

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOSETAKSEL VE DEGUELİN'İN AKCİĞER
KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
KEMOPREVANTİF ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

NİNA GHANİTABE

MOLEKÜLER TIP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc-2013970077

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOSETAKSEL VE DEGUELİN'İN AKCİĞER
KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
KEMOPREVANTİF ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI
MOLEKÜLER TIP**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
NİNA GHANİTABE**

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Hilal KOÇDOR

Bu araştırma BAP tarafından 2015.KB.SAG.25 proje numarasıyla desteklenmiştir

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc-2013970077

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Yüksek Lisans Programı öğrencisi **Nina GHANITABE** "Dosetaksel ve Deguelin'in Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Kemoprevantif Etkinliğinin Araştırılması" konulu Yüksek Lisans tezini **15.01.2018** tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. Hilal KOÇDOR
BAŞKAN

(DEÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp AD)

Prof. Dr. G. Hüseyin İŞLEKEL
ÜYE

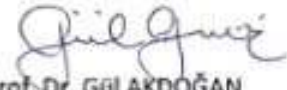
(DEÜ, Sağlık Bilimleri Ens. Moleküler Tıp AD)


Doç. Dr. Zeynep YÜCE
ÜYE

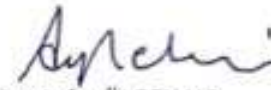
(DEÜ, Sağlık Bilimleri Ens. Moleküler Tıp AD.)


Yrd. Doç. Dr. Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ
ÜYE

(DEÜ, Sağlık Bilimleri Ens. Moleküler Tıp AD)


Prof. Dr. Gül AKDOĞAN
ÜYE

(İzmir Ekonomi Ün. Tıp Fakültesi)


Prof. Dr. Ayfer ÜLGENALP
YEDEK ÜYE

(DEÜ, Sağlık Bilimleri Ens. Moleküler Tıp)

Yrd. Doç. Dr. Banu DEMİR
YEDEK ÜYE

(İzmir Ekonomi Ün. Tıp Fakültesi)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
TEŞEKKÜR	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	3
1.2. Araştırmanın Amacı	4
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser	5
2.2. Akciğer	6
2.2.1. Akciğer Anatomisi	6
2.2.2. Plevra	7
2.2.3. Pulmoner Alveoller	8
2.2.4. Bronş Ağacı	9
2.3. Akciğer Kanseri	9
2.3.1. Akciğer Kanserinin Evrelemesi	10
2.3.2. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması	11
2.3.3. Akciğer Kanseri Gelişimi İle İlgili Moleküler Olaylar:	12
2.3.4. Akciğer Kanserinde Risk Faktörler:	12
2.4. Dosetaksel	12
2.5. Deguelin	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Araştırmanın Tipi	15
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	15
3.3. Çalışma Materyali	15
3.4. Araştırmanın Değişkenleri	15
3.5. Veri Toplama Araçları:	15
3.5.1. Kullanılan Cihazlar	15

3.5.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Diğer Gereçler	17
3.5.3. Uygulanan Yöntemler	19
3.5.3.1. Hücre Kültürü	19
3.5.3.1.1. Hücre Hattı Özellikleri	19
3.5.3.1.2. Hücrelerin Kültürde İdamesi	20
3.5.3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması	21
3.5.3.1.4. Hücrelerin Dondurulması	21
3.5.3.1.5. Hücrelerin Çözülmesi	21
3.5.3.1.6. Hücrelerin Sayılması	22
3.5.3.2. Hücre Canlılık Testi	22
3.5.3.2.1. Yöntemin Prensibi	22
3.5.3.2.2. İlaçların Hazırlanması	23
3.5.3.2.2.1. Deguelin Hazırlanması	23
3.5.3.2.2.2. Dosetakselin Hazırlanması	24
3.5.3.2.3. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney prosedürü	24
3.5.3.3. Akım Sitometrik Analizler	27
3.5.3.3.1. Apoptoz Analizi (Annexin V yöntemi)	27
3.5.3.3.1.1. Yöntemin Prensibi	27
3.5.3.3.1.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü	27
3.5.3.3.2. Hücre Döngüsü Analizi	28
3.5.3.3.2.1. Yöntemin Prensibi	28
3.5.3.3.2.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü	28
3.5.3.4. Koloni Sayısı Analizi	29
3.5.3.5. Migrasyon Analizi	30
3.5.3.5.1. Yöntemin Prensibi	30
3.5.3.5.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü	31
3.6. Araştırma Planı ve Takvimi	32
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi	33
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları	33
3.9. Etik Kurul Onayı	33
4. BULGULAR	35
4.1. Hücre Canlılık Testi	35

4.2. Akım Sitometrik Analizi	37
4.2.1. Akım Sitometrik- Apoptoz Analizi	37
4.2.2. Hücre Döngüsü	41
4.3. Koloni Sayısı Analizi	45
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
7. KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	62



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Kanserin ana kategorileri _____	5
Tablo 2.2. TNM sınıflamasına göre evrelendirme _____	10
Tablo 2.3. Akciğer tümörlerin sınıflandırılması _____	11
Tablo 3.1. Projede kullanılan mevcut makine-teçhizat listesi _____	16
Tablo 3.2. Projede kullanılan sarf malzemeler ve diğer gereçler _____	17
Tablo 3.3. Hücre hatları ve hücre kültüründe kullanılan ortam içerikleri _____	20
Tablo 3.4. Hücre Canlılık Deneyi için A549 hücre hattına verilen Dosetaksel'in 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı _____	25
Tablo 3.5. Hücre Canlılık Deneyi için A549 hücre hattına verilen Deguelin'in 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı _____	25
Tablo 3.6. Hücre Canlılık Deneyi için H1299 hücre hattına verilen Dosetaksel'in 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı _____	26
Tablo 3.7. Hücre Canlılık Deneyi için H1299 hücre hattına verilen Deguelin'in 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı _____	26
Tablo 3.8. Akım Sitometrik analizlerdetüm hücre hatları için oluşturulan gruplar _____	29
Tablo 3.9. Koloni Analizde tüm hücre hatları için oluşturulan gruplar _____	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Akciğerler, plevra ve göğüs boşluğu _____	7
Şekil 2.2. Akciğerler konumu ve plevra ile ilişkisi _____	8
Şekil 2.3. Solunum sisteminin respiratuar bölümü ve dolaşımı _____	8
Şekil 2.4. Trakea'dan bronşiyollere uzanan hava yolları _____	9
Şekil 2.5. Paklitaksel ve Doksetakselin yapısı _____	13
Şekil 2.6. Deguelinin kimyasal yapısı _____	14
Şekil 3.1. H1299 hücre hattı _____	19
Şekil 3.2. A549 hücre hattı _____	19
Şekil 3.3. CCK'nın formazana indirgenme mekanizması _____	23
Şekil 3.4. Her plate kolonilerin sayıldığı bölgeler _____	30
Şekil 4.1. A549 ve h1299 Hücre hattında Dosetaksel ve Deguelin 72 saatlik IC50 dozları _____	36
Şekil 4.2. A549 ve H1299 hücre hatlarında IC50 dozları ile 72 saatlik Dosetaksel ve Deguelin uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik-Apoptoz Analizi bulguları _____	37
Şekil 4.3. Apoptoz Analiz Verileri _____	38
Şekil 4.4. A549 ve H1299 hücre hatlarında Apoptoz Analiz (Q4+Q2, Q4) sonuçları _____	39
Şekil 4.5. A549 ve H1299 hücre hatlarında Apoptoz Analiz sonuçları _____	40
Şekil 4.6. A549 ve H1299 hücre hattı üzerinde belirlenen IC50 dozları ile 72 saatlik Dosetaksel ve Deguelin uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analiz bulguları _____	41
Şekil 4.7. Hücre Döngüsü Analiz Verileri _____	42
Şekil 4.8. A549 ve H1299 hücre hatlarında Hücre Döngüsü Analiz sonuçları _____	43
Şekil 4.9. A549 ve H1299 hücre hatlarında Hücre Döngüsü Analiz (S, G2+M) sonuçları _____	44
Şekil 4.10. A549 hücre hattında Koloni Sayısı Analiz sonuçları _____	45
Şekil 4.11. H1299 hücre hattında mikroskop altında fotoğraflanan koloniler _____	46
Şekil 4.12. A549 hücre hattında mikroskop altında fotoğraflanan koloniler _____	47
Şekil 4.13. H1299 hücre hattında migrasyon analizinde mikroskop altında 4X'lik büyütmede birinci ve 24.saat sonunda fotoğraflanan hücreler _____	48
Şekil 4.14. A549 hücre hattında migrasyon analizinde mikroskop altında 4X'lik büyütmede birinci ve 24.saat sonunda fotoğraflanan hücreler _____	49

KISALTMALAR DİZİNİ

OSI: Oksidatif Stres İndeksi

DEG: Deguelin

DTX: Dosetaksel

AK: Akciğer Kanseri

KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

PBS: Fosfat Buffer Solüsyon

DMSO: Dimetil Sülfoksit

CCK: Cell Caunting Kit

PS: Fosfatidilserin

PI: Propidyum

NADPH: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Fosfat İndirgenmiş formu

NADH: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid İndirgenmiş formu

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması ve yüksek lisans eğitimi süresince her zaman yanımda olup beni yalnız bırakmayan, akademik bilgi birikimlerini sınırsız benimle paylaşan değerli danışman hocam Prof. Dr. Hilal KOÇDOR'a; Tezimin deneysel çalışmalarının bir kısmında yol gösteren, Moleküler Tıp Anabilim Dalı'ndan hocam Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ'e, tüm deneysel uygulamaların gerçekleşmesi için Onkoloji Laboratuvarları'nın kullanmasını sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'a, laboratuvar çalışmalarımda destek veren hocalarıma ve YL, doktora yapan arkadaşlarıma; Bu çalışma boyunca beni yalnız bırakmayan ve tüm aşamalarda beni destekleyen Moleküler Tıp A.D Doktora öğrencileri Hakan CENGİZ, Dr. Tarık SALMAN'a, MOT Yüksek Lisans öğrencisi Serap ÇELEBİ YILMAZ'a; Akım sitometrik analizlerin gerçekleştirilmesi için bana yol gösteren ve zaman ayıran Uzman Dr. Halil ATEŞ'e; Ayrıca bana güç ve özgüven veren değerli eşim Dr. Behzad SALEKY'e, hayatımızın tadı olan kızımız Serenay'a, eğitim hayatım boyunca maddi, manevi olarak yanımda olan ve beni destekleyen sevgili anneme, babama, sevdiğim kardeşim Dt. Sahand GHANİTABE'ye ayrı ayrı sonsuz teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Nina GHANİTABE

DOSETAKSEL VE DEGUELİN'İN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARINDA KEMOPREVANTİF ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

**NİNA GHANİTABE, D.E.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı,
nnbg1030@gmail.com**

ÖZET

Kanseri önlemek ve tedavi etmek için yoğun çalışmalara rağmen, kanser önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Akciğer kanseri, tüm dünyada kansere bağlı ölümlerde hem kadın hem de erkeklerde ilk sırada yer almaktadır. En etkili kanser tedavi ajanları da normal dokular için toksiktir. Bu nedenle ya hiç ya da çok düşük bir toksisite ile yeni, önleyici ve tedavi edici ilaçlara ihtiyaç vardır.

Bu çalışma, Deguelin'in akciğer kanseri hücre hatlarında etkin konsantrasyonda kanser hücrelerinin çoğalmasında inhibe edici etkiye sahip olması ve DEG+DTX kombinasyonunun akciğer kanseri hücrelerinin çoğalmasında, ilaçların tek kullanılmasına göre daha başarılı olması hipotezine dayanarak gerçekleştirildi. Bu çalışmada H1299 ve A549 akciğer kanseri hücre hatları üzerine Deguelin'in antikanser etkisi incelendi. Yapılan çalışmada A549 ve H1299 akciğer kanseri hücre hatlarında Dosetaksel ve Deguelin'in tek başlarına sitotoksik etkileri araştırıldı. IC50 dozları belirlendi. Belirlenen etkin konsantrasyonlar, Deguelin ile Dosetaksel kombinasyonları akciğer kanseri hücrelerine uygulandı. Hücre kültürlerinde Flow Sitometrik Analizler (Apoptoz, hücre döngüsü), Migrasyon analizi ve Koloni Formasyon Testleri gerçekleştirildi.

Araştırmamızda; DEG+DTX kombinasyonunun akciğer kanseri hücrelerinin çoğalmasında, ilaçların tek başlarına kullanılmalarına göre daha başarılı olduğu, Deguelin'in antikanser etkisinin, kanser hücrelerinin ölümüne yol açmaktan ziyade, hücrelerin yayılımını azaltarak olabileceği gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler:

Akciğer kanseri hücre hatları, Deguelin, Dosetaksel, IC50, apoptoz, hücre döngüsü, koloni sayısı, hücre migrasyonu

INVESTIGATION OF DOCETAXEL AND DEGUELIN'S CHEMOPREVENTIVE ACTIVITY IN LUNG CANCER CELL LINE

ABSTRACT

Despite intense efforts to prevent and treat cancer, cancer is one of the most common causes of death. In cancer-related deaths, lung cancer is ranked first in men and women all over the world. The most effective cancer treatment agents are also toxic to normal tissues. For this reason, new, preventive and curative medicines with very low or no toxicity are needed.

This study was based on the hypothesis that Deguelin in effective concentration has an inhibitory effect on the proliferation of neoplastic cells in lung cancer cell lines and DEG+DTX combination is more successful than single usage of the drug. This study examined the anticancer effect of Deguelin on H1299 and A549 lung cancer cell lines. In this study, pure Docetaxel and Deguelin cytotoxic effects on A549 and H1299 lung cancer cell lines were investigated. IC₅₀ doses were determined. At the determined effective concentrations, combinations of Deguelin and Docetaxel were applied to lung cancer cells. Flow Cytometric Analyzes (Apoptosis, cell cycle), Migration analysis and Colony Formation Test were performed in cell cultures.

In our research; It has been observed that the DEG+DTX combination is more successful in proliferating lung cancer cells than drugs used alone, Deguelin's anticancer effect could be by reducing the spread of cells, rather than leading to the death of cancer cells.

Key words:

Lung cancer cell lines, Deguelin, Docetaxel, IC₅₀, apoptosis, cell cycle, number of colon, cell migration

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Yoğun çabalara rağmen, kanser dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Akciğer kanseri dünya çapında erkeklerde en önde gelen ve kadınlarda ise kansere bağlı ölümlerin ikinci nedenidir (1). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) kötü prognoza sahiptir (2) ve akciğer kanserinin en sık tipini temsil etmektedir (3). Akciğer kanseri, aynı zamanda meme, kolon, deri ve prostat kanseri dâhil olmak üzere, diğer kanser tiplerinden gelen metastazların ana yeridir. Tedavi yöntemlerinin son yıllardaki gelişmelerine rağmen, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hastalarında yanıt ve remisyon oranları nispeten düşüktür (4).

Dosetaksel (DTX) porsuk ağacından türetilmiş paklitakselin yarı sentetik bir türevi ve taxane'nin yeni türüdür (5). Dosetaksel meme (6,7),KHDAK (8), over (9), gastrik (10), baş-boyun (11), prostat (12) karsinomları da dâhil olmak üzere çeşitli solid tümörlere (13) karşı geniş bir anti-tümör aktiviteye sahiptir. Ancak, DTX'e karşı direnç, akciğer adenokarsinomu olan hastaların tedavisinin başarısı önündeki en büyük engel olmaya devam etmektedir. Dosetaksel, mikrotübül sistemi içinde denge bozukluğuna ve hücre döngüsünün G2/M fazında tutulumuna sebep olarak hücre ölümüne neden olur (14). Dosetaksel hücre mitoz bölünmesini inhibe eder ve apoptozu teşvik eder.

Bitkilerden elde edilen bitki ilaçları binlerce yıldır dünya çapında kullanılmaktadır (15). Deguelin, birçok insan kanserine karşı ümit verici aktiviteye sahiptir. Deguelin, kanser kemopreventif ya da karsinogenez inhibitörü olan doğal bileşenin bir örneğidir (16,17). Deguelin, *Mundulea sericea* (Leguminosae) dâhil olmak üzere birçok bitki türünden izole edilmiş (18), bir rotenoiddir (19). Çeşitli *invitro* çalışmalarda Deguelin'in kolon kanseri hücrelerinin büyümesini engellediği rapor edilmiştir (20).

Kanser ilaçları oldukça toksik ve yan etkileri olan ajanlardır. Son zamanlarda, bitkisel ilaçlar az yan etkileri ile akciğer kanseri tedavisi için ilgi odağı olmuştur. Standart kullanılan ilaçların, yeni ilaç kombinasyonları ile etkisini artırmak, ya da kombine kullanım ile dozu azaltıp etkinliği aynı tutulsa bile yan etkilerini azaltmak kanser tedavisinde hedeflenen tedavi stratejileri arasındadır.

Bu çalışmada akciğer kanseri hücreleri üzerine potansiyel bir kemoterapötik ajan olan Deguelin ve tedavide kullanılan Dosetaksel ile 2'li kombinasyon şeklinde tedavide kullanılması ilk kez araştırılmıştır ve elde edilen verilerin ileride *in vivo* çalışmalara ışık tutacağı öngörülmektedir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada, akciğer kanseri tedavisinde ilk sırada kullanılan Dosetaksel ile potansiyel bir kemoterapötik ajan olan Deguelin'in etkinliğinin karşılaştırılması, invazyon ve migrasyon yanıtlarının değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Hücre hatlarının özelliklerinden dolayı agresif akciğer kanseri hücre hattı olan H1299 (lenf nodu metastazı ve P53 mutant) ve A549 (adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücreleri) üzerinde araştırma yapılmıştır.

H1: Deguelin, akciğer kanseri hücre hatlarında etkin konsantrasyonda kanser hücrelerinin çoğalmasını engeller.

H2: DEG+DTX kombinasyonu akciğer kanseri hücrelerinin çoğalmasını engellemesinde, ilaçların tek tek kullanılmasına göre daha başarılıdır.

H3: Deguelin ile kombinasyon Dosetakselin anti-kanser etkinliğini artırır.

H4: DEG hücre döngüsünde G0/G1 fazında etkilidir.

H5: DTX hücre döngüsünde G2+M fazında etkilidir.

H6: DEG, H1299 ve A549 hücre hatlarında migrasyon ve koloni formasyonu oluşumunda etkilidir.

H7: DTX, H1299 ve A549 hücre hatlarında migrasyon ve koloni formasyonu oluşumunda etkilidir.

H8: DEG, H1299 ve A549 hücre hatlarında apoptozis analizinde etkilidir.

H9: DTX, H1299 ve A549 hücre hatlarında apoptozis analizinde etkilidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Vücudumuzdaki hücrelerin anormal ve kontrolsüz gelişerek vücudun normal fonksiyonlarını aksatması ve vücudun diğer bölümlerine yayılması ile sonuçlanan hastalığa kanser adı verilmiştir. Kanser hücreleri vücudun diğer bölgelerine kan ve lenf sistemi ile yayılabilmekte ve farklı kanser tipleri bulunmaktadır. Kanser tipleri genellikle hastalığın başladığı organ veya hücre ile isimlendirilir. Örneğin, akciğerde başlayan kansere akciğer kanseri; derinin bazal hücrelerinde başlayan kanser tipine bazal hücreli karsinoma adı verilir. Kanser tipleri daha kapsamlı kategorilerde sınıflandırılabilir.

Tablo 2.1. Kanser ana kategorileri (21).

Karsinoma	Deride ya da bu hat dokularda başlayan veya iç organları kapsayan kanser tipidir.
Sarkoma	Kemik, kas, kan, kıkırdak, yağ, damarlar veya diğer bağ veya destek dokularda başlayan kanser tipidir.
Lösemi	Kemik iliği gibi kan yapıcı dokularda başlayan ve yüksek miktarda anormal kan hücresinin üretilerek kana karışmasına neden olan kanser tipidir.
Lenfoma ve miyeloma	İmmün sistem hücrelerinde başlayan kanser tipidir.
Santral sinir sistemi kanserleri	Beyin ve spinal kord dokularında başlayan kanser tipidir.

İnsan vücudu çok farklı hücrelerden meydana gelmiştir. Bu hücreler canlılığın devamını sağlamak için büyür ve kontrollü olarak bölünürler. Vücuttaki hücreler yaşlandığında veya zarar gördüğünde, ölürler ve bu hücrelerin yerini yeni hücreler alır. Bazen hücrenin genetik materyali olan DNA zarar görebilir ya da değişime uğrayabilir. Mutasyona uğramak normal hücrelerin bölünmesini ve büyümesini etkiler. Tümör kontrolsüz şekilde bölünen hücrelerden oluşan doku kitlesine denilir. Tüm kanserler tümör formunda değildir. Örnek olarak, lösemi; kemik iliği ve kan kanseridir. Tümörler benign veya malign olarak iki ana sınıfa ayrılır. Benign tümörler; bu tip tümör hücreleri vücudun başka bölgelerine yayılmazlar.

Malign tümörler; Yakın dokulara ve vücudun diğer bölgelerine yayılabilirler. Metastaz; kanserin vücudun bir bölgesinden başka bir bölgeye yayılmasıdır (22).

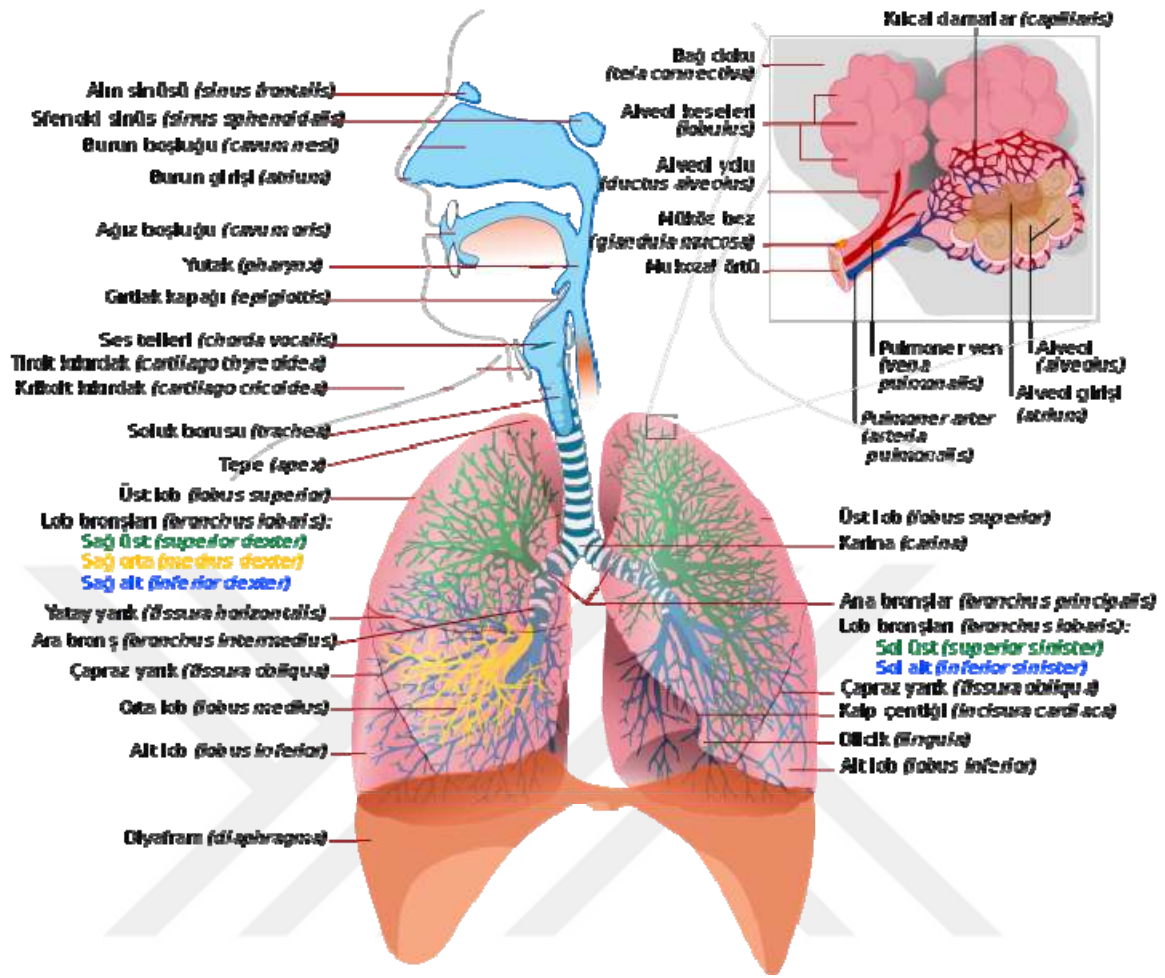
2.2. Akciğer

2.2.1. Akciğer Anatomisi

Akciğer göğüs boşluğu içinde, diafragmadan klavikulanın superioruna kadar uzanmıştır (Şekil 2.1) (23) ve göğüs boşluğunda her iki tarafta plevralkese içerisinde yerleşmiştir. Akciğerler ortada mediastinumda yer alan ve içinde kalbin de bulunduğu yapılarla birbirinden ayrılır. Ana bronş ve distalinde bulunan solunum sisteminin tüm yapıları, bronşiyal ağaç ve akciğer alveolleri akciğerlerin içinde yer almaktadır. Her akciğer dört yüzeye sahiptir.

1. Akciğerin mediastinal yüzü: akciğerin iç tarafına doğru çöktür(23,24). Bu yüzeye akciğer göbeğihilus pulmonis adı verilmiştir ve buradan akciğerin ana bronşu, akciğer arteri (a. Pulmonalis), iki veni (v. Pulmonalis), sinirlerive lenf damarları geçer.
2. Basis pulmonis yüzü: diafragmanın dışbükey kubbesi üzerinde akciğerin alt yüzeyi yayılmıştır.
3. Akciğerin apeks pulmonis yüzeyi: klavikula seviyesinin üzerine kadar uzanan üst yüzü.
4. Facies kostalis: akciğerlerin en geniş yüzü olup ve kaburgaların iç yüzü ile temastadır.

Sağ ve sol akciğerler birbirine benzerler ama aynı değildirler. Sol akciğer, sağ akciğere göre küçüktür ve iç yüzü üzerinde kalbin oluşturduğu bir çukur bulunmaktadır (23). Akciğerin her bir lobu pulmoner alveolleri içeren çok sayıda küçük lobülere ayrılmıştır.



Şekil 2.1. Akciğerler, plevra ve göğüs boşluğu

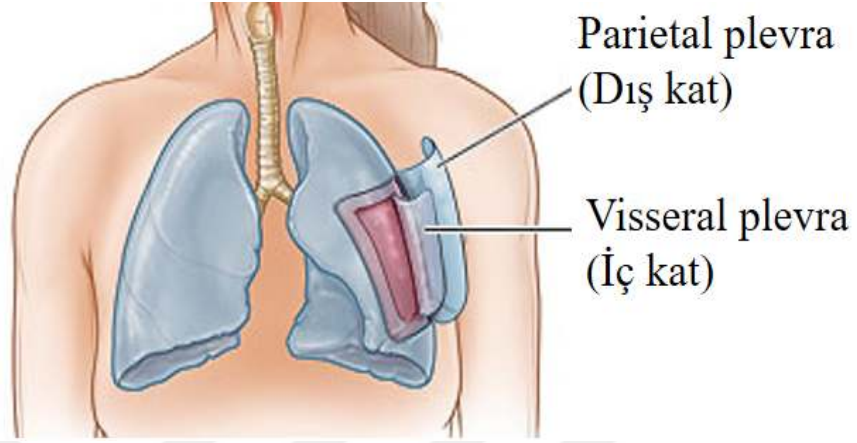
2.2.2. Plevra

Plevra çift katlı seröz bir zar olarak sağ ve sol akciğeri bir kese şeklinde ayrı ayrı sarar (Şekil 2.2) (23,24).

Plevranın parietal yaprağı, göğüs kafesinin iç yüzünü, diafragmanın büyük bölümünü örter ve mediastinumu yanlardan sınırlar.

Plevranın visseral yaprağı, akciğer yüzeyini ve aynı zamanda loblar arasındaki yüzleri örter.

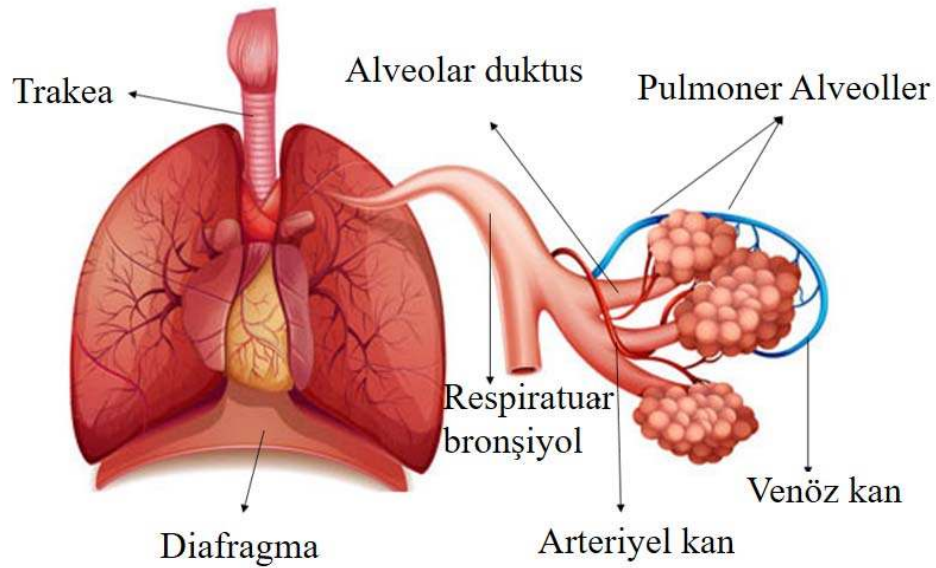
Aralarındaki kapiller aralığa, cavitas pleuralis adı verilir ve solunum sırasında kolaylık sağlayan bir sıvı içerir. Plevranın iki yaprağının birbirlerine yaklaşarak oluşturdukları bölüme ligamentum pulmonale adı verilir ve bu ligament akciğerleri destekler (24,25).



Şekil 2.2. Akciğerler konumu ve plevra ile ilişkisi

2.2.3. Pulmoner Alveoller

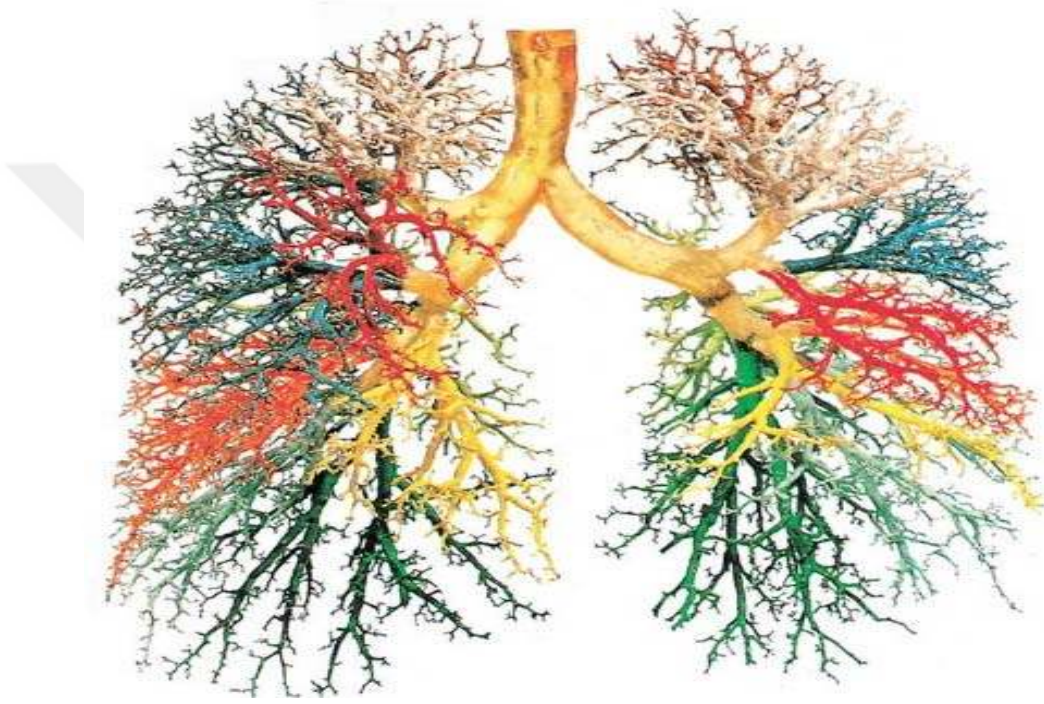
Akciğerlerde gaz değişiminin meydana geldiği fonksiyonel birimler, pulmoner alveollerdir. (Şekil 2.3) (23). Alveollerin duvarlarında Tip I Alveoler hücreler ve Tip II Alveoler hücreler bulunur. Tip II Alveoler hücreler, akciğer surfaktanını yani alveolusların yüzey gerilimini azaltan fosfolipidi salgırlar (24,25).



Şekil 2.3. Solunum sisteminin respiratuar bölümü ve dolaşımı

2.2.4. Bronş Ağacı

Trachea, bifurcatio trakea'dan sonra iki ana bronşa ayrılır ve her ana bronş akciğer içine uzanır. Yabancı partiküllerin, sağ ana bronşa kaçma olasılığı daha yüksektir. Bunun nedeni sağ ana bronşun daha kalın ve dikey konumda olmasıdır. Ana bronşlar devam ettikçe lobar bronşları ve segmental bronşları oluştururlar. Bronşiyal ağaç bronşiyoller denilen daha küçük tübüller bronşiyoller şeklinde devam eder (Şekil 2.4) (23,24).



Şekil 2.4. Trakea'dan bronşiyollere uzanan hava yolları

2.3. Akciğer Kanseri

Kanser dünyada en önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir ve batı ülkelerinde 20.yüzyıl boyunca insidansı giderek artmıştır.

Akciğer kanseri dünya çapında erkeklerde en önde gelen ve kadınlarda ise kansere bağlı ölümlerin ikinci nedenidir. Akciğer kanseri, aynı zamanda, meme, kolon, deri ve prostat kanseri dâhil olmak üzere, diğer kanser tiplerinden gelen metastazların ana yeridir. Tedavide son yıllardaki gelişmelere rağmen, KHDAK hastalarında yanıt ve remisyon oranları nispeten düşüktür (4).

Prognoz, kanserin hücre tipine ve klinik safhasına bağlıdır (26). Akciğer kanseri kötü bir prognoza sahiptir. Kemoterapi, radyasyon tedavisi, cerrahi girişimler ve uygulamalardaki tüm gelişmelere rağmen, akciğer kanserli bireyler için en uzun yaşam süresi 5 yıldır. Bu düşük yaşam oranı için en önemli neden, pek çok vakalarda akciğer kanserinin ileri evrede saptanmasıdır. Düşük yaşam oranının diğer bir nedeni, bireylerde yüksek sıklıkta ikincil tümörlerin ortaya çıkmasıdır (KHDAK olan bireylerde %2, KHAK olan bireylerde %4-%6) (27).

Akciğer kanserinin, karsinojenlere maruz kalma sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Akciğer kanseri gelişimi, özellikle akciğerin genomik kararsızlığa neden olan karsinojenlere maruz kalması ile tetiklenir (27).

2.3.1. Akciğer Kanserinin Evrelemesi

Akciğer kanserin evrelendirilmesinde, primer tümörün büyüklüğüne ve yayılımına (T), bölgesel lenf bezi tutulumuna (N) ve uzak metastaz varlığına (M) dayanan TNM yöntemi kullanılır.

Skumöz, büyük hücreli ve adenokarsinomda (KHDAK) yapılacak tedavi ve prognoz yönünden, TNM sisteminde hastalar evre IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB ve IV şeklinde sınıflandırılır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. TNM sınıflamasına göre evrelendirme (28)

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

2.3.2. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması

Akciğer kanserinin temel iki tipi KHDAK (%85'i) ve küçük hücreli akciğer kanseri-KHAK'dır (%15) (Tablo2.4) (28).

Tablo 2.3.Akciğer tümörlerin sınıflandırılması (29)

1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
• Küçük hücreli karsinom
2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
• Skuamöz hücreli karsinom • Adenokarsinom • Büyük hücreli karsinom • Adenoskuamöz karsinom • Pleomorfik, sarkomatoid ya da sarkomatöz • Elemanlarlabirlikte olan karsinomlar • Karsinoid tümörler • Tipik karsinoid • Atipik karsinoid • Tükrük bezi, tipindeki karsinomlar • Mukoepidermoid karsinom • Adenoid kistik karsinom
1. Sınıflandırılmayan Karsinom

Prognostik özelliklerinin benzerliği ve tedaviye verdikleri yanıtın yakınlığı bakımından skuamöz hücre karsinomu, büyük hücreli akciğer karsinomu ve adenokarsinom aynı grupta KHDAK tanımlanmaktadır (30). KHDAK kötü prognoz'a sahiptir (2) ve akciğer kanserinin en sık tipini temsil etmektedir (3). Skuamöz hücreli kanser, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %30'unu oluşturur. Bu kanser tipinde, tedaviden sonraki lokal tekrarlamalar daha fazladır. Adenokarsinom ve büyük hücreli kanserler akciğer kanserlerinin %5-10'unu oluşturur, mikroskop altında geniş yuvarlak hücrelerin görünmesi nedeniyle bu adı almıştır, genelde akciğerin dış bölgelerinde görülür ve hızlı büyürler (31). Adenokarsinom genelde akciğerlerin

dış kısımlarında görülür ve göğüs duvarına çok kolay yayılabilirler. Bu nedenle metastaz yapma bu tip kanserlerde daha fazla görülmektedir (32).

2.3.3. Akciğer Kanseri Gelişimi İle İlgili Moleküler Olaylar:

- İnvazyon
- Metastaz
- Sürekli anjiogenez
- Hücre ölümünden kaçış
- İmmortalizasyon
- Hücre büyümesinde etkili düzenleyici genlerdeki, (tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerdeki) genetik-epigenetik değişikliklerdir (27).

Kemoprevensiyon, kanserin gelişimindeki bütün basamaklarında (başlangıç, ilerleme, gelişme) kimyasal olarak yapılan önleme ya da durdurma işlemidir. (33,34)

2.3.4. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri:

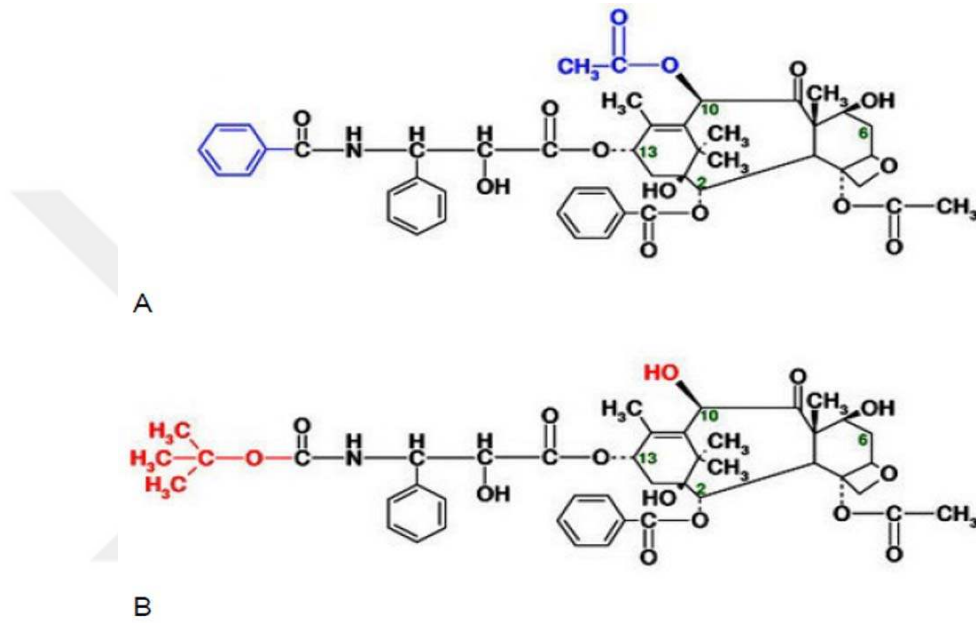
- Sigara akciğer kanserin risk faktörleri arasında çok büyük farkla birinci sıradadır ve akciğer kanserlerinin %90'ndan sorumludur.
- Pasif içicilik
- Radon
- Asbest
- Çeşitli metaller (arsenik, krom, kadmiyum)
- Bazı organik kimyasallar
- Radyasyon
- Çevre kirliliği
- Mesleki maruziyetler
- Çevresel maruziyetler (35).

2.4. Dosetaksel

Taksoidler, Paklitaksel ve Dosetaksel, antineoplastik ilaçların ayrı bir sınıfını temsil etmektedir (10). Taksol, ABD'de yetişen *Taxus brevifolia*'nın kabuğundan 1971 yılında izole edilmiştir (36). Bu yıldan sonra üzerinde yapılan yoğun çalışmalar sonucunda taksol; 1983

yılında faz I, 1985 yılında faz II çalışmalarına alınmıştır. Preparatı Taxol (Bristol-Myers Squibb Company, New York, NY) olarak isimlendirilirken etkin maddesine Paklitaksel (paclitaxel-PTX) (Şekil 2.5.) adı verilmiştir (37,38).

Preparatı Taxotere (Rhone-Poulenc Rorer Pharmaceutical, Inc., Collegeville, PA.) olarak isimlendirilirken etkin maddesine Dosetaksel (Dosetaksel-DTX) (Şekil 2.8) adı verilmiştir (37).



Şekil 2.5. Paklitaksel (A) ve Doksetakselin (B) yapısı. Farklılıklar mavi ve kırmızı ile işaretlenmiştir

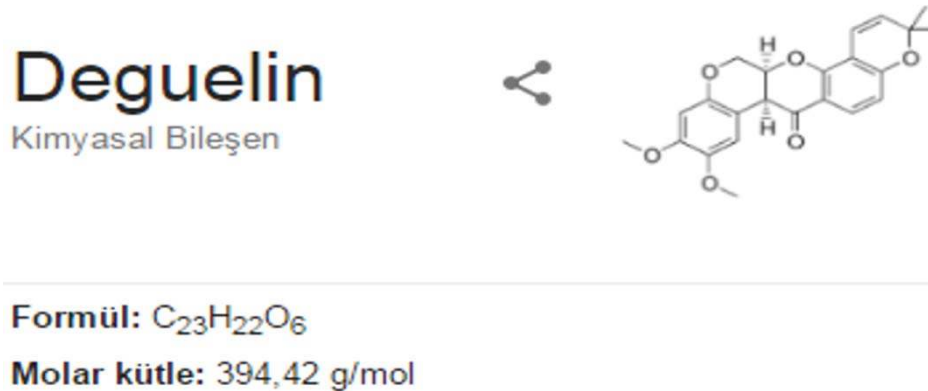
Dosetaksel, porsuk ağacından türetilmiş Paklitakselin yarı sentetik bir türevidir ve taxane'nin yeni türüdür (5). Dosetaksel (DTX), meme (6,7), NSSLK (8), over (9), gastrik (10), baş-boyun (11), prostat (12) kansinimleri da dahil olmak üzere çeşitli solid tümörlere (13) karşı geniş bir anti-tümör aktiviteye sahiptir. Dosetaksel, bu kanser tiplerin tedavisinde hastalarda Paklitaksele göre, daha yüksek yanıt ve daha az yan etkiye sahiptir (5,6). Ancak, DTX'e karşı direnç, akciğer adenokarsinomu olan hastaların başarılı tedavisinin önündeki en büyük engel olmaya devam etmektedir. Hem Dosetaksel hem Paklitaksel mikrotübüllere bağlanarak ve mikrotübüllerin serbest tübülünlere depolimere olmalarını inhibe ederek işlev görürler. Bunun bir sonucu olarak, mikrotübül sistemi içinde denge bozulması, hücre

döngüsünün G2/M fazında mitotik tutulmaya sebep olur ve sonuç olarak hücre ölümüne neden olmaktadır (14).

DTX, hücre mitoz bölünmesini inhibe eder ve apoptoz'u teşvik eder, DMSO ve etanolde çözünürken, sudaki çözünürlüğü oldukça düşüktür. DTX Paklitaksel ile karşılaştırıldığında suda daha yüksek çözünürlük ve tübülinlere karşı daha yüksek afinite göstermektedir (40).

2.5. Deguelin

Bitkilerden elde edilen bitki ilaçları binlerce yıldır dünya çapında kullanılmaktadır (Şekil 2.6.) (15). Deguelin, birçok insan kanserine karşı ümit verici aktiviteye sahiptir. Deguelin kanser kemopreventif ya da karsinogenez inhibitörü olan doğal bileşenin bir örneğidir (16,17). Flavonoid ailesinin bir bileşiği olan rotenoidler, mitokondriyal NADH dehidrojenaz aktivitesini inhibe ederek ve kararlı dengede olan mRNA seviyeleri ve ornitin dekarboksilaz enzim aktivitelerini baskılayarak kemopreventif aktivite gösterirler (41,42).



Şekil 2.6. Deguelinin kimyasal yapısı

Rotenon, mikrotübül yapımını inhibe edebilir ve doğrudan tübüline bağlanarak hücrelerin mitozda duraklamalarına sebep olur (43). Deguelin çeşitli *invitro* çalışmalarda, kolon kanser hücrelerin büyümesini engellediği rapor edilmiştir (20). Ayrıca transforme insan bronşiyal epitel hücreleri ve (KHDAK) hücrelerin büyümesini inhibe edebilir (44,45).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma invaziv olmayan deneysel çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Ocak 2015-Ekim 2016 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı; ARLAB ve Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.3. Çalışma Materyali

Çalışmada H1299 ve A549 küçük hücreli akciğer kanseri hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları Prof. Dr. Hilal KOÇDOR'un hücre kültürü arşivinden temin edildi.

3.4. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı Değişken: Akciğer kanseri hücre hastalarında % canlılık oranı, apoptozis, hücre döngüsü, migrasyon (hücre göçü), koloni analizi.

Bağımsız Değişkenler: Dosetaksel, Deguelin ve DTX+DEG gruplarının farklı derişimlerdeki konsantrasyonları.

3.5. Veri Toplama Araçları:

3.5.1. Kullanılan Cihazlar

Projede kullanılan makine ve teçhizat listesi Tablo 3.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Projede kullanılan mevcut makine- teçhizat listesi.

ADI/MODELİ	PROJEDE KULLANIM AMACI
Hava Akış kabineti/Kojair	Hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.
CO2 inkübatörü/Thermo Forma Steri-cycle	Hücrelerin belli sıcaklık ve CO ₂ içeren ortamda saklanması amacıyla kullanılmıştır.
Otoklav/Hirayama Hiclave	Pipet vb. malzemelerin sterilizasyonu amacıyla kullanılmıştır.
ELİSA Plak okuyucu/Biotek Elx 808- 660nm	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 ve Akım sitometrik çalışmalarda kullanılmıştır.
Etüv/Thermo Heraeus	Steril edilmiş malzemeleri kurutmak için kullanılmıştır.
Buzdolabı (-20, +4) / Siemens	Kimyasalların saklanması için kullanılmıştır.
Sıvı Nitrojen Depolama Tankı (-196) (MVEXLC)	Hücre hatlarının saklanması için kullanılmıştır.
Derin dondurucu (-80) / Indesit	Hücre hatlarının saklanması için kullanılmıştır.
Akım Sitometrik analiz Cihazı/BD FACS Calibur	Apoptoz ve Hücre Döngüsü analizinde kullanılmıştır.
Santrifüj	Hücre lizat ve Apoptoz ve Hücre Döngüsü analizinde kullanılmıştır.
Hassas terazi	Kuru kimyasalları tartmak için kullanılmıştır.
Mikrodalga	Koloni analizi için kullanılmıştır.

3.5.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Diğer Gereçler

Projede kullanılan sarf malzeme ve diğer gereçler Tablo 3.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.2. Projede kullanılan sarf malzemeler ve diğer gereçler.

Maddenin Adı	Markası-Cat No:
Deguelin	Sigma-Aldrich
Dosetaksel	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Gibco
DMEMF-12	Gibco
RPMI 1640	Gibco
Fetal Sığır Serum (FBS)	Gibco
Tripsin-EDTA	Gibco
Penisilin / Streptomisin	Gibco
PBS	Gibco
DMSO	Cryosure
Tripan mavisi	Sigma-Aldrich
Hücre Canlılık Testi	Bimake
Microtest 96 Well Plate	Costar
Microtest 6 Well Plate	Costar
Akım Sitometri Tüpü	BD Falcon
Akım Sitometrik Apoptoz Analiz Kiti	BD Pharmingen
Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analiz Kiti	Cycle TEST PLUS
1000 ml'Lik Filtreli Pipet Ucu	Costar
200 ml'Lik Filtreli Pipet Ucu	Costar

100 ml’Lik Filtreli Pipet Ucu	Costar
10 ml’Lik Filtreli Pipet Ucu	Costar
Parafilm	American National Can
Otoklav Bandı	Sussex
12ml’lik Steril Tüp	Costar
Lateks Eldiven	Beybi
1ml’lik Pipet	Costar
2ml’lik Pipet	Costar
25 cm ² ’lik Steril Hücre Kültür Kabı	Costar
75 cm ² ’lik Steril Hücre Kültür Kabı	Costar
50 ml’lik Flakon	Axygen
2 ml’lik Cryovial	Costar
Lateks Eldiven	Tenty
L-Glutamin	Fresenius Kabı
Wound Healing Plate	İbidi
Binding Buffer	BD Facscanto II
Agaroz	Sigma
Cell Scraper	Costar
Lateks Eldiven	Tenty
Es 7x	Mp Biomedicals

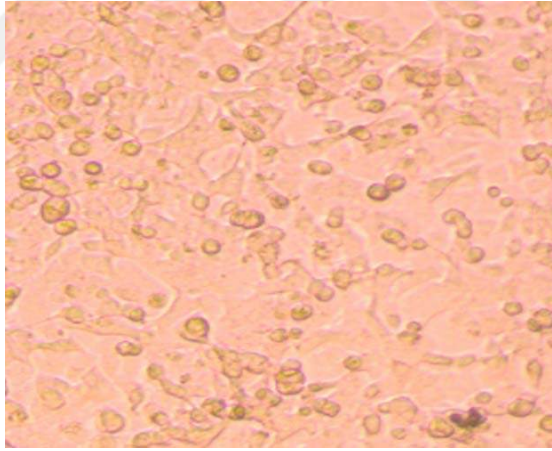
3.5.3. Uygulanan Yöntemler

3.5.3.1. Hücre Kültürü

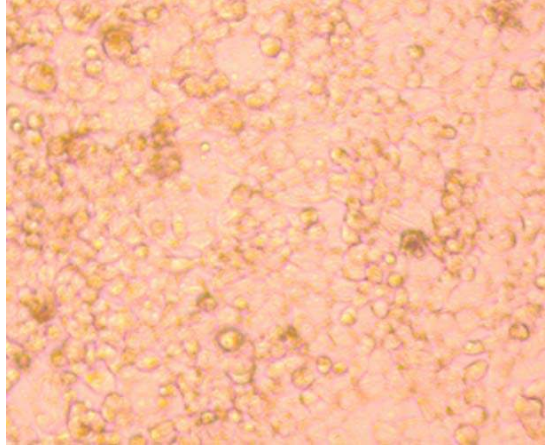
3.5.3.1.1. Hücre Hattı Özellikleri

Deneyler iki adet iki boyutlu yüzeye bağımlı akciğer kanseri hücre hattı kullanılarak gerçekleştirildi. H1299 hücre hattı, küçük hücreli dışı akciğer karsinom hücre hattıdır. NCI-H1299 (46,47), CRL-5803 (48) olarak da adlandırılır. H1299 hücre hattı (Şekil 3.1), lenf nodundan türetilmiştir ve birçok çalışmada kullanılmaktadır. P53 mutant bir hücre hattı olan H1299, ölümsüzleşmiş diğer hücre hatlarında olduğu gibi sürekli bölünebilir.

A549 hücreleri adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücreleridir. A549 hücre hattı (Şekil 3.2) ilk olarak 1972'de D. J. Giard ve arkadaşları tarafından, 58 yaşındaki bir erkeğin kanserli akciğer dokusundan alınmış ve kültürlenmesiyle elde edilmiştir (49,50). A549 hücreleri *in vitro* olarak kültürlenirse, tek tabakalar halinde kültür flaskına yapışarak büyürler. A549 hücre hattı, *in vitro* bir çözelti içine süspanse edilebilir (49).



Şekil 3.1. H1299 hücre hattı



Şekil 3.2. A549 hücre hattı

3.5.3.1.2. Hücrelerin Kültürde İdamesi

H1299 hücre hattı %10 oranında FBS, %1 L-glutamin içeren RPMI-1640 ortamında ve A549 hücre hattı %10 oranında FBS, %1 L-glutamin içeren DMEM ortamında kültüre edildi. Bakteri kontaminasyonunun önlenmesi için penisilin ve streptomisinden oluşan antibiyotik çözeltisinden kültür ortamına ilave edildi. Hücreler 25 cm²'lik hücre kültür flasklarına ekildi. 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilerek canlılıklarının devamı sağlandı. Flasklarda beslenen hücre hatları %80 yoğunluğa ulaşana kadar her iki günde bir beslendi. Bu yoğunluğa gelen hücrelerin çoğaltılması amacıyla pasajlama işlemi uygulandı. Pasajlama işlemi ile hücreler 75 cm²'lik kültür kaplarına alınıp çoğaltıldı (51). Tablo 3.3.

Tablo 3.3. Hücre hatları ve hücre kültüründe kullanılan ortam içerikleri.

Hücre hattı	Ortam
H1299	RPMI 1640
A549	DMEM

3.5.3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Steril pipetler kullanılarak flask içindeki ortam uzaklaştırıldı. Hücreleri yapıştıkları 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 kalktığından emin olmak amacıyla mikroskop altında kontrol edildi. Hücreler flask yüzeyinden ayrıldığında Tripsin-EDTA hacminin 2 katı kadar ortam flask içine ilave edildi. Flask içindeki hücre içeren süspansiyon 15 mL 'lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı ve 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üst faz (supernatant) atıldı ve tüpün dibinde olan hücre peleti üzerine 10 ml kültür ortamı ilave edildi. Pipet ucuyla hücreler süspanse edildi. Her kültür kabına 2 ml süspanse haldeki kültür ortamı ve hücreler paylaştırılarak üzerelerine 5 ml ortam eklendi. Çoğalması için 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirildi (51).

3.5.3.1.4. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler Tripsin-EDTA etkisiyle flask yüzeyinden kaldırıldıktan sonra hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen pellet üzerine 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 saat -20 °C'de bekletildi daha sonra -80 °C'de depolandı (51).

3.5.3.1.5. Hücrelerin Çözülmesi

Kabin içinde, steril ortamda hücre kültür kapları 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 kültürünün idamesi sağlandı (51).

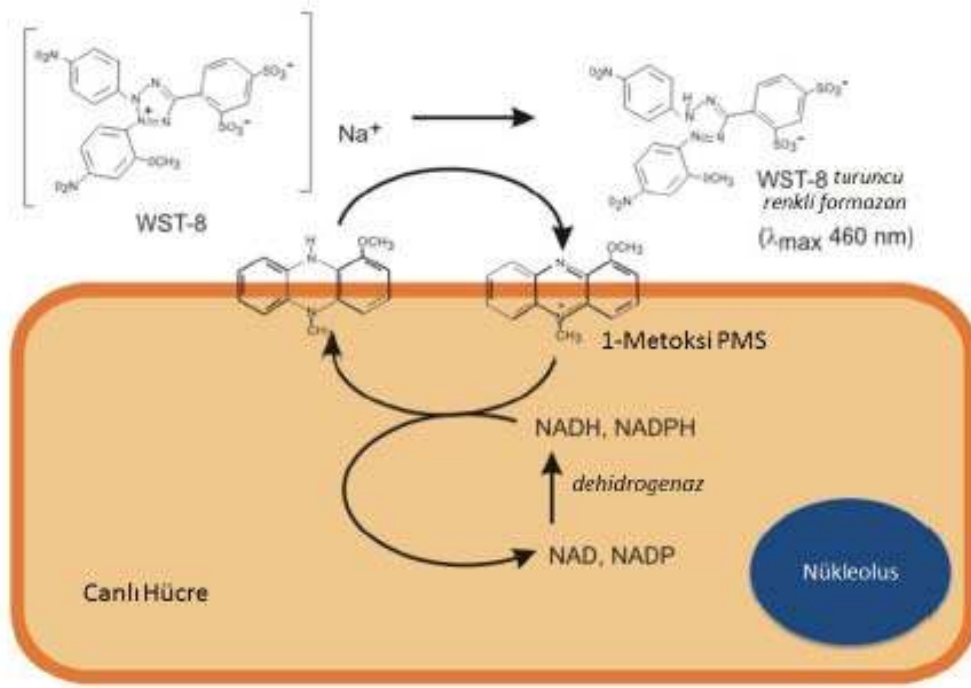
3.5.3.1.6. Hücrelerin Sayılması

Thoma lamı distile su ve alkol ile temizlendi. Üzeri hafifçe ıslatılarak lamele yerleştirildi. 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. Thoma lamının her iki tarafındaki karelerde sayılan hücrelerin sayısının ortalaması hesaplandı ve ortalama hücre sayısı x Dilüsyon Faktörü x 10^4 formülü ile 1 ml'deki hücre sayısı belirlendi (51).

3.5.3.2. Hücre Canlılık Testi

3.5.3.2.1. Yöntemin Prensibi

Hücre canlılık testinde Cell Counting Kit (CCK) kullanıldı. Suda çözünebilen formazanlar, suda çözünebilen tetrazolyum tuzlarından (WST) oluşturmaktadır. Elektron taşıyıcısı oldukça stabil olan 1-Metoksi-PMS'dir (52). 1-Metoksi-PMS'in indirgenmiş formuyla beraber reaksiyona girerek indirgenir. Bu taşıyıcı hücre membranında bulunmaktadır. NADH ya NADPH ile doğrudan reaksiyona girer. NADH ve NADPH ile laktat dehidrogenaz ve laktik asit gibi dehidrogenaz enzimleri ve substratlarının reaksiyonları ile NAD^+ ve $NADP^+$ 'den oluşur. Bu nedenle tetrazolyum tuzu dehidrogenazın aktivitesinin yada substratının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Canlı hücrelerde bulunan dehidrogenazlar tarafından CCK'nın indirgenip, oluşturduğu formazan ürünü solüsyona 460 nm'de pik absorbanı veren güçlü bir renk oluşturur. Bu rengin yoğunluğu mikropate okuyucuda ölçülür (52).



Şekil 3.3. CCK'nın formazana indirgenme mekanizması (52)

3.5.3.2.2 İlaçların Hazırlanması

3.5.3.2.2.1. Deguelin Hazırlanması

Toz halinde temin edilmiş Deguelin DMSO da çözüldü. Stok çözeltisinin konsantrasyonu 10.000 µM olarak ayarlandı. Bu stok solüsyondan seri dilüsyonlar ile 1000 µM, 100 µM, 10 µM ve 1 µM, 1 µM'lık konsantrasyonlar elde edildi.

Önce büyük konsantrasyonlarda, konsantrasyon aralıkları büyük olacak ölçümlerle olası etkin dozlar hakkında bilgi sahibi olmaya çalışıldı. Daha sonra ara stoktan; H1299 hücre hattı için 100000 nM, 10000 nM, 1000 nM, 100 nM ve 10 nM olmak üzere,

A549 hücre hattı için de 1000 nM, 500 nM, 100 nM, 10 nM ve 1 nM olmak üzere 5 farklı doz hazırlandı.

3.5.3.2.2.2.Dosetakselin Hazırlanması

Elde olan DTX stoğu 2000µM 'dür. 100 µM olan ara stok elde eldesinden sonra bu ara stoktan seri dilüsyonlar ile 50µM, 5µM, 0,5µM ve 0,05µM olmak üzere dört farklı doz hazırlandı.H1299 hücre hattı için RPMI-1640 ve A549 hücre hattı için DMEM ortamı kullanıldı.

3.5.3.2.3. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney prosedürü

Hücre Canlılık testi için; A549 ve H1299 hücreleri yüzeye yapışan hücreler oldukları için tripsin kullanarak flask yüzeyinden kaldırıldı. Hücre süspansiyonu tripan mavisi sayım yöntemi ile Thoma lamında sayılarak 96 kuyucuklu kültür kabının her kuyucuğuna 10.000'er hücre ekildi. Hücrelerin yapışması için 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 72 saat ön inkübasyona bırakıldı.

96 kuyucuklu kültür kabının kuyucuklarından ortamlar çekildi, Yerine yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda Deguelin ve Dosetaksel çözeltilerinden her kuyucuğa 200 µl hacimde konuldu. Her grup için sekiz kuyucuk olacak şekilde gruplar hazırlandı. İlaç uygulanmayan, sadece hücre ve ortamdan oluşan bir kontrol gurubu oluşturuldu. Deguelin DMSO'da çözüldüğü için DMSO grubu oluşturuldu. Hücrelerin 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 72 saat inkübasyona bırakıldı. (Tablo 3.4, Tablo 3.5, Tablo 3.6, Tablo 3.7).

Tablo 3.4. Hücre Canlılık Deneyi için A549 hücre hattına verilen Dosetaksel'in 96kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı.

A549	A	B	C	D	E	F
	Kontrol	DMSO	DTX	DTX	DTX	DTX
1	Kontrol	1/1000 (v/v)	50 µM	5 µM	0.5 µM	0.05 µM
2	Kontrol	1/1000 (v/v)	50 µM	5 µM	0.5 µM	0.05 µM
3	Kontrol	1/1000 (v/v)	50 µM	5 µM	0.5 µM	0.05 µM
4	Kontrol	1/1000 (v/v)	50 µM	5 µM	0.5 µM	0.05 µM
5	Kontrol	1/1000 (v/v)	50 µM	5 µM	0.5 µM	0.05 µM
6	Kontrol	1/1000 (v/v)	50 µM	5 µM	0.5 µM	0.05 µM
7	Kontrol	1/1000 (v/v)	50 µM	5 µM	0.5 µM	0.05 µM
8	Kontrol	1/1000 (v/v)	50 µM	5 µM	0.5 µM	0.05 µM

Tablo 3.5. Hücre Canlılık Deneyi için A549 hücre hattına verilen Deguelin'in 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı.

A549	A	B	C	D	E	F	G
	Kontrol	DMSO	DEG	DEG	DEG	DEG	DEG
1	Kontrol	1/1000 (v/v)	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
2	Kontrol	1/1000 (v/v)	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
3	Kontrol	1/1000 (v/v)	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
4	Kontrol	1/1000 (v/v)	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
5	Kontrol	1/1000 (v/v)	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
6	Kontrol	1/1000 (v/v)	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
7	Kontrol	1/1000 (v/v)	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
8	Kontrol	1/1000 (v/v)	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM

Tablo 3.6. Hücre Canlılık Deneyi için H1299 hücre hattına verilen Dosetaksel'in 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı.

H1299	A	B	C	D	E	F
	Kontrol	DMSO	DTX	DTX	DTX	DTX
1	Kontrol	1/1000 (v/v)	50µM	5µM	0.5µM	0.05µM
2	Kontrol	1/1000 (v/v)	50µM	5µM	0.5µM	0.05µM
3	Kontrol	1/1000 (v/v)	50µM	5µM	0.5µM	0.05µM
4	Kontrol	1/1000 (v/v)	50µM	5µM	0.5µM	0.05µM
5	Kontrol	1/1000 (v/v)	50µM	5µM	0.5µM	0.05µM
6	Kontrol	1/1000 (v/v)	50µM	5µM	0.5µM	0.05µM
7	Kontrol	1/1000 (v/v)	50µM	5µM	0.5µM	0.05µM
8	Kontrol	1/1000 (v/v)	50µM	5µM	0.5µM	0.05µM

Tablo 3.7. Hücre Canlılık Deneyi için H1299 hücre hattına verilen Deguelin'in 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı.

H1299	A	B	C	D	E	F	G
	Kontrol	DMSO	DEG	DEG	DEG	DEG	DEG
1	Kontrol	1/1000 (v/v)	100000 nM	10000 nM	1000 nM	100 nM	10 nM
2	Kontrol	1/1000 (v/v)	100000 nM	10000 nM	1000 nM	100 nM	10 nM
3	Kontrol	1/1000 (v/v)	100000 nM	10000 nM	1000 nM	100 nM	10 nM
4	Kontrol	1/1000 (v/v)	100000 nM	10000 nM	1000 nM	100 nM	10 nM
5	Kontrol	1/1000 (v/v)	100000 nM	10000 nM	1000 nM	100 nM	10 nM
6	Kontrol	1/1000 (v/v)	100000 nM	10000 nM	1000 nM	100 nM	10 nM
7	Kontrol	1/1000 (v/v)	100000 nM	10000 nM	1000 nM	100 nM	10 nM
8	Kontrol	1/1000 (v/v)	100000 nM	10000 nM	1000 nM	100 nM	10 nM

Deguelin, Dosetaksel ve DMSO ile muamele edilen hücreler 72 saat boyunca 37 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. 72 saat sonunda hücreler 2 kez PBS ile yıkanıp, CCK prosedürü uygulandı. İnkübasyon sonrası 450 nm (650 nm referans) dalga boyunda canlı hücrelerin absorbans ölçümleri mikropate okuyucudan alındı. Elde edilen absorbans değerleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak canlı hücre oranı belirlendi.

Hücre canlılık testi her ilaç grubu için farklı konsantrasyonlarda sekiz kuyucukta ve üç farklı zamanda tekrarlandı.

3.5.3.3. Akım Sitometrik Analizler

3.5.3.3.1. Apoptoz Analizi (Annexin V yöntemi)

3.5.3.3.1.1. Yöntemin Prensibi

Bu çalışmada apoptoz analizi BD Pharmingen firmasından temin edilen “Apoptosis Detection Kit” ile gerçekleştirildi. FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserin bağlanma oranı flow sitometri ile ölçüldü. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak Propidyum iyodür (PI) eklendi. Anneksin V-FITC (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidium iodide (red fluorescence) ile boyanma farklılığına göre hücreler aşağıdaki gibi birbirinden ayrımlandı (53);

- Canlı hücreler (FITC-PI-),
- Erken apoptotik hücreler (FITC+PI-),
- Geç apoptotik (FITC+PI+)
- Nekrotik hücrelerin (FITC+PI+)

3.5.3.3.1.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

Bu çalışmada apoptoz analizi BD Pharmingen firmasından temin edilen “AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit” (BD Pharmingen) ile gerçekleştirildi. H1299 ve A549 hücreleri tripsinizasyonla kültür kabından kaldırıldı. Hücreleri tripan mavisi sayım yöntemi ile Thoma lamında sayılıp ve 6 kuyucuklu plate ’lerin her kuyucuğuna hücreler ekildi. 72 saatlik bir ön inkübasyondan sonra daha önce her ilaç için elde edilen IC₅₀ dozları tek ve kombine gruplar şeklinde kuyucuklara verildi (tablo 3.9). 72 saat inkübe edildi. 72 saatlik ilaca

maruziyet sonrasında 6 kuyucuklu plate'lerdeki ortamlar çekilip 15ml'lik tüplere aktarıldı. Daha sonra kuyucuklara Tripsin-EDTA eklenip hücreler kaldırıldı. Tripsinin etkisini gidermek için tripsin miktarının 2 katı kadar ortam kuyucuklara eklendi ve hepsi çekilip 15 ml'lik tüplere ilave edildi. Santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Tüplere binding buffer eklendi ve resüspanse edildikten sonra tüplere önce AnnexinV daha sonra PI eklendi. Tüpler karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Ardından her tüpe binding buffer eklendi ve cihaza verildi. Erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ve canlı hücre oranları çift lazerli akım sitometri cihaz ile değerlendirildi (54).

3.5.3.3.2. Hücre Döngüsü Analizi

3.5.3.3.2.1. Yöntemin Prensibi

Bu çalışma, hücrelerin hücre döngüsünün hangi aşamasında olduğunu belirlenmesi amacıyla yapılan işlemdir. Propidium iodide boyasının hücrelerin DNA'sına bağlanıp ışığa vermesi temeline dayanır. Bağlanan bu boya miktarı her bir hücredeki total DNA miktarı ile orantılıdır (55).

3.5.3.3.2.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

Bu çalışmada hücre döngüsü analizi Cycle Test Plus DNA Reagent Kit ile gerçekleştirildi. H1299 ve A549 hücreleri tripsinizasyonla kültür kabından kaldırıldı. Hücreler tripan mavisi sayım yöntemi ile Thoma lamında sayılıp, 6 kuyucuklu plate'lerin her kuyucuğuna ekildi. 72 saatlik bir ön inkübasyondan sonra daha önce her ilaç için elde edilen IC50 dozları tek ve kombine gruplar şeklinde kuyucuklara verildi (Tablo 3.9). 72 saatlik ilaca maruziyet sonrasında 6 kuyucuklu plate'lerdeki ortamlar çekilip 15ml'lik tüplere aktarıldı. Daha sonra kuyucuklara Tripsin-EDTA eklenip hücreler kaldırıldı. Tripsinin etkisini gidermek için tripsin miktarının 2 katı kadar ortam kuyucuklara eklendi ve hepsi çekilip 15 ml'lik tüplere ilave edildi. 5 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Her tüpe buffer eklendi, resüspanse edilip içerikler 17x100 mm 'lik tüplere aktarıldı. 5 dakika santrifüj yapıldı. Bu yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. 4. yıkama tampon solüsyonu ile yapılarak, 5 dakika santrifüj edildi. Her yıkamadan sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Bu aşamadan sonraki işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

Yıkama işlemlerinin ardından tampon solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine solüsyon A her tüpe eklendi ve hafifçe çalkalandı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra solüsyon A uzaklaştırılmadan solüsyon B tüplere eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. +4 °C’de solüsyon C her tüpe eklendi. 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi ve örnekler akım sitometri cihazında analiz edildi. G0/G1, sentez fazı ve G2+Mitoz fazına ait hücreleryüzde olarak değerlendirildi. Bu analiz için oluşturulan gruplar Tablo 3.8.’de gösterilmektedir.

Tablo 3.8. Akım Sitometrik analizlerdetüm hücre hatları için oluşturulan gruplar

Hücre Hattı	GRUPLAR (72 saat inkübasyon süresi)			
H1299	Kontrol	DTX IC ₅₀	DEG IC ₅₀	DEG+ DTX IC ₅₀ IC ₅₀
A549	Kontrol	DTX IC ₅₀	DEG IC ₅₀	DEG+ DTX IC ₅₀ IC ₅₀

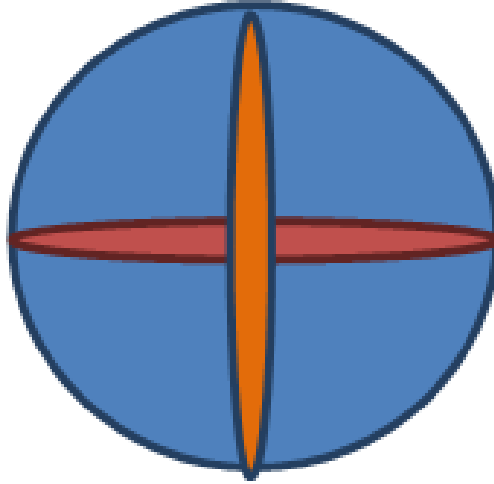
3.5.3.4. Koloni Sayısı Analizi

Alt tabaka agaroz hazırlamak için gerekli miktarda agaroz steril beher içinde hassas terazi üzerinde tartıldı. Gerekli miktarda steril distile su üzerine ilave edilip mikrodalga içinde kaynamaya bırakıldı. Kaynadıktan sonra laminar flow kabinet içinde eşit hacimde ortam ile iyice pipetlenip 6 kuyucuklu plate’in her kuyucuğuna agaroz ve ortam karışımı dikkatlice eklendi ve katılaşması için bekletildi.

Üst tabaka için daha önceden tripan mavisi sayım yöntemi ile Thoma lamında sayılmış olan H1299 ve A549 hücreleri sayılarak DMEM içinde hazırlandı.

Üst tabaka agaroz hazırlamak için gerekli miktarda agaroz steril beher içinde hassas terazi üzerinde tartıldı. Gerekli miktarda steril distile su üzerine ilave edilip mikrodalga içinde kaynamaya bırakıldı. Laminar flow kabinet içinde agaroz ile eşit miktarda hücre ve ortam süspansiyonu ile iyice pipetaj yapıldı. 6 kuyucuklu plate’in her kuyucuğuna ilave edildi. Agaroz katılaşana kadar bekletilip, her grup için hazırlanan ilaç dozları ve kontrol grup için ortam ilave edildi. 37 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Gün aşırı dozlar ve ortam gruplara ilave edildi. 14.günün sonunda vital screen boyası ilave edilerek

inkübasyona bırakıldı. 4X'lik büyütmede fotoğraflandı ve koloni sayıları kaydedildi. Her plate'teki koloni sayısını belirlemek için şekil 3.1.'de gösterilen kırmızı ve turuncu bölgelerdeki koloniler sayıldı. Bu analiz için oluşturulan gruplar Tablo 3.9.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Her plate kolonilerin sayıldığı bölgeler (turuncu ve kırmızı kısımlar)

Tablo 3.9. Koloni Analizde tüm hücre hatları için oluşturulan gruplar

Hücre Hattı	GRUPLAR (72 saat inkübasyon süresi)		
H1299	Kontrol	Dosetaksel	Deguelin
A549	Kontrol	Dosetaksel	Deguelin

3.5.3.5. Migrasyon Analizi

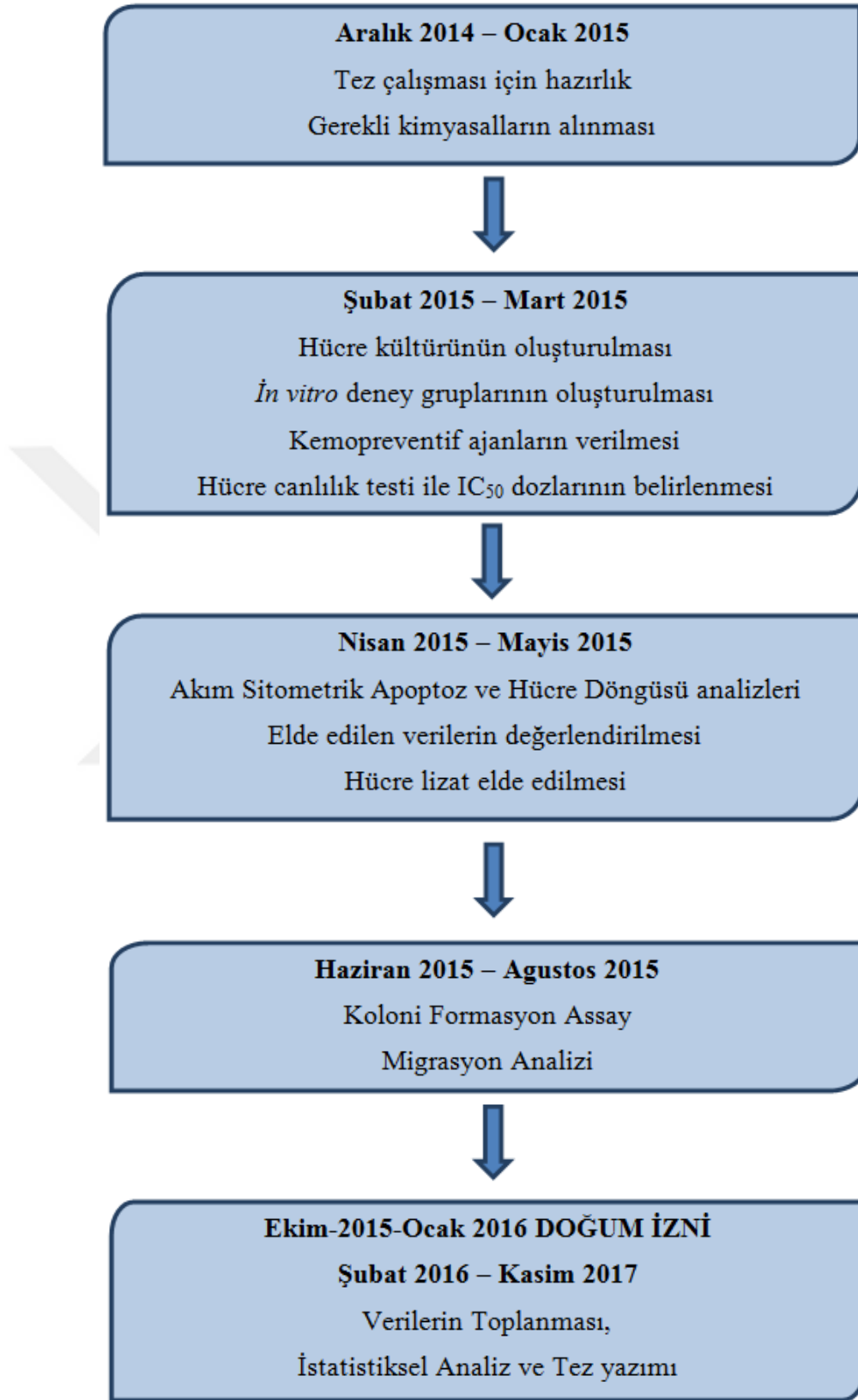
3.5.3.5.1. Yöntemin Prensibi

Bu çalışmada migrasyon analizi Culture-Insert 2 Well ile gerçekleştirildi. Migrasyon analizi, *in vitro* olarak yönlü hücre göçünü incelemek için en önemli yöntemlerden biridir. Hücrelerin göç yoluyla migrasyon analizinin kinematiği incelenir.

3.5.3.5.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

Her grup için hücreler 6 kuyucuklu plate'e ekildi. 6 kuyucuklu plate'in her kuyucuğuna tedavi gruplarına ilaçlı ortam ve kontrol grubuna normal ortam ilave edildi. Hücreler inkübatörde bekledikten sonra tripsin ile kaldırılıp sayıldı. Plate'in içinde bulunan culture-insert'in her bir kuyucuğuna 70µl ortam içinde hücreler eklendi. Plate'ler 72 saat inkübe edildi. Bu süre bittikten sonra dikkatli bir şekilde forseps ile culter-insert, plate den koparıldı. Kontrol grubuna ilaçsız ortam ve tedavi gruplarına ise ilaçlı ortam eklendi. Dikkatlice plate'lerin kapakları kapatılıp mikroskop altında görüntü alındı (1. Saat).Daha sonra paletler inkübatöre konuldu. 4., 6., 8., 10., 12., ve 24. saatlerde grupların görüntüleri alındı ve gruplar arası fark analiz edildi. Bu analiz içinoluşturulan gruplar tablo 3.9' da gösterilmektedir.

3.6.Araştırma Planı ve Takvimi



3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analiz Rstudio programı (v.0.98.501) ve R script dili kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) kullanılarak incelendi.

Tanımlayıcı istatistik; değişkenlerin ortalama $\pm$ standart sapma değerleri verilerek yapıldı. Değişkenlerin normal dağılım göstermediği durumda 2 bağımsız grubun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı.

İkiden fazla bağımsız grubun karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis H testi kullanıldı. P-değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Hücre hattı çalışmalarında sterilizasyon çalışmanın vazgeçilmezidir.

Kontaminasyonu engellemek için çalışma protokolumuzda 2 ya da 3'lü antibiyotik kullanımı standarttır. Çalışmamızın hiçbir döneminde kontaminasyon yaşanmadı, sterilizasyona çok dikkat edildi.

Hücre hatlarında kullanılan ilaçların etkin dozlarını ortaya koyma konusunda sıkıntı yaşanabilirdi, bununla ilgili kısıtlılık da izlenmedi.

Agaroz jelin laboratuvarımızda standardize edilmesinde ardışık denemeler yapmak durumunda kaldık. Burada da kısıtlılık düzeyine gelinmeden emek ve zaman harcanarak deney prosedürü oturtuldu.

Projenin bütçesine ve zamana bağlı olarak en uygun metodlar belirlenerek çalışma yapıldı. Ancak gelecekte farklı bir proje ile bu araştırmada yer almayan farklı metodlar ile apoptozis yolakları (westernblot veya ELISA) ve anjiogenezis (3B Biyogörüntü Analizi) çalışılabilir.

3.9. Etik Kurul Onayı

DEÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu; Etik Kurul Onayı; 20.11.2014, 2014/ 35-32 No'lu karar.

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsünde Temel Onkoloji Anabilim Dalından ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenme Kaynakları Merkezi Araştırma Laboratuvarı-ARLAB'dan çalışma izni alınmış, belgeler ekte sunulmuştur.



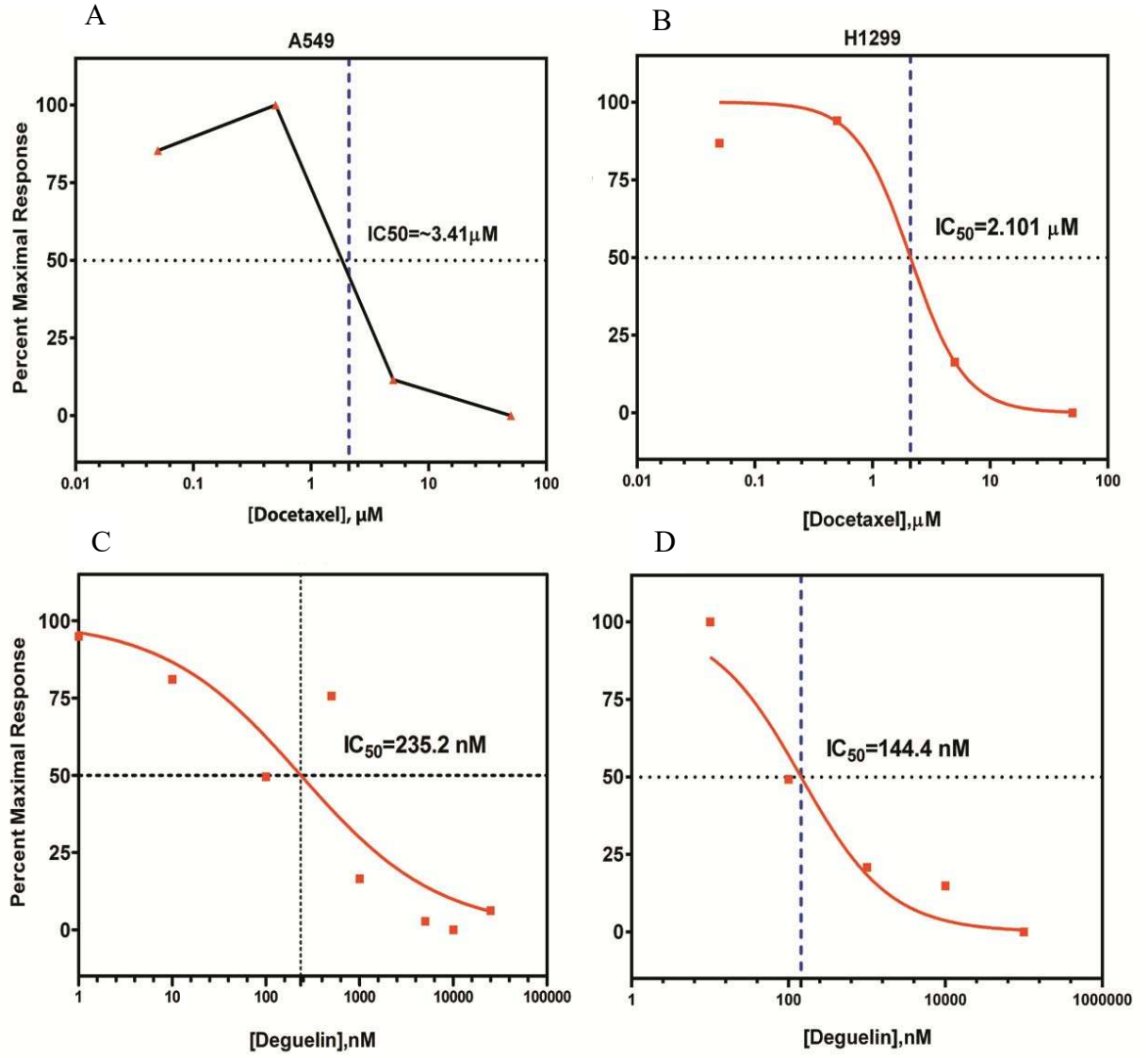
4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılık Testi

72 saat süresince Dosetaksel (50 μ M, 5 μ M, 0,5 μ M, 0,05 μ M) konsantrasyonları A549 ve H1299 hücre hattı üzerinde uygulandı ve Dosetaksel konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi incelendi. 72 saatlik Dosetaksel uygulaması sonucu ve hücre canlılığının %50 oranda azaldığı IC50 dozu A549 hücre hattında 3.41 μ M ve H1299 hücre hattında 2.101 μ M olarak belirlendi (Şekil 4.1.A ve Şekil 4.1.B).

72 saat süresince Deguelin 1000 nM, 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM konsantrasyonlarda A549 hücre hattında ve 100000 nM, 10000 nM, 1000 nM, 100 nM, 10 nM konsantrasyonlarda H1299 hücre hattında uygulandı. Deguelin konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi incelendi. 72 saatlik Deguelin uygulaması sonucu hücre canlılığının %50 oranda azaldığı dozlar belirlenmiştir (Şekil 4.1.C ve Şekil 4.1.D).

DMSO grubundaki hücre sayısı ile kontrol grubu arasında hiçbir fark gözlenmediği ve istatistiksel anlamlılık da olmadığı için bundan sonraki diğer çalışmalarda DMSO grubu çalışılmadı.



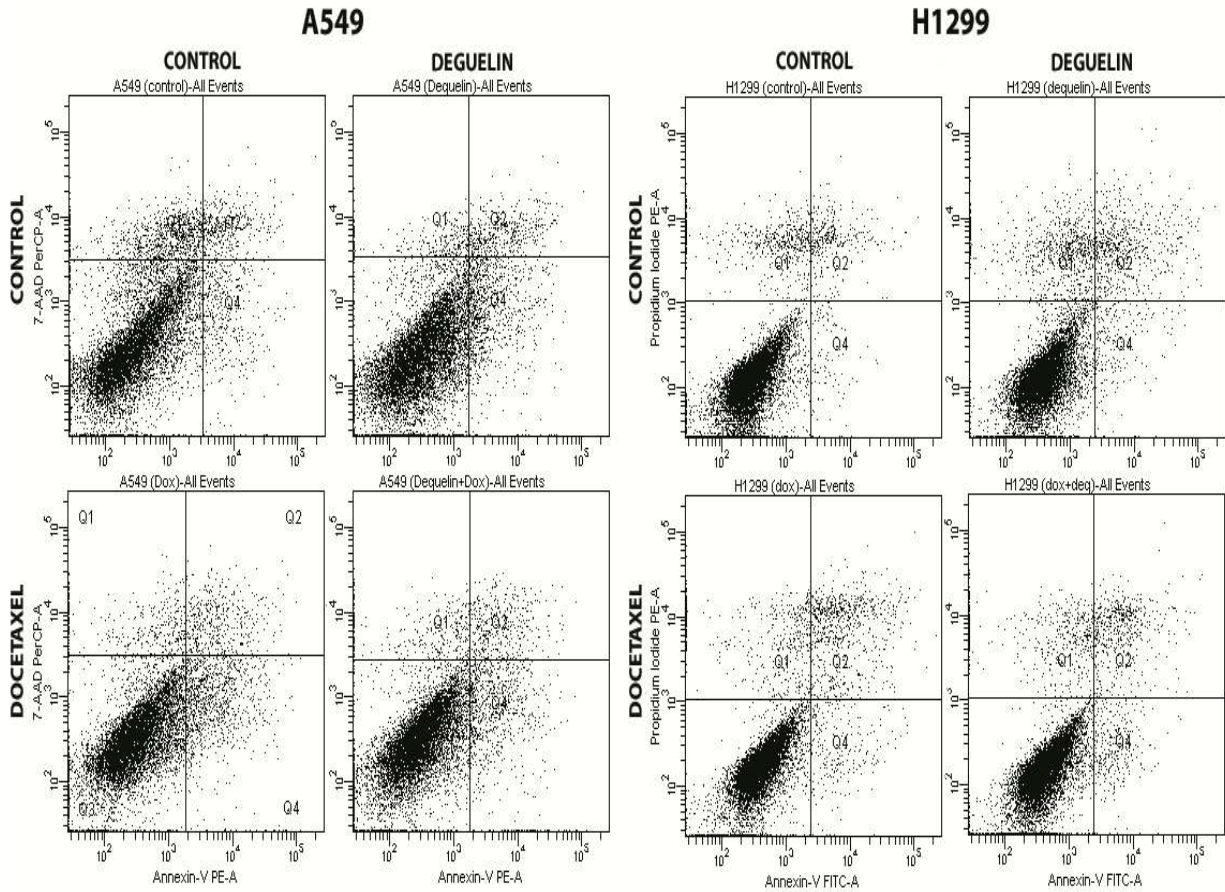
Şekil 4.1. A549 Hücre hattında (A: Dosetaksel, C: Deguelin) ve H1299 hücre hattında (B: Dosetaksel ve D: Deguelin) 72 saatlik IC_{50} dozları

4.2. Akım Sitometrik Analizi

4.2.1. Akım Sitometrik-Apoptoz Analizi

A549 ve H1299 hücre hatlarında tekli ve kombine ilaç grupları ile kontrol grubu arasında apoptoz analizinde Q₂+Q₄ faz hücre oranında anlamlı fark elde edildi ($p < 0.05$).

Her iki hücre hattında Dosetaksel ve Deguelin yalnız başlarına ve kombine kullanımlarında apoptotik hücre oranını anlamlı ölçüde arttırdığı saptanmıştır (Şekil (4.3), Şekil (4.4) ve Şekil (4.5)).



Şekil 4.2. A549 ve H1299 hücre hatlarında belirlenen IC₅₀ dozları ile 72 saatlik Dosetaksel ve Deguelin uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik-Apoptoz Analizi bulguları.

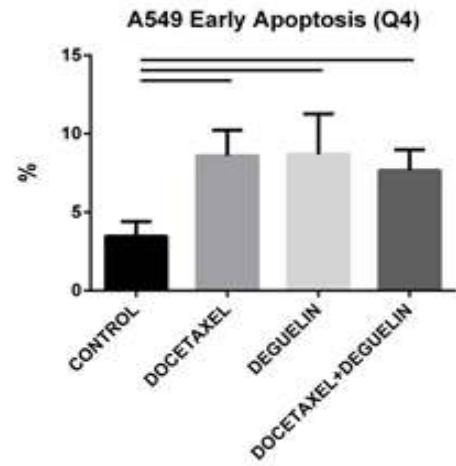
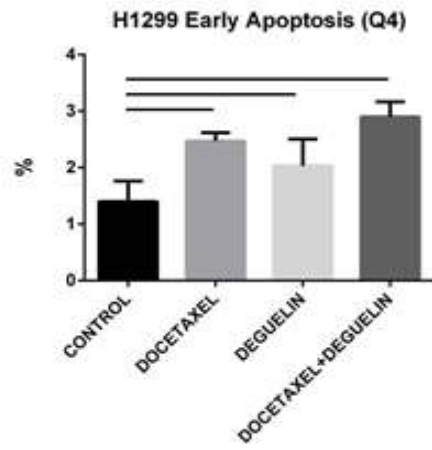
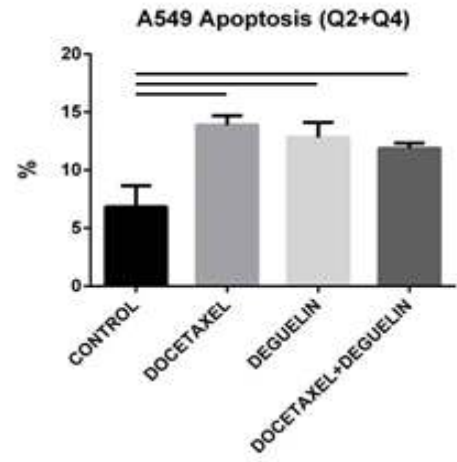
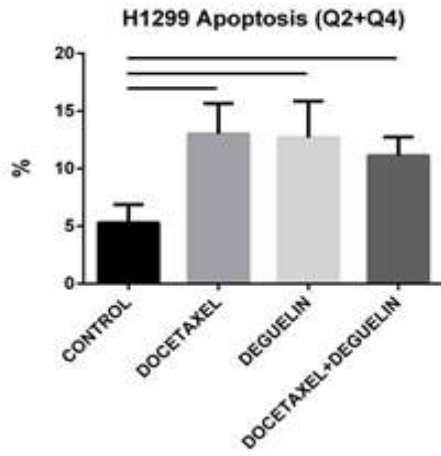
Tube: H1299 (Control)			Tube: H1299 (Dox)		
Population	#Events	%Total	Population	#Events	%Total
■ All Events	10,000	100.0	■ All Events	10,000	100.0
☒ Q1	593	5.9	☒ Q1	1,254	12.5
☒ Q2	300	3.0	☒ Q2	368	3.7
☒ Q3	8,953	89.5	☒ Q3	8,131	81.3
☒ Q4	154	1.5	☒ Q4	247	2.5

Tube: H1299 (Deq)			Tube: H1299 (dox+deq) 02		
Population	#Events	%Total	Population	#Events	%Total
■ All Events	10,000	100.0	■ All Events	10,000	100.0
☒ Q1	1,043	10.4	☒ Q1	510	5.1
☒ Q2	215	2.2	☒ Q2	1,037	10.4
☒ Q3	8,594	85.9	☒ Q3	8,193	81.9
☒ Q4	148	1.5	☒ Q4	260	2.6

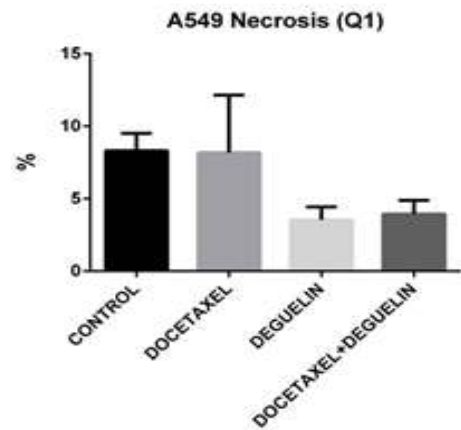
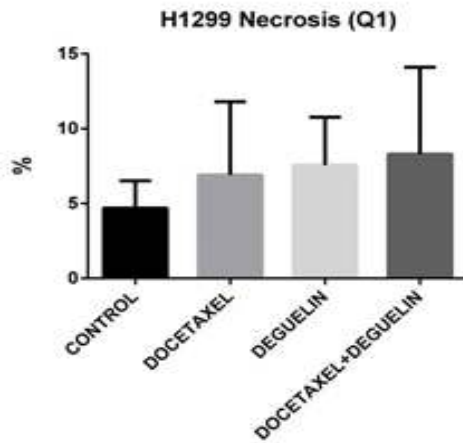
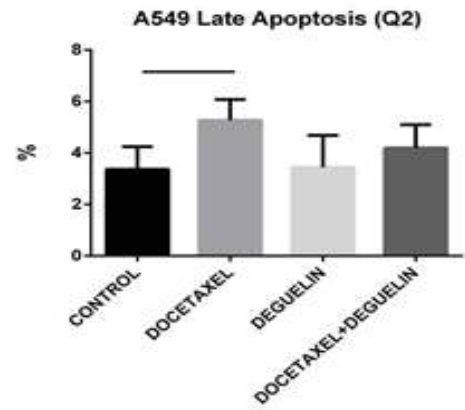
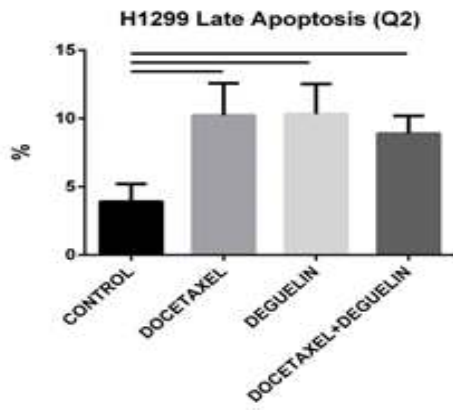
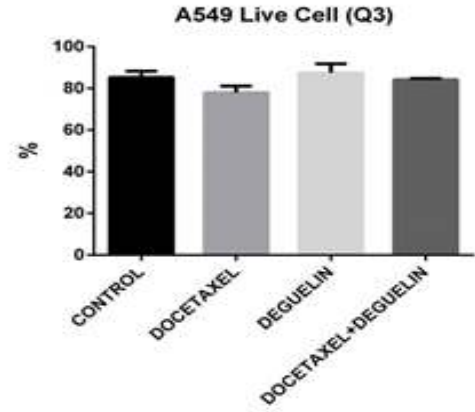
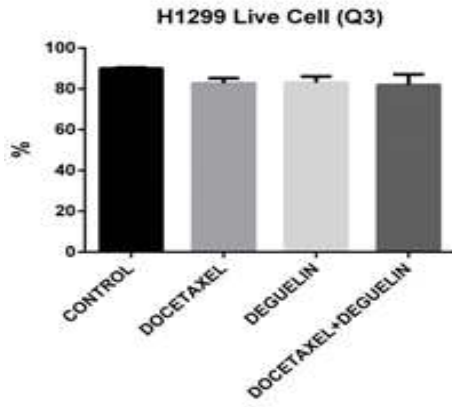
Tube: A549 (Control)			Tube: A549 (Dox)*		
Population	#Events	%Total	Population	#Events	%Total
■ All Events	10,000	100.0	■ All Events	10,000	100.0
☒ Q1	705	7.0	☒ Q1	995	10.0
☒ Q2	238	2.4	☒ Q2	541	5.4
☒ Q3	8,821	88.2	☒ Q3	7,645	76.4
☒ Q4	236	2.4	☒ Q4	819	8.2

Tube: A549 (Dequelin)			Tube: A549 (Dequelin+Dox)		
Population	#Events	%Total	Population	#Events	%Total
■ All Events	10,000	100.0	■ All Events	10,000	100.0
☒ Q1	260	2.6	☒ Q1	299	3.0
☒ Q2	470	4.7	☒ Q2	330	3.3
☒ Q3	8,313	83.1	☒ Q3	8,457	84.6
☒ Q4	957	9.6	☒ Q4	914	9.1

Şekil 4.3. Apoptoz Analiz Verileri.



Şekil 4.4. A549 ve H1299 hücre hatlarında Apoptoz Analiz (Q₄+Q₂, Q₄) sonuçları



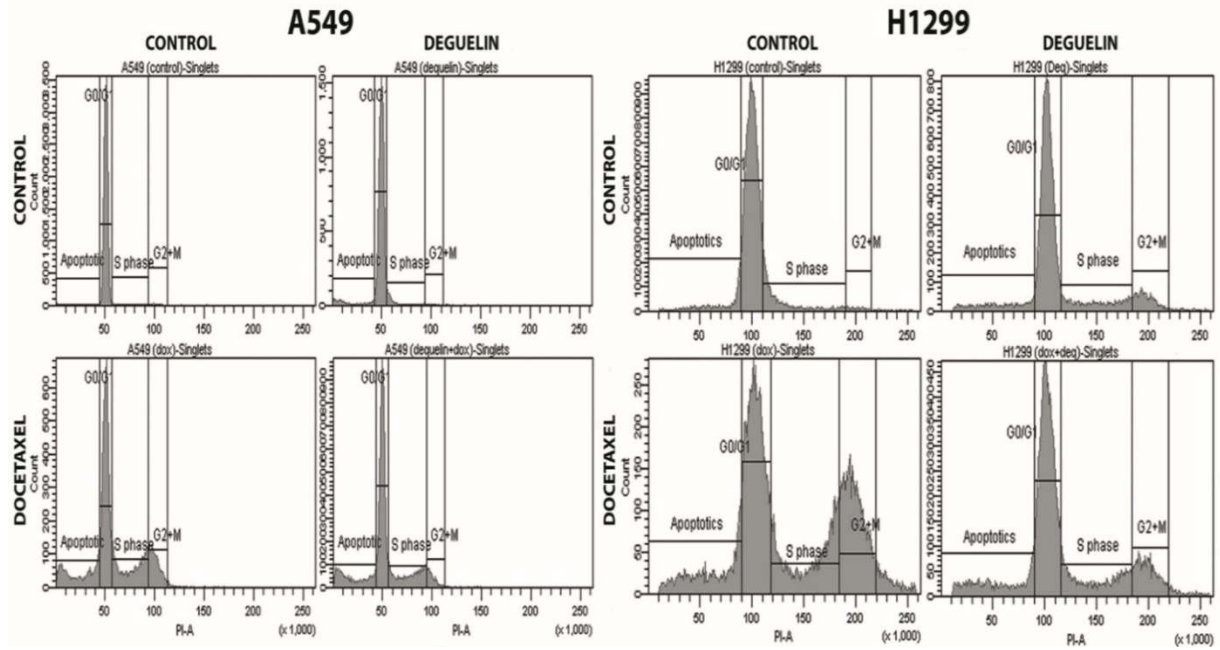
Şekil 4.5. A549 ve H1299 hücre hatlarında Apoptoz Analiz (Q₁, Q₂, Q₃) sonuçları

4.2.2. Hücre Döngüsü

A549 ve H1299 hücre hatlarında tüm gruplar arasında hücre döngüsünün -biri hariç- tüm aşamasındaki hücre oranlarını arasında anlamlı farklılıklar elde edildi ($p<0.05$). Sadece A549 hücre hattında Dosetaksel ile DEG+DTX grupları arasında apoptotik faza giren hücre yüzdesinde anlamlı fark elde edilemedi ($p>0.05$).

H1299 hücre hattında Dosetaksel rejimine Deguelin eklenmesinin Dosetakselin etkisini apoptoz fazında inhibe ettiği tesbit edildi ($p<0.05$).

H1299 ve A549 hücre hattında Dosetaksel rejimine Deguelin eklenmesi Dosetakselin etkisini G0/G1 fazında arttırdığı, sentez ve G2+M fazında inhibe ettiği belirlendi ($p<0.05$) (Şekil (4.6), Şekil (4.7), Şekil (4.8) ve Şekil (4.9)).



Şekil 4.6. A549 ve H1299 hücre hattı üzerinde belirlenen IC50 dozları ile 72 saatlik Dosetaksel ve Deguelin uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analiz bulguları.

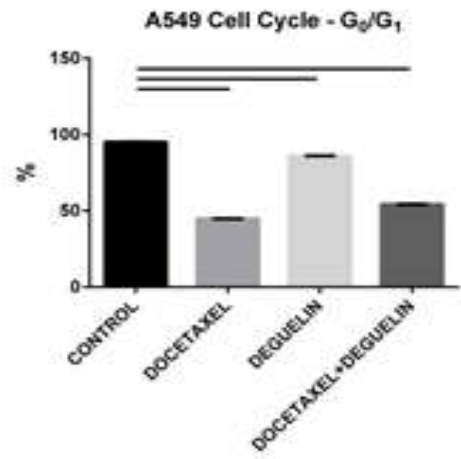
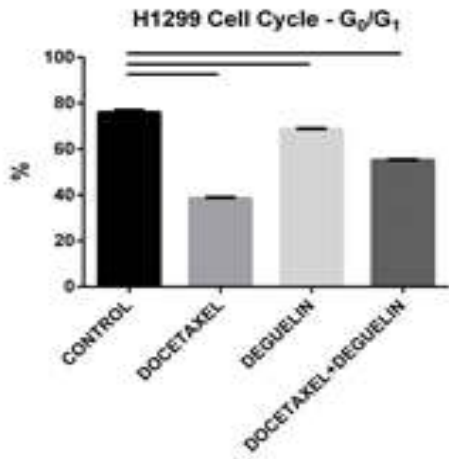
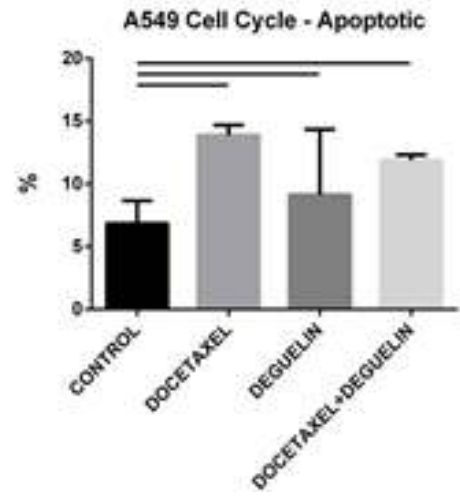
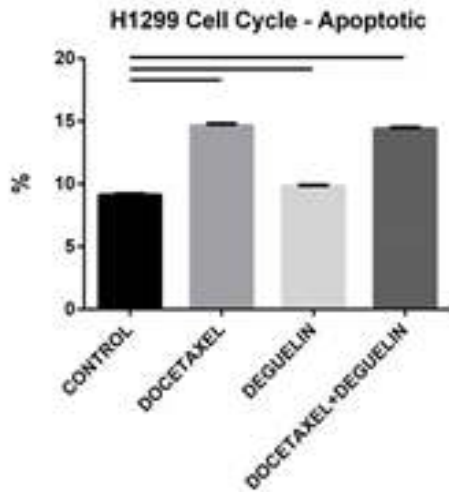
Tube: H1299 (control)				Tube: H1299 (dox)			
Population	#Events	%Parent	%Total	Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0	All Events	20,000	###	100.0
Singlets	17,687	88.4	88.4	Singlets	14,623	73.1	73.1
G0/G1	13,383	75.7	66.9	G0/G1	5,375	36.8	26.9
S phase	2,369	13.4	11.8	S phase	2,901	19.8	14.5
G2+M	255	1.4	1.3	G2+M	3,624	24.8	18.1
Apoptotics	1,610	9.1	8.0	Apoptotics	2,032	13.9	10.2

Tube: H1299 (Deq)				Tube: H1299 (dox+deq)			
Population	#Events	%Parent	%Total	Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0	All Events	20,000	###	100.0
Singlets	15,631	78.2	78.2	Singlets	13,901	69.5	69.5
G0/G1	10,556	67.5	52.8	G0/G1	7,453	53.6	37.3
S phase	1,961	12.5	9.8	S phase	2,256	16.2	11.3
G2+M	1,388	8.9	6.9	G2+M	1,829	13.2	9.1
Apoptotics	1,499	9.6	7.5	Apoptotics	1,945	14.0	9.7

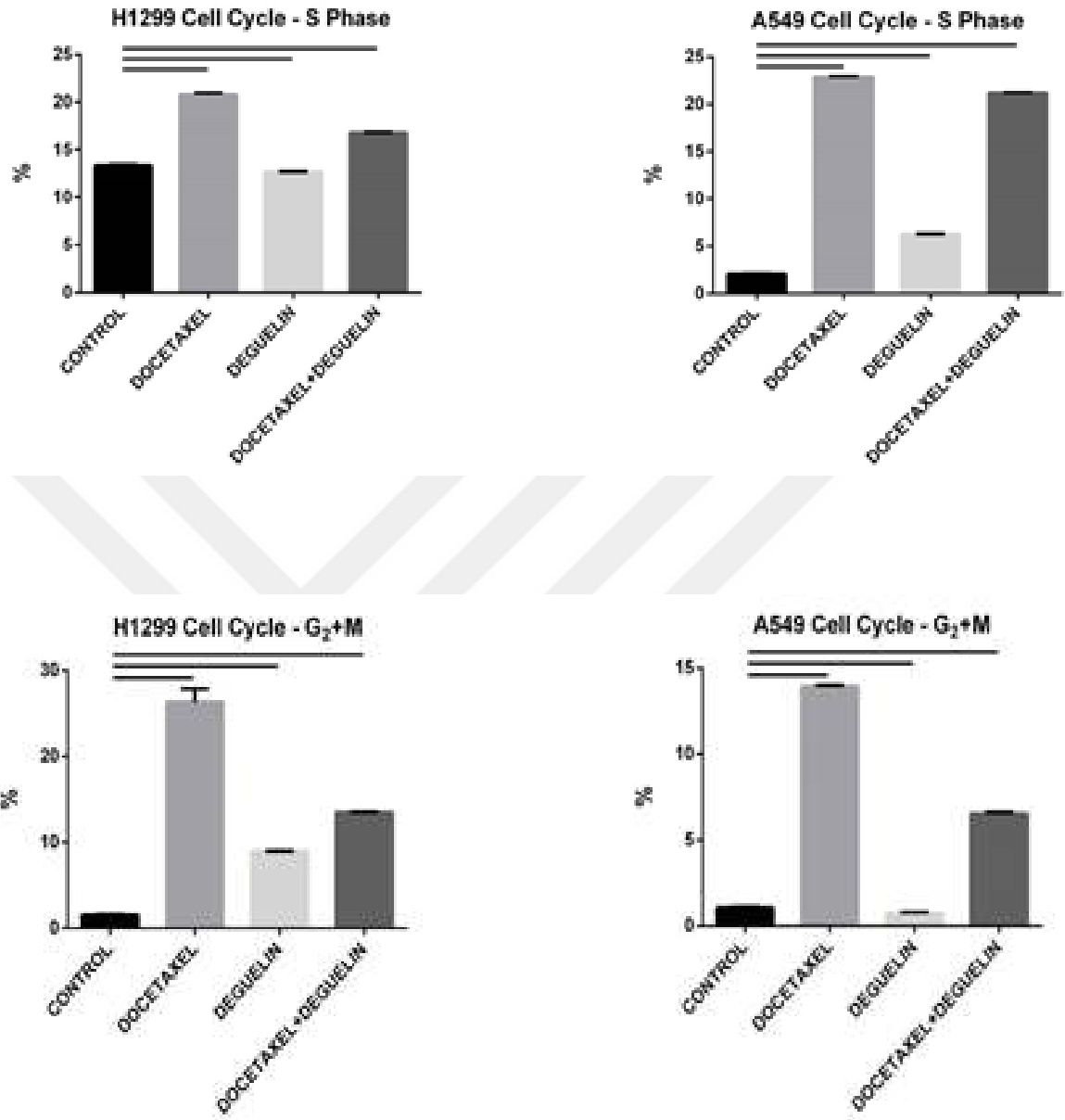
Specimen Name: 14052015 (Nina) Tube Name: A549 (control) Record Date: May 14, 2015 5:06:35 PM				Specimen Name: 14052015 (Nina) Tube Name: A549 (dox) Record Date: May 14, 2015 5:13:06 PM			
Population	#Events	%Parent	PI-A Mean	Population	#Events	%Parent	PI-A Mean
P1	16,853	84.3	49,086	P1	12,309	61.5	53,281
Singlets	16,068	95.3	50,756	Singlets	10,214	83.0	58,379
Apoptotic	277	1.7	13,905	Apoptotic	1,847	18.1	22,650
G0/G1	15,302	95.2	50,496	G0/G1	4,568	44.7	50,222
S phase	333	2.1	70,472	S phase	2,319	22.7	75,530
G2+M	154	1.0	99,133	G2+M	1,411	13.8	100,373

Specimen Name: 14052015 (Nina) Tube Name: A549 (dequelin) Record Date: May 14, 2015 5:23:37 PM				Specimen Name: 14052015 (Nina) Tube Name: A549 (dequelin+dox) Record Date: May 14, 2015 5:32:05 PM			
Population	#Events	%Parent	PI-A Mean	Population	#Events	%Parent	PI-A Mean
P1	11,255	56.3	45,216	P1	12,351	61.8	47,067
Singlets	10,002	88.9	48,291	Singlets	10,059	81.4	53,020
Apoptotic	701	7.0	17,190	Apoptotic	1,801	17.9	19,265
G0/G1	8,603	86.0	49,312	G0/G1	5,460	54.3	49,458
S phase	618	6.2	62,555	S phase	2,125	21.1	75,906
G2+M	72	0.7	98,243	G2+M	658	6.5	99,381

Şekil 4.7. Hücre Döngüsü Analiz Verileri.



Şekil 4.8. A549 ve H1299 hücre hatlarında Hücre Döngüsü Analiz (apoptoz ve G₀/G₁) sonuçları.



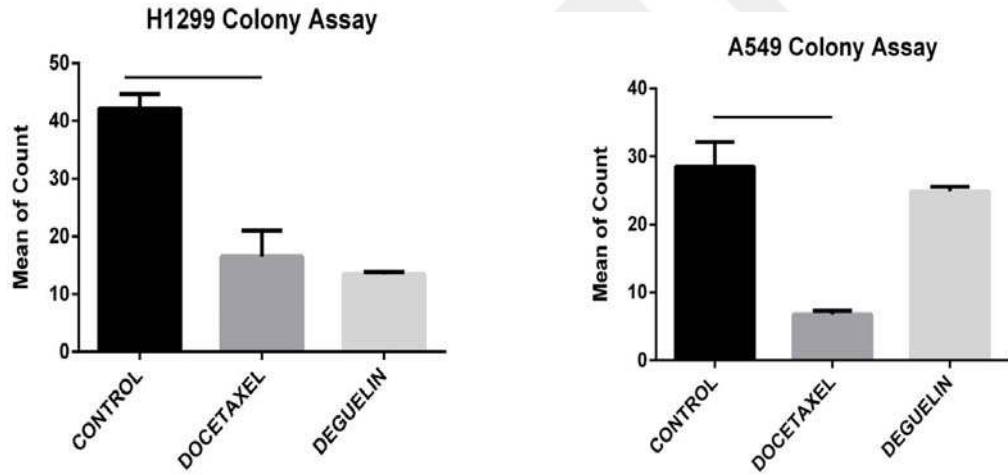
Şekil 4.9. A549 ve H1299 hücre hatlarında Hücre Döngüsü Analiz (S, G₂+M) sonuçları.

4.3. Koloni Sayısı Analizi

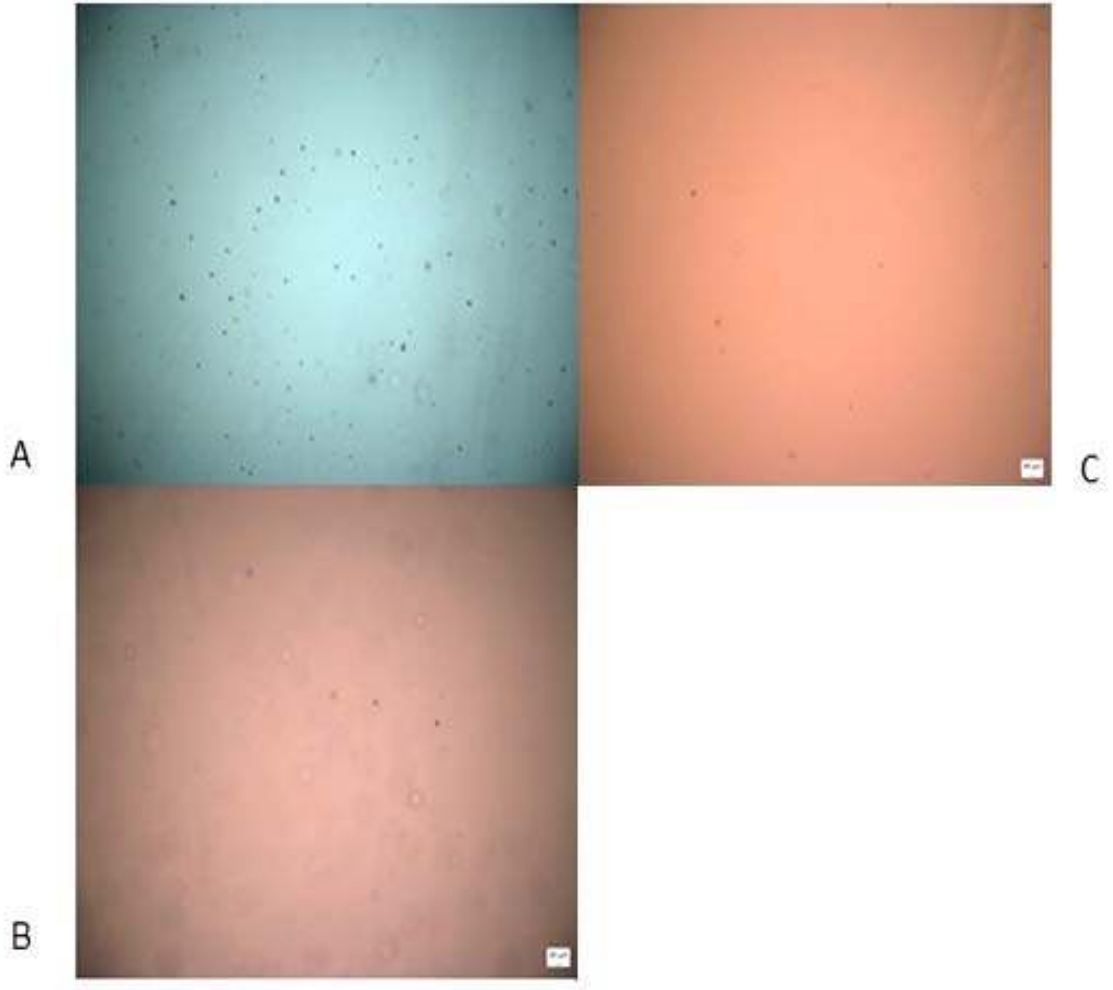
H1299 hücre hattında kontrol grubu ile Dosetaksel ve Deguelin grupları arasında koloni sayısında anlamlı fark elde edilmiştir ($p<0.05$). İlaç grupları arasında koloni sayısında anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Kontrole karşı en düşük koloni sayısı Deguelin grubunda görülmektedir. (Şekil 4.10)

A549 hücre hattında kontrol grubu ile Dosetaksel grupları arasında koloni sayısında anlamlı fark elde edilmiştir ($p<0.05$). Ancak kontrol grubu ile Deguelin grubu arasında koloni sayısında anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.10).

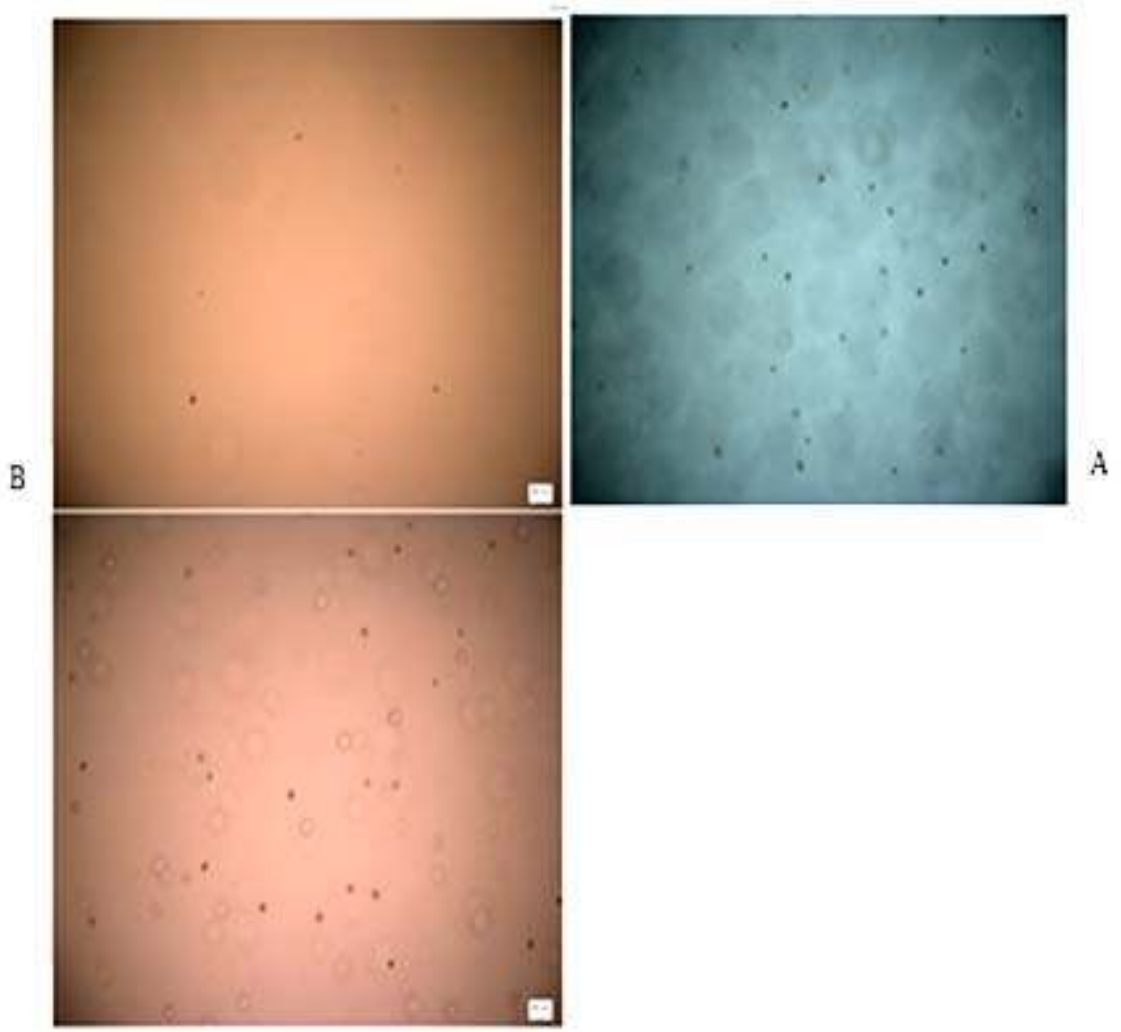
Deguelin ve Dosetaksel grupları arasında koloni sayısında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). A549 hücre hattında ilaç grupları arasında en yüksek koloni sayısı Deguelin grubunda saptanmıştır (Şekil 4.11 ve Şekil 12).



Şekil 4.10. A549 hücre hattında Koloni Sayısı Analiz sonuçları.



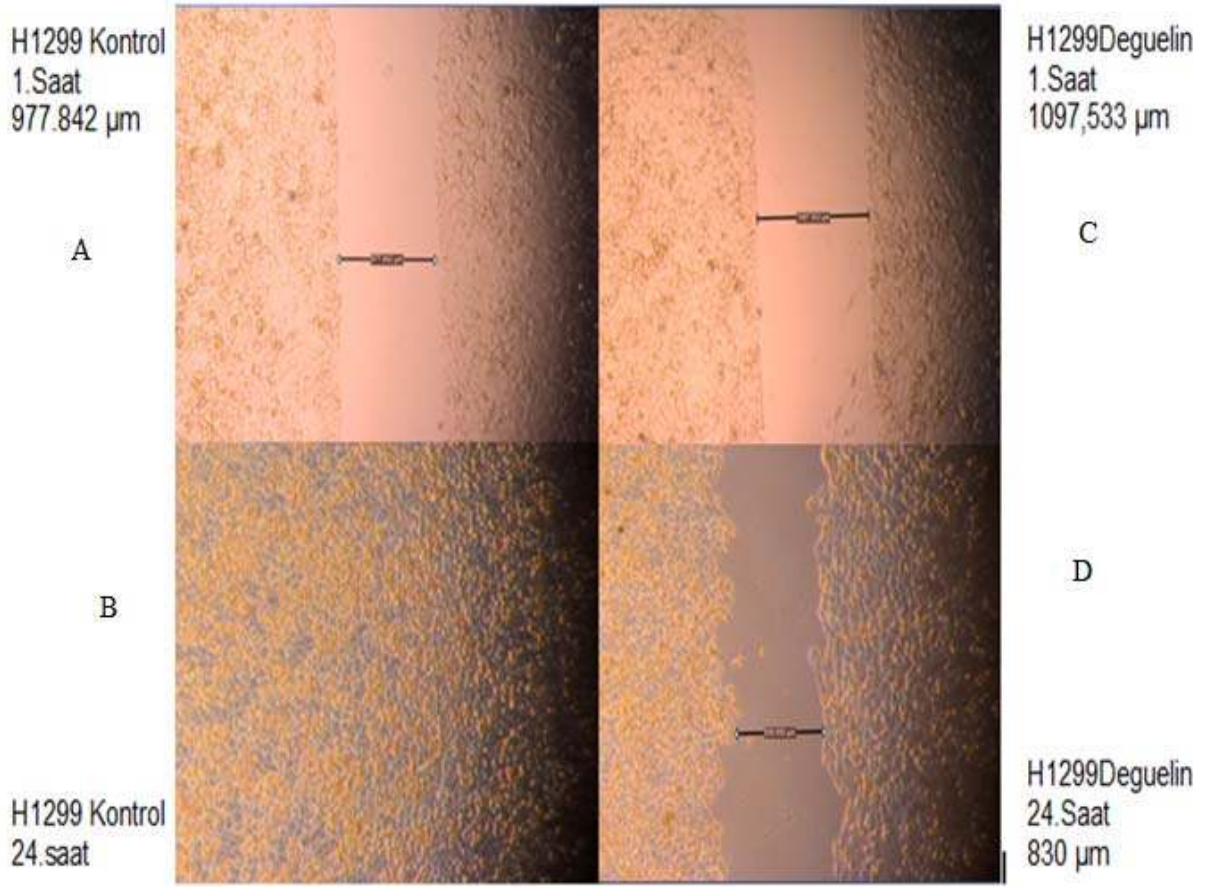
Şekil 4.11. H1299 hücre hattında mikroskop altında 4X'lik büyütmede fotoğraflanan koloniler (**A:** H1299 Kontrol grubu, **B:** H1299 Deguelin grubu, **C:**H1299 Dosetaksel grubu).



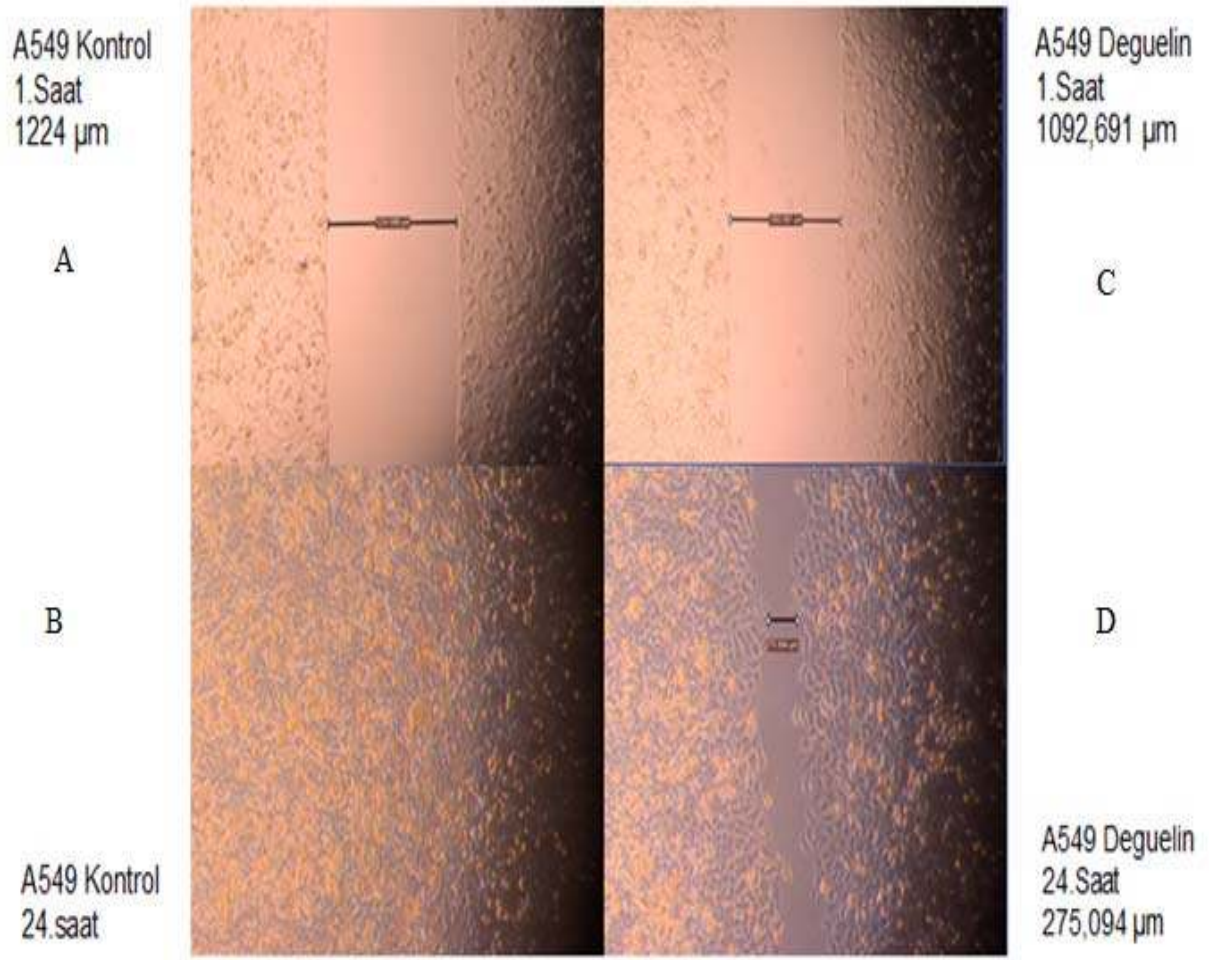
Şekil 4.12. A549 hücre hattında mikroskop altında 4X'lik büyütmede fotoğraflanan koloniler
(**A:** A549 Kontrol grubu, **B:** A549 Dosetaksel grubu, **C:** A549 Deguelin grubu)

4.4. Migrasyon Analizi

H1299 ve A549 hücre hatlarında kontrol ve Deguelin gruplarının migrasyon testi yapılmıştır. 24 saat sonunda elde edilen sonuçlara göre Deguelin'e maruz bırakılan H1299 ve A549 hücre hatlarında hücrelerin üreme ve çoğalma hızının inhibe edildiği gözlenmiştir. Bu sonuçlarda Deguelin'in H1299 hücre hattında daha etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).



Şekil 4.13. H1299 hücre hattında migrasyon analizinde mikroskop altında 4X'lik büyütmede 1. ve 24. saat sonunda fotoğraflanan hücreler (**A:** H1299 hücre hattında kontrol grubunda 1.saat sonunda ayırık bölgenin mesafesi 977.842 µm. **B:** H1299 hücre hattında kontrol grubunda 24. saat sonunda ayırık bölge hücreler ile kapanmış. **C:** H1299 hücre hattında Deguelin grubun 1.saat sonunda ayırık bölgenin mesafesi 1097,533 µm. **D:** H1299 hücre hattında Deguelin grubun 24. saat sonunda ayırık bölge 830 µm)



Şekil 4.14. A549 hücre hattında migrasyon analizinde mikroskop altında 4X'lik büyütmede 1. ve 24. saat sonunda fotoğraflanan hücreler (**A:** A549 hücre hattında kontrol grubunda 1.saat sonunda ayırık bölgenin mesafesi 1224 µm.**B:** A549 hücre hattında kontrol grubun 24. saat sonunda ayırık bölge hücreler ile kapanmış.**C:** A549 hücre hattında Deguelin grubunda 1.saat sonunda ayırık bölgenin mesafesi 1092,691 µm. **D:** A549 hücre hattında Deguelin grubunda 24. saat sonunda ayırık bölge 275,094µm.)

5. TARTIŞMA

Dosetaksel akciğer kanserinin standart tedavisinde yer alan, oldukça toksik bir ajandır. Dosetaksel'in şiddetli derecede görülen yan etkileri saç dökülmesi, kemik iliği baskılanması, orta derecede mukozit, ödem, hipersensitivite reaksiyonları ve cilt-tırnak değişiklikleridir. Bunlar arasında en önemli yan etkiler kemik iliği üzerine olan yan etkisidir. Dosetaksel'in yan etkilerinin şiddetine göre doz kısıtlaması, tedaviye ara verilmesi ve granülosit monosit koloni stimüle edici faktörlerin (GM-CSF) kullanılması gerekebilmektedir (56). Akciğer kanseri standart tedavisinde kullanılan Dosetaksel'in oldukça toksik bir ajan olması, sitotoksitesini inhibe etmeye ve antikanser etkinliğini arttırmaya yönelik birçok araştırma yapılmasını da beraberinde getirmektedir. Literatürde Dosetaksel ile kemopreventif ajanların akciğer kanseri hücre hatları üzerinde kombine kullanımını destekleyen birçok çalışma mevcuttur (57,58,59,60,61). Son zamanlarda, bitkisel ilaçlar çok az yan etkileri ile akciğer kanseri tedavisi için çekici yaklaşımlardan biri olarak kabul edilmiştir.

Ana hedefimiz, son yıllarda yeni bir antikanser ajan olabileceği literatürde tartışılan Deguelin'in akciğer kanseri hücre hatlarında etkinliğini değişik ana yolların analizleri ile izlemektir. Bu çalışmada akciğer kanseri hücreleri için kemoterapötik bir ajan olan Dosetaksel ile potansiyel bir ajan olan Deguelin, 2'li kombinasyon halinde tedavi yönünde kullanıldı. Akciğer kanseri hücre hatlarında, Dosetaksel rejimine Deguelin ilavesi, anti-kanser etkinliğe katkısı, hücre döngüsü ve apoptotik yolak, koloni sayısı ve migrasyon üzerine etkileri açısından incelendi. Literatürde bu kombinasyon ile ilgili bir çalışma bulunmadığından bulgularımızın literatüre önemli bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Bu doğrultuda akciğer kanseri hücre hatları olan H1299 ve A549 kullanıldı.

Thamilselvan ve ark.'nın prostat kanseri hücre hatlarında DEG çalışmasında 72 saatlik DEG'in etkin dozu nM olarak elde edilmesi bu çalışmada elde edilen analiz sonuçlarını desteklemektedir (62).

H1299 ve A549 hücre hatlarında Deguelin'in IC50 dozunu belirlemek için ilk 24 saatlik yapılan deneyler sonrasındaki (4 deney) sitotoksidite testlerinde IC50 etkinliğinin çok yüksek dozlara çıkması nedeniyle 48 saatlik deneyler (4 deney) yapıldı. Ancak tekrar yüksek IC50 doz elde edildi ve sonuç olarak 72 saatlik deneylerde "düşük dozlarda" Deguelin'in etkili dozu saptandı. Deguelin'in etkili IC50 dozu 72 saatlik deneyde elde edildiği için Dosetakselin

de 72 saatlik etkili IC50 dozu belirlendi. H1299 ve A549 hücre hatlarının 72 saatlik IC50 dozlarına bakıldığında, Dosetaksel ve Deguelin'in etkin dozunun H1299 hücre hattında, A549 hücre hattına göre daha yüksek olduğu saptandı (Deguelin: A549 hücre hattında 235.2 nM, H1299 hücre hattında 144.4 nM ve Dosetaksel: A549 hücre hattında 3.41 µM, H1299 hücre hattında 2.101 µM).

Koçdor ve ark. H1299 ve A549 hücre hatlarında Dosetaksel ve Çinko çalışmasında Dosetaksel'in sitometrik analiz sonuçları bu çalışmada elde edilen analiz sonuçlarını desteklemektedir (57).

Bu bulgular üzerine akciğer kanseri hücre hatlarında diğer analizler (migrasyon, flow sitometrik analizler ve koloni analizleri) gerçekleştirildi. Belirlenen etkin dozlar ile akım sitometrik olarak hücre döngüsü ve apoptoz analizleri gerçekleştirildi. Bu kombinasyon ile ilgili literatürde bir çalışma olmadığı için hücre döngüsü ve apoptoz analizi bulgularının önemli olduğunu düşünmekteyiz. Buradan yola çıkarak kemoterapi sırasında Deguelin desteği ile kemoterapiden kaynaklanan toksik etkilerin engellenebileceği ya da azaltılabileceği öngörülebilir.

H1299 ve A549 hücre hatlarında yapılan hücre döngüsü analizlerinde ise Dosetaksel rejimine Deguelin eklenmesinde, Dosetaksel ajanının S fazında tutulan hücre oranını azalttığı gözlemlendi. H1299 hücre hattında Deguelin'in tek başına tedavi edici ajan olarak kullanımı ile kontrol grubu kıyaslandığında S fazında tutulan hücre oranını azalttığı izlendi. Buna karşın H1299 hücre hattında Dosetaksel'in tek başına tedavi edici ajan olarak kullanımı ile kontrol grubu kıyaslandığında S fazında tutulan hücre oranını arttırdığı ve A549 hücre hattında ise Deguelin ve Dosetaksel'in tek başlarına tedavi ajanı olarak kullanıldıklarında S fazında tutulan hücre oranını arttırdığı görüldü. Her iki hücre hattında Deguelin ve Dosetaksel'in tek başlarına tedavi ajanı olarak kullanıldıkları gruplar ile kontrol grubu kıyaslandığında apoptoza giden hücre oranını arttırdığı gözlemlendi. A549 hücre hattında Dosetaksel'e Deguelin eklenmesinde ise Dosetaksel'in apoptoza yönlendirdiği hücre oranında engelleyici bir etkisi olduğu belirlendi.

H1299 ve A549 hücre hatları hücre döngüsü analizinde, Dosetaksel rejimine Deguelin eklenmesinin Dosetaksel'in etkisini G0/G1 fazında arttırdığı ve G2+M fazında inhibe ettiği belirlendi. H1299 hücre hattında Deguelin ve Dosetaksel'in tekli kullanıldığı gruplar ile

kontrol grubu kıyaslandığında G2+M fazında tutulan hücre oranını arttırdıkları ancak A549 hücre hattında Deguelin'in bu hücre oranının azalmasına sebep olduğu gözlemlendi. Her iki hücre hattında Deguelin ve Dosetaksel'in tekli kullanıldığı gruplar ile kontrol grubu kıyaslandığında G0/G1 fazında tutulan hücre oranının azaldığı ve Deguelin ile Dosetaksel ile kombine edildiği gruplarda Deguelin'in Dosetaksel etkisini tetiklediği izlendi.

Thamilselvan ve ark.'nın prostat kanseri hücre hatlarında (62), Suh ve ark.'nın (63) meme kanseri hücre hatlarında DEG çalışmasındaki koloni sayısı analiz sonuçları bu çalışmada elde edilen analiz sonuçlarını desteklemektedir.

Koloni analizinde yapılan tekli ilaç çalışmasında A549 ve H1299 hücre hatlarında Dosetaksel ve Deguelin'in kontrol grubu ile kıyaslandığında koloni sayısının azalmasına sebep oldukları saptandı. H1299 hücre hattında Deguelin'in, A549 hücre hattı ile kıyaslandığında koloni sayısının azalmasında daha etkin olduğu görüldü. Literatürde Deguelin açısından bu hücre hatlarında koloni analizi, çalışmamız zaman diliminde ya yoktu ya da biz ulaşamadık.

2015 yılında Zhao ve ark.'nın yaptığı KHDAC hücre hatlarında DEG çalışmasında migrasyon analizi sonuçları bu çalışmada elde edilen analiz sonuçlarını desteklemektedir (64).

Zhao 2017 yılında başka ekip ile KHDAC hücre hatlarında DEG ile yaptığı çalışmada elde ettiği migrasyon analizi sonuçları bu çalışmadaki analiz sonuçlarını desteklemektedir (65).

H1299 ve A549 hücre hattında kontrol grupları ve Deguelin gruplarında yapılan migrasyon analizinde 24. saatte meydana gelen hücre göçünde anlamlı istatistiksel farklılık saptandı. 24.saatın sonunda elde edilen sonuçlar Deguelin'in, H1299 hücre hattında, hücrelerin üreme ve çoğalma hızını, A549 hücre hattı hücrelerine göre daha fazla inhibe ettiği gözlemlendi. Elde edilen bu sonuç H1299 hücre hattında Deguelin'in daha etkili olduğunu göstermektedir. Literatürde, yine çalışmamız zaman diliminde akciğer kanseri hücre hatlarında Deguelin'in migrasyona etkisi ile ilgili bilgiye rastlayamadık.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Deguelin'in; akciğer kanseri hücre hatlarında etkin konsantrasyonda kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği hipotezi çalışma sonuçlarımızda doğrulandı,
2. DEG+DTX kombinasyonunun akciğer kanseri hücrelerinin çoğalmasında, ilaçların tek başlarına kullanılmalarına göre daha başarılı olduğu görüldü,
3. Bu etkiyi apoptoz yollarını kullanarak gerçekleştirebilirliği ile ilgili öngörülerimiz hakkında yeterli sonuçlar elde edilemedi,
4. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle; Deguelin'in antikanser etkisinin, kanser hücrelerinin ölümüne yol açmaktan ziyade, hücrelerin yayılımını azaltarak olabileceğini ortaya koyduk.

- Sonuç olarak Deguelin, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanser hücre hatlarında antikanser ilaç adayı olarak etkilidir. Bu etkinin standart tedavide kullanılan ilaç (Docetaksel) ile artması da düşük doz kombinasyonların yapılabilmesine olanak vermesi açısından önemlidir. Antikanser etkinliği ve bu etkinin mekanizmalarını ortaya koyucu ana yolak çalışmaları bu tez araştırmasında yapılmıştır. (İnhibitör konsantrasyon, apoptoz, hücre döngüsü analizleri, migrasyon ile koloni formasyon çalışmaları). Sonuçlar bölümü 4 de yer alan ve çok önemli bulgu olarak öngördüğümüz etkinliğin, ileri araştırmalarla ortaya konabilmesi için; bundan sonraki çalışmalarımızda Deguelinin yalnız başına ve standart tedavi ilaçları ile kombinasyonlarının etkinliğini, ekip olarak akciğer kanseri deney hayvanı modellemesinde araştırmayı hedefledik.

7. KAYNAKLAR

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011;61:69-90.
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;166:1166-1196.
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2012;62:10-29.
4. Whitehead CM, Earle KA, Fetter J, Xu S, et al. Exisulind-induced apoptosis in a non-small cell lung cancer orthotopic lung tumor model augments Docetaxel treatment and contributes to increased survival. *Mol Cancer Ther*, 2003;2:479-8.
5. Pazdur R, Kudelka AP, Kavanagh JJ, Cohen PR, et al. The taxoids: Paclitaxel (Taxol®) and docetaxel (Taxotere®). *Cancer Treat. Rev.*, 1993;19:351-386.
6. Chevallier B, Fumoleau P, Kerbrat P, Dieras V, et al. Docetaxel is a major cytotoxic drug for the treatment of advanced breast cancer: A phase II trial of the Clinical Screening Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *J. Clin. Oncol*, 1995;13:314-322.
7. Valero V, Holmes FA, Walters RS, Theriault RL, et al. Phase II trial of docetaxel: A new, highly effective antineoplastic agent in the management of patients with anthracycline-resistant metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol*, 1995;13:2886-2894
8. Fossella FV, Lee JS, Shin DM, Calayag M, et al. Phase II study of docetaxel for advanced or metastatic platinum-refractory non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol*, 1995;13:645-651.
9. Kaye SB, Piccart M, Aapro M, Francis P, et al. Phase II trials of docetaxel (Taxotere®) in advanced ovarian cancer-an updated overview. *Eur. J. Cancer*, 1997;33:2167-2170.
10. Androulakis N, Kourousis C, Kakolyris S, Sarra E, et al. Monotherapy with docetaxel and granulocyte colony-stimulating factor in advanced gastric cancer. *Ann. Oncol*, 1998;9:54.
11. Couteau C, Chouaki N, Leyvraz S, Oulid-Aissa D, et al. A phase II study of docetaxel in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br. J. Cancer*, 1999;81:457-462.
12. Friedland D, Cohen J, Miller R, Voloshin M, et al. A phase II trial of docetaxel (Taxotere) in hormone-refractory prostate cancer: Correlation of antitumor effect to phosphorylation of Bcl-2. *Semin. Oncol*, 1999;26:19-23.

13. Cortes JE, Pazdur R. Docetaxel. *J. Clin. Oncol*, 1995;13:2643-2655.
14. Gueritte-Voegelein F, Guenard D, Lavelle F, Le Goff MT, et al. Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity. *J Med Chem*, 1991;34(3):992-998.
15. Ravelo AG, Estevez-Braun A, Chavez-Orellana H, Perez-Sacau E, et al. Recent studies on natural products as anticancer agents. *Curr Top Med Chem*, 2004;4:241-265.
16. Ito C, Itoigawa M, Kojima N, Tan HT, et al. Cancer chemopreventive activity of rotenoids from *Derris trifoliata*. *Planta Med*, 2004;70:585-588.
17. Kinghorn AD, Su BN, Jang DS, Chang LC, et al. Natural inhibitors of carcinogenesis. *Planta Med*, 2004;70:691-705.
18. Clark EP. A relation between rotenone, Deguelin and tephrosin. *Science (New York, NY)*, 1931;73:17-8.
19. O'Brien RD. *Insecticides: Action and Metabolism*. 1st Edition. New York: Academic Press, 1967; 159-163.
20. Murillo G, Salti GI, Kosmeder JW, Pezzuto JM, et al. Deguelin inhibits the growth of colon cancer cells through the induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Eur J Cancer*, 2002;38:2446-2454.
21. <http://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html> (Aralık, 2016).
22. <http://www.cancer.gov/> (Aralık, 2016).
23. Kılıç C. Akciğerlerin Anatomisi, Yücel O, Genç O un editörler. *Toraksik Konjenital Anomaliler ve Cerrahisi*, ilk baskı, Ankara: Derman Tıbbi Yayıncılık, 2011. P.1-3.
24. Johnson D, Shah P. Thorax. In: Standring S, editor. *Gray's anatomy*, 39th ed. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone; 2005:951-1079.
25. Sinnatamby CS. *Last's Anatomy; Regional and Applied*. 11th ed. New York: Churchill Livingstone; 2006:219-224.
26. Beadsmoore CJ, Screaton NJ. Classification, staging and prognosis of lung cancer. *European Journal of Radiology*, 2003;45:8-17
27. Buzdar AU, Freedman RS, Fossella FV. *Lung Cancer*, 2002; 281-296.
28. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *The New England journal of medicine*, 2008;359(13):1367-1380.
29. Göksel T. Akciğer Kanseri, [www.toraks.org.tr/kisokulu,4- ppt pdf/Tuncay_Goksel.pdf](http://www.toraks.org.tr/kisokulu,4-ppt pdf/Tuncay_Goksel.pdf)

30. Lung, in: Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, et al editors. Cancer Staging Manual, Sixth Edition, Chicago, American Joint Committee on Cancer, 2002. p. 171-172
31. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, et al. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J*, 2001;18(6):1059-1068.
32. Topuz E, Aydıner A. Akciğer Kanseri Tanı-Tedavi-Takip, İstanbul Konsensusu, Nobel Tıp Kitabevi, 2006.
33. Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc*, 1976;35:1332-1338.
34. Kelloff GJ¹, Johnson JR, Crowell JA, Boone CW, et al. Approaches to the development and marketing approval of drugs that prevent cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1995;4(1):1-10.
35. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures. Atlanta: American Cancer Society, 2008
36. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 1971;93(9):2325-2327.
37. Suffness M, Arbuck, S.G. and B.A. Blaylock, Taxol: clinical results and current issues in development. *Taxol: Science and Applications*, 1995;379.
38. Eiermann W, Pienkowski T, Crown J, Sadeghi S, et al. Phase III Study of DTXorubicin/Cyclophosphamide With Concomitant Versus Sequential Docetaxel As Adjuvant Treatment in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Normal, Node-Positive Breast Cancer: BCIRG-005 Trial. *J OF Cli Oncology*, 2011;29(29):3877-3884.
39. Caponigro F, Longo F, Perri F, Ionna F. Docetaxel in the management of head and neck cancer. *Anticancer Drugs*, 2009;20(8):639-645.
40. Ali SM, Hoemann MZ, Aubé J, Mitscher LA, et al. Novel cytotoxic 3'-(tert-butyl) 3'-dephenyl analogs of paclitaxel and docetaxel. *J Med Chem*, 1995;38(19):3821-3828.
41. Yamamoto Y, Zolfaghari R, Ross AC. Regulation of CYP26 (cytochrome P450RAI) mRNA expression and retinoic acid metabolism by retinoids and dietary vitamin A in liver of mice and rats. *FASEB J*, 2000;14:2119-2127.
42. Fang N, Casida JE. Anticancer action of cube' insecticide: correlation for rotenoid constituents between inhibition of NADH: ubiquinone oxidoreductase and induced ornithine decarboxylase activities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95:3380-3384.

43. Marshall LE, Himes RH. Rotenone inhibition of tubulin self-assembly. *Biochim Biophys Acta*, 1978;543:590-594.
44. Lee HY. Molecular mechanisms of Deguelin-induced apoptosis in transformed human bronchial epithelial cells. *Biochem Pharmacol*, 2004;68:1119-1124.
45. Lee HY, Suh YA, Kosmeder JW, Pezzuto JM, et al. Deguelin-induced inhibition of cyclooxygenase-2 expression in human bronchial epithelial cells. *Clin Cancer Res*, 2004;10:1074-1079.
46. "NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line supplement". *J. Cell. Biochem. Suppl*, 1996;24:1-291.
47. "ATCC Advanced Catalog Search". Retrieved, 2009-01-07.
48. "CRL-5803/NCI-H1299 cell line". LGC Promochem: Cell Biology Collection. American Type Culture Collection. Retrieved, 2008;06-22.
49. "A549 Cell Line: Human alveolar adenocarcinoma cell line -General Information". Retrieved 3 January 2012.
50. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, et al. "In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors". *Journal of the National Cancer Institute*, 1973;51(5):1417-1423.
51. Lee, E.C. Cytogenetic Analysis of Continuous Cell Lines. In *The ACT Cytogenetic Laboratory Manual*, Raven Press, New York. 2nd ed., 1991;2:107-148.
52. Paul Held Ph. D. Senior Scientist, Applications Dept., BioTek Instruments, Inc., An Absorbance-based Cytotoxicity Assay using High Absorptivity, Water-soluble Tetrazolium Salts, 2009.
53. www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols (aralık 2016)
54. eBIOSCIENCE Akım Sitometri protokolleri, <http://media.ebioscience.com/data/pdf/best-protocols/annexin-v-staining.pdf>, Erişim Tarihi: 12.02.2013
55. eBIOSCIENCE Akım Sitometri protokolleri, <http://media.ebioscience.com/data/pdf/best-protocols/cell-preparation-for-flow-cytometry.pdf>, Erişim Tarihi: 12.02.2013
56. Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG, Donehower RC. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol*, 1993;20:1-15.
57. Kocdor H, Ates H, Aydin S, Cehreli R, et al. Zinc supplementation induces apoptosis and enhances antitumor efficacy of docetaxel in non-small-cell lung cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015;9:3899-3909.

58. Chandra P, Belani, Frank Fossella , et al. Elderly Subgroup Analysis of a Randomized Phase III Study of Docetaxel plus Platinum Combinations versus Vinorelbine plus Cisplatin for First-Line Treatment of Advanced Nonsmall Cell Lung Carcinoma (TAX 326). *Cancer*, 2005 ;15;104:2766-2774.
59. Kubota K, Watanabe K, Kunitoh H, et al. Phase III randomized trial of docetaxel plus cisplatin versus vindesine plus cisplatin in patients with stage IV non-small-cell lung cancer: the Japanese Taxotere Lung Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, 2004;15:254-261.
60. Georgoulas V, Ardavanis A, Agelidou A, Agelidou M, et al. Docetaxel Versus Docetaxel Plus Cisplatin As Front-Line Treatment of Patients With Advanced Non—Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Multicenter Phase III Trial. *Clin Oncol*, 2004;1;22:2602-2609.
61. Samadi N, Ghanbari P, Mohseni M, et al. Combination therapy increases the efficacy of docetaxel, vinblastine and tamoxifen in cancer cells. *Cancer Res Ther*, 2014;10:715-721.
62. Thamilselvan V, Menon M, Thamilselvan S. Anticancer efficacy of deguelin in human prostate cancer cells targeting glycogen synthase kinase-3 b/b-catenin pathway. *Int. J. Cancer*, 2011;129:2916-2927.
63. Suh Y-H, Kim J-H, Sung MA, Boo H-J, et al. A novel antitumor activity of deguelin targeting the insulin-like growth factor (IGF) receptor pathway via up-regulation of IGF-binding protein-3expression in breast cancer. *Cancer Letters*, 2013;332:102-109.
64. 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;8(12):15582-15590.
65. Zhao D, Han W, Liu X, Cui D, et al. Deguelin inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of human non-small cell lung cancer cells by regulating NIMA-related kinase 2. *Thoracic Cancer*, 2017;8:320-327.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

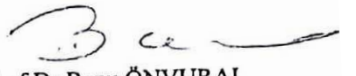
Konu: Karar hk.- 786

24.11.2014

Sayın Doç.Dr.Hilal KOÇDOR,

Kurulumuz tarafından 20.11.2014 tarih ve 1761-GOA protokol numaralı 2014/35-32 karar numarası ile görüşülen **“Dosetaksel ile Deguelin'in Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Kemoprevantif Etkinliğinin Araştırılması”** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	1761-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Dosetaksel ile Deguelin'in Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Kemoprevantif Etkinliğinin Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Hilal KOÇDOR Temel OnkolojiA.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014/35-32	Tarih: 20.11.2014
	Doç.Dr.Hilal KOÇDOR'un sorumlusu olduğu "Dosetaksel ile Deguelin'in Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Kemoprevantif Etkinliğinin Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.İşıl TEKME	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren INTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

ÖZGEÇMİŞ

AD SOYAD: Nina GHANITABE

Doğum Yılı	1985
Yazışma Adresi	Korutürk Mh. Kaüçük Sok. Aşkın Ap. No:13, D:2. Balçova/İZMİR
Telefon	0507 597 429
e-posta	nnbg1030@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim alanı	Derece	Mezuniyet yılı
İran	Zanjan Azad Üniv.	Sağlık Bilimleri Ens.	Mikrobiyoloji	Lisans	2007
Türkiye	Dokuz Eylül Üniv.	Sağlık Bilimleri Ens.	Moleküler Tıp	Yüksek lisans	2018

UZMANLIK ALANLARI

UZMANLIK ALANLARI
Mikrobiyoloji, Moleküler Tıp

Kurslar

Adı	Tarih	Yer
Onkoloji Alanında Uygulamalı İstatistik Çözümleme Kursu	9-10 Haziran 2014	DESEM-İZMİR
1. Onkolojide Araştırma Uygulamaları Kursu- Hazırlık	01 Nisan 2015	İZMİR

KONGRELER

Adı	Tarih	Yer
2.Ulusal Sağlık Bilimleri Lisansüstü Öğrenci Kongresi, Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu	17-20 Nisan 2014	MANİSA
1.Uluslararası Tıp Öğrenci Kongresi	20-22 Mart 2015	İZMİR
3 rd Anticancer Agent Development Congress (MOKAD)	18-19 May 2015	İZMİR

SÖZLÜ BİLDİRİLER

Serap ÇELEBİ YILMAZ, Nina GHANİTABE , Hakan CENGİZ, Halil ATEŞ, Tarık SALMAN, Mehmet Ali KOÇDOR, Hilal KOÇDOR, Deguelin'in Deneysel Meme Kanseri Tedavisindeki Etkinliğinin Araştırılması, 10-12 Kasım 2017, KOCAELİ
Serap ÇELEBİ, Nina GHANİTABE , Hakan CENGİZ, Halil ATEŞ, Tarık SALMAN, Mehmet Ali KOÇDOR, Hilal KOÇDOR, Deguelin'in <i>in vitro</i> Antikanser Belirteçlere Etkinliği, II. Türkiye <i>in vitro</i> Diyagnostik (IVD) Sempozyumu "BİYOBELİRTEÇLER" (Hastalıkta ve Sağlıkta), 10-12 Mayıs 2017, İZMİR
Serap CELEBI, Nina GHANİTABE , Hakan CENGİZ, Halil ATEŞ, Mehmet Ali KOÇDOR, Aziz KARAOĞLU, Meral KARAMAN, Hilal KOÇDOR, Anti-Cancer Efficacy Of Deguelin Against Lung Cancer Cells With And Without Docetaxel, 1st International Cell Death Research Congress , 4-7 Mayıs 2016, İZMİR
Serap ÇELEBİ, Nina GHANİTABE , Hakan CENGİZ, Halil ATEŞ, Mehmet Ali KOÇDOR, Aziz KARAOĞLU, Meral KARAMAN, Hilal KOÇDOR, Dosetaksel İle Deguelin'in Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Kemoprevantif Etkinliğinin Araştırılması, Türk Biyokimya Derneği XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi 3- 6 Kasım 2015, ANTALYA