve hedefte en az yan etki ile olabildiğince uzun vadeli tedavi planıdır ve bununla beraber maliyet de ikinci planda önemlidir. Kanserin tedavisi kadar yan etkilerin oluşumuna bağlı sorunların bertaraf edilmesi de önemlidir. Yan etkiler genelde; kanama, enfeksiyon, kaşeksi ve tümör lizisi sendromu olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanserin ayırt edici özellikleri aşağıdaki görselde ifade edilmiştir. Tedavi başarısı, kanserin bu ayırt edici özelliklerinde alınan olumlu sonuçlara bağlıdır.



2.1.1. Kanserlin tedavisi

Öncelikle, birçok hastalığın tedavisinde vücudun bağışıklık sistemi mücadelede başrol oynar. Bağışıklık sistemini zayıflatan, baskılayan unsurların ortadan kaldırılması tedavinin önemli bir basamağıdır. Kanserli hücrelerin ne boyutta ve vücudun hangi bölgesine metastaz yaptığını tahmin etmek bazı durumlarda olanaksız olduğundan kanser tedavisi görenlerin bağışıklık sistemlerinin güçlendirilmesi bu yayılmış hücreleri yok etmede hedeflenen bir durumdur.

Genel bilindik kanser tedavileri cerrahi müdahale dışında 5 çeşit yolla yapılabilir:

Cerrahi müdahale (Kanserli dokuyu ve çevresindeki invazyon riski taşıyan dokuyu çıkartmak.) Bazı durumlarda kanserli dokuyu cerrahi müdahale ile çıkartmak mümkün olmayabilir. Bu durumda radyoterapi veya kemoterapi uygulanır.

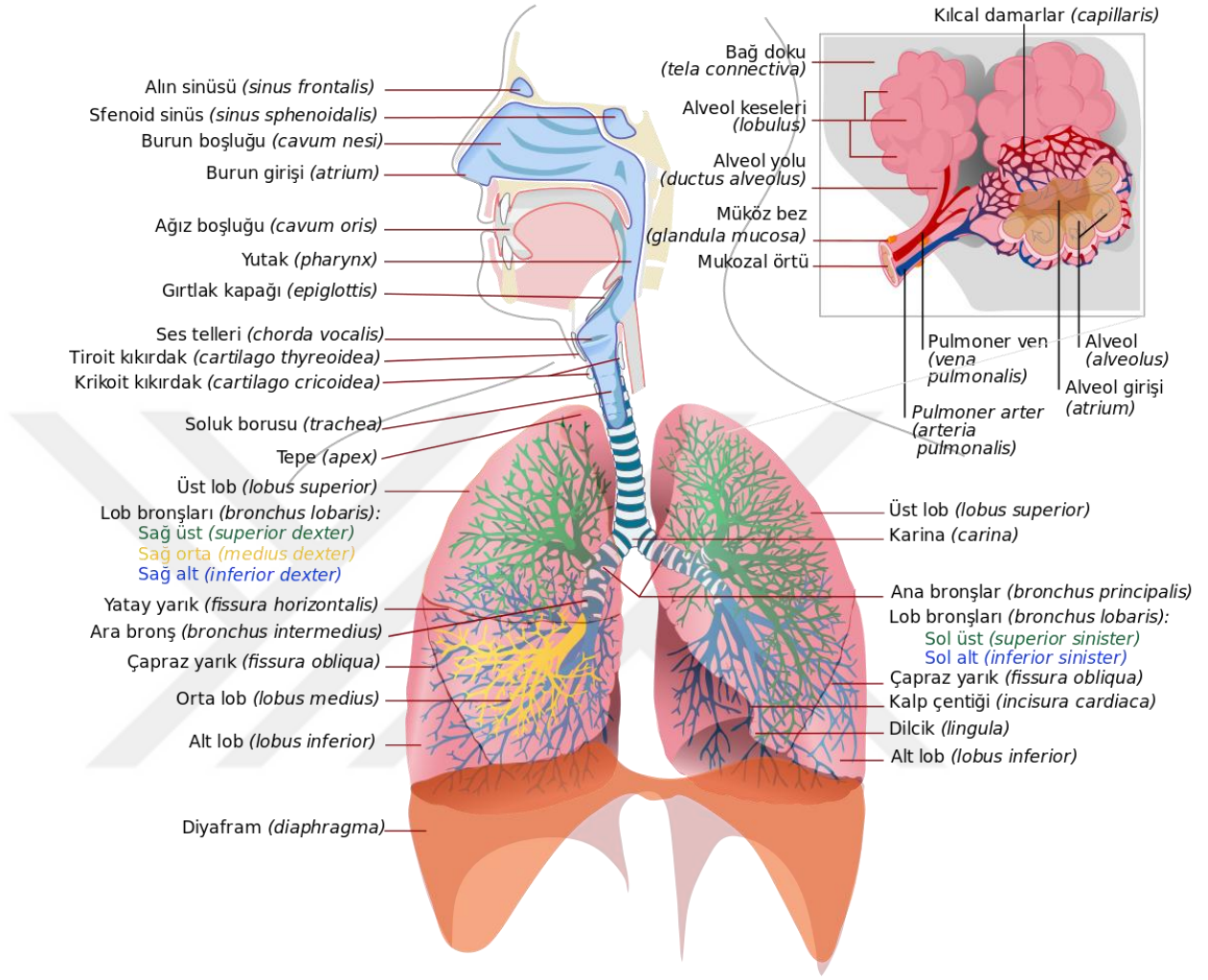
1. Radyoterapi (ışın) tedavisi,

2. Kemoterapi,
3. İmmünoterapi Bağışıklık sistemi hücrelerinin kansere karşı etkin bir şekilde kullanılmasıdır. Kimerik Antijen Reseptörü T Hücreleri tedavisi gibi.
4. Kök hücre nakli, (Lösemi veya lenfoma gibi kanla ilgili kanserli insanlar için uygulanması.)
5. Hedefli tedaviler, küçük molekülü ilaçlar (peptidler) ve monoklonal antikorlar.

2.2. Akciğer Anatomisi

Akciğerler sağ ve solda olmak üzere birer tane olup göğüs boşluğu içerisinde yer alırlar. Sağ akciğer bölümleri, üst, orta ve alt lob olmak üzere üç loba, sol akciğer ise üst ve alt olmak üzere iki loba ayrılır. Bu her iki akciğer, köprücük kemiğine kadar yukarı çıkan tepelere sahiptir. Konum olarak diafragmadan klavikulanın superioruna kadar uzanmış olup göğüs boşluğunda her iki tarafta plevral kese içerisinde yerleşmiş bir yapıdır. Mediastinumda ortasında yer alan akciğerler; içinde kalbin de bulunduğu yapılar sayesinde birbirinden ayrılır. Akciğerler, bağ dokusundan oluşan ve esnek bir yapıya sahip olan organlardır. Her akciğer de göğüs boşluğunun şekline uyacak şekilde dört yüzey vardır (32).

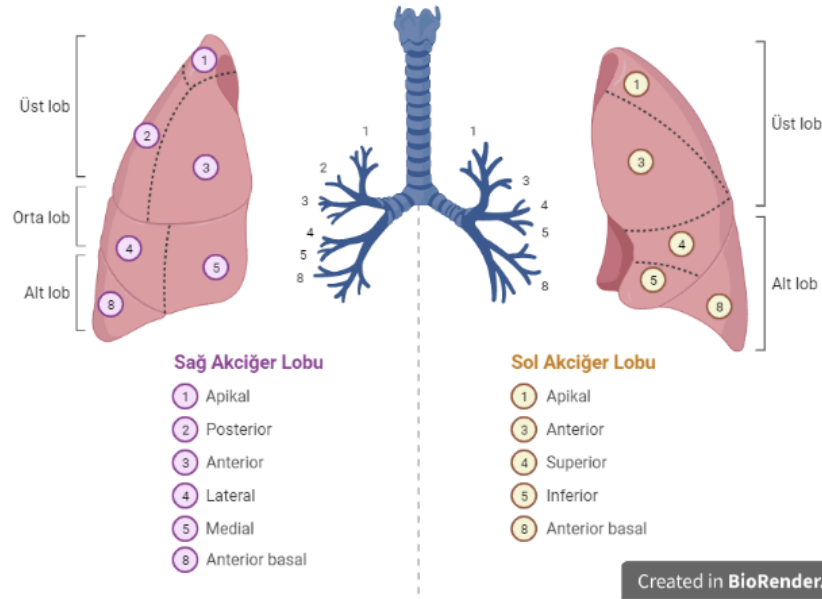
Akciğerin mediastinal yüzü: hafif iç bükey şekline sahip olduğu için (33, 34) akciğer göbeği hilus pulmonis adını almıştır. Ayrıca akciğerin bu yüzünde akciğerin ana bronşu, akciğer arteri (A. Pulmonalis), iki veni (V. Pulmonalis), sinirleri ve lenf damarlarının geçtiği hilum pulmonis denilen dikey bir yarık bulunur. Diafragmanın dışbükey kubbesi üzerine yayılan akciğerin yüzeyi ise konkavdır. Bu kısım basis pulmonis yüzü olarak adlandırılır. Akciğerin apeks pulmonis denen üst yüzeyi ise klavikula seviyesinin üzerinde uzanır. Diğer bir yüzey olan facies costalis: kaburgaların iç yüzü ile yakın temasta olup akciğerlerin en geniş yüzeyine sahiptir.



Şekil 2.2-1 Akciğer anatomisi

Sağ ve sol akciğerler birbirine temelde benzerler fakat farklı ölçüye ve yapıya sahip olmaları ile birbirinden ayrılırlar. Sol akciğer, sağ akciğere göre biraz daha küçük olması sebebiyle kalp ile uyum gösterir. Bu uyum sayesinde sol akciğerin iç yüzü üzerinde kalbin oluşturduğu bir çukurluk (*impressio cardiaca*) meydana gelmiştir (33). Sağ akciğerde üç, sol akciğerde ise iki lob bulunur. Sebebi kalbin normalde vücudun sol tarafında olmasından kaynaklanır. Akciğerin her bir lobu pulmoner alveolleri içeren çok sayıda küçük lobüllerine ayrılmıştır.

Bronkopulmoner Segmentler (Ön)



Şekil 2.2-2 Bronkopulmoner Segmentler

Plevra, çift katlı seröz bir zardan oluşur. Görevi sağ ve sol akciğeri bir kese şeklinde ayrı ayrı sarmaktır. Plevranın parietal yaprağı, göğüs kafesinin iç yüzünü kaplar. Diafragmanın çok büyük bir bölümünü örterek mediastinumu yanlardan sınırlar.

Plevranın visseral yaprağı, akciğer yüzeyini ve aynı zamanda loblar arasındaki yüzleri örter. Aralarındaki kapiller aralığa, cavitas pleuralis adı verilir ve solunum sırasında kolaylık sağlayan bir sıvı içerir. Plevranın iki yaprağının birbirlerine yaklaşarak oluşturdukları bölüme ligamentum pulmonale adı verilir ve bu ligament akciğerleri destekler (35,36).

2.2.1. Pulmoner Alveoller

Akciğerlerde gaz değişiminin meydana geldiği fonksiyonel birimler olan pulmoner alveollerin duvarlarında (33) tip I alveoler hücreler ve tip II alveoler hücrelere sahiptir. Tip II alveoler hücreler, akciğer surfaktanını yani alveolusların yüzey gerilimini azaltan fosfolipidi salgırlar (35,36).

2.2.2. Bronş Ağacı

Solunum sırasında hava dolaşımını sağlayan elementlerin dallanmasıyla oluşur. Trachea, pulmoner alveoller ve gırtlak arasında yer alır.

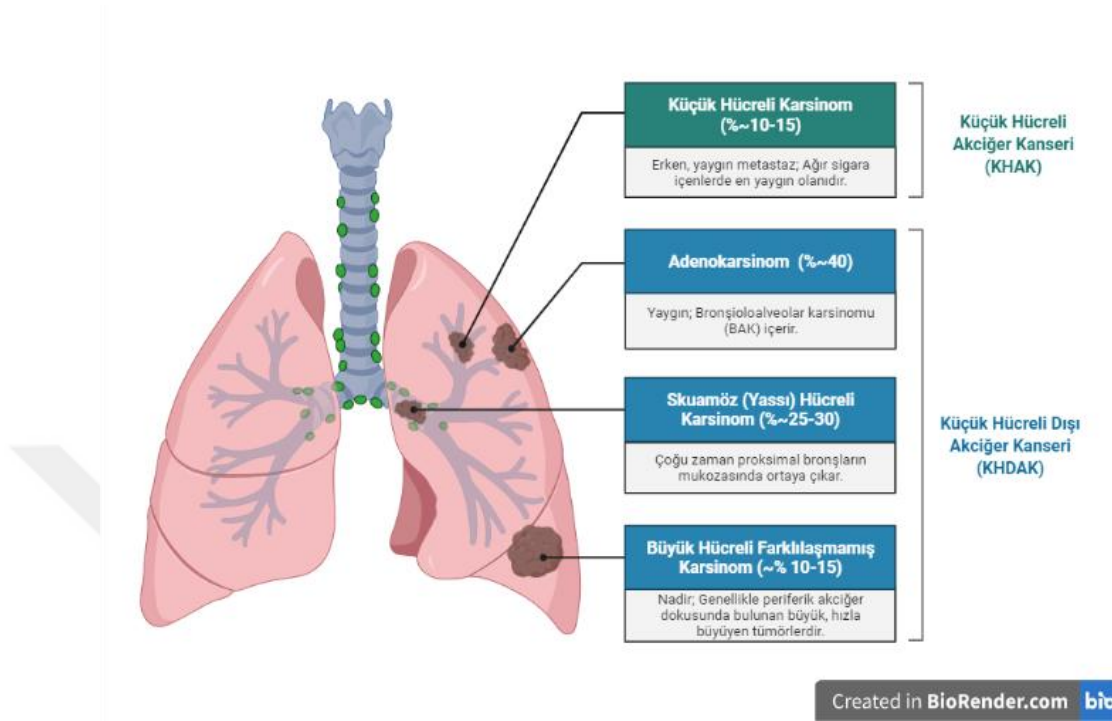
Trachea, iki ana bronştan, ikincil bronştan veya loberden ve daha küçük olan birkaç üçüncül veya segmental bronştan oluşur. Sağ ana bronşun daha kalın ve dikey konumda olması sebebiyle yabancı partiküllerin, sağ ana bronşa kaçma olasılığı daha yüksektir. Ana bronşlar devam ettikçe lobar bronşları ve segmental bronşları oluştururlar. Bronşiyal ağaç bronşiyoller denilen daha küçük tübüller bronşiyoller şeklinde devam eder (33,34).

2.3. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, akciğerlerde başlayan bir kanser türüdür. Akciğer kanseri dünya çapında yaklaşık %12 ile en çok görülen ölümcül hastalıktır. Her yıl 2.2 milyonu aşkın yeni teşhis konmakta ve yaklaşık 1.8 milyona varan ölümle sonuçlanmaktadır. Sigara kullanma alışkanlığının kontrol altına alınması çabalarıyla ölüm oranlarında iyileşmeler görülmesine rağmen yine de sağkalım yüzdesi %10'lardan öteye geçememiştir. Hastalık teşhisi konulanlar arasında sigara içme oranının $\frac{3}{4}$ olması bu kanser türünün bütün kullanımı ile ilişkisini gözler önüne sermektedir (37).

İki ana akciğer kanseri türü vardır ve çok farklı tedavi edilirler. Akciğer kanseri türlerinin yaklaşık %85'ini oluşturan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) en çok görülen alt türüdür (3). Akciğer kanserlerinin %15'ini küçük hücreli, geri kalan %85'lik kısmı ise küçük hücreli dışı akciğer kanserleri oluşturmaktadır.

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri üç alt gruba ayrılır; skuamoz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom. Bunlardan ilk ikisi bütün akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'inini teşkil eder.



Şekil 2.3-1 Akciğer kanseri çeşitleri

İleri aşamadaki hastalıkların kemoterapi ve radyoterapi başarı oranlarının düşük olması, hastalığın evrelerinin tespitinin hayati öneme sahip olduğunu göstermiştir.

2.4. Akciğer Kanserin Evrelendirilmesi

KHDAK için en sık kullanılan evreleme sistemi, 3 temel bilgiye dayanan Amerikan Ortak Kanser Komitesi'nin (AJCC) TNM sistemidir:

Ana tümörün boyutu ve kapsamı (**T**): Tümör ne kadar büyük?

Yakındaki lenf düğümlerine (**N**) yayılma: Kanser yakındaki lenf düğümlerine yayıldı mı?

Uzak bölgelere yayılma (metastaz) (**M**): Kanser beyin, kemikler, böbrek üstü bezleri, karaciğer veya diğer akciğer gibi uzak organlara yayıldı mı?

Akciğer kanserinde ve KHDAK'da ise skuamöz (yassı), büyük hücreli ve adenokarsinomda uygulanacak tedavinin belirlenmesi ve planlanması tümörün prognozuna bağlı olarak TNM sisteminde hastaların sınıflandırılması ve evrelendirilmesi; IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB ve IV şeklindedir (Tablo 2.4.1).

Tablo 2.4-1 TNM sınıflandırmasına göre evrelendirme (38, 39)

Evre	TNM
0	Karsinoma in situ Tis, N0, M0
I	I A: T1, N0, M0
	I B: T2, N0, M0
II	II A: T1,N1,M0
	II B: T2,N1,M0 T3, N0, M0
III	IIIA: T3,N1,M0 T1-2-3, N2, M0
	IIIB: T4,N,M0 T, N3, M0
IV	T, N, M1

2.5. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi ve Mekanizmaları

Akciğer kanseri histopatolojik yönden olduğu kadar moleküler ve genetik yönden de oldukça heterojenik özellikler taşımaktadır. Birçok araştırmada bu elim hastalığın moleküler mekanizmaları ve altında yatan genetik faktörler inceleme konusu olmuştur. İlk olarak hastalığa karşı yatkınlığın genetik nedenlerini odak noktasına alan çalışmalar, GWAS (genome-wide association studies) genom çapında incelemeler sonunda birtakım polimorfik varyasyonların hastalığa ve nikotin kullanımına alt yapı oluşturabileceğine işaret etmiştir (40–42). Fakat bu görülen varyasyonların oluşturacağı genetik yatkınlık bütün insidansı açıklamaya yetmemiş olup, tümör örneklerinde görülen mutasyonlu genler farklı moleküler faktörlerin de rol oynadığını göstermiştir. Akciğer kanseri özellikle *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *MEK*, *HER2* genleri ve PI3K yolağı üzerindeki diğer onkogenlerde yüksek mutasyon frekansları taşımaktadır (43). Buna ek olarak, *ALK* (anaplastic lymphoma kinase), *ROS1* (proto-oncogene receptor tyrosine kinase) ve *RET* genlerinin kromozomal translokasyonlarla deregülasyonları ve oluşan füzyon proteinleri de hastalığın patolojisinde rol oynar (44, 45). Adenokarsinomada *MET*, skuamoz hücreli

karsinomada *FGFR1* ve *DDR2* genlerinin kopya sayılarının artması da bir diğer moleküler mekanizma olarak rol alır. Bunların yanısıra *TP53*, *PTEN*, *RB1* ve *p16* gibi birtakım önemli tümör supresör genlerin hasara uğraması oldukça sık görülen durumlardır (46).

EGFR mutasyonunu taşıyan tümörlerde tirozin kinaz inhibitör tedavisi tümör yükünü azaltmada etkin rol oynamıştır (47).

ALK, *ROS1*, *BRAF* gibi genlere karşı kinaz inhibitör ilaçları ile etkin sonuçlar elde edilmektedir. Bunlara ek olarak, diğer genlerden *ERBB2*, *MET*, *RET*, *NTRK1* ve *FGFR* genleri de terapötik olarak hedef olmaktadır (48).

2.6. Akciğer Kanserinde *in vitro* Deney Materyalleri

Akciğer kanseri hücre hatları kanserin evresine, barındırdığı genetik değişikliğe, kök hücre karakteristiğine sahip olmasına, agresifliğine, ilaç dirençliliğine veya buna benzer özelliklere göre tanımlanır ve kimliklendirilir.

Küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarından hücre hatlarının elde ve karakterize edilmesine yönelik sistematik bir yaklaşımla tür fark etmeksizin şimdiye kadar 2000'den fazla akciğer kanseri hücre hattının toplanması sağlanmıştır (49). Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'na (ATCC) ait akciğer dokusu ile ilişkili bu zamana kadar yaklaşık 250'ye yakın hücre hattı bulunmaktadır. ATCC'den elde edilen sorgulamaya göre hücre hatlarından 82 tanesi insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri olduğu belirlenmiştir. Akciğer kanseri hücre hatları da canlılığın türüne göre değişkenlik gösterir.

2.6.1. *Homo Sapiens* Hücre Hatları

Genetik yatkınlık, akciğer kanseri riskini artırır ve akciğer adenokarsinomu, diğer histotiplere göre genetik faktörlerle daha fazla ilişkilidir. Akciğer kanserinde en sık bildirilen somatik mutasyonlar *TP53*, *LRP1B*, *KRAS*, *KEAP1*, *KMT2C*, *FAT4*, *CDKN2A*, *EGFR* ve *FAT2* genlerindedir. Bu bilgiye dayalı da birçok hücre hattı izole edilmiştir. Akciğer kanserinin çeşitli türlerinde hücre hattı aşamasında çalışmalar yapabilmek için sırasıyla; adenokarsinom için A549, H1975, HCC4006 ve HCC827, KHDAC karsinom

için NCI-H1299, büyük hücreli karsinom için NCI-H460 ve skuamöz hücreli karsinom için NCI-H226 hücre hatları kullanılabilir (50–58).

2.6.2. *Mus Musculus* Hücre Hatları

Hayvan hücre hatları içinde *Mus musculus* türünün kanser çalışmalarında oldukça önemli bir yeri vardır ve hemen hemen birçok deney hayvanı modellemesinde kullanılmaktadır. Hücre hattı aramalarında önemli bir yeri olan expasy.org veritabanından elde edilen sorgulamaya göre şimdiye kadar 124 adet akciğer kanseri hücre hattı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda Lewis akciğer karsinomu hücre hattı kullanılmıştır. Literatürde en çok kullanılan iki hücre hattının özellikleri ayrıntılı olarak aşağıda ifade edilmiştir.

2.6.2.1. Lewis Akciğer Karsinomu (LAK) Hücre Hattı

Lewis akciğer karsinomu (LAK), 1951'de Wistar Enstitüsü'nden Dr. Margaret R. Lewis tarafından tespit edilen bir fare kanseridir. Tümör, C57BL/6 farelerinde akciğer karsinomu olarak uygulandığı bölgede (s.c, i.p, i.v) spontan olarak gelişir (59) ve ayrıca indüklemeye ihtiyaç duyulmamaktadır. Adenokarsinom tipi akciğer kanseri özelliği göstermektedir (60). Ayrıca, kanser kök hücre özelliği de vardır (61). İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı olan A549'a benzer özellikler göstermektedir (60). Metastatik potansiyel gelişim durumuna göre süspanse veya yapışkan-yüzeye bağlı (adherent) özellik gösterir (62). Çalışmamızda bu hücre hattı kullanılmıştır.

2.6.2.2. KLN 205 Hücre Hattı

Skuamöz (Yassı) hücreli karsinoma özelliğine sahip *Mus musculus* türü akciğer kanseri hücre hattıdır. DBA/2 fare soyuna aittir ve yine bu fare soyuna ve BDF1 farelerine tümörjenite oluşturmak için uygulanabilir (35). Morfolojik olarak epitelyal özellik gösterir.

2.7. Akciğer Kanseri*nde in vivo* Deney Modelleri

Kanserde kemoterapötik ajan keşfi sürekli yeni gelişmeler ile devam etmekte ve olağanüstü hız ve çok miktarda kaynak harcanarak ilaç keşfi ve tasarımı için çalışmalar sürdürülmektedir. Böyle bir umutla tasarlanmış ilaç molekülünün değerlendirilmesi, kritik aşamayı oluşturmaktadır. Değerlendirme yönteminin yanlış seçimi potansiyel bir ajanın ileride tedavi adaylığından düşürebilir. Aday molekülün tedavide kullanılan bir ilaç olabilme yolculuğuna başlaması için birincil yöntem olarak uygun hücre hattı kullanılarak yüksek verim ile optimum doz taraması yapılmasıdır. Ancak klinikle daha az ilişkili olma gibi sınırlamalar nedeniyle uygun *in vivo* modeli kullanarak daha fazla tarama koşulu zorunludur. Böyle bir durumda hayvan seçimi uygun modeli oluşturmak için çok önemli hale gelmektedir. Oluşturulan hayvan modeli, insandaki hastalığı olabildiğince benzer şekilde temsil etmelidir. Aynı zamanda fizibilitesinin yapılabilir ve ekonomik olması da önemli faktörlerdendir. Aşağıda tümör modeli başlıkları sunulmuştur ve transplante edilebilen model üzerinde durulacaktır.

- Spontan tümör modelleri
- Virüsle indüklenmiş modeller
- Radyasyon ile indüklenmiş modeller
- Kimyasal ile indüklenmiş modeller
- Transplantasyon yapılmış modeller
- Genetik Mühendislik ile yapılmış modeller

2.7.1. Transplantasyon yapılmış modeller

2.7.1.1. Transplantasyon Metodları

Bu modeller, farelerde veya sıçanlarda yetiştirilebilen kanser hücre hatlarının veya dokularının kullanımına dayanmaktadır.

2.7.1.1.1. Heterotopik Transplantasyon

Köken aldığı organ ve yeri dışındaki bölgeye tümör hücrelerinin veya dokuların naklinin yapılmasını içerir(63, 64). Örneğin; intraperitoneal (i.p) veya subkutan (s.c) olarak nakledilen karsinomdur ve bu yöntemde genellikle tümörün solid tümör şeklinde çoğaldığı s.c transplantasyonu tercih edilir. Bu transplantasyon prosedürü basittir ve

daha az zaman alır. Bu yöntemde, tümör ve konakçı arasındaki yakın etkileşim düşünüldüğünde önemli bir durum olması nedeniyle insan tümörlerinin birçok önemli özelliğinden yoksundur. Örneğin, genellikle homozigot olarak yetiştirilmiş farelerden türetilirler ve bu nedenle insan tümörlerinin genetik karmaşıklığından yoksundurlar. Ayrıca, onkogenezdaki türe özgü farklılıklar nedeniyle (örneğin kanserojen ksenobiyotik metabolizmasındaki farklılıklar) insanlarda gözlemlenen kanserler ile aynı mutasyon kümesini taşımayabilir.

2.7.1.1.2. Ortotopik Transplantasyon

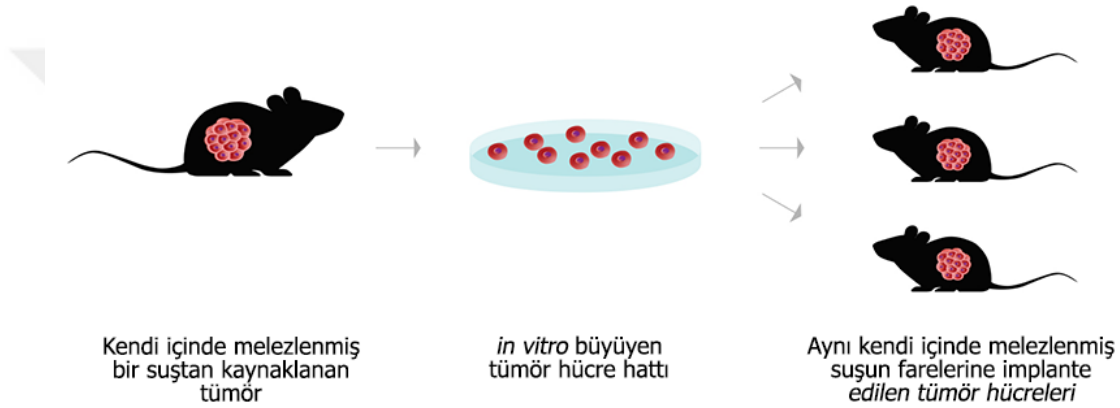
Ortotopik modeller, tümörün köken aldığı ilgili organa enjekte ederek veya implante ederek tümör mikroçevresini doğru şekilde modellemeye odaklanır (65). Bu modellemede, tümör hücre hatlarının, hayvan modellerinde karşılık gelen dokuya enjekte edilmesini içerir. Kanser hücrelerinin, bir tümörün oluştuğu anatomik konuma veya dokuya transplantasyonunu ifade eder (59). Örneğin, akciğer tümörü akciğerlere nakledilir (66). Bu strateji, ilgili bir ortamda tümör gelişimini değerlendirmemize ve hastalık sürecinin insanda olana benzeterek prelinik tümör modelinde tedavi etkinliğini değerlendirmemize olanak tanır (66). Ortotopik modellerle, birincil tümör büyümesini, metastatik aktiviteyi ve tedavi senaryolarına yanıtı yakından izlenebilir ve doğru bir şekilde ölçülebilir. Bu yöntemin kullanılması, tümör histolojisi, vaskülarite, gen ekspresyonu, kemoterapiye yanıt verme ve metastatik biyoloji dahil olmak üzere insan kanserlerine daha çok benzeyen tümör modelleriyle sonuçlanmıştır. Konak-mikroçevre etkileşimi hakkında daha fazla şey bilindiği için ortotopik tümörlerin neden geleneksel yan (s.c. transplant) modellere göre tercih edildiği açıktır.

2.7.1.2. Host (Hücre Hattı) Kullanılarak Yapılan Modeller

2.7.1.2.1. Sinjeneik Modeller

Tez çalışması bu model üzerine tasarlanmıştır. Bu tür modeller, türetilmiş hücre hattı veya dokusu ile aynı genetik geçmişe sahip kendi içinde melezlenmiş (inbred) hayvanlara nakledilen fare veya sıçan (murin) kanser hücre hattının veya dokularının kullanımını içerir (63). Sinjeneik modellerde, immünolojik olarak uyumlu kanser

hücrelerinin immün sistemi yeterli olan farelere enjeksiyonunu gerektirir (63, 67, 68). Akciğer kanserini incelemek için eş zamanlı modellerin varlığı çok sınırlıdır. Bugüne kadar akciğer kanseri için tekrarlanabilir tek eş zamanlı model, LAK modelidir. LAK, primer Lewis akciğer karsinomunun implantasyonundan kaynaklanan bir tümörü taşıyan bir C57BL faresinin akciğerinden oluşturulan bir hücre hattıdır (60). Bu hücre hattı, oldukça tümörijeniktir ve metastazı modellemek için uygun bir yöntemdir (69). Aynı zamanda kemoterapötik ajanların *in vivo* etkinliğini değerlendirmek için kullanılır (70).



Şekil 2.7-1 Sinjenik modelin oluşturulması

2.7.1.2.2. Ksenograft Modeller

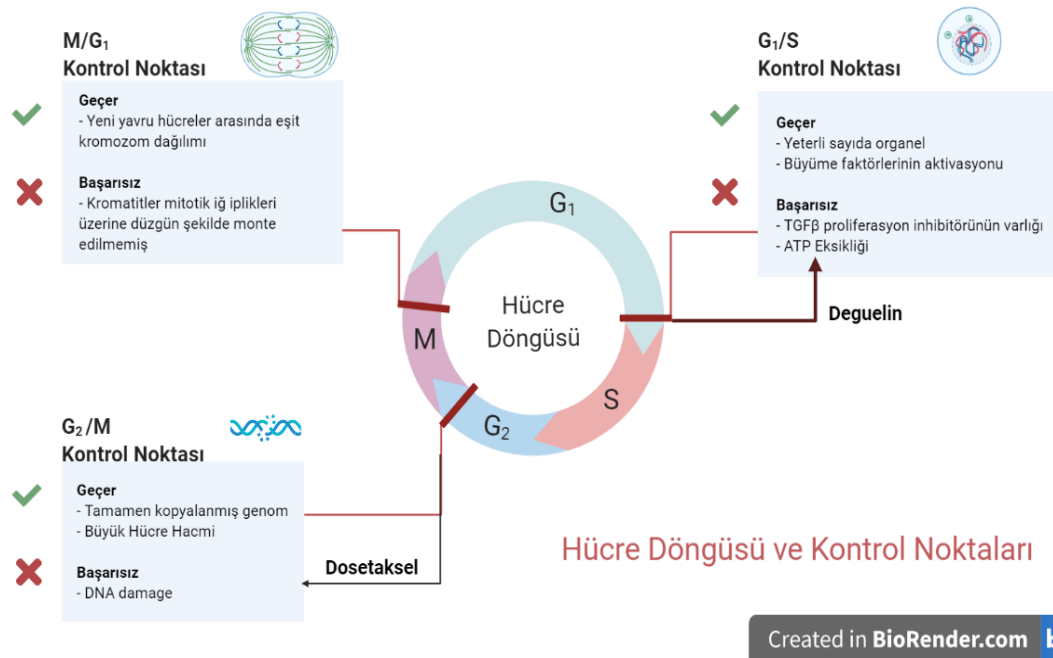
Orijin organın belirli bir bölgesine transplante edilen tümör hücreleri model oluşumunu başlatır (71, 72). Özellikle bu organ, tümör hücrelerinin çoğalması veya gelişmesi için idealdir ve optimum şartlar sağlar. Bu model pahalı, zahmetli, üst düzey deney hayvanı laboratuvarı isteyen ve uzmanlaşmış kişilerden destek alınarak yapılması gerekli ve alışılmamış modeldir. Organ bölgesine spesifik sitotoksik ajanların etkilerini *in vivo* değerlendirmede kullanılmaktadır. Günümüzde bağışıklığı baskılanmış fareler üzerine uygulanan beyin tümörleri, kolon, renal hücre ve pankreatik karsinom, prostat ve akciğer kanserleri potansiyel ortotopik model kullanımında da görülmektedir (73). Örnek model olarak; anestezi altındaki hayvanın süspanse durumdaki tümör hücrelerine özellikle sağ akciğerinin sağ bronş sapına direkt inoküle edilir (56, 74). Tümör oluşumunu değerlendirmek için denek kurbanı edilir ve beraberinde histolojik inceleme

yapılır. Tümörün durumu sitopatolojik olarak incelenmeli ve ilerleme kaydetmeyen bölümleri moleküler görüntüleme metodu ile değerlendirilir.

2.8. Kemoterapi

Kemoterapi, kanserin kimyasal yolla yani ilaç ile tedavi edilmesi demektir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar kanser hücrelerinin proliferasyonunu, gelişmesini ve yayılmasını önleyerek onları hasara uğratarak ortadan kaldırabilir veya etkinliklerini azaltabilir. Klasik kemoterapiler tek başına kullanıldıkları gibi bazı ilaç kombinasyonları ile uygulandığında sinerji oluştuğunda daha fazla etki gösterebilmektedir. Ayrıca, etki mekanizmaları farklı ajanların kullanılması da avantaj sağlayabilir. Bu nedenle tedavinin herhangi aşamasında kemoterapi kürleri birden fazla ilaç yada radyoterapi-ışın tedavisi içerebilir.

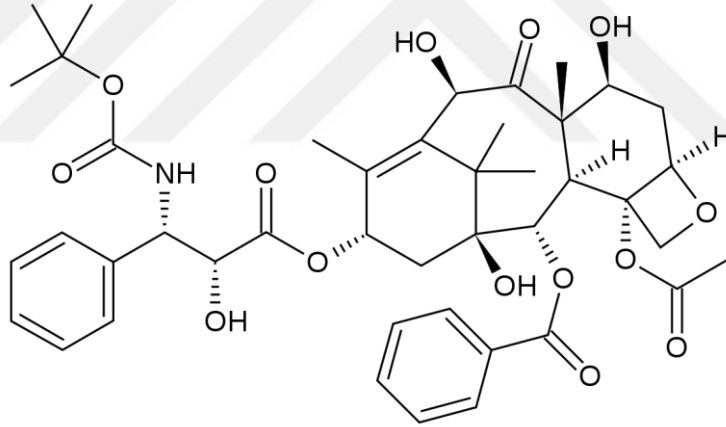
Aşağıdaki görselde çalışmamızda yer alacak moleküllerin hücre döngüsü üzerinde başlıca hedef mekanizmaları yer almaktadır ve bu moleküllerden ayrıntılı bir şekilde bahsedilecektir.



Şekil 2.8-1 Hücre döngüsünde dosetaksel ve deguelinin kontrol noktalarında etkisi

2.8.1. Dosetaksiel ve Standart Tedavide Kullanımı

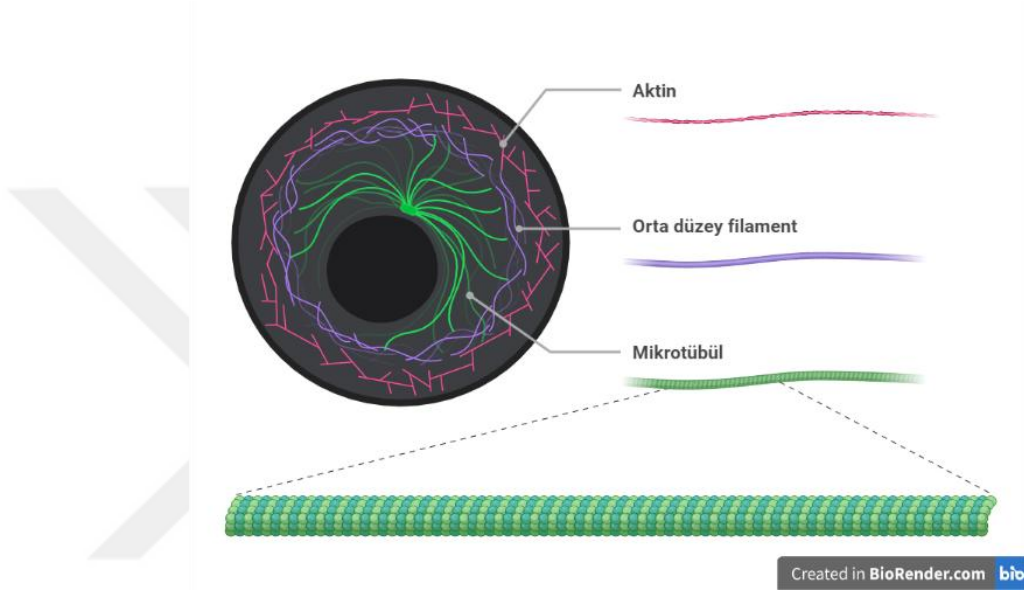
Kanser tedavisi genellikle cerrahi ve radyasyon tedavisinden kemoterapiye, hormonal tedaviye ve hastalığın türüne ve kapsamına bağlı olarak hedefe yönelik tedaviye kadar uzanan uygulamaların bir kombinasyonundan oluşmaktadır. Bireysel tedavinin uygulanması ise kanserin türüne ve moleküler mekanizmasına bağlıdır. Yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçları sisplatin, paklitaksiel, gemsitabin veya dosetaksiel ve karboplatin ve paklitaksiel olarak sıralanır (75). Dosetaksiel, taksan ailesine ait ikinci nesil kemoterapötik ajandır (76, 77). Dosetaksiel 1986'da patentlenmiş ve 1995'te tıbbi kullanım için onay almıştır (78). KHDAK'de kullanım onayını 1999 yılında almıştır (79). Dünya Sağlık Örgütü'nün Temel İlaçlar Listesinde yer almaktadır ve jenerik bir ilaç olarak satışı yapılmaktadır (80).



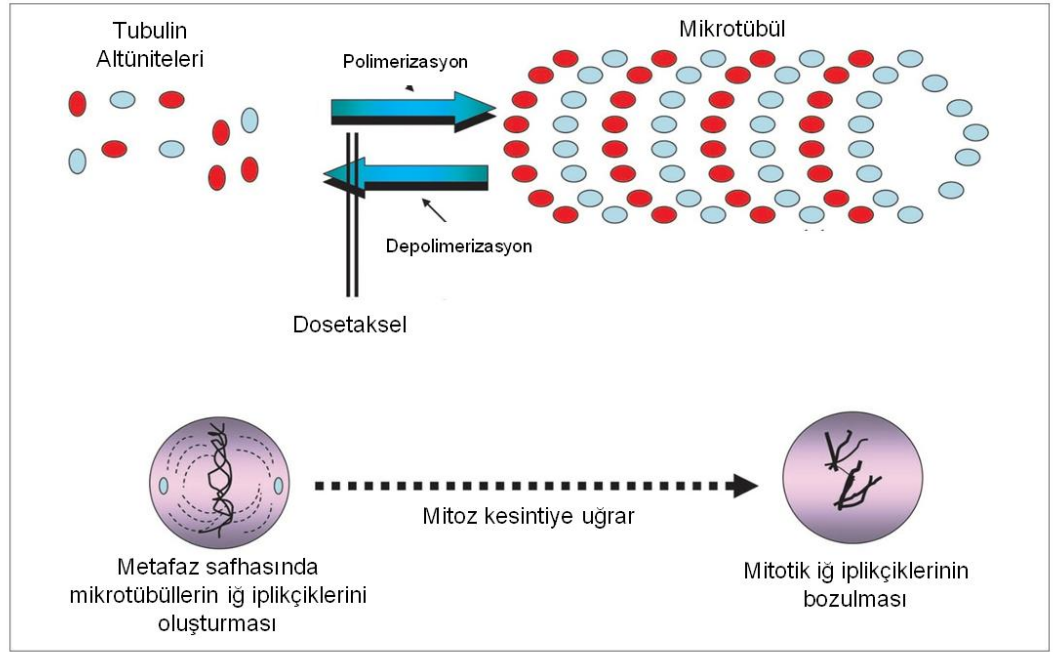
Şekil 2.8-2 Dosetaksielin molekül şekli

Bu tedavi türlerinden birisi olan dosetaksiel, birçok kanser türünün tedavisinde tekli ya da normal dokular üzerine toksisite etkisi olacağı için antioksidan etkisi olan ajanlarla çoklu kombinasyon şeklinde kullanılabilen bir kemoterapi ilacıdır. Dosetaksiel, Japonya'da en yaygın standart olarak kullanılan ikinci basamak bir kemoterapi ilacıdır. Dosetaksiel ve pemetreksed gibi birkaç yeni kemoterapötik ajan, akciğer kanseri için ikinci veya üçüncü basamak tedaviler olarak sağlamaktadır (14, 81). Dosetaksiel,

mikrotübülünün β -tübülün alt birimine bağlanan, mikrotübüllerin stabilize edilmesine ve depolimerizasyonun önlenmesine neden olan, mikrotübül dinamiklerinin inhibisyonuna ve hücre döngüsünün durmasına ve sonunda apoptotik hücre ölümüne yol açan sitotoksik bir anti-mikrotübül ajanıdır.



Şekil 2.8-3 Hücre içinde mikrotübül yerleşimi



Şekil 2.8-4 Mikrotübül ve dosetaksel etkileşimi

Yapılan güncel çalışmalarda, dosetakselin yumurtalık kanseri, akciğer kanseri, meme kanseri gibi farklı kanserlere karşı yaygın olarak kullanıldığını ve prostat kanseri için ilk basamak tedavi olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, dosetakselin biyolojik işlevi ve mekanizmaları, akciğer kanserinde daha fazla açıklanmayı beklemektedir (9, 10). Xigan ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada, dosetakselin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre apoptozunu indüklediğini ve hücre proliferasyonunu baskıladığı bulunmuştur (82). Yapılan ilk çalışmalarda, dosetakselin P388 hücre hattı (murin lösemi), KB hücre hattı (epidermoid karsinom), CEM hücre hattı (akut lenfoblastik lösemi), N417 hücre hattı (küçük hücreli akciğer karsinomu) ve T24 hücre hattına (mesane karsinomu) karşı önemli inhibitör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (83, 84). Liu ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada yeni dosetaksel yüklü misellerin, hipertermi ile kombinasyon halinde antitümör etkinliğini, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak, geleneksel dosetaksel formülasyonundan daha

önemli ölçüde artırdığı göstermiştir (85). Dosetaksel bazı *in vivo* deney çalışmalarında sisplatin ile birlikte kombine uygulandığı da gösterilmiştir (86). Bissery ve arkadaşları tarafından kemirgen transplante edilebilen tümörler kullanılarak Dosetaksel'in *in vivo* antitümör aktivitesi araştırılmıştır (87). B16 melanom hücre hattı ile oluşturulan deney hayvanı modelinde dosetaksel, aynı modelle oluşturulan ve paklitaksel ile tedavi edilene göre 2,7 kat daha etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, dosetakselin etkinliğinin araştırıldığı başka bir çalışma olan pankreatik duktal karsinoma ve kolon adenokarsinomun erken evrelerinde %100'e yakın iyileşme ve ileri evre hastalıkta %80'den fazla tam gerileme sağlandığı ifade edilmiştir. Kolon adenokarsinomu 51/A, erken ve ileri evrelerde Dosetaksele oldukça duyarlıyken, Lewis akciğer karsinomu, L1210/P388 lösemi ve Glasgow osteojenik sarkom hücre hatları ile oluşturulan modeller daha az duyarlı olduğu bulunmuştur (88). Sonraki bir çalışmada, beş meme tümöründen dördünün Dosetaksele duyarlı olduğu bulunmuştur (89).

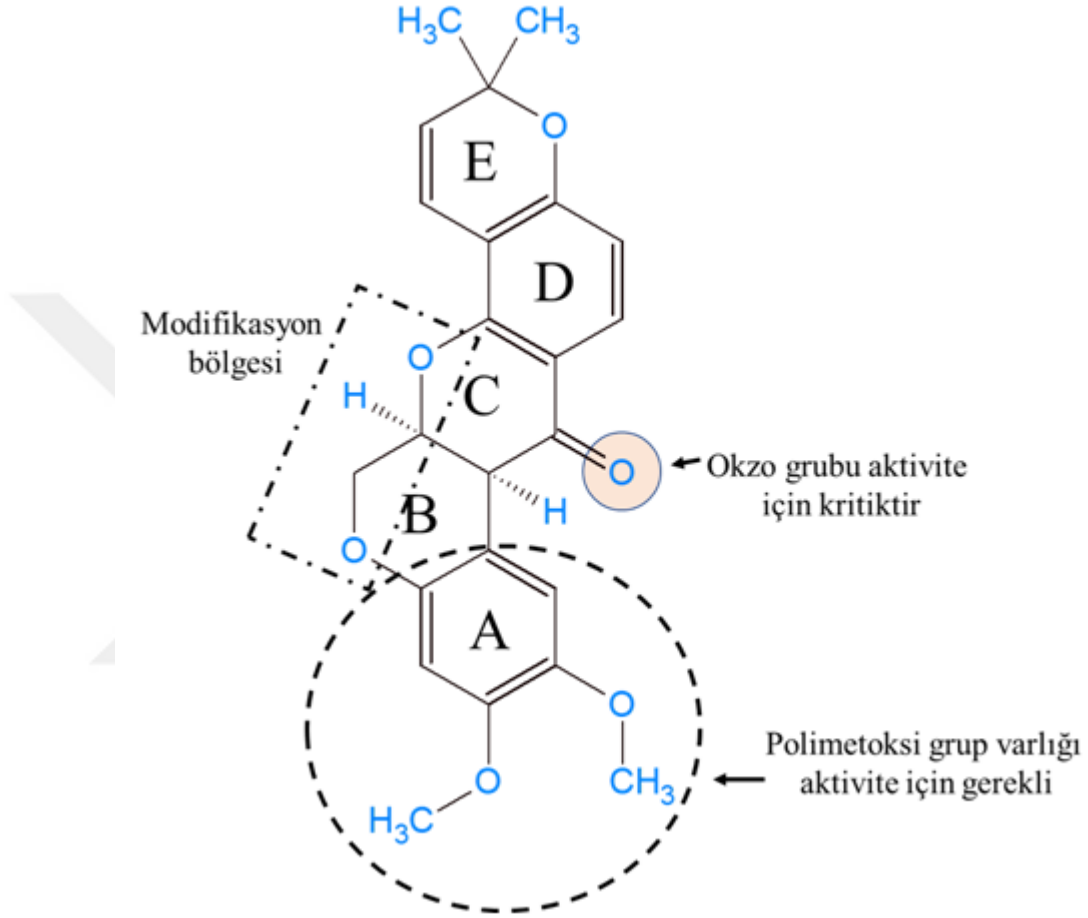
Dosetaksel, çeşitli kanserlerin tedavisi için ilaç olarak hizmet vermesine rağmen, ilaç direnci oluşumu ya da gelişimi bu kemoterapötik ajanın etkinliğine sınırlamalar getirir ve çoklu ilaç direnci gelişimi söz konusudur. Dosetaksel, ilaca dirençli proteinler, özellikle ATP'ye bağlı ilaç dışarı akış pompası P-glikoprotein (Pgp) için yüksek afiniteye sahiptir (76, 90, 91). Pgp'nin kanser hücreleri tarafından ekspresyonu, taksanlara karşı hem edinilmiş hem de kazanılmış dirençten sorumlu olabilir. Sınıf III β -tübülinin aşırı ekspresyonu da taksan direncinin nedeni olarak tanımlanmıştır (92).

Dosetaksele bağlı oluşan yan etkiler; kemik iliği baskılanmasına bağlı olarak gelişen nötropeni, saç dökülmesi, gastrointestinal sistem etkileri ve hipersensitivite reaksiyonları, ödem, deri ve tırnak değişiklikleri olarak görülebilir (6, 93).

2.8.2. Deguelin

Deguelin, doğal olarak oluşan rotenoid alt sınıfına ait flavonoiddir. Doğal deguelin baklagil türleri arasında bulunan *Mundulea sericea*, *Derris trifoliata* Lour ve *Tephrosia vogelii* Hook.f tıbbi bitkilerden izole edilmektedir (19). Sentetik olarak laboratuvar ortamında sentezlenebilmesi ile biyolojik aktivitelerinin daha detaylı

çalışılmasının önü açılmıştır (22). Teksas Üniversitesi'nden Ho-Young Lee isimli araştırmacı 2003 yılında bu molekül için patent başvurusunu yapmıştır (21).



Şekil 2.8-5 Deguelin kimyasal yapısı (94).

Henüz Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmamış olmasına karşın, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar (örneğin fare akciğer kanser çalışmaları) Deguelin'in farklı yollar üzerinden kansere karşı etkin ilaç olma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (95). Deguelinin bilinen etki ettiği temel yollar ve sistemlere Fosfoinositol 3-kinaz/protein kinase B (PI3K/Akt), Nükleer Faktör Kappa Beta (NF-kB),

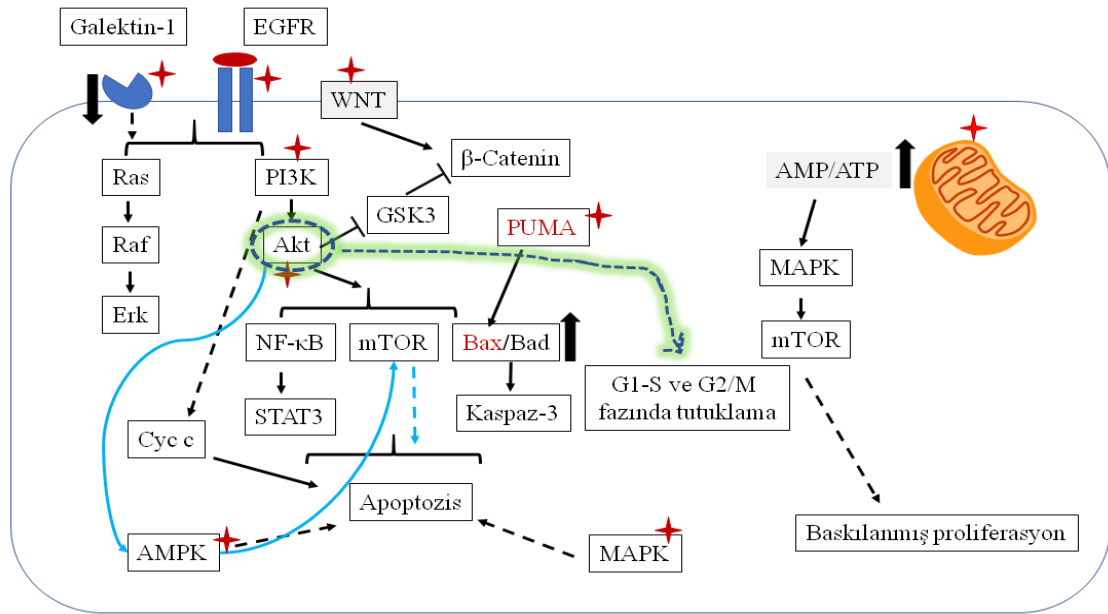
Mitojen ile etkileşen protein kinaz (MAPK) ve Mitokondrinin Elektron Taşıma Sisteminin Kompleks I'ı örnek olarak verilebilir.

Deguelin, indüktif etki göstererek PI3K/Akt yolağının aşağı yönlü regülasyonunu sağlayarak akciğer kanserinde meydana gelen apoptozis direncinin ortadan kalkmasını sağlar (95). Benzer şekilde meme kanseri hücre hatları ve lösemide apoptozisi PI3K/Akt yolağı üzerinden tetiklediği gösterilmiştir (22). Deguelin, Akt defosforilasyonunu indüklemekte ve lösemi hücrelerinin S ve G2/M fazında duraklatılmasını sağlamıştır. Diğer önemli bir durum da Deguelin'in doğrudan toksik etki göstermesine ek olarak PI3K/Akt yolağına sahip direnç nedeniyle etkisiz kalan antikanser ilaçlarının etkisini artırmak için sinerjistik ajan olarak da kullanılma fikrini ortaya koymaktadır (96). Akt'nin inhibisyonu hücre tipleri arasında değişiklik göstermektedir, örneğin BRAF^{V600E} mutasyonuna sahip metastatik melanoma hücrelerinde deguelin Akt inhibisyonunu indüklememektedir (25). Akt yolağının Deguelin ile regülasyonu doğrudan Deguelin-EGFR ile ilişkisinden ziyade deguelinin bir seri metabolik yolağı etkilemesi neticesiyle meydana gelmektedir. Akt her ne kadar Deguelin'in etkinliğinin ifade edilmesinde merkezi sistem gibi gözükse de, bu durumun deguelinin pekçok yapı ile etkileşmesi nedeniyle Akt'nin başka efektörlerden etkilenecek derecede düzenlenmesiyle de ortaya çıkmaktadır (23).

KHDAK hücre hatları ve ksenograft fare çalışmaları ile Deguelin'in PI3K/Akt sinyal yolağı aracılığıyla Hekzokinaz-II (HK-II) enzimin sentezinin inhibisyonunu ve HK-II'nin mitokondri dış zar yüzeyinde birikmesini baskılayarak apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir (24). Glukoz metabolizması ve PI3K/Akt yolağı temelinde bakıldığında (kanser gelişimi için deregülasyon şarttır), Deguelin hipoksi ile indüklenen faktör (hypoxia inducible factor) 1 α (HIF-1 α) protein sentezini akciğer kanser hücre hatlarında ve fareler ile yapılan çalışmalarda blokladığı gösterilmiştir. HIF-1 α sentezinin aşağı yönlü regülasyonu glukoz metabolizmasında bulunan pekçok enzimin ve VEGF sentezini doğrudan etkilediği için kanser hücrelerinin çoğalmasının önüne geçmektedir (97). Bununla birlikte, Deguelin akciğer epitel hücrelerinde I κ B α ve p65 in fosforilasyonunu engelleyerek p65 in translokasyonunu bloklamakta ve bu şekilde NF-

kB'nin inhibisyonu gerçekleşmektedir (98); burada NF-kB nin inhibisyonu PI3K/Akt yolağından bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Diğer önemli bir yolağın etkilenmesi olarak Deguelin p38 MAPK aktivasyonunu gerçekleştirerek kolorektal kanser hücre hatlarında apoptozisi artırdığı örnek olarak gösterilebilir (99). Diğer kaynaklara bakıldığında ise Deguelinin doğrudan MAPK'yı etkilediğine dair bir bulguya rastlanmamıştır.

Mitokondrial kompleks I sisteminde oksidatif defosforilasyonun Deguelin aracılığıyla bloklanması bir seri sinyal mekanizmasında deregülasyona sebebiyet vermektedir. Artmış AMP, AMPK sinyal yolağını aktifleştirerek mTORC1 sinyal yolağını tetikler ve bu durum 4E-BP1 ve p70S6 kinazlarının aktifleşmesini sağlamaktadır. Ayrıca, ERK aktivasyonunun ve Ki67 ekspresyonunun inhibisyonu gerçekleşmektedir. Bu farklı sinyal yollarının bir arada düzenlenmesi kanser hücrelerinin proliferasyonunu (örneğin melanoma hücreleri) engellemektedir (25).

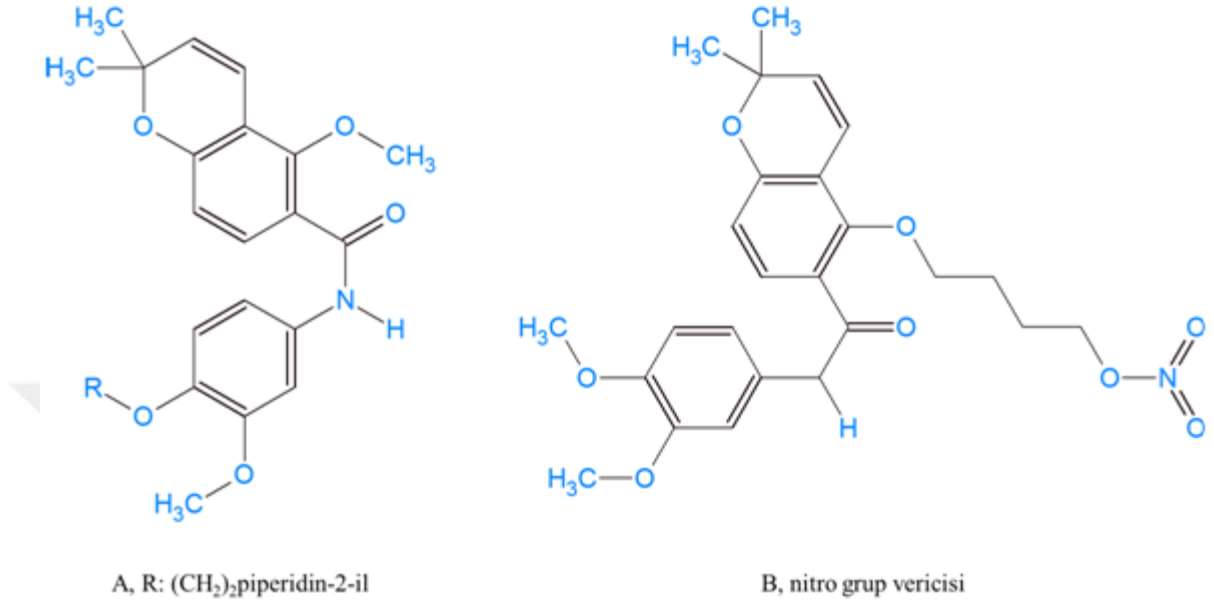


★ Yıldız işareti, Deguelinin etki ettiğini göstermektedir.

Şekil 2.8-6 Deguelinin bilinen etki ettiği mekanizmaları

2.8.2.1. Sentetik Deguelinler

Doğal Deguelin'e ek olarak yeni modifiye Deguelin molekülleri sentezlenerek mevcut aktivitenin artırılmasının yanı sıra yeni etki mekanizmalarının ortaya çıkması ve çoklu etkilerin oluşturulmasını sağlamaktadırlar. Diğer önemli bir durum ise farelerle yapılan çalışmalar temel alındığında, doğal Deguelin'in absorpsiyonunda sorunlar yaşanmasıdır (22). Isı şok protein 90 (Heat shock protein 90, HSP90)'nın inhibisyonuna yönelik olarak Deguelin'in B ve C halkalarına yapılan *O*-eklemeler (*O*-substituted) (Şekil 2.8.7.A) doğal Deguelin'e nazaran çok daha yüksek inhibisyon özelliği göstermekte ve Trastuzumab-duyarlı ve Trastuzumab-dirençli meme kanser hücre hatlarında yüksek toksisite göstermiştir (100). Nitro grup verici olarak tasarlanan modifiye Deguelin (Şekil 2.8.7.B) akciğer kanser hücrelerinde hem migrasyonu engellemekte, hemde HSP90 proteinini inhibe etmekte (N terminaldeki G137 ve K58 amino asitleri ile etkileşim göstermektedir) ve hücrelerin G2/M fazında tutuklanmasını sağlamaktadır (101). *O*- substitüsyona uğramış Deguelin'in doğal Deguelin'e göre daha yüksek biyoaktivite göstermesinin nedeni *O*-substitüsyonun Deguelin metabolizmasında değişikliğe neden olması olabilir çünkü sitokrom P450 2C19 Deguelin'i *O*-substitüsyon mekanizması üzerinden metabolize etmektedir (22).



Şekil 2.8-7 Deguelin'in türevleri (A ve B)

Fareler ile yapılan farmakokinetik çalışmalar Deguelin'in intravenöz uygulama sonucunda birikimin en yüksek olduğu dokunun kalp ve en düşük olduğu dokunun akciğer olduğu görülmüştür. Mide içerisine uygulama neticesinde ise birikimin en yüksek olduğu doku böbrek etrafındaki yağ dokusunda ve en düşük birikim ise deride olduğu görülmüştür (22). Antikanser ilaçlarının etkinliğinin maksimize edilmesinde önemli hususlardan bir tanesi hedef dokuya seçimli olarak taşınmasıdır. Alternatif Deguelin türevlerine ek olarak doğal Deguelin'in seçimli taşınmasına yönelik çalışmalar da artmaktadır. Örneğin, Deguelin'in lipozomlar içerisinde taşınması yapılan fare çalışmalarında lipozom-Deguelin formülasyonunun intranazal uygulamalarının serbest Deguelin'e göre çok daha yüksek ve akciğer kanserine spesifik kemopreventif etki gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (102). Benzer şekilde katyonik hidrojel içerisine hapsedilmiş Deguelin'in fare prostat kanseri uygulamalarında başarı oranını artırmıştır (103). Tüm bunlar dikkate alındığında, doğal Deguelin'in hem modifikasyonu hem de seçimli taşınması ile sahip olduğu farmakolojik etkinin artırılabilirliği öngörülmektedir.

2.9. Apoptozis

Apoptozis hücrenin doğal programlı ölüm olayıdır. Homeostazisin sağlanmasında kritik öneme sahip olan apoptozis, istenmeyen ve gereksiz hücrelerin bertaraf edilmesinde görev alır; DNA hasarında veya kontrolsüz hücre çoğalması durumunda aktive edilir. İç ve dış yolların etkin olduğu iki tür apoptotik yolak mevcuttur. İç yollar ile gerçekleştirilen apoptotik süreç mitokondri yolu olarak adlandırılırken dış yollar ise ölüm reseptör yolları olarak adlandırılır. Bu iki yolak kaspazlar aracılığıyla birleşmektedir.

Apoptoz sinyali verildiği anda hücre içerisinde değişimler başlar; kaspazların aktivasyonu başlar ve hücre fonksiyonları için gerekli olan bileşenlerin parçalanması gerçekleşir. Kaspazlar sistein aspartil spesifik proteazlardır ve apoptozisin gerçekleşmesinde cellat olarak görev alırlar. Kaspaz2, -8, -9 ve -10 apoptozisin başlaması için gerekli iken kaspaz-3, -6 ve -7 ise cellat olarak görev alır. Cellat kaspazların hedef proteinleri parçalaması ile hücre ölümü gerçekleşir.

Mitokondriyal yolak, B-hücre Lenfoma-2 (BCL-2) protein ailesi ile regüle edilir; proapoptotik proteinler, proapoptotik BH3-sadece protein ve antiapoptotik BCL-2 proteinleri ile regülasyon sağlanır. Antiapoptotik BCL-2 proteinleri proapoptotik BCL-2 proteinleri, BCL-ilişkili X protein (BAX) ve BCL-2 homolog antagonist öldürücü (BAK) proteinlerini inhibe ederek apoptozisi durdurur. BH3-sadece proteinleri ise antiapoptotik BCL-2 proteinlerini inhibe eder. BAX, p53 tümör baskılayıcı geni tarafından regüle edilmektedir. Apoptozis aktive edildikten sonra BAX ve BAK oligomerize olur ve bu durum mitokondri dış membran geçirgenliğine (MOMP) neden olur. MOMP gerçekleştikten sonra iç apoptozis yolu harekete geçmiştir ve artık geri dönüş yoktur. Geçirgenlik sitokrom c, ikinci mitokondri türevli aktivator kaspazı (SMAC) ve Omi'nin salınmasına neden olur. Sitokrom c'nin salınması ile sitokrom c, apoptotik proteaz aktifleyici faktör-1 (APAF-1), dATP ve prokaspaz-9 dan apoptozomun oluşmasına neden olur. Apoptozom içerisinde prokaspaz-9 kaspaz-9'a dönüştürülür ve kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin aktifleşmesini sağlar. Cellat kaspazlar hemen

hücre ölümünü sağlayacak proteinlerin (örneğin; iskelet proteinleri) parçalanmasını sağlar.

Dış yolak; hücre dışı sinyal yollarının uyarması ile dış yolak temelli apoptozis başlar. Hücre ölüm sinyalleri tümör nekrozis faktör (TNF) aile ölüm reseptörlerine bağlanır; örnek olarak Fas ligandları (Fas-L), TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TRAIL) ve tümör nekrozis faktör (TNF) verilebilir. Ölüm reseptörlerinden Fas-ilişkili ölüm domaini (FADD) ve TNF-reseptör ilişkili ölüm domaini (TRADD) adaptör proteinleri reseptör-ligand etkileşiminden sonra ayrılır ve başlatıcı prokaspazlardan -8 ve -10'a bağlanarak ölüm indükleyici sinyal kompleksinin (DISC) oluşumunu sağlar. Bu kompleks prokaspaz-8 ve -10'un aktifleşmesine neden olur. Bu durum cellat kaspazlar-3,-6 ve -7'nin aktifleşmesini sağlayarak hücre hayatı için gerekli proteinlerin ve hücre iskeletinin parçalanmasını sağlayarak hücre ölümünü getirir. DISC'in regülasyonu inhibitör özelliği gösteren c-FLIP ile gerçekleşir.

Kaspaz-8'in aktifleşmesi BH3 etkileşimli domain ölüm antagonisti (BID) (BH3-sadece protein) aktifleşmesine neden olur. BID sonrasında BAX ve BAK'ın oligomerizasyonunu sağlayarak iç apoptotik yolağın sürece dahil olmasını sağlar (104).

2.10. Anjiyogenezis

Kanserli hücreler gelişimleri için oksijen ve çeşitli nütrientlere ihtiyaç duyarlar. Bu ihtiyaçların karşılanmasında başvurulacak temel kaynak kan dolaşım sistemidir. Bu durum, kanser hücre topluluklarının etrafında yoğun damar oluşumu ile kendini göstermektedir (105). Kanser gelişimi için damar gelişimi gereklidir. Kanser hücre topluluklarının etrafında damar gelişiminin görülmediği durumlarda ise kanserin ilerleyişi akamete uğramaktadır.

Tümör gelişimi durumunda, mevcut damarlar tümör gelişimine aracılık edebilir veya kompleks moleküller ile birlikte hücresel araçların kullanıldığı ve “yeni damar” gelişimine neden olarak agresif karakterini artırır. Damar oluşumunun başlaması öncül-anjiyojenik sinyal yolağının indüklenmesi ile başlar ve tümörün ilerleme safhasında

gerçekleşen bu olaya “anjiyojenik değişim (angiogenic switch)” adı verilir. Anjiyojenik değişim başladığında yeni damarların oluşumu ve akabinde hızlı kanser gelişimi gerçekleşir (105).

2.10.1. Kanser Durumunda Damar Oluşum Mekanizması

Filizlenme şeklinde ilerleyen anjiyogenezis;

Yeni kapiler damarları mevcut toplar damarlardan filizlenerek gelişebilir;

1. Tip (Uç) hücre seçimi: ana toplar damardan orjinli bir göç eden hücre göç edici lider hücre olur ve komşu hücreleri bloklar.
2. Filiz uzaması: uç hücre kemotaktik yol ile hareket eder ve ardından gelen hücreler hat oluşturur.
3. Lümen oluşumu: filizin luminal alanı ana toplardamar ile birleşir. Gelişen filiz sonrasında anastomozis süreci ile diğer toplar damarlar ile de ilişki kurmaya başlar.

Endotelial hücreler olağan koşullar altında böyle bir sürece girmez; vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi faktörlerin etkisiyle filizlenme şeklinde ilerleyen anjiyogeneze katılım gösterirler. Uç ve uç hücreyi takip eden hücrelerin seçimi VEGF ve Dll4/Notch yollarının çapraz ilişkisi (crosstalk) ile seçilir. VEGF indüksiyonu ile uç hücreler Delta-like-4 (DLL4) ligantını, platelet den türemiş büyüme faktörü B (PDGF-B), VEGF reseptör 2 (VEGFR-2) ve VEGFR-2/Flt-4 üretimini gerçekleştirir. VEGF, Notch sinyal yolağını bloklar ve tip hücrelerinde filizlenmeyi, göç kapasitesini ve filopod oluşumunu güçlendirir. Uç hücreler tarafından salgılanmış DLL4 komşu endotelial hücrelerde Notch sinyal yolağını aktive eder; bu durum VEGFR2 ve VEGFR3 ekspresyonunu inhibe ve VEGFR1'i aktive ederek uç hücre oluşumunu engeller. Tüm bunlar uç hücrenin filopodlar oluşturmaya ve daha agresif fenotipik karakter kazanmasını sağlar. Sonrasında tirozin kinazların da dahil olduğu bir seri etki ile uç hücreyi takip eden hücreler ana toplar damardan filizlenmeler oluşmasına neden olur (105).

De novo damar gelişimi;

Angioblast hücrelerinin hareketi ile başlayan yeni damar oluşumu indükleyici ve inhibe edici bir seri faktörün etkisi ile kontrol edilmektedir. VEGF ailesine ait VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D faktörleri anjiogenezin başlatılmasını ve damar geçirgenliğinin (permeability)'nin artmasını sağlar; epidermal büyüme faktörü vasküler endotelial hücre üretimini artırır; plasenta büyüme faktörü (PlGF) vasküler endotelial hücrelerinin hareketini sağlar; fibroblast büyüme faktörü anjiyogenezi tetikler. Bunlara ek olarak matriks metalloproteinazlar, efrin (ephrin), dönüştürücü büyüme faktörü ve anjiopoietin 1 de yeni damar oluşumunda görev alır. Buna karşın, platelet faktör-4 ise VEGF'ye bağlanarak inhibisyonuna neden olur. Benzer şekilde, anjiopoietin 2, kollajen, endostatin ve anjiostatin gibi faktörlerde yeni damar gelişimini engelleme yönünde hareket eder (106). Bu iki ana damar gelişim yolağına ek olarak vaskülojenik taklit (vaskülojenik mimicry) ve kanser kök hücrelerinin transformasyonu ile gerçekleşen damar oluşumları da mevcuttur.

VEGF'nin nötralize edilmesine yönelik hareket eden antikor kullanımı ile kanserli hastaların yaşam süreleri artırılmıştır. Günümüzde FDA onaylı VEGF nötralize edici antikorlar mevcuttur (105). VEGF'nin tümör gelişiminde damar gelişimini yolaklarının herbirinde rol aldığı düşünüldüğünde, bloklanmasının kanser gelişimini engelleyici özelliği göstereceği açıktır (106).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma, deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, 2016-2020 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı ve Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Deney hayvanı çalışmaları, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Histolojik yöntemler için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı ve patolojik yöntemler için ise Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ve SBÜ İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi patoloji görüntüleme laboratuvarı ve gen ekspresyon çalışmaları için İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Laboratuvar alt yapısından yararlanılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışma, insan üzerinde yapılmadığı için evreni ve örnekleme yoktur.

3.4. Araştırmanın Materyali

Çalışmada, Lewis Akciğer Karsinom hücre hattı, İnsan Umbilikal Vein Endotelyal Hücre hattı (HUVEC) ve *Mus musculus* cinsinin C57BL/6 türü kullanıldı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmanın değişkenleri hücre kültürü ve deney hayvanı çalışmalarında farklılık göstermektedir ve ayrıntılı olarak kendi maddeleri içinde açıklanmıştır.

3.5.1. Hücre Kültürü Çalışması

Bağımlı Değişkenler: LAK hücre hattında % canlılık oranı ve IK_{50} , akım sitometrik apoptozis ve hücre döngüsü, migrasyon (hücre göçü), 3B anjiyogenezis (tüp formasyon).

Bağımsız Değişkenler: Kontrol, Dosetaksel, Deguelin ve Kombinasyon [(DTX+DEG)/2] gruplarının farklı derişimlerdeki konsantrasyonları.

3.5.2. Deney Hayvanı Çalışması

Bağımlı Değişken: Denek ağırlıkları (g), tümör volümleri (mm^3), sağkalım süreleri (gün), nekrotik tümör varlığı, apoptotik tümör varlığı, immünhistopatolojik aktif kaspaz-3 skoru ve gen ekspresyon düzeyleri (VEGF, HIF-1a, kaspaz-9, aktif kaspaz-3, p53)

Bağımsız Değişkenler: Kontrol, Kanser, Kanser+DMSO, Kanser+DEG, Kanser+DTX, Kanser+Kombinasyon [(DTX+DEG)/2] gruplarının farklı derişimlerdeki konsantrasyonları.

3.6. Veri Toplama Araçları

Kullanılan araç & gereçler ve sarf malzemeler ilgili tablolarda aşağıda sunulmuştur.

3.6.1. Tez Çalışması Sırasında Kullanılan Araç ve Gereçler

Tez çalışmasında kullanılan tüm araç ve gereçler Tablo 3.6-1’ de verilmektedir.

Tablo 3.6-1 Tez çalışmasında kullanılan tüm araç ve gereçler

ADI	MARKA/MODELİ	PROJEDE KULLANIM AMACI
Hava Akış kabineti	Kojair Class II	Hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.
CO2 inkübatörü	Sanyo	Hücrelerin belli sıcaklık ve CO ₂ içeren ortamda saklanması amacıyla kullanılmıştır.
Otoklav	Hirayama Hiclave	Pipet, vb. malzemelerin sterilizasyonu ve steril dH ₂ O elde etmek amacıyla kullanılmıştır.

ELISA Plak okuyucu	Bioteck Elx 808	Hücre canlılık testi sonuçlarının alınması ve Serbest Oksijen Radikallerinin tayini için kullanılmıştır.
Distile su cihazı	UV plus ultrapure water system	Su banyosunda kullanım ve temizlik amacıyla kullanılmıştır.
Inverted mikroskop	Olympus CKX41	Hücrelerin kontrolü ve hücre sayımı amacıyla kullanılmıştır.
Su Banyosu	GFL	Hücre ortamları ve kimyasalların 37 °C ısıya gelmesi için kullanılmıştır.
Soğutmalı Santrifüj	Sigma 3-16K	Hücre kültürü, doku homojenizasyonu ve akım sitometri çalışmalarında kullanılmıştır.
Etüv	Thermo Heraeus	Steril edilmiş malzemeleri kurutmak için kullanılmıştır.
Buzdolabı (-20, +4°C)	Siemens	Kimyasalların saklanması için kullanılmıştır.
Sıvı Nitrojen Depolama Tankı	MVEXLC	Hücre hatlarının saklanması için kullanılmıştır.
Derin dondurucu (-80°C)	Indesit	Hücre hatlarının saklanması için kullanılmıştır.
Akım Sitometrik Analiz Cihazı	BD FACS Calibur II	Apoptoz ve Hücre Döngüsü analizinde kullanılmıştır.
Santrifüj		Hücre lizat ve Apoptoz ve Hücre Döngüsü analizinde kullanılmıştır.
Hassas terazi	Mettler Toledo	Kuru kimyasalları tartmak için kullanılmıştır.
RT-PCR	Applied Biosystems 7500 Fast	Gen ekspresyon çalışmaları için kullanılmıştır.
PCR Cihazı		cDNA elde etmek için kullanılmıştır.
Sonikatör		Dokuları homojenize etmek için kullanılmıştır.
Rotary mikrotom	RM 2255, Leica, Germany	Doku bloklarından kesit almak için kullanılmıştır.

3.6.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler Tablo 3.6-2’ de verilmektedir.

Tablo 3.6-2 Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler

Maddenin Adı	Markası	Kullanım Amacı
Deguelin	Sigma-Aldrich	Çalışma için seçilen aday ajan
Dosetaksel	Taxotere, Sanofi Aventis	Standart tedavide kullanılan ajan
L-Glutamin	Gibco	Hücre kültürü tamamlanmış ortam için gerekli
RPMI 1640	Gibco	Hücre hatları için besin sıvısı
Fetal Sığır Serum (FBS)	Gibco	Tamamlanmış ortam çözeltisi için
Trypsin-EDTA	Gibco	Pasajlamada hücreleri kaldırmak için
Penisilin / Streptomisin	Gibco	Tamamlanmış ortam çözeltisinde antibiyotik
PBS (Fosfat tuz tampon çözeltisi)	Gibco	fizyolojik koşullar için
DMSO	Cryosure	Çözgen / kriyoprevensiyon işlemi
Tripan Mavisi	Sigma-Aldrich	Hücre sayımında hücre boyama
Hücre Canlılık Testi	Biotool	Hücre canlılık tespiti ve IK belirleme
Thoma Lamı	Marienfeld, Germany	Hücre sayımı
Akım Sitometri Tüpü	BD Falcon	Akım sitometride özel kullanılan tüp
Akım Sitometrik Apoptozis Analiz Kiti	BD Pharmingen	Apoptozis analiz kiti
Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analiz Kiti	Cycle TEST PLUS	Hücre döngüsü belirleme kiti
1000 ml’lik Filtreli Pipet Ucu	Costar	steril pipetleme işlemi
200 ml’lik Filtreli Pipet Ucu	Costar	steril pipetleme işlemi
100 ml’lik Filtreli Pipet Ucu	Costar	steril pipetleme işlemi
10 ml’lik Filtreli Pipet Ucu	Costar	steril pipetleme işlemi
Parafilm	American National Can	Kapatma-hava teması önleme

Otoklav Bandı	Sussex	Otoklav indikatörü
12ml'lik Steril Tüp	Costar	Hücre kültürü-santrifüj basamağı
1ml'lik Pipet	Costar	Hücre kültürü rutin pipetleme işlemi
2ml'lik Pipet	Costar	Hücre kültürü rutin pipetleme işlemi
25 cm ² 'lik Steril Flask	Costar	Hücre Kültür Kabı; büyüme çoğalma
75 cm ² 'lik Steril	Costar	Hücre Kültür Kabı; büyüme çoğalma
50 ml'lik Falcon tüp	Axygen	Hücre kültürü-santrifüj basamağı
2 ml'lik Cryovial	Costar	Hücre dondurarak saklama
Binding Buffer	BD Facscanto II	Akım sitometri metodunda kullanıldı
Cell Scraper	Costar	Hücreyi kazımak için kullanıldı
Lateks Eldiven	Tenty	Laboratuvar sarf malzeme
Es 7x	Mp Biomedicals	Güçlü dezenfektan ve kabin, ekipman temizleme
Cam petri kapları (Steril)		Doku parçalama için kullanıldı
0,5-10 µl 20-2000 µl ve 100-1000 µl otomatik pipet	Thermo	Laboratuvar sarf malzeme-steril pipetleme işlemi
Steril Bistüri	PlusMed	Doku parçalama için kullanıldı
TRIZOL	ThermoFisher	Dokudan RNA elde etmek için
RIPA Lysis and Extraction Buffer	Thermo	lizis ve ekstraksiyon tamponu
µ-Dish35mm,low Culture-Insert	ibidi, Germany	Hücre migrasyonu için gerekli plak
µ-Slide Angiogenesis Plate 3x5	ibidi, Germany	3B Anjiyogenezis metodu için gerekli plak
Matrigel Matrix	Corning	3B Anjiyogenezis-Tüp Formasyonu için katman
96'lık well plate	Corning	Hücre kültürü işlemi için
6'lık well plate	Corning	Hücre kültürü işlemi için
The PureLink® RNA Mini Kit	Invitrogen	RNA saflaştırma
Qubit RNA ölçüm kiti	Invitrogen	RNA ölçümü yapabilmek için
High Capacity RNA-to-cDNA™	Invitrogen	RNA'dan komplement DNA'ya çevirmek için
Alkol (%70-80-96)		Doku takibi
Eosin	Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire	Histolojik değerlendirme için boyama

Entellan	Merck	Doku preparatı kapama işlemi
Hematoksilen	Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire	Doku takibi
%10'luk Formaldehit	Sigma-Aldrich	Doku takibi
Parafin		Doku bloklama
Aseton		Doku takibi
Ksilol		Doku takibi
Lam-Lamel (Poli-Lizin Kaplı)		Histopatolojik yöntem
Beta aktin (Primer)	Thermo	Gen ekspresyon için gerekli primer
Aktif kaspaz-3 (Primer)	Thermo	Gen ekspresyon için gerekli primer
Kaspaz-9 (Primer)	Thermo	Gen ekspresyon için gerekli primer
p53 (Primer)	Thermo	Gen ekspresyon için gerekli primer
VEGF (Primer)	Thermo	Gen ekspresyon için gerekli primer
HIF-1a (Primer)	Thermo	Gen ekspresyon için gerekli primer

3.6.3. Uygulanan Yöntemler

Hücre hattı çalışmasında uygulanan yöntemler; hücre kültürü açma-idame ettirme ve dondurma saklama, hücre canlılık tayini ve inhibitör konsantrasyon %50 tayini, hücre göçü analizi, anjiyogenezis-tüp formasyon (3D), görüntü analizi, akım sitometri ile apoptozis ve hücre döngüsü analizleri uygulanmıştır.

Deney hayvanı çalışmasında ise denekler sakrifiye aşamasına gelmeden önce uygun plana göre tedavileri yapılırken gözlemlmeleri ve tartımları yapıldı. Bu aşamada ex olanların sağkalım süreleri kayıt altına alındı. Sakrifikasyon aşamasından sonra deneklerin tümör boyutlarının ölçümleri yapıldı. Akciğer ve tümör dokusunda histolojik olarak hematoksislen ve eozin boyamaları ve patolojik olarak da İHK yöntemi ile aktif *kaspaz-3*, *kaspaz-9*, *p53*, *HIF-1a*, *VEGF-A* boyamaları yapıldı ve görüntü incelemeleri değerlendirildi. Aynı dokularda apoptozisde (aktif kaspaz 3, kaspaz 9, p53) ve anjiyogenezis için (*HIF-1a* ve *VEGF*) etkin görevi olan belli gen bölgelerinin ekspresyon düzeyleri incelendi.

3.6.3.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışması, iki adet iki boyutlu yüzeye bağımlı biri *Mus musculus* tipi akciğer kanseri LAK hücre hattı diğeri ise HUVEC hücre hattı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.6.3.1.1. Hücre Hattı Özellikleri

LAK hücre hattı, Cell Lines Service (CLS GmbH, Eppelheim, Germany, <http://clsgmbh.de>) firmasından ticari olarak satın alındı. *Mus musculus* cinsinin C57BL türüne ait akciğer kanseri hücresidir. İkiye katlama süresi 21 saattir. Gelişim durumuna göre süspanse veya yapışkan-yüzeye bağlı (adherent) özellik gösterir (62).

HUVEC hücre hattı, insan göbek kordonundaki damarların endotelyumundan türetilen hücrelerdir (107). Endotel hücreleri, kan damarlarının içini kaplar ve vasküler homeostazın kritik bir bileşenidir. Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşturulduğu süreç olan anjiyogenezde kilit oyuncular. Endotel hücrelerinin fonksiyon ve patolojisinin (örneğin; anjiyogenezis) incelenmesi için bir laboratuvar model sistemi olarak kullanılır (108). Bu hücre hattı, Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz'ın hediyesidir.

3.6.3.2. Hücre Kültürünün İdame Ettirilmesi, Pasajlanması, Dondurulması-Çözülmesi ve Hücre Sayımı İşlemleri

LAK hücre hattı için RPMI-1640 ortamında (Lot No: 1644425 ;Gibco) 2 mM L-glutamin (Lot No:1661077; Gibco), %10'luk v/v FBS (Lot No:07Q6640K; Gibco), kontaminasyon oluşumunu engellemek için %1'lik v/v Penisilin/Streptomisin (Lot No: 1647113; Gibco) ve %1'lik v/v Amfoterisin B (Lot No:45083TB22, Bristol-Myers Squibb) birleşimi kültür ortamı olarak kullanıldı. HUVEC hücre hattı için DMEM-F12 ortamı kullanılmıştır ve diğer kullanılan ek yardımcı bileşenler aynı oranda aynen HUVEC hücre hattı için de kullanılmıştır. Hücreler 25 cm²'lik hücre kültür flasklarına ekildi. 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilerek canlılıklarının devamı sağlandı. Flask yüzey alanının yaklaşık %80'ini kaplayana kadar her iki günde bir ortamı

değiştirildi. Daha sonra yeterli alanı kaplayan hücrelerin çoğaltılması amacıyla pasajlama işlemi uygulandı. Pasajlama işlemi ile hücreler 75 cm²'lik flasklara (Lot No: 22614006, Corning) alınıp çoğaltıldı (109).

Pasajlama işlemi, steril pipetler (5 mL-10 mL) kullanılarak flask içindeki ortam uzaklaştırıldı. Hücreleri yapışıkları hücre kültür kabının yüzeyinden kaldırmak amacıyla 75 cm²'lik flask için 5 mL, 25 cm²'lik flask için 2 ml Tripsin-EDTA çözeltisi ilave edildi. Flasklar 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 2-3 dakika hücreler yüzeyden kalkana dek bekletildi. Daha sonra hücrelerin tamamen flask yüzeyinden ayrıldığından emin olmak amacıyla mikroskopta kontrol edildi. Hücreler flask yüzeyinden ayrıldığında Tripsin-EDTA'nın aktivasyonunu durdurmak için kullanılan Tripsin-EDTA hacminin 2 katı kadar ortam flask içine ilave edildi. Flask içindeki hücre içeren süspansiyon 15 mL'lik yada 50 mL'lik falkon tüpüne aktarıldı. 5 dakika santrifüj edildi ve daha sonra üst faz atıldı. Tüpün konik kısmında birikmiş olan hücre peleti üzerine 10 ml kültür ortamı ilave edildi. Pipetaj ile hücreler süspanse edildi. Her flaskta 2 mL süspanse haldeki kültür ortamı ve hücreler paylaştırılarak üzerlerine 5 ml ortam eklendi. Çoğalması için 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirildi.

Hücre dondurma işlemleri, %0,25 Tripsin-EDTA (Lot No: 1741240; Gibco) kullanılarak yapıldı. Tripsin-EDTA etkisiyle flask yüzeyinden kaldırıldıktan sonra hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen pellet üzerine %5'lik DMSO içeren dondurma ortamı eklenerek resüspanse edildi. 2 ml'lik steril cryovial üzerine tarih, hücre hattı ismi, pasaj no, kişi adı yazılmış hücre dondurma tüplerine dağıtıldı. Hücreler, önce 2-3 saat -20°C'de bekletildi daha sonra -80°C'de derin dondurucuda depolandı (109).

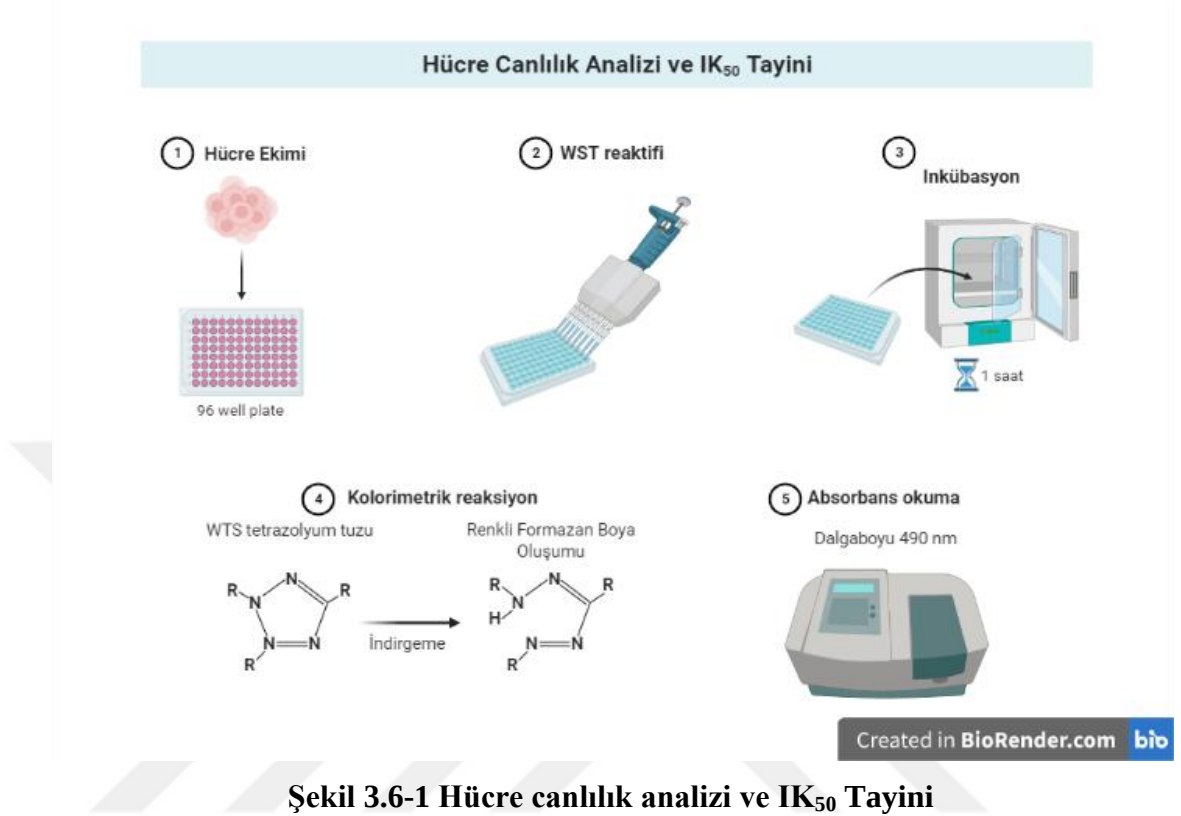
Çözme işlemleri, kabin içinde steril ortamda kriyovial üzerine tarih, pasaj no, hücre hattı ismi ve kişi adı yazıldı. Daha önce hazırlanmış kültür ortamından 25 ml flask içine 5 ml konuldu. Hücreler -80°C'den çıkarılarak hızlı bir şekilde 37°C' ye getirilmiş olan su banyosunda çözüldü. Hücre dondurma tüpünün dış kısmı steril edildikten sonra kabinet içine alındı. İçindeki hücre süspansiyonu hazırlanmış olan flask içine ilave

edildi. Flask 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilerek kültürün sürdürülmesi sağlandı (109).

Hücre sayımı, Thoma lamı kullanılarak yapıldı. Santrifüj sonrası elde edilmiş olan pelet 5 mL ortam ile resüspanse edildi. 1:1 (v/v) oranında tripan mavisi ile birleştirildi. Thoma lam ve lamelin arasına 10 µl tripan mavisi ile boyanmış hücre süspansiyonu aktarıldı. 16 büyük kareyi barındıran Thoma lamının yüzeyinde tüm hücreler sayıldı (110). Thoma lamının her iki tarafındaki karelerde sayılan hücrelerin sayısının ortalaması hesaplandı ve ortalama hücre sayısı x Dilüsyon Faktörü x 10⁴ formülü ile 1 ml’deki hücre sayısı belirlendi (109).

3.6.3.3. Hücre Canlılık Testi ve IK₅₀ Tayini

Hücre Sayım Kiti-8 (CCK-8), suda çözünürlüğü yüksek tetrazolyum tuzu kullanarak hücre canlılığı belirlemek için çok uygundur. WST-8 [2- (2-metoksi-4-nitrofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disülfofenil) -2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu] bir elektron aracı varlığında indirgeme üzerine suda çözünür bir formazan boyası üretir (111). Bu formazan solüsyonu 490 nm’de pik absorbans veren güçlü bir renk oluşturur ve mikropłaka okuyucuda absorbansı ölçülebilir.



Şekil 3.6-1 Hücre canlılık analizi ve IK_{50} Tayini

Her iki kimyasal ajan için inhibisyon konsantrasyon (IK_{50}) dozu bulmak için literatür taraması yapıldı. Dosetaksel (DTX) için kontrol, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 64, 96 ve 128 μM dozları belirlendi. Ayrıca 2. çalışma grubu olarak kontrol, 1, 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 125, 150 ve 200 μM dozları da çalışıldı. Deguelin (DEG) için ise 5, 10, 20, 40, 80, 100, 160, 320, 640 ve 1280 nM olarak dozlar çalışıldı. 96-well plate'in kuyucuklarına 200 μL ortam içinde 5×10^3 hücre ekimi yapıldı ve ekim yapıldıktan 24 saat sonra dozlar uygunlandı. 48 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını ölçmek için 10 μL Cell Counting Kit-8 (Biotool, Germany) pipetlendi ve 2 saat $37^\circ C$ 'de %5'lik CO_2 ortamda inkübasyona bırakıldı. 490 nm'de ölçüm elde edilerek IK_{50} değerleri bulundu. HUVEC hücre hattı için ayrıca IK_{50} hesaplanmamıştır. Sadece anjiyogenezis metodunda LAK hücre hattında elde edilen dozlar denenmiştir.

3.6.3.4. Hücre Göçü Analizi

μ -Dish^{35mm,low} Culture-Insert (Lot No:150318/1; Ibidi GmbH, Munich, Germany) ürünü ve ilgili deney protokolü kullanıldı. Silikon kuyucuklar içine 70 μ L ortam içinde 35×10^4 hücre ekimi yapıldı. 24 saat 37°C’de %5’lik CO₂ ortamında inkübe edildi. 24 saat sonunda silikon yavaşça kaldırıldı (112). Kontrol grubu için 1 mL ortam ve diğer gruplar için ise yine 1 mL ortam içinde hesaplanan IK₅₀ dozları uygulandı. Doz uygulandıktan sonra 0., 3., 5., 7., ve 24. saatin görüntüleri (Olympus CKX41, Tokyo, Japan) elde edildi. Her grup için; I.kontrol, II.DTX, III. DEG ve IV. DTX+DEG (IK₅₀/2) 3 farklı ölçüm tekrarı yapıldı. Görüntülerin eldesinde 5X ve 10X objektif kullanıldı. Görüntülerin elde edildiği skala 200 μ m’dir.

3.6.3.5. Anjiyogenezis Metodu

μ -Slide Angiogenesis Plate^{3x5} (Lot No: 141106/2; Ibidi GmbH, Munich, Germany) ürünü ve ilgili deney protokolü kullanıldı. Deney planına göre her bir kuyucuğa 10 μ L Matrigel Matrix (Lot No:4174067; Discovery Labware Inc, Corning, Bedford, MA, USA) pipetlendi. Matrigel’in polimerizasyonu (jel oluşumu) için inkübatörde 37°C’de 60 dakika bekletildi ve sonrasında her kuyucuğa 10^4 hücre ekilecek şekilde 50 μ L ilaçlı ya da ilaçsız ortam (kontrol) içinde ekimi yapıldı (113). Her grup için; I. Kontrol, II. DTX, III. DEG ve IV. DTX+DEG (IK₅₀/2) 3 kuyucuk tekrarı yapıldı. Ekim yapıldıktan sonra hemen ilk görüntüler elde edildi. Plate, 12 saat boyunca inkübatörden çıkarılmadı. 16. 24. ve 84. saat görüntüleri alındı. Görüntülerin eldesinde 5X ve 10X objektif kullanıldı. HUVEC hücre hattında, LAK hücre hattından elde edilen IK50 değerleri kullanılmıştır.

3.6.3.6. Görüntü Analizi

ImageJ v.1.51i (NIH, Bethesda, Maryland, USA; <https://imagej.nih.gov/ij/>) açık kaynak kodlu (open source) program kullanılarak görüntü analizleri yapılarak sayısal veri elde edildi. Cell Migration Assay analizi için ImageJ üzerinde çalışan “MRI Wound Healing Tool” (<http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej->

[macros/wiki/Wound Healing Tool](#)) makro yazılımı ile Ibidi μ -dish (35mm, low) Culture-Insert ürününde oluşturulan aralığın (gap, scratch) hücrelerin zamana bağlı olarak göç etmesiyle aralığın alanının ve ilaç uygulanan gruplarda hücrelerin öldüğü alanlarda dahil edilerek hesaplama yapıldı ve pixel birim üzerinden gruplar arası karşılaştırmalar yapıldı.

Angiogenesis assay analizi için ImageJ üzerinde çalışan “Angiogenesis Analyzer” (<http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ&lang=en>) makro yazılımı ile μ -Slide Angiogenesis Plate^{3x5} ürünü kullanılarak Matrigel içinde oluşan tube formasyon oluşumunu analizlemek için kullanıldı. Kullanılan makronun ölçüm parametreleri ve çıktıları(http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ&lang=en&artpage=6-7#outil_sommaire_5) istatistiksel analiz için değerlendirildi. Her grup için; I. kontrol, II. DTX, III. DEG ve IV. DTX+DEG (IK₅₀/2) 3 farklı görüntüden hesaplama yapıldı.

3.6.3.7. Akım Sitometri ile Apoptozis Tayini

Bu çalışmada apoptozis analizi BD Pharmingen firmasından temin edilen AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit I ile yapıldı. Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) vardır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne yer değiştirirler. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı, apoptotik hücre ölümünün erken olduğu zamanlarda meydana gelir. Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine doğru yer değiştiren fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenip apoptotik hücre tespit edilebilir hale gelmiş olur. FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri cihazı ile ölçülür. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için yanlış apoptozis sonuç vermemesi için ikinci boya olarak propidyum iyodür (PI) eklenir. Annexin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan PI (red fluorescence) ile boyanma farklılığına göre hücreler canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-

), geç apoptotik hücreler (FITC+PI+) ve nekrotik hücreler (FITC-PI+) birbirinden ayrımlanır (<http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/556547.pdf>) ve dört gözlü pencerede analitik bölgelere göre analiz sonuçları gösterilir.

LAK hücreleri Trypsin-EDTA czeltisi (%0,025) ile kültür flaskından kaldırıldı. Hücre süspansiyonu tripan blue sayım yöntemi ile Thoma lamında sayılarak 6'lı well-platelerin her bir kuyucuğuna 50.000 hücre olacak şekilde ve toplam hacim 3 ml olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra 3 ml medium içinde Kontrol, Dosetaksel, Deguelin IK_{50} dozları ve Kombinasyon ($IK_{50}/2$) kuyucuklara verildi ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 6'lı well-platelerdeki ortamlar çekilip 15 ml'lik falkon tüplere aktarıldı. Kuyucuklara 1000 μ l tripsin eklenerek hücreler kaldırıldı. Ekleğimiz tripsinin iki katı ortam eklenerek tripsin inaktivasyonu yapıldı ve hücre süspansiyonu çekilip 15 ml'lik falkon tüplere ilave edildi. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı ve supernatant uzaklaştırıldı. Her tüpe 400 μ l binding buffer eklendi ve resüspanse edildi. Tüplere önce 5 μ l AnnexinV daha sonra 5 μ l PI eklendi. Tüpler karanlık ortamda 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası tüplere 400 μ l binding buffer eklendi. BD FACSCanto II flowcytometer cihazı (ift lazerli) ile erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ve canlı hücre oranları değerlendirildi.

3.6.3.8. Akım Sitometri ile Hücre Döngüsü Analizleri

Bu çalışmada hücre döngüsü analizi "BD Cycle Test Plus DNA Reagent Kit" ile yapıldı. Bu analiz, hücrelerin hücre döngüsünün hangi aşamasında olduğunun belirlenmesi için yapılan işlemdir. PI boyasının hücrelerin DNA'sına bağlanıp ışıma vermesi temeline dayanmaktadır. Bağlanan boya miktarı her bir hücredeki toplam DNA miktarı ile orantılıdır (<http://www.bdbiosciences.com/ds/is/tds/23-2923.pdf>).

LAK hücreleri Trypsin-EDTA czeltisi (%0,025) ile kültür flaskından kaldırıldı. Hücre süspansiyonu tripan blue sayım yöntemi ile Thoma lamında sayılarak 6'lı well-platelerin her bir kuyucuğuna 50.000 hücre olacak şekilde ve toplam hacim 3 ml olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra 3 ml medium içinde Dosetaksel, Deguelin IK_{50} dozları ve Kombinasyon ($IK_{50}/2$) kuyucuklara verildi ve 48 saat

inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 6'lı well-platelerdeki ortamlar çekilip 15 ml'lik falkon tüplere aktarıldı. Kuyucuklara 1000 µl tripsin eklenip hücreler kaldırıldı. Eklediğimiz tripsinin 2 katı ortamla tripsin inaktivasyonu yapıldı ve hücre süspansiyonu çekilip 15 ml'lik falkon tüplere ilave edildi. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 1 ml tampon solüsyonu (dimetilsülfoksit içeren sükroz-sitrat tamponu) eklendi ve hücreler resüspanse edildi (yıkama işlemi). 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandıktan sonra boyama işlemine geçildi ve bu aşamadan sonraki işlemler +4°C yüzey üzerinde gerçekleştirildi. Yıkama işlemlerinin ardından tampon solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 250 µl solüsyon A (Tripsin içeren sitrat tamponu) her tüpe eklendi ve el ile hafifçe çalkalandı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra solüsyon A uzaklaştırılmadan 200 µl solüsyon B (Tripsin inhibitörü ve RNAz içeren sitrat tamponu) tüpelere eklendi ve el ile hafifçe çalkalandı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. +4°C'de muhafaza edilen solüsyon C (propidium iyodür boyama solüsyonu) her tüpe 200'er µl olacak şekilde eklendi. +4°C zemin üzerinde 10 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Solüsyon C eklendikten sonra 3 saat içerisinde örnekler BD FACSCanto II flowcytometer (çift lazerli) cihazında analiz edildi. G0/G1, sentez fazı ve G2+Mitoz fazına ait hücreler ModFitLT3.2 programı kullanılarak yüzde (%) olarak değerlendirildi.

3.6.3.9. Deney Hayvanı Modeli ve Deneklerin Bakımı

Çalışmada, *Mus musculus* cinsine ait C57BL/6 türü dişi 7-8 haftalık ortalama 20 g ağırlığında fareler kullanılmıştır. 3R+R kuralı göz önünde bulundurularak hayvan refahı her aşamada düşünülerek deney yapılmıştır. Fareler 21-22°C oda ısısında, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık dönemler şeklinde ayarlanmış ortamda serbest su ve gıda (pellet yem) sağlanarak; stres ve gürültüden izole bir şekilde barındırıldı.

Tümör modeli, deneğe i.p ve s.c olarak 2 farklı bölgeye ve her bölgeye $1,75 \times 10^6$ LAK hücresi enjekte edilerek 1 hafta süre ile beklendi ve 8. günden itibaren gün aşırı olacak şekilde toplamda 6 defa (porsiyon) tedavileri uygulandı. 21. gün sakrifikasyonları gerçekleştirildi. Deney planı 3.7'de görsel olarak açıklamalı gösterilmiştir.

Tümör gelişiminin seyri aşağıdaki gibi dört klinik safhaya bölündü; (114)

0-7 gün: non-metastatik evre,

8-14 gün: mikrometastatik evre,

15-21 gün: makrometastatik evre ve

21 gün sonra: kaşektik evredir.

Denekler 21. gün sakrifikasyon yapıldığı için kaşektik evrenin gözlenmemesi beklendi.

3.6.3.10. Tedavi Protokolü ve *in vivo* Deney Modeli için Dozların Belirlenmesi

Tedavi rejiminin, hücre kültüründe olduğu gibi 48 saatlik yani 2 gün arayla yapılması uygun görüldü. Bu şekilde yapılmasının nedeni, periyotlar halinde uygulanacak olan toplam dozun porsiyonlanarak kemoterapiye bağlı toksik ve yan etkileri olabildiğince minimize etme ve tedaviden maksimum başarı elde etme amacıdır (115, 116). Sürekli düşük dozlu (metronomik) sitotoksik ilaç uygulamasının tek bir yüksek doz kemoterapiye göre daha iyi tolere edilebileceği ve daha fazla antitümör etkisine sahip olabileceği bildirilmiştir (117–119). Örnek metronomik doz belirleme formülü;

$$\text{Toplam Doz} = [\text{Porsiyon Sayısı} \times (\text{İlaç Doz Birimi} / \text{Denek Ağırlığı (kg)} / \text{günlük})]$$

şeklinde olabilir. Çalışmada, tedavi gruplarına metronomik protokol uygulanmıştır. Belirlenen dozlar tedavi gruplarına intraperitoneal (i.p) olarak uygulanmıştır (87, 120–122).

3.6.3.10.1. Dosetaksel Dozu Belirleme

LAK hücre hattında elde edilen etkin doza bağlı yapılmış *in vivo* deney modeline literatür taramasında bulamadığımız için DTX'in sadece *in vivo* deney çalışmaları baz alınarak kendi çalışmamıza uyarladık. Öncelikle toplam doz literatürden 116 mg/kg olarak alınmıştı; (85, 87) ve planladığımız tedavi rejimine uygun olarak 5 deneğimize

uyguladığımızda, deneklerimiz 12. günden itibaren gün aşırı olacak şekilde ex oldular ve bu 5 deneği literatüre göre sözde toksik olmayan doza bağlı olarak kaybettik. Bu sonuçtan elde ettiğimiz sağkalım oranları ile tekrar doz çalışması yaptık ve 60 mg/kg olarak belirledik. Bu dozun tedavide optimum doz aralığında olduğunu başka bir yayın ile destekledik (123). Ek denek talebinde bulunarak grubu tekrarladık ve 10 mg/kg/günlük dozda 6'şar porsiyon olacak şekilde tedavileri gerçekleştirildi. 2 denek ex oldu ve genel sağkalımda değerlendirildiler.

3.6.3.10.2. Deguelin Dozu Belirleme

Çalışmamızda, LAK hücre hattında etkin doz IK_{50} 25,8 nM olarak bulunmuştur. Hu ve ark. LAK hücre hattının VEGF-D yüksek ekspresyona sahip hali için indüklenmiş modelini kullanmışlar ve bu geliştirdikleri hücre hattı üzerinde 48 saatlik IK_{50} dozunu 100 nM olarak bulmuşlardır (124). İndüklenmemiş normal hücre hattına göre yaklaşık 4 katı kadar yükseklikte fark bulunmuştur. Burdan yola çıkarak, yine aynı Hu ve ark.'nın makalesinde yer alan aynı modele (LAK&C57BL/6) metronomik protokole bağlı kalarak Deguelin'i 48 saat aralıklarla 4 mg/kg/günlük ve 6'şar porsiyon düzeninde toplamda 24 mg/kg olarak uygulamışlardır. Hücre hattından elde ettiğimiz 4 kat farkı bu total doza bölerek kendi çalışmamızda uygulayacağımız 6mg/kg olan toplam doz bulunmuş oldu. Çalışmamızda, metronomik protokole bağlı kalarak 1mg/kg/günlük olmak üzere 6'şar porsiyonla i.p enjekte (26 G insülin iğnesi) ederek tedavi protokolü uygulandı.

3.6.3.11. Denek Ağırlıkları

Deneklerin ağırlıkları, deney başında ve sakrifikasyon aşamasının hemen öncesinde ölçülmüş gram (g) birimi ile kayıt altına alınmıştır.

3.6.3.12. Deneklerin Sağkalım Analizi

Deneklerin sağkalım analizlerinin yapılabilmesi için günlük laboratuvar ziyaretleri yapılmıştır ve ex olan deneklerin ex tarihi ve beraberinde ne kadar süre yaşadıkları belirlenip kayıt altına alınmıştır. Kaplan-Meier sağkalım analizi yapılmış ve log rank (Mantel-Cox) testi ile gruplar arasındaki anlamlılık incelenmiştir (125).

3.6.3.13. Sakrifikasyon Aşaması ve Yapılan İşlemler

Tablo 3.6-3 Sakrifikasyon Aşaması ve Yapılan İşlemler

Yapılan İşlemler		Malzemeler
1	Farenin canlı ağırlığı için tartım yapıldı.	Tartım cihazı, not defteri
2	Fare eter desikatörüne yerleştirildi ve anesteziye girmesi sağlandı.	Eter, desikatör, idame için burun konisi
3	Farenin abdominal ve dorsum (kitlenin olduğu alan) bölgesi jilet ile tıraşlandı.	Sıvı sabun, tek bıçaklı jilet
4	Fare, ventrodorsal pozisyonda flaster ya da steril iğne ile sabitlendi.	Flaster, enjektör iğnesi
5	Tıraşlanmış abdominal bölge önce baticon ile 3 defa, sonra alkolle bölge antisepsisi sağlandı.	Baticon, alkol, sponge
6	Antiseptik bölgeye steril cerrahi örtü serildi.	Cerrahi örtü
7	Cerrahi set steril açıldı.	Steril cerrahi set

8	Abdomen insizyonundan sonra makroskopik bakı ile organlar incelendi. Anormal görünümde kayıt edildi.	Not defteri
9	Kan alma işlemi ve hipovolemik şok; thoraks açıldı ve sol ventrikülden kan alındı.	2 mL Enjektör, Siyah uç, Tüp (Vacutainer-Sarı&Kırmızı), Sponge
10	Abdominal bölgedeki organlar diseke edilerek, eksize edilir. (karaciğer, dalak, pankreas, uterus, ovaryum, böbrekler, mide, barsak) Tümör dokusu alındı ve elektronik kumpas ile boyutları ölçüldü.	Cerrahi set, sponge, formaldehit, PBS, doku kapları, etiketler
11	Thorakal bölgedeki organların eksizyonu sağlandı. (kalp, akciğer, timus) sonra femur eksize edildi.	Cerrahi set, sponge, formaldehit, PBS, doku kapları, etiketler
12	Fare dorsoventral pozisyona getirilerek, tıraş edilen bölgedeki kitle deri ile birlikte alındı.	Cerrahi set, sponge, formaldehit, PBS, doku kapları, etiketler

- Her deneğin fotoğrafı çekildi ve kayıt altına alındı.

3.6.3.14. Tümör Boyutlarının Hesaplanması

Ölçümler elektronik kumpas yardımı ile yapılmıştır. Tümör boyutu ve hacimsel dönüşümü aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır.

$$\text{Tümör Volümü (mm}^3\text{)} = (L \times W^2) / 2 \quad (126)$$

W: tümör genişliği (mm), L: tümör uzunluğu (mm)

3.6.3.15. Doku Homojenizasyonu

Dokular, -80°C'den oda sıcaklığı olan ortama getirildi. Dokular hassas tartı ile tartıldı ve ölçüm kaydedildi. Buzun üzerine cam petri kabına koyuldu ve tartılan dokular

bistüri ile parçalandı. Üzerine 400 µl RIPA lizis solüsyonu eklendi ve parçalama işlemine devam edildi. Parçalanmış dokular eppendorf tüpüne aktarıldı. 100 µl PBS petri kabında kalan doku parçalarına eklendi ve eppendorf üzerine aktarıldı. Kıyılmış doku içeren eppendorf tüpler buz kabı içine yerleştirildi ve sonikatör cihazı (Amplitude-genlik 30-40, Timer; 5 dk., Pulser; 0,5-1) ile dokular homojenize edildi. +4°C'de (buzdolabında) 10 dakika bekletildi. 19000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernetant kısmı başka bir temiz eppendorf tüpüne aktarıldı, etiketlendi-numaralandırıldı ve deney aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

3.6.3.16. TRIZOL ile RNA İzolasyon Protokolü

Hayvan doku örneklerinden (akciğer ve tümör) her grup için RNA izolasyonu “Trizol ile RNA izolasyonu” protokolü uygulanarak gerçekleştirildi. Trizol ile RNA izolasyonu protokolü aşağıda belirtilen sıra ile uygulandı (127).

- Bir önceki metotta -20°C'de 500 mL Trizol içerisinde saklanan örnekler derin dondurucudan çıkartılarak çözülmesi sağlandı ve oda sıcaklığında 10 dk. inkübasyona bırakıldı.
- 1,7 mL'lik mikrosantrifüj tüpleri içerisindeki homojenat üzerine 100 µl kloroform eklendi ve mikropipet yardımıyla pipetaj yapılarak oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edildi.
- İnkübasyon süresinin ardından tüpler +4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra tüpler içerisinde oluşan en üstteki renksiz/şeffaf faz mikropipet yardımı ile alınarak temiz ve steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Renksiz ve şeffaf bu faz RNA'nın bulunduğu fazdır.
- Toplanan bu fazın üzerine 500 µl izopropanol yavaş yavaş eklendi ve pipetaj yapıldı. Ardından örnekler 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- İnkübasyon süresinin ardından tüpler +4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.

- Santrifüj işleminden sonra tüpler içerisindeki süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 500 µl %70'lik soğuk etanol eklendi.
- Tüpler tekrar +4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve santrifüj işleminden sonra tüplerin içerisindeki süpernatant atıldı. Tüplerin kapakları açılarak ortamda kalan fazla alkolün buharlaştırılması sağlandı.
- Son olarak pelet üzerine 40 µl RNaz-DNaz içermeyen su eklenerek RNA'lar homojenize edildi ve -20°C'de analiz için muhafaza edildi.

3.6.3.17. RT-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Çalışmada ilgilenen sinyal yollarındaki (*Aktif kaspaz-3*, *Kaspaz-9*, *p53*, *HIF-1a*, *VEGF-A*) hedef genlerini belirleyebilmek, bu genlerin doz ve zaman bağımlı transkripsiyonel regülasyonlarını incelemek ve hedef gen regülasyonuna ilişkin kantitatif veriler elde etmek amacıyla qRT-PCR metodolojisinden yararlanıldı.

Tüm gruplara ait örneklerden RNA izolasyonu, The PureLink® RNA Mini Kit'i (12183018A, Invitrogen) kullanılarak kit protokolüne uygun olarak yapıldı (128).

Tüm gruplara ait deri örneklerinden elde edilen RNA'ların konsantrasyon tayini florometrik bir ölçüm yapmayı sağlayan Qubit-3.0 cihazı (Q33216 Invitrogen) ve Qubit RNA ölçüm kiti (Q32852, Invitrogen) kullanılarak yapıldı. Qubit RNA ölçüm kiti protokolünde öncelikle standart 1 ve 2 solüsyonları hazırlanarak ölçülecek böylelikle cihazda bir standart grafik eğrisi çizildi. Sonrasında total hacim 200 µL (199 µL kit bileşeni + 1 µL örnek) olacak şekilde örnekler Qubit 3.0 cihazında µg/µL cinsinden okutulacaktır. Kitin içerisindeki florometrik boyalar izole edilen örnekteki RNA'ya spesifik olarak bağlandığı için karışımdaki saf RNA miktarı ölçüldü.

Elde edilen RNA'lardan hemen The High Capacity RNA-to-cDNA™ (4368814, Invitrogen) kiti kullanılarak cDNA çevirimi gerçekleştirildi (129). Kit protokolüne göre; kitin içerisindeki 2× RT master mix kullanılarak 20 µL hacimde reaksiyon kuruldu ve her reaksiyon başına 2 µg total RNA eklenerek 25°C de 10 dk Step 1, 37 °C de 120 dk Step 2 , 85 °C de 5 dk Step 3, 4°C de Step 4 programı uygulanarak tüm RNA örneklerinden cDNA çevirimi yapıldı. Elde edilen cDNA'lar PCR reaksiyonlarında

eşit konsantrasyonlarda kalıp olarak kullanılarak 20 µL hacimde (10 µL Power Sybergreen Master Mix (2.0×), 1µL Assay Mix (20.0×) ve 7µL H₂O) reaksiyon karışımı içerisine eklendi ve amplifikasyonun sonunda gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerinin miktarını kat cinsinden; $(130)^{2^{(-\Delta\Delta CT)}}$ belirlemek amacıyla β -aktin (ACTB, Mm02619580_g1, TaqMan, Thermo Fisher Scientific) referans geni kullanılarak relatif kantitasyon analizleri StepOnePlus RT-PCR (4376600 Applied Biosystems) cihazı ile cihazda daha önce optimizasyonu yapılmış programa uygun olarak gerçekleştirildi.

Bu metodoloji ile aktif *kaspaz-3* (Mm01195085_m1, TaqMan, Thermo Fisher Scientific), *Kaspaz-9* (Mm00516563_m1, TaqMan, Thermo Fisher Scientific), *TP53* (Mm01731287_m1, TaqMan, Thermo Fisher Scientific), *HIF-1a* (Mm00468869_m1, TaqMan, Thermo Fisher Scientific), *VEGF-A* (Mm00437306_m1, TaqMan, Thermo Fisher Scientific) genlerinin transkripsiyonel seviyelerindeki farklılıklar belirlendi ve elde edilen veriler diğer sonuçlar ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

3.6.3.18. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Dokular %10'luk tamponlanmış nötral formalin içerisinde 3 gün boyunca fikse edildi. Ardından rutin doku takip işlemi yapıldı. Fiksatifin uzaklaştırılması için 1 gece akarsu altında bekletildi. 60°C'de etüvde 20'şer dakika sırasıyla %70, %80, %96 artan etil alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra 60°C'lik etüvde 20'şer dk. dört değişim asetonda dehidrate edildi. Şeffaflandırma işlemi için 60°C'lik etüvde 30'ar dakika iki kez ksilolde bekletildi. Ardından, 60°C'lik etüvde iki değişim halinde 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlanarak parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo 1). Rotary mikrotom (RM 2255, Leica, Germany) aracılığı ile 5 µm'lik kesitler alındı.

Tablo 3.6-4 Rutin Doku Takibi

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	%10'luk Formaldehit	3 gün
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 Gece
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	20 Dakika
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	20 Dakika
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 2	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 3	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 4	20 Dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 1	30 Dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 2	30 Dakika
	Parafin 1	60 Dakika
	Parafin 2	60 Dakika
Bloklama	Parafin	

3.6.3.18.1. Hematoksilen-Eozin boyaması

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 2 saat 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dakikasını 60°C'lik etüvde, 20'şer dakika 2 değişim ile oda sıcaklığında olmak üzere ksilolde bekletildi. Daha sonra rehidratasyon işlemi için %96'dan %70'e kadar azalan alkol serilerinden geçirildi. Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Ardından akan suda 10 dakika yıkama işlemi ile mordanlanması sağlandı. Genel sitoplazmik yapının gösterimi için 2 dakika Eozin boya (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Sonrasında, sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilolde bekletildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapama işlemi yapıldı (131) (Tablo 2).

Tablo 3.6-5 Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	120 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2 (Oda Isısında)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama

Rehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 70 Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 Dakika
Yıkama	Akarsu	10 Dakika
Boyama	Eosin	2 Dakika
Yıkama	% 70 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.19. Avidin-Biyotin-Peroksidaz Tekniği ile İndirek İmmünhistokimyasal Yöntem

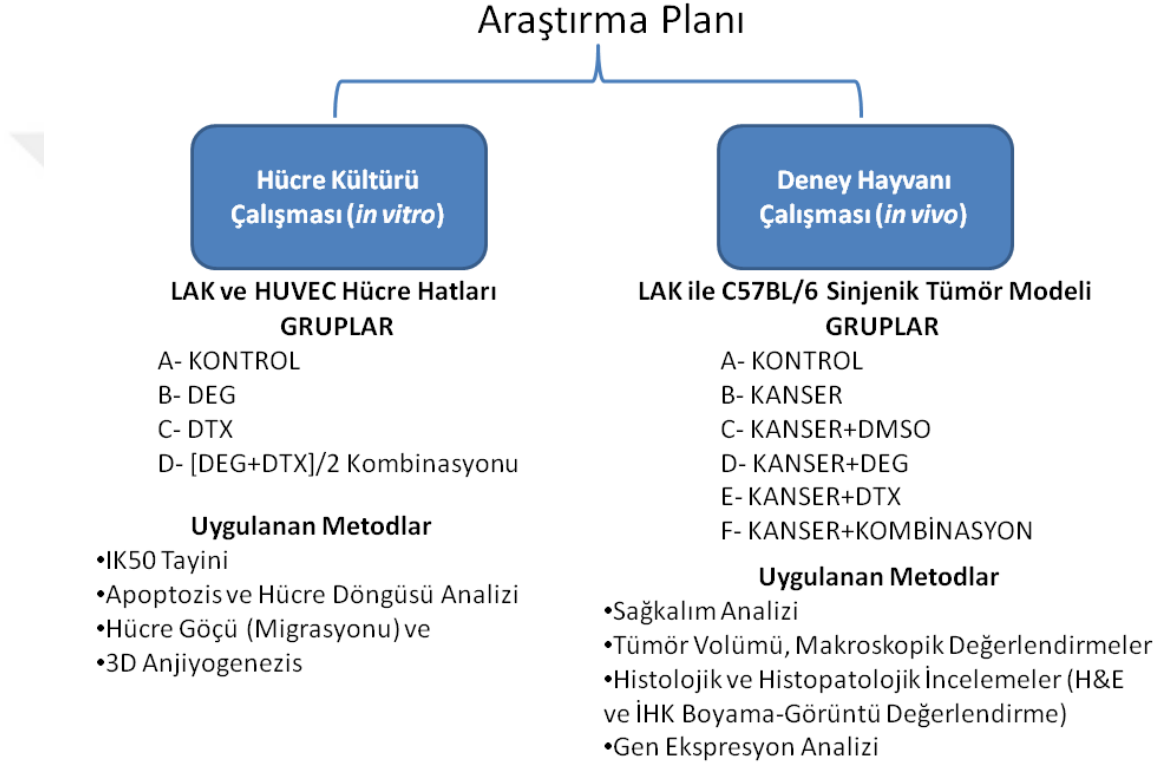
Formalin ile tespit edilmiş parafine gömülmüş dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak poli-lizin kaplı lamlar üzerine alındı. Kesitler, deparafinizasyon için 1 gece 60 C etüvde bekletildi. Deparafinizasyon işlemine takiben kesitler iki değişim ksilol ile muamele edildi. Rehidratasyon için azalan alkol serilerinden (%96-90-80-70-60) geçirildi. Distile su ile 10 dakika yıkandıktan sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. Formaldehitin kapattığı reseptör bölgeleri açmak için antijen retrieval işlemi uygulanarak proteinaz K ile 37 C'de 15 dakika muamele edildi. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'l k H₂O₂ uygulandı. PBS ile yıkanan (3 defa 5'er dakika) kesitler, özgün olmayan reseptör bağlanmaları bloke etmek için bloklama solüsyonu ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından, primer antik rlar aktif kaspaz-3 (1:100, AB3626 ,Chemicon International), kaspaz-9 (1:100, sc-56076, Santa Cruz), p53 (1:100, sc-98, Santa Cruz), HIF-1a (1:100, sc-13515, Santa Cruz). VEGF-A (1:100, sc-7269, Santa Cruz) ile 1 gece +4 C'de muamele edildi. PBS ile 3 defa yıkanan kesitler biotinle işaretlenmiş hidrojen peroksidaz sekonder antikoru ile 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. PBS ile yıkama işleminden sonra kesitlere 30 dakika streptavidin uygulandı. İmm noreaktivitenin görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile 5 dakika boyanan kesitler, artalan boyaması Mayer's hematoksilen ile sağlandı. %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler, 30 dakika ksilen ile şeffaşlaştırma işleminden sonra entellan ile kapama işlemi yapıldı (132).

3.6.3.20. İmmünohistokimyasal İncelemelerin Değerlendirilmesi

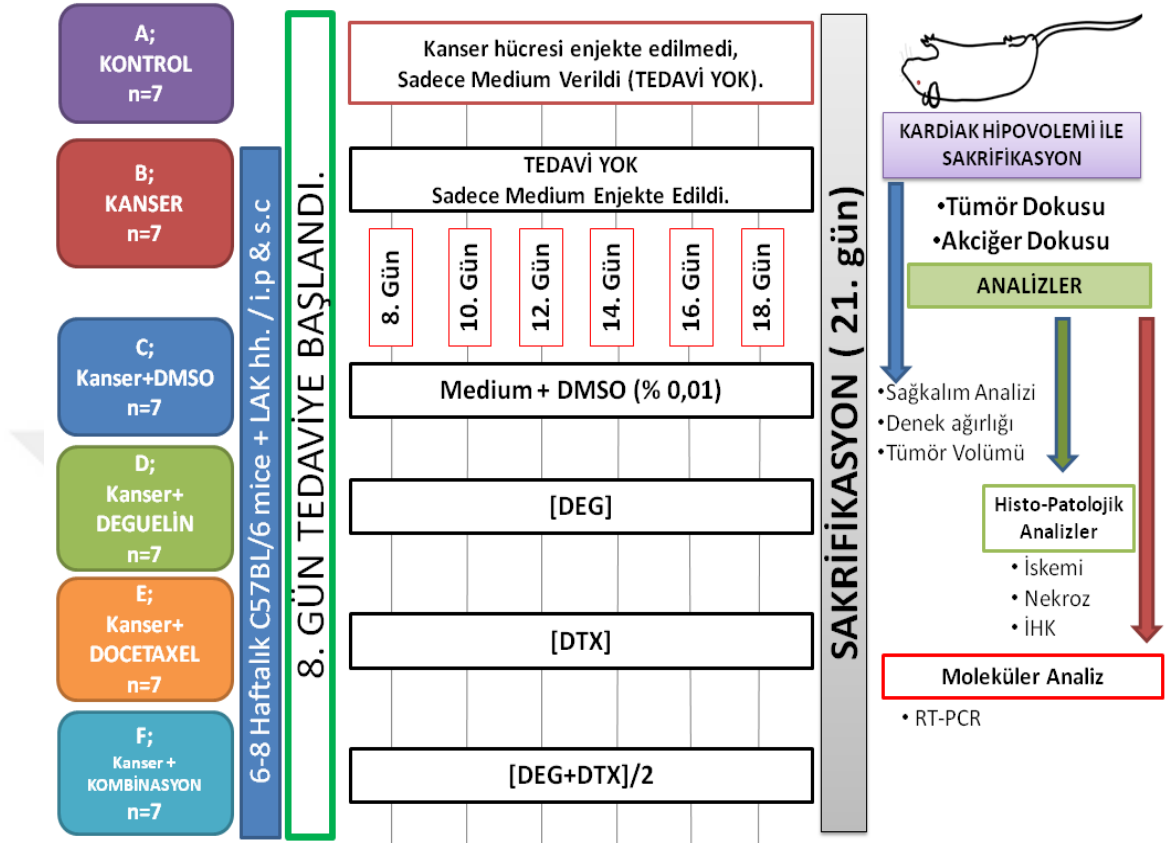
İmmünohistokimyasal incelemelerde Image Tool programı (UTHSCA Image Tool for Windows version 3.0 software) kullanılarak x40'lık ve x100'l k büyütmede (Olympus BH- 2 Tokyo, Japan) Aktif Kaspaz-3 (1:100, AB3626 ,Chemicon International), kaspaz-9 (1:100, sc-56076, Santa Cruz), p53 (1:100, sc-98, Santa Cruz), HIF-1a (1:100, sc-13515, Santa Cruz). VEGF-A (1:100, sc-7269, Santa Cruz) primer antikör boyaması ile akciğer ve tümör dokusunda pozitif boyanma immünreaktivitesi

semikantitatif olarak; (132) boyanma yok: 0 (-), zayıf boyanma: 1 (+), orta boyanma: 2 (++) , şiddetli boyanma: 3 (+++) şeklinde değerlendirildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



Şekil 3.6-2 Araştırma planı



Şekil 3.6-3 Deney Hayvanı Model Planı ve Dizaynı

İş Planı (2016-2017)	2016												2017											
	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık
Hücre Kültürü çalışmaları (IKSO Tayini)																								
Apoptosis ve Hücre Döngüsü Analizleri (Akım Sitometri)																								
Hücre Göçü ve Anjiyogenezis Analizleri																								
Deney Hayvanı Modeli (pilot Çalışma)																								
Deney Hayvanı Modeli Görüntü İşleme & İstatistik Analiz																								
İş Planı (2018-2019)	2018												2019											
Doku Homojenatların Eldesi																								
Homojenatların Hazırlanması																								
Doku Kesitlerinin Çalışılması (H&E, İHK)																								
Gen Ekspresyonu Analizi																								
Verilerin Eldesi & İstatistik Analiz-Tez Yazımı																								
İş Planı (2020-2021)	2020												2021											
Verilerin Eldesi & İstatistik Analiz-Tez Yazımı																								
Tez Savunması																								

Şekil 3.6-4 Araştırmanın takvimi

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler Rstudio programı (v.0.98.501) ve R script dili, SPSS 25.0 ve GraphPad 5.0 yazılımları kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) kullanılarak incelendi. Tanımlayıcı istatistikler; değişkenlerin ortalama $\pm$ standart hata değerleri verilerek yapılmıştır. Değişkenlerin normal dağılım göstermediği durumda bağımsız grubun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İki'den fazla bağımsız grubun karşılaştırılmasında ise tek yönlü ANOVA ve beraberinde gruplar arası anlamlı çıkan karşılaştırmalarda ikili karşılaştırmalar için post hoc testlerden Sidak analizi uygulanmıştır. Patoloji skorlarını ve gen ekspresyon seviyelerini değerlendirmek için gruplar arası karşılaştırmada Kruskal-Wallis ve beraberinde post hoc test Dunn's testi kullanılmıştır. Kaplan-Meier sağkalım analizi ve gruplar arası farkı değerlendirmek için Log-Rank (Mantel-Cox) testi uygulandı. p-değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmanın, hem hücre hattı çalışması hem de deney hayvanı modeli ile birlikte 2 basamağı olduğu için bütçeye ve zamana bağlı olarak en uygun metodlar belirlenerek çalışma yapıldı. Kanseri çalışması olduğu için deney hayvanı aşamasında denek sayısının özellikle kanser ve tedavi gruplarında sayıca yüksek tutulması gereklidir. Çalışmada doku yetersizliği nedeni ile bazı metodlar (oksidatif stres vb.) çalışılamamıştır. RT-PCR analizinde cihazın deney esnasında arıza yapması nedeniyle akciğer dokusuna ait her gruptan bir dizi örnek çalışılamamıştır. Gelecekte farklı bir proje ile bu araştırmada yer almayan farklı metodlar (konfokal görüntüleme, tek hücre sekanslama ve RNA analizi, western blot veya ELISA) ile daha detaylı apoptozis yolları, anjiyogenezis, kanser kök hücre tespitine yönelik çalışmalar yapılabilir.

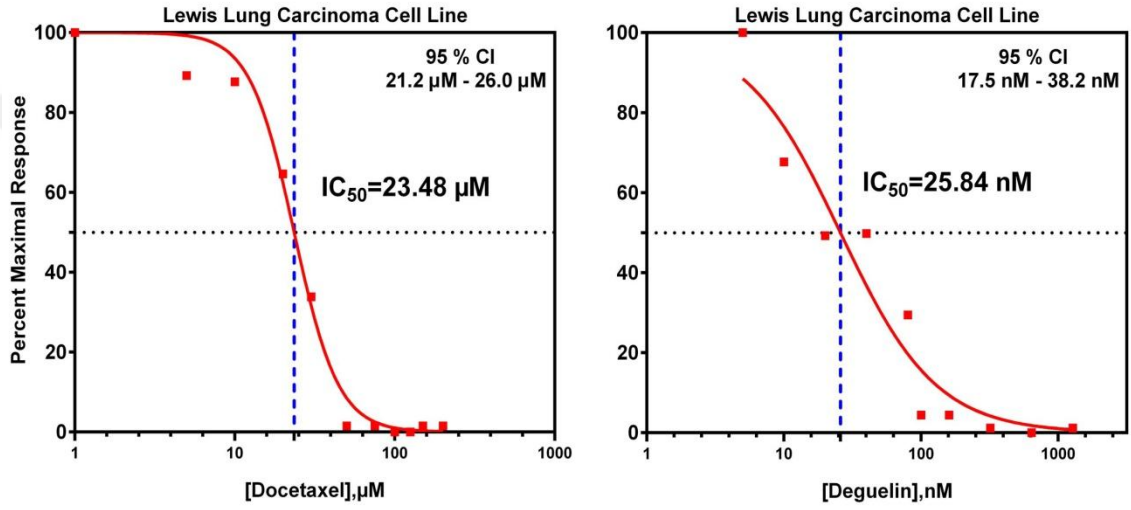
3.10. Etik Kurul Onayı

DEÜ HADYEK; Etik Kurul Onayı 26.04.2016 tarihli ve 02/09 gündem ve toplantı no'lu karar ile tez çalışması yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılık Testi ve IK_{50} Tayini

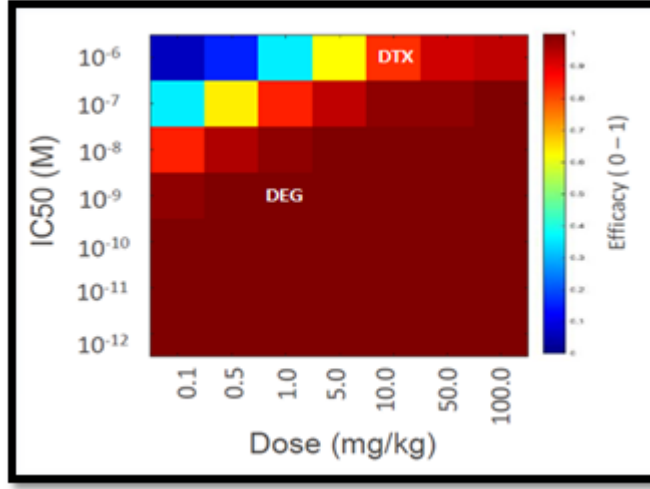
Bu aşamada, LAK hücre hattı üzerine Dosetaksel ve Deguelin molekülleri uygulanarak doz-yanıt grafiğinin elde edilmesi ve beraberinde inhibitör konsantrasyonlarının (IK_{50}) hesaplanması yapılmıştır.



Şekil 4.1-1 LAK (LLC) Hücre hattında Dosetaksel ve Deguelinin IK_{50} Değerleri

IK_{50} Dosetaksel; 23.5 μM olarak bulundu. %95 GA [21.2-26.0] μM arasında bulunmaktadır. IK_{50} Deguelin; 25.8 nM olarak bulundu. %95 GA [17.5-38.2] nM arasında bulunmaktadır. Deguelin, Dosetaksel'e göre yaklaşık 1000 kat kadar düşük dozda LAK hücre hattına etki etmiştir.

Ajanların, hücre hattı çalışması ile deney hayvanı modelinde kullanılan dozların ısı haritası (heat map) gösterimi ile etkinlikleri Şekil 4.1-2'de gösterilmiştir. Tedavide kullanılan ajanların etkinliklerinin 1'e yakın olduğu görülmektedir.

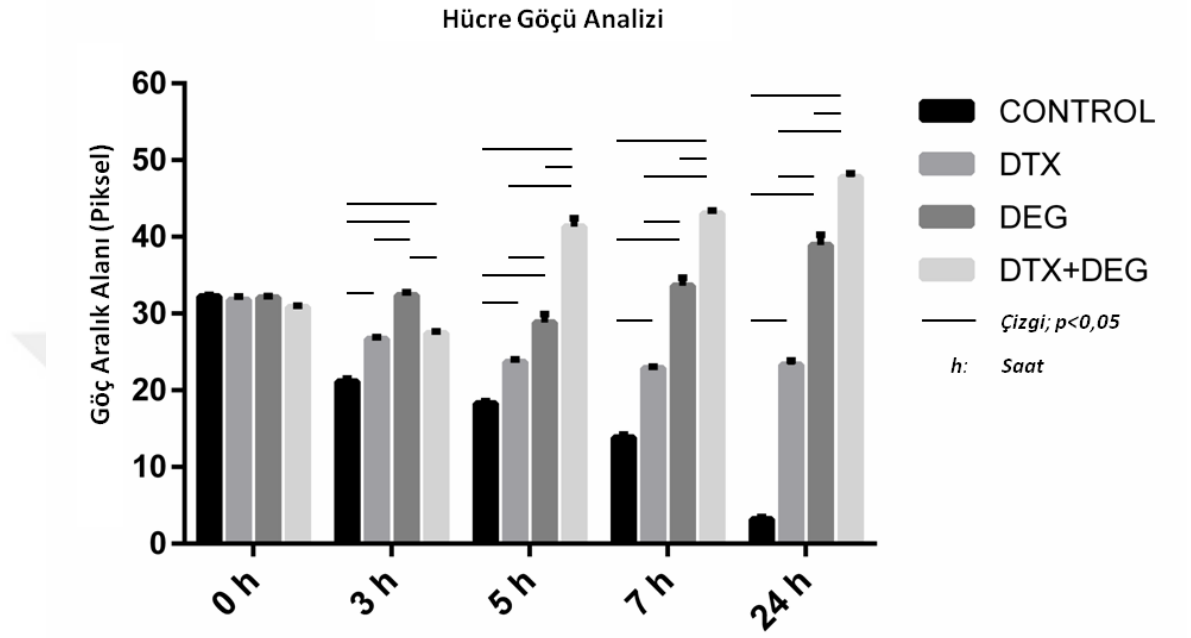


Şekil 4.1-2 Kemoterapötik ajanlara ait in vitro/in vivo dozlarına bağlı etkinliklerini gösteren ısı haritası

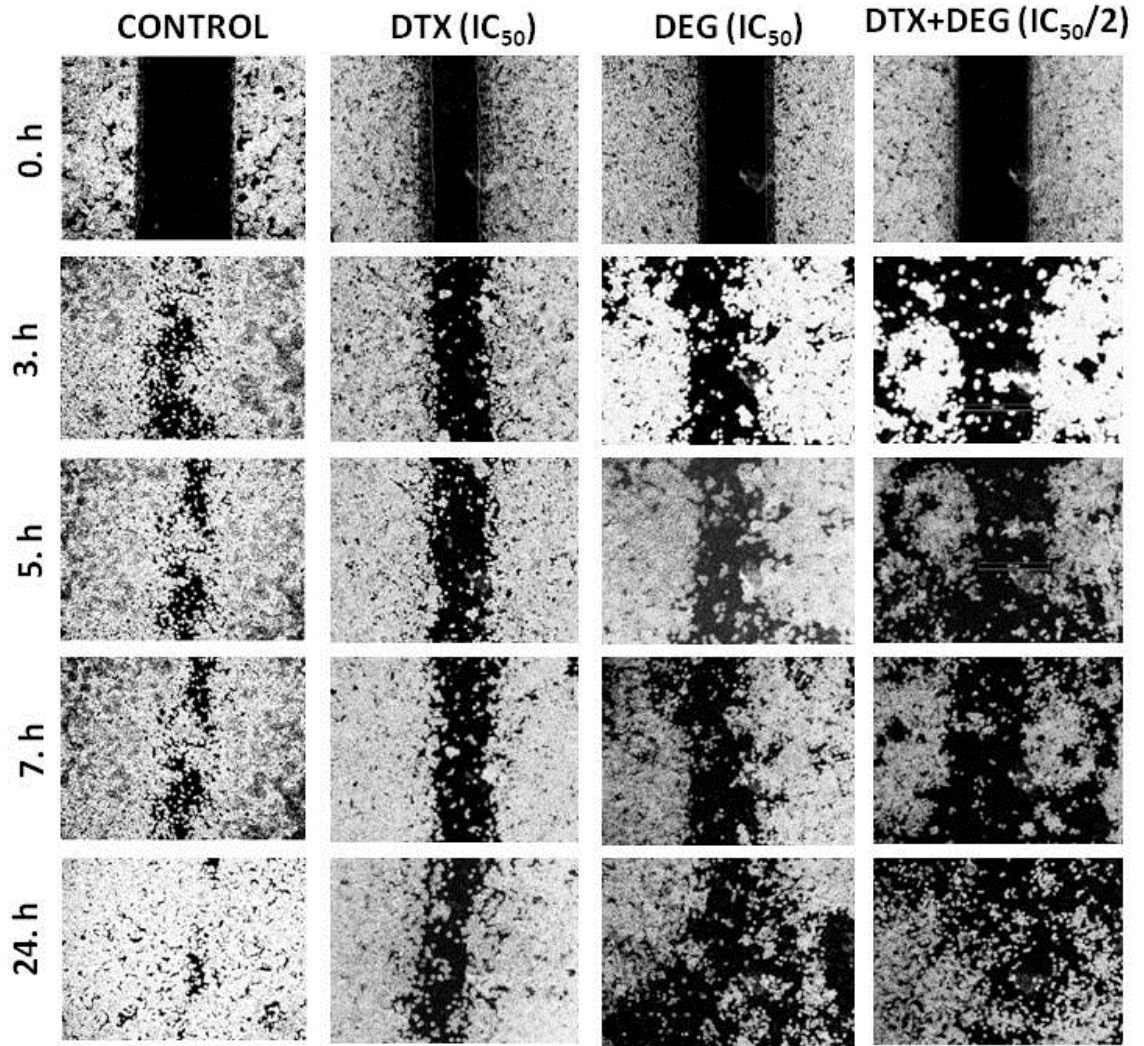
4.2. Hücre Göçü Analizi

4.2.1. LAK Hücre Hattı Çalışması

Şekil 4.2-1'de göç aralığının alanı piksel cinsinden analizi ele alınmıştır ve şekil 4.2-2'de gruplar arasında görsel fark sunulmuştur. 24 saat sonrasında kontrol ile tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Kontrol grubunda neredeyse tam bir kapanma gözlenmiştir. Tedavi grupları arasında kombinasyon grubu ile tekli tedaviler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Tekli tedaviler (DTX vs. DEG) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0,05$). Objektif=10X



Şekil 4.2-1 Gruplar arasında hücre göçü analiz sonuçlarının karşılaştırılması
(çizgiler anlamlı karşılaştırmayı belirtir.)

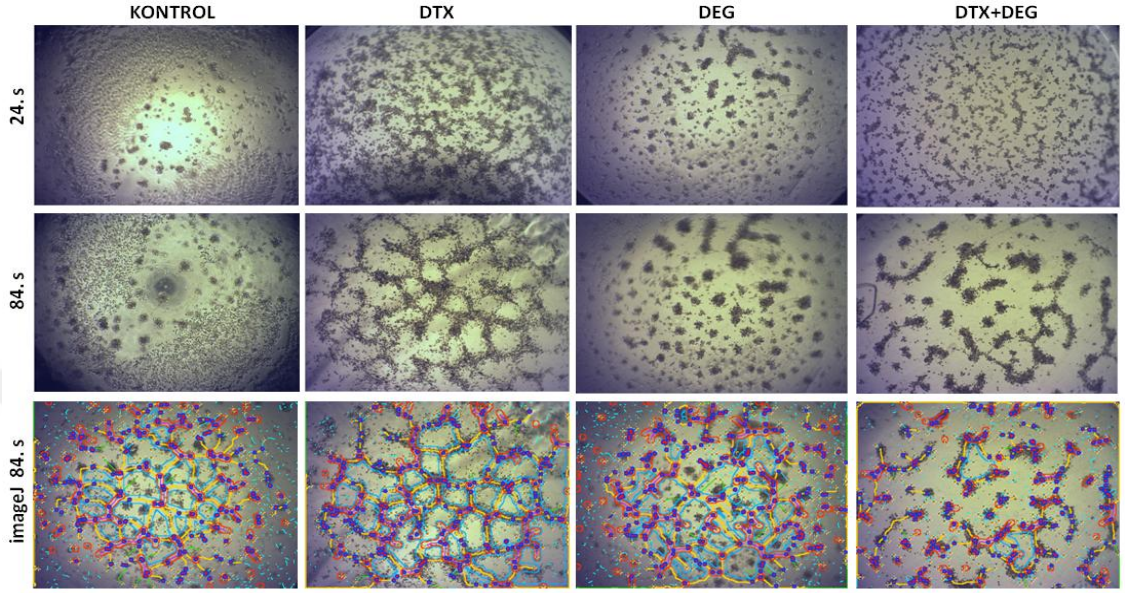


Şekil 4.2-2 Gruplar arasında zamana bağlı hücre göçü alan karşılaştırması

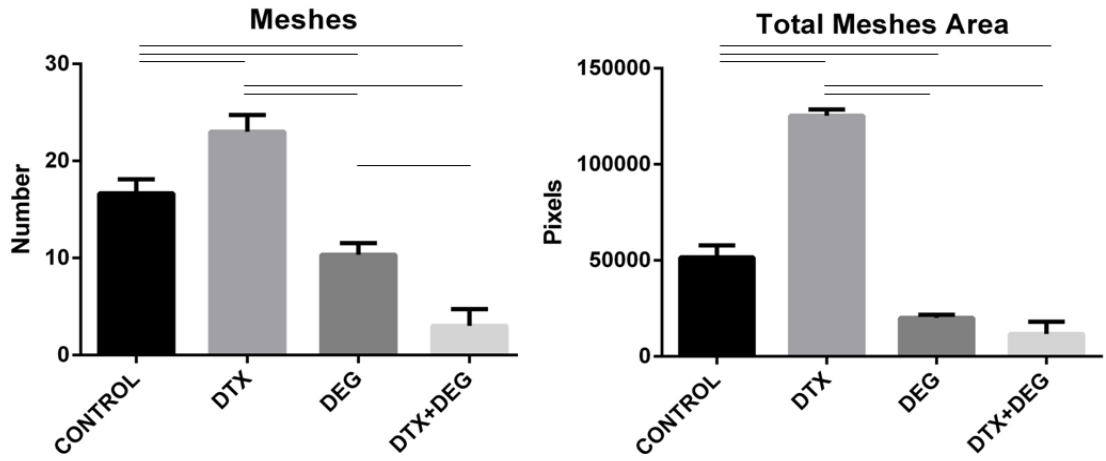
4.3. Anjiyogenezis (Tüp Formasyon) Analizi

4.3.1. LAK Hücre Hattı

3B Anjiyogenezis metodu (Tubular formasyon); LAK hücre hattı, 84 saat sonra öncelikle ağ (mesh) sayıları ve toplam ağ alanı da kontrole göre tedavi gruplarında DTX grubunda anlamlı artış görülürken diğerlerinde (DEG ve DTX+DEG kombinasyon grupları) anlamlı azalış görüldü ($p<0,05$). Objektif=5X



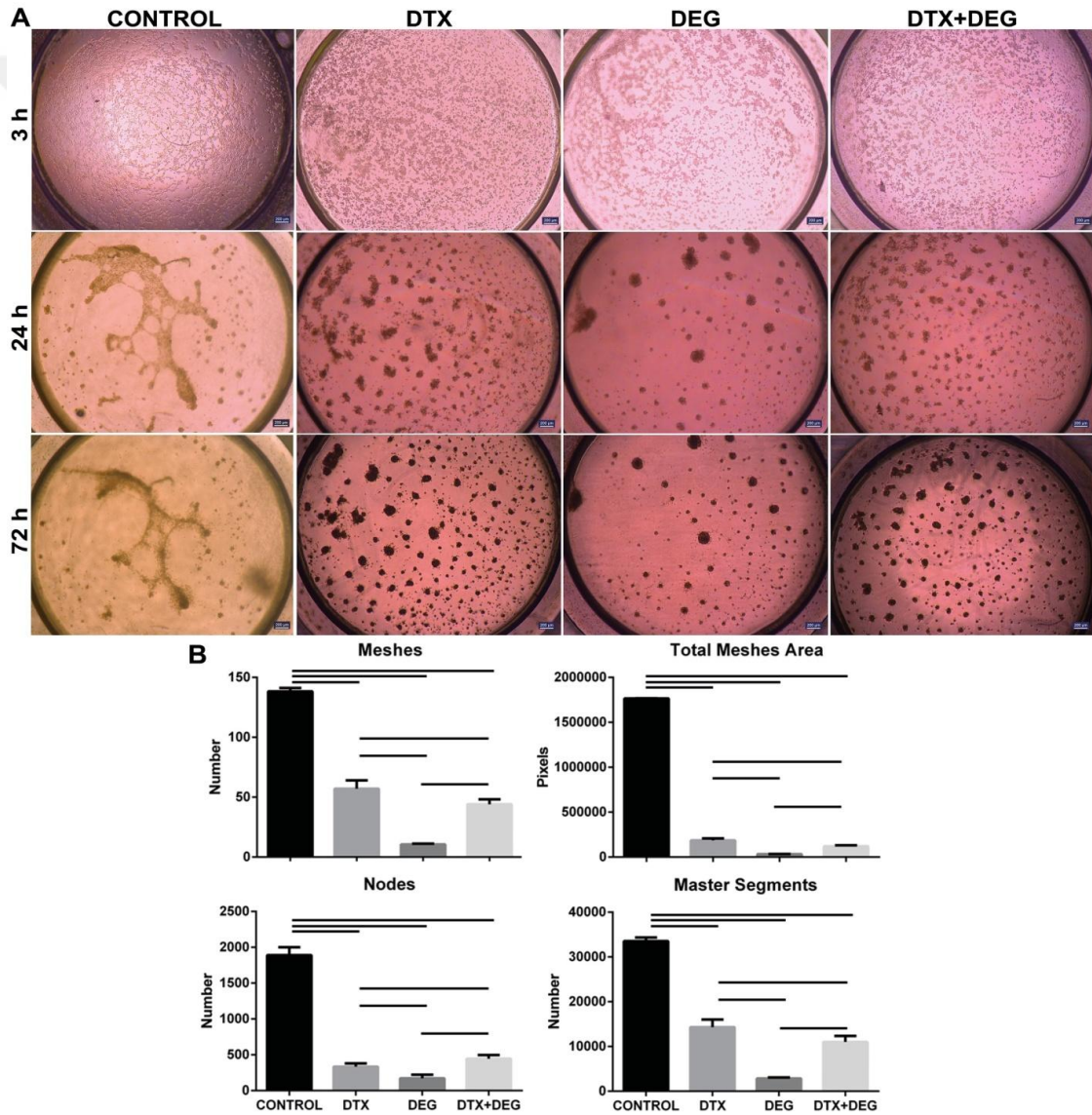
Şekil 4.3.1-1 Gruplar arasında 3B Anjiyogenezis (tubular formasyon) karşılaştırması



Şekil 4.3.1-2 Gruplar arasında 3B Anjiyogenezis (tubular formasyon) ağ sayısı ve toplam ağ alanı karşılaştırılması (çizgiler anlamlı karşılaştırmayı belirtir)

4.3.2. HUVEC Hücre Hattı

Anjiyogenezis - Tüp Formasyon metodunda (3B); HUVEC hücre hattı, 72 saat sonra ağ (mesh) ve toplam ağların alanı değişkenlerinde kontrole göre tedavi gruplarında anlamlı azalış görüldü ($p<0,05$). Ayrıca, DEG ve kombinasyon tedavilerinde ana segment parametresinde diğer gruplara göre anlamlı azalış görüldü ($p<0,05$). Kombinasyon ($IK_{50}/2$) tedavisi; ağ ve toplam ağların alanı parametrelerinde ek etki göstermiştir ($p<0,05$).

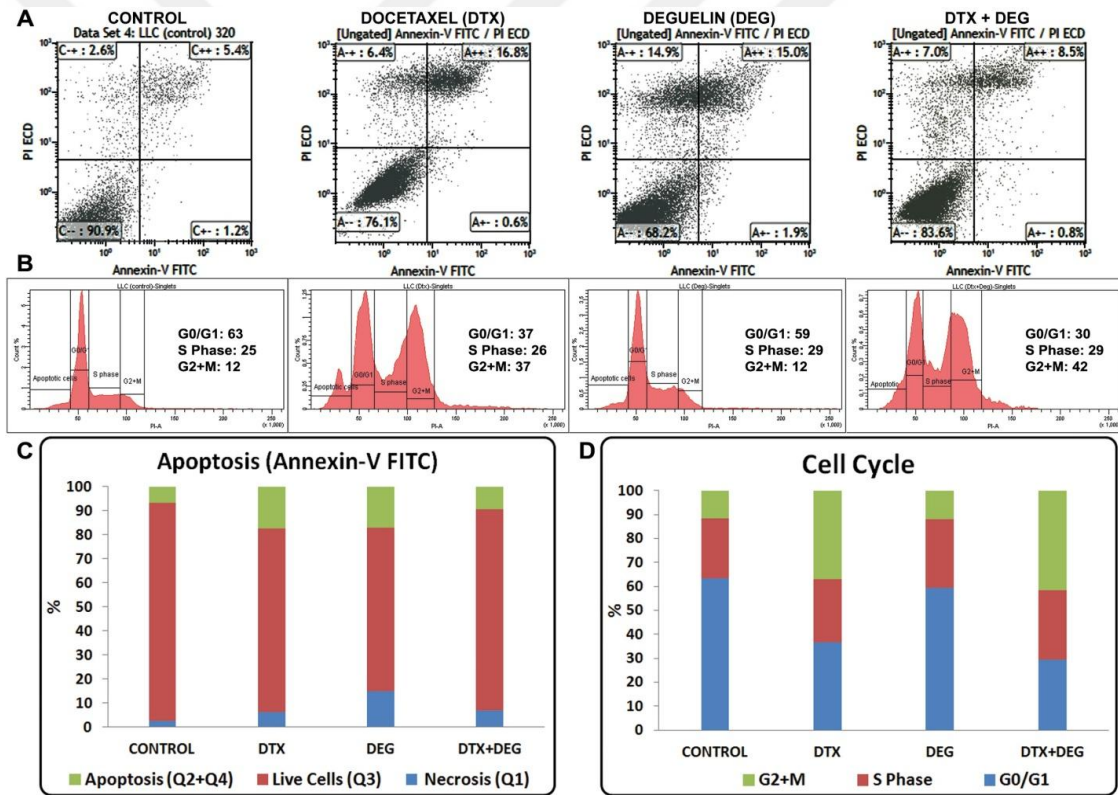


Şekil 4.3.1-3 Anjiyogenezis - Tüp Formasyon metodunda (3B).

4.4. LAK Hücre Hattında Akım Sitometrik Apoptozis ve Hücre Döngüsü Analiz Değerlendirmesi

A) Apoptozis ve hücre döngüsü analiz grafiklerini göstermektedir.

B) Major parametre olan apoptozis ölçümünde (yeşil bar), kontrole göre diğer tedavi gruplarında anlamlı ölçüde artış olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Aynı durum nekroz parametresinde (mavi bar) de geçerlidir. Ayrıca, DEG grubunda diğer tedavi gruplarına göre nekroz parametresinde (mavi bar) anlamlı artış görüldü ($p<0.05$). Kombinasyon tedavisi ek etki göstermiştir.



Şekil 4.3.1-4 Apoptozis ve hücre döngüsü analizi

C) Hücre döngüsü analizi; kontrol grubuna göre tedavi gruplarından DEG’de G₁/S geçişinde, DTX’de ise G₂+M fazında alıkonma oranlarının anlamlı yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Kombinasyon tedavisi, ek etki göstermiştir.

4.5. Sakrifikasyon Aşaması ve Yapılan İşlemler

1-) 23.08.2016 tarihinde (sakrifikasyon günü) 2 Denek ile yapılan *pilot çalışmada* her iki deneğin;

Akciğer, Karaciğer, Kalp, Dalak, Böbrek, Beyin, Ovaryum, Uterus, Pankreas, Bağırsak, Mide, Kemik (Femur), Deri altı tümör dokusu (XnT) dokuları alınmıştır.

2-) 09.01.2016 tarihinde (sakrifikasyon tarihi) 2 denek ile yapılan çalışmada 1 denek ex olmuştu ama dokularını aldık ama çalışmaya dahil edilmedi. Bu grup kanserli ve tedavisiz grup; (B) grubudur.

1-) EX olanın; Akciğer, Karaciğer, Kalp, Dalak, Böbrek, Beyin, Ovaryum, Uterus, Pankreas, Bağırsak, Mide, Kemik (Femur), Deri altı tümör dokusu (XnT) dokuları alınmıştı.

2-) Akciğer, Karaciğer, Kalp, Dalak, Böbrek, Beyin, Ovaryum, Uterus, Pankreas, Bağırsak, Mide, Kemik (Femur), Deri altı tümör dokusu (XnT) dokuları alınmıştır.

3-) 25.04.2017 tarihli sakrifikasyon günü; çalışmaya (D-Deguelin) ve (E-Dosetaksel) gruplarında 5'er denek ile başlanmıştı. Ancak, E grubu doza bağlı ex olduğu için dokuları alınamamıştır. D grubunda 2 denek ex olmuştur.

D-1 , D-3 ve D-5 deneklerinden doku alınabilmiştir.

Akciğer, Karaciğer, Kalp, Dalak, Böbrek, Beyin, Ovaryum, Uterus, Pankreas, Bağırsak, Mide, Kemik (Femur), Deri altı tümör dokusu (XnT) dokuları alınmıştır.

4-) 08.06.2017 tarihli sakrifikasyon işleminde; (D - Deguelin) ve (E - Dosetaksel) gruplarında 5'er denek ile başlanmıştı. D grubunda 2 denek ex oldu. E grubu doz ayarlamasından sonra başarılı bir şekilde ex olmadan çalışmayı tamamladı.

Akciğer, Karaciğer, Kalp, Dalak, Böbrek, Beyin, Mide, Kemik (Femur), Deri altı tümör dokusu (XnT) dokuları alınmıştı.

D-2, D-4 ve D-5 gruplarından doku alındı. Bu grubun tamamlanması için 1 denek yani D-7 daha sonraki planlamada yapılmıştır.

E-1, E-2, E-3, E-4, E-5 deneklerinden doku alındı. Bu grubun tamamlanması için E-6 ve E-7 denekleri bir sonraki planlamada çalışılmıştır.

5-) 16.06.2017 tarihli sakrifikasyonda; her grupta 6'şar denek olmak üzere toplamda 18 denek ile çalışmaya başlanmıştır.

B-Kanser, C-Kanser+DMSO, F-Kanser+Kombinasyon

B- grubunda farklı günlerde toplamda 4 denek ex oldu. Sadece **B-5 ve B-6** dan doku alındı. Ex olanlar tekrarlanmıştır.

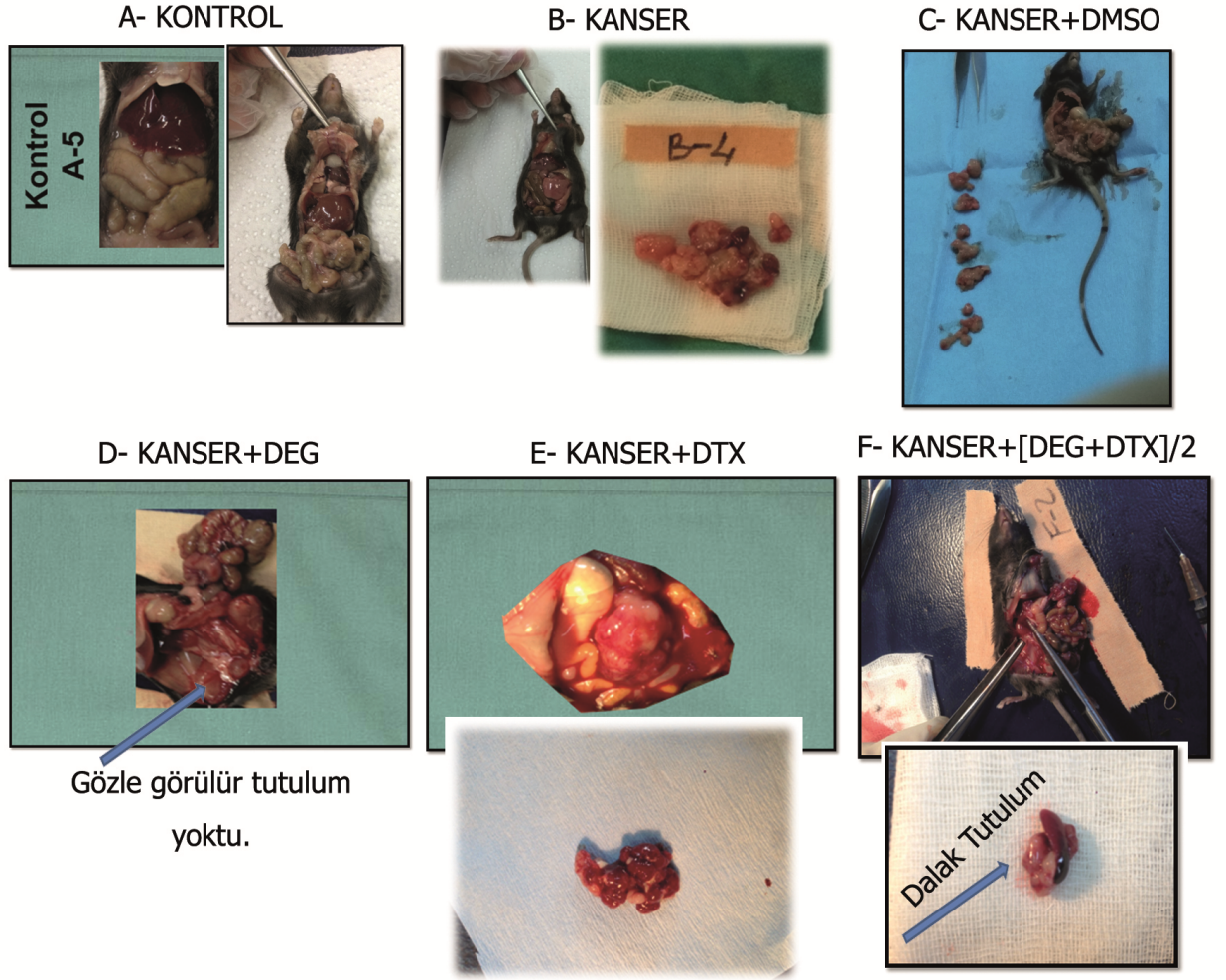
C- grubunda ex olmadı ve **C-1'den C-6 ya** kadar olan deneklerin dokuları alındı. C-7 daha sonra sakrifiye yapıldı.

F- grubunda; 1. ve 3. denekler ex oldu ve bir sonraki çalışmada tekrarlandı. **F-2, F-4, F-5 ve F-6** 'nın dokuları alındı.

Akciğer, Karaciğer, Kalp, Dalak, Böbrek, Beyin, Mide, Kemik (Femur), Deri altı tümör dokusu (XnT) dokuları alınmıştır.

6-) 28.07.2017 tarihinde son sakrifikasyon gerçekleşti ve 21 denek ile sona bırakılan kontrol grubu ile birlikte gruplarda eksik kalan sayılar tamamlandı ve çalışıldı. Bu son sakrifikasyon oldu.

Akciğer, Karaciğer, Kalp, Dalak, Böbrek, Beyin, Mide, Kemik (Femur), Deri altı tümör dokusu (XnT) dokuları alınmıştır.



Şekil 4.5-1 Grupların makroskopik incelenmesi ve tümör görünüşleri

4.6. Deneklerin Sağkalım Analizleri

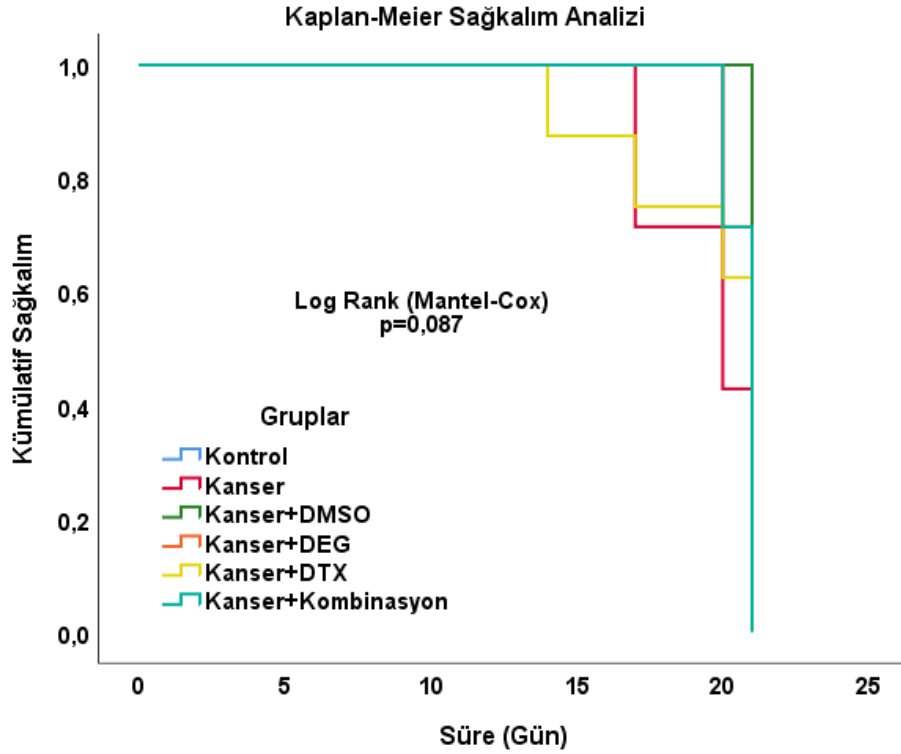
Gruplar arasında sağkalımları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.6-1; $p>0,05$).

Tablo 4.6-1 Gruplarda sağkalım süreleri ve karşılaştırmaları

Gruplar	Ortalama				p değeri*
	Tahmini (Gün)	Std. Hata	%95 GA		
			Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	21,0	0,0	21,0	21,0	0,087
Kanser	19,6	0,7	18,2	20,9	
Kanser+DMSO	21,0	0,0	21,0	21,0	
Kanser+DEG	20,7	0,2	20,4	21,1	
Kanser+DTX	19,5	0,9	17,7	21,3	
Kanser+Kombinasyon	20,7	0,2	20,4	21,1	
Genel Sağkalım	20,4	0,2	20,0	20,8	

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. p; Log rank (Mantel-Cox)

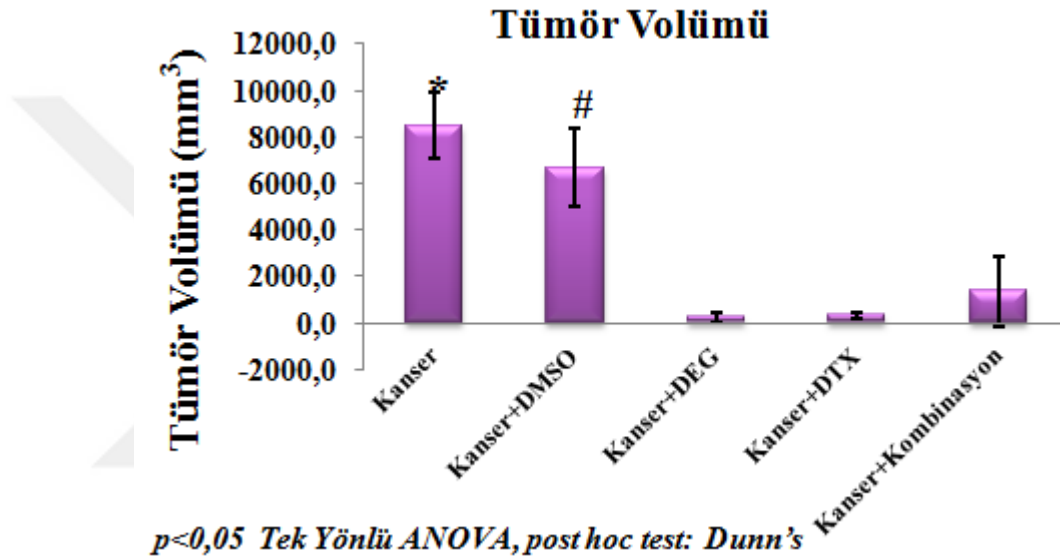
*Kaplan-Meier Sağkalım analizi uygulanmıştır.



Şekil 4.6-1 Denekler arasında sağkalım analizi ve grafiği

4.7. Deneklerin Tümör Boyutları

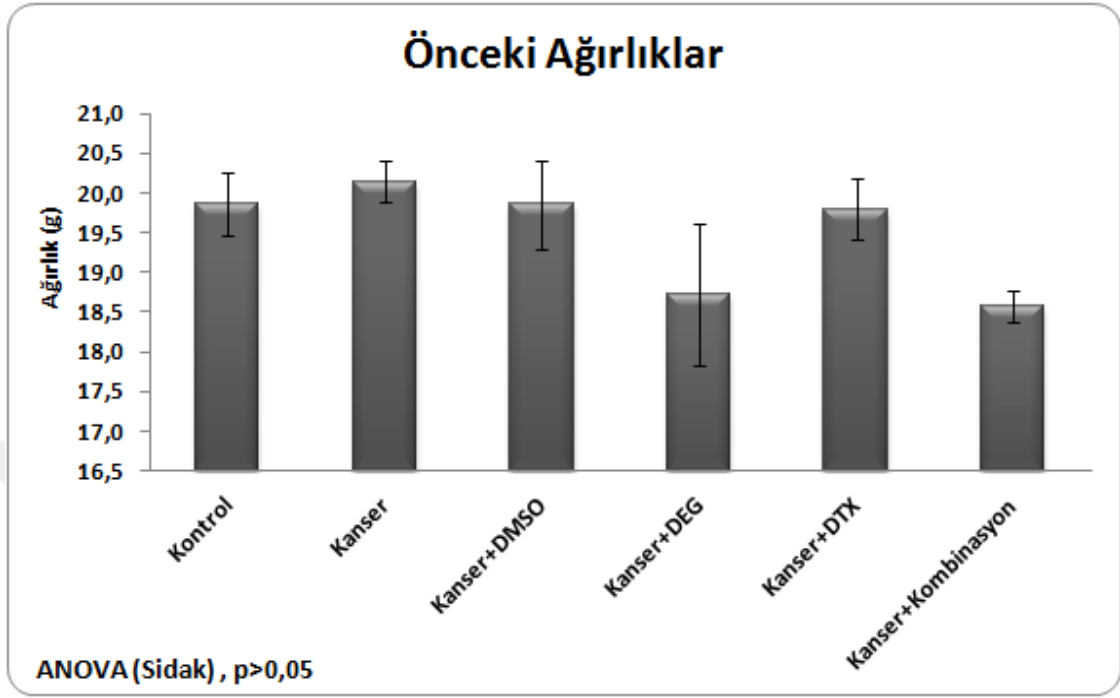
Kanser ve Kanser+DMSO gruplarında diğer tedavi gruplarına göre tümör volümleri anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Tedavi gruplarının birbiriyle karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Kombinasyon tedavi grubunda tümör hacmi diğer tekli tedavi gruplarına göre yüksekti ama istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).



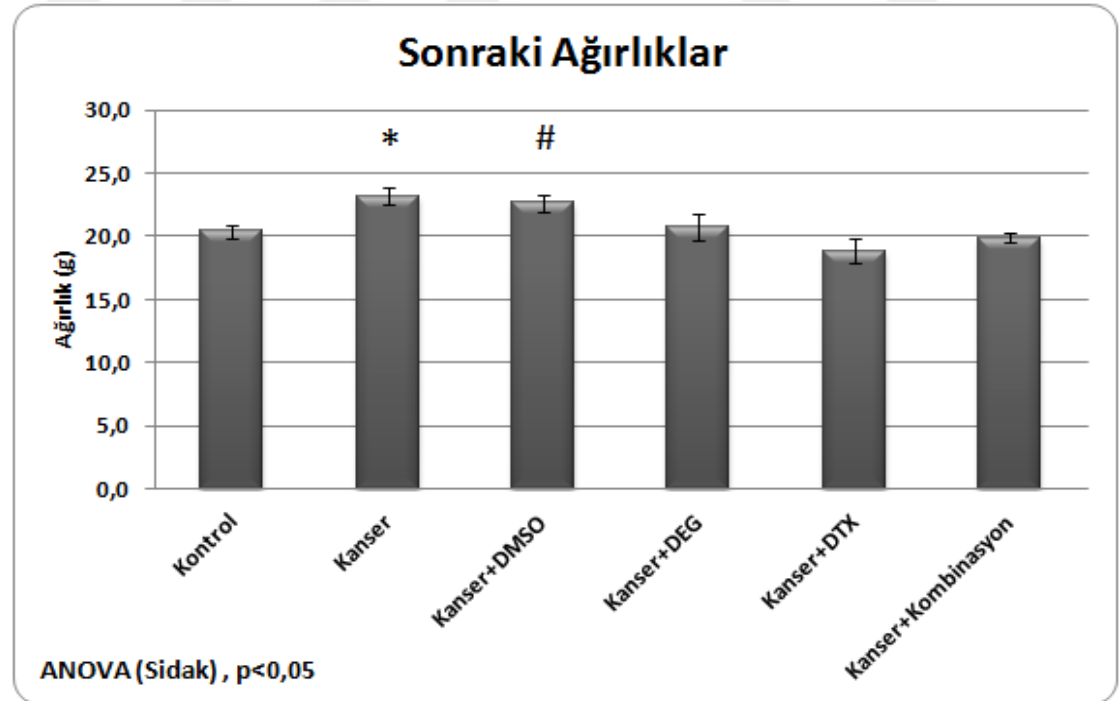
Şekil 4.7-1 Gruplar arası tümör volümü karşılaştırması

4.8. Denek Ağırlıkları (Önce ve Sonra)

Denekleri çalışmaya başlamadan ve çalışmaya başladıktan sonra 2 güne bir ağırlıkları tartıldı ve durumları gözlemlendi. En son ağırlık sakrifikasyon aşamasında ölçüldü. Denekler arasında deney başında elde edilen ölçümlere göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ($p>0,05$), sakrifikasyon işlemi öncesi elde edilen denek ağırlıkları gruplar arasında karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu görüldü. Kanser ve kanser+DMSO gruplarında tümör volümünün artması nedeniyle sakrifikasyon aşamasında elde edilen makroskopik inceleme de bunu doğruluyordu ve bu gruptaki deneklerin ağırlıkları anlamlı artış göstermiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.8-1 Başlangıç esnasında denek ağırlıkları

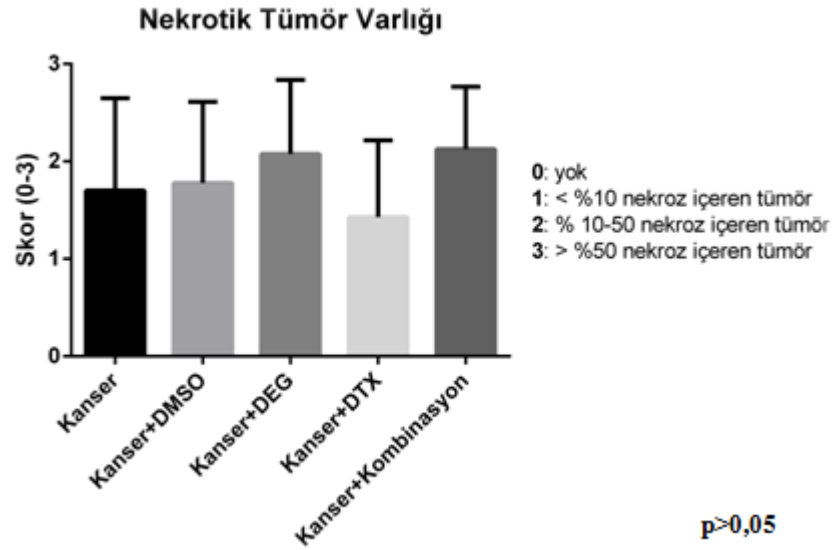


Şekil 4.8-2 Denek ağırlıklarının sakrifikasyon öncesi son ölçümlere göre karşılaştırılması

4.9. Hematoksilen & Eozin Boyama Değerlendirmesi

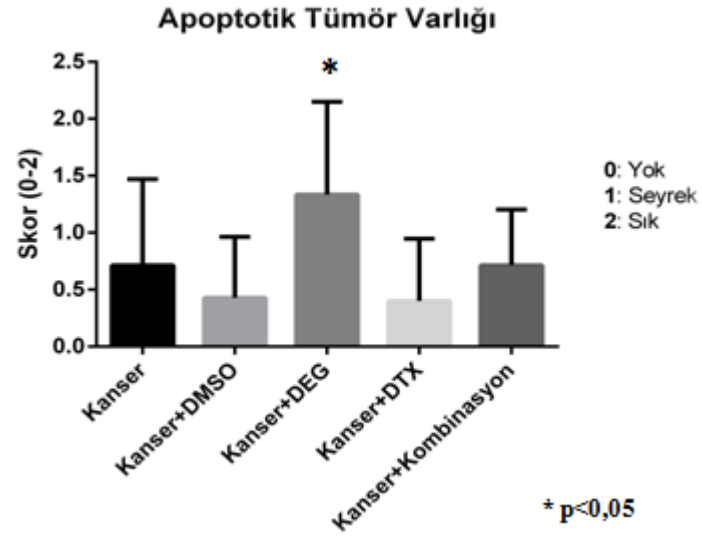
4.9.1. Tümör Dokusunun İncelenmesi

Tümör dokusu içeren grupların Hematoksilen&Eozin boyama sonrası nekrotik ve apoptotik hücre varlıkları skorlandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Gruplar arasında nekrotik tümör varlığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). DEG ve kombinasyon grupları diğer gruplara göre skor olarak yüksek bulunmuş olsa da anlamlı değildi. Gruplarda ortalama nekrotik tümör varlığı %10-50 arasındadır.

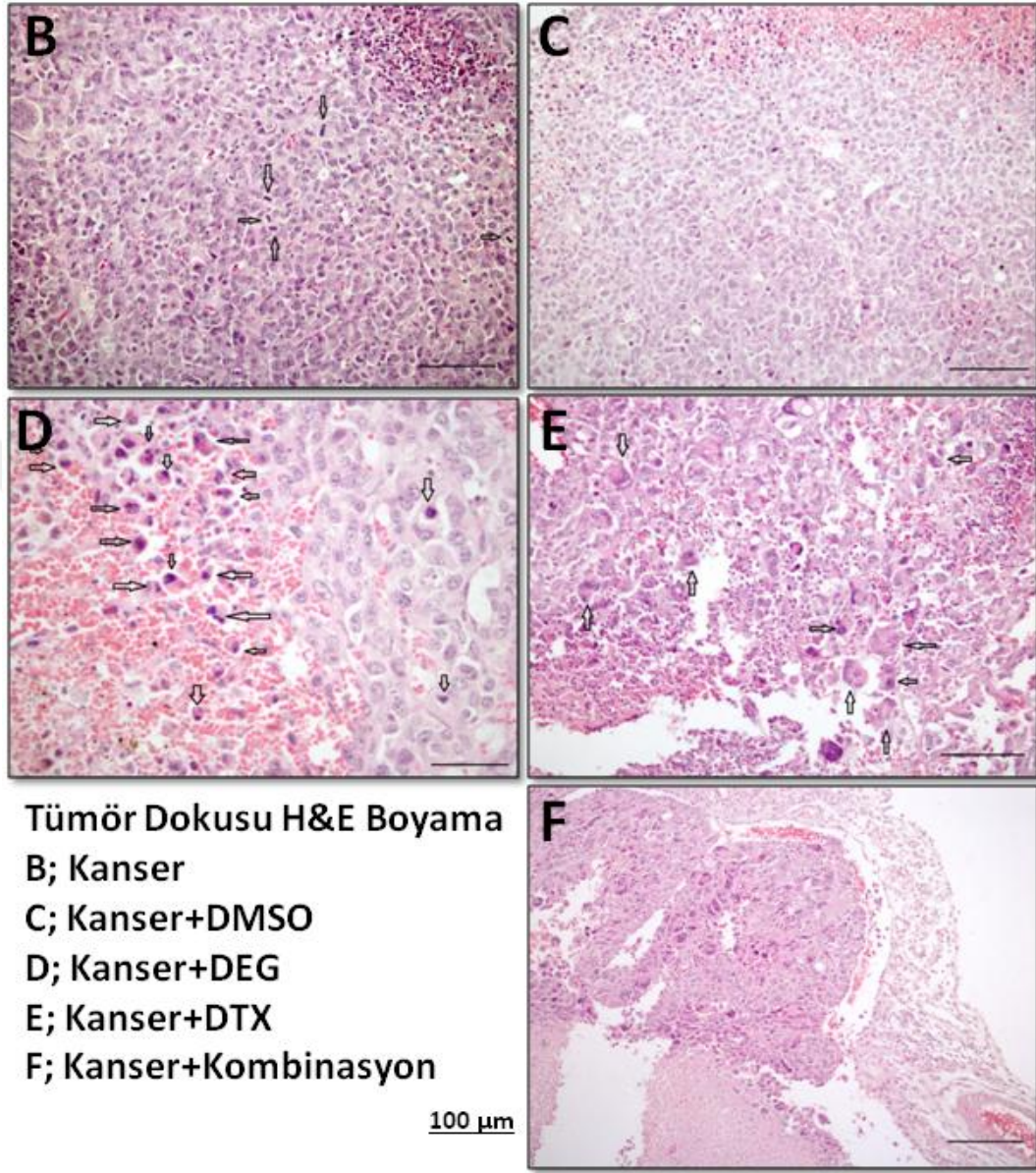


Şekil 4.9-1 Gruplar arasında nekrotik tümör varlığı karşılaştırması

Gruplar arasında apoptotik tümör varlığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Genel olarak incelenip skorlar karşılaştırıldığında gruplarda hemen hemen seyrek tümör varlığı gözlenmiş olup DEG grubunda anlamlı yüksek olduğu tespit edilmiştir. Diğer grupların birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Ancak immünohistokimyasal olarak aktif kaspaz-3 boyaması bize daha doğru sonuç verecektir.



Şekil 4.9-2 Gruplar arasında apoptotik tümör varlığı karşılaştırması



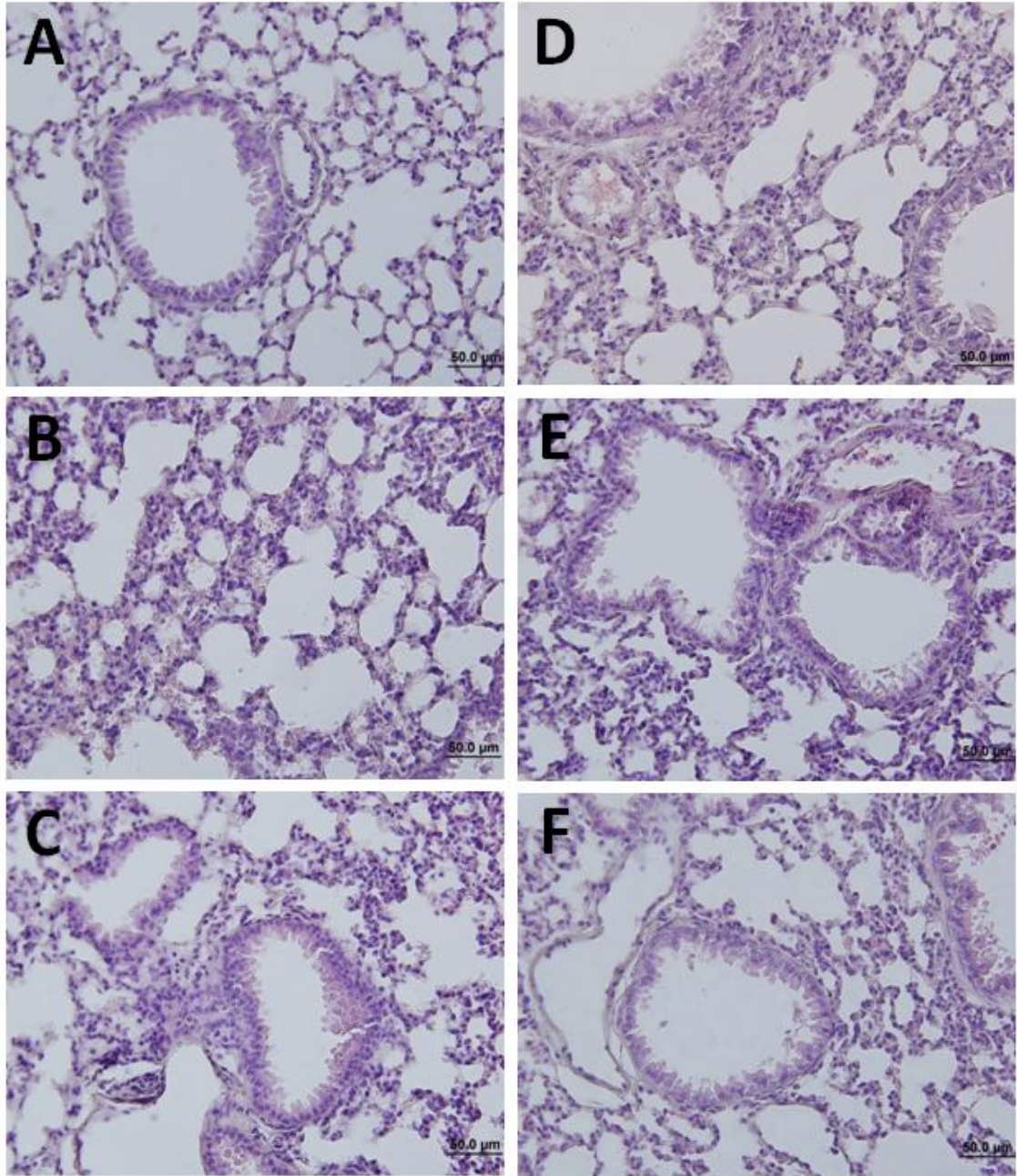
Şekil 4.9-3 Tümör dokusunun hematoksilin & eozin boyamaları

B; Mitotik aktif hücreler, C; Minimal nekroz canlı tümör ve nadir apoptotik hücreler, D; Apoptotik tümör hücreleri, E; Tümör Dev Hücreleri, F; Tümör Dev Hücreleri ve Ilımlı Nekroz

4.9.2. Akciğer Dokusunun İncelenmesi

Akciğer dokusunda Hematoksilen&Eosin boyamaları yapılmıştır. Ancak oluşturulan deney modelinde sadece B grubunda kanserli ve tedavi edilmeyen grupta 1 denekte akciğer tümör tutulumu olduğu tespit edilmiş ancak diğer gruplarda akciğerlere metastaz yapmadığı tespit edilmiştir. Gruplar arasında olağan bir fark gözlemlenmemiştir. Nekrotik ve apoptotik tümör varlığı karşılaştırması yapılamamıştır.





Şekil 4.9-4 Akciğer Dokusunun Hematoksilen&Eosin Boyama ile İncelenmesi

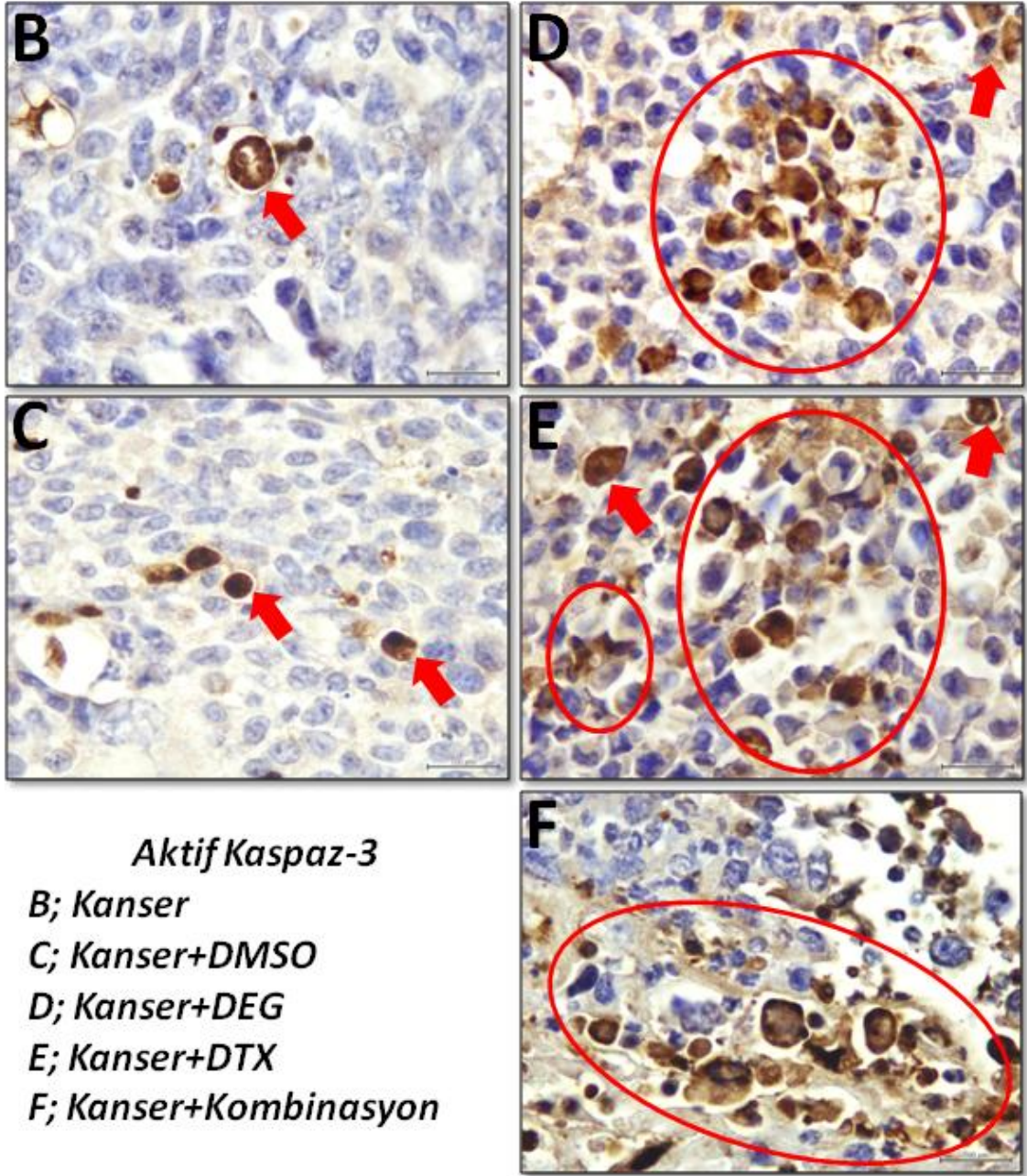
A; Kontrol, B; Kanser, C; Kanser+DMSO,

D; Kanser+DEG, E; Kanser+DTX, F; Kanser+Kombinasyon

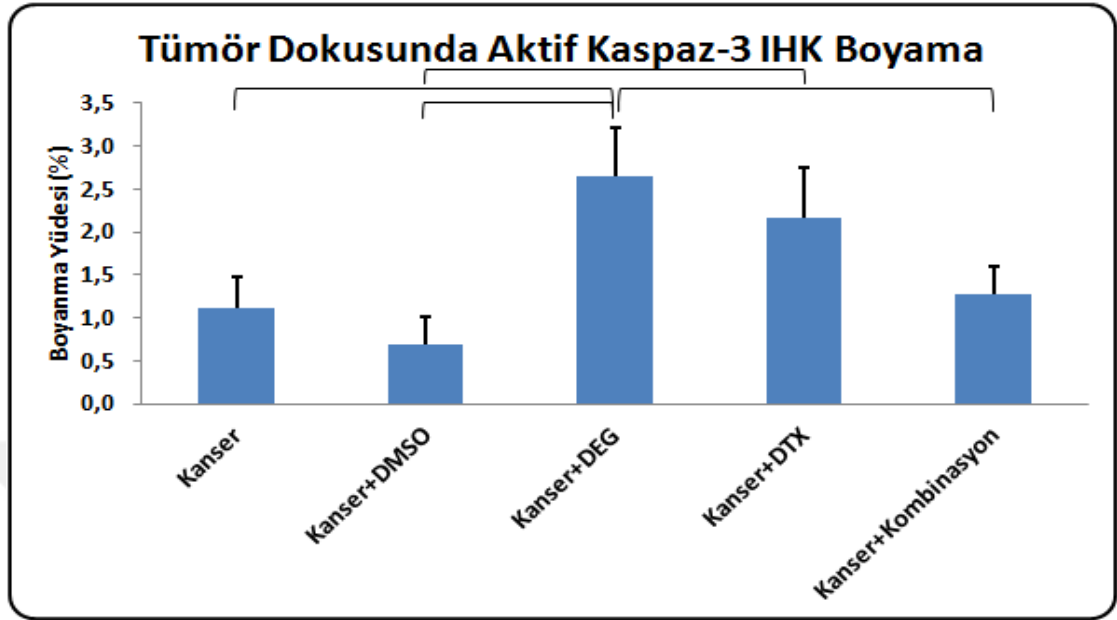
4.10. Aktif Kaspaz-3 İmmünohistokimya Değerlendirmesi

Tümör dokusu incelendiğinde gruplar arasında Aktif Kaspaz-3 IHK boyama skorları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,037$). Anlamlılığın olduğu grupları tespit etmek için ikili karşılaştırmalar yapıldı ve grafik üzerinde anlamlı fark bulunan gruplar işaretlenmiştir ve altındaki tabloda anlamlılık durumları sayısal olarak belirtilmiştir ($p<0,05$).

Akciğer dokusu incelendiğinde gruplar arasında Aktif Kaspaz-3 IHK boyama skorları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).



Şekil 4.10-1 Tümörlü dokularda aktif kaspaz-3 boyaması ve değerlendirilmesi

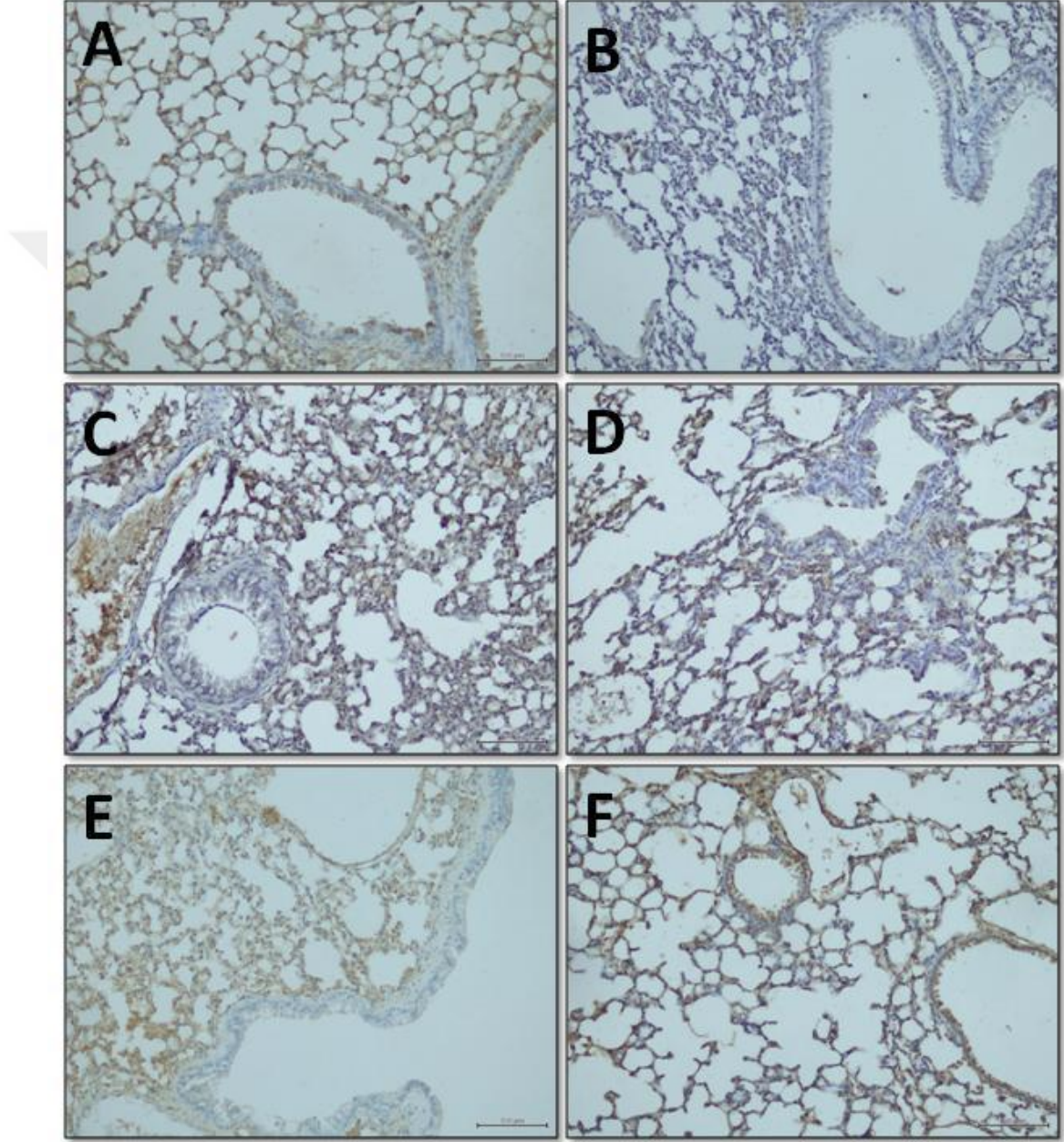


Şekil 4.10-2 Tümör dokusunda aktif kaspaz-3'ün gruplar arasında boyama yüzdesi karşılaştırması

Tablo 4.10-1 Tümör dokusunda gruplar arasında aktif kaspaz-3 skor karşılaştırmaları

Post Hoc Karşılaştırmalar	
Grup 1 vs. Grup 2	p-Değeri
Kanser vs. Kanser+DMSO	0,422
Kanser vs. Kanser+DEG	0,037
Kanser vs. Kanser+DTX	0,101
Kanser vs. Kanser+Kombinasyon	0,594
Kanser+DMSO vs. Kanser+DTX	0,023
Kanser+DMSO vs. Kanser+DEG	0,006
Kanser+DMSO vs. Kanser+Kombinasyon	0,224
Kanser+DEG vs. Kanser+DTX	0,866
Kanser+Kombinasyon vs. Kanser+DEG	0,202
Kanser+Kombinasyon vs. Kanser+DTX	0,323

Akciğer dokusunda tümör oluşumu çok nadir bazı deneklerde rastlandı. Ancak, gruplardaki her deneğin preparatının boyanma yüzdesi hemen hemen aynı olduğu için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).



Şekil 4.10-3 Akciğer dokusunda aktif kaspaz-3'ün gruplar arasında boyama yüzdesi karşılaştırması

Bütün gruplarda interstisyum ve plevra olağandı. Tedavisiz kanserli grupta 1 denekte %10'un altında nekroz içeren tümör varlığı görüldü. Kanser+DMSO grubunda 1 denekte %10-50 oranında nekroz içeren tümör varlığı tespit edildi. Kanser+Kombinasyon grubunda 1 denekte %10'un altında nekroz içeren tümör varlığı görüldü. Diğer tedavi gruplarında nekrozlu tümör olgusuna rastlanmamıştır.

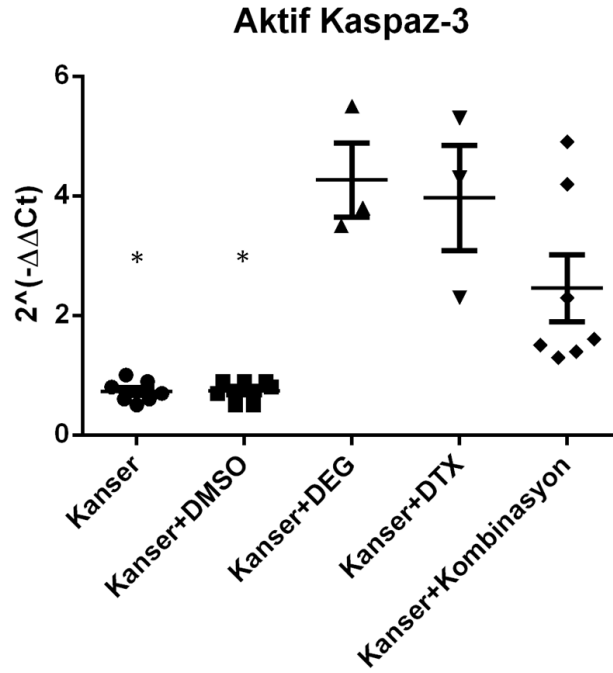
Bronş-bronşiol durumları incelendiğinde sadece tekli tedavi grupları olan Kanser+DTX ve Kanser+DEG gruplarında 1'er denekte dilatasyon varlığı görüldü. Diğer gruplardaki denekler olağandı.

Alveoller incelendiğinde ise tedavi gruplarında Kanser+DTX ve Kanser+DEG gruplarında 2'şer ve Kanser+Kombinasyon grubunda 1 denekte amfizem geliştiği belirlendi.

4.11. Gen Ekspresyon Analizinin Bulguları

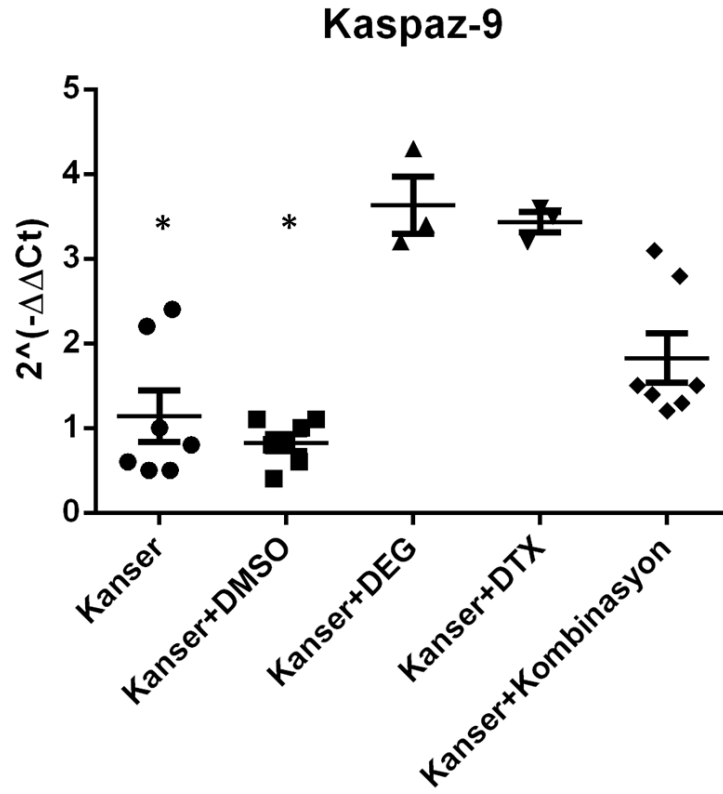
4.11.1. Tümör Dokusu Gen Ekspresyon Analizi

Aktif *kaspaz-3* geninin gruplar arasında ekspresyonu incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (K-W analizi; $p=0,0004$). Yapılan post hoc analizi sonrası anlamlılığın kanser grubu ile Kanser+DEG ve Kanser+DTX ve Kanser+DMSO ile Kanser+DEG ve Kanser+DTX grupları arasında olduğu bulundu ($p<0,05$). Kombinasyon tedavisi grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da tedavisi olmayan gruplara göre ekspresyon düzeyi yüksek bulundu ($p>0,05$).



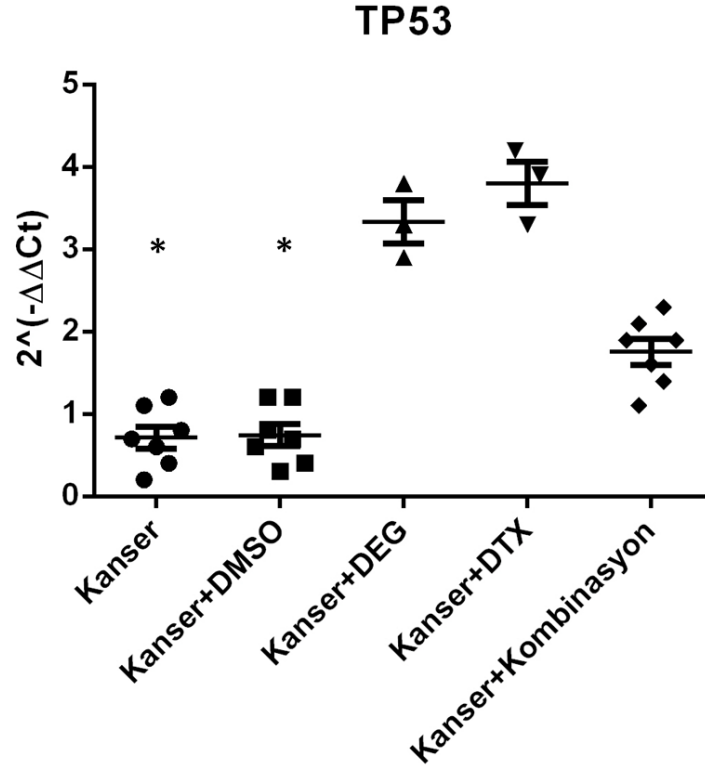
Şekil 4.11-1 Tumor dokusunda aktif *kaspaz-3* gen ekspresyon karşılaştırması

Kaspaz-9 geninin gruplar arasında ekspresyonu incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (K-W analizi; $p=0,0008$). Yapılan post hoc analizi sonrası anlamlılığın kanser grubu ile Kanser+DEG ve Kanser+DTX ve Kanser+DMSO ile Kanser+DEG ve Kanser+DTX grupları arasında olduğu bulunmuştur ($*p<0,05$). Kombinasyon tedavisi grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da tedavisi olmayan gruplara göre ekspresyon düzeyi yüksek bulundu ($p>0,05$).



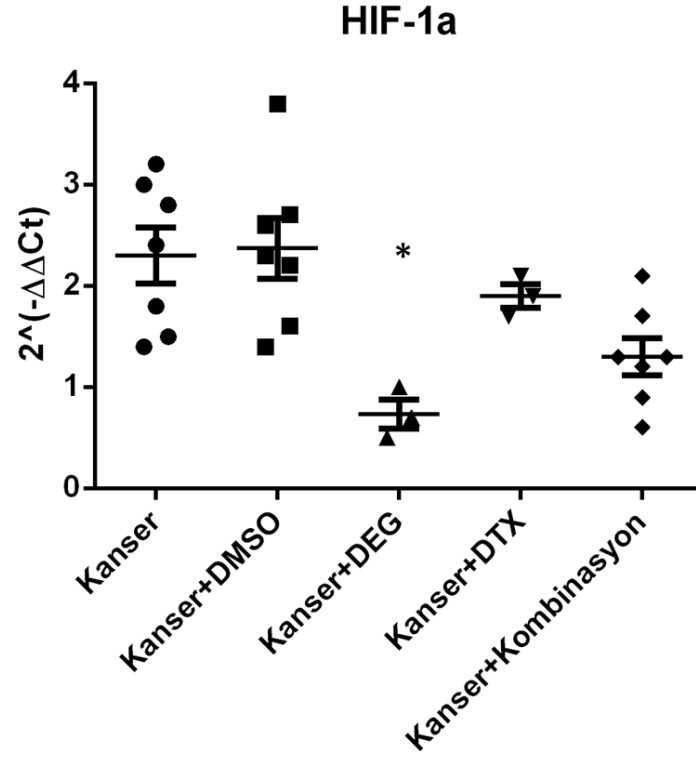
Şekil 4.11-2 Tümör dokusunda *kaspaz-9* gen ekspresyon karşılaştırması

TP53 geninin gruplar arasında ekspresyonu incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (K-W analizi; $p=0,0004$). Yapılan post hoc analizi sonrası anlamlılığın kanser grubu ile Kanser+DEG ve Kanser+DTX ve Kanser+DMSO ile Kanser+DEG ve Kanser+DTX grupları arasında olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Kombinasyon tedavisi grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da tedavisi olmayan gruplara göre ekspresyon düzeyi yüksek bulunmuştur ($p>0,05$).



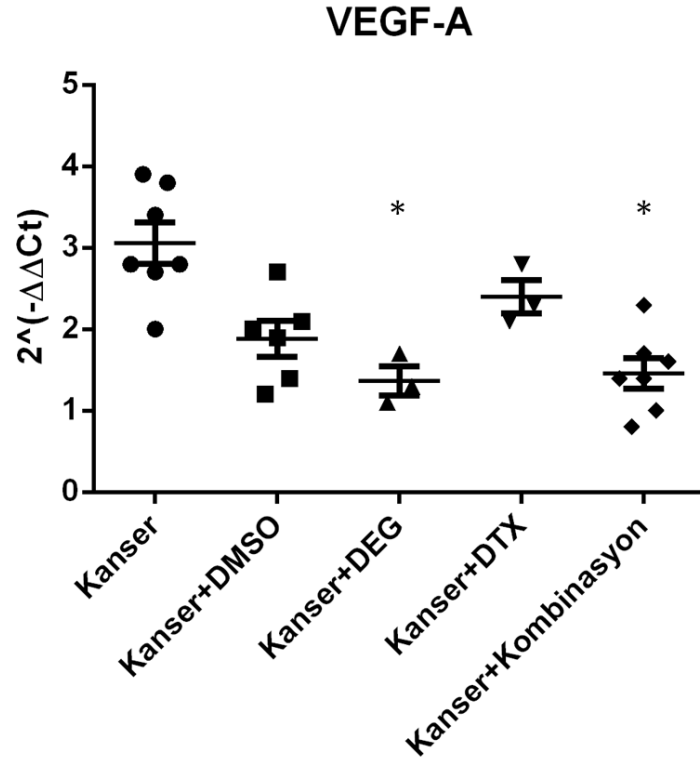
Şekil 4.11-3 Tümör dokusunda *TP53* gen ekspresyon karşılaştırması

HIF-1a geninin gruplar arasında ekspresyonu incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (K-W analizi; $p=0,0052$). Yapılan post hoc analizi sonrası anlamlılığın sadece Kanser+DEG tedavi grubu ile tedavi olmayan gruplar (Kanser ve Kanser+DMSO) arasında olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Kombinasyon tedavisi grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da tedavisi olmayan gruplara göre ekspresyon düzeyi düşük bulunmuştur ($p>0,05$).



Şekil 4.11-4 Tümör dokusunda *HIF-1a* gen ekspresyon karşılaştırması

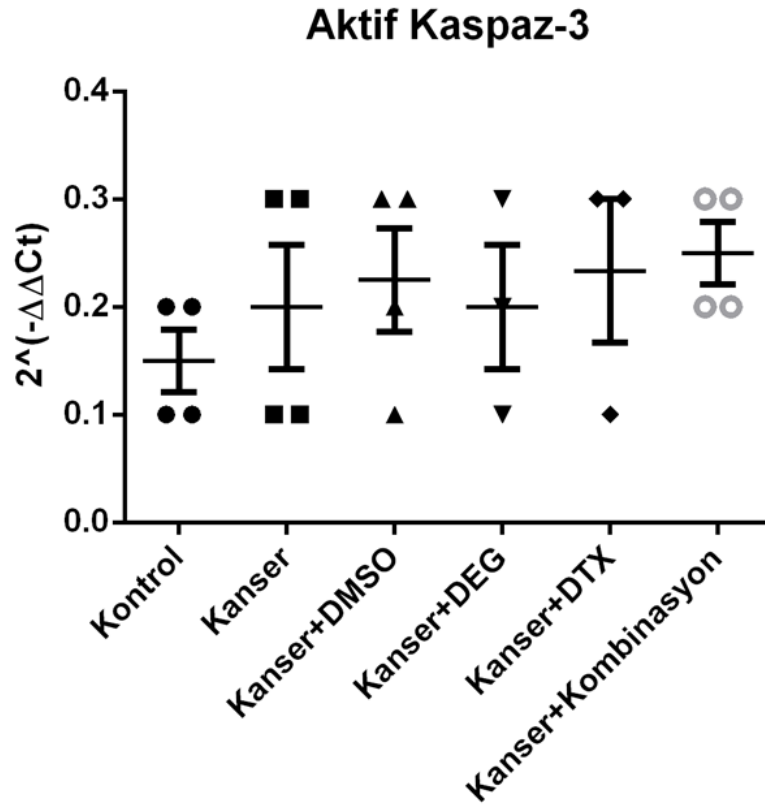
VEGF-A geninin gruplar arasında ekspresyonu incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (K-W analizi; $p=0,0026$). Yapılan post hoc analizi sonrası anlamlılığın sadece Kanser+DEG tedavi grubu ile tedavi olmayan gruplar (Kanser ve Kanser+DMSO) arasında olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Benzer şekilde, kombinasyon tedavisi grubu ile tedavi olmayan gruplar (Kanser ve Kanser+DMSO) arasında olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Kanser+DTX grubu ile hem tedavisiz hemde tedavili gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.11-5 Tümör dokusunda *VEGF-A* gen ekspresyon karşılaştırması

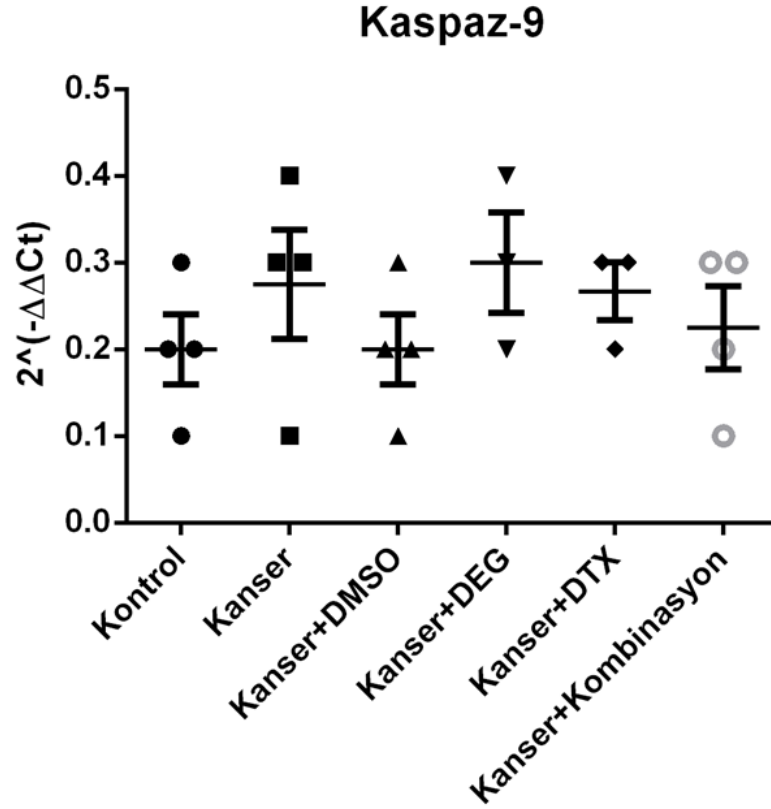
4.11.2. Akciğer Dokusunda Gen Ekspresyon Analizi

Aktif *kaspaz-3* geninin gruplar arasında ekspresyonu incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (K-W analizi; $p=0,750$). Post hoc Dunn's testi yapıldı ve grupların ikili karşılaştırmalarında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).



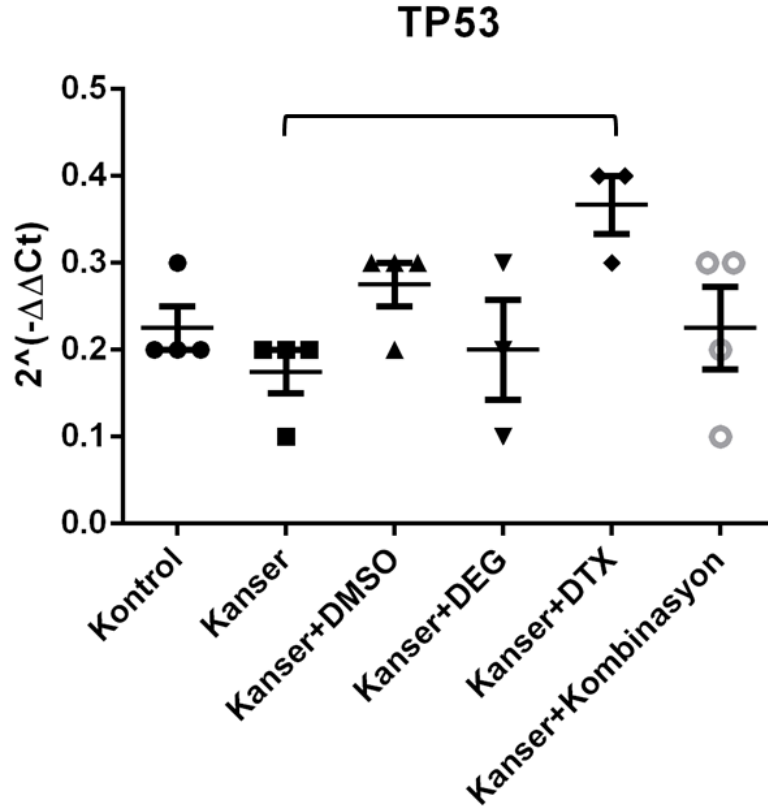
Şekil 4.11-6 Akciğer dokusunda Aktif *Kaspaz-3* gen ekspresyonu karşılaştırması

Kaspaz-9 geninin gruplar arasında ekspresyonu incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (K-W analizi; $p=0,460$). Post hoc Dunn's testi yapıldı ve grupların ikili karşılaştırmalarında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).



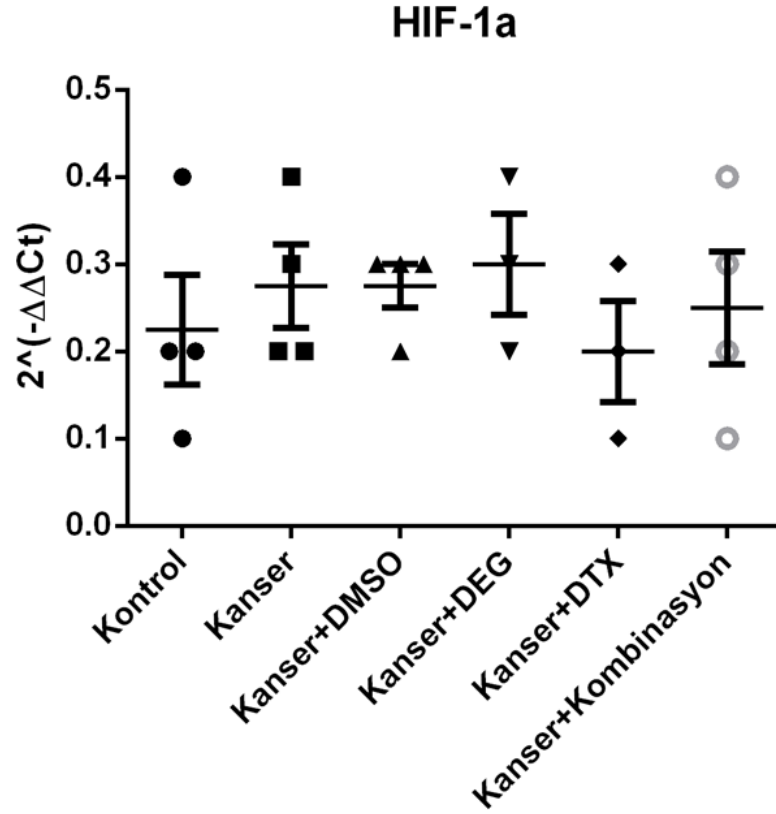
Şekil 4.11-7 Akciğer dokusunda *Kaspaz-9* gen ekspresyonu karşılaştırması

TP53 geninin gruplar arasında ekspresyonu incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (K-W analizi; $p=0,062$). Ancak, post hoc Dunn's testi yapılması sonrasında sadece Kanser ve Kanser+DTX grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).



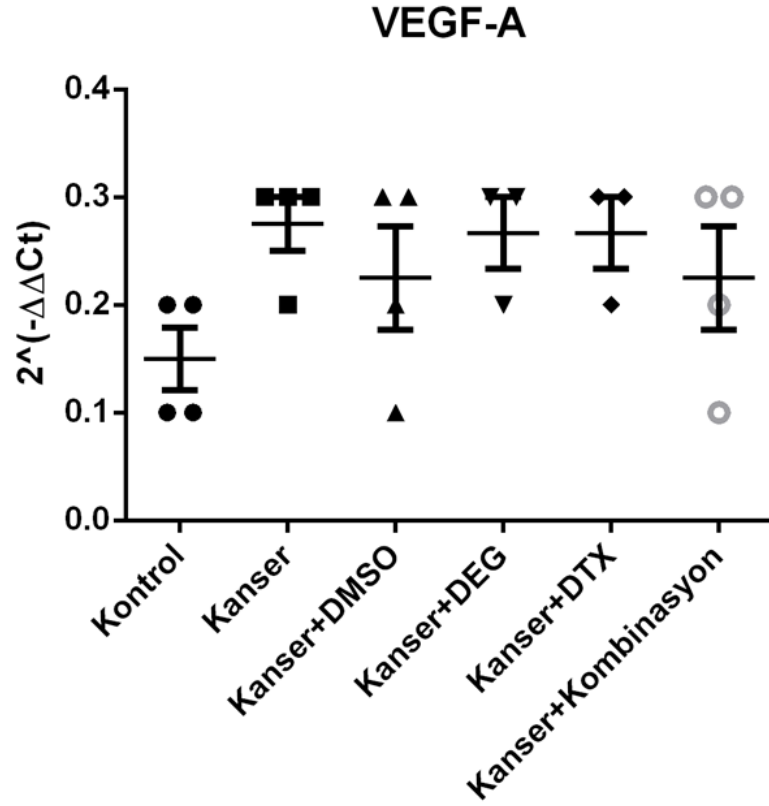
Şekil 4.11-8 Akciğer dokusunda *TP53* gen ekspresyonu karşılaştırması

HIF-1a geninin gruplar arasında ekspresyonu incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (K-W analizi; $p=0,638$). Post hoc Dunn's testi yapıldı ve grupların ikili karşılaştırmalarında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).



Şekil 4.11-9 Akciğer dokusunda *HIF-1a* gen ekspresyonu karşılaştırması

VEGF-A geninin gruplar arasında ekspresyonu incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (K-W analizi; $p=0,146$). Post hoc Dunn's testi yapıldı ve grupların ikili karşılaştırmalarında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).



Şekil 4.11-10 Akciğer dokusunda *VEGF-A* gen ekspresyonu karşılaştırması

5. TARTIŞMA

Taksanlar, kanser tedavisinde kullanılan güçlü kemoterapötiklerdir. Dosetaksel, KHDAK'ın standart tedavisinde yer alan ve 1. basamak tedavide kullanılan oldukça toksik bir ajandır. Dosetaksel'in şiddetli derecede görülen yan etkileri alopesi, nötropeni, ödem, bitkinlik, sıvı retansiyonu, hipersensitivite reaksiyonları ve deri ve tırnak toksisitesidir. Dosetaksel'in yan etkilerinin şiddetine göre tedavi rejiminde alınan önlemler; doz ayarlanması, kombine tedaviye geçiş, tedaviye ara verilmesi yada granülosit (bazofil, nötrofil, eozinofil) ve monosit hücrelerinin yapımını uyaran granülosit monosit koloni stimüle edici faktörlerin (GM-CSF) kullanılmasıdır (133–135).

Dosetakselin oldukça toksik bir ajan olması nedeniyle sitotoksitesini azaltmaya ya da engellemeye ve sağaltıma katkısını arttırmaya yönelik araştırmalar yapılmasını da akla getirmektedir. Dosetaksel ile kemoprevantif ajanların akciğer kanseri *in vitro* ve *in vivo* modeller üzerinde birlikte kullanımını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (86, 89, 136–138). Son zamanlarda, bitkisel moleküller ve bunların yarı sentetik modifiye türevleri çok az yan etki gösterdiklerinden dolayı, akciğer kanseri tedavisi için dikkat çekici ve tedavi rejiminde aday bir ajan olarak kabul edilmelerini sağlamıştır.

Yaklaşık 2003 yılından bu zamana kadar Deguelin ile ilgili öncelikle patent başvurusu yapılmış ve sonrasında farklı araştırmacıların da bu molekülü farklı kanser türleri üzerinde çalışmasıyla literatüre 100'e yakın yayın kazandırılmıştır ve kazandırılmaya devam edilmektedir. Deguelin'in, yeni bir anti-kanser ajan adayı olabileceği literatürde tartışılmış ve önemli hücre sinyal ileti yolları ve mekanizmaları üzerinde çalışılmıştır.

Hedefimiz bu tez çalışmasında, Deguelin'i özellikle KHDAK'nin *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda etkinliğini, standart tedaviye göre hem karşılaştırılması hem de katkısının nasıl olacağını araştırmak olmuştur. Bu bağlamda, KHDAK'ın tedavisinde kullanılan Dosetaksel ile potansiyel bir ajan olan Deguelin'i, hem tekli hem de ikili kombinasyon halinde tedavi planında uygulandı. Akciğer kanseri *in vitro* modelinde,

Dosetaksel tedavisine Deguelin'in eklenmesi ile anti-kanser etkinlikleri, hücre döngüsü ve apoptozis, migrasyon, 3B anjiyogenezis (tüp formasyon) üzerine etkileri ve *in vivo* deney modelinde ise sağkalım, tümör volümü ve apoptozis ile anjiyogenezisin ana kavşak molekülleri açısından incelendi. Literatürde, bu moleküllerin aynı anda tekli ve bu moleküllerin kullanılması ile oluşturulmuş yarı doz kombinasyonları ile ilgili bir çalışmayla şimdilik karşılaşılmadığından, bulgularımızın literatüre önemli bir katkı sağlayacağını öngörüyoruz. Bu bağlamda, *Mus musculus* LAK hücre hattı ve C57BL türü deney hayvanı kullanılmıştır.

Çalışmamızın omurgasını oluşturan hipotezleri test etmek için iki hücre hattı (LAK ve HUVEC) ve bir fare (C57BL/6) modeli üzerinde çalışıldı. Deguelin'in inhibitör konsantrasyonunda kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellediği hipotezini **(H1)** LAK hücre hattında hücre canlılık ve etkin dozu (IK50) belirleme yöntemi ile CCK8 kullanarak test edildi, etkin doz bulundu ve hipotezimiz doğrulanmış oldu. Hu ve ark. LAK hücre hattının VEGF-D yüksek ekspresyonlu hali için indüklenmiş modelini kullanmışlar ve bu geliştirilmiş hücre hattı üzerinde 48 saatlik IK50 dozu olarak 100 nM bulmuşlardır (124). Bizim çalışmamızda bulunan doz ise 25,8 nM'dür ve normal hücre hattı üzerinde elde edilen sonuca göre yaklaşık 4 katı kadar fark bulunmaktadır. Buradan elde edilen kat farkı deney hayvanı modelinde Deguelin dozu belirlenmesinde kullanılmıştır. Literatürde, normal LAK hücre hattı üzerinde elde edilmiş Deguelin IK50 dozuna rastlanmamıştır. Bu nedenle bulduğumuz bu doz sonucu (25,8 nM) yapılacak başka çalışmalara da fikir vereceği öngörülmektedir.

DEG uygulanmış LAK hücre hattında, kontrol grubuna kıyasla nekrotik ve apoptotik hücre oranlarında anlamlı bir artış gözlemlenmiş, hipotezimizin **(H2)** doğrultusunda DEG hücre döngüsünün G₁/S fazında önemli bir etkiye sahip olmuştur. Murillo ve ark.'nın Deguelin kullanarak yapmış oldukları çalışmada kolon kanser hücrelerinde hücre döngüsü ve apoptozisde benzer sonuçlar almışlar, G₁/S fazında hücrelerin alıkondüğünü belirtmişlerdir (139). Lee ve ark.'nın premalign insan bronşiyal epitel hücrelerinde Deguelin'in etkilerini hücre döngüsü analizlerinde değerlendirmişler

ve benzer şekilde aynı fazda hücrelerin büyümelerinin durdurulduğu ve apoptozise yönlendirildiğini açıklamışlardır (140). Deguelin tedavisinin etki mekanizmasını da şu şekilde açıklamışlardır: “skuamöz insan bronşiyal epitel hücrelerinde Bcl-2 protein seviyelerini etkilememiş ancak proapoptotik protein p53 ve sikline bağımlı kinaz inhibitörleri olan p21 ve p27'nin ekspresyon seviyelerini artırarak yaptığını” bahsetmişlerdir (140).

Ayrıca, DEG'in hücre göçüne etkisini test ettiğimiz migrasyon deneyinde hipotezimizle (**H3**) uyumlu olarak hücre göçünün kontrol grubuna oranla oldukça anlamlı şekilde engellendiği gözlemlenmiştir. Hu ve ark.'nın benzer hücre hattında Deguelin ile yapmış oldukları çalışmaya kıyasla paralel sonuçlar alınmıştır (124). Benzer bir araştırma, Zhao ve ark.'nın insan hücre hatları (A549 ve H460) üzerinde yapmış oldukları “transwell chamber invazyon” metodu ile DEG'in 10 ve 20 mikromolar dozları ile migrasyon ve invazyon aşamasında başarı elde ettiklerini söylemişlerdir (141).

DEG, HUVEC hücre hattında olduğu gibi LAK hücrelerinin de anjiyogenezis gelişimini engellemiştir ve bu inhibisyon ile hipotezimiz (**H4**) doğrulanmıştır. Bu metod ve benzer anjiyogenik metod kullanılarak literatüre göre karşılaştırma yapabileceğimiz birkaç çalışma bulunmuştur. Lee ve ark.'nın hepatosellüler karsinoma hücre hatlarını (HepG2, Huh7 ve SK-Hep1) kullanarak Deguelin'in anti-anjiyogenik etkisini ($IK_{50}=0,62$ mikromolar) bulmuşlardır (142).

DTX ajanının etki sonuçları beklenildiği gibi literatür ile uyumlu çıkmıştır. Tedavi etki mekanizması iyi bilinen molekülün çalışmamızda hücre döngüsünde hipotezimiz ile uyumlu olarak (**H5**) G_2+M fazında etkili olduğunu göstermiştir ve literatür ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (143, 144). Hücre göçünde (migrasyon), LAK hücre hattı üzerinde etkilidir (**H6**) ama bu hücre hattı ile yapılmış çalışmaya rastlanmadığı için karşılaştırma yapılamamıştır.

DTX, LAK hücre hattı ile oluşturulan 3B anjiyogenezisin (tubular formasyon) inhibisyonunda etkili olmazken HUVEC hücre hattında etkili sonuçların alındığı görülmüştür (**H7**). Bu metod kullanılarak meme hücre hattı üzerinde DTX'in etkisi araştırılmış ancak yapılan çalışmada tekli dozu yerine kombine dozunu direk uygulamışlar ve etkinliğini kombinasyon dozu üzerinden değerlendirmeye almışlardır (145). DTX, LAK hücre hattında etkili olmaması tümörijenik anjiyogenezisin baskılanmasında etkili olmayacağı sonucuna varılmış ve deney hayvanı modeli ile doğrulanması gerektiği sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Araştırmamızda, DTX ve DEG 'in yarı etkili dozları olan kombinasyon dozunun [DEG+DTX]/2 LAK hücre göçünün (migrasyonu) yavaşlatılması ya da engellenmesinde sinerjistik etki oluşmuş ve etkili (**H8**) olduğu görülmüştür. DTX ile ilgili birçok çalışmada farklı kemoterapötik ajanlar, hedefe yönelik tedaviler (MAb vb.) ve radyasyon tedavisi ile kombinasyonları kullanılmış, etkili sonuçların alındığı görülmüştür (143,146,147). Belirlediğimiz yarı dozlu kombinasyonun hücre hattı çalışmalarında 3B anjiyogenezisin (tubular formasyon) üzerine aldığımız olumlu sonuçların (**H9**) invazyon ve tümörijenik anjiyogenezisin inhibisyonunda etkili olabileceğini öngörüyoruz. DTX ve DEG birlikte kullanılarak anjiyogenezis metodu üzerinde etkisinin incelendiği çalışmaya literatürde rastlanmadığı için alınan sonuçların değeri artmaktadır ve *in vivo* deney modeli ile birlikte gelecekte faz çalışmalarına ışık tutacaktır. İleri evre KHDAK'da çeşitli kombine tedavilerin uygulandığı; (148, 149) ve sağkalım oranının ne kadar arttırıldığına bağlı olarak başarı ile korele sayıldığı zorlu bir tedavi sürecidir.

Hücre kültürü deney modelinde DTX ve DEG'in ve kombinasyon dozunun migrasyon-invazyon ve anjiyogenezis metotlarında etkileri araştırılmış ve çıkan sonuçlar *in vivo* basamağına geçiş için uygun bulunmuştu. Deney hayvanı modelinde ise gruplar arasında sağkalım süreleri, tümör volümü, histolojik ve histopatolojik değerlendirmeler ile gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırması yapılmıştır. Tedavi olan ve olmayan

grupların birlikte sağkalım oranları ve süreleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı için sağkalım oranları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ve hipotezimizin **(H10)** aksine bir durum gelişmiştir. Ancak, özellikle DTX grubundaki ölüm sayısının yüksek ve sağkalım süresinin diğer tedavi gruplarına ve hatta tedavi olmayan kanserli gruplara göre de düşük olmasının nedeni ajana bağlı yan etki gelişmesini akla getirmektedir. DTX (E) grubunda, deneklerde tedavinin 3. porsiyonundan sonra kıllarında sararmalarla birlikte dökülmelerin olması, halsizlik, hareketlerde yavaşlama, şişkinlik-ödem ve sakrifikasyon aşamasında görülen hemorajiden dolayı tedavi aşamasının zor geçtiğini gösteriyordu. Gelecek çalışmalarda bu şekilde kanser modeli geliştirildiğinde sağkalım analizinde farkın belirginleşmesi için gruplarda kontrol hariç denek sayısının artırılması gerekmektedir. Gruplarda, tümör volümleri karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu tespit edilmiş ve tekli ve kombine tedavilerin tümör volümünü azalttığı **(H11, H12, H13)** görülmüştür. DEG tek başına tümör volümünü azaltmada oldukça başarılıdır. Kombinasyon tedavi grubunda, yarı doz uygulama olmasına rağmen hemen hemen tekli tedaviler kadar etkili olarak tümör volümünü azaltması beklentileri karşılamıştır. Literatürde yarı doz uygulamasına bağlı bu şekilde bir yöntem denemesine KHDAK'ın tedavisinde *in vitro* ve *in vivo* model çalışmalarında rastlanılmamıştır.

Çalışmada ajanların, apoptozis yollarındaki moleküler sinyal ileti yollarında anahtar rol alan belirlenen hedef gen bölgelerine (*TP53*, *kaspaz-9*, *aktif kaspaz-3*) ve özellikle apoptozisin gerçekleştiğini gösteren İHK boyama aktif kaspaz-3 parametresi sonuçlarına göre değerlendirme yapılmıştır. Buna bağlı olarak DEG'in, apoptozisin iki farklı sinyal ileti yolağı olan intrensek (*kaspaz-9*) ve ekstrensek (aktif *kaspaz-3*) yolağı üzerinden etki ettiği anlaşılmaktadır **(H14)** ve tümör dokusunda aktif *kaspaz-3* gen ekspresyon düzeyinin beta aktine göre yaklaşık 4 kat arttığı belirlenmiştir. Aktif kaspaz-3 İHK boyamasına bağlı değerlendirmede DEG'in DTX ve kombinasyon gruplarına göre apoptoziste daha etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca DEG, hücrede mitokondrinin ETZ'sinde görev alan kompleks I ünitesinin NADH: ubikinon oksidoredüktaz

(kompleks I) inhibitörü olduğu için ATP seviyelerinin hızlı tükenmesi; (25, 150, 151) ve beraberinde ATP üretilmemesine neden olacağından dolayı mitokondriyal yani intrinsek apoptozis yolağını tetikletici görevi olabilir; (25, 152) ve *kaspaz-9*'un aşırı ekspresyonu bu durumu akla getirmektedir. Kaspaz-9'un ekspresyonu *TP53* ile de ilişkilidir; (153) ve aslında kemoteropötik direnç oluşumunda da kilit role sahip kaspaz-9 apoptozisin gerçekleşmesinde stratejik öneme sahiptir (154). Xu ve ark. insan akciğer kanseri hücre hattı olan H1975 (KHDAC epitelyal adenokarsinom) üzerinde DEG'in 5 ve 20 μ M konsantrasyonlarını denemişler ve kaspaz-3 aktivitesinin GAPDH'a göre yaklaşık 1 kat kadar ekspresyonu arttığını bulmuşlardır (155). Yan ve ark.'larının yapmış olduğu bir başka Deguelin aktivitesinin denendiği çalışmada insan NCI-H520 hücre hattında (skuamöz karsinom) 25 μ M konsantrasyonlarında ve aynı hücre hattı ile geliştirilen ksenograft deney hayvanı modelinde 4 mg/kg olan dozu gün aşırı olacak şekilde haftada 3 porsiyon olacak şekilde 3 hafta uygulamışlar ve aktif kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyon seviyelerini anlamlı arttırdığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ise *in vitro* ve *in vivo* Deguelin dozunun sırasıyla; 25,8 nM konsantrasyonda ve günlük 1mg/kg olarak uyguladığımızı metot bölümünde değinmiştik ve çok daha düşük dozlarda tedaviyi sağladığımızı ve aynı etkiyi aldığımızı düşünüyoruz. Dosetaksel, genel olarak hücre döngüsünde G2/M safhasında mitozun gerçekleşmesi esnasında mikrotübüllerdeki beta tubuline spesifik bağlanarak depolarizasyonunun gerçekleşmesini önleyerek stabil kalmasını zorlayarak hücreyi apoptozise götürür. Bizim çalışmamızda, İHK boyamada aktif kaspaz-3 ve beraberinde apoptotik öneme sahip proteinlerin (aktif kaspaz-3, kaspaz-9, TP53) ekspresyonlarının artması; (156–159) DTX'in başarısını birkez daha ortaya koymaktadır (**H15**) ve halen dünyada, birinci basamakta ve ileri evre KHDAC'nın kombinasyolarında kullanılma nedenini tekrar bize ispatlamıştır. Ancak, yan etkilerinin ağır oluşu kombinasyon denemelerinde dozunun azaltılmasına bağlı çalışmaları akla getirmiştir. Çalışmamızda, [DEG+DTX]/2 kombinasyon dozunu kullanarak, *in vivo* deney modelinde apoptozis yollarını aktive ettiğini göstermiş olduk ve (**H16**) hipotezimizi doğruladık. Her ne kadar tekli dozlar kadar istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmada da apoptozisi tetikler düzeyde etkinin oluşması başarı niteliğindedir. Burdan çıkarım yaparsak, sadece

kombinasyonun konsantrasyonu değil aynı zamanda tedavi rejimi yani metronomik yönteminde bu tür kombinasyonlar için tekrar ayarlanması başarıyı arttırabilir.

VEGF aşırı ekspresyonu, KHDAK ve KHAK olan hastalarda kötü prognozun bir göstergesidir (160). HIF-1a, hipoksi koşullarda ekspresyonu artan ve VEGF’i indükleyen, tümörijenik anjiyogenezis sinyal ileti yolağının düzenleyici proteinidir (97). Çalışmamızda tümör dokularında, DEG ajanı HIF-1a ve beraberinde VEGF’in baskılanmasında anlamlı rol oynamış; (161) ve gen ekspresyon düzeylerinde tedavi içermeyen gruplara göre negatif korele ve beta aktine göre yaklaşık 1,5 kat ekspresyon olurken diğerlerinden daha düşük ekspresyon düzeyine sahip olmuştur (**H17**). Oh ve ark.’nın yapmış olduğu araştırmaya göre insan KHDAK olan H1299 (p53 mutant) hücre hattı tubular formasyon metodunda 100 nM konsantrasyonda *in vitro* ortamda HIF-1a’yı inhibe ettiğini göstermişlerdir (97). Kombinasyon dozunda ise HIF-1a için diğer tedavi olmayan gruplara göre anlamlı ekspresyon farkı olmasa da VEGF için tam tersinedir. [DEG+DTX]/2 kombinasyon dozu, *in vivo* deney modelinde anjiyogenezis yolağında VEGF için etkili olurken ve HIF-1a üzerinde inhibitör etkisini istatistiksel olarak anlamlı şekilde gösterememiştir (**H19**). DTX, *in vivo* deney modelinde anjiyogenezis yolağında VEGF ve HIF-1a üzerinde inhibitör etkisi olmuş gibi görünse de (**H18**) bu durum istatistiksel değerlendirmeye yansımamış ve anlamlı fark bulunmamıştır. Bazı klinik çalışmalarda DTX’in ikinci basamak tedavisinde farklı ajanlarla birlikte kombinasyonları faz II ve faz III çalışmalarında etkileri denenmiş ancak yüksek VEGF düzeylerinde ve progresyonsuz sağkalım oranlarında (PFS) kombinasyonlu tedavisinde sağkalımdaki süreyi arttırmış olsa bile istatistiksel anlamlı fark oluşturmamıştır (162). Dosetaksel’in tümörijenik anjiyogenezis üzerinde etkisi hala net açıklanmış olmamakla birlikte bazı çalışmalarda, hücreler için sitotoksik olduğundan dolayı HIF-1a’nın birikmesini inhibe ettiği için direk değil dolaylı etkisinin olacağı yönde hipotezler vardır (163,164). Ek olarak, Dosetaksel’in HIF-1a protein ekspresyonunu düzenlediği, ancak mRNA’yı düzenlemediği bildirilmiştir (165). Dosetaksel’in hipoksi koşullar altında farklı solid insan kanser türlerinde (RKO, HeLa, MCF7, MDA-MB-231, SK-BR3), HIF-

1a inhibisyonunu içeren çalışmada 100 nM konsantrasyon ve %0,5'lik O₂'li ortamda (hipoksi ortam) etkili olabileceği gösterilirken aynı ortam ve konsantrasyonda VEGF'in inhibisyonunda etkili olamadığı görülmüştür (166). Bu bilgilere dayanarak tedavide kurduğumuz kombinasyon stratejisine göre ajanların birbirini destekleyici olabileceği görülmektedir. Deguelin, mitokondride solunum metabolizmasını kompleks I üzerinden inhibisyona neden olduğu ve farklı yollar; (161) üzerinden de etkisi olduğu bilindiği için kanser hücresinin ATP üretimini azaltarak ve hipoksi ortam oluşturarak DTX'in etkisini arttırmada yardımcı olabileceği söylenebilir. Ancak, kombinasyon tedavisinin gün aşırı değil belki de 24 saat esas alınarak uygulanması başarıyı arttırabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Deguelin'in, akciğer kanseri hücre hatlarında etkin konsantrasyonda kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı-engellediği hipotezi çalışmadaki bulgularımız ile doğrulanmıştır.

DEG+DTX kombinasyonunun akciğer kanseri hücrelerinin çoğalmasında, ilaçların tek başlarına kullanımlarına göre *in vitro* ortamda daha başarılıyken, *in vivo* modelde ise tümör volümü karşılaştırmalarında ve apoptozis başarı karşılaştırmasında beklediğimiz gibi olmamıştır. Ancak, farklı mekanizmalar üzerinden etkiye sahip ajanların, etkin dozları doğru tedavi rejimi ile birlikte kullanılarak “süpürücü kombinasyon” etkiye sahip olabilirler.

Bu etkiyi apoptoz yolaklarını kullanarak gerçekleştirebildiği ile ilgili öngörülerimiz hakkında yeterli sonuçlar kısmen de olsa elde edilmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle; Deguelin'in antikanser etkisi, kanser hücrelerini apoptozise yönlendirilebileceği gibi asıl önemli olan diğer bir görüş ise hücrelerin yayılımını azaltarak anti-anjiyojenik ve beraberinde anti-metastatik katkısının olabileceğini ortaya koyduk.

Sonuç olarak, KHDAK'ın *Mus musculus* cinsi *in vitro* ve *in vivo* deney modelinde Deguelin, antikanser ilaç adayı olarak etkilidir. Bu etkinin, standart tedavide kullanılan Dosetaksel ile artması da düşük doz kombinasyonların yapılabilmesine olanak vermesi açısından önemlidir. Antikanser etkinliği ve bu etkinin mekanizmalarını ortaya çıkarıcı ana yolak çalışmaları bu tez araştırmasında yapılmıştır. Gelecekte yapılacak çalışmada kombinasyon dozunun ve metronomik tedavi protokolünün tekrar gözden geçirilerek daha kapsamlı bir çalışma tasarlanabilir ve daha etkili sonuçlar alınabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021 Jan;71(1):7–33.
2. Spiro SG, Porter JC. Lung cancer--where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Nov 1;166(9):1166–96.
3. Brennan P, Hainaut P, Boffetta P. Genetics of lung-cancer susceptibility. *Lancet Oncol.* 2011 Apr;12(4):399–408.
4. Jamil A, Kasi A. Lung Metastasis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
5. Cafferata MA, Chiaramondia M, Monetti F, Ardizzoni A. Complete spontaneous remission of non-small-cell lung cancer: a case report. *Lung Cancer.* 2004 Aug;45(2):263–6.
6. Cortes JE, Pazdur R. Docetaxel. *J Clin Oncol.* 1995 Oct;13(10):2643–55.
7. Fossella FV, Lee JS, Shin DM, Calayag M, Huber M, Perez-Soler R, ve ark. Phase II study of docetaxel for advanced or metastatic platinum-refractory non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 1995 Mar;13(3):645–51.
8. Friedland D, Cohen J, Miller R Jr, Voloshin M, Gluckman R, Lembersky B, ve ark. A phase II trial of docetaxel (Taxotere) in hormone-refractory prostate cancer: correlation of antitumor effect to phosphorylation of Bcl-2. *Semin Oncol.* 1999 Oct;26(5 Suppl 17):19–23.
9. Escobar PF, Rose PG. Docetaxel in ovarian cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2005 Dec;6(15):2719–26.
10. Vici P, Viola G, Botti C, Rossi S, Vitucci C, Corsetti S, ve ark. Docetaxel in the adjuvant therapy of HER-2 positive breast cancer patients. *Clin Ter.* 2008;159(6):449–52.
11. d'Amato TA, Landreneau RJ, Ricketts W, Huang W, Parker R, Mechetner E, ve ark. Chemotherapy resistance and oncogene expression in non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007 Feb 1;133(2):352–63.
12. Davies AM, Lara PN Jr, Mack PC, Gandara DR. Docetaxel in non-small cell lung cancer: a review. *Expert Opin Pharmacother.* 2003 Apr;4(4):553–65.
13. Comer AM, Goa KL. Docetaxel: a review of its use in non-small cell lung cancer. *Drugs Aging.* 2000 Jul;17(1):53–80.

14. Ramaswamy B, Puhalla S. Docetaxel: a tubulin-stabilizing agent approved for the management of several solid tumors. *Drugs Today* . 2006 Apr;42(4):265–79.
15. Nehmé A, Varadarajan P, Sellakumar G, Gerhold M, Niedner H, Zhang Q, ve ark. Modulation of docetaxel-induced apoptosis and cell cycle arrest by all- trans retinoic acid in prostate cancer cells. *Br J Cancer*. 2001 Jun 1;84(11):1571–6.
16. Kumar S, Paul S, Walia YK, Kumar A, Singhal P. Therapeutic potential of medicinal plants: a review. *J Biol Chem Chron*. 2015;1(1):46–54.
17. Anand U, Jacobo-Herrera N, Altemimi A, Lakhssassi N. A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. *Metabolites* [Internet]. 2019 Nov 1;9(11). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo9110258>
18. Tiwari PS, Malik JK. A Comprehensive Review on Botanicals as Anti-ulcer Therapeutics: Prospective Avenues of Biocompatible Drug Discovery [Internet]. Vol. 03, *Scholars International Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2020. p. 27–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.36348/sijtcm.2020.v03i02.003>
19. Hong S-J, Kim J-T, Kim S-J, Cho N-C, Kim K, Lee S, ve ark. An Electrophilic Deguelin Analogue Inhibits STAT3 Signaling in H-Ras-Transformed Human Mammary Epithelial Cells: The Cysteine 259 Residue as a Potential Target [Internet]. Vol. 8, *Biomedicines*. 2020. p. 407. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines8100407>
20. Wenjie J, Yuchun F, Chunji G, Yunhui W, Jie P. Extraction and purification of deguelin from *Derris trifoliata* lour root. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. 2010 Jan 12;2(4):98–103.
21. Lee H-Y. Deguelin as a chemopreventive agent for lung cancer. *World Patent*. 2004032876A3.
22. Tuli HS, Mittal S, Loka M, Aggarwal V, Aggarwal D, Masurkar A, ve ark. Deguelin targets multiple oncogenic signaling pathways to combat human malignancies. *Pharmacol Res*. 2021 Apr;166:105487.
23. Baba Y, Maeda T, Suzuki A, Takada S, Fujii M, Kato Y. Deguelin Potentiates Apoptotic Activity of an EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor (AG1478) in PIK3CA-Mutated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Jan 26;18(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18020262>
24. Li W, Gao F, Ma X, Wang R, Dong X, Wang W. Deguelin inhibits non-small cell lung cancer via down-regulating Hexokinases II-mediated glycolysis. *Oncotarget*. 2017 May 16;8(20):32586–99.

25. Carpenter EL, Chagani S, Nelson D, Cassidy PB, Laws M, Ganguli-Indra G, et al. Mitochondrial complex I inhibitor deguelin induces metabolic reprogramming and sensitizes vemurafenib-resistant BRAFV600E mutation bearing metastatic melanoma cells. *Mol Carcinog*. 2019 Sep;58(9):1680–90.
26. Kocdor MA, Cengiz H, Ates H, Kocdor H. Inhibition of Cancer Stem-Like Phenotype by Curcumin and Deguelin in CAL-62 Anaplastic Thyroid Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem*. 2019;19(15):1887–98.
27. Mehta RR, Katta H, Kalra A, Patel R, Gupta A, Alimirah F, ve ark. Efficacy and mechanism of action of Deguelin in suppressing metastasis of 4T1 cells. *Clin Exp Metastasis*. 2013 Oct;30(7):855–66.
28. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993 Aug 1;72(3 Suppl):962–70.
29. Bast RC, Hait WN, Kufe DW, Weichselbaum RR, Holland JF, Croce CM, ve ark., editors. *Holland- Frei Cancer Medicine*. Wiley; 2016.
30. Malarkey DE, Hoenerhoff M, Maronpot RR. Chapter 5 - Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, editors. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2013. p. 107–46.
31. Scott RE, WILLE JJ Jr, Wier ML. Mechanisms for the initiation and promotion of carcinogenesis: a review and a new concept. *Mayo Clin Proc [Internet]*. 1984; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025619612602444>
32. Tomashefski JF, Farver CF. Anatomy and Histology of the Lung. In: Tomashefski JF, Cagle PT, Farver CF, Fraire AE, editors. *Dail and Hammar's Pulmonary Pathology: Volume I: Nonneoplastic Lung Disease*. New York, NY: Springer New York; 2008. p. 20–48.
33. Kılıç C. Torasik Konjenital Anomaliler ve Cerrahisi. Orhan Yücel OG, editor. Göztepe Mahallesi, Atatürk Caddesi, No: 18, Bala, Ankara, Türkiye.: Derman Tıbbi Yayıncılık; 2011. ((1. Baskı)).
34. Standring S. editor in chief. *Grays Anatomy*. Elsevier Churchill Livingstone; 2005.
35. Kaneko T, LePage GA. Growth characteristics and drug responses of a murine lung carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 1978 Jul;38(7):2084–90.
36. Sinnatamby CS, Last RJ. *Last's Anatomy : regional and applied*. Edinburgh: Elsevier/Churchill Livingstone; 2006.

37. Hirsch FR, Suda K, Wiens J, Bunn PA Jr. New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer. *Lancet*. 2016 Sep 3;388(10048):1012–24.
38. Hwang JK, Page BJ, Flynn D, Passmore L, McCaul E, Brady J, ve ark. Validation of the Eighth Edition TNM Lung Cancer Staging System. *J Thorac Oncol*. 2020 Apr 1;15(4):649–54.
39. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung Cancer [Internet]. Vol. 359, *New England Journal of Medicine*. 2008. p. 1367–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra0802714>
40. Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, ve ark. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet*. 2008 May;40(5):616–22.
41. Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, ve ark. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*. 2008 Apr 3;452(7187):633–7.
42. Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, ve ark. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*. 2008 Apr 3;452(7187):638–42.
43. Kris MG, Johnson BE, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II, Aronson SL, ve ark. Identification of driver mutations in tumor specimens from 1,000 patients with lung adenocarcinoma: The NCI's Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC). *J Clin Oncol*. 2011 Jun 20;29(18_suppl):CRA7506–CRA7506.
44. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, ve ark. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012 Feb 12;18(3):378–81.
45. Bergethon K, Shaw AT, Ou S-HI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, ve ark. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10;30(8):863–70.
46. Larsen JE, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*. 2011 Dec;32(4):703–40.
47. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, ve ark. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med*. 2004 May 20;350(21):2129–39.
48. Stephens P, Hunter C, Bignell G, Edkins S, Davies H, Teague J, ve ark. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature*. 2004 Sep 30;431(7008):525–6.

49. Gazdar AF, Girard L, Lockwood WW, Lam WL, Minna JD. Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Sep 8;102(17):1310–21.
50. Memon AA, Jakobsen S, Dagnaes-Hansen F. Positron emission tomography (PET) imaging with [11C]-labeled erlotinib: a micro-PET study on mice with lung tumor xenografts. *Cancer Res* [Internet]. 2009; Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/69/3/873.short>
51. Steiner P, Joynes C, Bassi R, Wang S, Tonra JR. Tumor growth inhibition with cetuximab and chemotherapy in non-small cell lung cancer xenografts expressing wild-type and mutated epidermal growth factor *Clin Cancer Res* [Internet]. 2007; Available from: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/13/5/1540.short>
52. Sakuma Y, Matsukuma S, Nakamura Y, Yoshihara M, Koizume S, Sekiguchi H, ve ark. Enhanced autophagy is required for survival in EGFR-independent EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells. *Lab Invest.* 2013 Oct;93(10):1137–46.
53. Akhtar S, Meeran SM, Katiyar N, Katiyar SK. Grape Seed Proanthocyanidins Inhibit the Growth of Human Non-Small Cell Lung Cancer Xenografts by Targeting Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3, Tumor Cell Proliferation, and Angiogenic Factors [Internet]. Vol. 15, *Clinical Cancer Research*. 2009. p. 821–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-1901>
54. Chen M-F, Chen W-C, Wu C-T, Lin P-Y, Shau H, Liao S-K, ve ark. p53 status is a major determinant of effects of decreasing peroxiredoxin I expression on tumor growth and response of lung cancer cells to treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Dec 1;66(5):1461–72.
55. Wang H, Li M, Rinehart JJ, Zhang R. Pretreatment with dexamethasone increases antitumor activity of carboplatin and gemcitabine in mice bearing human cancer xenografts: in vivo activity *Clin Cancer Res* [Internet]. 2004; Available from: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/10/5/1633.short>
56. McLemore TL, Liu MC, Blacker PC, Gregg M, Alley MC, Abbott BJ, ve ark. Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice. *Cancer Res.* 1987 Oct 1;47(19):5132–40.
57. Carter CA, Chen C, Brink C, Vincent P, Maxuitenko YY, Gilbert KS, ve ark. Sorafenib is efficacious and tolerated in combination with cytotoxic or cytostatic agents in preclinical models of human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007 Feb;59(2):183–95.
58. Feng Z, Zhao G, Yu L, Gough D, Howell SB. Preclinical efficacy studies of a novel nanoparticle-based formulation of paclitaxel that out-performs Abraxane. *Cancer*

Chemother Pharmacol. 2010 Apr;65(5):923–30.

59. Zhang X, Wu J. Establishing of the Transplanted Animal Models for Human Lung Cancer. *Journal of Nanjing Medical University*. 2009 Jan 1;23(1):1–5.
60. Kellar A, Egan C, Morris D. Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications. *Biomed Res Int*. 2015 May 3;2015:621324.
61. Zhang A-M, Fan Y, Yao Q, Ma H, Lin S, Zhu C-H, et al. Identification of a cancer stem-like population in the Lewis lung cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(3):761–6.
62. Bertram JS, Janik P. Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett*. 1980 Nov;11(1):63–73.
63. Navale AM. Animal models of cancer: a review. *Int J Pharm Pharm Sci* [Internet]. 2013; Available from: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.278.4215&rep=rep1&type=pdf>
64. Kim MP, Evans DB, Wang H, Abbruzzese JL, Fleming JB, Gallick GE. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc*. 2009 Oct 29;4(11):1670–80.
65. Bobek V, Kolostova K, Pinterova D, Boubelik M, Gurlich R, Hoffman RM. Tail spontaneous metastatic mouse model: comparison of metastatic potential of orthotopic and heterotopic models imaged by GFP and RFP protein. *In Vivo*. 2011 Nov;25(6):849–52.
66. Janker F, Weder W, Jang J-H, Jungraithmayr W. Preclinical, non-genetic models of lung adenocarcinoma: a comparative survey. *Oncotarget*. 2018 Jul 17;9(55):30527–38.
67. Murphy J. Pre-clinical Murine models: Syngeneic models for immuno-oncology. *MOJ Immunol* [Internet]. 2015 Sep 28;2(4). Available from: <https://medcraveonline.com/MOJI/pre-clinical-murine-models-syngeneic-models-for-immuno-oncology.html>
68. Dranoff G. Experimental mouse tumour models: what can be learnt about human cancer immunology? *Nat Rev Immunol*. 2011 Dec 2;12(1):61–6.
69. Vanlamsweerde A, Henry N, Vaes G. Heterogeneity of metastatic ability among clones from 3LL Lewis lung carcinoma [Internet]. Vol. 5, *Cell Biology International Reports*. 1981. p. 32. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0309-1651\(81\)90095-3](http://dx.doi.org/10.1016/0309-1651(81)90095-3)

70. Perez-Soler R. The role of erlotinib (Tarceva, OSI 774) in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Jun 15;10(12 Pt 2):4238s – 4240s.
71. Jung J. Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. *Toxicol Res* . 2014 Mar;30(1):1–5.
72. Bhimani J, Ball K, Stebbing J. Patient-derived xenograft models—the future of personalised cancer treatment. *Br J Cancer*. 2020 Jan 10;122(5):601–2.
73. Howard RB, Chu H, Zeligman BE, Marcell T, Bunn PA, McLemore TL, ve ark. Irradiated nude rat model for orthotopic human lung cancers. *Cancer Res*. 1991 Jun 15;51(12):3274–80.
74. Hastings RH, Burton DW, Quintana RA, Biederman E, Gujral A, Deftos LJ. Parathyroid hormone-related protein regulates the growth of orthotopic human lung tumors in athymic mice. *Cancer*. 2001 Sep 15;92(6):1402–10.
75. Thomas A, Liu SV, Subramaniam DS, Giaccone G. Refining the treatment of NSCLC according to histological and molecular subtypes. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015 Sep;12(9):511–26.
76. Ojima I, Lichtenthal B, Lee S, Wang C, Wang X. Taxane anticancer agents: a patent perspective. *Expert Opin Ther Pat*. 2016;26(1):1–20.
77. Du Q, Jiang G, Li S, Liu Y, Huang Z. Docetaxel increases the risk of severe infections in the treatment of non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Oncoscience*. 2018 Jul;5(7-8):220–38.
78. Cowart M. Analog-Based Drug Discovery Edited by Janos Fischer and C. Robin Ganellin. Wiley/VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. 2006. xxi 575 pp. 17.5 × 42.5 cm. ISBN 3527312579. \$180.00 [Internet]. Vol. 49, *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006. p. 4799–4799. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jm068024p>
79. Gueritte F. General and recent aspects of the chemistry and structure activity relationships of taxoids. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2001; Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2001/00000007/00000013/art00005>
80. Organization WH, Others. World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019 [Internet]. World Health Organization; 2019. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf>
81. Caraglia M, Giuberti G, Marra M, Di Gennaro E, Facchini G, Caponigro F, ve ark. Docetaxel induces p53-dependent apoptosis and synergizes with farnesyl

- transferase inhibitor r115777 in human epithelial cancer cells. *Front Biosci.* 2005 Sep 1;10:2566–75.
82. He X, Li C, Wu X, Yang G. Docetaxel inhibits the proliferation of non-small-cell lung cancer cells via upregulation of microRNA-7 expression. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Aug 1;8(8):9072–80.
 83. Lavelle F, Fizames C, Gueritte-Voegelein F, Guénard D, Potier P. Experimental properties of RP 56976, a taxol derivative. In: *Proc Am Assoc Cancer Res.* 1989. p. 566.
 84. Ringel I, Horwitz SB. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *J Natl Cancer Inst.* 1991 Feb 20;83(4):288–91.
 85. Liu B, Yang M, Li R, Ding Y, Qian X, Yu L, ve ark. The antitumor effect of novel docetaxel-loaded thermosensitive micelles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008 Jun;69(2):527–34.
 86. Kodama A, To H, Kinoshita T, Ieiri I, Higuchi S. Influence of dosing schedules on toxicity and antitumour effects of combined cisplatin and docetaxel treatment in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2009 May;61(5):615–21.
 87. Bissery MC, Guénard D, Guéritte-Voegelein F, Lavelle F. Experimental antitumor activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503), a taxol analogue. *Cancer Res.* 1991 Sep 15;51(18):4845–52.
 88. Bissery MC, Vrignaud P, Lavelle F, Chabot GG. Experimental antitumor activity and pharmacokinetics of the camptothecin analog irinotecan (CPT-11) in mice. *Anticancer Drugs.* 1996 Jun;7(4):437–60.
 89. Bissery MC, Vrignaud P, Bayssas M, Lavelle F. Docetaxel (RP 56976, Taxotere®) efficacy as a single agent or in combination against mammary tumors in mice. In: *Proc Am Assoc Cancer Res.* 1994. p. 327.
 90. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs [Internet]. Vol. 4, *Nature Reviews Cancer.* 2004. p. 253–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1317>
 91. Goldstein LJ. MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer.* 1996 Jun;32A(6):1039–50.
 92. Mozzetti S, Ferlini C, Concolino P, Filippetti F, Raspaglio G, Prislei S, ve ark. Class III β -Tubulin Overexpression Is a Prominent Mechanism of Paclitaxel Resistance in Ovarian Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2005 Jan 1;11(1):298–305.
 93. Baker J, Ajani J, Scotté F, Winther D, Martin M, Aapro MS, ve ark. Docetaxel-

- related side effects and their management. *Eur J Oncol Nurs*. 2009 Feb;13(1):49–59.
94. Yao H, Xu F, Wang G, Xie S, Li W, Yao H, ve ark. Design, synthesis, and biological evaluation of truncated deguelin derivatives as Hsp90 inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2019 Apr 1;167:485–98.
 95. Sundukov YN. First record of the ground beetle *Trechoblemus postilenatus* (Coleoptera, Carabidae) in Primorskii krai. *Far Eastern Entomologist* [Internet]. 2006; Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=11655236>
 96. Bortul R, Tazzari PL, Billi AM, Tabellini G, Mantovani I, Cappellini A, ve ark. Deguelin, A PI3K/AKT inhibitor, enhances chemosensitivity of leukaemia cells with an active PI3K/AKT pathway. *Br J Haematol*. 2005 Jun;129(5):677–86.
 97. Oh S-H, Woo JK, Jin Q, Kang H-J, Jeong J-W, Kim K-W, ve ark. Identification of novel antiangiogenic anticancer activities of deguelin targeting hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Int J Cancer*. 2008 Jan 1;122(1):5–14.
 98. Bao Z, Zhang P, Yao Y, Lu G, Tong Z, Yan B, ve ark. Deguelin Attenuates Allergic Airway Inflammation via Inhibition of NF-kb Pathway in Mice. *Int J Biol Sci*. 2017 Apr 8;13(4):492–504.
 99. Chen L, Jiang K, Chen H, Tang Y, Zhou X, Tan Y, ve ark. Deguelin induces apoptosis in colorectal cancer cells by activating the p38 MAPK pathway. *Cancer Manag Res*. 2019;11:95–105.
 100. Nguyen C-T, Ann J, Sahu R, Byun WS, Lee S, Nam G, ve ark. Discovery of novel anti-breast cancer agents derived from deguelin as inhibitors of heat shock protein 90 (HSP90). *Bioorg Med Chem Lett*. 2020 Sep 1;30(17):127374.
 101. Zhou H, Dong Y, Ma X, Xu J, Xu S. Development of a novel truncated deguelin derivative possessing nitric oxide donor as a potential anti-lung cancer agent. *Fitoterapia*. 2020 Oct;146:104670.
 102. Woo JK, Choi DS, Tran HT, Gilbert BE, Hong WK, Lee H-Y. Liposomal encapsulation of deguelin: evidence for enhanced antitumor activity in tobacco carcinogen-induced and oncogenic K-ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Prev Res* . 2009 Apr;2(4):361–9.
 103. Men K, Liu W, Li L, Duan X, Wang P, Gou M, ve ark. Delivering instilled hydrophobic drug to the bladder by a cationic nanoparticle and thermo-sensitive hydrogel composite system. *Nanoscale*. 2012 Oct 21;4(20):6425–33.
 104. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Feb 2;19(2). Available from:

<http://dx.doi.org/10.3390/ijms19020448>

105. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci.* 2020 May;77(9):1745–70.
106. Katayama Y, Uchino J, Chihara Y, Tamiya N, Kaneko Y, Yamada T, ve ark. Tumor Neovascularization and Developments in Therapeutics. *Cancers* [Internet]. 2019 Mar 6;11(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers11030316>
107. Cao Y, Gong Y, Liu L, Zhou Y, Fang X, Zhang C, ve ark. The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. *J Appl Toxicol.* 2017 Dec;37(12):1359–69.
108. Park H-J, Zhang Y, Georgescu SP, Johnson KL, Kong D, Galper JB. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Rev.* 2006;2(2):93–102.
109. Lee EC. Cytogenetic Analysis of Continuous Cell Lines. In: *The ACT Cytogenetics Laboratory Manual*, (MJ Barch, ed.) pp. 107-148. Raven Press, New York; 1991.
110. Counting cells in a hemocytometer - UK. [cited 2021 Apr 18]; Available from: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/counting-cells-in-a-hemacytometer.html>
111. Held P. An absorbance-based cytotoxicity assay using high absorptivity, water-soluble tetrazolium salts. Application Note BioTek Instruments, INC , Winooski, Vermont. 2009;5404.
112. ibidi. Wound Healing and Migration Assays [Internet]. ibidi.com. 2019 [cited 2021 Apr 24]. Available from: https://ibidi.com/img/cms/resources/AG/FL_AG_033_Wound_Healing_150dpi.pdf
113. ibidi GmbH. μ -Slide Angiogenesis [Internet]. ibidi.com. 2019 [cited 2021 Apr 24]. Available from: https://ibidi.com/img/cms/products/labware/open_standard/S_8150X_Angiogenesis/IN_8015X_Angio.pdf
114. Kurata T, Micksche M. Correlation of immune response with clinical stage in Lewis lung tumor-bearing mice. *Oncology.* 1978;35(4):155–9.
115. Gurney H. How to calculate the dose of chemotherapy. *Br J Cancer.* 2002 Apr 22;86(8):1297–302.

116. Aston WJ, Hope DE, Nowak AK, Robinson BW, Lake RA, Lesterhuis WJ. A systematic investigation of the maximum tolerated dose of cytotoxic chemotherapy with and without supportive care in mice. *BMC Cancer*. 2017 Oct 16;17(1):684.
117. Todorova VK, Kaufmann Y, Klimberg VS. Increased efficacy and reduced cardiotoxicity of metronomic treatment with cyclophosphamide in rat breast cancer. *Anticancer Res*. 2011 Jan;31(1):215–20.
118. Simsek C, Esin E, Yalcin S. Metronomic Chemotherapy: A Systematic Review of the Literature and Clinical Experience. *J Oncol [Internet]*. 2019 Mar 20 [cited 2021 Apr 28];2019. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jo/2019/5483791/>
119. Maiti R. Metronomic chemotherapy. *J Pharmacol Pharmacother*. 2014 Jul;5(3):186–92.
120. Nguyen MP, Lee D, Lee S-H, Lee H-E, Lee H-Y, Lee YM. Deguelin inhibits vasculogenic function of endothelial progenitor cells in tumor progression and metastasis via suppression of focal adhesion. *Oncotarget*. 2015 Jun 30;6(18):16588–600.
121. Fujiwara K, Armstrong D, Morgan M, Markman M. Principles and practice of intraperitoneal chemotherapy for ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 Jan;17(1):1–20.
122. Lemoine L, Sugarbaker P, Van der Speeten K. Drugs, doses, and durations of intraperitoneal chemotherapy: standardising HIPEC and EPIC for colorectal, appendiceal, gastric, ovarian peritoneal surface malignancies and peritoneal mesothelioma. *Int J Hyperthermia*. 2017 Jul 4;33(5):582–92.
123. Vrignaud P, Sémiond D, Lejeune P, Bouchard H, Calvet L, Combeau C, et al. Preclinical Antitumor Activity of Cabazitaxel, a Semisynthetic Taxane Active in Taxane-Resistant Tumors [Internet]. Vol. 19, *Clinical Cancer Research*. 2013. p. 2973–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-12-3146>
124. Hu J, Ye H, Fu A, Chen X, Wang Y, Chen X, et al. Deguelin--an inhibitor to tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis by downregulation of vascular endothelial cell growth factor-D in lung tumor model. *Int J Cancer*. 2010 Nov 15;127(10):2455–66.
125. Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 12: survival analysis. *Crit Care*. 2004 Oct;8(5):389–94.
126. Faustino-Rocha A, Oliveira PA, Pinho-Oliveira J, Teixeira-Guedes C, Soares-Maia R, da Costa RG, et al. Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Anim*. 2013 Jun;42(6):217–24.

127. Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc.* 2010 Jun;2010(6):db.prot5439.
128. Ambion, Life Technologies. PureLink® RNA Mini Kit [Internet]. <https://assets.thermofisher.com/>. 2012 [cited 2021 Apr 24]. Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf
129. AppliedBiosystems. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits [Internet]. <https://assets.thermofisher.com/>. 2016 [cited 2021 Apr 24]. Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4375222_HighCap_cDNA_ReverseTranscripKits_PI.pdf
130. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinform Biomath.* 2013 Aug;3(3):71–85.
131. Mammadov R, Suleyman B, Akturan S, Cimen FK, Kurt N, Suleyman Z, ve ark. Effect of lutein on methotrexate-induced oxidative lung damage in rats: a biochemical and histopathological assessment. *Korean J Intern Med.* 2019 Nov;34(6):1279–86.
132. Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EAG. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol.* 2003 Feb;199(2):221–8.
133. Chu Y, Wang L-X, Yang G, Ross HJ, Urba WJ, Prell R, ve ark. Efficacy of GM-CSF-producing tumor vaccine after docetaxel chemotherapy in mice bearing established Lewis lung carcinoma. *J Immunother.* 2006 Jul;29(4):367–80.
134. Yu W-L, Hua Z-C. Evaluation of effectiveness of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy to cancer patients after chemotherapy: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2018 Jun 15;9(46):28226–39.
135. Hong I-S. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Exp Mol Med.* 2016 Jul 1;48(7):e242–e242.
136. Nishizaki M, Meyn RE, Levy LB, Atkinson EN, White RA, Roth JA, ve ark. Synergistic inhibition of human lung cancer cell growth by adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in combination with docetaxel and radiation therapeutics in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2001 Sep;7(9):2887–97.
137. Kocdor H, Ates H, Aydin S, Cehreli R, Soyarat F, Kemanli P, ve ark. Zinc supplementation induces apoptosis and enhances antitumor efficacy of docetaxel in

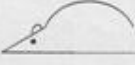
- non-small-cell lung cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Jul 27;9:3899–909.
138. Samadi N, Ghanbari P, Mohseni M, Tabasinezhad M, Sharifi S, Nazemieh H, ve ark. Combination therapy increases the efficacy of docetaxel, vinblastine and tamoxifen in cancer cells. *J Cancer Res Ther*. 2014 Jul;10(3):715–21.
 139. Murillo G, Salti GI, Kosmeder JW II, Pezzuto JM, Mehta RG. Deguelin inhibits the growth of colon cancer cells through the induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Eur J Cancer*. 2002 Dec 1;38(18):2446–54.
 140. Lee H-Y, Suh Y-A, Kosmeder JW, Pezzuto JM, Hong WK, Kurie JM. Deguelin-induced inhibition of cyclooxygenase-2 expression in human bronchial epithelial cells. *Clin Cancer Res*. 2004 Feb 1;10(3):1074–9.
 141. Zhao H, Jiao Y, Zhang Z. Deguelin inhibits the migration and invasion of lung cancer A549 and H460 cells via regulating actin cytoskeleton rearrangement. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Dec 1;8(12):15582–90.
 142. Lee J-H, Lee D-H, Lee H-S, Choi J-S, Kim K-W, Hong S-S. Deguelin inhibits human hepatocellular carcinoma by antiangiogenesis and apoptosis. *Oncol Rep*. 2008 Jul;20(1):129–34.
 143. Lu L, Zhang M, Wang X, Zhang Y, Chai Z, Ying M, ve ark. Baicalein enhances the antitumor efficacy of docetaxel on nonsmall cell lung cancer in a β -catenin-dependent manner. *Phytother Res*. 2020 Jan;34(1):104–17.
 144. Han TD, Shang DH, Tian Y. Docetaxel enhances apoptosis and G2/M cell cycle arrest by suppressing mitogen-activated protein kinase signaling in human renal clear cell carcinoma. *Genet Mol Res [Internet]*. 2016 Feb 5;15(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017321>
 145. Batista de Carvalho ALM, Medeiros PSC, Costa FM, Ribeiro VP, Sousa JB, Diniz C, ve ark. Anti-Invasive and Anti-Proliferative Synergism between Docetaxel and a Polynuclear Pd-Spermine Agent. *PLoS One*. 2016 Nov 23;11(11):e0167218.
 146. Gasparini G, Longo R, Fanelli M, Teicher BA. Combination of Antiangiogenic Therapy With Other Anticancer Therapies: Results, Challenges, and Open Questions. *J Clin Orthod*. 2005 Feb 20;23(6):1295–311.
 147. Janning M, Loges S. Anti-Angiogenics: Their Value in Lung Cancer Therapy. *Oncol Res Treat*. 2018 Mar 23;41(4):172–80.
 148. Tian W, Cao C, Shu L, Wu F. Anti-Angiogenic Therapy in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Onco Targets Ther*. 2020 Nov 24;13:12113–29.
 149. Qu J, Zhang Y, Chen X, Yang H, Zhou C, Yang N. Newly developed anti-

- angiogenic therapy in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2018 Feb 9;9(11):10147–63.
150. Gerhauser C, Lee SK, Kosmeder JW, Moriarty RM, Hamel E, Mehta RG, ve ark. Regulation of ornithine decarboxylase induction by deguelin, a natural product cancer chemopreventive agent. *Cancer Res*. 1997 Aug 15;57(16):3429–35.
 151. Boyd J, Han A. Deguelin and Its Role in Chronic Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2016;929:363–75.
 152. Yamada K, Yoshida K. Mechanical insights into the regulation of programmed cell death by p53 via mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2019 May 1;1866(5):839–48.
 153. Wu GS, Ding Z. Caspase 9 is required for p53-dependent apoptosis and chemosensitivity in a human ovarian cancer cell line. *Oncogene*. 2002 Jan 3;21(1):1–8.
 154. Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, ve ark. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*. 2017 Apr 4;8(14):23996–4008.
 155. Xu H, Li X, Ding W, Zeng X, Kong H, Wang H, ve ark. Deguelin induces the apoptosis of lung cancer cells through regulating a ROS driven Akt pathway. *Cancer Cell Int*. 2015 Feb 25;15:25.
 156. Wang T, Zhan Q, Peng X, Qiu Z, Zhao T. CCL2 influences the sensitivity of lung cancer A549 cells to docetaxel. *Oncol Lett*. 2018 Jul;16(1):1267–74.
 157. Ogura T, Tanaka Y, Tamaki H, Harada M. Docetaxel induces Bcl-2- and pro-apoptotic caspase-independent death of human prostate cancer DU145 cells. *Int J Oncol*. 2016 Jun;48(6):2330–8.
 158. Li R, Moudgil T, Ross HJ, Hu H-M. Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. *Cell Death Differ*. 2005 Feb 15;12(3):292–303.
 159. Jelínek M, Balušíková K, Schmiedlová M, Němcová-Fürstová V, Šrámek J, Stančíková J, ve ark. The role of individual caspases in cell death induction by taxanes in breast cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2015 Feb 4;15(1):8.
 160. Zhan P, Wang J, Lv X-J, Wang Q, Qiu L-X, Lin X-Q, ve ark. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J Thorac Oncol*. 2009 Sep;4(9):1094–103.
 161. Wang Y, Ma W, Zheng W. Deguelin, a novel anti-tumorigenic agent targeting apoptosis, cell cycle arrest and anti-angiogenesis for cancer chemoprevention. *Mol*

Clin Oncol. 2013 Mar;1(2):215–9.

162. Heymach JV, Johnson BE, Prager D, Csada E, Roubec J, Pesek M, ve ark. Randomized, placebo-controlled phase II study of vandetanib plus docetaxel in previously treated non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Sep 20;25(27):4270–7.
163. Escuin D, Kline ER, Giannakakou P. Both microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs inhibit hypoxia-inducible factor-1alpha accumulation and activity by disrupting microtubule function. *Cancer Res*. 2005 Oct 1;65(19):9021–8.
164. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Yao Xue Xue Bao*. 2015 Sep 1;5(5):378–89.
165. Mabeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, ve ark. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell*. 2003 Apr;3(4):363–75.
166. Oh E-T, Kim CW, Kim SJ, Lee J-S, Hong S-S, Park HJ. Docetaxel induced-JNK2/PHD1 signaling pathway increases degradation of HIF-1 α and causes cancer cell death under hypoxia. *Sci Rep*. 2016 Jun 6;6:27382.

8. EKLER

 **DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 02/09/2016
Toplantı Tarihi : 26 Nisan 2016

Sayın, Doç.Dr.Hilal KOÇDOR
Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji A.D

61/2014 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Deneysel Akciğer Kanseri Modelinde Standart Tedaviye Deguelin'in Katkıları" isimli proje; toplam 42 adet (Her Grup:7) C57/BL soyu farenin verildiği projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

 Prof. Dr. Canan YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı	 Prof. Dr. Ali Nuri LÜKKAŞIN Başkan Yard.
 Prof. Dr. Safiye AKTAŞ Üye	 Prof. Dr. Hatice Nur ELGÜL Üye
 Prof. Dr. Gülşen OKTAY Üye	 Prof. Dr. Gülay KORKMAZ Üye
 Doç. Dr. Meriç KARAMAN Üye (Araştırma Gözetmeni Katılmadı)	 Doç. Dr. Pembe UYGUN KILIÇKIOĞLU Üye (Tıbbi Katılmadı)
 Doç. Dr. Fikriye ERTAY Üye	 Doç. Dr. Nermin Nüket GÖÇMEN MAS Üye
 Doç. Dr. Zekiye Sultan ALTUN Üye (Tıbbi Katılmadı)	 Yard. Doç. Dr. Orhan KALPACI Üye (Tıbbi Katılmadı)
 Zehra KINAM Üye	 Vet. Hekim. Asuman BÖRKE Üye

NOT: Proje değerlendirilerek, uygun görülürse etik kurul onayı ile çalışmaya başlanabilir.

9. ÖZGEÇMİŞ

HAKAN CENGİZ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

www.hakancengiz.com

Öğrenim Bilgileri

01 Şubat 2014 - Şu Anda (7 yıl 3 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (DR)

01 Eylül 2008 - 01 Haziran 2011 (2 yıl 10 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİLİŞİM (YL) (TEZLİ)
Tez Başlığı: Hasta, Hekim Ve İlaç Sektörü İçin Etkileşimli İzmir İli Polen İzlem Ve Karar Destek Sistemi
Tez Konusu: Bu Çalışmanın Hedefi İzmir Alerjen Polen Takviminin Düzenli Olarak Güncellen-diği Bir Web Sayfası Tasarlayarak, Hekim, Hasta Ve Diğer Son Kullanıcıların Hizmetine Sunmaktır.
Tarih: 2011
Tez Danışmanı: OĞUZ DİCLE
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.28 / 4.0

01 Haziran 2002 - 13 Haziran 2008 (6 yıl 1 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOKİMYA BÖLÜMÜ
Diploma Numarası: 13693
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 65.97 / 100.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Nisan 2019 - Şu Anda (2 yıl 1 ay) (Tam Zamanlı)
TEKNİK PERSONEL, DOKTORA ÖĞRENCİSİ, SAVAŞ MEDİKAL LABORATUAR
MALZEMELERİ SANAYİ TİCARET A.Ş.

01 Nisan 2017 - 01 Nisan 2019 (2 yıl 1 ay) (Tam Zamanlı)
DANIŞMAN, ELMA ART AKSESUAR SANAYİ VE TİCARET

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Biyokimya -- Moleküler Biyokimya

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Moleküler Biyoloji ve Genetik -- Kanser Moleküler Biyolojisi

Anahtar Kelimeler

Biyokimya
Kanser Biyokimyası
Kanser Moleküler Biyolojisi
Tıbbi Bilişim
Biyostatistik
Biyoinformatik
Kanser Hücre Kültürü
İn Vivo Çalışmalar
in vitro Kültür
Antikanser İlaç
Akciğer Kanseri
C57Bl/6 Fare
A549 Hücre Serisi

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

M. A. KOCDOR, H. CENGİZ, H. ATEŞ & H. KOCDOR, Inhibition of Cancer Stem-Like Phenotype by Curcumin and Deguelin in CAL-62 Anaplastic Thyroid Cancer Cells, ANTI-CANCER AGENTS IN MEDICINAL CHEMISTRY, 2019, 1871-5206, 19, 15, 1887-1898.

G. BAŞER, H. CENGİZ, U. ÜNSAL & E. KARAHAN, The Influence Of Selective Laser Trabeculoplasty On The Success Of Trabeculectomy., Oman Journal of Ophthalmology, 2018, 0974-7842, 11, 1, 28-32.

H. KOCDOR, A. KOCAK, E. CANBAY, D. ASLAN, F. A. KOSE, S. CELEBİ, D. HARMANCI, H. CENGİZ, E. SEZER & A. PABUCCUOĞLU, Evaluation of the first Turkish in vitro diagnostic symposium, TURKISH JOURNAL OF BIOCHEMISTRY-TURK BIYOKIMYA DERGİSİ, 2017, 0250-4685, 42, 1, 93-96.

A. SAKLAMAZ, M. AKYILDIZ, E. KASAP & H. CENGİZ, Osteopontin Levels Do Not Increase In Gestational Diabetes Mellitus, Ege Journal of Medicine , 2017, 1016-9113, 56, 4, 173-177.

M. GENÇ, E. B. GÜR, E. KASAP, O. N. SİVRİKOZ, F. ESKİCİOĞLU, G. A. TURAN, O. YILMAZ & H. CENGİZ, Comparison between resveratrol and cabergoline in preventing ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model, GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY, 2016, 0951-3590, 32, 8, 634-640.

F. ESKİCİOĞLU, H. CENGİZ, G. A. TURAN, O. N. SİVRİKOZ, N. APAYDIN, N. SAHİN, E. TOZ & M. GENÇ, Comparison of the effects of letrozole and cabergoline on vascular permeability, ovarian diameter, ovarian tissue VEGF levels, and blood PEDF levels, in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome, ARCHIVES OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS, 2016, 0932-0067, 293, 5, 1101-1106.

E. S. UN, G. BASER, M. UYAR & H. CENGİZ, Diurnal Alterations of Refraction, Anterior Segment Biometrics, and Intraocular Pressure in Long-Time Dehydration due to Religious Fasting, SEMINARS IN OPHTHALMOLOGY, 2016, 0882-0538, 31, 5, 499-504.

B. UYAR, A. SAKLAMAZ, M. YALÇIN & H. CENGİZ, Isotretinoin increased carotid intima-media thickness in acne patients, HIPPOKRATIA, 2016, 1108-4189, 20, 1, 14-18.

U. OFLAZOGLU, Y. KUCUKZEYBEK, T. SALMAN, U. VAROL, A. ALACACIOGLU, L. DEMİR, G. GUVENDİ, M. AKYOL, O. TARHAN, H. CENGİZ, Y. YILDIZ & H. TASKAYNATAN, Serum apelin levels and body composition changes in breast cancer patients treated with an aromatase inhibitor, JOURNAL OF BUON, 2016, 1107-0625, 21, 6, 1419-1424.

M. GENC, H. CENGİZ & B. GENC, Adenomyosis and accompanying gynecological pathologies, ARCHIVES OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS, 2015, 0932-0067, 291, 4, 877-881.

U. KULU, M. B. AKPINAR, H. CENGİZ, B. GENC, N. SAHİN & A. SOLAK, Brain diffusion changes in unilateral carotid artery stenosis with non-shunt endarterectomy: Correlation with white matter lesions, CLINICAL NEUROLOGY AND NEUROSURGERY, 2015, 0303-8467, 133, 24-29.

S. VATANSEVER, N. SAHİN, O. YILMAZ, G. A. TURAN, H. YESİL, Z. AKAN, H. CENGİZ, O. N. SIVRIKOZ & F. ESKİCIOGLU, Montelukast is effective in preventing of ovarian hyperstimulation syndrome; an experimental study, GINEKOLOGIA POLSKA, 2015, 0017-0011, 86, 8, 566-573.

G. A. TURAN, S. ADAKAN, F. ESKİCIOGLU, O. YILMAZ, N. SAHİN, S. TATAR, H. CENGİZ, O. N. SIVRIKOZ & E. B. GUR, Myo-inositol is a promising treatment for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): an animal study, ARCHIVES OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS, 2015, 0932-0067, 292, 5, 1163-1171.

E. ATAG, I. T. UNEK, H. CENGİZ, T. SALMAN, A. ALACACIOGLU, I. OZTOP, H. S. SEMİZ, S. N. KAZAZ, U. VAROL, U. OFLAZOGLU, M. O. TARHAN & Y. KUCUKZEYBEK, Prognostic Value of the Pretreatment Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio for Patients with Neuroendocrine Tumors: An Izmir Oncology Group Study, CHEMOTHERAPY, 2015, 0009-3157, 61, 6, 281-286.

O. YILMAZ, F. ESKİCIOGLU, N. SAHİN, H. CENGİZ, O. N. SIVRIKOZ, E. B. GUR, S. TATAR & G. A. TURAN, Prophylactic vitamin D supplementation in ovarian hyperstimulation syndrome: an animal study, ARCHIVES OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS, 2015, 0932-0067, 292, 2, 421-427.

R. CEHRELİ, D. HARMANCI, P. KEMANLI, M. A. KOÇDOR, S. AYDIN, F. SOYARAT, H. KOÇDOR, H. CENGİZ & H. ATEŞ, Zinc supplementation induces apoptosis and enhances antitumor efficacy of docetaxel in non-small-cell lung cancer, DRUG DESIGN DEVELOPMENT AND THERAPY, 2015, 1177-8881, 9.

M. A. KOÇDOR, H. CENGİZ, Z. KILIÇ, H. ATEŞ & H. KOÇDOR, Deguelin Ve Curcumin İn Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerinde Antikanser Etkinliği, Poster Sunumu, 9. Cerrahi Araştırma Kongresi, 10 Kasım 2017, 12 Kasım 2017.

S. ÇELEBİ YILMAZ, N. GHANITABE, H. CENGİZ, H. ATEŞ, T. SALMAN, M. A. KOÇDOR & H. KOÇDOR, Deguelin'in Deneysel Meme Kanseri Tedavisindeki Etkinliğinin Araştırılması, Sözlü Sunum, 9. Cerrahi Araştırma Kongresi, 10 Kasım 2017, 12 Kasım 2017.

Z. KILIÇ, H. CENGİZ, N. YENER, M. A. KOÇDOR, H. ATEŞ, T. SALMAN & H. KOÇDOR, Deguelin'in Pankreas Ve Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Etkinliğinin Standart Tedaviler İle Karşılaştırılması, Sözlü Sunum, 9. Cerrahi Araştırma Kongresi, 10 Kasım 2017, 12 Kasım 2017, [Http://www.turkjsurg.com](http://www.turkjsurg.com), 165 - 166.

H. CENGİZ, M. A. KOÇDOR, H. ATEŞ, S. AYDIN & H. KOÇDOR, Deneysel Agresif Akciğer Kanseri Modelinde Standart Terapi İle Deguelin'in Vaskülojenik Taklite Etkisi: Biyogörüntü İnformatik Analizi, Sözlü Sunum, 9., 10 Kasım 2017, 12 Kasım 2017, 167 - null.

Bildiriler

H. CENGİZ, G. G. BEYOĞLU, M. A. KOÇDOR, S. ÖZBAL, N. YENER, Z. KILIÇ, M. KARAMAN, D. GÜREL, E. Ç. ULUKUŞ, T. SALMAN & H. KOÇDOR, Deneysel In Vivo Metastatik Akciğer Kanseri Modelinde Standart Tedavi İle Deguelin'in Kardiyotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması, Sözlü Sunum, 9, 10 Kasım 2017, 12 Kasım 2017, 115 - 116.

H. CENGİZ, G. G. BEYOĞLU, M. A. KOÇDOR, S. ÖZBAL, N. YENER, Z. KILIÇ, M. KARAMAN, D. GÜREL, E. Ç. ULUKUŞ, T. SALMAN & H. KOÇDOR, Cardiotoxic Effects Of Deguelin And Docetaxel In Experimental Lung Cancer Model, Poster Sunumu, International Biochemistry Congress ? 2017 /28th National Biochemistry Congress, 19 Eylül 2017, 23 Eylül 2017,

Z. KILIÇ, H. CENGİZ, N. YENER, M. A. KOÇDOR, H. ATEŞ, T. SALMAN & H. KOÇDOR, Pankreas Ve Prostat Kanserlerinde Deguelin'in In Vitro Anti-kanser Biyobelirteçler Üzerine Etkinliği, Sözlü Sunum, International Biochemistry Congress ? 2017 /28th National Biochemistry Congress, 19 Eylül 2017, 23 Eylül 2017.

H. CENGİZ, M. A. KOÇDOR, S. AYDIN & H. KOÇDOR, Deguelin, A Novel Anti-cancer Agent, Inhibits Tumor Aggressiveness And Increases Docetaxel Efficacy In Lung Cancer Cells, Poster Sunumu, 42nd Febs Congress, From Molecules To Cells And Back, 10 Eylül 2017, 14 Eylül 2017, 284.

M. A. KOÇDOR, H. CENGİZ, S. AYDIN & H. KOÇDOR, Bir Tümör Agresiflik Belirteci Olarak Vaskülojenik Takdit: Biyogörüntü Informatik Analizi İle Deguelin'in Etkinliği, Sözlü Sunum, II. Türkiye In Vitro Diyagnostik Sempozyumu "biyobelirteçler", 10 Mayıs 2017, 12 Mayıs 2017, 1.

N. GHANITABE, S. ÇELEBİ YILMAZ, H. CENGİZ, H. ATEŞ, M. A. KOÇDOR, A. KARAOĞLU, M. KARAMAN & H. KOÇDOR, Deguelin'in Akciğer Kanserinde In Vitro Anti-kanser Belirteçlerine Etkinliği, Sözlü Sunum, II. Türkiye In Vitro Diyagnostik Sempozyumu "biyobelirteçler", 10 Mayıs 2017, 12 Mayıs 2017, 1.

S. ÇELEBİ YILMAZ, N. GHANITABE, H. CENGİZ, H. ATEŞ, T. SALMAN, M. A. KOÇDOR & H. KOÇDOR, Deguelin'in In Vitro Antikanser Belirteçlerine Etkinliği, Sözlü Sunum, II. Türkiye In Vitro Diyagnostik Sempozyumu "biyobelirteçler", 10 Mayıs 2017, 12 Mayıs 2017, 1.

F. AYDIN KÖSE, S. ÇELEBİ YILMAZ, H. CENGİZ, D. HARMANCI KARAGÜLLE, A. KOÇAK SEZGİN, E. CANBAY, D. ASLAN, E. SEZER, N. A. PABUÇÇUOĞLU & H. KOÇDOR, 1. Türkiye In Vitro Diyagnostik Sempozyumu Değerlendirilmesi, Poster Sunumu, Tbd Biyokimya Günleri, 02 Kasım 2016, 05 Kasım 2016, 1303-829X, 41, 3.

G. G. BEYOĞLU, N. GHANITABE, S. ÇELEBİ YILMAZ, H. CENGİZ, H. ATEŞ, M. YÜKSEL EĞRİLMEZ, M. A. KOÇDOR, A. KARAOĞLU, M. KARAMAN & H. KOÇDOR, Anti-cancer Efficacy Of Deguelin Against Lung Cancer Cells With And Without Docetaxel And Cisplatin, Poster Sunumu, 41st Febs Congress, Molecular And Systems Biology For A Better Life, 03 Eylül 2016, 08 Eylül 2016, 283.

H. CENGİZ, H. KOÇDOR, N. GHANITABE, S. ÇELEBİ YILMAZ, H. ATEŞ, M. YÜKSEL EĞRİLMEZ, R. ÇEHRELLİ, F. SOYARAT, G. H. ÖZSAN, İ. ÖZTOP & M. A. KOÇDOR, Selenium Pre-treatment Increases The Efficacy Of Standard Chemotherapy Regimens In Lung Cancer, Poster Sunumu, 41st Febs Congress, Molecular And Systems Biology For A Better Life, 03 Eylül 2016, 08 Eylül 2016, 283.

F. AYDIN, S. ÇELEBİ YILMAZ, H. CENGİZ, D. HARMANCI KARAGÜLLE, A. KOÇAK, E. CANBAY, D. ASLAN, E. SEZER, N. A. PABUÇÇUOĞLU & H. KOÇDOR, The 1st Turkish In Vitro Diagnostic Symposium Evaluation, Poster Sunumu, 41st Febs Congress, Molecular And Systems Biology For A Better Life, 03 Eylül 2016, 08 Eylül 2016, 283.

F. KARAKUŞ, H. MOLLAOĞLU, T. ATABAY, H. YALÇINKAYA, E. UZ, M. AKYILDIZ, T. ACAR, O. GANIÜSMEN, H. CENGİZ, N. ÖZTASAN, S. KAYAN & N. G. ÖZDAMAR, Protective Effects Of Endogenous And Exogenous Melatonin On Oxidative Toxicity In Pinealectomized Rats Induced With Organophosphate Insecticide, Poster Sunumu, 6th World Congress Of Oxidative Stress, Calcium Signaling And Trp Channels, 24 Mayıs 2016, 27 Mayıs 2016, 2149-7222, 8, 1.

F. KARAKUŞ, H. MOLLAOĞLU, T. ATABAY, H. YALÇINKAYA, E. UZ, M. AKYILDIZ, T. ACAR, O. GANIÜSMEN, H. CENGİZ, N. ÖZTASAN, S. KAYAN & N. G. ÖZDAMAR, Protective Effects Of Endogenous And Exogenous Melatonin On Oxidative Toxicity In Pinealectomized Rats Induced With Organophosphate Insecticide, Sözlü Sunum, 6. World Congress Of Oxidative Stress, Calcium Signaling And Trp Channels, 24 Mayıs 2016, 27 Mayıs 2016, 2149-7222, 8, 1, 568 - 568.

E. KASAP, G. A. TURAN, F. ESKİCİOĞLU, H. CENGİZ, E. B. GÜR, O. N. SİVRİKOZ, M. GENÇ & O. YILMAZ, Comparison Between Resveratrol And Cabergoline In Preventing Ovarian Hyperstimulation Syndrome In A Rat Model, Poster Sunumu, 11th Biennial Conference Of Alpha. Scientists In Reproductive Medicine, 05 Mayıs 2016, 08 Mayıs 2016, 1472-6483, 32, Suppl 1, S11 - S13.

S. ÇELEBİ YILMAZ, N. GHANITABE, H. CENGİZ, H. ATEŞ, M. A. KOÇDOR, A. KARAOĞLU, M. KARAMAN & H. KOÇDOR, Anti-cancer Efficacy Of Deguelin Against Lung Cancer Cells With And Without Docetaxel, Sözlü Sunum, 1st International Cell Death Research Congress, 04 Mayıs 2016, 07 Mayıs 2016, 41, 4, 93 - null.

S. ÇELEBİ YILMAZ, N. GHANITABE, H. CENGİZ, H. ATEŞ, M. A. KOÇDOR, A. KARAOĞLU, M. KARAMAN & H. KOÇDOR, Anti-cancer Efficacy Of Deguelin Against Lung Cancer Cells With And Without Docetaxel, Sözlü Sunum, 1. International Cell Death Research Congress, 04 Mayıs 2016, 07 Mayıs 2016, 1303-829X, 41, 4.

S. ÇELEBİ YILMAZ, N. GHANITABE, H. CENGİZ, H. ATEŞ, M. A. KOÇDOR, A. KARAOĞLU, M. KARAMAN & H. KOÇDOR, Deguelin'in Akciğer Kanseri Hücrelerinde Tek Başına Ve Doseksel İle Birlikte Anti-kanser Etkinliği, Sözlü Sunum, 27. Ulusal Biyokimya Kongresi, 03 Kasım 2015, 06 Kasım 2015, 40.

F. CESUR, M. AKYILDIZ, H. CENGİZ & H. VURAL, Diyete Ceviz İlaresinin Kan Lipid Parametreleri Üzerine Etkisinin Araştırılması, Poster Sunumu, 27. Ulusal Biyokimya Kongresi, 03 Kasım 2015, 06 Kasım 2015, 40.

H. CENGİZ, A. GÖKDUMAN, H. KINIK, M. AKYILDIZ, M. KARADENİZ & M. YALÇIN, Klinikte 25-oh Vitamin D Yerine Total 25-oh Vitamin D Ölçümü Kullanılabilir Mi?, Poster Sunumu, 27. Ulusal Biyokimya Kongresi, 03 Kasım 2015, 06 Kasım 2015.

H. CENGİZ, H. KOÇDOR, N. GHANITABE, S. ÇELEBİ YILMAZ, H. ATEŞ, R. ÇEHRELİ, F. SOYARAT, G. H. ÖZSAN, İ. ÖZTOP & M. A. KOÇDOR, Selenyum, Akciğer Kanseri Standart Tedavisinde Etkinliği Arttır, Sözlü Sunum, 27. Ulusal Biyokimya Kongresi, 03 Kasım 2015, 06 Kasım 2015, 40.

T. ATABAY, Ş. KOBAK, M. AKYILDIZ, H. CENGİZ & H. MOLLAOĞLU, Evaluation Of Serum Il-1a And Il-17a Levels In Psoriatic Arthritis Patients, Poster Presentation, Turkish Society Of Physiological Sciences 41st National Physiology Congress, 09 Eylül 2015, 13 Eylül 2015, 215, 704, 89 - 89.

M. AKYILDIZ, Ş. KOBAK, A. GÖKDUMAN, T. ATABAY & H. CENGİZ, Increased Circulating Interleukin-23 In Patient With Sarcoidosis, Poster Sunumu, 2015 Annual Meeting & Clinical Lab Expo, 26 Temmuz 2015, 30 Temmuz 2015, S17 - S17.

T. ATABAY, Ş. KOBAK, M. AKYILDIZ, H. CENGİZ & H. MOLLAOĞLU, Serum Salusin-alpha Is Increased In Patients With Psoriatic Arthritis, Poster Sunumu, 2015 Annual Meeting & Clinical Lab Expo, 26 Temmuz 2015, 30 Temmuz 2015, S17 - S17.

H. YALÇINKAYA, T. ATABAY, T. ACAR, F. KARAKUŞ, H. CENGİZ & H. MOLLAOĞLU, Sağlık Yüksekokulu Öğrencilerinde Fiziksel Aktivite Ve Uyku Kalitesinin Araştırılması, Poster Sunumu, V. Egzersiz Fizyolojisi Sempozyumu, 29 Mayıs 2015, 30 Mayıs 2015.

H. KOÇDOR, H. ATEŞ, H. CENGİZ, S. AYDIN, R. ÇEHRELİ, F. SOYARAT, P. KEMANLİ, D. HARMANCI KARAGÜLLE, G. ASLAN & M. A. KOÇDOR, Zinc Supplementation Exhibits Anti-tumor Efficacy And Enhances Docetaxel-induced Cytotoxicity In Lung And Hormone-resistant Prostate Cancer Cells, Sözlü Sunum, Eacr-sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, 18 Mayıs 2015, 19 Mayıs 2015, 49 - null.

B. KOÇDOR, S. ÇELEBİ YILMAZ, N. GHANITABE, C. ALTAS, H. ATEŞ & H. CENGİZ, C.sordelli Küçük Hücreli Dış Akciğer Kanseri Hücrelerinde Potansiyel Antikanser Ajan Olabilir Mi?, Poster Sunumu, 1.uluslararası Tıp Öğrenci Kongresi- Şifa Üniversitesi, 20 Mart 2015, 22 Mart 2015.

A. GÖKDUMAN, A. SAKLAMAZ, H. CENGİZ, M. AKYILDIZ, H. BEKDEMİR & M. KARADENİZ, Diyabetes Mellitus'lu Hasta Takibinde Tükürük Fruktozamin Düzeyi, Poster Sunumu, 36. Türkiye Endokrinoloji Metabolizma Hastalıkları Kongresi, 21 Mayıs 2014, 25 Mayıs 2014, 247 - 248.

G. TUNÇERLER, F. KÖSEOĞLU, A. HAKSEVER, H. CENGİZ & V. TAVLİ, Outcome Of Premature Intensive Care Unit Patients Using Pediatric Risk Of Mortality (prism) Score, Sözlü Sunum, 8. Uluslararası Sağlıkta Kalite, Akreditasyon Ve Hasta Güvenliği Kongresi, 24 Nisan 2014, 27 Nisan 2014.

H. BELVERENLİ?, A. HAKSEVER, Ş. ERDOĞAN, S. TUNCA, Y. SEVİ?NÇ, T. KÖSEOĞLU, C. ÇELTİ?K, H. CENGİZ & V. TAVLİ, Yenidoğanlarda Hiperbilirubinemi Ve Fototerapinin İşitme Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi, Poster Sunumu, 57. Ulusal Pediatri Kongresi, 30 Ekim 2013, 03 Kasım 2013.

H. CENGİZ & O. DİCLE, Hasta, Hekim Ve İlaç Sektörü İçin Etkileşimli İzmir İli Polen İzlem Ve Karar Destek Sistemi, Sözlü Sunum, Viii. Ulusal Tıp Bilişimi Kongresi, 17 Kasım 2011, 20 Kasım 2011.

H. CENGİZ, M. C. ECEVİT, O. DİCLE, Y. GEMİCİ & A. Z. SİN, Medikal İnfomatik Bakış Açısıyla İzmir Alerjen Polen Takvimi, Poster Sunumu, 7. Türk Rinoloji Kongresi, 19 Mayıs 2011, 22 Mayıs 2011.

E. TAŞBAŞ USTAOĞLU, H. CENGİZ, E. ÇALIK, E. AKDENİZ & O. DİCLE, Data Entry Methods In Medicine, Poster Sunumu, The 6th International Symposium On Health Informatics And Bioinformatics (hibit 2011), 02 Mayıs 2011, 05 Mayıs 2011.

H. CENGİZ, E. TAŞBAŞ USTAOĞLU & O. DİCLE, Cep Telefonlarında Sağlık Bilişimi Uygulamalar, Sözlü Sunum, Vii. Ulusal Tıp Bilişimi Kongresi, 14 Ekim 2010, 17 Ekim 2010.

E. TAŞBAŞ USTAOĞLU, H. CENGİZ & O. DİCLE, Sağlık Bakanlığı Şartname Önerilerine Uygun Pacs Şartnamesi Hazırlama Yazılım, Sözlü Sunum, Vii. Ulusal Tıp Bilişimi Kongresi, 14 Ekim 2010, 17 Ekim 2010.

E. TAŞBAŞ USTAOĞLU, H. CENGİZ & O. DİCLE, Medikal İnfomatikte Araştırma Alanları: Etki Faktörü En Yüksek Dört Tıp Bilişimi Dergisinin 2007 Ve 2008 Yayın Analizi, Sözlü Sunum, Efrni Stc 2009-turkcia Medical Informatics 709 Kongresi, 12 Kasım 2009, 15 Kasım 2009.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Deguelin'in Deneysel Meme Kanseri Tedavisindeki Etkiliğinin Araştırılması, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Deneysel Akciğer Kanseri Modelinde Standart Tedaviye Deguelin'in Katkıları, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Dosetaksel İle Deguelin'in Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Kemoprevantif Etkinliğinin Araştırılması, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, 01 Ocak 2015, 01 Ocak 2017.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Zinc Supplementation Induces Apoptosis And Enhances Antitumor Efficacy Of Docetaxel In Non-small-cell Lung Cancer, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, 01 Ocak 2013, 01 Ocak 2015.

Ödüller

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, 9. Cerrahi Araştırma Kongresi - Seçilmiş Bildiri, Deneysel In Vivo Metastatik Akciğer Kanseri Modelinde Standart Tedavi İle Deguelin'in Kardiyotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması, Ödül Alınan Kurum: TÜRK CERRAHİ DERNEĞİ, TÜRKİYE, 12 Kasım 2017.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Uluslararası, The 17th Febs Young Scientists' Forum & 42nd Febs Congress Katılımı, Kayıt-konaklama Ve Yol Bursu, Ödül Alınan Kurum: FEBS (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), İSRAİL, 07 Eylül 2017.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, 2. Türkiye In Vitro Diyagnostik Sempozyumu; Biyobelirteçler - Poster Ödülü, Poster Bildiri 3. Lük Ödülü, Ödül Alınan Kurum: TÜRK BİYOKİMYA DERNEĞİ İZMİR ŞUBESİ, TÜRKİYE, 12 Mayıs 2017.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, 2. Türkiye In Vitro Diyagnostik Sempozyumu; Biyobelirteçler - Sözel Bildiri Ödülü, Sözlü Sunum 1. Lük Ödülü, Ödül Alınan Kurum: TÜRK BİYOKİMYA DERNEĞİ İZMİR ŞUBESİ, TÜRKİYE, 12 Mayıs 2017.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Uluslararası, Tbd & Febs 2016 Kongresi Kayıt Ödülleri, Kongre Kayıt Bursu, Ödül Alınan Kurum: Türk Biyokimya Derneği (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 15 Haziran 2016.

Diğer, Ulusal, 27. Ulusal Biyokimya Kongresi Roche Kayıt Bursu, Kongre Kayıt Bursu, Ödül Alınan Kurum: ROCHE (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 06 Kasım 2015.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Uluslararası, 3rd Eacr - Sponsored Anticancer Agent Development Congress Katılımı, Travel Award, Ödül Alınan Kurum: EACR-MOKAD (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 18 Mayıs 2015.

Diğer, Ulusal, 13. Ulusal Jinekoloji Ve Obstetrik Kongresi En İyi Bildiri Ödülü, Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromunda Profilaktik D Vitamini Suplementasyonu: Hayvan Çalışması, Ödül Alınan Kurum: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE, 11 Mayıs 2015.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Tıp Bilişimi Derneği Başarı Bursu, Başarı Bursu, Ödül Alınan Kurum: TIP BİLİŞİMİ DERNEĞİ, TÜRKİYE, 03 Ocak 2011.

Patentler

Basınç Değiştirici Cihaz, Deney Ortamlarında Basınç Değişikliği Sağlamak Üzere, In Vivo Ve/veya In Vitro Deneylerde Kullanılabilen Bir Sistemdir., Patent Başvurusu, Ulusal, Başvuru No: 2017/09076, 19 Haziran 2017

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

BİDEB Destekleri

HAKAN CENGİZ, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2015 - 2, 01.10.2015 - 28.02.2018.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

Clinical & Experimental Metastasis

DEGUELIN, A NOVEL ANTICANCER AGENT, INHIBITS METASTATIC POTENTIAL OF LUNG CANCER CELLS THROUGH VASCULOGENIC MIMICRY AND INCREASES DOCETAXEL EFFICACY.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	CLIN-D-18-00092	
Full Title:	DEGUELIN, A NOVEL ANTICANCER AGENT, INHIBITS METASTATIC POTENTIAL OF LUNG CANCER CELLS THROUGH VASCULOGENIC MIMICRY AND INCREASES DOCETAXEL EFFICACY.	
Article Type:	Original Research	
Keywords:	Lung cancer, deguelin, docetaxel, vasculogenic mimicry angiogenesis	
Corresponding Author:	Hilal Kocdor, Professor Dokuz Eylul University, Institute of Oncology, Department of Basic Oncology TURKEY	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Dokuz Eylul University, Institute of Oncology, Department of Basic Oncology	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Hakan Cengiz	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Hakan Cengiz Mehmet Ali Kocdor, Professor Suleyman Aydin, Professor Halil Ates Hilal Kocdor, Professor	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Izmir Medical and Scientific Research Activities Support Association	Not applicable
Abstract:	Vasculogenic mimicry (VM), a new pattern of tumor microcirculation, known as de novo vessel like channel formation by tumor cells. Studies has been demonstrated that VM is associated with tumor progression, invasion, metastasis and docetaxel resistancy in lung cancers. Moreover, docetaxel has also potential to induce systemic metastasis. As a rotenone derivative, deguelin, has been reported to possess several anti-cancer efficacies including angiogenesis and potentially VM inhibition. The present study investigated its anti-cancer, anti-angiogenic, anti-VM activities against Lewis Lung Cancer (LLC) cells when used alone and combine with docetaxel. Apoptosis and cell cycle alterations were analyzed by flow cytometry. Cell migration capacity was analyzed by woud-healing assay. Angiogenesis and VM were evaluated quantitatively in 3D cell culture conditions. Mesh (poligon) numbers, mesh area and master segment numbers were counted as VM and angiogenesis parameters. Deguelin has been found as pro-apoptotic and anti-invasive capacity as much as docetaxel without causing remarkable cell cycle alterations. Interestingly, docetaxel induced angiogenesis and VM formation. Deguelin not only suppressed VM and angiogenesis, but also reversed docetaxel-induced angiogenesis and VM in LLC cells. Our data for the first time indicates that deguelin has strong anti cancer, anti-metastatic, anti-vasculogenic-mimicry activities against lung cancer cells. This plant-derived compound has also	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	potential to reverse docetaxel-induced vasculogenesis and increase docetaxel efficacy at metastatic stage.
Suggested Reviewers:	Andrew Maniotis University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60607 amanioti@uic.edu This researcher defined vasculogenic mimicry for the first time in malignant melanoma
	Jiandong ZHANG Qianfoshan Hospital Affiliated to Shandong UniversityJinan, zhangjd165@sina.com Dr Zhang involved in many of basic research about vasculogenic mimicry
	Pithi Chanvorachote Chulakongkorn University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Bangkok, Thailand pithi_chan@yahoo.com This researches is actively working on anti-metastatic natural compounds for lung cancer

DEGUELIN, A NOVEL ANTICANCER AGENT, INHIBITS METASTATIC POTENTIAL OF LUNG CANCER CELLS THROUGH VASCULOGENIC MIMICRY AND INCREASES DOCETAXEL EFFICACY.

HAKAN CENGİZ¹

MEHMET ALI KOCDOR²

SULEYMAN AYDIN³

HALİL ATEŞ⁴

HİLAL KOCDOR^{1,4}

¹Dokuz Eylül University, Health Science Institute, Molecular Medicine İzmir, Turkey

hakancengiz@gmail.com

²Dokuz Eylül University School of Medicine, Department of Surgery İzmir, Turkey;

mehmet.kocdor@deu.edu.tr

³Firat University, School of Medicine, Department of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Elazığ, Turkey

saydin1@hotmail.com

⁴Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, İzmir, Turkey

halil.ates@deu.edu.tr

⁴Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, Department of Basic Oncology, İzmir, Turkey

h.kocdor@gmail.com

Correspondence:

Hilal Kocdor, MD, PhD, Professor in Biochemistry

Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, Department of Basic Oncology, 35340
İnciraltı, İzmir TURKEY

0090 2324122803 (Office), 0090 232 2784078 (Fax)

h.kocdor@gmail.com

RESEARCH ARTICLE



Inhibition of Cancer Stem-Like Phenotype by Curcumin and Deguelin in CAL-62 Anaplastic Thyroid Cancer Cells

Mehmet A. Kocdor^{1,*}, Hakan Cengiz², Halil Ates³ and Hilal Kocdor³

¹Department of Surgery, Breast and Endocrine Surgery Unit, Dokuz Eylul University Hospital, 35340 Inciralti, Izmir, Turkey;

²Health Science Institute, Molecular Medicine, Dokuz Eylul University, 35340 Inciralti, Izmir, Turkey; ³Institute of Oncology, Dokuz Eylul University, 35340 Inciralti, Izmir, Turkey

Abstract: Background: Anaplastic Thyroid Cancer (ATC) is one of the most lethal and aggressive human malignancies. Studies have shown that Cancer Stem-Cell (CSC) phenotype is mainly responsible for ATC aggressiveness. Cytostatic compounds are mostly ineffective because of multidrug resistance mechanisms driven by the CSC phenotype. Taxanes have limited efficacy. Recently, CSC inhibition using plant-derived, less toxic compounds, which have anti-cancer efficacy, has become a novel treatment modality. The aim of the study was to evaluate the anti-cancer activity of two natural compounds (curcumin and deguelin) on ATC cells and their CSC properties. In addition, the efficacies of these compounds were compared with that of docetaxel.

Methods: Besides control, five treatment groups were formed. ATC cells (CAL-62) were treated with curcumin, deguelin, docetaxel, and their combinations (curcumin+docetaxel, deguelin+docetaxel) at previously determined IC₅₀ doses. Stemness was analyzed by quantitative estimation of sphere formation in matrigel, expression of several cell surface markers (CD133, CD90, Nanog, and OCT3/4) using flow cytometry, and quantification of the hypoxic status [Oxidative Stress Index (OSI) and Superoxide Dismutase (SOD) activity]. The anti-cancer efficacies of these compounds and their combinations were evaluated by determining the alterations in the cell cycle, apoptosis, and tumoral cell migration.

Results: Both the natural compounds (particularly curcumin) significantly suppressed the spheroid formation and cellular motility in matrigel as well as suppressed the accumulation of cells in the G₀/G₁ phase, in which the maximum CSC activity is observed. The compounds did not suppress the expression of CSC markers, but two-thirds of the cells expressed CD90. Deguelin was found to be particularly effective in inducing apoptosis similar to docetaxel at IC₅₀ concentrations. Curcumin reduced the OSI and deguelin enhanced the SOD activity, even in docetaxel pre-treated cells.

Conclusion: A large proportion of anaplastic tumors might consist of heterogeneous CSC population. Curcumin and deguelin have anti-cancer and several anti-stem cell activities against ATC cells. These natural compounds are capable of altering the aggressive behavior of ATC cells through the inhibition of the CSC phenotype. As a novel therapeutic target, CD90 should be investigated in other ATC cell lines and *in vivo* models.

Keywords: Anaplastic thyroid cancer, deguelin, curcumin, docetaxel, cancer stem cell, CSC phenotype.

1. INTRODUCTION

Anaplastic Thyroid Cancer (ATC) accounts for 1%-2% of all thyroid cancers [1]. However, unlike other thyroid cancers, ATC is probably the most lethal human malignancy because of its aggressive tumor behavior and lack of effective treatment. ATC cells are resistant to almost all cytotoxic compounds. All the ATC cases are classified as TNM stage IV, regardless of their tumor size, nodal/distant metastasis, or extension to adjacent tissues [2]. The median overall and 1-year survival rates after diagnosis are 4-5 months and 18%-36%, respectively [1, 3]. Despite the development of contemporary anti-cancer strategies, no effective treatment modality exists for this tumor. ATC cells are resistant to cytostatic drugs and radiotherapy as well as to targeted therapies [4]. Limited survival advantage can be obtained after receiving multimodal

treatment, including chemotherapy with taxane together with radiotherapy in operable patients [5, 6]. Thus, alternative therapeutic strategies or novel compounds effective against ATC are urgently needed.

The data accumulated over the last two decades indicate that Cancer Stem-Like Cells (CSCs) constitute a relatively small sub-population (2%-3%) within the heterogeneous mix of bulky tumor cells. However, these specialized cells have the capacity to self-renew, initiate new tumors, switch to metastatic phenotype, and more importantly maintain their undifferentiated state [7-9]. Standard chemotherapy regimens and radiotherapy protocols remain insufficient to eradicate the CSC populations. Wide-spectrum carcinogenic events are mostly associated with the activation of CSCs. For example, Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-related pathways, Multidrug Resistance (MDR) mechanisms, tumor angiogenesis-related mechanisms, aberrant activation of some (Wnt, Notch, and hedgehog) pathways, as well as hypoxia and oxidative stress are involved in the formation of CSCs [4, 10-15]. In addition, hypoxic conditions increase the CSC population and CSCs contain higher amounts of free-radical scavengers compared to non-CSCs.

*Address correspondence to this author at the Department of Surgery, Breast and Endocrine Surgery Unit, Dokuz Eylul University Hospital, 35340 Inciralti, Izmir, Turkey; E-mails: mehmet.kocdor@deu.edu.tr makocdor@gmail.com

Zinc supplementation induces apoptosis and enhances antitumor efficacy of docetaxel in non-small-cell lung cancer

Hilal Kocdor^{1,2}
Halil Ates¹
Suleyman Aydin³
Ruksan Cehrelci¹
Firat Soyarat²
Pinar Kemanli²
Duygu Harmanci²
Hakan Cengiz²
Mehmet Ali Kocdor⁴

¹Institute of Oncology, Dokuz Eylul University, ²Department of Molecular Medicine, Institute of Health Sciences, Dokuz Eylul University, Izmir Turkey; ³Department of Biochemistry, Firat University School of Medicine, Elazig, ⁴Department of Surgery, School of Medicine, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey

Background: Exposure to exogenous zinc results in increased apoptosis, growth inhibition, and altered oxidative stress in cancer cells. Previous studies also suggested that zinc sensitizes some cancer cells to cytotoxic agents depending on the p53 status. Therefore, zinc supplementation may show anticancer efficacy solely and may increase docetaxel-induced cytotoxicity in non-small-cell lung cancer cells.

Methods: Here, we report the effects of several concentrations of zinc combined with docetaxel on p53-wild-type (A549) and p53-null (H1299) cells. We evaluated cellular viability, apoptosis, and cell cycle progression as well as oxidative stress parameters, including superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and malondialdehyde levels.

Results: Zinc reduced the viability of A549 cells and increased the apoptotic response in both cell lines in a dose-dependent manner. Zinc also amplified the docetaxel effects and reduced its inhibitory concentration 50 (IC_{50}) values. The superoxide dismutase levels increased in all treatment groups; however, glutathione peroxidase was slightly increased in the combination treatments. Zinc also caused malondialdehyde elevations at 50 μ M and 100 μ M.

Conclusion: Zinc has anticancer efficacy against non-small-cell lung cancer cells in the presence of functionally active p53 and enhances docetaxel efficacy in both p53-wild-type and p53-deficient cancer cells.

Keywords: lung cancer, zinc, docetaxel, A549, H1299

Introduction

Lung cancer is the most commonly diagnosed cancer. It is the leading cause of cancer-related deaths in males and the second cause of cancer-related deaths in females worldwide.¹ Non-small-cell histology comprises ~85% of lung cancers, and 75% of patients are diagnosed at stages III and IV.^{2,3} At the advanced stages, taxane chemotherapy regimens are commonly used for the treatment of non-small-cell lung cancers (NSCLCs) as first-line options.⁴ However, long-term survival in patients with advanced NSCLC is <5% and toxic. Side effects such as febrile neutropenia, neuropathy, and hypersensitivity reactions are particularly high in taxane formulations. Furthermore, the therapeutic results are not satisfactory.^{4,5}

Paclitaxel and its semisynthetic form, docetaxel, are isolated from the yew tree and primarily stabilize cytoplasmic microtubules via binding to the β -tubulin site, thereby causing cell cycle arrest at the G2/M phase and driving apoptosis.⁹ Several compounds have been tested to determine whether they increase taxane-induced anticancer efficacy. For example, the therapeutic efficacy of paclitaxel is restricted by the increasing frequency of chemotherapeutic resistance in NSCLC. Pulsing with

Correspondence: Hilal Kocdor
Department of Basic Oncology, Institute
of Oncology, Dokuz Eylül University,
35340 Inciralti, Izmir, Turkey
Tel +90 232 412 8203
Fax +90 232 278 4078
Email h.kocdor@gmail.com

The **FEBS**
Journal



Volume 284 Supplement 1 September 2017 | ISSN 1742-464X

www.febsjournal.org

42ND FEBS CONGRESS

FROM MOLECULES TO CELLS AND BACK

10-14 September, 2017 | Jerusalem, Israel



 **FEBS PRESS**
science publishing by scientists

WILEY

POSTERS

Table of Contents

Monday 11 September

- 104 Synthetic Biology
- 108 DNA Damage and Repair
- 118 Proteomic Approaches in Cell Biology
- 120 Molecular Basis of Diseases
- 150 Signaling Across Membranes: Receptors, Channels and Transporters
- 165 CRISPR and RNA Processing and Regulation
- 174 Mechanisms for Protein Homeostasis
- 177 Organelle Biogenesis and Dynamics
- 179 Integrated Structural Biology for Innovative Translational Research
- 180 Education, Training, and Career Planning in Molecular Life Sciences

Tuesday 12 September

- 180 Protein Dynamics and Interactions
- 205 Molecular Machines in Action
- 211 Protein Folding and Misfolding
- 218 Chromatin Structure and Epigenetic Modifications
- 228 Redox Regulation of Biological Activities
- 234 Systems Biology
- 241 Molecular Neuroscience

Wednesday 13 September

- 254 Cancer Biology
- 293 Translational Control and mRNA Localization
- 297 Protein Degradation
- 305 Autophagy
- 307 Structural Computational Biology
- 320 The Structural Organization of the Cell

Thursday 14 September

- 321 Intrinsically Disordered Proteins
- 322 Medicinal Chemistry
- 345 The Human Microbiome
- 347 Metabolism and Signalling
- 373 Miscellaneous

Abstracts submitted for the main call for abstracts to the 42nd FEBS Congress (Jerusalem, Israel; September 10–14, 2017) and accepted by the Congress Organizing Committee, as well as abstracts from invited speakers for the event, are published in this Supplement to *The FEBS Journal*. Late-breaking abstracts are not included in this supplement.

About these abstracts

Abstracts submitted to the Congress are **not peer-reviewed**. In addition, abstracts are published as submitted and are **not copyedited** prior to publication.

We are unable to make **corrections of any kind** to the abstracts once they are published.

Indexing

Abstracts published in *The FEBS Journal* Supplement for the 42nd FEBS Congress will be included individually in the Conference Proceedings Citation Index published by Web of Science.

How to cite these abstracts

AuthorOne, A., AuthorTwo, B. (2017). Abstract title. *FEBS J*, 284: Abstract number*. doi:10.1111/febs.14174

However, the treatment of the same cells with 5FU loaded SF NPs dramatically decreased cell viability and proliferation potential, triggered morphological changes in cells shape and induced apoptosis.

In conclusion, these NPs could be further used for *in vivo* studies on animal models in order to determine their distribution, effect and clearance.

P.4.1-025

Development of Anticalins binding prostate-specific membrane antigen (PSMA) for theranostic applications

V. Morath¹, C. Mender², B. Blechert², A. Richter², J. Placek³, Z. Novakova⁴, C. Barinka⁵, M. Schwaiger², A. Skerra¹

¹Collaborative Research Centre 824 of the German Research Foundation, Munich Center for Integrated Protein Science (CIPS-M) and Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technical University of Munich, Munich, Germany, ²Collaborative Research Centre 824 of the German Research Foundation and University hospital Klinikum rechts der Isar, Technical University of Munich, Munich, Germany, ³Laboratory of Structural Biology, Institute of Biotechnology, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

Prostate-specific membrane antigen (PSMA) is a validated target for the imaging and therapy of prostate carcinoma (PCa), by far the most commonly diagnosed neoplasia in men. Anticalins, engineered binding proteins based on a non-immunoglobulin scaffold, were selected from a naïve library against this tumor target via phage display. Subsequent affinity maturation using bacterial surface display yielded Anticalins with extraordinary affinity ($K_D \sim 500$ pM) as measured in BIAcore. In order to improve plasma half-life and imaging contrast in animal studies, the Anticalin was modified by PASylation technology. Radiolabeling was achieved by coupling the metal chelator NODA-GA either via maleimide chemistry to a free Cys side chain or via aminooxy conjugation to the non-natural amino acid p-acetyl-L-phenylalanine (Apa). The conjugated protein was purified and charged with radioactive ⁶⁸Gallium. *In vivo* tumor imaging of mice bearing PSMA-positive xenografts using positron emission tomography (PET) will be presented.

P.4.1-026

Role of NLRP3 inflammasome in cancer cells

K. Park

Seoul National University, Seoul, South Korea

We investigated P2X7 receptor and NLRP3 expression, and their role in oral cancer cells. We found that the P2X7R and all NLRP3 inflammasome components were upregulated in head and neck squamous cell carcinoma tissues biopsied from human patients. Similarly, in A253 cells derived from the epidermoid carcinoma, expression of P2X7R, apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC), and pro-form caspase 1 were highly upregulated compared to normal Human Salivary Gland (HSG) cell line. Active caspase-1 and its final product, active interleukin-1 β , were both increased when primed A253 cell were stimulated with P2X7 agonists, and this elevated NLRP3 inflammasome activity was suppressed by P2X7 antagonist. However, none of those phenomena was observed in HSG cells. Inhibition of both NLRP3 inflammasome and P2X7R led to the significant cell death of primed A253 cells, but viability of primed HSG cells or the primary cultured human fibroblast cells was unaffected. Furthermore, inhibition of either P2X7R or NLRP3 inflammasome decreased invasiveness of A253, and this effect became

more evident when both P2X7R and NLRP3 inflammasome were simultaneously blocked. Therefore, it is concluded that the P2X7R and the activation of NLRP3 inflammasome play important roles in the survival and invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma in human.

P.4.1-027

DEGUELIN, a novel anti-cancer agent, inhibits tumor aggressiveness and increases docetaxel efficacy in lung cancer cells

H. Cengiz¹, M. A. Kocdor², S. Aydin³, H. Kocdor⁴

¹Dokuz Eylül University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine, Izmir, Turkey, ²Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of General Surgery, Izmir, Turkey, ³Firat University, School of Medicine, Department of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Elazığ, Turkey, ⁴Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, Department of Basic Oncology, Izmir, Turkey

Lung cancer is leading cause of mortality due to its aggressive behavior and commonly diagnosed at advanced stages. Standard drug regimens are not satisfactory. Previous studies has been demonstrated that vasculogenic mimicry (VM) and increased tumor cell motility are associated with poor prognosis, high tumor grade and the indicators of tumor aggressiveness. Vasculogenic mimicry is known as vessel-like network formation by tumor cells. As a rotenone derivative, deguelin has been demonstrated to have several anti-cancer efficacies including angiogenesis and potentially VM inhibition. The present study investigated anti-VM activity of deguelin, docetaxel, and their combination in Lewis Lung Cancer (LLC) cells. Tumor cell motility alterations after the treatment modalities were also investigated. The results of both assay suggested that deguelin had strong anti-VM and anti cell migration activity against LLC cells. Synergism was also exist between deguelin and docetaxel. In conclusion, deguelin has able to reduce tumor aggressiveness and metastatic potential when used alone or combine with docetaxel in lung cancer.

P.4.1-028

Innovative therapeutic modalities for solid EpCAM-positive tumours

J. Treter¹, K. K. Schorpp¹, E. Luxenburger², K. Hadian¹, O. Gires², D. Nüssing^{1,3}

¹Helmholtz Zentrum München, Munich, Germany, ²Klinikum der LMU München, Munich, Germany, ³LMU München, Munich, Germany

The epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is a transmembrane glycoprotein expressed on healthy and adenomatous epithelia, where it plays a role in homophilic cell adhesion. Furthermore, it was shown that this protein has an impact on cell proliferation. EpCAM is strongly overexpressed by carcinomas, which makes it an attractive target for diagnosis and therapy of tumours. In 2009, the EpCAM trispecific antibody catumaxomab (Removab) was authorized for treatment of cancer patients. A new approach would be to target the intracellular EpCAM signalling itself.

We established and performed a High-Content Screen to identify compounds, which specifically inhibit the EpCAM signaling cascade. The obtained and verified hits were then further characterized by cellular and biochemical assays with regards to their effects on cytotoxicity, target gene expression, regulated intramembrane proteolysis (RIP), and cell proliferation.



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This is to certify that

HAKAN CENGIZ

participated in the

42ND FEBS CONGRESS

FROM MOLECULES TO CELLS AND BACK

10-14 September, 2017 | Jerusalem, Israel

Vaclav Paces

FEBS Secretary General

Abdussalam Azem

Congress Chair

THE 17th FEBS
YOUNG SCIENTISTS' FORUM

September 7th-10th, 2017

Certificate of Attendance

This to confirm that

Hakan Cengiz

Participated in the FEBS Young Scientists'

Forum 2017 in Jerusalem, September 7th-10th




Maayan Pour

Chair of YSF 2017



EACR - Sponsored
3rd ANTICANCER AGENT
Development Congress

18th – 19th of May 2015

Dokuz Eylul University Izmir-Turkey

www.cancerresearch2015.org



ABSTRACT BOOK

11:30 - 12:00

PLENARY LECTURE

Chair: Leonard Girnita

Hermis Iatrou (GREECE)

11:30 - 12:00

Smart Polymeric Materials for Drug Delivery to Treat Pancreatic Cancer

11:00 - 12:00

Discussion

12:10 - 12:50

ORAL PRESENTATIONS

Chairs: Zekiye Altun, Semra Koçtürk

Yusuf Tutar

12:10 - 12:18

A Novel Approach to Inhibit Heat Shock Response as Anticancer Strategy by Coumarine Compounds Containing Thiazole Skeleton

12:18 - 12:20

Discussion

Hakan Cengiz

12:20 - 12:28

ZINC SUPPLEMENTATION EXHIBITS ANTI-TUMOR EFFICACY AND ENHANCES DOCETAXEL-INDUCED CYTOTOXICITY IN LUNG AND HORMONE-RESISTANT PROSTATE CANCER CELLS

12:28 - 12:30

Discussion

Çiğdem Özen

12:30 - 12:38

New Calcium Channel Blocker Compounds With Anticancer Activity

12:38 - 12:40

Discussion

Zelal Adigüzel

12:40 - 12:48

A novel platinum-blue complex exerts its cytotoxic activity via DNA damage and induces apoptosis in breast cancer cells

12:48 - 12:50

Discussion

13:00 - 14:00

LUNCH

14:00 - 14:30

PLENARY LECTURE

Chair: Abdullah Karadağ

Mehmet Korkmaz (TURKEY)

14:00 - 14:25

Boron derivatives for combating against cancer

14:25 - 14:30

Discussion

14:30 - 15:30

ORAL PRESENTATIONS

Chairs: İlhan Yaylım, Serap Çelikler

Banu Iskender

14:30 - 14:38

Myrtucommulone-A Treatment Decreases Pluripotency- and Multipotency-associated Marker Expression in Bladder Cancer Cell Line HTB-9.

14:38 - 14:40

Discussion

Abbas Jafarizad

14:40 - 14:48

Mitoxantrone-conjugated gold nanoparticles for stem cell therapy

14:48 - 14:50

Discussion

Faisal Gulzar

14:50 - 14:58

PATTERN OF IMMUNOHISTOCHEMICAL FACTORS IN BREAST CANCER PATIENTS

14:58 - 15:00

Discussion

Nuket Eliyatkin

15:00 - 15:08

The Role of p95HER2 in Trastuzumab Resistance in Breast Cancer

OP-08

Zinc supplementation exhibits anti-tumor efficacy and enhances docetaxel-induced cytotoxicity in lung and hormone-resistant prostate cancer cells

Hilal Kocdor, MD, PhD, PhD, Asc. Professor^{1,2}, Halil Ates, PhD¹, **Hakan Cengiz**², Suleyman Aydin, PhD, Professor³, Ruksan Cehreli, Ass. Profesör¹, Firat Soyarat², Pinar Kemanli², Duygu Harmanci² MSc, Güven Aslan, MD, Professor⁴, Mehmet Ali Kocdor, MD, Professor⁵

¹Dokuz Eylul University, Institute of Oncology

²Institute of Health Sciences, Department of Molecular Medicine

³Firat University School of Medicine, Department of Biochemistry, Elazig Turkey

⁴Dokuz Eylul University, School of Medicine, Department of Urology,

⁵Department of Surgery, Izmir Turkey

Lung cancer takes one of the first places among the cancer related deaths for both sexes on the whole world. The 85% of the lung cancers are non-small cell lung cancers (NSCLC). Docetaxel is quite a toxic agent used in the standard treatment of these patients. Due to lack of zinc seen on the patients, its supplementation is being required frequently during the treatment.

The determination of the anticancer activity in an in-vitro environment by using the docetaxel treatment on NSCLC together with the zinc supplementation is aimed in this study.

The A549 and H1299 cell lines of the lung cancer are used in our study. The apoptosis rates of the cells were determined by Flow Cytometry Analyzes after the determination of minimal inhibitor concentrations by cytotoxicity analyzes. The level of cancer cells within the cell cycle after the application of the medicines is again determined by Flow Cytometry Analyzes. MDA, SOD and GPx ranks are regarded as oxidation determinants.

As a result, the combined usage of zinc with docetaxel is increasing the anticancer activity of docetaxel by initiating a synergistic effect on the NSCLC cell lines. Zinc has a potential on A549 cell line by itself.



www.cancerresearch2015.org

EACR - Sponsored
3rd ANTICANCER AGENT
 Development Congress

18th – 19th of May 2015
 Dokuz Eylul University Izmir-Turkey

Joint congress
 of the 9th International Congress
 of Molecular Medicine
 20-22 May 2015
 www.molcongress2015.org

16th of April 2015

Dear Hakan Cengiz ,

We would like to thank you for the submission of the abstract for the **3rd EACR-Sponsored Anticancer Agent Development Congress** which will be held in Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey on 18th – 19th of May 2015.

We are glad to inform you that your abstract entitled «*ZINC SUPPLEMENTATION EXHIBITS ANTI-TUMOR EFFICACY AND ENHANCES DOCETAXEL-INDUCED CYTOTOXICITY IN LUNG AND HORMONE-RESISTANT PROSTATE CANCER CELLS*» has been accepted for the publication and **ORAL presentation** at the congress.

If you haven't register yet, please be so kind and complete congress registration till 20th of April 2015.

Thank you in advance for all your effort. Looking forward to meeting you in Izmir in May 2015.

With best regards,

Prof. Dr. Engin Ulukaya

Assist. Prof. Konstantinos Dimas

Scientific Secretariat
 Assist. Prof. Konstantinos Dimas
 Dept of Pharmacology,
 Faculty of Medicine
 School of Health Sciences
 University of Thessaly
 Larissa, Greece
 E-mail: ksdimas@yahoo.com

Congress President
 Prof. Dr. Engin Ulukaya
 Department of Biochemistry,
 Medical School of Uludağ University,
 Bursa, Turkey
 E-mail: gulukaya@uludag.edu.tr

Organizing Secretariat
 ConPlus Congress & Organization
 Acarlar Soğuksu Mah. Samanyolu Sok.
 Erguvan Evleri Blok: A10 Daire:10
 Beykoz , Istanbul, Turkey
 Tel : +90 210 341 00 34
 Fax: +90 210 341 01 08
 E-mail: secretariat@cancerresearch2015.org

